

Untersuchungen  
über die  
milchwirtschaftlich wichtigen Bakterien  
in den Faeces des Rindes

---

Von der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich  
zur Erlangung der  
Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften  
genehmigte

**Promotionsarbeit**

vorgelegt von  
**Jakob Baumann**, ing. agr., aus Schafisheim, Aargau

Nr. 792

Referent: Prof. Dr. **M. Dügge**  
Korreferent: Prof. Dr. **G. Wiegner**

**Leer - Vide - Empty**

Am 31. März 1906 wurde ich in Schafisheim, Aargau, wo ich heimatberechtigt bin, geboren. Ich besuchte die dortige Gemeindeschule und anschliessend die Bezirksschule in Lenzburg. Später trat ich in die Kantonsschule Aarau ein, an der ich im Jahre 1925 die Maturität bestand. Im selben Jahre begann ich mein Studium an der landwirtschaftlichen Abteilung der E. T. H. in Zürich und erwarb mir das Diplom als ing. agr. im Sommer 1928. Zur weiteren fachlichen Ausbildung arbeitete ich auf landwirtschaftlichen Betrieben in Südfrankreich, Algier, Aegypten, im Kt. Tessin und in einer Emmentalerkäserei im Berner Jura. Seit 1931 bin ich teilweise an der milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern und an der Abteilung für Landwirtschaft im Eidgenössischen Volkswirtschafts-Departement tätig.

---

## Inhaltsübersicht

---

	Seite
Einführung . . . . .	3
A. Die kugel- bzw. kettenförmigen Milchsäurebakterien	
1. Literaturübersicht . . . . .	4
2. Methodisches . . . . .	6
3. Die Streptokokken . . . . .	9
4. Die Betakokken . . . . .	23
5. Die Tetrakokken . . . . .	24
B. Untersuchungen über das Vorkommen von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien	
1. Bisherige Untersuchungen . . . . .	31
2. Eigene Untersuchungen . . . . .	33
C. Das Vorkommen von Propionsäurebakterien	
1. Bisherige Untersuchungen . . . . .	49
2. Eigene Untersuchungen . . . . .	50
D. Das mengenmässige Vorkommen der für die Molkereigewerbe unerwünschten Mikroorganismen	
1. Die Coli-aerogenes-Gruppe . . . . .	55
2. Die Buttersäurebazillen . . . . .	59
3. Die anaeroben, Eiweiss abbauenden Sporenbildner . . . . .	60
E. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse . . . . .	61
Literaturverzeichnis . . . . .	66

# Untersuchungen über die milchwirtschaftlich wichtigen Bakterien in den Faeces des Rindes.

Von **J. Baumann**, ing. agr.

Aus der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern,  
Vorstand: Prof. Dr. *R. Burri*.

---

## Einführung.

Der Zweck unserer Untersuchungen war, die Bedeutung und Auswirkung von Kuhkotinfektionen hinsichtlich der auf diesem Wege in die Milch gelangenden wichtigen Bakterienarten abzuklären. In einer früheren Arbeit über den Zusammenhang zwischen Schmutzgehalt und Keimzahl der Milch (6a) haben wir festgestellt, dass der Kotinfektion im allgemeinen nicht die Bedeutung zukommt, wie man gewöhnlich glaubt und auch in der Literatur angegeben findet, indem sie sich nicht wie eine Impfung auswirkt, als deren Folge eine rasche Zunahme des Keimgehaltes auftritt. Wir haben indessen darauf hingewiesen, dass die reinliche Milchgewinnung trotzdem namentlich vom hygienischen Standpunkt aus sehr erstrebenswert ist. Während jene Untersuchungen in erster Linie die quantitativen Verhältnisse abzuklären hatten und namentlich mit Rücksicht auf die Beeinflussung der Haltbarkeit der Milch vorgenommen wurden, war aus verschiedenen Gründen eine Ergänzung derselben nach der qualitativen Seite hin wünschbar. Einmal war es von Interesse zu wissen, welche Keimarten fäkaler Herkunft gelegentlich in Konsummilch gelangen können. Ebenso wichtig schien es uns, Aufschluss darüber zu erhalten, mit welchen von Kot stammenden Bakterienarten man gegebenenfalls bei der Verarbeitung von Milch zu rechnen hat, vor allem in der Käseerei und Buttereier, da ja selbst unter Wahrung grösster Vorsicht bei der Milchgewinnung Kotverunreinigungen nie ganz auszuschalten sind. Es ist deshalb für die genannten Molkereigewerbe von Wichtigkeit, über die aus dieser Infektionsquelle zu erwartenden „nützlichen“ und „schädlichen“ Arten orientiert zu sein. Es sei hier als Beispiel nur die Bedeutung der hitzeresistenten Arten im Kot für die Molkereigewerbe, die auf Pasteurisation angewiesen sind, erwähnt.

Sowohl die Buttereier wie die Käseerei gehen heute darauf hinaus, ihr Ausgangsmaterial, die Milch, so keimarm wie möglich zu halten, um nachher die nötigen nützlichen Organismen in Reinkultur zuzusetzen. Unsere Hauptaufgabe soll nun die sein, festzustellen, ob und in welcher Menge im Kot die für die Molkereigewerbe nötigen nützlichen Organismen vorhanden sind. Eine solche Feststellung hat ohne Zweifel ihre volle Berechtigung mit Rücksicht auf die Tatsache, dass einerseits von jeher auch unter primitiven Milchgewinnungsverhältnissen vorzügliche Molkereiprodukte hergestellt wurden, andererseits gewisse Schwierigkeiten bestehen, die in solcher Milch herrschenden natürlichen Keimverhältnisse durch Reinkulturen zu ersetzen. Die Untersuchungen waren

so vorzunehmen, dass die im Kot vorhandenen Milch- und Propionsäurebakterien einem eingehenden Studium zu unterziehen waren, um sie wenn möglich anschliessend, mit den entsprechenden aus Milch, bezw. Käse isolierten Arten zu vergleichen. Das mengenmässige Auftreten der einzelnen Arten war ebenfalls zu berücksichtigen. Um schliesslich den Anteil der milchwirtschaftlich nützlichen Organismen an der Gesamtflora des Kotes richtig ermessen zu können, waren auch einige quantitative Erhebungen über das Vorkommen der schädlichen Bakteriengruppen im Kot notwendig.

Das sind die leitenden Gesichtspunkte, nach welchen die Kotflora einer Untersuchung zu unterziehen war.

## A. Die kugel- bzw. kettenförmigen Milchsäurebakterien.

### 1. Literaturübersicht.

Im Darminhalt der neugeborenen Kälber und im Meconium der Säuglinge konnte *Popoff* (63) nie Mikroben nachweisen. *Escherich* (27) stellte im Jahre 1886 den *Micrococcus ovalis*, einen Diplococcus, als normalen Bewohner des Säuglingsdarmes fest. Ein Jahr später beschrieb *Hirsch* (38) den *Streptococcus enteritidis*, welcher meist längere Ketten bildet, im Stuhl von Säuglingen vorkommt und Erreger der Säuglingsenteritis sein soll. *Thiercelin* (77) nennt den länglichen bis lanzettlichen Diplococcus im Stuhle von Kindern *Enterococcus* und bemerkt, dass dieser in Bouillon einen weisslichen, schleimigen Niederschlag bildet und häufig unter anaeroben Bedingungen besser wächst als bei ungehemmtem Luftzutritt. *Kruse* (47) hielt den in Milch gefundenen *Streptococcus lacticus* für identisch mit dem *Enterococcus* von *Thiercelin*.

In einer Arbeit von *Gröning* (34) wird das Vorhandensein von Streptokokken im Darmtraktus des Rindes geprüft. Während er im ersten Viertel des Dünndarmes solche weder mikroskopisch noch kulturell nachweisen konnte, traten in den hinteren Abschnitten derselben, wenn auch nur selten, kurze, zwei- bis viergliedrige Ketten auf. Im Dickdarm nahm im allgemeinen mit der Gesamtbakterienzahl auch die Zahl der Streptokokken bedeutend zu, welche letztere im Mastdarm sehr häufig in 10—30gliedrigen Ketten nachzuweisen waren. *Wüthrich* und *v. Freudenreich* (90) stellten den Einfluss der Fütterung auf den Bakteriengehalt des Kuhkotes fest. Bei den an 2 Kühen angestellten Versuchen ergab sich ein Steigen des Bakteriengehaltes beim Uebergang von der Grasfütterung zur Trockenfütterung einerseits, andererseits eine Verminderung der Keimzahl, als das Heu durch saure Kartoffeln ersetzt wurde. Die genannte Vermehrung betrifft in erster Linie die Heu- und Kartoffelbazillen, in zweiter Linie die Coli-Bakterien. Da das Heu reich an Sporenbildnern ist, ist eine Vermehrung der erstgenannten Bazillen leicht erklärlich. Die Autoren glauben, dass im Darmtraktus für die Coli-Bakterien durch die Heufütterung günstige Verhältnisse geschaffen werden, da diese Bakterien im Heu nicht sehr häufig sind. *P. Ankersmit* (3) stellt auf Grund von umfassenden Untersuchungen fest, dass die Keimzahlen beim Rinde im Pansen am höchsten sind. Im Labmagen und im mittleren Dünndarm tritt immer eine bedeutende, fast bis zur Vernichtung gehende Reduktion ein, wogegen im Dickdarm wieder ein Ansteigen der Keimzahl zu verzeichnen ist. Das *Bact. Güntheri* und das *Bact. coli* werden zur *obligaten* Darmflora gerechnet, da sie sich in bestimmten Abschnitten in wesentlicher Masse vermehren und regelmässig angetroffen werden. Aus anschliessenden Untersuchungen des Milchkalbkotes ergab sich, dass hier bedeutend höhere Keimmengen vorhanden sind als im Rinderkot. Auch hier nehmen die Milchsäurebakterien zahlenmässig die erste Stelle ein und zwar sind es neben *Bact. Güntheri* langstäbchenförmige Milchsäurebakterien, welche die hohen Keimzahlen bedingen. *F. Löhnis* (51) weist darauf hin, dass das relativ häufige Vorkommen der „Laktokokken“ im Verdauungskanal des Rindes naturgemäss auf die Keimflora der Milch von grösserem oder geringerem Einfluss ist und macht auf den Umstand aufmerksam, dass sich gerade diese Darmstreptokokken dem typischen *Strept. pyogenes* mitunter nähern. *W. Hüttemann* (41) fand im Darmtraktus stets den *Bacillus subtilis* und das *Bact. coli*, oft auch eine grössere Zahl von Kokken. Im Ganzen züchtete er aus dem Darminhalt von 72 Kühen 25 verschiedene Arten. Zu gleicher Zeit untersuchte *Neubauer* (57) die Bakterienflora

von 30 Rindern auf das Vorhandensein von obligat anaeroben Bakterien und fand unter 900 Stämmen nur einen einzigen, der streng anaerob war.

