Beitrag zur Methodik des Nachweises anaerober Buttersäurebazillen in Milch

Autor(en): **Hostettler, H. / Sahli, K. / Binz, M.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **32 (1941)**

Heft 2

PDF erstellt am: **29.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983664

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

BEITRAG ZUR METHODIK DES NACHWEISES ANAEROBER BUTTERSÄUREBAZILLEN IN MILCH

Von *H. Hostettler, K. Sahli* und *M. Binz.*

(Aus der eidg. milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld - Bern. Vorstand: Dr. G. Koestler.)

I. EINLEITUNG

Der bewegliche Buttersäurebazillus, Bac. amylobacter A. M. et Bredemann*) gilt in der grossen Gruppe der Buttersäurebazillen als der für die Milchwirtschaft und insbesondere für die Hartkäsefabrikation allein gefährliche Vertreter; Orla-Jensen bezeichnete diesen in seinen Ausführungen über die Reifung des Hartkäses[2]) als den Feind Nr. 1 der Käserei. Im Gegensatz zum beweglichen Buttersäurebazillus gilt der weitverbreitete unbewegliche Buttersäurebazillus, Bac. saccharobutyricus immobilis Grassberger und Schattenfroh (identisch mit Bac. phlegmonis emphysomatosae Fränkel und Bac. Welchii Migula) als für die Käserei absolut ungefährlich.

Ueber das Vorkommen des Bac. amylobacter in der Milch finden sich im Schrifttum zahlreiche, einander widersprechende Angaben.

Schattenfroh und Grassberger[3]) fanden, dass ihr beweglicher Buttersäurebazillus viel seltener vorkomme als der unbewegliche. Den ersteren fanden sie nur zweimal in 80 Milchproben (2,5 %).

Tissier und Gasching[4]) wiesen bei ihren Milchuntersuchungen einen anaeroben, beweglichen Buttersäurebazillus nach, den sie Bac. lactopropylbutyricus non liquefaciens nannten. Der Organismus unterschied sich von Bac. saccharobutyricus nur dadurch, dass er Glukose und Saccharose, nicht aber Laktose vergor. Er fand sich in 8 von 10 untersuchten Milchproben (80 %).

Nach Barthel[5]) kommt in der Milch zur Hauptsache nur der unbewegliche Buttersäurebazillus Grassberger und Schattenfroh (Fränkelscher Gasbazillus) vor. In 83 untersuchten Milchproben wurde der bewegliche Buttersäurebazillus nur zweimal (2,4 %) gefunden. R. Burri, W. Staub und J. Hohl[6]) konnten in 8 von 11 Silomilchproben (72,7 %) den beweglichen Buttersäurebazillus nach-

---

*) Nach dem heutigen Stand der bakteriologischen Systematik[1]) ist Bac. amylobacter A. M. et Bredemann identisch mit Bac. saccharobutyricus mobilis Grassberger und Schattenfroh, Bac. saccharobutyricus v. Klecki, Clostridium tyrobutyricum van Beynum und Pette und nach Zeissler ebenfalls mit Bac. tertius Henry.

Die Benennung Bac. saccharobutyricus v. Klecki möchte Bergey fallen lassen, während Lehmann und Neumann den von v. Klecki gegebenen, richtig gebildeten Namen beibehalten möchten, indem sie darauf hinweisen, dass v. Klecki die erste gute Beschreibung des Organismus gegeben hat, während der Name Bac. amylobacter schon von van Tieghem (Cpts. rds. d. l'acad. sc. *89*, 7) für ein unbestimmtes Bakteriengemisch verwendet wurde.

weisen, während in fünf vor und nach der Silagefütterungsperiode gewonnenen Milchen der Organismus nicht gefunden wurde.

K. J. Demeter und H. Ordolff[7]) fanden in einer Untersuchungsreihe von 230 Milchen 166 bei der Anaerobenprobe nach Weinzirl positiv reagierend. Bei 58,43 % dieser Milchen herrschten die Organismen der saccharolytischen und bei 41,57 % die der proteolytischen Gruppe vor. In einer weiteren Serie von 194 Milchen enthielten 144 Proben anaerobe Sporenbildner. Von diesen wiesen 89 Milchen vorwiegend Saccharolyten und 55 überwiegend Proteolyten auf. Eine Differenzierung in bewegliche und unbewegliche Buttersäurebazillen hat nicht stattgefunden.

Einholz[8]) konnte in seinen Untersuchungen über die anaeroben Sporenbildner der Milch den beweglichen Buttersäurebazillus nie isolieren.

Jochims[9]) gewann aus 13 von 25 Milchproben nicht pathogene, eiweissnichtverflüssigende Gärungserreger und nahm an, dass es sich hier mehrfach um Bac. saccharobutyricus handelte. Eine nähere Identifizierung hatte nicht stattgefunden.

Bei der Untersuchung von 20 Marktmilchen von Baltimore konnte Bliss[10]) den beweglichen Buttersäurebazillus in 13 Fällen (65 %) nachweisen.

W. Dührsen[11]) konnte in seinen Untersuchungen über das Vorkommen von anaeroben Sporenbildnern in Milch Bac. saccharobutyricus in 33 (70,2 %) von 47 untersuchten Handelsmilchen nachweisen. Das überraschend starke Auftreten von Bac. saccharobutyricus erklärt der Autor damit, dass die starke Verbreitung des Organismus im Stalldünger ihn auch in Milch in grösserem Umfange erwarten lässt.

