

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 29 (1938)
Heft: 1-2

Artikel: Versuche über die unter dem Einfluss der Bakterienentwicklung in der Milch auftretenden Veränderungen, ein Beitrag zur Abklärung des Begriffes der "erstickten" Milch [Fortsetzung]
Autor: Häni, J.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983350>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 24.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Man sieht, dass in diesen Fällen die 2,3-Butylenglykolwerte wesentlich tiefer liegen als bei unseren Versuchen (Tab. 1 u. 2). Dies spricht unabhängig vom zu niedrigen Acetylmethylcarbinolgehalt eindeutig für die Fälschung.

In allen Versuchen zeigten die frischen Abläufe das charakteristische Essigbukett noch kaum entwickelt. Es entsteht daher erst nachträglich bei der Lagerung.

Versuchsanordnung und weitere experimentelle Einzelheiten geben wir in der nächsten Mitteilung mit anderen Ergebnissen bekannt.

Für experimentelle Mitarbeit danken wir den Herren Dr. J. Hartnagel, E. Keller und M. Plüss.

Versuche über die unter dem Einfluss der Bakterienentwicklung in der Milch auftretenden Veränderungen, ein Beitrag zur Abklärung des Begriffes der „erstickten“ Milch.

Von J. HÄNI, Lebensmittelinspektor, Bern.

(Fortsetzung)

c) Lufterneuerung über der Milchsicht.

Versuch 18. Frische Mischmilch aus der Käserei Bd. wurde in $\frac{1}{2}$ Liter fassende Flaschen abgefüllt. Die eine Hälfte der Proben bewahrten wir verschlossen auf; bei der andern wurde die Luft über der Milch in der früher beschriebenen Weise ständig erneuert. Die durch Bakterien gebildeten flüchtigen Stoffwechselprodukte wurden dadurch entfernt und durch fortwährende Zufuhr frischer Luft für die an der Rahmoberfläche befindlichen Organismen günstige aerobe Verhältnisse geschaffen.

Die frische Milch wies einen Säuregrad von 6,3 auf und enthielt 150 000 Keime. Diese gehörten folgenden Bakterienarten bzw. Gruppen an: Gelatine nicht verflüssigende Kokken 20%, *Bacterium fluorescens* 3,5%, alkalibildende Kurzstäbchen 39,5%, *Coli-aerogenes*-Bakterien 3,5% und Milch koagulierende, Gelatine nicht verflüssigende Stäbchen 33,5%.

Die Aufbewahrung der Milch erfolgte auch wieder bei 18–20°. Die bakteriologische Untersuchung der Rahmschicht wurde nach 12 und 24 Stunden vorgenommen. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

Nach den Keimzahlen zu schliessen, hat keine der beiden Aufbewahrungsmethoden einen besondern Einfluss auszuüben vermocht. Es hat allerdings den Anschein, dass bei der 24 Stunden alten Milch das *Bact. coli* durch die ständige Lufterneuerung über der Rahmschicht begünstigt worden sei. Der *Coli*-Titer ist hier 100mal grösser als in der verschlossenen Probe.

Ein Unterschied der qualitativen Zusammensetzung des auf den Milchzuckeragar-Platten ermittelten Keimgehaltes konnte erst bei der 24 Stunden alten Milch festgestellt werden. Der Rahm der verschlossen aufbewahrten Milch enthielt 56,6% Milchsäurestreptokokken gegenüber 87% im belüfteten Rahm. Im ersten Falle waren noch 40% peptonisierende bewegliche Stäbchen gewachsen, die auf sterilem Rahm einen kohl- bis erdbeer- und

Tabelle 20.

Alter der Milch Std.	Art der Aufbewahrung	Säuregrad	Keimzahl	Milchsäure- Streptokokken	Mikrokokken	Gelatine verfl. Stäbchen	Alkalibildende Kurzstäbchen	Andere Organismen	Fettsäure- Bakterien	Coli- Titer	Fett- spaltende Bakterien auf Rahmagar gewachsen
Frisch		6,3	150 000	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/9	10	30 000
13	Verschlossen: Rahm M'milch	6,0	58 000 000	14,0	—	42,0	42,0	2,0	40,0	100 000	27 000 000
		6,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ständige Lüfterneue- rung über d. Milch: Rahm M'milch	5,6	58 000 000	16,5	—	33,5	36,5	13,5	40,0	1 000 000	44 000 000
		6,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	Verschlossen: Rahm M'milch	12,2	1050 Mill.	56,6	—	40,0	—	3,4	23,0	100 000	25 000 000
		7,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ständige Lüfterneue- rung über d. Milch: Rahm M'milch	14,0	1100 Mill.	87,0	—	—	—	13,0	—	10 000 000	9 000 000
		7,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—

himbeerähnlichen Geruch erzeugten. Im belüfteten Rahm waren diese Organismen bei der gleichen Verdünnung nicht mehr nachweisbar.

Es ist daher erklärlich, warum hier auch der Säuregrad stärker zugenommen hatte. Was aber bei beiden Proben auffällt, ist der grosse Unterschied im Säuregehalt der Rahm- und Magermilchschicht: 4,4 bzw. 6,8 Säuregrade. Wieder ein deutlicher Beweis, dass die Säuerung der Milch im Rahm beginnt. Die entsprechende Vollmilch wies einen Säuregrad von 7,8 (verschlossen) bzw. 8,2 (belüftet) auf.

Die ersten Geruchsveränderungen wurden bei der verschlossen aufbewahrten Milch nach 16 Stunden verspürt. Der Geruch war ranzig-säuerlich, nach 22 Stunden waschlappenartig und nach 24 Stunden schwach futterig-sauer. Der Rahm hingegen, über dem die Luft ständig erneuert wurde, war beim Abheben des Flaschenverschlusses geruchlos. Hier sind eben die Geruchsstoffe fortwährend entfernt worden. Dafür bestanden bei den beiden Proben Unterschiede im Geschmack. Er war bei der verschlossenen räss-säuerlich bis sauerteigähnlich, dagegen rein säuerlich bei dem unter dem Einfluss der ständigen Lüfterneuerung gestandenen Rahm.

Die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora des belüfteten Rahmes ist nicht ohne weiteres verständlich. Warum sollen nun gerade hier die aeroben Keime unterdrückt und dafür die Milchsäurestreptokokken begünstigt worden sein? Hierzu ist zu bemerken, dass der belüftete Rahm eine bedeutend stärker zusammenhängende Decke bildete. Dies mag zum Teil auf dem höheren Säuregehalt beruhen. Dieser aber ist sekundär. Primär ist das Austrocknen der Rahmoberfläche. Trotzdem die eingesogene Luft durch Wasser geleitet wurde, vermochte der ständige Luftstrom der obersten Rahmschicht doch soviel Wasser zu entziehen, dass sich eine luftundurchlässige Haut bildete. Damit aber waren die aeroben Bakterien

der günstigen Wachstumsbedingungen beraubt. Um so besser waren sie für die in der tiefern Rahmschicht vorhandenen Milchsäurestreptokokken. Dass die aeroben Bakterien durch die ständige Lufterneuerung anfänglich begünstigt worden waren, geht aus den vom Rahm der 13 Stunden alten Milch auf den Rahmagar-Platten ermittelten Keimzahlen hervor. Hier wurden nur die fettspaltenden Kolonien gezählt. Es waren hauptsächlich alkali-bildende Kurzstäbchen. Auf diese Fettspalter ist wohl auch der schon nach 13 Stunden aufgetretene ranzig-säuerliche Geruch zurückzuführen.

Versuch 19. Wir haben im vorhergehenden Versuch darauf hingewiesen, dass bei der ständigen Lufterneuerung über der Rahmschicht diese in den obersten Partien austrockne. Daran reihten wir noch einen Versuch, wo wir die Luft anstatt durch Wasser durch Schwefelsäure leiteten. Einzelne Milchproben konnten auf diese Weise unter besonders trockener Luft aufbewahrt werden. Zum Vergleich stellten wir die Milch nochmals in offenen und geschlossenen Gefässen sowie in hoher und niedriger Schicht auf.

Die Milch entnahmen wir einer Transportkanne der Käserei Bl. Die Versuchsanordnung war folgende:

1. 2-dl-Milchflaschen, verschlossen, Schichthöhe der Milch 10 cm.
2. Wie 1, aber ständige Lufterneuerung über der Milch, Luft durch Wasser geleitet.
3. Wie 2, aber Luft durch Schwefelsäure geleitet.
4. Glasschale, bedeckt, Schichthöhe 3 cm.
5. Wie 4, Glasschale offen.

Der Säuregrad der frischen Milch betrug 6,0. Die Bakterienflora (Totalkeimzahl 39 000) hatte folgende Zusammensetzung: 25% alkalibildende Kurzstäbchen, 50% Gelatine verflüssigende und nicht verflüssigende weisse und gelbe Kokken, 15% zitronengelbe Stäbchen, 10% plumpe, indifferente Stäbchen.

Nach 20stündiger Aufbewahrung bei 18—20° konnten folgende Gerüche festgestellt werden:

- Probe 1: eigentümlich süsslich-säuerlich,
 Probe 2: sehr schwach säuerlich,
 Probe 3: sehr schwach säuerlich,
 Probe 4: ranzig-säuerlich,
 Probe 5: sehr schwach säuerlich.

Die Rahmdecke der Proben 2, 3 und besonders 5 war zähe und schwer zerteilbar. Der Rahm der 2. und 3. Probe dagegen war sämig und liess sich leicht mit der Milch vermischen.

Die bakteriologische Untersuchung, die Bestimmung der Reduktionszeit und des Säuregrades erfolgten nach 20 Stunden, wobei diesmal die nicht entrahmte Milch verwendet wurde.

Tabelle 21.

Art der Aufbewahrung	Säure- grad nach		Reduk- tase nach		Keimzahl nach 20 Std.	Milchsäure- Streptokokken	Mikrokokken	Alkalibildende Kurzstäbchen	Andere nicht verfl. Stäbchen	Gelatine verfl. Stäbchen	Andere Organismen	Fettsaltende Bakterien
	20 Std.	31 Std.	20 Std.	31 Std.								
1. Verschlossen . . .	6,1	6,8	Min.	Min.	18 300 000	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2. Lufterneuerung durch Wasser	6,0	6,4	89	12	18 400 000	14,0	34,0	30,0	—	9,0	13,0	39,0
3. Lufterneuerung durch Schwefelsäure . . .	6,0	6,0	96	18	16 300 000	11,0	23,0	38,0	28,0	—	—	28,0
4. Nied. Schicht, bedeckt	6,0	6,4	89	12	20 000 000	11,0	5,0	32,0	21,0	21,0	10,0	53,0
5. » » , offen .	6,0	6,4	113	26	16 500 000	10,0	15,0	30,0	20,0	10,0	15,0	30,0

Bis zum Auftreten der geruchlichen Veränderung hatte der Keimgehalt der Milch um das 400- bis 500fache zugenommen. Der Säuregrad aber war noch unverändert. Es ist also durchaus möglich, schon auf Grund des Geruches Schlüsse auf die Keimvermehrung zu ziehen, bevor der Säuregrad der Milch messbar zugenommen hat. Aber immer trifft es nicht zu, wie wir früher schon gezeigt haben. Sehr oft wies die Milch erst dann einen veränderten Geruch auf, wenn der Säuregrad schon in geringem Masse zugenommen hatte. Es mag dies bis zu einem gewissen Grade auch damit zusammenhängen, dass unser Geruchssinn nicht immer gleich empfindlich ist.

Viel früher als der Säuregrad hat die Reduktaseprobe die erfolgte Keimvermehrung angezeigt. Die Reduktionszeiten betrugen nur 89 bis 113 Minuten. Die Auffassung, die «erstickte» Milch zeichne sich durch eine kurze Reduktionszeit bei relativ niedrigem Säuregrad aus, findet hier ihre Bestätigung. Die Reduktaseprobe gibt bedeutend früher Aufschluss über eine stattgefundene Keimvermehrung. Ausserdem ist sie auch empfindlicher als die Geruchsprüfung.

Die Art der Aufbewahrung der Milch kommt in allen drei Untersuchungsergebnissen (Keimgehalt, Reduktionszeit, Säuregrad) nicht sehr ausgesprochen zum Ausdruck. Allerdings weisen die beiden Proben 3 und 5, deren Rahm am stärksten ausgetrocknet war, die geringsten Keimzahlen auf. Auch sind hier die Reduktionszeiten am längsten und der Säuregrad nahm, wenigstens bei der Probe 3 (Luft durch Schwefelsäure geleitet), sehr langsam zu. Die Unterschiede in den Keimzahlen müssen aber doch als verhältnismässig gering bezeichnet werden. Am deutlichsten machte sich der Einfluss des Zudeckens geltend. Die verschlossen aufbewahrte Milch enthielt pro cm^3 4 Millionen mehr Keime. In der offenen Schale trocknete die Rahmschicht derart aus, dass sie eine zähe Decke bildete.

Viel weniger trocknete diesmal die belüftete Rahmschicht aus, wo die Luft durch Wasser geleitet wurde. Aber auch der Unterschied in der Schichthöhe der Milch trat hier nicht so deutlich zutage wie in andern Versuchen. Immerhin säuerte die hohe Schicht etwas rascher als die niedrige.

Weichen die Keimzahlen weniger stark voneinander ab, so sind die Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung der Keimflora deutlicher. Die fettzersetzenden Bakterien, die bekanntlich obligat aerob sind, machten in den Proben 3 und 5 nur 28 bzw. 30% der Bakterienflora aus, während jene Spaltpilze in den drei andern Proben, in denen der Rahm nicht oder nur wenig ausgetrocknet war, zu 39—60% vertreten waren. Dagegen haben sich die alkalibildenden Kurzstäbchen in allen drei Proben ungefähr gleich stark zu vermehren vermocht. Im grossen und ganzen lässt sich aber aus diesen Versuchsergebnissen auch eine wichtige Rolle der Rahmschicht für das Keimwachstum in der Milch ableiten.

Im übrigen wurde die qualitative Zusammensetzung des Keimgehaltes der fünf Proben nicht wesentlich beeinflusst. Ueberall liessen sich die Milchsäurestreptokokken noch in verhältnismässig geringem Prozentsatze nach-

weisen. Die Mikrokokken und die alkalibildenden Kurzstäbchen, teilweise auch peptonisierende Stäbchen, herrschten vor. Dabei waren die Vertreter dieser Gruppe mehrheitlich fettzersetzend. Die Kokken gehörten hauptsächlich einem grauen Typus an. Sie koagulierten die Milch und erzeugten darin einen baldrianähnlichen Geruch. Die Milchsäurebakterien bestanden zu ungefähr gleichen Teilen aus dem *Streptococcus lactis* und einem schwach säuernden, Milch nicht koagulierenden, in kurzen Ketten wachsenden *Streptococcus*. In den Proben 3, 4 und 5 wurden verhältnismässig viel spindelförmige, Gelatine nicht verflüssigende Kurzstäbchen gefunden, die in Milch einen schwachen widerlichen Estergeruch erzeugten. Die alkalibildenden Kurzstäbchen bildeten auffallend viele hypertrophe Zellen, die in oft mehr oder weniger stark gekrümmten Ketten anzutreffen waren.

Infolge des starken Vorherrschens der Nichtsäurebildner und ihrer Fähigkeit, Geruchsstoffe zu erzeugen, muss der «stickige» Geruch der hier untersuchten Milch in erster Linie jenen Organismen zugeschrieben werden. Zweifellos spielten die fettspaltenden Bakterien auch hier wieder eine wichtige Rolle. Denn dem Rahm der aufbewahrten Milch entströmte beim Abdecken des Gefässes teilweise ein ranzig-säuerlicher Geruch. Aber auch am Zustandekommen der mehr säuerlich riechenden Stoffe waren die fettspaltenden Organismen wohl mitbeteiligt.

d) Untersuchungen über die Entwicklung der Rahmflora in kurzen Zeitabständen.

Versuch 20. Die aus dem Transportgefäss des Landwirtes Z. entnommene Morgenmilch wurde zu 300 cm³ in bedeckten Bechergläsern bei 15° und 18–20° aufgestellt.

Die bakteriologische Untersuchung der Rahmdecke wurde alle 3 Stunden bzw. nach 12, 24, 33 und 48 Stunden bei der bei 15° aufbewahrten Milch vorgenommen. Dabei wurde von der gleichen Probe an 10 verschiedenen Stellen der Rahmoberfläche je eine Oese Material entnommen und nach gründlichem Verreiben an der Glasröhrchenwand in 10 cm³ sterilen Wassers aufgeschwemmt. Von dieser Aufschwemmung stellten wir entweder direkt oder nach zehnfacher Verdünnung Oesenausstriche auf gewöhnlichem Schrägagar her. Gleichzeitig wurden auch Kulturen auf Nilblausulfat-Rahmagarplatten angelegt und, teilweise in etwas grösseren Zeitabständen, der Coli-Titer bestimmt sowie in besonderen Proben der Säuregrad der Rahm- und Magermilchschicht.

Die Keimzahl berechneten wir auf 1 cm² Rahmoberfläche und 1 mm Tiefe, was 0,1 cm³ Rahm entspricht.

Die frische Milch enthielt 114000 Keime, die folgenden Arten angehörten: Milchsäurestreptokokken 90%, plumpe, nicht verflüssigende Stäbchen 4%, Mikrokokken 6%. Schon die frische Milch enthielt in überwiegender Mehrzahl Milchsäurestreptokokken, die auch im Verlaufe der Aufbewahrung immer mehr oder weniger vorherrschten.

Aufbewahrungstemperatur 18–20°. Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, war der Keimgehalt der Rahmoberfläche ausserordentlich hoch. Schon nach 3 Stunden waren in 0,1 cm³ 900000 Keime vorhanden, welche Zahl sich in den folgenden 3 Stunden nahezu verzehnfachte. Nach weitem 15 Stunden enthielt die gleiche Menge Oberflächenrahm bereits 100 Millionen Bakterien. Und nach 24 Stunden waren es bereits 800 Millionen.

Tabelle 22.

Alter der Milch Std.	Bezeichnung	Säuregrad	Fettspaltende, auf Nilblausulfat- rahmagar gewachsene Keime	Gesamt- Keimzahl (Agar- ausstrich)	Milchsäure- Streptokokken	Mikrokokken	Alkalibildende Kurzstäbchen	Gelatine verf. Stäbchen	Andere Organismen	Coli- aerogenes
Aufbewahr. bei 20°										
3	Rahm	—	40	900 000	90,0	3,9	—	—	6,1	100
6	Rahm	—	390	8 000 000	96,2	1,3	2,5	—	—	100
9	Rahm	—	2 000	12 000 000	83,0	16,0	1,0	—	—	10 000
12	{ Rahm	6,2	12 000	36 000 000	84,8	13,5	1,7	—	—	10 000
	{ M'milch	6,5	—	—	—	—	—	—	—	—
15	Rahm	—	300 000	100 000 000	89,2	4,6	6,2	—	—	10 000
18	{ Rahm	6,9	550 000	76 000 000	83,2	1,2	15,6	—	—	—
	{ M'milch	6,9	—	—	—	—	—	—	—	—
21	Rahm	—	3 000 000	350 000 000	77,3	14,2	5,7	2,8	—	—
24	{ Rahm	9,4	37 000 000	800 000 000	84,2	7,2	8,6	—	—	10 000 000
	{ M'milch	9,0	—	—	—	—	—	—	—	—
28	{ Rahm	14,2	80 000 000	5 000 000 000	67,4	—	4,0	28,6	—	—
	{ M'milch	13,0	—	—	—	—	—	—	—	—
Aufbewahr. bei 15°										
12	Rahm	—	500	500 000	89,8	5,8	0,8	—	3,6	—
24	{ Rahm	5,5	200 000	34 000 000	70,8	7,0	22,2	—	—	1 000 000
	{ M'milch	6,2	—	—	—	—	—	—	—	—
33	{ Rahm	7,3	18 500 000	520 000 000	64,7	19,6	15,7	—	—	100 000 000
	{ M'milch	6,8	—	—	—	—	—	—	—	—
48	{ Rahm	15,2	100 000 000	3 000 000 000	18,8	—	74,9	—	6,3	100 000 000
	{ M'milch	13,3	—	—	—	—	—	—	—	—

Hierbei ist zu bemerken, dass sich entsprechend dem starken Vorkommen in der frischen Milch die Milchsäurestreptokokken am stärksten vermehrten. Sie wurden somit trotz der ausgesprochen *aeroben* Verhältnisse in ihrem Wachstum nicht wesentlich beeinträchtigt. Dies lässt den Schluss zu, dass es eben nicht möglich ist, durch Begünstigung des Luftzutrittes die Haltbarkeit der Milch zu erhöhen, sofern damit nicht eine Abkühlung verbunden ist.

Mit zunehmendem Alter der Milch hatte der prozentuale Gehalt der Milchsäurebakterien in der Rahmoberfläche abgenommen. Aerobe Stäbchenbakterien und Mikrokokken vermochten sie etwas zurückzudrängen.

Die absolute Zahl der fettspaltenden Keime (auf Nilblausulfat-Rahmagarplatten) stieg fortwährend an, sodass sie selbst in der 28 Stunden alten Milch, deren Rahm bereits einen Säuregrad von 14,2 aufwies, noch in einer Menge von 80 Millionen pro 0,1 cm³ Rahm vorhanden waren. Sie mussten sich also auch noch in dem durch die Milchsäurebakterien gesäuerten Rahm bedeutend vermehrt haben. An der Gesamtkeimzahl gemessen, machten sie allerdings nur 1,6%, bei der 24 Stunden lang gelagerten Milch 4,4% aus.

Die fettspaltenden Bakterien gehörten vor allem der Fluoreszenten-Gruppe an; die alkalibildenden Kurzstäbchen waren seltener. Von 15 Stunden an trat auch das *Bact. prodigiosum* auf.

Der prozentuale Anteil der Mikrokokken nahm in den ersten 12 Stunden zu, ging in den folgenden Stunden wieder etwas zurück, zeigte nach 21 Stunden nochmals eine kleine Steigerung, um dann auf Null abzusinken. Der Gehalt an Coli-aerogenes-Bakterien nahm nur langsam zu, erreichte aber nicht die Höhe der Kokken und fettspaltenden Organismen.

Aufbewahrung bei 15°. Entsprechend der niedrigeren Temperatur ging die Keimvermehrung langsamer vor sich. Nicht nur die Milchsäurestreptokokken und die der Coli-Gruppe angehörenden Organismen, sondern auch die fettspaltenden Bakterien vermehrten sich weniger rasch. Die Zusammensetzung der Rahmflora zeigt ein etwas anderes Bild (Tabelle 22). Auf den Agarausstrichen waren mehr alkalibildende Kurzstäbchen gewachsen. In der obersten Rahmschicht der 48 Stunden alten Milch vermochten sie sogar die Oberhand zu gewinnen.

Die während der Aufbewahrungszeit vorgenommenen *Geruchsprüfungen* führten zu folgendem Ergebnis:

Aufbewahrung bei 20°:

Nach 15 Stunden: herb-adstringierend.

Nach 21 Stunden: adstringierend-säuerlich, oft auch essigsäureähnlich bis ranzig.

Nach 24 Stunden: scharf, adstringierend, auch an Waschlappen erinnernd.

Aufbewahrung bei 15°:

Nach 24 Stunden: der Rahm war etwas zäher, aber geruchlos.

Nach 30 Stunden: schwach ranzig bis adstringierend.

Nach 48 Stunden: futterig-sauer.