*Andrewes* und *Holder* (2) versuchten die Streptokokken auf Grund des verschiedenen Säuerungsvermögens von Kohlehydraten zu differenzieren. An dem in den Faeces vorherrschenden Strept. *Faecalis* hoben sie besonders die Fähigkeit, Mannit zu vergären, hervor. *Winslow* und *Palmer* (86) prüften nach der von *Andrewes* und *Holder* angegebenen Methode der Zuckervergärung eine grosse Zahl von Streptokokken-Stämmen aus menschlichen, Rinder- und Pferde-Faeces. Unter 116 Stämmen aus Fäkalien fanden sie nur 34 %, welche die von *Andrewes* und *Holder* für Strept. *faecalis* als charakteristisch angegebenen Eigenschaften aufwiesen, während *Fuller* und *Armstrong* (31) bei der Untersuchung von 123 Stämmen aus menschlichen Stühlen bei 65 % ihrer Stämme Mannitvergärung und typisches Verhalten wie *Streptococcus faecalis* feststellen konnten. *J. W. Dible* (20) hält den Begriff des Sc.\*) *faecalis*, wie ihn *Andrewes* und *Holder* umschrieben haben, zufolge seiner Beschränkung auf Mannitvergärer, als zu eng und möchte die im Darm vorkommenden Streptokokken, mit wenigen Ausnahmen unter den Namen *Enterokokken* zusammenfassen. Als besonders charakteristische Eigenschaften des *Enterococcus* hebt er hervor die Mannitvergärung, die Thermoresistenz und das Wachstum in Diploform. Nach *A. Rochaix* (67) soll der *Enterococcus* die von *Harrison* und *Vanderleck* (36) angegebenen Aeskulin-nährböden zersetzen.

In einer neueren Arbeit von *A. Voss* (83) wurde die Milchsäurebakterienflora im Darminhalt des Rindes und ihre Beeinflussung durch Rübenblättermahlung untersucht. Zur systematischen Bestimmung der Stämme wendet *A. Voss* die von *S. Orla-Jensen* ausgearbeitete Methode, auf die wir im folgenden Abschnitt eintreten werden, an. Während die Milchsäurebakterien in den oberen Darmabschnitten in verhältnismässig grosser Zahl und ansehnlichem Artenreichtum auftraten, waren sie im Dickdarm nur spärlich nachweisbar. „Anhaltend und ohne Ausnahme konnten bei allen Versuchstieren nur die Streptokokken *faecium* und *bovis* ermittelt werden, während die Streptokokken *thermophilus*, *liquefaciens* und *lactis*, *Tetrakokken* und *Thermobakterium lactis* nur einmal und stets nur bei verschiedenen Versuchstieren angetroffen werden konnten“ (83, p. 397). Wie wir im Abschnitt über die langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien anführen, fand *H. Kreipe* (46, p. 22) bei seinen Untersuchungen über die Milchsäurebakterienflora des Kuhpansens, dass jene Gruppe von Milchsäurebakterien nicht in der Lage ist, sich dauernd im Pansen anzusiedeln. „Scheinbar trifft für einige Streptokokken, z. B. *lactis* und *cremoris* genau dasselbe zu. Diese sind eben derartig an die Ernährungsbedingungen, wie sie ihnen die Milch bietet, gewöhnt, dass sie sich auf die ganz andern Bedingungen im Pansen nicht einzustellen vermögen.“ In den Studien über den Streptokokkus *lactis* (*Lister*) Löhnis und seine Beziehungen zu den Fäkalstreptokokken von *K. J. Demeter* (19) wurden die Stämme hauptsächlich auf folgende Eigenschaften geprüft: Morphologie, Hitzeresistenz, Haemolyse, Lachmusmilchprobe, Janusgrünprobe, Vergärung von Zuckern, Alkoholen und Glucosiden, Wachstum in Medien mit erniedrigter Oberflächenspannung, CO<sub>2</sub>-Bildung aus Dextrose und Pepton (Gasquotient), Ammoniakbildung aus Pepton und Natriumhippuratspaltung. „Die Untersuchung einer engeren Gruppe von 24 Fäkal- und 3 Milchstämmen hinsichtlich solcher Eigenschaften, die von verschiedenen Autoren als für die Enterokokken charakteristisch angegeben werden (Säuerungskraft bei 50°, Vergärung von Salizin, Mannit, Saccharose, Arabinose, Schwärzung von Aeskulinbouillon) ergab nicht weniger als 11 verschiedene Kombinationen. Dies ist ein Beweis für die Aussichtslosigkeit, auf Grund dieser Eigenschaften den Enterokokkus vom Streptokokkus *lactis* differenzieren zu wollen“ (p. 265). *G. J. Hucker* (39a) untersuchte, bis zu welchem Grade eventuell verschiedene Species eine positive Agglutination zeigen. In diesem Falle wären sie zum mindestens als nahe verwandt, wenn nicht als identisch zu bezeichnen. Bemerkenswerterweise agglutinierte der Sc. *faecium* Stämme von Sc. *lactis*. Diese Tatsache spricht sehr für die Auffassung *Demeters*, wonach es sich erübrigt, zwischen Sc. *lactis* und Sc. *faecium* zu unterscheiden.

---

\*) Sc. wird stets als Abkürzung für *Streptococcus* benützt.

## 2. Methodisches.

Während man früher bei der Beschreibung und Bestimmung von Bakterienarten vorwiegend auf das morphologische Aussehen und das kulturelle Verhalten angewiesen war, stellt man in neuerer Zeit, besonders bei den Milchsäurebakterien, weitgehend auf die physiologisch-chemischen Eigenschaften, wie das Verhalten gegenüber verschiedenen Kohlenhydraten, das Eiweissabbauvermögen und die Art der gebildeten Milchsäure ab. Die Vergärfähigkeit der Zucker erwies sich besonders geeignet, die zahlreichen, morphologisch nicht zu unterscheidenden Species der Streptokokkenfamilie auseinander zu halten. *S. Orla-Jensen* (60) hat seiner Systematik der Milchsäurebakterien dieses Prinzip unter Heranziehung weiterer chemisch-physiologischer und anderer Eigenschaften zu Grunde gelegt. Wie aus der angeführten Literatur hervorgeht, bestehen noch mancherlei Widersprüche hinsichtlich der Umschreibung der für die Fäkalstreptokokken charakteristischen Eigenschaften und ihrer Abgrenzung gegenüber den andern Species. Kritisch betrachtet, haben wir die einander gegenüberstehenden extremen Auffassungen, vertreten durch *Andrewes* und *Horder* einerseits, die die Mannitvergärung als besonderes Kriterium für die Fäkalstreptokokken betrachten, und *K. J. Demeter* andererseits, welcher die Grenzen für die Fäkalstreptokokken sehr weit zieht und es müßig findet, Unterschiede zwischen diesen und dem *Streptococcus lactis* herauszusuchen. Wir werden uns bei unseren Untersuchungen weder auf die eine, noch auf die andere dieser beiden Richtungen festlegen, sondern die Bestimmung der aus Kuhkot isolierbaren Streptokokken nach der Methode von *S. Orla-Jensen* vornehmen.

Nach der Systematik von *Orla-Jensen* werden die milchsäurebildenden Streptokokken und Mikrokokken zunächst in folgende zwei Hauptgruppen eingeteilt:

- I. Organismen ohne Katalase, Nitratreduktion und Oberflächenwachstum;
- II. Organismen, in der Regel mit Katalase, Nitratreduktion und immer kräftigem Oberflächenwachstum.

Gruppe II umfasst die bisher als Mikrokokken, Staphylokokken, Tetrakokken und Sarcinen bezeichneten kugelförmigen Organismen mit in der Regel kräftigem Oberflächenwachstum und führt den Gattungsnamen *Tetrakokkus*. Eine Ausscheidung besonderer Arten nach morphologischen Gesichtspunkten (z. B. Wachstums- oder Teilungsformen), wie sie andere Autoren vornehmen, erfolgt nicht. Dagegen werden die Organismen dieser Gattung nach ihrem Verhalten gegenüber den Kohlenhydraten in 3 Arten eingeteilt.

Gruppe I umfasst fast ausschliesslich kettenförmige Milchsäurebakterien mit schwachem Oberflächenwachstum (Gattung *Streptokokkus*). Sehr selten kommen auch etwa morphologisch Mikrokokkenähnliche Organismen, die keine Katalase bilden, unter der Gattung *Betakokkus* vor. Das primäre Unterscheidungsmerkmal zwischen den Gruppen I und II (Strepto- und Betakokken einerseits und Tetrakokken andererseits) ist nicht die morphologische Verschiedenheit, sondern das Katalasebildungs- und Nitratreduktionsvermögen. „In contrast to the truer lactic acid bacteria, however, the micrococci and sarcinae are furnished with *catalase*, so that their broth cultures give a development of oxygen with peroxide of hydrogen, — almost always of the nature of a explosion — and this reaction is therefore a reliable character by which to distinguish them from the other cocci, and especially from the micrococcus-like *betacocci*.“ (60, p. 75). Die kettenförmigen Milchsäurebakterien der Gruppe I werden in solche, die neben Milchsäure nur Spuren von Nebenprodukten (Gattung: *Streptokokkus*) und solche, die neben Milchsäure Gas und beträchtliche Mengen anderer Nebenprodukte (flüchtige Säuren und Aromastoffe) bilden (Gattung: *Betakokkus*), unterscheiden. Die Streptokokken bilden rechts —, die Betakokken links —, ausnahmsweise inaktive Milchsäure. Die Betakokken, welche sich durch ein niedriges Temperaturoptimum auszeichnen, umfassen die praktisch wichtige Gruppe der Aromabakterien. Zur Gattung *Streptokokkus* gehört die Grosszahl der gemeinen Milchsäurestreptokokken, die nach der Vergärbarkeit der Kohlenhydrate in 10 Arten gegliedert werden.