Demgegenüber zeigen uns aber die Untersuchungen von J. Baumann[12]) und J. Kürsteiner[13]), dass der bewegliche Buttersäurebazillus normalerweise im Kuhkot in beschränkter Menge (10—400 Keime pro 1 Gramm Kot) vorkommt. Erst bei Buttersäurebazillengehalten von 1000 und mehr Keimen pro Gramm Kot kommt es nach J. Kürsteiner zu einer beachtlichen, für die Hartkäsefabrikation gefährlichen Infektion der Milch mit Buttersäurebazillen. Zu Steigerungen des Buttersäurebazillengehaltes des Kuhkotes um das 10 000—50 000 fache des normalen Buttersäurebazillengehaltes kommt es nach den genannten Autoren bei der Verfütterung von Silofutter. J. Kürsteiner vertritt die Auffassung, dass die gewaltigen Veränderungen des Buttersäurebazillengehaltes des Kotes eine wesentlich erhöhte Infektion der Milch als selbstverständlich erscheinen lassen. Die Infektionsgefahr für die Milch und damit die Blähungsgefahr für den Käse hängen mit diesen quantitativen Verhältnissen zusammen, mit andern Worten, sie sind umso geringer, je niedriger die Buttersäurebazillenzahl im Kuhkot gehalten werden kann.

Neben dieser durch die Verfütterung von stark buttersäurebazillenhaltigen Futterstoffen verursachten Infektion der Milch kann eine solche auch durch Verunreinigung mit Erdpartikeln zustandekommen. W. Dorner und P. Ritter[14])

machten bei ihren Untersuchungen über die Ursache der in der Alpkäserei überaus häufig und heftig auftretenden Buttersäuregärung die Feststellung, dass es an exponierten Stellen des Sennereibetriebes zu einer Anreicherung von Buttersäurebazillen kommt, so auf dem Vorplatz der Sennhütte, im Stall auf dem Läger, am Boden der Sennhütte etc., von wo aus die Milch infiziert wird.

Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass einwandfrei eingelieferte Milch in den Milchverarbeitungsstellen selbst mit Buttersäurebazillen infiziert werden kann. Untersuchungen über in Emmentalerkäsereien auftretende Fehlgärungen führten zu wiederholten Malen zur Feststellung, dass durch Buttersäurebazillen verursachte Störungen auftraten, ohne dass eine mit dem Käsereischädling infizierte Milch zur Verarbeitung eingeliefert worden wäre. Der Infektionsherd befand sich in diesen Fällen in der Käserei selbst, wo die einwandfrei angelieferte Milch mit einer für die Entstehung einer Buttersäuregärung im Käse genügenden Bazillenmenge infiziert wurde.

Die weite Verbreitung der Buttersäurebazillen in der Natur schafft unzweifelhaft die verschiedensten Infektionsmöglichkeiten für die Milch, je nach deren Gewinnungs- und Verarbeitungsweise. Auf diesen Umstand ist vielleicht der im Schrifttum im Hinblick auf das Vorkommen des beweglichen Buttersäurebazillus in der Milch öfters vorhandene Widerspruch zurückzuführen. Es schien uns deshalb wertvoll, umfangreichere Untersuchungen hierüber vorzunehmen, wobei auch die Fütterungsverhältnisse mit in Betracht gezogen wurden.

II. METHODISCHES

a) Bisher empfohlene Nachweisverfahren

Der bewegliche Buttersäurebazillus erweist sich für die Hartkäse-, speziell für die Emmentalerkäsefabrikation deshalb als sehr gefährlich, weil es nach den Untersuchungen von J. Kürsteiner (l. c. 13) nur sehr geringe Buttersäurebazillenmengen braucht, um im Käse eine Buttersäuregärung einzuleiten. Die Gefährlichkeit des Organismus wird bedeutend erhöht durch den Umstand, dass der Käser kein Mittel besitzt, um die Anwesenheit des Käseschädlings in der Milch zu erkennen. Auch während der Herstellung des Käses lässt sich bei der Verarbeitung buttersäurebazillenhaltiger Milch nichts Ungünstiges feststellen; erst nach 3—4 Wochen, wenn der Käse in den Gärspeicher verbracht wird, beginnen sich die Fehlerscheinungen einzustellen.

Als Nachweisverfahren für Buttersäurebazillen wird im Schrifttum vielfach die Sporogenesprobe nach Weinzirl oder die pasteurisierte Gärprobe empfohlen. K. J. Demeter[15]) misst der Probe nach Weinzirl als qualitativem Test eine genügende Sicherheit bei, um zu entscheiden, ob in einer Milch hauptsächlich Vertreter der eiweisszersetzenden oder der zuckervergärenden anaeroben Sporenbildner vorhanden sind.

Das schweizerische Lebensmittelbuch[16]) empfiehlt die pasteurisierte Gärprobe nach Weinzirl als summarischen Test für die Anwesenheit von anaeroben

Sporenbildnern. Für die Vornahme eingehender Untersuchungen wird das Anlegen von Kulturen als unumgänglich erachtet.

J. Kürsteiner[17]) versuchte den Nachweis mit der pasteurisierten Gärprobe. Wenn in der pasteurisierten Milch Blähungserscheinungen auftraten, gelang es Kürsteiner nicht immer, aus diesen geblähten Gärproben die für den Emmentalerkäse gefährlichen Blähungserreger nachzuweisen. R. Burri, W. Staub und J. Hohl (l. c. 6) konnten zeigen, dass bei Einsaat von beweglichen Buttersäurebazillen in Milch die pasteurisierte Gärprobe nicht gestattete, die erfolgte Infektion der Milch zu erkennen. Die in geimpften und ungeimpften Milchproben auftretende Gasbildung war auf den unbeweglichen Buttersäurebazillus zurückzuführen. Nur die Verarbeitung der geimpften Milchproben auf Dextroseagar-Schüttelkultur liess die eingesäten beweglichen Buttersäurebazillen zum Vorschein kommen.