Die erste Geruchsveränderung wurde verspürt, nachdem der Säuregrad des Rahmes bereits gestiegen war (um den Wert zwischen 0,3 und 0,7). Die Bakterienflora bestand zu dieser Zeit aus 89,2% Milchsäurestreptokokken, 4,6% Mikrokokken und 6,2% alkalibildenden Kurzstäbchen. Und als der adstringierende, ranzig-säuerliche Geruch besonders deutlich wahrgenommen werden konnte, setzte sich der Keimgehalt zusammen aus: 77,3% Milchsäurestreptokokken, 14,2% Mikrokokken, 5,7% alkalibildenden Kurzstäbchen und 2,8% Gelatine verflüssigenden Stäbchen.

Bei 15° hatte der Säuregrad des Rahmes bereits um 1,3 zugenommen, als nach 33 Stunden erstmals ein schwach adstringierender Geruch festgestellt werden konnte. 64,7% des Gesamtkeimgehaltes waren Milchsäurestreptokokken, 19,6% Mikrokokken und 15,7% alkalibildende Kurzstäbchen.

In beiden Fällen, bei der Aufbewahrung der Milch bei Zimmertemperatur und bei 15°, herrschten zur Zeit des ersten Auftretens der geruchlichen Veränderungen die Milchsäurestreptokokken vor. Auf sterile Magermilch verimpft, erzeugten diese jedoch ausnahmslos einen angenehm schwach säuerlichen, niemals aber einen adstringierenden Geruch. Auch die andern Keimarten produzierten in Reinkulturen diesen Geruch nicht, sodass man seine Entstehung auch hier nur dem Zusammenwirken der verschiedenen Bakteriengruppen zuschreiben kann.

e) Aufbewahrung der Milch unter Kohlensäure und reinem Sauerstoff.

Es wurde früher schon erwähnt, dass frische Milch ungefähr 6% Kohlensäure und geringe Mengen anderer Gase enthalte. Diese gasförmigen Körper entweichen durch das Umgiessen, das Rühren und das Kühlen am Berieselungskühler zum Teil. Werden die Transportgefässe unmittelbar nach dem Melken verschlossen, sammeln sich die flüchtigen Stoffe im Luftraum zwischen Milch und Deckel. Diese eingeschlossenen Gase sollen nach bestehenden Auffassungen das «Ersticken» der Milch verursachen.

Obwohl unsere Untersuchungen bereits gezeigt haben, dass der vorwiegend aus Kohlensäure bestehende Gasgehalt an den bakteriellen Veränderungen der Milch nicht in dem Masse beteiligt ist, wie vielfach angenommen wird, führten wir doch auch solche Versuche durch, in denen die Milch unter reiner Kohlensäure aufbewahrt wurde. Im Vergleich dazu verwendeten wir reinen Sauerstoff und gewöhnliche Luft.

Die Milch wurde zu je 2½ dl in weithalsigen Halbliterflaschen aufbewahrt. Die Einführung der Gase in den über der Milch befindlichen Luftraum erfolgte in der im Abschnitt «Arbeitsverfahren» beschriebenen Weise. Die Aufbewahrungstemperatur betrug 18–20°.

Die Untersuchung der Rahmschicht wurde erst dann vorgenommen, wenn bei der unter gewöhnlichen Bedingungen in verschlossener Flasche aufbewahrten Kontrollprobe die ersten Geruchsveränderungen festgestellt werden konnten. Dabei legten wir Kulturen sowohl von der Rahmoberfläche als auch von der ganzen Rahmschicht an. Im ersten Falle wurde das Untersuchungsmaterial mit einer kalibrierten Oese entnommen, in Wasser aufgeschwemmt und alsdann auf gewöhnlichem Schrägagar quantitativ ausgestrichen. Um Vergleichszahlen zu erhalten, wurde diesmal der Keimgehalt der Rahmoberfläche ebenfalls pro cm³ Rahm berechnet.

Versuch 21. Versuchsmilch aus dem Transportgefäss des Lieferanten H. In der frischen Milch herrschten schwach säuernde Milchsäurestreptokokken vor. Diesen gehörten 81% der auf Agarplatten gewachsenen Kolonien an. Daneben entfielen 9,5% auf weisse Mikrokokken und 9,5% auf alkalibildende Kurzstäbchen.

Die erste Geruchsveränderung, adstringierend-säuerlich, wurde nach 23 Stunden wahrgenommen. Unmittelbar nach der kulturellen Verarbeitung der drei Rahmproben unterzogen wir diese sowie die Magermilch einer eingehenden Geruchsprüfung. Um die Unterschiede besser erkennen zu können, wurden sowohl Rahm als Milch im Wasserbad erwärmt. Wir stellten folgende Gerüche fest:

Aufbewahrung unter	Rahm	Magermilch
Sauerstoff . . .	Anfänglich herb, dann adstringierend-säuerlich, scharf.	Erst kurz vor dem Aufkochen rein, angenehm, schwach säuerlich.
Kohlensäure . .	Anfänglich geruchlos, erst beim Erwärmen schwach säuerlich.	Angenehm, schwach säuerlich, besonders kurz vor dem Aufkochen.
gewöhnlicher Luft	Anfänglich fast geruchlos, nach leichtem Erwärmen adstringierend-säuerlich.	Nach stärkerem Erwärmen angenehm säuerlich bis schwach adstringierend.

Die übrigen Untersuchungsergebnisse sind aus Tabelle 23 ersichtlich.

Sowohl hinsichtlich des Geruches als auch des Keimgehaltes muss die unter Kohlensäure aufbewahrte Milch am günstigsten beurteilt werden. Während der Rahm der ersten und dritten Probe (unter Sauerstoff bzw. gewöhnlicher Luft) einen unangenehmen, adstringierenden, teilweise scharfen Geruch aufwies, war die zweite Probe (unter Kohlensäure) nahezu geruchlos oder höchstens schwach säuerlich. Bei den Proben 1 und 3 sind auch frühere Befunde bestätigt worden: die Gerüche traten immer zuerst im

Tabelle 23.

Alter der Milch Std.	Aufbewahrungsart	Säure-grad		Keimzahl	Milchsäure-Streptokokken	Mikrokokken	Gelatine verfl. Stäbchen	Alkalibildende Kurzstäbchen	Andere Organismen	Fettpaltende Bakterien
		Rahm	Magermilch							
23	Versuch 22				0/0	0/0	0/9	0/0	0/0	0/0
	Unter Sauerstoff:									
	Ganze Rahmschicht .	6,7	6,8	88 000 000	8,0	60,0	8,0	24,0	—	16,0
	Rahmoberfläche . .			440 000 000	11,3	20,4	—	59,3	9,0	59,3
	Unter Kohlendioxyd:									
	Ganze Rahmschicht .	6,1	7,6	11 000 000	61,5	38,5	—	—	—	—
	Rahmoberfläche . .			56 000 000	75,0	25,0	—	—	—	—
	Unter gewöhnlicher Luft:									
	Ganze Rahmschicht .	6,0	6,7	140 000 000	46,0	25,0	—	21,0	7,0	21,0
	Rahmoberfläche . .			880 000 000	23,0	33,0	5,5	38,5	—	44,0
24	Versuch 23									
	Unter Sauerstoff:									
	Ganze Rahmschicht .	7,6	6,9	740 000 000	40,0	—	43,4	6,6	10,0	40,0
	Rahmoberfläche . .			1 200 000 000	41,3	—	58,7	—	—	58,7
	Unter Kohlendioxyd:									
	Ganze Rahmschicht .	8,0	8,2	156 000 000	95,0	—	5,0	—	—	5,0
	Rahmoberfläche . .			380 000 000	97,3	—	—	—	2,7	2,7
	Unter gewöhnlicher Luft:									
	Ganze Rahmschicht .	6,8	7,1	450 000 000	40,0	3,4	40,0	13,3	3,3	40,0
	Rahmoberfläche . .			4 000 000 000	—	—	80,0	20,0	—	100,0

Rahm auf, während die darunter stehende Milch noch geruchlos war oder erst eine schwache Geruchsveränderung aufwies.

Im Rahm der unter Kohlensäure gestandenen Milch wurde der kleinste Keimgehalt festgestellt. Die Magermilch aber wies den höchsten Säuregrad auf. Die stärkere Säurezunahme beruhte jedoch nicht auf Bakterientätigkeit, sondern rührte einzig davon her, dass sich ein Teil der Kohlensäure gelöst hatte.

Die Bakterienflora wurde durch das Kohlendioxyd in deutlicher Weise beeinflusst. Die Milchsäurestreptokokken herrschten vor. Aber auch die Mikrokokken, zur Gattung Tetracoccus gehörend, vermochten sich beträchtlich zu vermehren. Die aeroben Stäbchen dagegen blieben aus.

Ganz anders war der Keimgehalt in den Proben 1 und 3 zusammengesetzt. Die Milchsäurestreptokokken waren hier zurückgeblieben. Dafür haben sich die alkalibildenden Kurzstäbchen und zum Teil auch die Mikrokokken um so stärker entwickelt. Die ersteren machten 24 bzw. 21%, in der Rahmoberfläche sogar 59 bzw. 38% des Keimgehaltes aus.

Trotz der sehr günstigen Bedingungen für die aeroben Bakterien bleiben die genannten Keimzahlen der Probe 1 hinter denjenigen der dritten Probe zurück. Offenbar steht den aeroben Bakterien der Sauerstoff in der gewöhnlichen Luft in genügender Menge zur Verfügung, sodass eine

vermehrte Sauerstoffzufuhr gar keine günstigen Wirkungen hervorzurufen vermag.

Wie enorm sich die Bakterien in der obersten Rahmdecke vermehrten, zeigen die dort ermittelten Spaltpilzmengen im Vergleich zum Keimgehalt der gesamten Rahmschicht. Bei der unter Kohlensäure aufbewahrten Milch entwickelten sich auch die Milchsäurestreptokokken an der Oberfläche weit- aus lebhafter als in den untern Partien des Rahmes oder gar in der Milch.

Versuch 22. Mischmilch aus der Käserei Hb. Die frische Milch enthielt 68000 Keime, die folgenden Gruppen angehörten: Mikrokokken 50%, Gelatine verflüssigende bewegliche Stäbchen 15%, gelbe nicht verflüssigende Stäbchen 20%, fluoreszierende, nicht verflüssigende Stäbchen 10%, alkalibildende Kurzstäbchen 5%.

Bei der Kontrollprobe konnte nach 24 Stunden die erste Geruchsveränderung festgestellt werden. Die hierauf bei den drei Proben durchgeführten Geruchsprüfungen führten zu ähnlichen Ergebnissen wie im vorherigen Versuch:

Aufbewahrung unter	Rahm	Magermilch
Sauerstoff . . .	Deutlich ranzig, aber vermischt mit anderen Gerüchen.	Schwach säuerlich, etwas adstringierend.
Kohlensäure . .	Nahezu geruchlos.	Geruchlos.
gewöhnlicher Luft	Ranzig, auch nach Sauerfutter riechend, besonders nach dem Erwärmen.	Ganz schwach säuerlich.

Ueber die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung und der Säuregradsprüfung orientiert ebenfalls Tabelle 23.

Im Rahm der unter Kohlensäure aufbewahrten Milch entwickelten sich wiederum fast ausschliesslich Milchsäurestreptokokken, während bei den beiden andern Proben ungefähr die Hälfte der Bakterienflora aus peptonisierenden und fettspaltenden Stäbchen bestand. In der Rahmoberfläche der dritten Probe (unter gewöhnlicher Luft) machten diese beiden Gruppen sogar 80% aus. Mit den alkalibildenden Kurzstäbchen waren hier ausschliesslich fettspaltende Bakterien tätig. Es ist daher erklärlich, warum bei diesem Rahm ein ranziger Geruch vorherrschte. Aber auch in der unter Sauerstoff aufbewahrten Probe, wo die fettspaltenden Bakterien zwar in etwas geringerem Prozentsatze gefunden wurden, waren sie bestimmend für den Geruch des Rahmes.

Interessant ist hier die ganz beträchtliche Vermehrung der Milchsäurestreptokokken. Es ergibt sich daraus, dass diese doch nicht so sehr auf anaerobe Verhältnisse angewiesen sind, wie viele Autoren annehmen. Die schon mehrmals belegte Tatsache, dass die Milch im Rahm zu säuern beginnt, wird damit neuerdings bestätigt. Der Reichtum an Spaltpilzen in der Rahmschicht lässt sich nur zum geringsten Teil darauf zurückführen, dass die Mikroorganismen von den Fettkügelchen in die Rahmschicht transportiert werden. Zur Hauptsache verdanken die hier anzutreffenden überaus zahlreichen Keime ihre Gegenwart einer sehr üppigen Vermehrung in der obersten Rahmdecke selbst und damit den dort für die betreffenden Bakterien herrschenden günstigen Lebensbedingungen.

Die Kohlensäure hat die Bakterienflora nur in einem für die Milch günstigen Sinne beeinflusst. Das Keimwachstum ging nicht nur langsamer

vor sich, sondern es wurden auch die schädlichen, Geruchsstoffe bilden, obligat aeroben Spaltpilze unterdrückt. Es entwickelten sich vorwiegend Milchsäurebakterien. Unangenehme Geruchsveränderungen traten daher nicht oder nur in sehr geringem Masse auf. Zweifellos konnte aber auch die infolge Kohlensäureaufnahme eingetretene p_H -Änderung der Milch die Bakterienentwicklung nach der einen oder andern Richtung hin beeinflussen.

Demnach kann das «Ersticken» der Milch nicht auf deren mangelhafte Entgasung zurückgeführt werden. Denn durch das Lüften der Milch wird ja, sofern diese nicht irgendwelche üblen Gerüche aus der Umgebung aufgenommen hat, nur die Kohlensäure ausgetrieben.

Das Kohlendioxyd wäre sicher ein Mittel, die Haltbarkeit der Milch zu erhöhen. Bei ihrer Aufbewahrung unter Kohlensäuredruck liesse sich auch das Wachstum der Milchsäurebakterien auf ein Minimum herabdrücken. Die praktische Anwendung scheitert aber daran, dass sich die Kohlensäure in der Milch löst, wodurch ihr Säuregrad derart ansteigen kann, dass sie beim Kochen gerinnt.

f) Zusammenfassende Bemerkungen zu den Ergebnissen der Versuche 10—22.

Im Kapitel über Geruchsprüfungen (Seite 321, Jahrg. 1937) wurde gezeigt, dass die während der Aufbewahrung früher oder später aufgetretenen geruchlichen Veränderungen oder das «Ersticken» der Milch durch Bakterien hervorgerufen werden. Die Versuche 10—22 hatten den Zweck, das Keimwachstum in der aufbewahrten Milch näher zu untersuchen und vor allem die Zusammensetzung der Bakterienflora zur Zeit der ersten Anzeichen des «Erstickens» festzustellen.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 24 zusammengestellt. Zur Ergänzung haben wir noch Versuche herangezogen, die, um Raum zu sparen, nicht näher beschrieben worden sind. Die Resultate sind je nach der Untersuchung der nicht entrahmten Milch, der ganzen Rahmschicht oder nur der Rahmoberfläche in Gruppen vereinigt.

Die Geruchsveränderungen traten nach ganz verschiedenen Aufbewahrungszeiten auf. Es sei noch besonders hervorgehoben, dass es sich dabei immer um die Aufbewahrungstemperatur von 18—20° handelt. Dabei hat sich im grossen und ganzen ergeben, dass die Milch um so früher «erstickte», je höhere Keimzahlen anzutreffen waren. Dies ist übrigens auch verständlich. Denn je mehr Keime die Milch im allgemeinen von Anfang an enthält, desto ausgiebiger vollziehen sich die durch Bakterien hervorgerufenen Umsetzungen.

Dass dabei die Art der beteiligten Organismen und ihr Vermögen, Umsetzungen hervorzurufen, eine massgebende Rolle spielt, liegt auf der Hand. Daraus erklären sich gelegentliche Ausnahmen, bei denen relativ hohe Anfangskeimzahlen nicht zu den hier beschriebenen Veränderungen führten, weil die betreffenden Spaltpilze zu diesen Leistungen nicht befähigt waren. Auf der andern Seite kam es vor, dass eine zahlenmässig schwach vertretene, aber in dieser Beziehung sehr leistungsfähige Gruppe an Mikro-

Tabelle 24.

Versuch	Herkunft der Milch	Geruch der aufbewahrten Milch	Untersuchung der	nach Std.	Säure- grad		Milchsäure- Streptokokken	Mikrokokken	Peptonisie- rende Stäbchen	Alkalibildende Stäbchen	Coll- aerogenes	Andere Organismen	Fettpaltende Bakterien	Keimzahl der frischen Milch
					Rahn	Voll- milch								
25	Landwirt W., H.	Ranzig-säuerlich	ganzen Milch	12		8,0	40,0	—	7,0	50,0	—	—	16,5	54 000
32	» H., H.	Herb-malzig	»	25		7,5	80,0	16,5	—	3,5	—	—	—	77 000
31	» Z., B.	Süßlich-säuerlich	»	24		6,9	100,0	—	—	—	—	—	—	250 000
10	» G., Sch.	Herb-malzig	»	24		7,4	100,0	—	—	—	—	—	—	23 000
26	» H., B.	Säuerlich	»	12		6,3	50,0	5,0	—	45,0	—	—	45,0	91 000
12	Käserei R.	Säuerlich, nach Ester	»	18		6,6	29,0	—	3,0	68,0	—	—	ca. 30,0	36 000
19	» Bl.	Säuerlich-ranzig	»	20		6,1	14,0	34,0	9,0	30,0	—	13,0	39,0	39 000
13	» Gr.	Nach Waschlappen	»	12		6,2	4,0	—	46,5	49,5	—	—	20,0	160 000
24	Landwirt B., K.	Schwach ranzig	Rahmschicht	21	6,0		—	22,5	6,8	70,5	—	—	27,2	62 000
15	» G., B.	Adstringierend-säuerlich	»	36	6,7		46,0	27,0	9,0	18,0	—	—	9,0	27 000
27	» St., W.	Herb-säuerlich	»	20	5,8		—	—	68,0	—	32,0	—	68,0	16 000
33	» M., W.	Nach Karamel u. schwach säuerlich	»	27	6,0		55,0	35,0	—	10,0	—	—	15,0	56 000
22	» H., T.	Ranzig-säuerlich	»	23	6,0		46,0	25,0	—	21,0	—	—	21,0	13 600
16	Käserei Ob.	Adstringierend, nach Essigsäure	»	31	6,2		70,0	9,5	12,5	—	—	5,0	4,5	22 000
18	» Bk.	Schwach ranzig	»	16	6,0		14,0	—	42,0	42,0	—	—	40,0	150 000
23	» H.	Ranzig-säuerlich	»	24	6,8		40,0	3,4	40,0	13,3	—	3,3	40,0	68 000
29	» Ob.	Säuerlich-malzig	Rahm-Oberfläche	17	—	6,4	45,5	4,0	—	50,5	—	—	50,5	—
34	Landwirt K., A.	Obstartig-säuerlich	»	24	—	8,1	ca. 30,0	—	—	ca. 70,0	—	—	—	—
28	» M., B.	Adstringierend-sauer	»	23	—	—	67,0	8,0	11,0	24,0	—	—	32,0	—
20	» Z., B.	Malzig-herb, adstringierend	»	15	—	—	89,2	4,6	—	6,2	—	—	6,2	114 000
30	» G., H.	Nach Waschlappen	»	24	—	7,3	ca. 20,0	—	—	ca. 80,0	—	—	—	100 000
35	» N., B.	Herb-adstringierend	»	22	—	6,9	—	5,0	20,0	75,0	—	—	—	13 000

organismen die Bildung des «stickigen» Geruches hervorzurufen vermochte. So wies die Milch von Versuch 25, die in frischem Zustande 54000 Keime enthielt, schon nach 12 Stunden einen ranzig-säuerlichen Geruch auf, während beim 31. Versuch mit einem Anfangskeimgehalt von 250000 Bakterien pro cm^3 erst nach 24 Stunden ein säuerlicher Geruch festgestellt werden konnte. Im ersten Falle bestand die Bakterienflora neben 40% Milchsäurestreptokokken noch aus 50% alkalibildenden und 7% eiweisslösenden Stäbchen. Im zweiten Falle waren es ausschliesslich schwach säuernde Milchsäurestreptokokken, die schon in der frischen Milch zu 80% vertreten waren. In Versuch 15 enthielt die frische Milch 27000 Keime. Sie wies nach 36 Stunden einen adstringierend-säuerlichen Geruch auf. Die Rahmschicht enthielt zu dieser Zeit 46% Milchsäurebakterien, 27% Mikrokokken, 18% alkalibildende Kurzstäbchen und 9% eiweisslösende Stäbchen. Bei einem Anfangskeimgehalt von 13000 Bakterien (Versuch 22) konnte derselbe Geruch schon nach 23 Stunden wahrgenommen werden. Dabei wurden im Rahm neben 46% Milchsäurestreptokokken, 25% Mikrokokken und 21% alkalibildende Kurzstäbchen gefunden. Und endlich erinnerte der Geruch einer Milch (Versuch 30), die frisch 100000 Keime enthielt, nach 24 Stunden an mangelhaft gereinigte Waschlappen, wobei die Bakterienflora der Rahmoberfläche aus ca. 20% Milchsäurestreptokokken und 80% alkalibildenden Kurzstäbchen bestand. Im entsprechenden Versuch 35 dagegen, dessen Milch einen Anfangsbakteriengehalt von 13000 Keimen aufwies, konnte schon nach 22 Stunden ein herb-adstringierender Geruch festgestellt werden. Dabei wurden in der Rahmoberfläche 5% Mikrokokken, 20% eiweisslösende Stäbchen und 75% alkalibildende Kurzstäbchen gefunden.

Die Erklärung für diese Abweichungen muss u. E. in tiefer liegenden Ursachen gesucht werden. Die «Disposition» der Milch dürfte hier eine wichtige Rolle gespielt haben.

Ueberall da, wo in der aufbewahrten Milch ein ranzig-säuerlicher Geruch auftrat, bestand die Bakterienflora zu einem erheblichen Teile aus fettspaltenden Organismen, die hauptsächlich zu den alkalibildenden Kurzstäbchen und dem *Bact. fluorescens* und seinen Verwandten gehörten.

Mehr angenehme, esterähnliche Gerüche wurden in zwei Fällen festgestellt. Einmal wurden neben 29% Milchsäurestreptokokken 68% alkalibildende Kurzstäbchen angetroffen, von denen ungefähr die Hälfte einer Gelatine nicht verflüssigenden Fluoreszenzform zugeordnet werden konnte. Im andern Falle war der Geruch obstartig-säuerlich, wobei die Bakterienflora aus $\frac{1}{3}$ Milchsäurebakterien und $\frac{2}{3}$ alkalibildenden Kurzstäbchen bestand. Milch mit dem an Waschlappen erinnernden Geruch enthielt einmal nur wenig Milchsäurebakterien, dafür vorwiegend eiweisslösende Stäbchen und alkalibildende Kurzstäbchen. Ein anderes Mal wurden bei einem ähnlichen Geruch neben ca. 80% alkalibildenden Kurzstäbchen ca. 20% Milchsäurestreptokokken gefunden.

Karamelgeruch und die herben Gerüche wurden mehr dort angetroffen, wo die Mikrokokken, vor allem aber die Milchsäurestreptokokken, vorherrschen. Wir haben an anderer Stelle bereits gezeigt, dass es Streptococcus-lactis-Stämme gibt, die einen herben, malzigen Geruch erzeugen.