Die Speciesbezeichnungen sind bis auf wenige Ausnahmen neu. Die Art *Sc. lactis* Orla-Jensen ist etwas enger und genauer umschrieben als der *Streptococcus lactis* (Lister) Löhnis oder gar die früher benannten und beschriebenen Arten: *Streptococcus acidi lactici* Grotenfeld, *Streptococcus lacticus* Kruse, *Bacterium lactis acidi* Leichmann und *Bacterium Güntheri* Lehmann et Neumann.

*Isolierung und Reinzüchtung der Stämme.* Bei der Isolierung wurde in der Hauptsache auf die morphologischen und kulturellen Eigenschaften der Stämme abgestellt. Es wurden dabei die verschiedensten Verfahren angewendet, um aller im Kot vorhandenen Species habhaft zu werden.

Eine Anzahl Stämme wies trotz sorgfältiger Reinzüchtung (zwei- bis dreimalige Passagen auf einem Gelatine- oder Agrarnährboden) *Polymorphismus* auf, wie ihn verschiedene Autoren u. a. H. Schönfeld und K. J. Demeter bei Fäkalstreptokokken auch beobachtet haben. Um darüber Klarheit zu bekommen, ob diese Eigenschaft wirklich artbedingt sei oder ob es sich dabei um zwei verschiedene, schwer von einander trennbare Arten handelt, war es nötig, Einzelkulturen anzulegen. Hiefür wurde das Einzelkulturverfahren von R. Burri (11) angewendet.

Wir verwendeten dazu eine gewöhnliche, sterilisierte, homogene Günther-Wagner Zeichentusche. Die Tuschepunkte mit nur einem Keim (gewöhnlich ein Diplokokkus) wurden bei den aerob auf Gelatineplatten gut wachsenden Stämmen mit einem Deckglassplitter zugedeckt und bei 20° bis zum Heranwachsen zur Kolonie bebrütet. Bei den mehr anaerob wachsenden Stämmen wurden die Punkte aus der Gelatine herausgeschnitten und unter sterilen *Kautelen* in ein ausgekochtes Röhrchen mit steriler Bouillon gebracht, dieses mit dem anaeroben Verschluss versehen und hierauf bei 30° bebrütet.

*Die Vergärung von Kohlehydraten.* Um Vergleichswerte zu bekommen, wurden die Vergärungen mit den gleichen 18 Kohlehydraten, wie sie S. Orla-Jensen jeweils benützte, durchgeführt.

Wenn auch einige Autoren sagen, man brauche die Milchsäurebakterien nicht auf ihr Vergärungsvermögen der 4 Hexosen: Dextrose, Laevulose, Galactose und Mannose, die sie wahrscheinlich alle vergären, zu prüfen, so wurde doch in jedem einzelnen Fall exakt die gebildete Säuremenge in ‰ bestimmt, um zu sehen, welcher Zucker bevorzugt wird.

S. Orla-Jensen hat bei seinen Gärungsstudien auch Milchsäurelangstäbchen, also z. T. sehr starke Säurebildner untersucht und deshalb stets mit 2 ‰igen Zuckerlösungen gearbeitet. Wie aber aus seinen eingehenden Voruntersuchungen über den optimalen Zuckergehalt hervorgeht, liegt dessen Wert für Streptokokken niedriger als für Stäbchen. Wir haben daher für die Prüfung der Zuckervergärfähigkeit unserer Streptokokkenstämme aus Kot nur 1 ‰ige Zuckerlösungen verwendet.

Bei den Untersuchungen *S. Orla-Jensens* wurden als Stickstoffquellen entweder Witte-Pepton, Casein-Pepton oder Hefeextrakt benützt. Wie aus seinen gründlichen Vorversuchen (60, p. 29) ersichtlich ist, nimmt das Säurebildungsvermögen aller Stämme im allgemeinen stark zu mit steigendem Stickstoffgehalt der Stickstoffquelle. Sie zeigen weiter, dass bei 0,5 ‰ N von Casein-Pepton mehr Säure gebildet wird, als bei 0,7 oder gar 1,35 ‰ N von Witte-Pepton herrührend. Das Casein-Pepton wird speziell von Streptokokken dem Witte-Pepton vorgezogen. In gewissen Fällen, besonders für stäbchenförmige Milchsäurebakterien war das Hefeextrakt die beste Stickstoffquelle. In Berücksichtigung dieser Verhältnisse und der anlässlich unserer Untersuchungen gemachten Feststellung, dass sämtliche aus Kot isolierten Stämme besonders gut auf gewöhnlicher Bouillon gewachsen sind, haben wir eine Stickstoffquelle folgender Zusammensetzung verwendet:

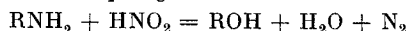
30 g Casein-Pepton,  
 5 g Witte-Pepton,  
 5 g Hefeextrakt,  
 1000 ccm entzuckerte Bouillon, mit NaOH (nötigenfalls HCl) auf pH = 6,8 eingestellt.

Sie weist einen N-Gehalt von nahezu 0,7% auf, während S. Orla-Jensen das Casein-Pepton in einer Menge von nur 0,5% N verwendete. Wir haben den N-Gehalt absichtlich etwas erhöht, weil, wie auch aus neuern Untersuchungen hervorgeht, das Säurebildungsvermögen stark zurückgeht mit sinkendem Stickstoffgehalt. Wird dieser von 1% auf 0,5% herabgesetzt, so geht die Milchsäurebildung nach Untersuchungen von *Blythe A. Eagles* und *Wilfried Sadler* (9) zurück um  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ . Um die Bouillon zu entzuckern, haben wir sie mit gewöhnlicher Bäcker-Hefe geimpft und einige Tage bei 30° bebrütet. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass bei der Zuckervergärung durch die Hefe nur Alkohol und Kohlensäure, aber keine weiteren Stoffwechselprodukte entstehen, deren Anwesenheit bei der weiteren Verwendung der Bouillon als Nährsubstrat schädigend wirken könnte, wie das z. B. der Fall sein dürfte bei einer Entzuckerung der Bouillon mit *Bact. coli*. Nach Abfiltrierung der Hefe und Zusatz der Ingredienzien werden beim anschließenden Sterilisieren im Autoklaven die beiden Gärprodukte der Hefe, Alkohol und Kohlensäure ohne weiteres ausgetrieben. Beim Beimpfen der auf diese Weise entzuckerten Bouillon in einem Reagenzglas mit Durhamröhrchen mit *Bact. coli* tritt oft noch eine allerdings geringe Menge Gas auf. Dieses Gas ist weniger auf allfällig durch die Hefe unvollständig vergorene Kohlehydrate zurückzuführen, als vielmehr auf andere in der Bouillon vorhandene Gas liefernde Verbindungen. Versuche, eine eventuell noch gegenwärtige Spur Zucker chemisch nachzuweisen (mit Fehling'scher Lösung bei vorheriger Fällung der Eiweisse durch Kochen mit Eisessig), zeigten stets negative Resultate.

Die Stämme wurden ab einer 24 Stunden alten Kultur auf gewöhnliche Bouillon mit einer Oese auf die sterilen mit je 1% der verschiedenen Zucker versehenen Röhrchen der Stickstoffquelle überimpft und während 10 Tagen bei 30° bebrütet. Die gebildete Säuremenge wurde durch Titration mit n/10NaOH unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt und in ‰ Milchsäure umgerechnet.

*Ermittlung des Caseinabbauvermögens.* Vorversuche, das Caseinabbauvermögen unserer Stämme makroskopisch auf Milchagar oder Agar nach *Frazier* und *Rupp* (29) zu prüfen, schlugen bei den echten Milchsäurebakterien fehl. Diese beiden Verfahren liessen sich nach unsern Beobachtungen nur für die Eiweiss stark abbauenden unechten Milchsäurebakterien anwenden. Unter diesen Umständen blieb nur die exakte chemische Bestimmung des Eiweissabbauvermögens bei den Streptokokkenstämmen übrig.

Die Caseinspaltung wurde in Anlehnung an die von *A. J. Virtanen* und *E. Lundmark* (82) zu diesem Zwecke benützten Methoden untersucht. Die auf ihr Eiweissabbauvermögen zu prüfenden Stämme wurden in kleine Erlenmeyerkolben mit je 20 ccm steriler Magermilch, welche 6% Kreise enthielt, geimpft und 1 Monat bei 30° bebrütet. In den ersten 14 Tagen ist häufiges, später selteneres Umschütteln der Kolben angezeigt. Um den Grad des Eiweissabbaues in Milch festzustellen, wurde nach der einmonatigen Bebrütung in einer unbeimpften Kontrollmilch und in den Kulturen der einzelnen Stämme je der lösliche Stickstoff und der Aminostickstoff bestimmt und der Zuwachs dieser beiden Stickstoffarten in % des Gesamtstickstoffs der Kontrollmilch ausgedrückt. Nach Zusatz von etwas Essigsäure (bei einigen Proben wurde Trichloressigsäure zugesetzt) wurde das unlösliche Eiweiss unter Kochen ausgefällt und hierauf in der einen Hälfte des Filtrates der Aminostickstoff nach *van Slyke* (75) ermittelt. Die Methode beruht auf der für die aliphatischen Aminosäuren charakteristischen Reaktion mit salpetriger Säure:



Bei der Bestimmung des Aminostickstoffs wird eine 30%ige Natriumnitritlösung verwendet, aus welcher mit Hilfe von Eisessig salpetrige Säure freigemacht wird. Die dem freien Stickstoff noch beigemengten Stickoxyde werden in alkalischer Permanganatlösung (50 g  $\text{KMnO}_4$  + 25 g KOH pro L) absorbiert. Der zurückbleibende reine Stickstoff wird

hierauf volumetrisch bestimmt. Nach van Slyke reagieren alle Aminosäuren mit ihrem ganzen Stickstoffgehalt, ausgenommen solche, die ausser der Aminogruppe auch zyklisch gebundenen Stickstoff enthalten, wie Tryptophan, Histidin, Arginin, etc., welche nur mit  $\frac{1}{2}$ , bzw.  $\frac{1}{3}$  und  $\frac{1}{4}$  ihres gesamten Stickstoffgehaltes reagieren. Nach *Chr. Barthel* und *E. Sandberg* (6) ist daher bei den Zersetzungsprodukten des Caseins der nach von Slyke erhaltene Wert mit 1,66 zu multiplizieren, um den richtigen Stickstoffgehalt der fraglichen Aminosäuren zu erhalten. Die in unsern Untersuchungen enthaltenen Werte für Aminostickstoff wurden nicht mit dem Faktor 1,66 multipliziert.