D. J. van Beynum und J. W. Pette[18]) weisen darauf hin, dass die Probe nach Weinzirl zur Differenzierung des von ihnen beschriebenen und für den Hartkäse allein als gefährlich erkannten Clostridium tyrobutyricum von dem ungefährlichen Clostridium saccharobutyricum nicht tauge; selbst wenn der Milch Glukose und entsprechende Mengen Milchsäure zugesetzt werden, ergibt auch das ungefährliche Cl. saccharobutyricum eine positive Probe.

Die gleichen Autoren haben kürzlich eine einfache Methode für den Nachweis von Buttersäurebazillen beschrieben.[19]) Bei dieser Methode, einer Gärprobe, wird die zu untersuchende Milch als Nährboden benutzt. Um die Entwicklung von Cl. tyrobutyricum zu ermöglichen, wird pro 50 ccm Milch 1 ccm 25 %ige Traubenzuckerlösung zugesetzt. Eine Pasteurisation dient dazu, die Nicht-Sporenbildner, welche stören würden (z. B. Milchsäurebakterien, coliartige Bakterien), zu vernichten. Um die Entwicklung der Fäulnisbakterien (B. putrificus) zu verhindern, wird ein Zusatz von 1 ccm normal-Säure (Milchsäure, Salzsäure) zu 50 ccm Milch empfohlen. Die Probe wird in einem V-förmigen Röhrchen vorgenommen. Der kürzere, mit einem Gummistopfen verschlossene Schenkel wird ganz gefüllt und soll ungefähr 10 ccm fassen. Die Entwicklung aerober sporenbildender Bakterien wird unterdrückt, indem die Flüssigkeit im längeren Rohrschenkel mit Paraffinöl überschichtet wird. Die Probe ist positiv, wenn nach höchstens 3 Tagen bei 35—40° C der kürzere Schenkel des Rohres sich mit Gas gefüllt hat und ein Geruch nach Buttersäure oder Butylalkohol festgestellt wird (Ausgiessen in ein Schälchen, ev. Zusatz von wenig verd. Schwefelsäure). Leider kann man, wie die Autoren hervorheben, nach dieser Methode nicht Cl. tyrobutyricum allein nachweisen, da auch das für die Käserei ungefährliche Cl. saccharobutyricum in Milch-Traubenzucker-Säure wächst. Um zu entscheiden, welche dieser Bakterienarten anwesend ist, muss auf Mannit- und Laktat-Nährboden überimpft werden.

Für den Nachweis des beweglichen Buttersäurebazillus in der Milch konnte deshalb nur ein kulturelles Verfahren in Betracht fallen. Hier hat sich das von R. Burri, W. Staub und J. Hohl (l. c. 6) für die Untersuchung von Silagen und

Kuhkot ausgearbeitete, auf Grundlage von Fleischwasser-Dextrose-Agar beruhende Verfahren als besonders wertvoll erwiesen. Die Autoren konnten zeigen, dass sich das Verfahren auch bei der Untersuchung von Milch bewährt. Bei Einsaat bestimmter Mengen beweglicher Buttersäurebazillen in Milch wurden diese in der Dextroseagar-Schüttelkultur mit befriedigender Genauigkeit wiedergefunden. Das Verfahren wurde von W. Ritter[20]) mit dem von G. Ruschmann[21]) empfohlenen Kartoffelbreiverfahren verglichen und als diesem durchaus ebenbürtig befunden.

D. J. van Beynum und J. W. Pette weisen in ihren schon erwähnten Untersuchungen (l. c. 18) darauf hin, dass vom Standpunkte der Schädlichkeit für die Käserei nur *die* Buttersäurebazillen wichtig sind, die Gelatine nicht verflüssigen. Hier unterschieden sie ein Clostridium saccharobutyricum und ein Clostridium tyrobutyricum. Die Vertreter der erstgenannten Art bauen *Glukose*, Lävulose, Galaktose, Mannose, Saccharose, Laktose, Maltose, Stärke, Xylose, Arabinose, Raffinose, Dulcit, Sorbit, Dextrin, Mannit und Inulin ab. Nicht vergärt werden *Laktat*, Rhamnose und Glycerin. Dieser Organismus ist für den Hartkäse nicht gefährlich. Clostridium tyrobutyricum dagegen baut ab: *Glukose* und *Laktat*. Nicht vergärt werden Mannose, Saccharose, Laktose, Maltose, Stärke, Raffinose, Xylose, Dulzit, Sorbit, Mannit, Dextrin, Glyzerin, Rhamnose und Inulin. *Seiner Fähigkeit wegen, Laktat vergären zu können, wird Clostridium tyrobutyricum als der für die Käserei allein gefährliche Buttersäurebazillus bezeichnet.* Die Autoren weisen darauf hin, dass ein Stärkenährboden, wie er von G. Ruschmann und Harder[22]) empfohlen wird, den Laktatvergärern *keine* Entwicklungsmöglichkeit bietet. Dagegen müssten sich bei der Verwendung eines *Dextrosenährbodens* sowohl *das für die Käserei ungefährliche Cl. saccharobutyricum wie das gefährliche Cl. tyrobutyricum entwickeln.*