Einen herben, leicht säuerlichen Geruch stellten wir in einer Milchprobe fest, deren Rahmflora zu 68% aus dem Bact. vulgare und zu 32% aus Coli-aerogenes-Bakterien bestand. Später war der Geruch futterig-sauer und der Geschmack räss bis bitterlich.

Eine Rahmschicht, die einen essigsäureähnlichen Geruch aufwies, enthielt neben Kokken und eiweisslösenden Stäbchen 70% Milchsäurestreptokokken. Trotzdem hier ausgesprochen aerobe Verhältnisse vorliegen, so glauben wir die Entstehung jenes Geruches doch nicht mit Barthel⁶⁰⁾ auf essigsäureproduzierende Milchsäurebakterien zurückführen zu dürfen.

In der Keimflora «erstickter» Milch fallen zahlenmässig hauptsächlich zwei Bakteriengruppen auf. Es sind dies die Milchsäurestreptokokken und die alkalibildenden Kurzstäbchen. Weniger häufig, wenn bei einzelnen Proben trotzdem auch ziemlich zahlreich, waren die eiweisslösenden Stäbchen und die Mikrokokken vertreten. Die alkalibildenden Kurzstäbchen sind vorwiegend fettspaltend. Fettzersetzer fanden sich ausserdem sehr oft auch unter den eiweissabbauenden Stäbchen. Es ergibt sich daraus, dass die Bakterienflora «erstickter» Milch hauptsächlich aus Milchsäurestreptokokken und fettspaltenden Organismen besteht.

Wie in der Literaturübersicht erwähnt worden ist, hat Wolff schon vor ungefähr 30 Jahren in aufbewahrter Milch in erheblichem Masse alkalibildende Kurzstäbchen gefunden. Er hielt es für möglich, dass sie unter günstigen Bedingungen Milchfehler hervorrufen können.

Das «Ersticken» der Milch hat sich in erster Linie als eine Folge bakterieller Veränderungen im Rahm erwiesen. Unter anaeroben Verhältnissen (Aufbewahrung der Milch in ganz gefüllten Flaschen oder unter Kohlensäure) traten Geruchsveränderungen bedeutend langsamer und nie in unangenehmer Form auf, ohne dass der Säuregrad schon beträchtlich zugenommen hatte. Dann waren sie aber eine Folge fortgeschrittener reiner Milchsäuregärung. Beim Auftreten der verschiedenartigen unangenehmen, vorwiegend adstringierenden Gerüche, die zudem schon vielfach vor einer Säurezunahme wahrgenommen werden konnten, waren immer aerobe Bakterien, meist sogar vorherrschend, im Spiele.

Das «Ersticken» der Milch beruht somit, so paradox es klingen mag, hauptsächlich auf der Tätigkeit aerober Bakterien und somit auf Luft- bzw. Sauerstoffvorhandensein. Obwohl der «stickige» Geruch meist nur bei der verschlossen aufbewahrten Milch wahrgenommen wird, so ist er doch nicht eine Folge des Verschliessens. Sozusagen die genau gleichen bakteriellen Veränderungen spielen sich auch ab, wenn der Verschluss fehlt. Aber in den verschlossenen Gefässen können die Geruchsstoffe nicht entweichen, während sie sich in den offenen verflüchtigen. «Offene» Milch «erstickt» aber so gut wie «verschlossene».

Das Verschliessen der Milchaufbewahrungsgefässe hatte nur in dem Sinne einen Einfluss, als das Austrocknen der Rahmschicht abgeschwächt wurde. So konnten sich die aeroben Keime auch an der Oberfläche ungehindert vermehren. Bei der Flaschenmilch war der Unterschied zwar meist nur gering, deutlich jedoch gegenüber der in flachen Schalen aufbewahrten Milch. Hier fliesst die mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre gleichsam ständig ab, während sie sich im offenen Gefäss, bei dem die Wandungen noch einen Luftraum umschliessen, länger zu halten vermag und ein stärkeres Abdunsten der Rahmdecke hintanhält.

C. Systematische Stellung der wichtigsten in «erstickter» Milch gefundenen Bakterienarten.

Die in den besprochenen Versuchen gefundenen Bakterien wurden teils nach morphologischen, teils nach physiologischen Gesichtspunkten in sieben Gruppen zusammengefasst. Wenn wir nun versuchten, die diesen Gruppen zugeteilten Arten etwas näher zu charakterisieren, so konnte es sich nicht darum handeln, sie genau zu bestimmen. Das wäre über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen.

Wir beschränkten uns daher in den meisten Fällen auf die Prüfung der für eine weitere Gruppierung wichtigsten physiologischen Leistungen. Einer eingehenden Untersuchung hingegen wurden die alkalibildenden Kurzstäbchen unterzogen. Wir hielten dies für notwendig, weil sie seit der von Wolff³⁾ veröffentlichten Arbeit u. W. nicht genauer untersucht worden sind und weil wir sie in unsern Versuchen fast immer in beträchtlicher Zahl in der Milch angetroffen haben.

1. Milchsäurebakterien.

a) Streptokokken.

Aus den bisher erläuterten Tabellen geht hervor, dass zur Zeit der auftretenden Geruchsveränderungen in der Milch zu einem erheblichen Prozentsatze, in einzelnen Fällen sogar ausschliesslich, Milchsäurestreptokokken vertreten waren. Aus dem bereits angeführten Grunde haben wir diese nicht, wie es für eine genauere Unterscheidung notwendig wäre, auf die Vergärung der verschiedenen Zucker und Alkohole geprüft. Nach der morphologischen Untersuchung und dem Verhalten der Streptokokken in Milch handelte es sich wohl mehrheitlich um den *Streptococcus lactis*.

Von 108 isolierten Stämmen koagulierten 77 die Milch, und zwar die meisten innert 12 bis 24 Stunden (bei 30°), nur wenige nach 1½ bis 2 Tagen. 31 Stämme liessen die Milch flüssig. Die meisten wuchsen auf Agar in Diplo-Formen bis kurzen Ketten. Einige nicht koagulierende Stämme wiesen neben kurzen auch lange Ketten auf.

Nach der bei der geronnenen Milch vorgenommenen Geruchsprüfung erzeugten 49 von 91 Stämmen einen deutlichen, rein säuerlichen Geruch. 21 (Milch nicht koagulierende) vermochten vereinzelt gar keinen, mehr-

heitlich aber nur einen ganz schwach säuerlichen Geruch hervorzurufen. Bei 16 Stämmen wiesen die Milchproben einen herb-malzigen Geruch auf. 2 produzierten einen Karamel-, je einer einen scharf sauren, essigsauen und einen bouillonartigen Geruch.

b) Mikrokokken.

Durch zahlreiche Untersuchungen (Wolff u. a.) ist gezeigt worden, dass die Mikroflora der frischen Milch zu einem grossen Prozentsatze aus Mikrokokken besteht. Dies war auch bei unsern Untersuchungen mehrheitlich der Fall. In der aufbewahrten Milch dagegen waren sie meist weniger stark vertreten. Doch konnten sie dann und wann auch in den Proben, bei denen die ersten Geruchsveränderungen auftraten, noch in erheblichen Mengen gefunden werden.

Die Kokken besiedelten vor allem die Rahmschicht und gehörten dem gelben und weissen Typus an. Morphologisch waren es Tetra-, Einzel-, Diplokokken und seltener scheinbare Kettchen und Häufchen. Die weitere Gruppierung der Kokken erfolgte nach dem Gelatineverflüssigungsvermögen. Von 46 aus aufbewahrter Milch isolierten Stämmen verflüssigten nur 3 die Gelatine nicht. Von 56 Frischmilch-Stämmen vermochten 14 die Gelatine nicht zu peptonisieren. Wir konnten die schon von Wolff³⁾ in der mehrfach zitierten ausgezeichneten Arbeit gemachte Feststellung, wonach sich bei der Aufbewahrung der Milch vor allem die verflüssigenden Kokken vermehren, bestätigen.

Die Bestimmung der Gattungszugehörigkeit haben wir nach *Orla-Jensen*⁶¹⁾ vorgenommen. Er fasst die Kugelbakterien (Mikrokokken, Staphylokokken, Tetrakokken, Sarcinen) in der Gattung *Tetracoccus* zusammen, für die vor allem das Katalasebildungs- und zum Teil auch das Nitratreduktionsvermögen typisch sind.

Das Nitratreduktionsvermögen wurde nach einem vom Ausschuss der Gesellschaft amerikanischer Bakteriologen empfohlenen Verfahren geprüft⁶²⁾. Zum Nachweis der Katalasebildung bedienten wir uns einer von uns vereinfachten Methode.

Mittels eines jeweils in der Flamme sterilisierten, in eine stumpfe Spitze ausgezogenen Glasstabes wurde von dem zu prüfenden Stamm Material in 1%iges Wasserstoffsuperoxyd getaucht, das in eine Reihe von Gläschen abgefüllt worden war. Schon nach kurzer Zeit entstanden bei katalasebildenden Organismen an der Glasstabspitze reichlich kleine Gasblasen, die fortwährend in die Höhe stiegen. Diejenigen Gläschen, in denen keine Reaktion auftrat, wurden während zwei Stunden von Zeit zu Zeit beobachtet, um eventuell auch schwache Katalasebildner noch feststellen zu können. Auf diese Weise war es möglich, eine grössere Anzahl von Stämmen ohne besondere Apparatur auf das Katalasebildungsvermögen zu prüfen. Denn es kam ja nur darauf an, festzustellen, ob Katalase gebildet wird oder nicht. Deshalb ist es u. E. nicht notwendig, das gebildete Gas zu messen.

Sämtliche von uns genauer untersuchten Mikrokokkenstämme bildeten Katalase. Sie gehören daher in der überwiegenden Mehrzahl, weil Gelatine verflüssigend, der Spezies *Tetrac. liquefaciens* an.

Von 23 Stämmen reduzierten 7 Nitrat nicht. Die Milch wurde von den meisten koaguliert. Der grösste Teil der Gelatine verflüssigenden Mikro-

kokken baute Milchkasein ab. Indessen bestand kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Gelatineverflüssigungs- und Kaseinlösungsvermögen. Hierauf hatte vor allem *Gorini*⁶³⁾ hingewiesen. Fettspaltung haben wir bei 3 Stämmen festgestellt.

Die Mikrokokken haben sich als ausgesprochene Aromabildner erwiesen. Gelbe und weisse Kokken erzeugten in Rahm sehr oft eigenartige, mit saurem Most zu vergleichende Gerüche. Die typischen Tetrakokken verursachten meistens einen käsigen Geruch. Ziemlich häufig waren auch solche Mikrokokken, die in Milch einen an Baldrian erinnernden Geruch hervorriefen. Ebenso waren gelbe und weisse Kokken die Ursache eines herben, Karamel- und in einem Falle eines essigsauen Geruches.

2. *Peptonisierende Stäbchen.*

Die Gelatine verflüssigenden Stäbchen waren in der «erstickten» Milch in recht verschiedenem Masse vertreten. In der Mehrzahl der Fälle traten sie auf den Plattenkulturen entweder gar nicht oder nur in sehr beschränkten Quantitäten auf. In einigen wenigen Proben dagegen machten sie ungefähr die Hälfte der Bakterienflora aus.

*Koning*²⁾ hat die verflüssigenden Stäbchen, speziell das *Bact. fluorescens*, der zweiten Phase der Bakterienentwicklung in der Milch zugewiesen. Hier wird der Boden für die Entwicklung der Milchsäurebakterien bereitet. *Weigmann* und *Wolff*³⁰⁾ studierten speziell die zur Fluoreszentengruppe gehörenden verflüssigenden Bakterien. Diese waren die Ursache eines Steckrübengeschmackes und -geruches in Milch und Milchprodukten. In einer neueren Arbeit macht *Henneberg*⁵⁵⁾ verschiedene in der Milch vorkommende peptonisierende Stäbchen für Geschmacksveränderungen verantwortlich. Er fasst die betreffenden Bakterien in der *Alcaligenes*-, der *Proteus*- und der Fluoreszenzgruppe zusammen. Sämtliche geprüften Stämme besaßen die Fähigkeit, Alkali zu bilden. Eine Anzahl war fettspaltend.

Wir haben 107 Stämme verflüssigender Stäbchen aus «erstickter» Milch isoliert. Sämtliche vermochten auf Milch oder Rahm teils aromatische, teils unangenehme Geruchsstoffe zu erzeugen. 59 Stämme spalteten Fett. Diese Eigenschaft war aber kein typisches Merkmal. Organismen ein und derselben Gruppe vermochten Fett zu spalten, andere nicht.

Die Stämme konnten nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten zwei Gruppen zugewiesen werden: der Fluoreszenz- und der *Proteus*gruppe.

a) *Fluoreszenzgruppe.* Die meisten Stämme gehörten dieser Gruppe an. Mikroskopisch waren es lebhaft bewegliche, kürzere bis schlankere, oft schwach gekrümmte Stäbchen. Bei allen Stämmen fehlte das Nitratreduktionsvermögen, im allgemeinen ein typisches Merkmal für das *Bact. fluorescens* und die verwandten Arten. Milchzucker wurde nicht gesäuert. Ferner war sämtlichen Stämmen die Fähigkeit eigen, rüben- bis kohllartige, vor allem aber esterige Gerüche (erdbeer- und himbeerähnlich) zu erzeugen.

In Tabelle 25 sind 4 Vertreter dieser Gruppe näher charakterisiert.

Die Stämme 57 und 153 gehören nach *Huss*⁶⁴⁾ der Spezies *Pseudomonas fragaroidea* an, die Milch koaguliert (die Peptonisierung ging bei unsern Stämmen sehr langsam vor sich) und Dextrose, nicht aber Milchzucker, ver-

Tabelle 25.

Stamm	Mikroskopisch	Gelatine verf.	Milch		Fett- spaltung	Trauben- zucker	Milch- zucker	Nitrat- reduktion	Aesculin	Indol	Geruch in Milch
			Koa- gu- lation	Ab- bau							
153	Stäbchen, bewegl.	+	+	gering	+	+	0	0	—	—	Erdbeerartig
57	» »	+	+	»	0	+	0	0	—	—	Esterig
67	» »	+	0	+	+	+	0	0	—	—	Rübenartig
4	» »	+	0	+	+	0	0	0	—	—	»
40	» » ¹⁾	+	+	+	+	+(Gas)	0	+	+	0	Rahm n. Limburgerkäse
123	» »	+	+	+	+	+(Gas)	0	+	+	+	Rahm stinkend

¹⁾ Kolonie schwärmt.

gärt. Stamm 153 war fettspaltend. Er erzeugte in Milch einen erdbeer- bis schwach rübenähnlichen Geruch. Steriler Rahm wurde deutlich ranzig.

In zwei Versuchen (13 und 18) bestand die Bakterienflora der Milch bzw. des Rahmes nach 12 Stunden zu 30—50%, nach 24 Stunden zu 10 bis 40% aus *Ps. fragaroidea*. Der aromatische, erdbeerähnliche Geruch konnte denn auch bei diesen Milchproben besonders deutlich wahrgenommen werden. Er machte dann kurz nach der ersten Geruchsempfindung einem mehr säuerlich-adstringierenden bis schwach ranzigen Mischgeruch Platz.

Die Stämme 4 und 67 waren typische Vertreter des *Bact. fluorescens liquefaciens*. Die Bouillonkulturen waren grün fluoreszierend und die ziemlich schlanken Stäbchen lebhaft beweglich.

Es gab Zucker nicht vergärende Stämme und solche, die Dextrose unter Säuerung abbauten. Nach *Lehmann* und *Neumann*⁶⁵⁾ ist das Unvermögen, Zucker zu vergären, ein typisches Merkmal für *Bact. fluorescens*. Aber auch die von *Henneberg*⁵⁵⁾ beschriebenen Stämme vergärten Dextrose. Er vertritt sogar die Ansicht, dass es wohl auch Fluoreszenzstämmen gebe, die Milchzucker angreifen.

Das *Bact. fluorescens* war immer stark fettspaltend. Doch herrschte auf Rahmkulturen (beimpfter Rahm in Petrischalen ausgegossen), wenigstens anfänglich, meist der Kohl- bis Steckrübengeruch vor. Erst später wurde der Rahm deutlich ranzig. Dies war auch in der Milch der Fall. Wir haben öfters in Rohmilchproben, deren Rahm besonders reichlich mit *Bact. fluorescens* besiedelt war, hauptsächlich einen Rübengeruch wahrgenommen. Im übrigen aber war dieser Organismus in den geruchlich veränderten Milchproben meistens nicht mehr besonders häufig anzutreffen. In einzelnen Proben von Versuch 19 wurde er noch zu 21—27% festgestellt. Der Geruch des betreffenden Rahmes war unangenehm säuerlich und erinnerte eher an saures Schweinefutter.

b) *Proteus-Gruppe*. Wir haben zu dieser Gruppe gehörende Organismen nur in zwei Milchproben (Versuch 27 und 36) in beträchtlicher Anzahl festgestellt. Sie sind bedeutend seltenere Milchw Bewohner als die erstgenannten.

Die Tabelle 25 gibt über die wichtigsten Eigenschaften zweier Stämme Aufschluss. Sie unterscheiden sich nur in der Art der Geruchserzeugung und im Indolbildungsvermögen. Nach *Lehmann* und *Neumann*⁶⁵⁾ ist dieses aber nicht typisch für *Bact. vulgare*.

Mikroskopisch waren es rasch bewegliche Stäbchen. Die Kolonien von Stamm 40 schwärmten stark aus, bei 123 fehlte dies. Die Gelatine wurde von beiden rasch verflüssigt.

In einer Milchprobe (Versuch 27), deren Rahm nach 19 Stunden (bei 18–20°) einen herben, leicht säuerlichen, nach 30 Stunden einen stark futterig-sauren Geruch aufwies, war das *Bact. Proteus* zu 68% vertreten. Die Rahmschicht hatte einen Säuregrad von 10,0, die Magermilchschicht einen solchen von nur 6,5. *Bact. Proteus* besitzt neben dem Eiweisslösungsvermögen auch ein starkes Fettspaltungsvermögen und ist daher als ein besonders arger Milchschildling zu betrachten. Der Rahm schmeckte salzig-bitterlich. Die darunter stehende Magermilch dagegen war süß und ohne Beigeschmack. *Wolff*⁶⁶⁾ fand einmal *Proteusbakterien* als Erreger nicht gerinnender, gasiger Milch, wobei diese einen seifigen Geschmack aufwies.

3. Alkalibildende Kurzstäbchen.

a) Bisherige Untersuchungen.

*Koning*²⁾ fand bei seinen Untersuchungen über die Bakterienentwicklung in der Milch ein bewegliches, Gelatine nicht verflüssigendes Stäbchen, das er als *Bac. faecalis alcaligenes* *Petruschky* bestimmte.

Die ersten Untersuchungen über alkalibildende, Gelatine nicht verflüssigende, unbewegliche Kurzstäbchen gehen auf *Wolff*³⁾ zurück, der sie in beträchtlicher Menge in Milch gefunden hat. Die Kolonien fielen auf den Agarplatten durch ihre Grösse auf. Die Stäbchen waren streng aerob und erzeugten auf Agarausstrichen, die vor der Beimpfung mit etwas Phenolphthaleinlösung versetzt worden waren, eine deutliche Rötung. Auf den Kartoffelkulturen wurde die Umgebung der Impfstelle bläulich gefärbt. Auf den künstlichen Nährböden bildeten sich unangenehme Geruchsstoffe (Ammoniak, Geruch nach Heringslake).

Später haben amerikanische Forscher (*Ayers, Johnson* und *Rupp*)⁶⁷⁾ ähnliche Organismen beschrieben.

Die durch die Bakterien hervorgerufene alkalische Reaktion wurde zunächst auch bei denjenigen Organismen ohne sichtbare Peptonisierung der Bildung von Ammoniak zugeschrieben. 1910 hatten *Bosworth* und *Pruscha*⁶⁸⁾ aber gezeigt, dass die Erzeugung der alkalischen Reaktion auch von der Vergärung der in der Milch vorhandenen zitronensauren Salze herrühren kann, die in Karbonate übergeführt werden. Diese Reaktion wurde bei Zimmertemperatur gewöhnlich nach 5 Tagen, bei 30° nach 48 Stunden sichtbar. Optimaltemperatur der betreffenden Bakterien war 20–30°.

*Henneberg*⁵⁵⁾ fasste die aus Milch isolierten alkalibildenden Kurzstäbchen einstweilen in der Gruppe «*Bact. alcaligenes* im physiologischen Sinne» zusammen. Dabei unterschied er zwei Untergruppen, von denen die eine Milch- und Traubenzucker, die andere nur Traubenzucker säuerte. Zur ersten gehören Gelatine verflüssigende und nicht verflüssigende, zur zweiten nur Gelatine verflüssigende Stäbchen. Alle diesen Stämmen angehörenden Organismen waren beweglich. Von 12 spalteten 6 Fett stark.

In einer andern Arbeit beschreiben *Henneberg* und *Kniefall*⁶⁹⁾ auch ein unbewegliches alkalibildendes Kurzstäbchen, das auf Chinablau-Schrägaragar einen dünnen, fadenziehenden Belag bildete. Gelatine wurde nicht verflüssigt und kein Indol produziert. Ferner erwähnen sie ein alkalibildendes Stäbchen, das Milch durch Lab zum Gerinnen brachte und ein Kuhstallaroma erzeugte.

Kürzlich erschien eine Arbeit von *Storck*⁷⁰⁾ über Alkalibildner in Rohmilch. Neben andern Gruppen (Mikrokokken, Coryne- und Mycobakterien, Sporenbildner, Streptokokken, Sarcinen) fand er auch alkalibildende, nicht sporenbildende Stäbchen, zu denen er *Bact. alcaligenes*, *fluorescens*, *vulgare* und *lactis viscosum* rechnet. Die als *Bact. alcaligenes* bezeichneten Stäbchen waren beweglich. *Storck* erwähnt, dass im Gegensatz zu *Weigmann* und

Wolff nie unbewegliche Alcaligenes-Bakterien gefunden worden seien. Im übrigen unterschieden sich die verschiedenen Stämme in der Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, Milch zu peptonisieren und Fett zu spalten. Ein Stamm koagulierte Milch.

b) Eigene Untersuchungen.

Wir haben 88 Stämme alkalibildender Kurzstäbchen untersucht. Es folgt eine eingehende Beschreibung eines typischen Vertreters (Stamm 2). Zugleich berücksichtigen wir auch die bei einer Anzahl von Stämmen nach der einen oder anderen Richtung aufgetretenen Abweichungen vom vorherrschenden Typus.

Morphologie.

Makroskopisch. Die Oberflächenkolonien sind auf der Agarplatte anfänglich tröpfchenförmig, wachsen rasch, sodass sie nach wenigen Tagen einen Durchmesser von $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ cm aufweisen. Die Kolonien sind denjenigen des Bact. coli zum Verwechseln ähnlich: schmutziggrau bis grau-grünlich, meist saftig glänzend. Der Rand ist später häufig mehr oder weniger gebuchtet. Hier und da bilden sich in der Randpartie radiale Einschnitte. Vielfach vergrössern sich die Buchtungen im Laufe der Zeit noch beträchtlich, sodass ältere Kolonien rosettenförmig aussehen und in der Mitte eine kegelförmige Erhebung aufweisen. Im durchfallenden Licht sind sie bläulich-irisierend.