Die Bestimmung des wasserlöslichen Stickstoffes wurde in der andern Hälfte des Filtrates nach *Kjeldahl* (45) vorgenommen.

*Bestimmung der Milchsäure.* Zur Bestimmung der Milchsäurebakterien nach *Orla-Jensen* gehört auch die Feststellung des Drehvermögens der von ihnen gebildeten Milchsäure. Wir haben die Bestimmung der optischen Aktivität der gebildeten Milchsäure indessen nicht bei allen von uns untersuchten Stämmen vorgenommen, sondern einerseits nur bei den Hauptvertretern der einzelnen Species und andererseits bei den atypischen Stämmen, bei welchen wir hinsichtlich ihrer Artzugehörigkeit im Ungewissen waren.

Die Kulturen wurden in Milch mit 5 % Kreidezusatz in 1 Liter-Kolben angesetzt und wie bei der Prüfung des Eiweissabbauvermögens einen Monat bei 30° bebrütet. Hierauf wurden aus den geronnenen Milchen die ausgeschiedenen Gerinnsel entfernt und die Serumflüssigkeit mit Ammonsulfat gesättigt. Dadurch wurden die noch in Lösung befindlichen Eiweisstoffe gefällt, so dass sie nach 12 Stunden abfiltriert werden konnten. Das Filtrat wurde hierauf im Wasserbade auf 200 ccm eingedampft und daraus die Milchsäure mit Amylalkohol nach der Methode von *Ohlsson* (64) extrahiert. Die zu extrahierende Flüssigkeit wird mit etwas Schwefelsäure versetzt und im Scheidetrichter mit der doppelten Menge Amylalkohol durchgeschüttelt. Hernach wird die Flüssigkeit abgelassen und der Amylalkohol mit der darin gelösten Milchsäure in einen andern Scheidetrichter übergeführt und hier in Abänderung der Methode *Ohlsson* mit einer Aufschwemmung von Zinkkarbonat statt Natriumkarbonatlösung in Wasser durchgeschüttelt, so dass wir gleich von Anfang an das Zinksalz haben. Der Amylalkohol wird nun wieder in den ersten Scheidetrichter zurückgebracht und wiederum mit der milchsäurehaltigen Flüssigkeit geschüttelt usw. Nach 5 Extraktionen wird das überschüssige  $ZnCO_3$  aus der wässrigen Aufschwemmung, die nun das Zinklaktat gelöst enthält, abfiltriert. Das Zinklaktat lässt man hierauf im 30° Thermostaten auskristallisieren und wäscht die Kristalle mit wenig Wasser aus und lässt nötigenfalls nochmals umkristallisieren bis alle Verunreinigungen entfernt sind. Zur Identifizierung des Zinklaktates wurde vorerst die Kristallwasserbestimmung vorgenommen. Mit dieser Bestimmung kann festgestellt werden, ob es sich um optisch aktive oder inaktive Milchsäure handelt, indem die aktive Milchsäure 2 Moleküle Kristallwasser enthält, entsprechend einem Kristallwassergehalte von 12,89 %, die inaktive Milchsäure dagegen 3 Moleküle Kristallwasser, entsprechend 18,8 % Kristallwasser. Der Drehsinn der optisch aktiven Zinklaktatproben wurde im Polarimeter bestimmt.

### 3. Die Streptokokken.

#### a. Isolierung und Reinzüchtung der Stämme.

Um die im Kot vorhandenen Streptokokken möglichst vollständig zu erfassen, wurden Kotproben verschiedener Provenienz zu verschiedenen Zeiten sowohl bei der Heu- und Silo- wie bei der Grasfütterung, entnommen und auf ihre Streptokokkenflora untersucht. Die untenstehende Tabelle gibt Aufschluss über die Herkunft der Stämme.

Datum	Anzahl	Fütterungsart	Ort
September bis November 1932. . .	23	Grasfütterung, z. T. Weidegang	Liebefeld, Köniz
	4	Weidegang	Wald-Dünkel
	7	Klee grasfütterung	Schafisheim
	8	Grasfütterung	Uetligen
	16	Heufütterung	Liebefeld u. Umgebung
	11	Heufütterung	Wäldau, Rothaus, Worb, Zolliköfen
	6	Heufütterung	Wald-Dünkel
	5	Silofütterung	Liebefeld
März 1933 . . . . .	10	Rübenschnitzel	Bargen, Kallnach, Kerzers
Juni 1933 . . . . .	10	Grasfütterung	Liebefeld u. Umgebung

Mittelst der aeroben und anaeroben Reagenzglas-Ausstriche nach *R. Burri* (12a) auf gewöhnlichem Agar und Peptonschottenagar konnten die vorherrschenden Arten direkt isoliert werden. Auf ähnliche Weise konnte dies auch mit den Gelatine- und Agarplattenkulturen geschehen. Die erwähnten Kulturmethoden wurden z. T. bei Zimmertemperatur, bei 30° und 38° vorgenommen. Weiter wurden Kötverdünnungsreihen auf Milch und Peptonschotte zu verschiedenen Temperaturen gestellt. Um Arten, welche mehr saure oder mehr neutrale bis alkalische Reaktion bevorzugen oder noch aushalten, anreichern und dann isolieren zu können, wurden Schottennährböden mit verschiedenen pH hergestellt. Klargeschiedene Schotte (enteiweinste Käseemilch) mit 1 % Peptonzusatz wurde mit verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge auf die pH 3,5; 4,0; 5,0; 6,0 und 7,8 eingestellt. Kötverdünnungsreihen auf diesen Nährflüssigkeiten wurden bei verschiedenen Temperaturen bebrütet. Es wurden auch Kotproben auf Milch, der, um den Milchsäurebakterien einen Vorsprung zu verschaffen, 1‰ Milchsäure zugegeben worden war, überimpft. Einige Emulsionen von Kotproben in Milch wurden 30 Minuten auf 55° und 60° erhitzt, um hieraus speziell thermoresistente Arten zu isolieren. Wenn die Stämme nach 2 Passagen über Platten oder hohe Schichtkulturen mikroskopisch und kulturell das Aussehen von Reinkulturen aufwiesen, wurden sie als rein betrachtet. Die Stämme 6,8 und 34 u. a. sahen nach diesen Passagen jedoch noch typisch polymorph aus. Neben vorherrschend grossen Kolonien trat immer eine beträchtliche Zahl kleiner auf, ohne dass auch ausgesprochene „Uebergangsformen“, also mittlere Kolonien, vorhanden gewesen wären. Wurde ab einer kleinen und einer grossen Kolonie abgeimpft und weitergezüchtet, so spalteten jeweils beide bei der Weiterzüchtung wiederum in grosse und kleine Kolonien auf. Um hierüber Klarheit zu erhalten, ob es sich dabei um zwei verschiedene, schwer von einander trennbare Arten, oder um eine einzige mit polymorphen Eigenschaften handle, wurden Einzelkulturen hergestellt nach dem im methodischen Teil erwähnten Verfahren von *R. Burri*.

Es zeigte sich, dass bei der Weiterzüchtung der aus Einzelkulturen hervorgegangenen Stämme 6, 8 und 34 besonders auf Ausstrich- und Plattenkulturen wiederum typischer *Polymorphismus* auftrat. Es wurde hiedurch auf einwandfreie Art nachgewiesen, dass der schon früher von verschiedenen Autoren beobachtete *Polymorphismus* bei Fäkalstreptokokken tatsächlich ein solcher sein kann.

*b. Bestimmung der Stämme nach ihrem Verhalten gegenüber den Kohlenhydraten, nach der optischen Aktivität der gebildeten Milchsäure und dem Eiweissabbauvermögen.*

Das Vergärvermögen, die Art der gebildeten Milchsäure und das Eiweissabbauvermögen sind die drei Eigenschaften, welche bei der Einordnung der Stämme in das Orla-Jensensche System in erster Linie berücksichtigt werden

müssen. Daneben sind selbstredend namentlich für die Abgrenzung verwandter Arten die weitem im folgenden Abschnitt angeführten Eigenschaften mitzubehrsichtigen. Es wurden insgesamt 85 nach den oben beschriebenen Methoden aus Kot isolierte Stämme, die nach den Vorprüfungen (Katalase-negativ, keine Nitratreduktion), als zu den Gattungen Strepto- bzw. Betakokkus gehörig befunden wurden, in ihrem Verhalten gegenüber 18 Kohlenhydraten, bzw. mehrwertigen Alkoholen und Glucosiden geprüft. Anhand der erhaltenen Resultate war bereits eine provisorische Einteilung der Stämme möglich. Die Bestimmung der Art der gebildeten Milchsäure und die Prüfung des Eiweissabbauvermögens wurde nur bei einer beschränkten Anzahl von Stämmen vorgenommen. Es wurden hiefür vor allem solche Stämme ausgewählt, deren Einteilung nach dem Vergärungsbild nicht gut oder überhaupt nicht möglich war. Daneben wurden den genannten Prüfungen auch einige typische Vertreter der einzelnen Species unterzogen. Die Resultate der Hauptuntersuchungen sind in Tabelle I zusammengestellt. Wir bemerken, dass 26 *Sc. bovis*- und 4 *Sc. faecium*-Stämme, die im Gärbild und in den übrigen Eigenschaften je mit dem Grundtyp ihrer Species sehr gut übereinstimmten, in den Tabellen I und III nicht aufgeführt wurden.

Zahlenmässig verteilen sich 70 eingehend untersuchte Streptokokkenstämme auf die gefundenen Arten wie folgt:

<i>Sc. bovis</i> . . . . .	43 Stämme
<i>Sc. faecium</i> . . . . .	17 „
<i>Sc. inulinaceus</i> . . . . .	6 „
<i>Sc. lactis</i> . . . . .	3 „
<i>Sc. glycerinaceus</i> . . . . .	1 Stamm.