Bei der Nachprüfung dieser Angaben an 24 aus Mineralsäuresilage und 18 aus anderer Silage isolierten Stämmen fand R. Burri[23]) 20 Stämme (83,3 %) bzw. 4 Stämme (22,2 %), die befähigt waren, Laktat zu vergären. Darin liegt eine Bestätigung der Angaben der holländischen Autoren, dass nicht alle auf Dextrosenährboden isolierten Stämme Laktat vergären. Sechs der von R. Burri isolierten Stämme vermochten sowohl Disaccharide und Alkohole als auch Laktate zu vergären. *Sie vereinigten somit die Eigenschaften von Cl. saccharobutyricum und Cl. tyrobutyricum in sich.*

Für unsere Untersuchungen schien uns wesentlich, die auf Dextroseagar gewachsenen Stämme auf ihr *Laktatvergärungsvermögen* zu prüfen, ist doch unzweifelhaft gerade diese Eigenschaft für die Gefährlichkeit eines Buttersäurebazillus in der Käserei entscheidend, denn die im Käse sich abspielende Buttersäuregärung ist stets eine *Laktatvergärung*.

Die auf Dextroseagar gewachsenen Stämme wurden deshalb alle noch auf Laktatagar pasteurisiert und unpasteurisiert auf die Fähigkeit, Laktat zu vergären, geprüft. Die Wachstumsprüfung auf Mannit-Peptonnährboden wurde dagegen unterlassen. Als Laktatnährboden diente in Abänderung des von van

Beynum und Pette empfohlenen Nährbodens Hefenautolysat-Laktat-Agar, ein Laktatnährboden folgender Zusammensetzung:

Brunnenwasser 1 Liter, dazu	
Pepton für bakt. Zwecke	15 gr
Pepton Witte	15 gr
Hefenextrakt «Difco»	10 gr
Milchsäure, neutralisiert mit 20 % Natronlauge	1 %
Agar — Agar	15 gr
End-pH	6,0—5,8

R. Burri, W. Staub und J. Hohl wiesen auf den Nachteil hin, dass beim Anlegen von Kulturen zum Nachweis von Buttersäurebazillen in Milch die möglicherweise schon von Anfang an zahlenmässig überwiegenden Putrifikusbazillen zur Vorherrschaft gelangten und infolge des stark putriden Geruches eine Entscheidung darüber, ob Bac. putrificus oder Bac. amylobacter das entstandene Gas gebildet hatten, nicht zu treffen war. Bei unseren Untersuchungen bereitete uns der in Milch sehr häufig vorhandene Bac. putrificus die gleichen Schwierigkeiten. Da das Vorhandensein von Clostridien und verwandten Formen im mikroskopischen Präparat nicht ohne weiteres zur Annahme der Anwesenheit von Buttersäurebazillen berechtigt, fanden wir es auch aus dieser Unsicherheit heraus geboten, der Passage auf Dextroseagar eine solche auf Laktatagar folgen zu lassen, um durch die nähere Differenzierung der gewünschten Abklärung näher zu kommen. In der Regel verbreiteten auf Laktatagar die Eiweisszersetzer ebenfalls einen stark putriden Geruch. Für unsere Begutachtung stellten wir hier aber in erster Linie auf die Gasbildung und das mikroskopische Bild ab.

b) Eigene Versuche über ein verschärftes Nachweisverfahren

Für die vorliegenden Untersuchungen, aber auch für die Abklärung von Betriebsstörungen in Käsereien war es wünschenswert, eine Verschärfung des Buttersäurebazillennachweises zu erstreben, um bei der Verimpfung auf Dextroseagar-Nährböden auch geringere Keimkonzentrationen zu erfassen als dies bei der Verimpfung von einigen ccm Milch möglich sein konnte. Als Ausgangsmenge benutzten wir daher stets 100 ccm Milch, die wir in der Laboratoriumszentrifuge bei einer Tourenzahl von 3500 pro Minute 30 Minuten lang ausschleuderten. Das erhaltene Zentrifugat wurde auf Dextroseagar verarbeitet.

Die Methode des Auszentrifugierens als Anreicherungsverfahren hat schon W. Dührsen (l. c. 11) für seine Untersuchungen über das Vorkommen anaerober Sporenbildner in Milch benutzt, doch verarbeitete Dührsen allein das anfallende Sediment. Verglichen mit der Weinzirlprobe und der Milchverdünnungsmethode erhielt Dührsen folgende durchschnittliche Keimzahlen pro 1 ccm Milch:

Weinzirlprobe	0,24 Keime
Sedimentverdünnungsmethode	10,7 Keime
Milchverdünnungsmethode	64,0 Keime

Die Wertigkeit der Methoden verhält sich wie 1 : 44 : 262.

Nach diesem Ergebnis würde die Zentrifugiermethode der Milchverdünnungsmethode an Exaktheit beträchtlich nachstehen, doch zieht Dührsen in Betracht, dass das Sediment nicht alle Bakterien enthält, sondern dass sich ein Teil im Rahm ansammelt. Wir führten hierüber folgende Untersuchung durch:

Zu 100 ccm Milch wurden wechselnde Mengen einer Buttersäurebazillenaufschwemmung zugesetzt. Danach wurde 30 Minuten bei 3500 Touren zentrifugiert. Die feste Rahmschicht wurde mit einem sterilen Spatel abgehoben, die Magermilch weggegossen, der Rahm in das Zentrifugenglas zurückgegeben und Rahm und Sediment gemeinsam mit 10 ccm geschmolzenem Dextroseagar vermischt. Von der ins Kulturenglas zurückgegebenen Mischung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, 10 Minuten bei 80° C pasteurisiert, abgekühlt und bei 30° C aufgestellt. Zum Vergleich wurde von 1 ccm der zur Impfung benutzten Suspension eine Verdünnungsreihe auf Dextroseagar angelegt.