Auf Schrägagar bildet sich eine saftig glänzende, meist ziemlich dicke graue Auflagerung mit etwas gebuchtem Rand. Dem Strich entströmt ein deutlicher Geruch nach Trimethylamin.

Die Kolonie auf Gelatine ist sehr dünn. Punktförmige Abimpfungen auf Gelatineplatten entwickeln sich zu einem deutlich coli-ähnlichen weinblattförmigen Belag.

Mikroskopisch. Auf Agarkulturen mehr oder weniger deutliche, häufig kokkenähnliche Kurzstäbchen, $\frac{3}{4} \times 1 \mu$, einzeln und zu zwei, gramnegativ. Eigenbewegung fehlt. Einzelne Bakterien sind oft stark involviert und haben dann die Form von grossen, plumpen Kurzstäbchen. Sehr oft sind die Zellen schlauchförmig, bis 20μ lang, wie z. B. bei Stamm 39. Bei Stamm 75 waren auch Stäbchenketten vorhanden.

Physiologisches Verhalten.

Gelatine wurde nie verflüssigt.

Die Bouillonkulturen wiesen eine mässige bis starke Trübung auf. An der Berührungsstelle von Flüssigkeitsoberfläche und Glaswand bildete sich ein mehr oder weniger zarter Ring. Andere Stämme (z. B. 75) erzeugten eine schleimige Decke. Der Bodensatz war mässig bis stark.

Das Wachstum auf der *Kartoffelkultur* war stets kräftig. Der Belag war matt glänzend und die Umgebung der Impfstellen schiefergrau bis graubräunlich verfärbt.

Milchkultur. Lackmusmilch wurde nach 4 Tagen deutlich alkalisch, bei Stamm 25 nach 12 Tagen. Die Stämme 75, 80 und 142 reduzierten zuerst den Lackmusfarbstoff, und erst dann trat die alkalische Reaktion auf.

Die Milch wurde nie koaguliert. Im Verlaufe von 7 Tagen (bei 30°) wurde sie seifenwasserähnlich aufgehellt. Meistens war sie geruchlos. Einzelne Stämme (2, 45, 142) erzeugten einen ausgesprochenen Stallgeruch. Stamm 75 machte die Milch stark schleimig.

Das in Milch gebildete Alkali wurde durch Titration mit $\frac{n}{10}$ -Lauge unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt.

Fettspaltung. Die Prüfung auf Fettspaltung erfolgte nach der von *Hammer* und *Collins*⁵⁹⁾ ausgearbeiteten und von uns etwas modifizierten Methode. Die Herstellung des Nährbodens wurde weiter oben beschrieben.

Auf eine Platte verimpften wir jeweilen 6 bis 8 Stämme, entweder von 24 bis 48 Stunden alten Bouillon- oder direkt ab Agarkulturen. Die Bebrütung erfolgte bei 20–25°. Schon nach 12 Stunden bildeten sich an den Impfstellen rötliche Aufhellungen, herrührend von dem durch die Bakterien gebildeten Alkali. Erst im Verlaufe der folgenden 12 Stunden wurde dann die durch die Fettspaltung hervorgerufene Reaktion sichtbar. Der Belag färbte sich an der Oberfläche blau. Nach wenigen Tagen trat dann auch auf der Unterseite der Platten infolge der weiter in den Nährboden gedrungenen Lipase eine tiefblaue Färbung auf. Ein Stamm war nur sehr schwach, ein anderer gar nicht fettspaltend.

Bei ca. 50% der untersuchten Stämme bildete sich nach einer Woche oder auch noch später um den Bakterienbelag herum eine mehr oder weniger tiefblaue Zone von ca. 2–5 mm. Die andere Hälfte der Stämme wies eine solche nicht auf. Bei den ersteren diffundierte die Lipase in den Nährboden hinaus, bei den letztern dagegen nicht. *Hammer* und *Collins* führen dies auf die verschieden starke hydrolytische Fähigkeit der einzelnen Stämme zurück. Sie stellten ebenfalls innerhalb derselben Gruppe (sie untersuchten hauptsächlich proteolytische Fettspalter) beträchtliche Variationen fest. Wir konnten aber bei unsern Untersuchungen beobachten, dass die Stärke der Lipasediffusion nicht nur zwischen den einzelnen Stämmen variierte. Sie war in einigen Fällen auch bei demselben Stamm nicht konstant. Es gab Stämme, die anfänglich lipolytische Enzyme in das Nährsubstrat diffundieren liessen, diese Eigenschaft später jedoch einbüssten.

Bei Verimpfung einer Oese Bouillonkultur auf 8–10 cm³ sterilen Rahm liess sich das Fettspaltungsvermögen auch durch die Geruchsprüfung feststellen. Die fettspaltenden Stämme erzeugten nach ca. 24 Stunden einen ranzigen Geruch.

Durch die Spaltung des MilCHFettes entstehen Fettsäuren, die den Säuregrad des Rahmes erhöhen. Diese Säurezunahme kann daher als Mass für die Stärke der Fettzersetzung der einzelnen Stämme benützt werden.

Von 88 Stämmen wiesen 5 ein besonders starkes Fettspaltungsvermögen auf. Wir prüften sie in ihrem Verhalten auf Rahm, Voll- und Magermilch. Dabei hatten wir den Rahm und die Magermilch aus einem Teil der hier verwendeten Vollmilch gewonnen. Milch und Rahm wurden zu 100 cm³ in 2-dl-Flaschen abgefüllt und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf während 20 Minuten erhitzt. Beimpft wurde mit 1 cm³ einer 24stündigen Bouillonkultur. Aufstellung der Proben bei 20°.

Wir haben die mit Stamm 39 erzielten Ergebnisse in 3 Kurven dargestellt.

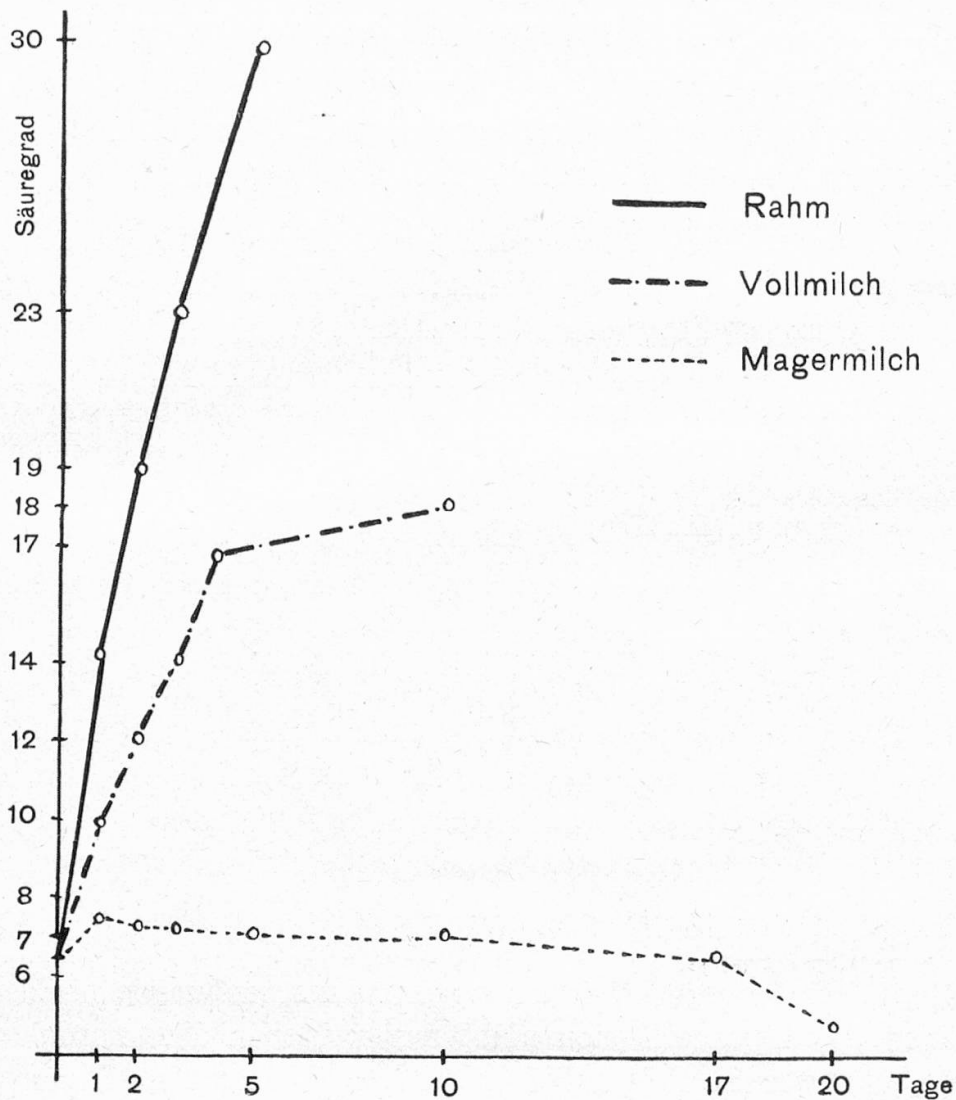


Abbildung 3.

Das verschiedene Verhalten in den 3 Nährsubstraten ist hieraus besonders deutlich ersichtlich. Infolge der Fettspaltung war der Säuregrad des Rahmes schon nach 24 Stunden von 6,5 auf 14,2 gestiegen. Entsprechend dem geringeren Fettgehalt der Vollmilch nahm hier der Säuregrad bedeutend langsamer zu und stieg auch nie so hoch wie im Rahm. Entgegengesetzt verhielt sich der Säuregrad in der Magermilch. Hier stieg er nur in den ersten 24 Stunden etwas an, blieb dann während 10 Tagen ziemlich konstant und ging alsdann fortwährend zurück. Im Rahm und in der Vollmilch bildeten sich Fettsäuren, in der Magermilch wurde Alkali produziert. Ob das leichte Ansteigen des Säuregrades nach 24 Stunden auf die Zersetzung des in der Magermilch immer noch in sehr geringem Masse enthaltenen Fettes zurückzuführen ist, haben wir nicht näher geprüft.

Wir glaubten anfänglich, auf Grund dieser Kurven die bei gewöhnlicher Milch nach einer bestimmten Aufbewahrungszeit festgestellten Unterschiede im Säuregrad der Rahm- und Magermilchschicht erklären zu können. Dies

ist aber nur dann möglich, wenn der Rahm vorwiegend mit starken Fettzersettern besiedelt ist, wie es z. B. in Versuch 27 der Fall war.

Die Mehrzahl unserer Stämme wies ein weniger starkes Fettspaltungsvermögen auf. So stieg z. B. bei 10 Stämmen der Säuregrad im Rahm nach 36 Stunden von 5,5 auf 5,8 bis 9,1. In den meisten Fällen waren die Unterschiede im Säuregrad der Rahm- und Milchsicht auf andere Faktoren zurückzuführen. Wir werden später zeigen, dass die alkalibildenden Kurzstäbchen die aufbewahrte Milch in anderer Weise beeinflussen.

Zuckervergärung. Die untersuchten Stämme haben weder Trauben- noch Milchzucker vergoren. Auch alle andern Zucker und Alkohole, die nach dem Vorschlage von Orla-Jensen zur Prüfung von Milchsäurebakterien verwendet werden, sind, wie Elser (Liebefeld) an einigen Stämmen feststellte, nicht angegriffen worden. Es hat sich ferner gezeigt, dass die Alkalibildung in zuckerhaltigen und zuckerfreien Nährböden gleich stark war.

Citratvergärung. Die Ergebnisse amerikanischer Forscher, wonach die alkalibildenden Stäbchen Zitronensäure zu vergären vermögen, veranlasseten uns, unsere Stämme auch nach dieser Richtung hin zu prüfen. Dabei benützten wir eine von *Ayers, Rupp* und *Johnson* angegebene synthetische Nährlösung ⁶²⁾:

1 g einbasisches NH_4PO_4 ,
0,2 g KCl ,
0,2 g MgSO_4 ,
1000 g destilliertes Wasser

und als Kohlenstoffquelle 1%iges Na-Citrat. Als Indikator verwendeten wir Bromthymolblau, womit auch die Nährlösung auf pH 7,0 eingestellt worden war.

Die Beimpfung der Gläschen erfolgte mit einer Oese einer 24stündigen Bouillonkultur. Bebrütung bei 30° . Daneben wurde auch Nährlösung ohne Na-Citrat verwendet. In dieser trat gar kein oder dann nur ein sehr schwaches Wachstum auf. Mit Ausnahme von Stamm 45 wuchsen alle Stämme gut in der Na-Citrat enthaltenden Nährlösung. Von 37 Stämmen veränderten 11 die Reaktion nicht, während 26 Stämme nach 24 bis 36 Stunden eine deutlich alkalische Reaktion hervorriefen. Die Mehrzahl der Stämme war somit befähigt, Na-Citrat in Alkalikarbonat überzuführen.

Katalasebildung. Zu deren Prüfung wurden die Bouillonkulturen mit 1%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Sämtliche Stämme besaßen ein starkes Katalasebildungsvermögen.

Nitratreduktion, Kaseinabbau auf Milchagar, Indolbildung und Aesculinspaltung waren bei allen Stämmen negativ.

Methylenblaureduktion. Während 24 Stunden bebrütete Magermilchkulturen (10 cm^3) wurden mit $0,25 \text{ cm}^3$ einer nach Barthel und Jensen hergestellten Methylenblaulösung (1 Tablette auf 200 cm^3 Wasser) versetzt und wieder zu 30° gestellt. Keiner der untersuchten Stämme wies eine deutliche Reduktionsfähigkeit auf. Bei den meisten konnte wohl nach mehreren Stunden eine schwache Aufhellung des Methylenblaufarbstoffes beob-

achtet werden, eine völlige Entfärbung trat aber nie ein. Einzelne Stämme entfärbten die Milch im untern Drittel.

Ansprüche an die Reaktion des Nährbodens. 4 Stämme wurden auf Bouillon mit einem p_H von 5,7, 6,5, 7,3, 8,0 und 8,7 verimpft. Am raschesten war das Wachstum in der Nähe des Neutralpunktes. Doch waren die Unterschiede bei den Stämmen 2 und 126 zwischen p_H 6,5, 7,3 und 8,0 nur sehr klein. Stamm 143 wuchs bei p_H 6,5 etwas langsamer. Diese drei vermochten nach 2 Tagen auch die Bouillon mit einem p_H von 8,7 schwach zu trüben. Keiner der geprüften Stämme wuchs bei p_H 5,7. Den am engsten begrenzten p_H -Bereich wies der Stamm 45 auf. Er wuchs gut bei p_H 7,3 und 8,0, gar nicht bei 5,7, 6,5 und 8,7.

Temperaturansprüche. Von 28 Stämmen wurden frisch beimpfte Bouillon, bisweilen auch Agarstriche bei 6–8°, 20, 25, 30 und 37° bebrütet. Bei 6–8° zeigten alle Stämme deutliches Wachstum. Am besten wuchsen sie bei 25–30°, sehr gut auch bei 20°. Bei 37° wuchs kein einziger Stamm.

Hitzeresistenz. Die mit 3 Tage alter Bouillonkultur beimpfte Bouillon (0,1 cm³ auf 8 cm³) wurde während 20 Minuten bei 63° pasteurisiert und alsdann zu 30° gestellt. Von 11 Stämmen wies nur Stamm 2 Wachstum auf. Alle andern ertrugen das Pasteurisieren (20 Minuten bei 63°) nicht. Im Gegensatz dazu überstanden die von den amerikanischen Forschern untersuchten alkalibildenden Kurzstäbchen den Pasteurisierungsprozess.

In der folgenden Tabelle 26 sind die verschiedenen Stammtypen in denjenigen Merkmalen charakterisiert, in denen sie von den typischen Ver-

Tabelle 26.

Stamm	Mikroskopisch	Fettspaltung	Citratvergärung	Lackmusmilch	Lipase-diffusion	Säuregrad n. 11 Tg. 1)	Bemerkungen	Spezies
2	Kokkenartige Kurzstäbchen, mitunter läng. Stäbchen $1\frac{1}{2} \times \frac{3}{4} \mu$	+	+	Alkalisch	schwach	0,3	Milch Stallgeruch	Alcaligenes metalcaligenes
25	Kokkenartige Kurzstäbchen, regelmässig, meist einzeln	+	+	»	»	4,8		»
39	Plumpe Kurzstäbchen, bisweilen auffallend grosse Formen, bis 20 μ lang	+	0	»	+	—		»
45	Kurzstäbchen, $1-1\frac{1}{2} \times \frac{3}{4} \mu$	+	0	»	0	2,6	M. Stallgeruch	»
75	Plumpe Kurzstäbchen, häufig hypertrophe, hie und da auch kettenbildend mit unregelmässigen Gliedern	+	+	Weiss, dann alkalisch	+	0,3	M. schleimig	Alcaligenes viscosus
80	Kokkenart. Kurzstäbchen, meist einzeln, seltener zu zwei, bisweilen etwas vergrösserte Zellen	+	0	»	0	1,1		Alcaligenes metalcaligenes
142	Kurzstäbchen ungleicher Grösse, meist kokkenartig, häufig bis 3 μ lang, einzeln und zu zweien	+	0	»	0	4,2	M. Stallgeruch	»
143	Kokkenartige Kurzstäbchen	0	+	Alkalisch	0	1,3		»

1) In Magermilch.

tretern abweichen. Es betrifft dies das Fettspaltungs- und das Alkalibildungsvermögen sowie die Fähigkeit, Citrat zu vergären und in Milch einen Stallgeruch zu erzeugen.

c) Diskussion der Bestimmungsergebnisse.

Die wichtigsten Merkmale scheinen für unsere alkalibildenden Kurzstäbchen die Unbeweglichkeit, die Unfähigkeit, Zucker zu vergären, bei 37° zu wachsen und ferner das streng aerobe Wachstum zu sein. Mit Ausnahme von Nr. 75 sind unsere Stämme sehr wahrscheinlich mit den von Wolff beschriebenen alkalibildenden Kurzstäbchen identisch. Ebenso dürfte es sich bei den von *Hanke*⁷¹⁾ charakterisierten, aus Milch isolierten Alkalibildnern um die gleichen Bakterien handeln. Auch die von *Henneberg* und *Kniefall*⁶⁹⁾ erwähnten alkalibildenden, unbeweglichen Kurzstäbchen scheinen mit den unsrigen übereinzustimmen. Dagegen können sie nicht in der von *Henneberg*⁵⁵⁾ aufgestellten *Alcaligenes*-Gruppe untergebracht werden. Sämtliche Angehörige dieser Gruppe sind beweglich, zum Teil Gelatine verflüssigend und Traubenzucker vergärend. Man muss sich überhaupt fragen, ob man alkalibildende Organismen, die Zucker vergären, zu den Alkalibildnern im engeren Sinne rechnen darf. Auch die von *Storck*⁷⁰⁾ untersuchten Organismen können, weil sie beweglich sind, nicht zu den unsrigen gezählt werden. Diese wuchsen überdies immer in auffallend grossen Kolonien, jenen dagegen soll eine kleine Kolonieförmigkeit eigen sein.

Die Stämme 2, 25, 39, 45 und 143 liessen sich nach *Bergey*⁷²⁾ am ehesten in die Spezies *Alcaligenes metalcaligenes* syn. *Achromobacter metalcaligenes* und *Bact. metalcaligenes* Weldine and Levine einreihen. Es wird allerdings das Nitratreduktionsvermögen als variabel angegeben. Nach unsern Untersuchungen zeichnen sich aber die alkalibildenden Kurzstäbchen geradezu dadurch aus, dass sie nicht imstande sind, Nitrat zu reduzieren. Auch die Angabe «fakultativ aerob» ist für unsere Alkalibildner unzutreffend. Alle Stämme waren, wie die Prüfungen auf Peptonschottenagarschüttelkulturen ergeben haben, obligat aerob. Auch Wolff hebt dies ausdrücklich hervor. Ferner dürfte das «Vorkommen im Darmkanal» (*Bergey*), wenigstens für unsere Stämme, nicht den Tatsachen entsprechen. Denn sie wuchsen nicht bei 37°. Das Temperaturoptimum soll nach *Bergey* in der Nähe von 22° liegen. Dies stimmt mit unsern Beobachtungen ziemlich überein.

Im übrigen enthalten die *Achromobacter*- und die *Alcaligenes*-Gruppe offenbar so nahe verwandte Arten, dass eine systematische Differenzierung mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Die Stämme 80 und 142 verhielten sich in Lackmusmilch abweichend, indem die alkalische Reaktion erst nach erfolgter Reduktion des Lackmusfarbstoffes eintrat. Dies trifft nach *Bergey* für *Achromobacter tiogense* und *Achromobacter rodonatum* zu. Bezüglich der übrigen Eigenschaften scheinen aber die genannten Stämme 80 und 142 nicht zu *Achromobacter*

tiogense und rodonatum zu gehören. Sie müssen vielmehr ebenfalls zur Spezies *Alcaligenes metalcaligenes* gerechnet werden.

Bei dem schleimbildenden Stamme 75 handelt es sich nach Bergey um *Alcaligenes viscosus* Welden syn. *Bac. lactis viscosus* Adamez. Er war, wie wir bereits erwähnten, stark fettspaltend, wobei die Lipase in beträchtlichen Quantitäten in den Nährboden hindusdiffundierte. Das Bacterium soll dann und wann als Erreger schleimiger Milch auftreten. Von den 88 untersuchten Typen waren 18 schleimbildend.

Auffallend waren die äusserst unregelmässigen Formen der Stäbchen. Neben plumpen Kurzstäbchen herrschten in der Regel keulen- bis schlauchförmige Zellen vor. *Storck*⁷⁰⁾ bezeichnet diese Vielgestaltigkeit der Kurzstäbchen sogar als Hauptmerkmal für *Bact. lactis viscosum*. Der von ihm untersuchte Stamm säuerte Traubenzucker schnell und intensiv. Wir konnten eine Zuckervergärung hingegen nie beobachten. Auch *Long* und *Hammer*⁷³⁾ stellten fest, dass das *Bact. lactis viscosus* gewöhnlich aus Zucker weder Säure noch Gas zu bilden vermag. Doch seien gelegentlich auch Stämme isoliert worden, die aus Glyzerin, Arabinose, Lävulose, Galactose, Maltose, Lactose und Mannit Säure produzierten.

Uebereinstimmend mit den Beobachtungen der Amerikaner waren unsere Alkalibildner, die Milch ebenfalls nicht deutlich sichtbar zu peptonisieren vermochten, zur Hauptsache befähigt, Citrat zu vergären und daraus Alkali zu bilden. Hingegen ist es kaum denkbar, dass die alkalische Reaktion in Milch auf dem gleichen Wege, d. h. auch durch Citratvergärung, zustande kommt. Nach *Mussill*⁷⁴⁾ enthält die Milch im Durchschnitt 0,27% Zitronensäure. Unsere Stämme bildeten aber so viel Alkali, dass der Säuregehalt der beimpften Magermilch um 1,7 bis 6,2 Säuregrade zurückging. Dazu hätte der geringe Zitronensäuregehalt entschieden nicht ausgereicht.

Hastings, *Mansfield* und *Helz*⁷⁵⁾ möchten das Verhalten von Bakterien in künstlichen Nährböden ebenfalls nicht ohne weiteres auf die Milch übertragen. Nach ihnen hängt die Vergärung von Zitronensäure von der Natur der verfügbaren Kohlenstoffquelle ab. Es ist daher u. E. sehr wohl möglich, dass gewisse Bakterien in der Milch, wo ihnen noch andere Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen, Zitronensäure gar nicht vergären.