*Sc. bovis*. Wir fanden diesen Organismus in allen untersuchten Kuhkotproben als weitaus vorherrschendsten Streptokokkus vor. Im allgemeinen schwankte sein Gehalt zwischen 10 000 und 1 000 000 Organismen im Gramm Kot. Titer von 10 Millionen waren jedoch nicht selten und in einigen Fällen stiegen sie sogar auf 100 Millionen an. Die Feststellung des Vorherrschens von *Sc. bovis* im Kuhkot stimmt mit den Befunden von Orla-Jensen, K. J. Demeter u. a. überein. Wie der Name sagt, ist es der für das Rind spezifische Fäkalstreptokokkus. In morphologischer Hinsicht ist der *Sc. bovis* nicht sehr charakteristisch. Er wächst immer in Ketten, die 4—7—12 und mehr Glieder aufweisen, oft aber sehr ungleichmässig aussehen, indem schon in 24stündigen Kulturen Involutionsformen häufig auftreten. Daneben kommen stets auch Einzel- und Diploformen vor. Auf gewöhnlichem Fleischwasserpeptonagar wächst er aerob in grossen, im Durchmesser bis 1 mm aufweisenden irisierenden Kolonien, kommt dagegen etwas weniger gut auf Peptonschottenagar. Auf gewöhnlichem Schrägagar unter dem anaeroben Verschluss werden die Kolonien noch etwas üppiger. *Sc. bovis* wächst in Bouillon und Peptonschotte gut, dagegen schlecht in gewöhnlicher Schotte.

In der Vergärung der Kohlehydrate verhielten sich speziell die *Sc. bovis*-Stämme sehr charakteristisch und stimmten gut mit dem von Orla-Jensen umschriebenen Gärtyp für diese Art überein. Das für *Sc. bovis* typische Gärbild ist in Tabelle II dargestellt. Für *Sc. bovis* ist insbesondere die regelmässige Vergärung der Arabinose, die stetige Hydrolyse der Stärke und das Unvermögen, Mannit zu vergären, kennzeichnend. Die *Sc. bovis*-Stämme zeigten in der Vergärung, verglichen mit den Stämmen anderer Species, die kleinste Variationsbreite. Sie konnten deshalb schon auf Grund ihres Gärbildes mit grosser Sicherheit als zu dieser Art gehörig angesprochen werden.

Table I.

Das Vergärungsvermögen von Kohlehydraten der aus Kuhkot isolierten Streptokokken.

Stamm	Glycerin	Xylose	Arabi- nose	Rham- nose	Sorbit	Mannit	Laeu- lose	Dextrose	Mannose	Galac- tose	Saccha- rose	Maltose	Lactose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Salzin	Art der Milch- säure	Eiweißabbau in %		Species		
																				lösli.-N	Amide-N			
1	—	—	3,6	2,2	—	4,5	4,5	5,6	5,6	4,5	5,2	6,3	4,5	4,7	—	1,1	—	—	4,5	d	2,0	1,48	Sc. faec.	
2	—	—	3,6	3,4	—	4,7	4,7	5,6	5,6	4,5	5,4	5,2	4,5	4,3	—	1,3	—	—	4,7	—	—	—	—	faec.
3	—	—	1,3	—	—	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,2	2,9	2,2	2,9	—	2,2	—	2,0	0,9	—	—	—	—	bovis
4	—	—	3,4	—	—	5,2	5,2	3,6	3,6	3,4	4,2	6,1	4,5	5,4	—	3,5	—	2,2	5,2	—	—	—	—	inulin.
5	—	—	—	—	—	3,4	3,4	2,5	2,5	2,2	3,4	3,1	2,2	1,1	—	4,1	—	2,7	1,8	—	—	—	—	inulin.
6	—	—	1,8	—	—	2,9	2,9	4,0	4,0	2,7	3,4	3,1	2,2	2,2	—	3,4	—	2,0	4,8	—	—	—	—	bovis
7	—	—	2,2	—	—	5,0	5,0	5,4	5,4	4,3	5,4	6,1	4,3	5,2	—	4,3	—	3,8	5,0	—	—	—	—	bovis
8	—	—	3,6	—	—	2,9	2,9	4,5	4,5	3,6	4,7	4,7	3,6	1,1	—	3,4	—	3,8	4,0	—	—	—	—	inulin.
10	—	—	—	—	—	5,6	5,6	5,0	5,0	5,0	4,3	5,4	5,2	4,0	—	4,5	—	3,4	5,88	—	—	—	—	inulin.
11	—	—	1,1	1,3	—	3,4	3,4	2,2	2,2	1,8	2,9	2,7	1,8	4,0	—	1,1	—	3,4	4,0	—	—	—	—	inulin.
12	—	—	—	—	—	3,4	3,4	2,2	2,2	1,8	2,9	2,7	1,8	4,0	—	1,1	—	3,4	4,0	—	—	—	—	faec.
13	—	—	—	—	—	3,4	3,4	2,2	2,2	1,8	2,9	2,7	1,8	4,0	—	1,1	—	3,4	4,0	—	—	—	—	inulin.
14	—	—	—	—	—	3,4	3,4	2,2	2,2	1,8	2,9	2,7	1,8	4,0	—	1,1	—	3,4	4,0	—	—	—	—	inulin.
16	—	—	3,4	—	—	4,7	4,7	5,6	5,6	4,3	4,0	5,4	4,4	4,3	—	1,6	—	2,9	3,6	—	—	—	—	bovis
19	—	—	0,9	—	—	5,0	5,0	4,7	4,7	4,5	3,1	4,0	3,1	3,6	—	2,5	—	2,2	4,0	—	—	—	—	bovis
22	—	—	—	—	—	6,3	4,7	4,0	4,0	2,9	3,8	3,8	3,6	4,3	—	2,5	—	2,2	3,4	—	—	—	—	faec.
25	—	—	—	—	—	4,3	1,1	2,2	2,2	2,2	2,2	2,5	1,3	3,6	—	2,7	—	2,9	3,4	—	—	—	—	bovis
29	—	—	—	—	—	2,5	2,5	4,7	4,7	2,2	3,1	2,2	2,5	4,0	—	2,0	—	2,2	2,9	—	—	—	—	bovis
30	—	—	—	—	—	2,9	2,9	3,1	3,1	2,2	3,1	2,2	2,5	4,0	—	3,4	—	2,2	2,9	—	—	—	—	faec.
32	—	—	2,2	—	—	3,8	2,2	3,8	3,8	2,2	3,4	3,6	3,4	4,0	—	1,1	—	1,1	2,9	—	—	—	—	bovis
34	—	—	—	—	—	3,4	3,0	2,9	2,9	3,1	2,2	4,0	2,7	2,7	—	2,9	—	1,8	2,9	—	—	—	—	bovis
35	—	—	—	—	—	4,5	4,5	5,2	5,2	3,8	—	2,5	3,8	3,1	—	3,8	—	—	2,7	—	—	—	—	lactis
38	—	—	—	—	—	1,3	2,0	3,8	3,8	2,0	2,7	2,5	1,4	3,1	—	—	—	—	0,9	—	—	—	—	faec.
39	—	—	0,9	—	—	2,0	1,6	3,4	3,4	1,6	2,5	2,2	1,4	—	—	—	—	—	0,9	—	—	—	—	faec.
40	—	0,9	—	—	—	1,8	3,4	3,4	3,8	1,6	2,5	2,2	1,4	—	—	—	—	—	0,9	—	—	—	—	faec.
41	—	—	1,3	—	—	4,1	5,2	6,1	5,0	5,2	0,4	4,7	5,6	2,0	—	2,2	—	3,4	2,7	—	—	—	—	bovis
42	—	—	1,6	—	—	3,6	3,1	2,7	3,1	2,2	2,5	2,9	2,5	2,9	—	3,8	—	2,2	2,7	—	—	—	—	bovis
43	—	—	1,6	—	—	3,4	3,1	2,7	3,1	2,2	2,0	2,9	2,5	2,9	—	3,4	—	2,2	2,9	—	—	—	—	bovis
44	—	—	2,0	—	—	3,1	2,7	3,1	2,9	2,2	2,0	3,1	2,2	2,9	—	7,6	—	2,0	3,4	—	d	—	—	bovis
45	—	—	—	—	—	5,0	4,8	5,0	5,0	3,6	5,2	3,4	4,0	4,0	—	2,5	—	1,8	3,4	—	—	—	—	faec.
46	—	—	—	—	—	3,4	4,0	4,0	4,0	3,4	3,6	3,6	3,6	2,9	—	4,0	—	1,8	1,8	—	—	—	—	bovis
47	—	—	—	—	—	4,5	4,5	4,0	4,0	2,2	—	3,6	1,4	—	—	1,1	—	1,8	2,2	—	d	—	—	lactis
48	—	—	—	—	—	1,8	3,8	4,7	5,0	3,8	—	3,8	4,0	—	—	0,7	—	—	2,2	—	—	—	—	lactis
49	—	—	—	—	—	1,1	3,8	4,7	5,0	1,8	4,5	3,6	2,2	3,1	—	4,0	—	1,6	3,4	—	—	—	—	faec.
51	1,6	—	—	—	—	0,9	2,9	3,4	3,4	1,8	2,5	2,9	2,5	3,1	—	2,2	—	1,6	2,9	—	—	—	—	bovis
52	—	—	2,7	—	—	3,6	3,4	2,9	2,9	2,7	3,6	3,2	2,9	—	—	2,0	—	1,3	2,7	—	—	—	—	faec.
55	—	3,8	2,0	—	—	5,6	5,2	4,8	4,8	4,8	5,0	4,0	5,6	—	—	3,1	—	—	0,9	—	—	—	—	glyc.
60	2,6	—	2,2	—	—	2,5	1,6	0,7	0,7	2,9	2,5	3,4	2,5	2,7	—	2,0	—	1,3	2,2	—	—	—	—	bovis
64	—	—	1,8	—	—	4,0	3,8	3,4	3,4	3,8	2,7	3,6	2,0	2,7	—	1,8	—	2,5	3,1	—	—	—	—	bovis
67	—	—	1,1	—	—	4,5	4,5	4,0	4,0	4,5	5,0	4,5	2,5	3,6	—	5,2	—	3,1	4,0	—	d	—	—	bovis
70	—	—	5,0	—	—	4,8	4,0	5,0	5,0	4,0	4,5	4,5	4,0	3,8	—	3,4	—	1,3	4,8	—	—	—	—	faec.

Tabelle II.