Ueber das Ergebnis solcher Zentrifugierversuche orientiert

Tabelle I

Suspension Nr.	Buttersäurebazillen in 1 ccm Suspension	Buttersäurebazillen in 100 ccm Milch					
		zugesetzt					gefunden
I	5,000	1	ccm	Suspension	=	5,000	10,000
		0,01	ccm		=	50	200
		0,0001	ccm		=	0,5	10
		1/Mill.	ccm		=	0	0
II	1,000	1	ccm	Suspension	=	1,000	100
		1	ccm		=	1,000	1,000
		1	ccm		=	1,000	1,000
		1	ccm		=	1,000	10,000
III	1,000,000	0,4	ccm	Suspension	=	400,000	1,000,000
		0,4	ccm		=	400,000	1,000,000
		0,4	ccm		=	400,000	1,000,000
		0,04	ccm		=	40,000	500,000
		0,004	ccm		=	4,000	10,000
		0,0004	ccm		=	400	1,000
		0,00004	ccm		=	40	100
		0,000004	ccm		=	4	10
		0,0000004	ccm		=	0,4	0

Diese Versuche zeigten, dass in den mit dem Zentrifugat angelegten Kulturen eine oftmals grössere Wachstumsfreudigkeit vorhanden war als in den mit den Suspensionen direkt angelegten Kulturen. Es kann sich hier wohl nicht um eine Keimvermehrung unter der Wirkung des Zentrifugalfeldes handeln, wie sie von M. Düggeli[24]), J. Kalkschmidt[25]) u. a. (nahezu vollständige Literaturangabe darüber siehe bei J. Kalkschmidt, 25) bei der Behandlung von Milch mit der Reinigungszentrifuge festgestellt wurde für Bakterienarten, die als Doppelindividuen, in Ketten und in Klumpen leben (verschiedene Kokkenarten, einige Stäbchenspezies und besonders Bacterium Güntheri). Nach M. Düggeli werden durch die Wirkung des Zentrifugalfeldes Bakterienklumpen zerschlagen und Bakterienketten zerrissen. Die entstehenden Spaltstücke schreiten dann, auf geeigneten Nährböden ausgesät, zur Koloniebildung.

Das bei unseren Zentrifugierversuchen im Zentrifugat festgestellte bessere Wachstum beruht nicht auf einem solchen Effekt. Durch den Zusatz von Rahm und Sediment wird der Dextroseagar offenbar derart verändert, dass der Nährboden den Buttersäurebazillen nun noch besser zusagt. Um diese Frage abzuklären, legten wir von einer Buttersäurebazillensuspension auf Dextroseagar vier Verdünnungsreihen an. Die erste Reihe bestand aus Dextroseagar allein, der zweiten setzten wir 5 ccm Magermilch, der dritten den Rahm und der vierten das Sediment von 100 ccm einer buttersäurebazillenfreien Milch zu. Auch hier zeigten die Reihen mit dem Zentrifugatzusatz besseres Wachstum.

Dextroseagar allein	+++++++
Dextroseagar + 5 ccm Magermilch	+++++++
Dextroseagar + Rahm	++++++++
Dextroseagar + Sediment	++++++++

Ein Verändern des Nährmediums in der Richtung der Förderung des Wachstums der vorhandenen Buttersäurebazillen ist wohl möglich, wenn wir bedenken, dass nach W. Dorner[26]) von in Dextroseagar eingeimpften vegetativen Formen des Bac. amylobacter angeblich nur 0,55—4,0 % und von den Sporen sogar nur 0,09—5,0 ‰ zu Kolonien auswachsen.

Bei unseren Zentrifugierversuchen richteten wir unsere Aufmerksamkeit auch auf die Verteilung der Buttersäurebazillen im Rahm, in der Magermilch und im Sediment. Hierüber gibt uns Tabelle II Aufschluss.

Tabelle II

Buttersäurebazillen in 100 ccm Milch					
	zugesetzt	gefunden			
		im Rahm	im Sediment	in 5 ccm Magermilch	Summa
Versuch I	400,000	1,000,000	100,000	100	1,102,000
	400,000	1,000,000	100,000	100	1,102,000
	400,000	1,000,000	100,000	10	1,100,200
	400,000	1,000,000	100,000	100	1,102,000
Versuch II	10,000	10,000	100	0	10,100
	10,000	10,000	1,000	10	11,200
Versuch III	1,000	1,000		0	1,000
	1,000	1,000		0	1,000
	1,000	1,000		0	1,000
	1,000	1,000		0	1,000

Daraus ist ersichtlich, dass beim Schleudern von buttersäurebazillenhaltiger Milch in der Laboratoriumszentrifuge weitaus der grösste Teil (bis 90 %) der vorhandenen Buttersäurebazillen in den Rahm und 1/4 bis 1/10 ins Sediment wandern, während ein ganz geringer Teil in der Magermilch verbleibt. Für den in der Magermilch verbleibenden Anteil ist von Einfluss, mit welcher Geschicklichkeit am Schluss des Zentrifugierens die Rahmschicht abgehoben und die Magermilch abgegossen wird. Die Rahmschicht wird bedeutend fester und lässt sich wesentlich leichter abheben, wenn die Milch vor dem Zentrifugieren tiefgekühlt wird. Da für die Buttersäurebazillenbestimmung nur der Rahm und das Sediment wichtig sind, kann man gewöhnlich auch so verfahren, dass man die Rahmschicht mit einem sterilen Spatel durchstösst und die Magermilch ausfliessen lässt.