Die Alkaliproduktion unserer Stämme muss offensichtlich doch vorwiegend, wenn nicht ausschliesslich, auf einem leichten Kaseinabbau beruhen. Das geht ja schon daraus hervor, dass die Milch bei Zimmertemperatur nach ungefähr 10 Tagen beginnt, seifenwasserähnlich aufzuhellen.

Da nun aber diese Alkalibildung verhältnismässig langsam vor sich geht, so kann ihr in der Milch infolge Neutralisation mit der durch Milchsäurebakterien gebildeten Milchsäure keine besondere Bedeutung zukommen. Das Sauerwerden der Milch kann durch die alkalibildenden Kurzstäbchen nicht hinausgeschoben werden. Dies könnte höchstens bei stark proteolytischen Bakterien zutreffen. Welche Verbindung das durch die alkalibilden-

den Kurzstäbchen aus dem geringen Kaseinabbau produzierte Alkali eingeht, ob Ammoniak, Amine oder Ammoniumbasen, scheint noch nicht festzustehen.

Es sei noch erwähnt, dass der uns von W. Ritter zur Verfügung gestellte Kertész'sche Stamm des *Reductobacterium frigidum*, das von Kende und Kertész zur Verhütung des «Schmirgeligwerdens» der Milch empfohlen wird, mit unserm beschriebenen alkalibildenden Kurzstäbchen identisch zu sein scheint. Die beiden Organismen stimmten in morphologischer und physiologischer Hinsicht fast völlig überein. Einzig die Fettspaltung war geringer als bei den meisten unserer Stämme, was möglicherweise davon herrühren kann, dass es sich beim Kertész'schen Stamm um einen wohl schon seit längerer Zeit auf künstlichen Nährböden weiter gezüchteten Organismus handelte. Ueberdies stellte W. Ritter⁷⁶⁾ auch bei einigen von uns zur Verfügung gestellten Stämmen fest, dass auch diese das Talgigwerden von Milch und Rahm verhinderten.

4. Andere nicht peptonisierende Stäbchen.

Die dieser Gruppe zugeteilten Bakterien waren lebhaft beweglich. Auf Chinablau-Milchzuckeragar erzeugten sie ebenfalls eine alkalische Reaktion. Sie wurden in der «erstickten» Milch nicht so häufig gefunden wie die vorhin beschriebenen alkalibildenden Kurzstäbchen und die peptonisierenden Stäbchen. Einzig in den Versuchen 12 und 13 waren sie häufig vertreten.

Nach ihrem Verhalten auf den verschiedenen Nährböden müssen sämtliche untersuchten Stämme zu den nicht verflüssigenden Fluoreszenten gerechnet werden. Die meisten besaßen die Fähigkeit, in Milch esterige und auch kohlartige Gerüche hervorzurufen. Alle Stämme haben Trauben-, nicht aber Milchzucker vergoren. Nitrat wurde nie reduziert.

Von 14 Stämmen gehörten 5 dem *Bact. fluorescens non liquefaciens* syn. *Bact. putidum* Lehmann und Neumann an. Auf Agarstrich produzierten sie grünen Farbstoff und einen deutlichen Geruch nach Trimethylamin. 3 Stämme waren fettspaltend. In Versuch 12 machte das *Bact. putidum* ungefähr die Hälfte der nicht verflüssigenden Stäbchen aus. Ein Stamm besaß die Fähigkeit, in Milch einen unangenehm säuerlichen, an Schweinetränke erinnernden Geruch zu bilden. Ein solcher wurde auch bei der aufbewahrten rohen Milch festgestellt. Nach Weigmann und Wolff⁷⁷⁾ kann das *Bact. putidum* auch einen mehr angenehmen, mohrrübenähnlichen Geruch verursachen.

Die andern 9 Stämme gehörten dem *Bact. fragi* an, das nach Lehmann und Neumann ebenfalls zu den Gelatine nicht verflüssigenden Fluoreszenten gezählt wird. Sie waren aber nicht fluoreszierend und riefen in Milch einen aromatischen, himbeer- und erdbeerähnlichen Geruch hervor. Sie wurden zu einem erheblichen Prozentsatze im Rahm der in Versuch 13 untersuchten Milch gefunden und waren daher mitbeteiligt am Zustandekommen des aromatisch-säuerlichen, adstringierenden Geruches.

In Versuch 19 war ein nicht verflüssigendes Stäbchen zu 20—30% vertreten, das auf Gelatine in blatterartigen, coliähnlichen Kolonien wuchs, Nitrat reduzierte und Milch koagulierte. Es vergäerte sowohl Trauben- als Milchzucker und spaltete auch Fett. Die mit diesem Organismus geimpfte Milch wies nach einiger Zeit einen widerlichen Estergeruch auf. Dieses Stäbchen dürfte u. E. ebenfalls zur nicht verflüssigenden Fluoreszenten-Gruppe gehören.

5. *Coli-aerogenes*-Gruppe.

Wie wir früher schon erwähnten, ermittelten wir den *Coli-aerogenes*-Bakteriengehalt der Milch entweder an Hand der Plattenkulturen oder aber durch spezielle Bestimmung des Coli-Titers mittels der von Kessler und Swenarton empfohlenen Gentianaviolett-Galle-Pepton-Milchzuckerlösung.

In der Literatur findet man recht verschiedene Angaben über den zahlenmässigen Gehalt der Milch an *Coli-aerogenes*-Bakterien. Diese treten im allgemeinen nicht nur in der frischen, sondern auch in der bei oder unter 20—22° aufbewahrten Milch im Gegensatz zu den bereits besprochenen Bakterienarten nicht so sehr hervor. So hatte Wolff³⁾ bei seinen Untersuchungen die *Coli-aerogenes*-Bakterien nur spärlich gefunden. Und nach Dügge⁷⁸⁾ machten sie in gewöhnlicher Marktmilch nur 4% der Mikroflora aus.

Weigmann²⁸⁾ macht sie für den in Milch und Butter gelegentlich auftretenden Stallgeruch verantwortlich. Nach Pont⁷⁹⁾ vermögen die *Coli-aerogenes*-Bakterien in weitgehendem Masse die Rahmqualität zu beeinflussen, wobei sich *Bact. aerogenes* schädlicher erweist als *Bact. coli*.

Bei der von uns untersuchten «erstickten» Milch waren die Organismen der *Coli-aerogenes*-Gruppe fast immer bedeutend schwächer vertreten. Ihr Anteil an der gesamten Bakterienflora betrug nur selten mehr als 5%, meistens aber weniger als 1%.

Sie konnten daher in den wenigsten Fällen bei der Entstehung der Gerüche entscheidend mitgewirkt haben. Die *Coli-aerogenes*-Bakterien traten wohl in stark saurer Milch zuweilen bedeutend zahlreicher auf, aber erst nachdem die primären Geruchsveränderungen schon längst durch andere intensivere Gerüche verdrängt worden waren.

Wir haben daher die hier in Frage kommenden Bakterien nur als Gruppe bestimmt, charakterisiert durch die Fähigkeit, Milch zu koagulieren, Milchzucker leicht und unter Gasbildung zu vergären. Eine Trennung in das typische *Bact. coli* und das *Bact. aerogenes* führten wir nicht durch. Immerhin zeigte es sich bei gelegentlichen Abimpfungen aus Gentianaviolett-bouillon auf Schrägagarkulturen, dass *Bact. coli* weitaus vorherrschend war.

Bei allen an Milch-Reinkulturen vorgenommenen Geruchsprüfungen konnten wir nie einen stallartigen Geruch feststellen, immer aber einen eigenartigen, unangenehm fischig-säuerlichen Geruch.

D. Künstliche Erzeugung des «stickigen» Geruches.

Wir haben die in unsern Versuchen gefundenen Bakterienarten, die, auf sterile Milch oder sterilen Rahm verimpft, charakteristische Gerüche hervorriefen, zum Teil bereits an anderer Stelle erwähnt. So das *Bact. fluorescens* und seine Verwandten, das *Bact. Proteus*, die Mikrokokken, die Milchsäurestreptokokken, das *Bact. coli* und die alkalibildenden Kurstäbchen.

Nur selten haben wir aber die von diesen Organismen erzeugten Gerüche in «erstickter» Milch feststellen können. Meistens waren es hier Mischgerüche, in denen vielfach der eine oder andere typische Geruch etwas hervortrat. Wir erinnern an den durch das *Bact. fluorescens* hervorgerufenen Steckrübengeruch oder an die durch verflüssigende und nicht verflüssigende Stäbchen hervorgerufenen aromatischen Gerüche, die unmittelbar nach dem Abdecken der Gefässe aufstiegen. An deren Stelle traten dann aber sehr oft adstringierende, säuerliche Gerüche, die mit den erstgenannten auch etwa abwechselten. Nach *Weigmann* und *Wolff*⁷⁷⁾ können durch das Zusammenwirken verschiedener Bakterienarten verschiedene Aromas gebildet werden. Das *Bact. fluorescens* erzeugte z. B. mit *Bac. mycoides* oder mit *Streptococcus lactis* ein angenehmes, mit *Bac. megatherium*, *mycoides* und Milchsäurebakterien zusammen dagegen ein mehr unangenehmes, käsiges Aroma. Den in Milch etwa auftretenden Geruch nach tierischen Eingeweiden schreiben die genannten Autoren dem Zusammenwirken von *Bact. fluorescens* mit einem alkalibildenden Kurzstäbchen zu. Das *Bact. fluorescens* soll einen deutlichen Rübensgeschmack nur in Verbindung mit andern, vor allem mit den gewöhnlichen Milchsäurebakterien zu erzeugen vermögen.

Wir versuchten daher, da Reinkulturen nicht zum Ziele führten, den bei aufbewahrter Milch festgestellten «stickigen» Geruch durch verschiedene Bakteriengemische zu erzeugen. Dabei führten wir die Versuche bei Zimmertemperatur mit sterilem Rahm sowie mit erhitzter und roher, aseptisch gewonnener Milch durch.

1. Versuche mit sterilem Rahm.

Die in Versuch 16 aus Milch mit säuerlich-ranzigem Geruch (31 Stunden alt) isolierten Stämme wurden in der prozentualen Verteilung der Bakterienarten auf den Agarplatten auf sterilen Rahm verimpft. Hierfür stellten wir vorerst durch Nadelabstriche eine Aufschwemmung in steriler Magermilch her und setzten alsdann davon 1 cm³ zu 8–10 cm³ Rahm.

Im ersten Falle verwendeten wir folgende Stämme:

- 2 Alkalibildende Kurzstäbchen,
- 3 Gelbe und weisse Kokken,
- 2 *Bact. putidum*,
- 1 Peptonisierendes Stäbchen,
- 1 *Bact. coli*,
- 1 Milch koagulierendes Stäbchen,
- 1 *Strept. lactis*.

Durch die Reinkultur auf sterilem Rahm erzeugter Geruch:

- ranzig,
- sauer,
- 1 geruchlos, 1 fischig,
- nach Limburger Käse,
- fischig-säuerlich,
- Erdbeergeruch,
- herb-säuerlich.

In einem Kulturgemisch erzeugten diese Organismen einen vorherrschend ranzigen Geruch. In einer andern Probe, die ausser den oben genannten mit mehreren *Strept.-lactis*-Stämmen beimpft worden war, trat ein herb-säuerlich-adstringierender Geruch auf.

Im zweiten Falle beimpften wir den sterilen Rahm in der beschriebenen Weise mit den aus der 18 Stunden alten Milch des 16. Versuches isolierten Stämmen. Die betreffende Milch wies einen schwach ranzigen Geruch auf.

Das Impfmateriel enthielt folgende Organismenstämme:

- 2 *Bact. fluorescens*,
- 1 Gelatine verflüssigende Stäbchen,
- 2 Gelatine verflüssigende Stäbchen,
- 7 Graue und gelbe Kokken.

Durch die Reinkultur auf sterilem Rahm erzeugter Geruch:

- ranzig,
- schwach ranzig,
- nach Ester,
- sauer.

Der auf sterilem Rahm erzeugte Geruch war vorherrschend erdbeerartig, aber auch schwach ranzig und kam demjenigen, der bei Versuchsmilch wiederholt spontan entstanden ist, zum mindesten sehr nahe. Es wird nur selten gelingen, mit einem Bakteriengemisch den genau gleichen Geruch, der bei blossen Stehenlassen der gewöhnlichen Milch durch natürliche Auslese gewisser Organismen von selbst entsteht, künstlich hervorzurufen. Denn fast immer wird die eine oder andere Bakterienart aus irgendeinem Grunde die Oberhand gewinnen und somit auch den Geruch der Milch oder des Rahmes einseitig beeinflussen.

2. Versuche mit roher und erhitzter Vollmilch.

Es handelte sich hier einmal darum, festzustellen, welche Bakterien in erster Linie an der Erzeugung der von uns als vorherrschend beobachteten Mischgerüche beteiligt waren. Dabei schenkten wir unsere besondere Aufmerksamkeit den in aufbewahrter Milch so häufig angetroffenen alkalibildenden Kurzstäbchen. Und endlich suchten wir zu ermitteln, inwieweit sich sterilisierte Milch eigne, um die bakterielle Erzeugung von Geruchsstoffen zu studieren und aus den erzielten Ergebnissen auch für die Rohmilch zutreffende Schlüsse abzuleiten. Denn die rohe und gekochte Milch bieten den Mikroorganismen ganz verschiedene Existenzbedingungen. In der ersteren wirken bakterizide Kräfte, in der letzteren sind diese zerstört, wie besonders *Schlaepi*⁸¹⁾ an Frauenmilch eindeutig zeigte.

Gewisse Bestandteile sind auch chemisch verändert. Hierauf macht *Rogers*⁸⁰⁾ mit besonderem Nachdruck aufmerksam. Er ist der Auffassung, dass bei Reinkulturstudien in erhitzter Milch unzweifelhaft andere Ergebnisse erzielt werden als in roher Milch.

Versuch 1. Aseptisch gewonnene Milch wurde zu gleichen Teilen roh, pasteurisiert (30 Min. bei 63°) und gekocht (20 Min.) verwendet.

Geprüft wurde je 1 Stamm alkalibildender Kurzstäbchen, weisser Kokken, Tetrakokken, Milchsäurestreptokokken, *Bact. coli* und *Bact. fluorescens*. Der Milchsäurestreptococcus erzeugte in steriler Milch einen angenehm säuerlichen Geruch.

Die Einsaatmenge wurde so bemessen, dass auf den cm³ Milch ca. 100 000 bis 500 000 Keime entfielen. Hierbei gingen wir ähnlich vor wie *Schlaepi*⁸⁰⁾, indem wir eine Bouillonkultur verwendeten, die eine diffuse Trübung aufwies. Von einer 10 000fachen Verdünnung dieser Bouillonkulturen wurden je 0,05 cm³ zu 100 cm³ Milch gegeben. Die Flaschen wurden mit Glasdeckeln bedeckt und bei 20° aufgestellt.

Die Ergebnisse der Geruchsprüfungen sind in Tabelle 27 zusammengestellt.

Der Stamm 142 erzeugte in allen drei Proben einen ranzigen Geruch. Bei der sterilisierten Milch trat er früher auf als in den rohen und pasteurisierten Proben. Die beiden Kokkenstämme 37 und 38 riefen in der rohen Milch einen an sauren Most erinnernden Geruch hervor. In der pasteurisierten Milch dagegen erzeugte der Stamm 37 einen herben Geruch. Bei den sterilisierten Proben konnten auch nach 46 Stunden noch keine Geruchsveränderungen festgestellt werden.

Bei der Mischkultur von Kokken mit Milchsäurestreptokokken machte sich der Einfluss der Kugelbakterien nur in der rohen Milch nach 29 Stunden geltend. Der Geruch war hier herb-säuerlich, später rein säuerlich, als wäre er durch den Streptococcus allein hervorgerufen worden.

Tabelle 27

	Rohe Milch			Pasteurisiert			Gekocht		
	Geruch nach								
	29 Std.	36 Std.	46 Std.	29 Std.	36 Std.	46 Std.	29 Std.	36 Std.	46 Std.
1. Alkalibildende Kurzstäbchen 142	—	—	ranzig nach 58 Std.	—	—	ranzig nach 48 Std.	—	—	schwach ranzig
2. Gelber Coccus 37	—	—	nach Kernobstmost	—	—	herb	—	—	—
3. Tetracoccus 38	—	—	nach Kernobstmost	—	—	nach Most	—	—	—
4. Kokken, Milchsäure-Streptococcus	herb-säuerlich	rein säuerlich	rein säuerlich	säuerlich	stark säuerlich	scharf sauer	säuerlich	säuerlich	säuerlich
5. Alkalibildner, Kokken	säuerlich	adstringier.-säuerlich	adstringier.-säuerlich	—	schwach adstringier.	schwach adstringier.	süsslich-säuerlich	süsslich-säuerlich	aromatisch
6. Alkalibildner, Kokken, Bact. coli	süsslich-säuerlich	aromatisch bis futterig-sauer	aromatisch, futterig-sauer	süsslich-säuerlich	aromatisch, adstringier.	adstringier. sauer	süsslich-säuerlich	aromatisch, himbeerartig	himbeerartig
7. Alkalibildner, Milchsäure-Streptokokken	—	schwach futterig-sauer	ranzig-säuerlich	—	aromatisch-säuerlich	aromatisch-säuerlich	—	aromatisch-säuerlich	himbeerartig
8. Alkalibild., Kokken, Milchs.-Streptokokken	—	futterig-sauer	ranzig-säuerlich	—	schwach futterig-sauer	ranzig-aromatisch	—	aromatisch	aromatisch
9. Alkalibild., Kokken, Bact. coli, Milchsäure-Streptokokken	süsslich-säuerlich	adstringier., futterig-sauer	ranzig, adstringier.	süsslich-säuerlich	adstringier.-säuerlich	futterig-sauer	—	—	aromatisch
10. Alkalibild., Kokken, Bact. coli, Bact. fluorescens, Milchsäure-Streptokokken	süsslich-säuerlich, schwach n. Steckrüben	aromatisch, futterig-sauer	ranzig-sauer, schwach nach Steckrüben	süsslich-säuerlich	sehr unangenehm, adstringier.	adstringier.-sauer	—	adstringier., käsig	adstringier., käsig

Wurden Alkalibildner und Kokken zusammen in Milch verimpft, so konnte sowohl bei den rohen als auch bei den gekochten Proben der mostartige Geruch nicht mehr festgestellt werden. Die Milch wies jetzt einen schwach säuerlichen bis adstringierenden Geruch auf, der sich deutlich von demjenigen der Reinkulturen unterschied. Aber auch der Geruch der sterilisierten Milch wich von demjenigen der rohen und pasteurisierten ab.

Durch das *Bact. coli* scheint in den Mischkulturen durchwegs eine mehr aromatische Geruchskomponente begünstigt worden zu sein. Bei der rohen Milch trat dann noch ein futterig-saurer Geruch hinzu. Dieser konnte zum Teil auch noch bei der pasteurisierten Probe festgestellt werden, während bei der sterilisierten Milch wiederum der aromatische Geruch hervortrat.

Auffallend ist die Beeinflussung der Milchsäurestreptokokken durch den Alkalibildnerstamm. Bei der rohen Milch konnte ein futterig-saurer bis ranzig-säuerlicher Geruch festgestellt werden; bei der pasteurisierten und sterilisierten Milch war dagegen eine aromatische Komponente vorherrschend. Die Kokken vermochten, wie aus Variation 8 hervorgeht, keinen spürbaren Einfluss auszuüben.

Dass hier und auch bei der 7. Variation die Gerüche später auftraten als bei den andern Proben, beruht wohl darauf, dass nach 29 Stunden über 90% der Bakterienflora auf Alkalibildner entfielen. Erst nachdem sich dann auch die Milchsäurestreptokokken stärker entwickelt hatten, trat der erwähnte Geruch auf. Dagegen konnte in der 5. Probe, wo die Alkalibildner gegenüber den Kokken stark vorherrschten, schon nach 29 Stunden ein säuerlicher Geruch wahrgenommen werden. In der 4. Probe scheint der herb-säuerliche Geruch durch das Zusammenwirken der Milchsäurestreptokokken (87%) und der Kokken (13%) bedingt worden zu sein, während später, als nur noch Milchsäurebakterien nachgewiesen werden konnten, der Geruch der Milch rein säuerlich war.

In den Proben 9 und 10 traten trotz der zahlreicheren Bakterienarten im grossen und ganzen keine neuen Geruchskombinationen mehr auf. Einzig das *Bact. fluorescens* gab sich in der rohen Milch zeitweilig durch einen schwachen Steckrübengeruch zu erkennen. Es machte hier neben 75% alkali-bildenden Kurzstäbchen noch 15% aus. Den Rest bildeten Streptokokken, Kokken und *Bact. coli*.

Am ehesten stimmten die Gerüche der pasteurisierten Milch mit denjenigen der rohen überein, während durchwegs die der sterilisierten Milch davon abwichen. Fast überall war hier ein aromatischer Geruch hervorgetreten. Diese Abweichungen müssen wohl auf die durch die Erhitzung hervorgerufene chemische Veränderung gewisser Milchbestandteile zurückgeführt werden, wodurch einzelne Bakterienarten in ihrem Wachstum gehemmt, andere begünstigt worden sind. Zum Teil mochten die Unterschiede auch dadurch bedingt worden sein, dass der Kochgeruch der Milch andere

riechende Stoffe überdeckt oder mit ihnen andere Kombinationen hervorgerufen hat.

Versuch 2. Hier wurde eine Anzahl verschiedener Stämme mit *Streptococcus lactis* nur auf rohe, aseptisch gewonnene Milch verimpft und zur Zeit der auftretenden Gerüche auch noch der Säuregrad der Milch bestimmt. Der *Streptococcus-lactis*-Stamm erzeugte in steriler Magermilch einen etwas herb-säuerlichen Geruch.

Von den 2 Tage alten Bouillonkulturen, die mit steriler Kochsalzlösung auf einen möglichst gleichmässigen, schwachen Trübungsgrad eingestellt worden waren, setzten wir von der 100fachen Verdünnung je 0,2—0,3 cm³ zu 100 cm³ Milch. Die Fläschchen wurden zugedeckt und bei 20° belassen.

Nach 22 Stunden stellten wir die in Tabelle 28 näher bezeichneten Gerüche fest.

Tabelle 28.

Stamm	Geruch nach 22 Stunden		Säuregrad
	Rahm	Nach dem Schütteln der Milch	
Strept. lactis +			
Alkalibild. 186	nach Waschlappen, adstringier.	herb-säuerlich	9,1 ¹⁾
Alkalibild. 187	herb	schwach säuerlich	8,4
Bact. Alcalig. H.	herb	herb	8,2
Bact. putidum 189	süsslich-säuerlich, adstringier.	aromatisch-säuerlich	8,7
Bact. fluorescens 190	herb-säuerlich, schwach adstring.	herb	8,0
Ps. fragaroidea 191	ranzig, stark adstringierend	säuerlich, Bockgeruch	9,2
Tetracoccus 188	herb	herb	8,7
Alcalibild. 186	} süsslich-säuerlich	herb	8,6
Tetrac. 188			
Alcalibild. 186	} ranzig, adstringierend, nach Waschlappen	herb	8,9
Tetrac. 188			
Ps. frag. 191			
Strept. lactis allein	herb-säuerlich	herb-säuerlich	8,2
Ps. frag. 191 »	esterig, ranzig	ranzig, aromatisch	7,2
Alcalib. 186 »	geruchlos	geruchlos	7,0

¹⁾ Säuregrad der frischen Milch 7,1.