Charakteristische Kohlehydratvergärbilder der wichtigsten Streptokokken aus Kuhkot.

	Glycerin	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Sorbit	Mannit	Laevulose	Dextrose	Mannose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Salizin	Eiweiss- abbau
<b>I. Lactis-Gruppe:</b>																			
1. <i>Sc. lactis</i> . . .	—	—	±	—	—	±	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+
2. <i>Sc. faecium</i> . . .	—	—	±	±	±	±	+	+	+	+	±	+	+	±	—	+	—	+	±
3. <i>Sc. glycerinaceus</i>	+	—	+	—	—	±	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	—	+	—
<i>Sc. lactis</i> nach Orla-Jensen . . .	±	±	±	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	+	—
<i>Sc. lactis</i> nach J.M.Sherman . . .	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	±	+	+	—	—	—	—	+	—
<b>II. Bovis-Gruppe:</b>																			
1. <i>Sc. bovis</i> . . .	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>Sc. inulinaceus</i> . . .	—	+	±	—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
<i>Sc. bovis</i> nach Orla-Jensen . . .	—	—	±	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sc. bovis</i> nach J.M.Sherman . . .	—	—	+	—	—	±	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+

Hinsichtlich Wachstum in Milch bei 30° zeigten sich Unterschiede bei den einzelnen Stämmen. Während ein Teil derselben Milch in 1 bis 2 Tagen dick legte, wobei bis 1 % Milchsäure gebildet wurde, konnte beim andern Teil wohl innert kurzer Zeit (1 Tag) kräftiges Wachstum festgestellt werden, wogegen die Milch nur langsam gesäuert wurde. — Würde man unsere *Sc. bovis*-Stämme in die von B. W. Hammer und M. P. Baker (35) mehr nach praktischen Gesichtspunkten orientierte Klassifikation der *Streptococcus lactis*-Gruppe einordnen, so kämen unsere Milch relativ rasch koagulierenden Stämme in der Hauptsache zur Hammerschen Species: „typical *S. lactis*“, während die übrigen grösstenteils als „*S. lactis* var. *tardus*“ angesprochen werden müssten.

Es sei darauf hingewiesen, dass das verhältnismässig starke Caseinabbauvermögen, welches dem *Sc. bovis* eigen ist (siehe Tabelle I), namentlich den in Milch rasch wachsenden Stämmen eine beachtenswerte Bedeutung zukommen lässt.

*Sc. faecium*. Im Gegensatz zu den Befunden von A. Voss (83) stellten wir diesen Organismus im Kuhkot weniger oft fest. Unter 30 auf *Sc. faecium* untersuchten Kuhkotproben fanden wir ihn in 17 vor, dagegen stellten wir ihn in Kälberkot stets fest und sogar öfters in ausserordentlich grosser Menge. *Sc. faecium*, von einigen Autoren auch *Sc. faecalis* genannt, ist der typische Vertreter der in der Literatur unter dem Namen „Enterokokken“ (Thiercelin, Dible) bekannten Darmstreptokokken. Neben der Hitzeresistenz wird insbesondere die Mannitvergärung als Charakteristikum für die beim Menschen und vielen Säugetieren vorherrschenden Darmstreptokokken angesehen. Wie wir aber bereits gesehen haben, hält nicht ein Mannitvergärer die Vorherrschaft im Darm des Rindes inne. Es sei hier noch speziell daraufhingewiesen, dass der *Sc. bovis*, welchem die Fähigkeit Mannit zu vergären ganz fehlt, nicht zu den von Dible (l. c.) umschriebenen Enterokokken gehört. In morphologischer

Beziehung unterscheidet sich *Sc. faecium* von *Sc. bovis* dadurch, dass er vorwiegend in Diplokokken, sog. Güntheriformen, wächst. In flüssigen Kulturen treten zuweilen auch längere Ketten auf mit gepaarten Gliedern. In selteneren Fällen erscheinen die Glieder in den Ketten quergestellt, d. h. sie sind breiter als lang. Auch weist der *Sc. faecium* ein aeroberes Oberflächenwachstum auf, in dem die milchig weissen Kolonien bis gegen 2 mm Durchmesser erreichen können und dadurch ein Mikrokokken ähnliches Aussehen erlangen.

Im Gegensatz zu *Sc. bovis* vergärt *Sc. faecium* die mehrwertigen Alkohole: Mannit und z. T. Sorbit. Die Vergärung der Saccharose ist schwankend, diejenige des Inulins und der Stärke unterbleibt ganz. Wie dagegen aus der Vergärungstabelle hervorgeht, bestehen zwischen den Gärbildern von *Sc. faecium* und *Sc. lactis* nur unwesentliche Unterschiede. *Sc. faecium* koaguliert Milch innert 24 Stunden. Nach Orla-Jensen sollte er Casein nicht abbauen. Bei unsern Stämmen kam hie und da ein Eiweissabbau, der allerdings schwächer war als beim *Sc. bovis*, vor. Indessen weist Orla Jensen (l. c. p. 36) selbst darauf hin, dass die Bakterien befähigt sind, sich an neue Stickstoffquellen anzupassen und dass aus diesem Grunde grosse Vorsicht geboten ist in der Bewertung des Eiweissabbauvermögens als Specieseigenschaft.

Aus der vorstehenden Beschreibung ist ersichtlich, dass *Sc. faecium* und *Sc. lactis* mehr gleiche als ungleiche Eigenschaften aufweisen und wir möchten an dieser Stelle nicht unterlassen, auf die Studien von K. J. Demeter (19) über den *Sc. lactis* und seine Beziehungen zu den Fäkalstreptokokken hinzuweisen, bei welchen er zum Schlusse kommt, dass sich eine prinzipielle Trennung zwischen diesen Organismen nicht durchführen lässt. Würden wir auch die *Sc. faecium*-Stämme einer Bestimmung nach Hammer unterziehen, so kämen sie wohl mit wenigen Ausnahmen — einige Stämme, die in Milch einen Malz ähnlichen Geruch und Geschmack hervorbringen (vergl. unten) — zu seinen Species „typical *S. lactis*“ bzw. „*S. lactis* var. *maltigenes*“.

*Sc. inulinaceus* ist dem *Sc. bovis* sehr nahe verwandt. Er unterscheidet sich von diesem nur durch das fehlende Eiweissabbauvermögen und ein mitunter ausgeprägteres Inulinvergärvermögen. Weitere biochemische noch morphologisch-kulturelle Unterschiede konnten wir zwischen diesen Organismen nicht feststellen. Zahlenmässig tritt *Sc. inulinaceus* in der Kotflora zurück, dagegen soll er nach Ayers und Sherman im Maul der Kühe zahlreich vorkommen.

*Sc. lactis*. Drei aus Kot isolierte Streptokokken mussten wir als zu dieser Species gehörig rechnen. Es waren dies *Sc. faecium*-artige Stämme, wovon zweien das Caseinabbauvermögen und einem das Aesculinspaltungsvermögen fehlte. Dieser letzte Stamm (Nr. 45) wurde seinerzeit aus am Tier angetrocknetem Kot isoliert, so dass er möglicherweise ursprünglich nicht aus Kot stammt. Aus unsern Befunden erhellt, dass der *Sc. lactis* Orla-Jensen im allgemeinen nur zufällig im Kuhkot vorkommt.

*Sc. glycerinaceus*. Einen unserer *Sc. faecium* ähnlichen Stämme haben wir mit Rücksicht auf seine ansehnliche Glycerinvergärung als *Sc. glycerinaceus* angesprochen. Das spärliche Vorkommen oder gar Fehlen des *Sc. glycerinaceus* im Kuhkot ist insofern interessant, als er in einem bestimmten Reifestadium des Käses, nach der Milchzuckervergärung bei allfälliger Fettspaltung eine gewisse Rolle spielt. Da nicht anzunehmen ist, dass dieser Organismus weder mit der Milch noch mit dem Lab in den Käse gelangt, liegt die Vermutung, dass er nur eine Anpassungsform des *Sc. lactis* oder *faecium* sei, nahe.



c. Ergänzende Untersuchungen zur Charakterisierung der aus Kuhkot isolierten Streptokokken.

Bestimmung der Optimaltemperatur. Von 24stündigen Bouillonkulturen ausgehend, wurden die Streptokokkenstämme auf Milch und diejenigen, welche diese nicht koagulierten, auf gewöhnliche Bouillon überimpft und zu 20, 30, 37 und 45° C. gestellt. Wir geben die gefundenen Optimaltemperaturen in Tabelle III wieder. Mit wenigen Ausnahmen hatten die als *Sc. bovis* bestimmten Stämme ihr Wachstumsoptimum bei 37° C., während *Sc. faecium*, *Sc. lactis* und *Sc. inulinaceus* dasselbe mehrheitlich bei 30° hatten.

Ergänzende Charakterisierung der Kuhkotsreptokokken. Tabelle III.

Stämme	Zum 1. Mal in Milch bei 30° bebrütet		Bromkresolpurpurprobe *)	Lackmusmilchprobe **)	Janusgrünreduktion in Stunden	Hitze-resistenz ***)	Aesculin-spaltungs-vermögen	Temperatur-Opt. Grad C.
	Koagul. in Tag.	Säure-grad						
1	1	35	+	+	—	a b c —	+	30
2	1	34	+	+	—	a b c d	+	30
3	1	28	+	+	—	a b c —	+	37
4	—	22	—	—	—	a — — —	+	30
5	14	25	+	—	—	— — — —	+	30
6	—	18	+	—	—	a — c —	+	37
7	7	25	+	—	—	— — — —	+	37
8	1	28	±	+	—	a — — —	+	30
10	14	30	+	—	—	a — c —	+	30
11	2	26	±	+	—	a — c —	+	37
12	1	27	+	+	—	a b c —	+	30
13	—	20	±	+	—	a — c —	+	37
14	—	20	±	—	—	a — — —	+	30
16	2	40	+	—	—	a — c —	+	37
19	2	28	±	+	—	a — c —	+	37
22	1	29	+	+	—	a — c —	+	30
25	2	30	±	+	—	a b c —	+	37
29	2	28	+	+	—	a b c —	+	30
30	—	18	±	+	—	a b c —	+	37
32	—	18	+	+	—	a b c —	+	37
34	1	36	+	+	—	a b c —	—	30
35	5	30	+	+	—	a b c —	+	30
38	1	35	+	+	—	a — c —	+	30
39	1	38	+	+	24 h	a b c —	+	30
40	1	31	+	+	—	a — c —	+	37
41	2	35	±	+	—	a — c —	+	37
42	1	30	+	+	—	a — c —	+	30
43	1	36	+	+	—	a b c —	+	30
44	1	28	±	+	—	a — c —	+	30
45	1	38	+	+	—	a — — —	—	30
46	1	40	+	+	—	a — — —	+	30
47	1	25	+	+	—	a b c —	+	30
49	2	33	+	+	—	a — c —	+	37
51	5	28	+	+	—	a — c —	+	30
52	1	25	+	+	—	a b c —	+	37
55	9	32	+	+	—	a — — —	+	30
60	—	18	+	—	—	a — c —	+	37
64	1	30	+	+	—	a — c —	+	30
67	—	24	+	+	—	a — — —	+	37
70	1	40	+	+	—	a b c —	+	30

\*) + = koaguliert, gelb.  
 ± = flüssig, gelb.  
 — = flüssig, teegrün.