Die bei unseren Untersuchungen im Sediment vorgefundenen geringen Anteile der zugefügten Buttersäurebazillen mögen erklären, warum W. Dührsen (l. c. 11) bei seinen Untersuchungen mit der Sedimentverdünnungsmethode ungünstigere Ergebnisse erzielte als mit der Milchverdünnungsmethode.

Zum Vergleich wurden auch von uns einige Milchen nach dem Milchverdünnungsverfahren (5 ccm auf Dextroseagar) und nach dem Zentrifugierverfahren untersucht.

Tabelle III

Milchprobe	Gasbildung	
	Milchverdünnungsverfahren	Zentrifugierverfahren
Konsummilch	—	++
»	+	+++
»	—	+
»	—	—
Käsereimilch	—	+
»	+	++
»	—	—
Lieferantenmilch	—	++
»	—	+
»	+	+ (+++)
»	++ (+)	+ (++)
»	—	+ (—+)
»	++	+ (+)
»	+	++ (+)

+ = Gasbildung (+) schwache Gasbildung

Die von W. Dorner (l. c. 26) festgestellten Schwankungen im Verhältnis der gewachsenen zu den tatsächlich vorhandenen Keimen von 0,55—4 % bei den vegetativen Formen und von 0,09—5,0 ‰ bei den Sporen von Bac. amylobacter zeigen, dass beim quantitativen Nachweis beweglicher Buttersäurebazillen mit einer diesen Zahlen entsprechenden Fehlerbreite zu rechnen ist. Aus diesem Grunde kann eine exakte Uebereinstimmung der nach den beiden Verfahren ermittelten Werte kaum erwartet werden. Es wird deshalb auch nur in beschränktem Masse von einem «quantitativen» Nachweis der Buttersäurebazillen die Rede sein können, und wir möchten, gestützt auf die zitierten Untersuchungen, unsere Werte stets mit diesem Vorbehalt aufgefasst wissen. Der Vergleich der nach dem Milchverdünnungs- und nach dem Zentrifugierverfahren erhaltenen Ergebnisse zeigt mit aller Deutlichkeit, dass das von uns geübte Ausschleudern von 100 ccm Milch und die Verimpfung des anfallenden Rahmes und Sedimentes eine Verschärfung des Buttersäurebazillennachweises darstellt. Das Verfahren erlaubt, noch wesentlich geringere Buttersäurebazillengehalte zu erfassen, als dies bei der Verimpfung von 5 ccm Milch möglich ist.

In bezug auf die Pasteurisationstemperatur stellten wir wiederholt fest, dass bei 80° C/10 Min. bedeutend schlechteres Wachstum eintrat als bei 75° C/10 Min. Beim Anlegen von Reinkulturen blieb bei 80° C/10 Min. wiederholt das

Wachstum überhaupt aus, während bei der um einige Grade tieferen Pasteurisation noch Wachstum eintrat. Auch bei der Untersuchung von Käse blieb oft die Fahndung nach Buttersäurebazillen bei der Pasteurisation von 80° C/10 Min. ergebnislos, während der Nachweis bei 75° C/10 Min. noch gelang. Eine Pasteurisationstemperatur von 75—77° C während 10 Minuten ist somit in manchen Fällen vorteilhafter.

c) Wachstumsbeurteilung

Bei der Beurteilung der pasteurisierten Dextroseagarreihen wurden *Gasbildung* und *Buttersäuregeruch* als in erster Linie entscheidend erachtet. Sämtliche auf Dextroseagar Wachstum zeigenden Kulturen wurden zudem der mikroskopischen Prüfung unterzogen, doch legten wir der Morphologie nur sekundäre Bedeutung bei, da es, wie bekannt, Formen gibt, die wie echte Buttersäurebazillen aussehen, ohne mit diesen identisch zu sein (z. B. Cl. polymyxa). Auch ist die Form der beweglichen Buttersäurebazillen nicht immer genau gleich; neben der Clostridienform (die dadurch zustandekommt, dass die einzige in der Mitte liegende Spore das Stäbchen spindelförmig auftreibt) können infolge endständiger Stellung der Spore auch Trommelschlägerformen vorkommen. Wir konnten auch beobachten, dass die Sporulation gelegentlich ganz unterblieb oder im Moment der Untersuchung noch nicht eingetreten war und sich die Buttersäurebazillen als plumpe, sehr kräftige Stäbchen präsentierten. In diesem Falle dienten die Gasbildung und der typische Geruch nach Buttersäure als einwandfreie Erkennungsmerkmale.

War Gasbildung auf Dextroseagar eingetreten, so erfolgte in jedem Falle eine pasteurisierte und eine unpasteurisierte Passage auf Laktatagar. Zur Wachstumsbeurteilung dienten hier die Gasbildung und das mikroskopische Bild. Dabei machten wir die Feststellung, dass die Gasbildung auf Laktatagar manchmal nicht sehr kräftig erfolgte, oft auch ganz ausblieb, obgleich die vorgenommene mikroskopische Kontrolle der gewachsenen Kolonien die Anwesenheit von Buttersäurebazillen vermuten liess. Bei einer neuen Passage zurück auf Dextroseagar und nochmals auf Laktatagar trat dann manchmal die Gasbildung deutlich hervor.