Adstringierend-säuerliche Gerüche wurden von *Streptococcus lactis* zusammen mit dem Alkalibildner-Stamm 186, dem *Bact. putidum*, dem *Bact. fluorescens* und einem dem *Ps. fragaroidea* nahestehenden Stäbchen erzeugt. Alle waren fettspaltend. Der Alkalibildner-Stamm 187 dagegen hatte keinen Einfluss.

Der durch den reinkultivierten *Tetracoccus liquefaciens* hervorgerufene Geruch wurde in Gesellschaft mit dem Stamm 186 ebenfalls unterdrückt. Es entstand ein säuerlich-adstringierender Geruch. Mit *Ps. fragaroidea* zusammen war er unangenehm und erinnerte an denjenigen eines Waschlappens.

Nach dem Durchmischen wiesen mit einer Ausnahme alle Proben einen herb-säuerlichen Geruch auf. Die vorhin beschriebenen Gerüche mussten also im Rahm entstanden sein. Sie unterschieden sich deutlich von denjenigen der darunter stehenden Milch. Einzig die mit dem *Ps.*-Stäbchen und dem Milchsäurestreptococcus infizierte Probe besass nach dem Durchmischen

einen andern Geruch. Er war eigenartig aromatisch-säuerlich, zeitweise konnte er mit einem eigentlichen Bockgeruch verglichen werden. Seine Entstehung kann man darauf zurückführen, dass durch die Mischung des vorwiegend ranzig-aromatischen Geruches des Rahmes mit dem ausschliesslich herb-säuerlichen der Magermilch eine neue Kombination zustande gekommen war.

Vergleichen wir die durch die Reinkulturen des *Streptococcus lactis*, *Ps. fragaroidea* und des alkalibildenden Kurzstäbchens erzeugten Gerüche mit denjenigen der Mischkulturen, so lässt sich auch aus diesem Versuche der wichtige Schluss ziehen, dass *an der Entstehung der säuerlich-adstringierenden, des Waschlappengeruches, kurz der «stickigen» Gerüche, die Milchsäurestreptokokken erheblich beteiligt sind.* Es ist daher auch verständlich, dass in Milch vom Zeitpunkt der ersten Geruchsveränderung an gerechnet, der Säuregehalt meistens ziemlich rasch zunimmt. Das ist nur möglich, weil sich die Milchsäurebakterien schon vorher beträchtlich vermehrt haben.

Der durch alkalibildende Kurzstäbchen und *Streptococcus lactis* hervorgerufene adstringierend-säuerliche oder auch Waschlappengeruch konnte nicht immer schon wahrgenommen werden, wenn der Säuregrad der Milch noch nicht oder erst wenig zugenommen hatte. Hier und da bedurfte es einer beträchtlichen Säurezunahme, bis ein Unterschied im Geruch der Rein- und Mischkultur der beiden Organismen auftrat. So konnte z. B. bei einer mit Milchsäurestreptokokken und alkalibildenden Kurzstäbchen beimpften Milchprobe ein unangenehm säuerlicher, teilweise beinahe fäkalartiger Geruch erst festgestellt werden, als die Milch einen Säuregrad von 12,8 aufwies. In einem andern Falle (der anfängliche Säuregrad der Frischmilch war ungefähr gleich hoch) hatte die Rahmschicht schon bei einem Säuregrad der Milch von 7,6 einen schwach ranzig-adstringierenden Geruch. Die nur Milchsäurestreptokokken enthaltende Parallelprobe roch rein säuerlich. Es müssen hier beim Freiwerden der Gerüche noch Faktoren mitspielen, die sich nicht ohne weiteres abklären lassen. Bis zu einem gewissen Grade kann wohl die verschiedene Empfindlichkeit des Geruchsinnes in Betracht gezogen werden. Auch verschieden günstige Wachstumsbedingungen für die eine oder andere Bakterienart mögen eine Rolle spielen. Aber damit wissen wir noch nicht, warum der eine Mischgeruch erst bei dem verhältnismässig hohen Säuregrad von 12,8, der andere aber schon bei 7,6 Säuregraden auftrat.

Im übrigen aber haben diese Versuche gezeigt, dass der «stickige» Geruch der Milch durch zwei oder mehrere Bakterienarten künstlich erzeugt werden kann. Es ist dies ein neuer Beweis dafür, dass das «Ersticken» der Milch ausschliesslich ein bakteriologischer Vorgang ist.

Am besten eignete sich für diese Untersuchungen aseptisch gewonnene rohe oder höchstens pasteurisierte Milch, wenn auch mit sterilisiertem Rahm in einzelnen Versuchen durchaus vergleichbare Ergebnisse erzielt worden

sind. Die Versuche mit sterilisierter Milch dagegen führten immer zu meist stark abweichenden Resultaten. Die Begünstigung mehr einheitlicher Gerüche wurde dabei wohl nicht nur durch gewisse chemische Veränderungen, die die Milch beim Kochen erleidet, sondern auch durch die nahezu aufgehobene Aufräumungsfähigkeit verursacht. Es kam hier in viel geringerem Masse zu einer Anreicherung der Bakterienflora an der Oberfläche, sodass sich dann gerade dort zufällig anwesende obligat aerobe Keime einseitig vermehren konnten. Vor allem aber störte der Kochgeruch der Milch immer das Bestimmen der gebildeten Riechstoffe.

E. Beeinflussung der Milchsäurebildner durch Alkalibildner.

1. Bisherige Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Bakterienarten.

Schon Koning²⁾ hatte beobachtet, dass die Säuerungskraft von *Streptococcus lactis* stieg, wenn er in Gesellschaft mit dem *Bact. fluorescens* in sterile Milch verimpft worden war. Koning war auch der Auffassung, dass bei der spontanen Säuerung der Milch alle vorkommenden Bakterienarten, also auch die Nichtsäurebildner, beteiligt seien, indem sie sich durch die Bildung verschiedener Abbauprodukte gewissermassen in die «Hände arbeiten». Ferner sollen die Milchsäurebakterien in Symbiose mit peptonisierenden Bakterien länger am Leben bleiben, weshalb der Säuregrad in der Marktmilch höher steige als in Reinkulturen. Zu ungefähr gleicher Zeit fand Marshall⁸²⁾, dass Milchsäurebakterien durch ein peptonisierendes Bakterium in ihrem Wachstum gefördert wurden. Burri und Thöni⁸³⁾ stellten fest, dass die Milchsäurebakterien in Symbiose mit Hefen schleimbildend werden können. Nach Belonowsky⁸⁴⁾ bildet das *Bact. coli* bei Anwesenheit von Milchsäurebakterien keine Bernsteinsäure.

Barthel⁸⁵⁾ hat gezeigt, dass *Oidium lactis* und einige Schimmelpilze bei Milchsäurestreptokokken stimulierend auf die Milchsäurebildung wirken. Nach Linneboe und Hastings⁸⁶⁾ dagegen wurde bei der Symbiose von *Streptococcus lactis* mit *Oidium lactis* die Gerinnungszeit gegenüber der Reinkultur nicht geändert. Wohl aber beschleunigte *Oidium lactis* bei *Bact. coli* die Gerinnung und förderte bei andern Organismen den Eiweissabbau.

Cox und Whithead⁸⁷⁾ studierten den Einfluss des *Bact. coli*, *Bac. subtilis*, eines *Staphylococcus* und des *Bact. faecalis* auf die Milchsäurebildung. Dabei fanden sie, dass *Bac. subtilis* und der *Staphylococcus* immer stimulierend wirkten, während das *Bact. coli* das eine Mal eine Erhöhung, das andere Mal eine Abnahme, das *Bact. faecalis* dagegen immer einen Rückgang der Säurebildung zur Folge hatte.

Beene Luxwolda⁸⁸⁾ dagegen hat keine Beeinflussung der Milchsäurebakterien durch andere Mikroorganismen feststellen können. Bei der Symbiose von Milchsäurebakterien mit *Bact. fluorescens* waren wohl die ersteren zahlreicher als in der Reinkultur. Es fehlte aber ein rascheres Ansteigen des Säuregrades. Einzig bei 20° war der Säuregrad der Mischkultur höher. Luxwolda schreibt dies aber nicht der wachstumsfördernden Wirkung der peptonisierenden Bakterien zu. Diese ermöglichen nach seiner Ansicht den Milchsäurebakterien nur, bei höherem Säuregrad zu leben. Hingegen wirken diese zwischen 13 und 20° hemmend auf das *Bact. coli*. Und bei 20° war das Wachstum der Milchsäurebakterien so kräftig, dass alle andern überwuchert und verdrängt wurden. Nur die Alkalibildner konnten durch ihr schnelleres Wachstum am Anfang die Säurezunahme aufhalten.

2. Eigene Untersuchungen.

Aus unsern früheren Versuchen geht hervor, dass die alkalibildenden Kurzstäbchen sozusagen als ständige Milchw Bewohner betrachtet werden müssen. Sie machten ausserdem sehr oft einen erheblichen Prozentsatz der Bakterienflora aus und spielten, wie wir festgestellt haben, auch bei der Entstehung von Gerüchen in der aufbewahrten Milch eine wichtige Rolle.

Da ferner die alkalibildenden Kurzstäbchen in älterer Milch oft noch allein neben den Milchsäurestreptokokken vorhanden waren, ergab sich die

Frage, ob wohl die Alkalibildner die Milchsäuregärung zu beeinflussen vermögen.

Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden mit aseptisch gewonnener Milch, steriler Magermilch und Milchzuckerbouillon durchgeführt.

a) Versuche mit roher und steriler Vollmilch.

Versuch 1. Je $\frac{1}{3}$ der aseptisch gewonnenen Milch wurde roh, nach vorheriger Pasteurisierung (30 Min. bei 63°) und nach 20 Min. langem Kochen zu 100 cm³ in 2 dl fassende Fläschchen abgefüllt und aus einer 24- bis 36stündigen Bouillon- bzw. Peptonschottenkultur in folgender Weise beimpft:

1. Alkalibildner (Stamm 142), nach 10 Stunden Streptococcus lactis (Stamm 135),
2. Streptococcus lactis, nach 10 Stunden Alkalibildner,
3. Alkalibildner und Streptococcus lactis gleichzeitig,
4. Ebenso, aber doppelt so viele Alkalibildner,
5. Streptococcus lactis allein.

Bei Stamm 135 handelte es sich um einen kräftigen Säurebildner, den wir in Magermilch bei 10tägiger Weiterzüchtung aufbewahrten. Der Alkalibildnerstamm wurde auf gewöhnlichem Schrägagar vorrätig gehalten.

Auf Grund von Vorversuchen erzielten wir die geeignete Einsaatmenge durch 400fache Verdünnung der Bouillonkultur in steriler Magermilch, wovon wir 1 cm³ zur Beimpfung der Proben (100 cm³) verwendeten. Aufstellung bei 20°.

Die Untersuchung wurde nach 10 und 30 Stunden vorgenommen. Für den kulturellen Nachweis eigneten sich die Chinablau-Milchzuckeragarplatten besonders gut, weil sie eine mühelose Unterscheidung der beiden Organismenarten zuließen.

Tabelle 29.

Art und Menge der geimpften Keime	Rohe Milch				Pasteurisiert				Gekocht			
	Nach 10 Std.		Nach 30 Std.		Nach 10 Std.		Nach 30 Std.		Nach 10 Std.		Nach 30 Std.	
	K'zahl	Red.	K'zahl	So	K'zahl	Red.	K'zahl	So	K'zahl	Red.	K'zahl	So
1. Alkalib. pro cm ³ 3900 Nach 10 Std. Strept. lactis	2,8 Mill.	—	207 Mill. 11 »	7,4	5,5 Mill.	—	204 Mill. 30 »	7,2	8,6 Mill.	—	196 Mill. 42 »	7,4
2. Strept. l. pro cm ³ 4700 Nach 10 Std. Alkalibild.	5000 1000	—	1 Mill. 34 »	7,0	29 000	—	86 Mill. 67 »	7,6	1,2 Mill.	—	540 Mill. 40 »	9,7
3. Alkalib. + Strept. l. gleichzeitig A 900) M 4800)	—	131 '	81 Mill. 77 »	8,5	—	81 '	110 Mill. 450 »	12,4	—	48 '	80 Mill. 1550 »	16,2
4. Alkalib. + Strept. l. gleichzeitig doppelt soviel A 3000) M 4100)	—	106 '	76 Mill. 100 »	8,8	—	48 '	— 710 Mill.	15,0	—	35 '	60 Mill. 1480 »	16,0
5. Strept. lactis allein per cm ³ 4700	—	8 $\frac{3}{4}$ Std.	< 1 Mill.	6,8	—	> 8 $\frac{3}{4}$ Std.	2 Mill.	6,8	—	6 Std.	61 Mill.	7,8

Hieraus ist ersichtlich, dass sich im ersten Falle die Alkalibildner in allen 3 Proben (roh, pasteurisiert und gekocht) ungefähr gleich stark vermehrt hatten. Die nach 10 Stunden eingeimpften Streptokokken wuchsen stärker in der pasteurisierten und gekochten Milch. Die bakterizide Wirkung der Rohmilch ist deutlich erkennbar, sie schien den Alkalibildner weniger zu beeinträchtigen. Der Streptococcus-lactis-Stamm hat sich innerhalb 10 Stunden nicht zu vermehren vermocht, während beim Alkalibildner die Keimzahl von 3900 auf 2,8 Millionen gestiegen war. Sie vermochten denn auch in der rohen Milch, trotzdem sie dieser 10 Stunden später zugesetzt worden waren, die Milchsäurestreptokokken zu überwuchern, während in der

pasteurisierten und gekochten Milch, wo die bakteriziden Kräfte nicht mehr wirkten, die Streptokokken die Oberhand zu gewinnen vermochten. Dementsprechend war auch der Säuregrad gestiegen.

In den Probenreihen 3, 4 und 5 ist ein Einfluss des Alkalibildnerstammes auf das Wachstum von *Streptococcus lactis* und damit auf die Säurezunahme deutlich erkennbar. Schon nach 10 Stunden ergaben sich bedeutende Unterschiede in der Reduktaseprobe.

Der Stamm 142 reduzierte Methylenblau nur sehr langsam und unvollständig. Demgemäss musste die bedeutend kürzere Reduktionszeit gegenüber derjenigen Milch, die nur mit *Streptococcus lactis* beimpft worden war, auf einer stärkeren Vermehrung der Milchsäurebakterien beruhen. Dies geht denn auch aus den bei der 30 Stunden alten Milch erzielten Ergebnissen hervor.

So enthielten die Mischkulturen der rohen Milch 70—100, der pasteurisierten 225—350 und der gekochten ungefähr 25mal mehr Milchsäurebakterien. Die rohe Milch wies einen um 1,7—2, die pasteurisierte um 5,6—8,3 und die gekochte um 8,2—8,4 höheren Säuregrad auf als die Reinkultur.

Dort, wo der Alkalibildner und der *Streptococcus* der Milch gleichzeitig zugesetzt worden waren, vermehrte sich der letztere rascher. Wurde dagegen der Alkalibildner erst 10 Stunden später eingeimpft, nahmen die Streptokokken langsamer zu. Besonders ausgeprägt ist der Unterschied bei der rohen Milch. Im ersten Fall vermochten wohl die Alkalibildner durch das lebhaftere Wachstum eine derart anregende Wirkung auszuüben, dass sich die bakteriziden Kräfte auf die Streptokokken weniger stark und vor allem weniger nachhaltig auswirken konnten.

Nun besteht allerdings auch ein Unterschied bei der pasteurisierten und der gekochten Milch. Hier ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zur rohen, die Streptokokken nach 10 Stunden, da der Alkalibildner zugesetzt wurde, diesem zahlenmässig schon bedeutend überlegen waren. Der Alkalibildner vermochte sich deshalb nicht mehr dermassen zu entwickeln, dass er auf das Wachstum der Streptokokken einen Anreiz ausübte, wie dies offenbar in der Milch der 3. Probenreihe der Fall war.

Eine gewisse zahlenmässige Ueberlegenheit der Alkalibildner scheint von Anfang an notwendig zu sein. Denn die Einsaat einer doppelten Menge hatte wenigstens bei der rohen und pasteurisierten Milch eine Erhöhung der Streptokokkenzahl und damit auch des Säuregrades zur Folge.

Unsere Untersuchungen bestätigen ferner die schon von *Wolff*³⁾ gemachte Beobachtung, dass sich die alkalibildenden Kurzstäbchen unbehindert neben den Milchsäurebakterien vermehren können, und zwar, wie aus Tabelle 29 ersichtlich ist, auch bei schon bedeutend erhöhtem Säuregrad.

Versuch 2. Hier beimpften wir aseptisch gewonnene Milch mit einem frisch isolierten Alkalibildner- und *Streptococcus-lactis*-Stamm. Der Anfangskeimgehalt bestand aus 3800 Alkalibildnern und 2000 Milchsäurebakterien. Der Säuregrad wurde in Abständen von 3—5 Stunden bestimmt.

Aus dem Verlauf der Säurekurve (Abbildung 4) geht hervor, dass eine Erhöhung des Säuregrades bei der Mischkultur nur kurze Zeit früher eingesetzt hatte als bei der Reinkultur. Anfänglich steigen die beiden Kurven gleichmässig an und trennen sich erst bei 8 Säuregraden. Die Kurve der

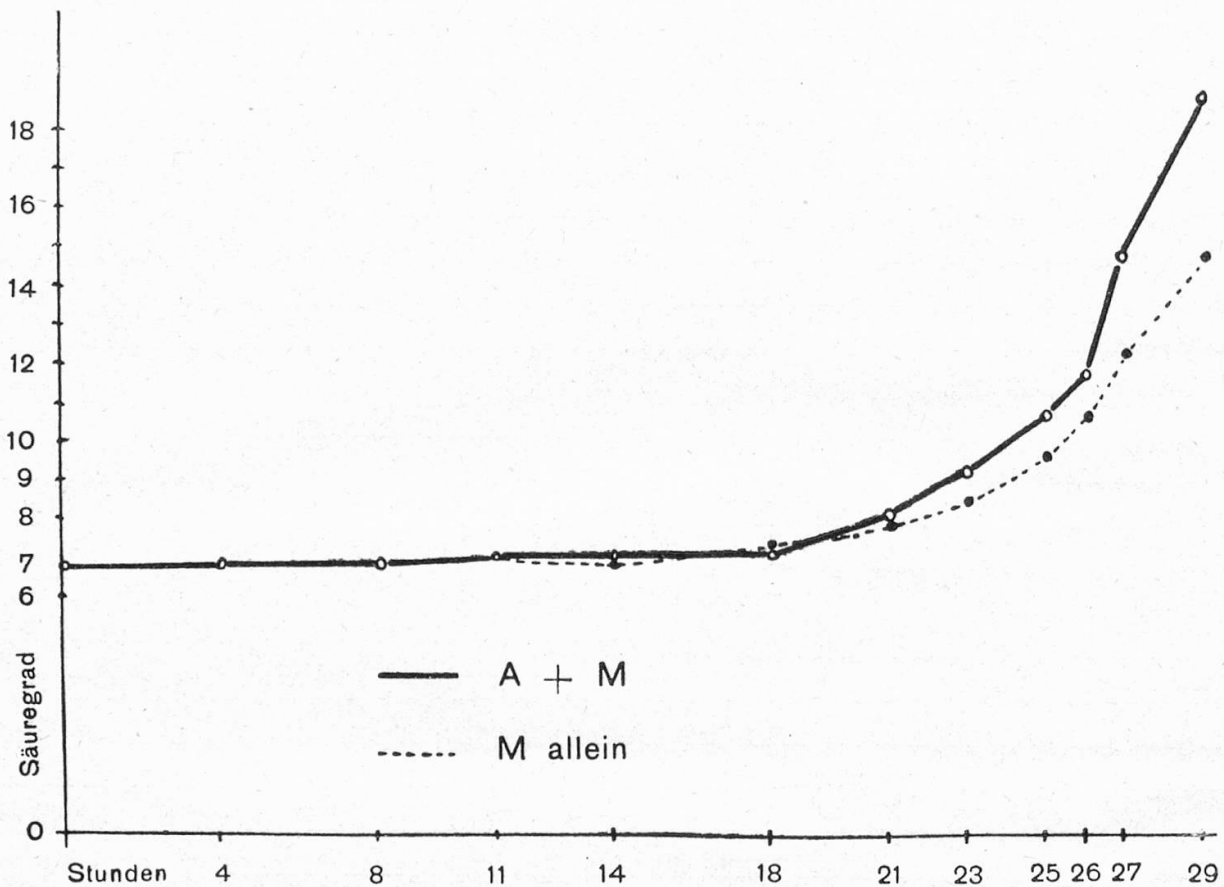


Abbildung 4.

Reinkultur setzt ihren langsamen Anstieg fort, während diejenige der Mischkultur nach einem etwas steileren Anstieg plötzlich in die Höhe schnellte. Der stimulierende Einfluss des Alkalibildners auf den *Streptococcus lactis* machte sich auch in diesem Versuche in deutlicher Weise geltend.

Es wurden zwar bei den zahlreich durchgeführten Untersuchungen nicht immer solche eindeutige Ergebnisse erzielt. Es gab Fälle, in denen ein Unterschied im Säuregrad erst nach einer beträchtlichen Säurezunahme auftrat, wie dies aus Tabelle 30 hervorgeht.

Ein Einfluss der Alkalibildner ist hier nur aus der Zahl der Milchsäurebakterien ersichtlich. Hingegen zeigt es sich, dass die Alkalibildner trotz des raschen zahlenmässigen Anstieges von den Milchsäurebakterien nach einer bestimmten Zeit doch überholt wurden. Die Alkalibildner können, wenn sie an Zahl stark überlegen sind, die Säuerung der Milch hintanhaltend, aber immer gewinnen die Säurebildner schliesslich die Oberhand. Könnten die beiden Keimzahlenreihen in Kurven eingetragen werden, so müssten diese sich in einem bestimmten Punkte schneiden.

Es lässt sich nicht ohne weiteres erklären, warum in diesem Versuche eine deutliche Wirkung der Alkalibildner ausblieb. Man ist versucht, dies darauf zurückzuführen, dass die Alkalibildner während 22 Stunden vor-

Tabelle 30.

	Reinkultur v. Strept. l.		Mischkultur, A + M gleichzeitig geimpft			Mischkultur: Zuerst M nach 10 Std. A			Mischkultur: Zuerst A nach 10 Std. M		
	M	S°	M	A	S°	M	A	S°	M	A	S°
Frisch beimpft	800	7,1	800	2 300	7,1	1 500	—	7,1	—	2 600	7,1
Nach 6 Std.	3 700	7,1	7 000	89 000	7,1	—	—	7,1	—	—	7,1
» 10 »	162 000	7,2	220 000	9,8 Mill.	7,1	172 000	1 000	7,0	10 000	6,6 Mill.	7,2
» 14 »	617 000	7,2	1 Mill.	25 »	7,0	7 Mill.	1 000	7,0	—	11 »	7,1
» 18 »	9,5 Mill.	7,2	33,6 »	91 »	7,2	43 »	900 000	7,0	—	140 »	7,1
» 22 »	62 »	7,8	93 »	115 »	7,8	180 »	7 Mill.	7,4	700 000	500 »	7,0
» 26 »	verunglückt	10,0	9 Milliard.	2 Milliard.	10,5	1 Milliard.	113 »	11,2	90 Mill.	3 Milliard.	7,2
» 30 »	17 Milliard.	14,0	22 »	2 »	15,1	22 »	—	14,2	300 »	5 »	7,0
» 34 »	—	—	—	—	—	—	—	—	2 Milliard.	3 »	8,0
» 38 »	—	—	—	—	—	—	—	—	22 »	—	13,1

herrschten, wobei sie so viel Alkali produzierten, dass die anfänglich gebildete Milchsäure neutralisiert wurde. Nun aber geht, wie wir früher gesehen haben, eine messbare Alkalibildung sehr langsam vor sich. Ferner müsste dort, wo das Verhältnis Milchsäurebakterien zu alkalibildenden Kurzstäbchen gerade umgekehrt war (Streptokokken der Milch 10 Stunden vor den Alkalibildnern zugesetzt) eine stärkere Zunahme des Säuregrades stattgefunden haben. Dies war aber nicht der Fall.

b) Versuche mit steriler Magermilch.