\*\*) + = typisch.  
 — = negativ.  
 = = unverändert.

\*\*\*) a = 1 h. 53°  
 b = 30' 62°  
 c = 15' 62°  
 d = 10' 80°

*Wachstum der Streptokokkenstämme in Milch.* Es sei vorausgeschickt, dass die Stämme immer auf zuckerfreier gewöhnlicher Bouillon und gewöhnlichem Agar aufbewahrt wurden, um ihre ursprünglichen Eigenschaften möglichst unverändert erhalten zu können. Auf diesen Medien (Fleischwasserpeptonbrühe und -Agar), welche unter den gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden dem natürlichen Nährsubstrat der Stämme wohl am ehesten entsprachen, wuchsen sie ohne Ausnahme sehr üppig. Kulturen auf Milch und Peptonschotte wurden vermieden, um eine Anpassung der Stämme an diese Substrate auszuschalten.

Das Verhalten der Stämme bei ihrer erstmaligen Kultur auf Milch, wobei  $\frac{1}{10}$  ccm einer 24stündigen Bouillonkultur auf 10 ccm sterile Milch überimpft wurde, ist aus Tabelle III ersichtlich. Von 70 Stämmen haben 24 die Milch bei 30° nach 24 Stunden, 11 nach 48 Stunden und weitere 12 nach 3—14 Tagen dick gelegt. Die gemessenen Säuregrade schwanken zwischen 24 und 42° (Soxhlet-Henkel). Die übrigen 23 Stämme koagulierten die Milch nach längerem Zuwarten schliesslich auch. Von ihnen gehören 19 zur Species *Sc. bovis* und 4 zu der dieser nahe verwandten Species *Sc. inulinaceus*. Auch bei den für die Milchkoagulation längere Zeit beanspruchenden Stämmen konnte schon in den 48stündigen Kulturen mikroskopisch starkes Wachstum festgestellt werden.

*Bromkresolpurpurprobe.* Sie wurde nach Clark and Lubs \*) ausgeführt und gestattete uns insbesondere, zwischen schwach säurebildenden Streptokokken und solchen, die Milch gar nicht säuern, zu unterscheiden. Während alle *Sc. lactis*-, *faecium*- und ein Teil der *bovis*- und *inulinaceus*-Stämme die Milch dicklegten und gelblich-weiss färbten, wurde die mit Bromkresolpurpur versetzte Milch von 17 *Sc. bovis*- und 3 *Sc. inulinaceus*-Stämmen nur weisslich-gelb gefärbt, ohne jedoch koaguliert zu werden. Je ein Stamm dieser beiden Species liess die Milch unverändert (teegrün).

*Lackmusmilchprobe.* L. Heim (37) und L. Bitter und L. Buchholz (8) sehen den typischen Ausfall der Lackmusmilchprobe als für *Sc. lactis* charakteristisch an. E. Wirth (87) unterscheidet zwei Unterarten von *Sc. lactis*, je nach dem die Lackmusmilchprobe typisch oder atypisch ausfällt. In einer neuern eingehenden Arbeit von K. J. Demeter (18) wurde der differential-diagnostische Wert (speziell für den *Sc. lactis*) dieser Probe geprüft. Die Probe kann wie folgt ausfallen:

1. *typisch:* Der blaue Lackmusfarbstoff in der Milch wird zuerst reduziert (farblos). Nachher Gerinnung der Milch und anschliessend Reoxydation des Lackmusfarbstoffes von oben nach unten (Rötung).
2. *pseudotypisch:* Rötung der Milch. Gerinnung. Reduktion des roten Lackmusfarbstoffes von unten her nach oben.
3. *negativ:* Nur Rötung der Milch, ohne Gerinnung.

Demeter kommt jedoch zum Schlusse, dass weder der typische noch der pseudotypische Ausfall der Probe für eine Streptokokkenart spezifisch sei, indem Stämme, die anfangs pseudotypischen Ausfall hatten, spontan eine typische Lackmusmilchprobe geben können. „Es haben von 17 menschlichen Fäkalstreptokokken 14, also die Mehrzahl, im Laufe der Kultur ihr anfängliches Unvermögen, Lackmusmilch typisch zum Gerinnen zu bringen, verloren, eine Tatsache, die nicht nur beweist, dass eine nicht typisch ausgefallene Lackmusmilchprobe für die Differenzierung von Streptokokken untereinander nichts besagt, sondern auch darauf-

\*) Herstellung der 0,5%igen Bromkresolpurpurlösung: 0,5 g Dibromoorthosulfonphthalein werden in Mörser mit 14 ccm n/10 NaOH gut gemischt. Mit dest. Wasser auf 100 ccm auffüllen. Pro Liter Magermilch werden 10 ccm dieser Stammlösung zugefügt. (Nach Angaben in der Vorlesung von Prof. Dügge).

hin deutet, dass die echten Milchsäurestreptokokken sicher zu irgend einer Zeit einmal ihre Herkunft aus dem menschlichen Darm gehabt haben“ (S. 245.)

Die mit unsern Streptokokkenstämmen ausgeführten Lackmusmilchproben (es wurden pro Liter Magermilch 10 ccm einer 0,6prozentigen wässrigen Lackmuslösung zugefügt) bestätigen die Ansicht Demeters. 58 von insgesamt 70 Stämmen ergaben eine typische Lackmusmilchprobe, 10 zeigten eine negative und 2 Stämme veränderten die Lackmusmilch gar nicht. Diese beiden Stämme, sowie diejenigen mit negativer Lackmusmilchprobe, gehören den Species *Sc. bovis* (8) und *Sc. inulinaceus* (4) an, während die übrigen 35 *Sc. bovis* und 2 *Sc. inulinaceus* eine typische Lackmusmilchprobe gaben. Es fällt auf, dass kein Stamm einen pseudotypischen Ausfall der Probe aufwies. Das Gesamtergebnis beweist, dass die Lackmusmilchprobe keine differential-diagnostische Verwendbarkeit hat und zeigt mit aller Deutlichkeit, dass ihr positiver Ausfall keinesfalls spezifisch ist für *Sc. lactis* Orla-Jensen.

Hingewiesen sei noch auf das etwas eigentümliche Verhalten einiger Stämme bei diesen auf Milch ausgeführten Proben. So vermochten z. B. die Stämme 5, 7, 8, 10 und 11, welche bei ihrer ersten Ueberimpfung auf Milch, diese koagulierten, entweder bei der Bromkresolpurpur- oder bei der Lackmusmilchprobe Milch nicht wieder zu gerinnen. Es wäre denkbar, dass in diesen Fällen die zugefügten Agenzien einen hemmenden Einfluss ausgeübt haben. Andererseits ist die Feststellung hervorzuheben, dass unter den 70 Streptokokkenstämmen, von denen ursprünglich nur 47 Milch koagulierten, nachdem sie zwischenhinein einige Male auf Milch überimpft wurden, bei der später ausgeführten Lackmusmilchprobe 58 Stämme die Milch dick legten. Folgende Stämme mit negativer Lackmusmilchprobe haben die Milch vorher einmal koaguliert: 5, 6, 7, 10, 15, 16, 59 und 60, so dass nur die 4 Stämme: 4, 9, 14 und 17 die Milch nie zur Gerinnung brachten.

Janusgrünprobe. Die Reduktion von Janusgrün wurde von *Ayers, Johnson* und *Mudge* (l. c.) als Charakteristikum für *Sc. lactis* bezeichnet. *K. J. Demeter* (l. c. p. 220) konnte ebenfalls feststellen, dass, „soweit es sich um aus Milch isolierte Streptokokken handelt, die Janusgrünprobe ein brauchbares differential-diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung des *Str. lactis* ist“. Er weist jedoch darauf hin, dass die Stämme fäkaler Provenienz sich anders verhalten und bemerkt (p. 247), „dass bei sämtlichen aus Kälberfaeces isolierten Stämmen keine positive Janusgrünprobe auftritt“. Anlässlich der Ausführung der Probe, wobei zu den 18—24stündigen Kulturen auf Fleischbouillon (nicht Extrakt, mit 1 % Casein-Pepton, 0,5 % Dextrose, pH = 7,5) 0,05  $\frac{0}{100}$  Janusgrün in wässriger Lösung zugegeben wurde, zeigte ein einziger Stamm (39, *Sc. faecium*) positiven Ausfall, während die *Sc. lactis* Janusgrün nicht reduzierten, wohl aber die Tetrakokken, auf welche wir weiter unten zurückkommen werden.

*Vermögen der Aesculinspaltung.* *F. C. Harrison* und *J. van der Leek* (36) haben das Aesculinspaltungsvermögen der Fäkalflora zuerst entdeckt und eine Methode zur Bestimmung des Coli-aerogenes-Titers fäkaler Herkunft in Wasser und Milch ausgearbeitet. In Anlehnung an ihre Studien haben später *A. Roचाix* (67) und *K. Meyer* und *H. Schönfeld* (54) die Aesculinspaltung als obligates Merkmal der Enterokokken angesehen. Der dabei verwendete Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

1—2 % Casein-Pepton,  
0,5 % Natriumtaurocholat,  
0,1 % Aesculin,  
0,05 % Ferricitrat,  
Leitungswasser.