Für die Gasbildung auf Laktatagar scheint der Zustand des eingeimpften Bakterienmaterials von grösserer Bedeutung zu sein als bei Dextroseagar, indem auf Laktatagar alte, in der Sporulation wohl schon weiter vorgeschrittene Bakterienstämme bedeutend schlechter angehen als junge. Dies geht aus folgender Gegenüberstellung hervor:

Tabelle IV

Impfmaterial	Gasbildung		Bemerkungen
	Dextroseagar	Laktatagar	
1. Suspension eines alten B.-bazillenstammes	+ + + + + + − −	+ + − + − − − −	Auf Laktatagar 1. u. 2. Verd. spärlich Gas 3. Verd. kein Gas 4. Verd. spärlich Gas u. Kol. 5. u 6. Verd. Kolonien
Verimpfen desselben Stammes auf Milch und zentrifugiert	+ + + + + + − −	+ + + + − − − −	Auf Laktatagar 5. u. 6. Verd. Kolonien
	+ + + + + + − −	+ + + − − − − −	4. Verd. Kolonie
	+ + + + − − − −	+ + − − − − − −	3. u. 4. Verd. Kolonien
	+ + + − − − − −	+ + − − − − − −	3. Verd. Kolonie
	+ + − − − − − −	+ − − − − − − −	
	+ − − − − − − −	− − − − − − − −	
2. Suspension eines jungen B.-bazillenstammes	+ + + + + + − −	+ + + + + − − −	Auf Laktatagar Gasbildg. bis 2 Tage später und weniger kräftig
Verimpfen desselben Stammes auf Milch und zentrifugiert	+ + + + + + + −	+ + + + + − − −	Auf Laktatagar Gasbildg. bis 3 Tage später
	+ + + + + + − −	+ + + + + + + −	do.
	+ + + + + + + −	+ + + + + + − −	do.
3. Suspension eines jungen B.-bazillenstammes	+ + + + − − − −	+ + + − − − − −	Auf Laktatagar Gasbildg. bis 1 Tag später
Verimpfen desselben Stammes auf Milch und zentrifugiert	+ + + + − − − −	+ + + + − − − −	Auf Laktatagar Gasbildg. bis 3 Tage später
	+ + + + − − − −	+ + + + + − − −	do.

Alle drei geprüften Stämme waren Reinkulturen, die Dextroseagar und Laktatagar passiert hatten. Danach wurde Stamm 1 drei Monate stehen gelassen, während 2 und 3 sofort nach der Passage auf Laktatagar für die in Tabelle IV angegebenen Kulturversuche verarbeitet wurden. In allen Laktatagarkulturen war die Gasbildung bedeutend weniger kräftig und trat auch später ein als in den Parallelreihen auf Dextroseagar.

Laktatagar eignet sich in der von uns benutzten Zusammensetzung weniger gut für die quantitative Ermittlung des Buttersäurebazillengehaltes von Milch

als Dextroseagar. Für quantitative Untersuchungen lässt sich somit das Anlegen von Kulturen auf Dextroseagar nicht umgehen. Die anschliessende Verimpfung auf Laktatagar kann lediglich als qualitativer Test auf das Laktatvergärungsvermögen gelten. Dabei erweist es sich als vorteilhaft, das Verimpfen der Stämme auf Laktatagar möglichst rasch auf die Passage in Dextroseagar folgen zu lassen. Bei unseren Versuchen auf Dextroseagar war die Gasbildung nach spätestens 5 Tagen beendet. Ein längeres Bebrüten ist für die nachfolgende Prüfung auf die Laktatvergärung nur von Nachteil.

Das Vorgehen zum Nachweis laktatvergärender Buttersäurebazillen erweist sich somit als etwas umständlich. Ein dem direkten Nachweis der Laktatvergärer dienliches Verfahren wäre sehr erwünscht.

III. ERGEBNISSE

Die von uns nach der beschriebenen Methode untersuchten Milchen lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

A. Lieferantenmilchen aus Genossenschaften ohne Silagefütterung (523 Milchen aus 14 Käsereigenossenschaften).

B. Lieferantenmilchen aus Genossenschaften mit Silagefütterung (Rübenschnitzel-Rübenlaubsilage) im Winter (115 Milchen aus 3 Genossenschaften).

C. Milchen aus einer Genossenschaft mit andauernder Fütterung frischer Malztreber (27 Milchproben).

D. Kesselmilchen aus Genossenschaften mit anhaltender Emmentalerkäsefabrikation und daherigem Silagefütterungsverbot (98 Milchen).

E. Kesselmilchen aus Genossenschaften nach vorübergehender Silagefütterung, gefasst zu Beginn der neuen Fabrikationsperiode (19 Milchen).

F. Lieferantenmilchen, gefasst nach beendigter Silagefütterung (47 Milchen).

Die prozentuale Verteilung der untersuchten Milchen auf verschiedene Keimgehaltskategorien zeigt für die einzelnen Gruppen folgendes Verhältnis:

Gruppe	Laktatvergärende Buttersäurebazillen in 100 ccm Milch				
	0	1—10	11—100	101—1000	über 1000
	%	%	%	%	%
A	89,9	8,6	1,5	0	0
B	27,0	20,9	30,4	16,5	5,2
C	37,1	44,4	14,8	3,7	0
D	86,8	7,1	6,1	0	0
E	57,9	15,8	26,3	0	0
F	38,3	31,9	14,9	10,6	4,3

Die von uns geübte Differenzierung der auf Dextroseagar gewachsenen Stämme ergab, dass von 288 dextrosevergärenden Stämmen 231 oder 80,2 % Laktat vergärten. Darin erblicken wir eine weitere Bestätigung der von D. J. van Beynum und J. W. Pette (l. c. 18) gemachten Angaben über zuckervergärende und laktatvergärende Buttersäurebazillen.