Versuch 3. Zunächst sei ein vergleichender mit Vollmilch (roh und gekocht) und steriler Magermilch durchgeführter Versuch angeführt. Zur Beimpfung der Proben verwendeten wir 24 Stunden alte Bouillonkulturen vom Alkalibildnerstamm 186 und eines frisch isolierten Streptococcus-lactis-Stammes. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 18–20°. Die Ergebnisse der in kürzeren Zeitabständen vorgenommenen Untersuchungen sind in Tabelle 31 zusammengestellt.

Tabelle 31.

	Rohe Milch			Gekochte Vollmilch			Sterilisierte Magermilch		
	Keimzahl		Säure- grad	Keimzahl		Säure- grad	Keimzahl		Säure- grad
	Milchsä.	Alkalib.		Milchsä.	Alkalib.		Milchsä.	Alkalib.	
Frisch beimpft	3900	8400	7,9	3600	12 100	7,9	3500	9000	6,1
13 Std. M	7 Mill.	—	7,9	3,4 Mill.	—	7,9	3,4 Mill.	—	6,1
M+A	5 »	5 Mill.	7,9	2,5 »	6,7 Mill.	7,9	5 »	9,2 Mill.	6,4
16 » M			8,0			8,0			6,7
M+A			8,0			7,8			6,4
20 » M			8,0			7,8			6,4
M+A			8,1			7,9			6,4
23 » M	1650 Mill.		9,0	620 Mill.		8,2	290 Mill.		6,8
M+A	1400 »	30 Mill.	9,0	300 »	150 Mill.	8,4	1100 »	30 Mill.	6,8
26 » M			11,2			8,6			7,0
M+A			11,2			9,0			8,3
28 » M			14,0			9,2			7,0
M+A			15,2			10,2			10,0
30 » M			19,0			10,4			7,7
M+A			19,2			12,0			13,1

Bei den verschiedenen Proben bestehen in bezug auf den Säuregrad beträchtliche Unterschiede. Bis zu 23 bzw. 26 Stunden hatte er sowohl in der Reinkultur von *Streptococcus lactis* als auch in der Mischkultur mit dem Alkalibildner gleichmässig zugenommen. Die Zunahme betrug bei der Magermilch 0,7, bei der gekochten Vollmilch 0,5 und bei der rohen Milch 2,2 Säuregrade. Diese säuerte von 23 Stunden ab stärker als die beiden andern Proben. Es mag dies überraschen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam jedoch auch *Meier*⁸⁹⁾. Er zeigte, dass sich mit zunehmender Aufbewahrungsdauer in aseptisch gewonnener Milch die Bakterien stärker vermehrten als in pasteurisierter und sterilisierter Milch. Er führt dies darauf zurück, dass in der erhitzten Milch ungünstige Veränderungen der Nährstoffe stattgefunden haben.

Während sich bei der Magermilch die Milchsäurestreptokokken bei Anwesenheit der Alkalibildner gegenüber der Reinkultur in erheblichem Masse vermehrten, konnte bei der Rohmilch ein solcher Einfluss nicht erkannt werden, wohl aber bei der gekochten Vollmilch. Hier machten die Alkalibildner noch $\frac{1}{3}$ der Gesamtflora aus, in den beiden andern Proben waren sie nur noch zu 2—2,5% vertreten. Die Säurezunahme der Mischkultur erfolgte daher vorläufig noch etwas langsamer.

Die Alkalibildner scheinen ihren Einfluss darin auszuüben, dass sie für die Milchsäurestreptokokken günstige Bedingungen schaffen, indem durch ihre anfängliche stärkere Vermehrung gewissermassen eine Reizwirkung ausgeübt wird. Diese scheint nachhaltig zu sein und auch noch dann zu wirken, wenn die Alkalibildner nur noch in geringer Zahl anzutreffen sind. Es ist ja eine seit langem bekannte Tatsache, dass eigene und fremde Stoffwechselprodukte in geringen Mengen weder die Bakterien töten, noch ihre Entwicklung hemmen, sondern vielmehr ihre Vermehrung beschleunigen.

Man ist daher geneigt, die raschere Entwicklung der Milchsäurestreptokokken bestimmten Stoffwechselprodukten der Alkalibildner zuzuschreiben. Welcher Natur diese Stoffe sind, ist allerdings nicht bekannt. Auf alle Fälle kann die Wachstumsförderung nicht darauf beruhen, dass das durch die Alkalibildner produzierte Alkali die Milchsäure neutralisiert. Denn die Alkalibildung geht ja sehr langsam vor sich und wäre zu gering, um auch bei erhöhtem Säuregrad derart neutralisierend zu wirken, dass die Milchsäurebakterien besser gedeihen könnten.

Hingegen wäre es denkbar, dass dem *Streptococcus lactis* Spuren gelösten Kaseins in besonders leicht aufnehmbarer Form zur Verfügung gestellt würden, wenn auch die kaseolytische Wirkung der Alkalibildner als sehr schwach bezeichnet werden muss.

Diese Annahme scheint um so berechtigter zu sein, als die Reizwirkung gerade dort am deutlichsten zutage trat, wo die Eiweisstoffe, wie in der sterilisierten Magermilch, durch Hitze beeinträchtigt worden waren. In der rohen Milch bestehen, sobald die bakterizide Phase überwunden ist, in jener Beziehung bessere Verhältnisse.

Vergleichen wir den Verlauf der Säurekurven in steriler Mager- und roher Vollmilch miteinander, so ergibt sich folgendes Bild:

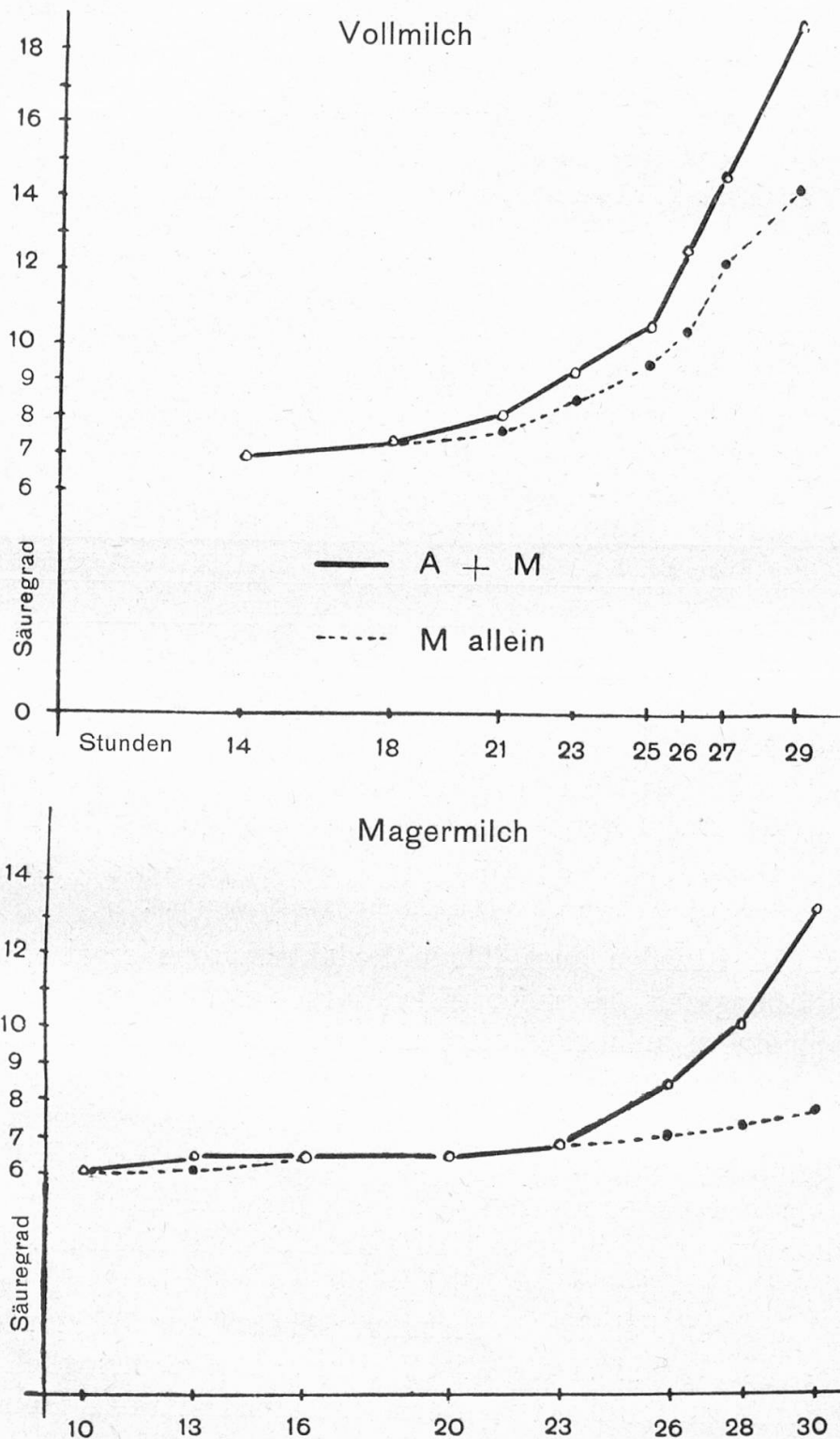


Abbildung 5.

Je höher der Säuregrad, um so grösser sind die Unterschiede zwischen dem Säuregrad der Rein- und Mischkultur. In der Magermilch verläuft die Säurekurve der Reinkultur viel flacher als in der rohen Vollmilch. Die Kurven der Mischkulturen dagegen verlaufen ziemlich parallel, mit dem Unterschied, dass die Steigung bei der rohen Milch etwas früher einsetzt.

Da sich die rohe Milch, wie wir gezeigt haben, auch anders verhalten kann, dehnten wir unsere Untersuchungen noch auf andere Faktoren aus, die bei der Beeinflussung der Milchsäurebakterien durch die Alkalibildner in Frage kommen können.

Hierher gehört einmal das zahlenmässige Verhältnis der Alkalibildner zu den Milchsäurestreptokokken.

Versuch 5. Von einer 24 Stunden alten Bouillonkultur eines *Streptococcus-lactis*-Stammes stellten wir in 9 cm³ sterile Mager- und aseptisch gewonnene Frischmilch enthaltende Röhrchen durch Uebertragung von je 1 cm³ eine Verdünnungsreihe von $\frac{1}{10}$ T bis $\frac{1}{100}$ M her. Während die Röhrchen je einer Reihe nur Milchsäurestreptokokken enthielten, fügten wir zu jedem Röhrchen zweier weiterer Reihen 0,1 cm³ einer 100fach verdünnten Bouillonkultur eines Alkalibildnerstammes hinzu, sodass in 1 cm³ Milch jedes Gläschens eine 10 000fache Verdünnung der Ausgangskultur enthalten war. Im 1. Gläschen mochte das Verhältnis der Milchsäurebakterien (M) zu den Alkalibildnern (A) ungefähr 1:1 betragen haben. In jedem folgenden Röhrchen verschob sich das Verhältnis immer mehr zugunsten der Alkalibildner.

Nach 14 Stunden führten wir die Reduktaseprobe aus und nach 21 bzw. 24 und 25 Stunden wurde der Säuregrad bestimmt.

Tabelle 32.

Verdünnung	Rohe Milch							Sterilisierte Magermilch						
	Reduktase			Säuregrad				Reduktase			Säuregrad			
		M	M + A		M	M + A	¹⁾		M	M + A		M	M + A	¹⁾
1	Nach 14 Std.	43 Min.	16 Min.	Nach 21 Std.	11,0	11,4	0,4	Nach 14 Std.	3 Std.	4 Min.	Nach 21 Std.	8,1	12,3	4,2
2		2 1/2 Std.	24 »		9,4	10,2	0,8		4 1/2 Std.	8 »		7,2	11,2	4,0
3		3 Std.	30 »		8,4	9,0	0,6		6 1/4 »	1 Std.		7,2	9,4	2,2
4		3 1/2 Std.	43 »		7,8	8,2	0,4		6 3/4 »	1 1/4 Std.		7,0	8,0	1,0
5		5 1/2 »	1 1/2 Std.		9,2	11,8	2,6		10 »	1 3/4 »		7,8	10,1	2,3

¹⁾ Unterschied gegenüber Reinkultur. ²⁾ Nach 24 Std. ³⁾ Nach 25 Std.

Die nach 14 Stunden ausgeführte Reduktaseprobe ergab eine um so kürzere Entfärbungszeit, je mehr Milchsäurestreptokokken im Verhältnis zu den Alkalibildnern anfänglich zugesetzt worden waren. Im ersten Röhrchen betrug das Verhältnis M:A ursprünglich ungefähr 1:1. In den weiteren Verdünnungen waren zunächst die Alkalibildner vorherrschend, die Milchsäureorganismen kamen weniger zur Geltung. Entsprechend den stärker verdünnten Aufschwemmungen der eingesäten Milchsäurestreptokokken verhielt sich auch der Säuregrad. Die Unterschiede zwischen Rein- und Mischkultur waren bei der rohen Milch wieder verhältnismässig gering, auffallend gross dagegen bei der Magermilch. Aber schon 3 Stunden später wies auch bei der Rohmilch die Mischkultur mit der anfänglich höchsten Verdünnung der Milchsäurebakterien eine bedeutend stärkere Säurezunahme auf. Hier ist der Einfluss der Alkalibildner besonders deutlich erkennbar. Je grösser ihr Anteil anfänglich im Verhältnis zu den Milchsäurebakterien in der Milch war, um so rascher schnellte dann nach einer bestimmten Zeit, nachdem die Milchsäurestreptokokken die Oberhand gewonnen hatten, der Säuregrad in die Höhe. Ein hoher Gehalt an Alkalibildnern vermochte in stärkerem Masse günstige Bedingungen für die Milchsäurebakterien zu schaffen.

Versuch 6. Die Beimpfung der Proben erfolgte in ähnlicher Weise wie vorher. Die Aufbewahrungstemperatur betrug aber 15°.

Tabelle 33.

	Rohe Milch				Sterilisierte Magermilch			
	Keimzahl		Reduk- tase- probe	Säure- grad	Keimzahl		Reduk- tase- probe	Säure- grad
	Milchs b.	Alkalib.			Milchs b.	Alkalib.		
Frisch beimpft	3 900	8 400	—	7,9	3 500	9 000	—	6,1
15 Std. { M	87 000	—	—	—	179 000	—	—	—
{ M + A	110 000	68 000	—	—	390 000	670 000	—	—
39 Std. { M	41 000 000	—	2 1/4 Std.	8,1	60 000 000	—	> 3 Std.	6,6
{ M + A	340 000 000	130 000 000	42 Min.	8,1	178 000 000	20 000 000	18 Min.	6,6

Der wachstumsfördernde Einfluss der Alkalibildner auf die Milchsäurestreptokokken konnte auch bei einer Aufbewahrungstemperatur von 15° festgestellt werden. Nur ging in diesem Falle das Keimwachstum infolge der niedrigeren Temperatur bedeutend langsamer vor sich. Im Säuregrad hatte sich dagegen in den 39 Stunden alten Proben noch kein Unterschied herausgebildet.

Versuch 7. Hier wurden in der beschriebenen Weise sterilen Magermilchproben Mischkulturen von Streptococcus lactis (hiervon 3 Verdünnungen) mit je einem Stamm weisser Mikrokokken, Tetrakokken, des Bact. fluorescens sowie eines Alkalibildners zugesetzt.

Tabelle 34.

	Säuregrad nach		
	21 Std.	26 Std.	28 Std.
	1. Verd.	2. Verd.	3. Verd.
Strept. lactis allein . . .	7,0	7,6	7,4
Alkalibildner, Stamm 186 .	9,2	12,5	11,2
67 .	8,8	11,7	10,7
142 .	8,0	11,0	10,5
Tetracoccus, Stamm 37 .	7,6	9,6	9,4
» 38 .	8,8	12,8	10,2
Bact. fluorescens » 40 .	9,2	12,3	10,4

Die Mikro- und Tetrakokken sowie das Bact. fluorescens übten ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf Streptococcus lactis aus. Am wenigsten wirksam zeigte sich der Mikrokokkenstamm 37. Der Tetracoccus und das Bact. fluorescens standen dem Alkalibildner nicht nach. Auch hier war ihr anfängliches Verhältnis zu den Milchsäurestreptokokken für die Säurezunahme im Vergleich zur Reinkultur massgebend. Im Verhalten des Tetrakokkenstammes, der ein schwacher Säurebildner war, liegt zugleich ein Beweis, dass die wachstumsfördernde Wirkung der Alkalibildner nicht von der Alkaliproduktion herrühren kann.

Die Kokken und das Bact. fluorescens waren stark kaseinlösend. Es mussten somit in den betreffenden Proben den Milchsäurebakterien mehr gelöste Eiweisstoffe zur Verfügung gestanden haben als bei den Alkalibildnern. Trotzdem aber konnte keine stärkere Säurezunahme beobachtet

werden. Daraus schliessen wir, dass die das Wachstum der Milchsäurestreptokokken fördernden Faktoren vorwiegend anderer Natur sein müssen.

c) Versuche mit Milchzuckerbouillon.

Die Milchzuckerbouillon, die in Gläschen zu 8 cm³ abgefüllt wurde, enthielt 1% Pepton und 0,5% Milchzucker sowie Bromkresolpurpur (1⁰/₁₀₀ einer 1,6%igen alkoholischen Lösung) als Indikator.

Diese Nährlösung war ganz besonders geeignet, den wachstumsfördernden Einfluss auf die Milchsäurebakterien fortlaufend zu beobachten. Die Nährlösung der Mischkultur trübte sich immer 10—12 Stunden früher als diejenige der Reinkultur. Es kam aber sehr oft vor, dass zur Zeit, als in der Mischkultur die Farbe des Indikators nach Olivgrün umschlug, die Reinkultur überhaupt noch keine Trübung aufwies. Im allgemeinen trat die saure Reaktion (Farbumschlag nach Gelb = p_H ungefähr 5,2) in der Mischkultur immer 3—4 Stunden früher auf.

Versuch 8. Zwei Reihen Bouillonröhrchen wurden mit je einer kleinen Oese 24stündiger Streptococcus-lactis-Kultur beimpft. Hierauf setzten wir zu je einer Reihe in fortlaufenden Verdünnungen von 4 Oesen bis ¹/₁₀ Oese frische Bouillonkultur eines Alkalibildners bzw. von Bact. fluorescens. Aufstellung bei 20°. Nach 24 Stunden bestimmten wir den Säuregrad, indem wir die Nährlösung auf den Neutralpunkt von Bromkresolpurpur zurücktitrierten.

Tabelle 35.

Art der verimpften Organismen	Impfmenge	Säuregrad nach 24 Std.
1. M allein	1 Oese	8,0
2. M + A (M immer 1 Oese) .	A = 1 »	12,0
3. » + A	2 »	11,3
4. » + A	3 »	11,3
5. » + A	4 »	11,3
6. » + A	¹ / ₁₀ »	10,6
7. » + A	¹ / ₁₀₀ »	10,1
8. » + A	¹ / ₁₀₀₀ »	9,3
9. » + F	1 »	4,5
10. » + F	2 »	4,8
11. » + F	3 »	6,8
12. » + F	4 »	6,9
13. » + F	¹ / ₁₀ »	8,3
14. » + F	¹ / ₁₀₀ »	8,4
15. » + F	¹ / ₁₀₀₀ »	9,2

M = Strept. lactis
A = Alkalibildendes Kurzstäbchen
F = Bact. fluorescens

Der Einfluss des Bact. fluorescens auf den Streptococcus lactis unterscheidet sich in nicht geringem Masse von demjenigen des Alkalibildners. Während dieser durchweg eine bedeutend stärkere Säurezunahme bewirkte, blieb diese unter dem Einfluss vom Bact. fluorescens in 4 Röhrchen hinter der Reinkultur zurück. In 3 weiteren Röhrchen war der Säuregrad der Mischkultur nur wenig höher als in der Reinkultur.

Beim Alkalibildner hatte die Erhöhung der Zahl der eingesäten Keime eine geringe, die Herabsetzung eine stärkere Verminderung des Säureanstieges zur Folge. Beim *Bact. fluorescens* dagegen war die Säurezunahme um so höher, je stärker verdünnt die Impfmenge war. Die Säuregrade 6,8 und 6,9 der mit 3 und 4 Oesen beimpften Proben müssen mehr als Zufallsergebnisse gewertet werden.

Die durch den Alkalibildner bewirkten Abstufungen lassen sich wohl in der Weise erklären, dass es in den Röhrchen 3—5 länger dauerte, bis die Milchsäurebakterien die Oberhand gewonnen hatten. In den Röhrchen 6—8 dagegen wurden infolge der geringeren Einsaatmenge weniger Reizstoffe gebildet.

Möglicherweise wurden beim Beimpfen mit der Fluoreszentenkultur im Vergleich zum Alkalibildner bedeutend mehr Keime in die betreffenden Röhrchen gebracht. Wir sind zwar von einem möglichst gleichen Trübungsgrad ausgegangen. Erfahrungsgemäss kann man sich aber in der Beurteilung des Keimgehaltes von Nährlösungen mit verschiedenen Organismen auf Grund des Trübungsgrades sehr täuschen. Eine stärkere Verdünnung der Impfmenge schaffte ein günstigeres Verhältnis zu den Milchsäurestreptokokken, sodass dann auch hier der Säuregehalt etwas rascher anstieg als in der Reinkultur.

Es folgt somit auch aus diesem Versuche, dass in der Beeinflussung der Milchsäurestreptokokken durch andere Bakterien das zahlenmässige Verhältnis der beiden Organismengruppen eine wichtige Rolle spielt. Es konnte aber auch der einwandfreie Beweis erbracht werden, dass der stimulierende Einfluss der alkalibildenden Kurzstäbchen, des *Bact. fluorescens* und der Tetrakokken nicht darauf beruhen kann, dass den Milchsäurestreptokokken leicht verwertbare Stickstoffverbindungen zur Verfügung gestellt werden. Denn die Bouillonröhrchen mit den Milchsäurebakterien-Reinkulturen enthielten ja Pepton (Pepton Witte und Kaseinpepton Merck 1:1). Und doch vermehrten sich hier die Streptokokken bedeutend langsamer.

d) Diskussion der Ergebnisse.