Zusammenfassung

1. Für die Ermittlung des Buttersäurebazillengehaltes der Milch wurde als Anreicherungstechnik das Ausschleudern in der Laboratoriumszentrifuge (30 Min. bei 3500 Touren) benutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass ca. 90 % der vorhandenen Buttersäurebazillen in den Rahm und ca. 10 % in das Sediment wandern. Die Magermilch enthält keine oder nur ganz unbedeutende Bazillenmengen. Rahm und Sediment zusammen enthalten somit praktisch die Gesamtheit der vorhandenen Buttersäurebazillen und sind für die weitere Verarbeitung allein wichtig.

Auf diese Weise ist es möglich, von einer grösseren Milchmenge ein Keimkonzentrat zu erhalten und noch wesentlich geringere Keimmengen zu erfassen als dies bei der Verimpfung einiger ccm Milch möglich wäre. Die in vorliegenden Untersuchungen jeweils verarbeitete Milchmenge betrug 100 ccm.

In Milch eingesäte Buttersäurebazillen konnten mit befriedigender Genauigkeit wieder gefunden werden.

2. Die vorgefundenen Buttersäurebazillen sollten auf ihre Fähigkeit, Laktat zu vergären, geprüft werden.

Vergleichende Kulturversuche auf Dextroseagar und Laktatagar bewiesen, dass der bewegliche Buttersäurebazillus auf Dextroseagar bedeutend besser wächst. Alte Stämme, auf beide Nährböden verimpft, zeigen einen viel ausgesprocheneren Unterschied in der Wachstumsfreudigkeit als junge Stämme. Für den Nachweis laktatvergärender Buttersäurebazillen muss deshalb das zu untersuchende Material zuerst auf Dextroseagar verimpft werden. Erst nach dieser Passage kann die Prüfung auf das Laktatvergärungsvermögen durchgeführt werden.

3. Es wurden 829 Milchproben nach dem beschriebenen Verfahren auf bewegliche und laktatvergärende Buttersäurebazillen geprüft. Dabei wurden die Gewinnungsweise der Milch und besonders die Fütterungsverhältnisse beim Milchproduzenten mit in Betracht gezogen.

Die prozentuale Verteilung der untersuchten Milchen auf die verschiedenen Keimgehaltskategorien wurde tabellarisch geordnet. Es zeigt sich, dass je nach der Gewinnungsweise der Milch das Verhältnis der buttersäurebazillenfreien zu den buttersäurebazillenhaltigen Milchen ganz verschieden sein kann.

Von 288 auf Dextroseagar gewachsenen Stämmen vergärten 231 oder 80,2 % Laktat.

Literatur

[1]) Lehmann-Neumann, Bakt. Diagnostik, München 1927.
Bergey: Manual of determinative Bacteriology, London 5. Auflage 1939.
[2]) Orla-Jensen, Le Lait *20*, 2 (1940).
[3]) Schattenfroh und Grassberger, Zentralblatt f. Bakt. 2. Abt. *5*, 209 u. 697 (1899). Arch. f. Hygiene *37*, 54 (1900).
[4]) Tissier und Gasching, Ann. d. l'Inst. Pasteur *17*, 540, 1903.
[5]) Chr. Barthel, Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. *26*, 14, 1910.
[6]) R. Burri, W. Staub und J. Hohl, Schweiz. Zentralblatt für Milchwirtschaft, Nr. 40—43, 1919.
[7]) K. J. Demeter und H. Ordolff, Milchw. Forschungen *12*, 1, 1931.
[8]) Einholz, Inaug. Diss. Kiel, 1934.
[9]) Jochims, Inaug. Diss. Hannover, 1934.
[10]) Bliss, Amer. Journ. of Hyg. *6*, 627, 1926.
[11]) W. Dührsen, Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. *96*, *35*, 1937.
[12]) J. Baumann, Inaug. Diss. Zürich, 1934.
[13]) J. Kürsteiner, Landw. Monatshefte Nr. 1—4, 1926.
[14]) W. Dorner und P. Ritter, Alpwirtschaftl. Monatsblätter Nr. 7, S. 239, 1938.
[15]) K. J. Demeter, Süddeutsche Molkerei-Ztg. Nr. 15, 1930.
[16]) Schweiz. Lebensmittelbuch, 4. Aufl. 1937, S. 46.
[17]) J. Kürsteiner, Schweiz. Milchzeitung *46*, Nr. 38 (1940).
[18]) D. J. van Beynum und J. W. Pette, Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. *93*, 198 (1935).
[19]) D. J. van Beynum u. J. W. Pette, Versl. v. landbouwkundige Onderz. *46*, 379, 1940.
[20]) W. Ritter, Landw. Jahrb. d. Schweiz 1932, S. 601.
[21]) G. Ruschmann, Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. *75*, 408 (1928).
[22]) G. Ruschmann und Harder, Die Futterkonservierung, *3*, 1, 1931.
[23]) R. Burri, Second international Congress for Microbiology, London 1937, S. 233.
[24]) M. Düggeli, Schweiz. Milchzeitung Nr. 88, 90, 92, 93, 94, 95 (1922).
[25]) J. Kalkschmidt, Milchw. Forschungen *19*, 140 (1937).
[26]) W. Dorner, Landw. Jahrb. d. Schweiz *38*, 175 (1924).