In Uebereinstimmung mit verschiedenen Autoren haben die vorstehenden Untersuchungen gezeigt, dass der *Streptococcus lactis* durch andere Bakterien in seinem Wachstum gefördert wird. Unter dem Einfluss der von uns besonders berücksichtigten alkalibildenden Kurzstäbchen, aber auch anderer Bakterien, stieg nicht nur die Zahl der Milchsäurestreptokokken. Auch der Säuregrad nahm meistens beträchtlich zu.

Bei der gekochten Vollmilch und vor allem bei der gekochten Magermilch und der Nährbouillon waren die Unterschiede zwischen Rein- und Mischkultur immer vorhanden, wogegen die Ergebnisse bei der rohen Milch weniger einheitlich ausfielen. Dies ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, dass die bakterizide Wirkung nicht in jeder frischen Milch gleich stark zur Geltung kommt. Weist eine solche erhöhte bakterientötende Wir-

kung auf, so gehen die Milchsäurestreptokokken stärker zurück, wobei dann die Wachstumsförderung der Alkalibildner deutlicher zum Ausdruck kommen kann. Diese Erklärung wird noch dadurch gestützt, dass die Intensität des stimulierenden Einflusses auch ganz erheblich vom zahlenmässigen Verhältnis der beiden Organismen abhing. Nur wenn die Alkalibildner den Milchsäurestreptokokken anfänglich überlegen waren, trat zwischen Rein- und Mischkultur der Unterschied im Keimgehalt und Säuregrad auf. Natürlich hängt dies auch mit den Wachstumsbedingungen für die Alkalibildner zusammen. Sind solche für diese ungünstig, so werden sie weniger leicht während einer bestimmten Zeit die Oberhand über die Milchsäurestreptokokken zu gewinnen vermögen.

Obwohl das durch die Alkalibildner erzeugte Alkali sowie die Eiweisspaltungsprodukte für die Wachstumsförderung der Milchsäurebakterien nicht in Frage kommen können, ist es doch nicht angängig, jene Erscheinung mit Luxwolda erklären zu wollen. Er schreibt das bei seinen Untersuchungen beobachtete raschere Wachstum der Milchsäurebakterien und die stärkere Zunahme des Säuregrades einfach dem Umstande zu, dass der *Streptococcus lactis* in Gegenwart anderer Organismen bei einem höheren Säuregrad leben könne. Nach unserer Auffassung muss man vielmehr an besondere Wuchsstoffe denken, die wie Katalysatoren wirken. Eine solche Vermutung scheint um so eher berechtigt zu sein, als nach neuesten Forschungsergebnissen beim Wachstum höherer und niederer Organismen bestimmte Aktivatoren, Bios und andere, eine ausschlaggebende Rolle spielen. So hat *Schopfer*⁹⁰⁾ gezeigt, dass der Pilz *Phycomyces* ohne das Vitamin B₁ nicht zu wachsen vermag. Und *Orla-Jensen* und seine Mitarbeiter⁹¹⁾ stellten fest, dass sich Milchsäurebakterien bedeutend rascher entwickeln, wenn die als Nährboden dienende Milch $\frac{1}{40}$ 0/00 Hefeautolysat enthielt. Die zuletzt genannten Forscher wiesen ferner nach (die Arbeiten wurden veröffentlicht, nachdem unsere Untersuchungen schon einige Zeit abgeschlossen waren), dass gerade die echten Milchsäurebakterien nur dann wachsen, wenn die beiden Aktivatoren Bios und Laktoflavin zugegen sind. Orla-Jensen glaubt sogar annehmen zu dürfen, dass die gelegentlich auftretende schlechte Säuerungsfähigkeit der Milch einzelner Tiere darauf zurückzuführen sei, dass die betreffende Milch die normalerweise in genügender Menge vorkommenden Aktivatoren in zu geringer Menge enthalte.

Für das *Bact. fluorescens* ist die Bildung von Wuchsstoffen bereits nachgewiesen⁹¹⁾. Das Bakterienfluoreszein enthält Flavın, das zusammen mit Bios ebenfalls das Wachstum und die Säurebildung gewisser Milchsäurebakterien fördern soll.

Der künstliche Zusatz von Bios und Laktoflavin wirkte nur bei kohlebehandelter Milch (in der die natürlich vorkommenden Aktivatoren durch Behandlung mit aktiver Kohle entfernt worden waren), wogegen Hefeautolysat und gewisse proteolytische Enzyme (z. B. Pankreatin) imstande sein sollen, die Milchsäurebakterien auch in nicht kohlebehandelter Milch

zu erhöhter Säureproduktion anzuregen. Wie nach Orla-Jensen auch für diese Präparate ausser Bios und Laktoflavin noch andere Aktivatoren wirksam sein müssen, muss man annehmen, dass auch die von uns untersuchten Alkalibildner und andere Bakterien noch unbekannte Wachstumsstoffe zu produzieren vermögen.

Es ist einleuchtend, dass diese Stoffe besonders dann reichlich vorhanden sind, wenn die zu ihrer Produktion befähigten Organismen zu einer bestimmten Zeit zahlenmässig über die Milchsäurebakterien dominieren. Da sich auch Tetrakokkenstämme sowie das *Bact. fluorescens* als wachstumsfördernd erwiesen haben, so ist es u. E. erklärlich, warum eine von Anfang an bakterienreiche Milch, auch wenn die Milchsäurebakterien nur in geringer Menge vertreten sind, bei der üblichen Aufbewahrungstemperatur rascher sauer wird als eine bakterienärmere, aber gleichviel Säurebakterien enthaltende Milch.

Nun aber gingen während der Aufbewahrung die Kokken prozentual meist rasch und stark zurück. Das *Bact. fluorescens* war nur selten in überwiegender Zahl vertreten. Dagegen haben wir nach einer bestimmten Aufbewahrungszeit meistens die alkalibildenden Kurzstäbchen in bedeutender Zahl angetroffen. Wir müssen ihnen daher bei der Säuerung der Milch einen wichtigen Einfluss zuschreiben. Am deutlichsten war die Wirkung bei 18—30°. Bei 15° und nach 30stündigem Aufbewahren war aber der Säuregrad der Milch in der Misch- und der Reinkultur gleich hoch. Dies ist hier wohl auf die für Milchsäurebakterien nicht hinreichende Temperatur zurückzuführen.

Hanusch⁶⁾ fand in einer während 12 Stunden gealterten Milch einer Käserei, die mit Betriebsstörungen zu kämpfen hatte, neben Kokken hauptsächlich Alkalibildner. Offenbar hatten sich diese während der üblichen Aufbewahrung der Käsereimilch derart vermehrt, dass die Milchsäurebakterien zahlenmässig zurückblieben und die betreffende Milch infolgedessen im Zeitpunkt der Verarbeitung einen ungenügenden Reifegrad aufwies. Weniger einleuchtend ist es aber, dass in einer andern Käserei gerade durch Zusatz einer Alkalibildnerkultur zur Kessmilch besonders gute Käse erzielt worden sein sollen. Da die alkalibildenden Kurzstäbchen streng aerob sind, ist im frischen Käse eine nachträgliche günstige Beeinflussung der Milchsäurestreptokokken ausgeschlossen, wenn man nicht annehmen will, dass die mit der Kultur zugesetzten Förderungstoffe im Käse nachwirken können.

D. Zusammenfassung.

1. An Hand zahlreicher Untersuchungen wurde gezeigt, dass in roher Milch nach einer gewissen Aufbewahrungszeit verschiedenartige geruchliche Veränderungen auftraten, die ausschliesslich durch Bakterien hervorgerufen wurden. Dabei handelte es sich hauptsächlich um säuerliche, an Waschlapen erinnernde und adstringierende Mischgerüche. Die mehr einheit-

lichen, aromatischen, Steckrüben-, Malz- und Karamelgerüche waren seltener. Verhältnismässig häufig wurden auch vorwiegend ranzige und herbe Gerüche festgestellt.

2. Mit dem Auftreten der ersten Geruchsveränderungen war immer ein stark erhöhter Keimgehalt verbunden. Dieser setzte sich vorwiegend aus dem *Streptococcus lactis*, aus alkalibildenden Kurzstäbchen, Tetradokokken, *Bact. fluorescens* und verwandten Arten zusammen. Der Säuregrad war meist schwach erhöht. Indessen konnten die abnormalen Gerüche häufig schon vor einer messbaren Säurezunahme wahrgenommen werden, sodass die Geruchsprüfung durchaus ein geeignetes Mittel ist, den Frischzustand der Milch zuverlässig zu beurteilen.

3. Im grossen und ganzen ging die Keimvermehrung in verschlossenen Gefässen gar nicht oder nur unwesentlich rascher vor sich als in offenen. Vor allem wurde die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora, solange die Gefässe nicht ganz gefüllt waren, nicht beeinflusst. Dem Verschliessen der nicht ganz gefüllten Kannen kommt in dem Sinne eine Bedeutung zu, als sich kuhwarme Milch unter Verschluss langsamer abkühlt, wobei das Bakterienwachstum durch lang anhaltende ihm zusagende Temperaturen begünstigt wird.

In vollständig gefüllten Gefässen wurden die meist schädlichen aeroben Bakterienarten unterdrückt. Es entwickelten sich in der Regel nur die Milchsäurebakterien. Die unangenehmen Gerüche traten entweder nicht oder nur schwach auf.

4. In der hochgeschichteten Milch vermehrten sich ebenfalls vorwiegend die Milchsäurebakterien. Die in flacher Schicht aufbewahrte Milch war trotz des fast immer höheren Keimgehaltes mehrheitlich länger haltbar. Dafür herrschten während längerer Zeit aerobe Nicht- oder schwache Säurebildner vor, die häufig unangenehme Geruchsstoffe produzierten.

5. Bei «gelüfteter» Milch war der Keimgehalt nach einer bestimmten Aufbewahrungszeit immer höher als bei nicht gelüfteter. Dabei hatten sich neben aeroben Keimen auch die Milchsäurebakterien stärker entwickelt. Hingegen blieb die ständige Lufterneuerung über der Milch in den untersuchten Proben sowohl hinsichtlich der Keimzahl als auch bezüglich ihrer qualitativen Zusammensetzung ohne Einfluss. Eine günstige Wirkung der in den Deckeln der Transportgefässe befindlichen Luftlöcher kann daher nur darin bestehen, dass sie den Abzug unangenehmer Geruchsstoffe ermöglichen und die Abkühlung der Milch, wenn auch unbedeutend, beschleunigen.

6. Das häufige Rühren der Milch während der Aufbewahrung bewirkte keine Erhöhung der Keimzahl, wohl aber eine Verschiebung der qualitativen Zusammensetzung zugunsten der Milchsäurebakterien.

7. Für das Keimwachstum in der aufbewahrten Milch spielt der Rahm eine sehr wichtige Rolle. Dort sammeln sich mit Hilfe der aufsteigenden Fettkügelchen die Keime an. Infolge der raschen Vermehrung nicht nur

der aeroben Bakterienarten, sondern auch der gewöhnlichen Milchsäurebakterien, setzt die Säuerung stets im Rahm ein und schreitet nach unten fort.

8. Als besonders keimreich hat sich die Rahmoberfläche erwiesen. Hier traten auch die ersten unangenehmen, vorwiegend säuerlich-adstringierenden Gerüche auf, die mit wenigen Ausnahmen immer unter dem Einfluss des *Streptococcus lactis* in Verbindung mit aeroben, meist fettzersetzenden Bakterien, wie alkalibildenden Kurzstäbchen, *Bact. fluorescens* und verwandten verflüssigenden und nicht verflüssigenden Arten, hervorgerufen werden. Das «Ersticken» der Milch ist somit in erster Linie als eine Folge der durch aerobe Bakterien in Verbindung mit Milchsäurestreptokokken verursachten geruchlichen Veränderungen im Rahm aufzufassen. Es beruht auf einem rein bakteriologischen Vorgang, der sich während der Aufbewahrung früher oder später in jeder auf gewöhnliche Art und Weise gewonnenen Milch abspielt.

9. Das «Ersticken» der Milch tritt gewöhnlich um so rascher ein, je höhere Anfangskeimzahlen ermittelt werden. Es wird nicht durch Luftmangel bedingt und scheint nur insofern an die Aufbewahrung der Milch unter Luftabschluss gebunden zu sein, als hier die durch Bakterien erzeugten Gerüche im Luftraum zwischen Milch und Gefässdeckel am Entweichen gehindert werden.

10. Es liegen daher keine stichhaltigen Gründe vor, eine Milch, die unter Luftabschluss infolge eines fortgeschrittenen Keimwachstums einen unangenehmen Geruch angenommen hat, als «erstickt», d. h. als eine in besonderer Weise veränderte Milch zu bezeichnen.

11. Neben den Milchsäurebakterien hat sich das *Bact. Alcaligenes metalcaligenes* Bergey als mehr oder weniger ständiger Milchwobner erwiesen. Es spielte nicht nur bei der Entstehung der «stickigen» Gerüche eine wichtige Rolle, sondern es förderte ausserdem das Wachstum und die Säureproduktion von *Streptococcus lactis*. Aehnlich wirkten *Bact. fluorescens* und gewisse Mikrokokken.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Burri, Vorstand der milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld, im Laboratorium des städtischen Lebensmittelinspektorates, Bern, ausgeführt. Es sei mir gestattet, meinem verehrten Lehrer sowohl für die Ueberlassung des Themas und das meinen Untersuchungen entgegengebrachte Interesse als auch für die vielen wertvollen Ratschläge meinen herzlichen Dank auszusprechen. Ferner fühle ich mich gegenüber meinen Vorgesetzten, den Polizeidirektoren Herrn Schneeberger und Herrn Dr. Freimüller sowie Herrn Stadtarzt Dr. med. Hauswirth für ihr bereitwilliges Entgegenkommen zu grossem Dank verpflichtet. Endlich schulde ich auch meinem Kollegen, Herrn Dr. Schlaeppli, für alle seine Bemühungen um das Zustandekommen dieser Arbeit vielen Dank.

Literaturverzeichnis.

- 1) *Lafar*, Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 2, 54, 1905/08.
- 2) *C. J. Koning*, Milchw. Ztrbl., 2-8, 1905.
- 3) *A. Wolff*, Diss., Zürich 1908.
- 4) *Van der Leek*, Ztrbl. f. Bakt. II, 17, 366, 1907.
- 5) *E. Hanke*, Schweiz. landw. Mtshefte, Nr. 4, 1928.
- 6) *J. Hanusch*, Weltkongr. f. Milchw. Rom-Mailand 1934, 11. Abt., 465.
- 7) *K. Richter*, Habilitationsschrift, Hildesheim 1931.
- 8) *J. Bahrs*, Diss., Kiel 1933.
- 9) *W. Fleischmann*, Lehrb. d. Milchw., herausg. v. H. Weigmann, Berlin 1932, 246.
- 10) *A. Wolff*, Molkereibakt. Betriebskontr., Berlin 1914, 65.
- 11) *A. Peter*, Prakt. Anleitg. z. Fabr. u. Behandlg. d. E'talerkäses, Bern 1925, 22.
- 12) *W. Ritter* u. *D. Stüssi*, Schriften d. Schweiz. Milchommission, 4, 1935.
- 13) *W. Bieri*, Schweiz. Ztrbl. f. Milchw., Nr. 24, 1936.
- 14) *W. Fleischmann*, Lehrb. d. Milchw., Berlin 1932, 276.
- 15) *Thörner* (zit. nach *W. Fleischmann*), Chemikerzeitg., 94, 1894.
- 16) *Ch. E. Marshall*, Ztrbl. f. Bakt. II, 9, 313, 1902.
- 17) *Lafar*, Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 2, 261 u. 263, 1905/08.
- 18) *W. Fleischmann*, Lehrb. d. Milchw., Berlin 1920, 100.
- 19) *G. Michaud*, Schweiz. Ztrbl. f. Milchw., Nr. 29, 1923.
- 20) *F. Moser* (zit. nach Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg., 23, 1932), Nachrichtenbl. d. städt. Milchgrossbetr. Deutschlands.
- 21) *R. M. Washabum*, Milchw. Lit. Bericht, 65, Kiel 1932.
- 22) Schweiz. Milchzeitung, Nr. 20, 1934.
- 23) *W. Fleischmann*, Lehrb. d. Milchw., Berlin 1920, 192.
- 24) Milchw. Zeitg., Nr. 52, 1932.
- 25) *C. Hüttig*, *A. Eichstädt*, *H. Hahn*, Milchw. Zeitg., Nr. 7, 1933.
- 26) *C. L. Roadhouse* u. *G. Koestler*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 583, 1928.
- 27) *R. Burri* u. *M. Düggeli*, Ztrbl. f. Bakt. II, 15, 709, 1906.
- 28) *H. Weigmann*, Ztrbl. f. Bakt. II, 22, 129, 1909.
- 29) *W. Sadler*, *M. L. Irwin*, *J. Can* (zit. nach Rogers, Fundamentals of Dairy Science, New York 1935), Research 3, 200, 1930.
- 30) *H. Weigmann* u. *A. Wolff*, ref. Ztrbl. f. Bakt. II, 43, 282, 1915.
- 31) *C. D. Kelly* (zit. nach Rogers), Trans. Roy. Soc. Can., 22, V. 227, 1928.
- 32) *B. W. Hammer* and *M. P. Baker* (zit. nach Rogers), Research Bull., 99, Jowa Arg. Expt. Sta. 1926.
- 33) *J. Baumann*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 153, 1934.
- 34) *P. H. Tracy* and *R. J. Ramsay* (zit. nach Rogers), J. Dairy Sci., 14, 457, 1931.
- 35) *G. Koestler*, *C. L. Roadhouse* u. *W. Lörtscher*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 927, 1928.
- 36) *S. Kende*, Milchw. Forschg., 13, 111, 1932.
- 37) *Th. Kertész*, Molkereizeitg. Hildesheim, Nr. 37, 1932.
- 38) *W. Ritter*, Schweiz. Milchzeitg., Nr. 59, 1936.
- 39) *J. Pien* et *S. Herrschdörfer*, Le Lait, 15, 1935.
- 40) *N. Zuntz* u. *A. Loewy*, Lehrb. d. Physiologie d. Menschen, Leipzig 1920.
- 41) *W. Fleischmann*, Lehrb. d. Milchw., Berlin 1932, 121.
- 42) *J. Tillmans* u. *W. Luckenbach*, Milchw. Forschg., 3, 262, 1926.
- 43) *J. Kürsteiner*, Diss., Zürich 1907.
- 44) *W. Ritter* u. *W. Dörner*, Ztrbl. f. Bakt. I, 125, 379, 1932.
- 45) *R. Burri*, World's Dairy Congress London 1928, Report of Proc., 690.
- 46) *W. Henneberg*, Molkereizeitg. Hildesheim, Nr. 21, 1930.
- 47) *Kessler* u. *Swenarton*, Journ. of. Bact. 14, 47, 1927.
- 48) *G. Koestler*, Diss., Zürich 1907.
- 49) *M. Schmidt*, Milchw. Forschg., 2, 432, 1925.

- 50) *G. S. Wilson*, Medical Research Council, London 1935.
- 51) *E. Mertens*, Milchw. Forschg., **14**, 1, 1932/33.
- 52) *F. Löhnis*, Vorlesg. über landw. Bakt., Berlin 1926, 255.
- 53) *Herr, Beninde u. Gernhardt* (zit. nach M. Schmidt), P. Sommerfeld, Handb. d. Milchkde., 627.
- 54) *L. V. Söhngen*, ref. Ztrbl. f. Bakt. II, **35**, 331, 1912.
- 55) *W. Henneberg*, Milchw. Forschg., **12**, 222, 1931.
- 56) *C. Eijkman*, Ztrbl. f. Bakt. I, **29**, 847, 1901.
- 57) *J. A. Berry*, J. of. Bact., Vol. 25, 433, 1933.
- 58) *W. Henneberg*, Bakt. Molkereikontrolle, Berlin 1934, 15.
- 59) *M. A. Collins, B. W. Hammer*, Journ. of. Bacteriol., 27, 473 — 485, 1934.
- 60) *Ch. Barthel*, Ztrbl. f. Bakt. II, **6**, 417, 1900.
- 61) *S. Orla-Jensen*, Kobenhavn 1919.
- 62) Manual of pure culture study of Bacteria, 1932 (herausg. v. d. Ges. Amerik. Bakteriologen), deutsche Uebersetzg. v. W. Dorner, Hannover 1933.
- 63) *C. Gorini*, Rev. gén. du lait, 8, 1912.
- 64) *H. Huss*, Ztrbl. f. Bakt. II, **19**, 661, 1907.
- 65) *Lehmann u. Neumann*, Bakt. Diagnostik, München, 1927.
- 66) *A. Wolff* (zit. nach W. B. Luxwolda), Ztrbl. f. Bakt. II, **31**, 1911.
- 67) *S. H. Ayers, W. T. Johnson and Jr. Rupp* (zit. nach Rogers), P. Bull. 782, U. S. Dept. Agr., 1919.
- 68) *A. W. Bosworth and M. J. Pruscha* (zit. nach Rogers), Tech. Bull. 14, N. J. (Geneva) Agr. Expt. Sta., 1910.
- 69) *W. Henneberg u. Kniefall*, Molkereizeitg. Hildesheim, Nr. 64 — 66, 1933.
- 70) *W. Storck*, Ztrbl. f. Bakt. II, **94**, 295, 1936.
- 71) *E. Hanke*, Milchw. Forschg., **2**, 343, 1925.
- 72) *Bergey*, Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins Co., 1930.
- 73) *H. F. Long and B. Hammer*, Journ. Paper, Nr. 277, (Yowa) Agr. Expt. Sta. 1936.
- 74) *J. Mussill*, Milchw. Forschg. **15**, 42, 1933.
- 75) *E. G. Hastings, H. Mansfield and G. Helz* (zit. nach Rogers), Abstract in J. Bact., 11, 77, 1926.
- 76) *W. Ritter*, Schweiz. Milchzeitg., Nr. 13, 1935.
- 77) *H. Weigmann u. A. Wolff*, Ref. Ztrbl. f. Bakt. II, **42**, 85, 1915.
- 78) *M. Düggele*, Ztrbl. f. Bakt. II, **45**, 433, 1916.
- 79) *G. E. Pont*, Milchw. Lit. Ber., 102, Kiel 1935.
- 80) *L. A. Rogers*, Fundamentals of Dairy Science, New York 1935, 303.
- 81) *F. Schläeppli*, Diss., Zürich 1928.
- 82) *C. E. Marshall*, Ztrbl. f. Bakt. II, **11**, 739, 1904 u. **15**, (Ref.), 245, 1906.
- 83) *R. Burri u. J. Thöni*, Ztrbl. f. Bakt. II, **23**, 32, 1909.
- 84) *Belonowsky* (zit. nach W. B. Luxwolda), Biochem. Zeitschr., 6, 251.
- 85) *Ch. Barthel* (zit. nach W. Fleischmann 1932), Le Lait., 4, 1925.
- 86) *J. B. Linneboe u. E. G. Hastings*, Ztrbl. f. Bakt. II, **93**, 278, 1936.
- 87) *G. Cox, Whitehead*, Milchw. Lit. Ber., 42, Kiel 1930.
- 88) *W. B. Luxwolda*, Ztrbl. f. Bakt. II, **31**, 129, 1912.
- 89) *W. Meier*, Diss., Zürich 1919.
- 90) *H. W. Schopfer*, Zeitschr. f. Vitaminforschg., 4, 1935.
- 91) *S. Orla-Jensen, N. C. Otte, Snog-Kjaer*, Ztrbl. f. Bakt. II, **94**, 434 — 452, 1936.