Im positiven Falle färbt sich der Nährboden gewöhnlich schon nach 24 Stunden tief schwarz. Die Schwarzfärbung entsteht nach Harrison und van der Leek wie folgt. Sind im Aesculinnährboden Fäkalorganismen wie Coli und Streptokokken gewachsen, so wird das Aesculin zu Aesculetin hydrolysiert. Das Aesculetin gibt dann mit Ferricitrat eine Schwarzfärbung.

Der Prüfung auf das Aesculinspaltungsvermögen wurden sämtliche 100 aus Kuhkot isolierten Stämme unterzogen. Dabei ergab sich, dass mit Ausnahme von zwei *Sc. lactis*-Stämmen (Nr. 34 und 45) alle übrigen 98 Stämme den Aesculinnährboden innert 24 Stunden schwärzten. Während Stamm 45 (aus angetrocknetem Kot isoliert) den Aesculinnährboden überhaupt nicht veränderte, hat ihn Stamm 34 (aus frischem Kot isoliert) nur gebräunt, ohne ihn auch nach längerer Bebrütung tief schwarz zu färben, wie dies sonst bei allen übrigen Stämmen spätestens nach 24 Stunden der Fall war.

Aus den Untersuchungen ergibt sich, dass das Aesculinspaltungsvermögen ein sehr ausgeprägtes Merkmal für Kuhkotstreptokokken ist. Diese Feststellung veranlasste uns, zu prüfen, ob das Aesculinspaltungsvermögen eine immerwährende Eigenschaft der Fäkalstreptokokken sei, oder ob es während der Weiterzüchtung der Streptokokken z. B. auf Milch verhältnismässig bald verloren gehe. Zu diesem Zwecke haben wir 4 *Sc. faecium*, 6 *Sc. bovis* und 2 *Sc. inulinaceus*-Stämme während einigen Monaten täglich auf Milch weitergeimpft, unbekümmert darum, ob die Milch jeweilen schon koaguliert war oder noch nicht. Wir achteten darauf, möglichst kleine Mengen zu überimpfen. Die Stämme wurden von Zeit zu Zeit auf Aesculinspaltungsvermögen und auf Reinheit geprüft. Die 12 Stämme verhielten sich während des Versuches wie folgt: Nach der 60. Ueberimpfung (Generation) auf Milch verursachte ein *Sc. bovis*-Stamm nach 24stündiger Bebrütung in Aesculinbouillon bloss Braunfärbung, die jedoch nach weiteren 24 Stunden Bebrütung in Schwarzfärbung umschlug. Dieses Verhalten des *Sc. bovis*-Stammes hielt an bis in die 72. „Generation“, während der Stamm nach der 76. Ueberimpfung auf Milch, in Aesculinbouillon gebraucht, diese nicht mehr zu verändern mochte (auch keine Braunfärbung mehr). Die übrigen 11 Kotstreptokokkenstämme schwärzten nach 100 Passagen auf steriler Milch den Aesculinnährboden stets noch. Wohl war bei allen 11 Stämmen in der Intensität der Schwärzung insofern eine Schwächung zu konstatieren, als die bewachsene Aesculinbouillon im durchfallenden Licht eine rötlich-braune Färbung aufwies, wogegen frisch isolierte Kotstreptokokken den Aesculinnährboden innert 24 Stunden immer ganz tief schwarz (undurchsichtig) färben.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Kotstreptokokken ihre Eigenschaft, das Aesculinspaltungsvermögen, nicht leicht verlieren.

*Hitzeresistenz.* Wie aus der angeführten Literatur hervorging, sahen die meisten Autoren die Hitzeresistenz als eine typische Eigenschaft der Fäkalstreptokokken an. Unsere Untersuchungen bestätigen diese Ansicht. Da die Ergebnisse bei der Prüfung auf Hitzeresistenz stark von der dabei angewandten Methode abhängen, und man sich auf keine allgemein gültige Methode geeinigt hat, hält es schwer, vergleichbare Resultate zu erhalten. Bei unsern Prüfungen gingen wir wie folgt vor: 0,1 ccm einer gut gewachsenen 24stündigen gew. Bouillonkultur wurde wieder auf 10 ccm gew. Bouillon vom pH = 6,9 bis 7,0 überimpft. Der obere Teil der Glasröhrchen wurde gut abflambiert. Hierauf wurden sie mit einem mit Thermometer versehenen Röhrchen in ein auf gewünschte Temperatur erhitztes Wasserbad (welches tief genug war) gestellt. Nachdem im Kontrollgläschen die gewünschte Temperatur erreicht war, wurden die Kulturen noch die vorgesehene Zeit bei dieser Temperatur belassen, dann abgekühlt und hierauf bei 30° bebrütet.

Vom käseertechnischen Standpunkt aus schien es vorerst interessant zu wissen, wieviel der durch Kotinfektionen in die Milch gelangenden Streptokokken die Brenntemperatur der Käsemasse im Kessi zu überstehen vermögen. Es zeigte sich, dass nur 2 Stämme (5 und 7) die Temperatur von 55°C während einer Stunde nicht aushielten.

Insgesamt 70 auf Hitzeresistenz geprüfte Stämme verhielten sich wie folgt:

Erhitzungsdauer und Temperatur	Resistente Stämme in %
60 Minuten auf 55° C	97,21
15 „ „ 62° C	72,8
30 „ „ 62° C	35,7
10 „ „ 80° C	2,8

100 % der *Sc. faecium*- und 72,5 % der *Sc. bovis*-Stämme hielten während 15 Minuten 62° aus und 70,5 % bzw. 32,5 % ertrugen diese Temperatur während einer halben Stunde. Die Thermoresistenz kann demnach als charakteristische Eigenschaft der Fäkalstreptokokken bezeichnet werden. Die Empfindlichkeit der angewandten Bestimmungsmethode steht ausser Frage. Die Möglichkeit, dass unter praktischen Verhältnissen wie beim Pasteurisieren von Milch oder Rahm und beim Erwärmen der Käsemasse im Kessi die thermoresistenten Streptokokken fäkalen Herkunft bei diesen Prozessen wenig dezimiert werden, ist offensichtlich. Von diesem Gesichtspunkt aus ist dem Einfluss der Fäkalstreptokokkenflora in den betreffenden Molkereigewerben die gebührende Aufmerksamkeit zu schenken.

*Aromabildung.* Anlässlich der ersten Kulturen unserer Kotstreptokokken in Milch haben wir die Stämme auf allfällig von ihnen gebildete Geruchs- und Geschmacksstoffe geprüft. Die Milchkulturen wurden bei 20°, 30°, ausnahmsweise auch bei höherer Temperatur bebrütet und gewöhnlich gerade nach der Gerinnung der Sinnenprüfung unterzogen.

Die grosse Mehrzahl der Stämme rief in Milch einen rein sauren Geruch und Geschmack hervor. Die betreffenden Kulturen erhielten bei ihrer weitem Bebrütung oft einen herben Beigeschmack. Von einer weiteren beträchtlichen Gruppe von Stämmen wiesen die Milchkulturen einen leichten, nur schwer feststellbaren Beigeschmack auf. Er war verschiedenartig, erinnerte oft an Fleischsuppe, Karamel u. a., trat jedoch bisweilen plötzlich nicht mehr auf. 4 *Sc. faecium*-Stämme verursachten in Milch einen unangenehmen brenzigen Geschmack. Daneben produzierten 4 weitere *Sc. faecium*- und 2 *Sc. bovis*-Stämme in Milch stets einen schlechten, malzartigen Geruch und Geschmack. Obgleich die Aromabildung bei diesen Stämmen intensiv war, ging sie beim *Sc. faecium* Nr. 52, welcher für die Prüfung auf die Dauerhaftigkeit des Aesculinspaltungsvermögens täglich auf Milch weitergeimpft wurde, nach der zwanzigsten Generation total verloren. Die Zweigkultur des gleichen Stammes, welche auf gewöhnlichem Agar aufbewahrt, bzw. weitergezüchtet wurde, rief indessen nach einem Jahr in Milch den Malzgeruch noch mit der ursprünglichen Intensität hervor.

*Hämolyse.* Zur Feststellung allfällig hämolysierender Stämme unter den aus Kuhkot isolierten Milchsäurestreptokokken haben wir sie auf Pferdeblutagar geimpft. In Uebereinstimmung mit den Befunden K. J. Demeters (l. c.) und anderer Autoren haben wir keine Streptokokken gefunden, die eine typische Hämolyse zeigten, d. h. eine deutliche Aufhellung des Blutagars um die Kolonien

herum. Die Mehrzahl der Stämme (83,8 %) verursachte keinerlei Veränderungen auf Blutagar. Nur 16,2 % der Streptokokken bildeten Kolonien, die grünlich verfärbt waren. Auch drang die Verfärbung zuweilen noch etwas in den Agar hinein. Diese Stämme wiesen eine gewisse Ähnlichkeit auf mit dem von Schottelius als Unterart des *Streptococcus pyogenes* Rosenbach beschriebenen *Streptococcus viridans*, dessen Pathogenität meist gering ist. Da jedoch nach *Lehmann* und *Neumann* (50) Hämolyse und Pathogenität nur unvollkommen parallel gehen, ist kein Anlass vorhanden, vom hygienischen Standpunkt aus in der Gruppe der *viridans* ähnlichen Kotstreptokokken eine Gefahr zu erblicken. Immerhin dürfte eine Untersuchung über die Beziehung solcher *viridans*-Stämme zu Mastitisstreptokokken von Interesse sein.

#### *Morphologie und kulturelles Verhalten der Streptokokken-Stämme.*

Wenn sich innerhalb ein und derselben Species wohl ein gewisses einheitliches Bild ergibt, treten doch auch verschiedene Uebergänge und Abweichungen auf, die ein zuverlässiges Bestimmen einzelner Arten nach rein morphologischen Eigenschaften als zu wenig sicher erscheinen lassen. Dagegen kann auf Grund dieser Eigenschaften in vielen Fällen gesagt werden, ob ein Stamm der *Sc. lactis*-, *faecium*- oder der *Sc. bovis*-Gruppe angehört. Die *Sc. lactis* und *faecium* wachsen auf Agar wie in Bouillon mit wenigen Ausnahmen (Stämme 22, 34, 46, 71—73) vorwiegend in Diplokokkenform mit einzelnen kurzen Kettchen. Auf Agar und Gelatineplatten bilden namentlich die *faecium*-Stämme grosse, milchig getrübe, undurchsichtige Kolonien, die zuweilen Mikrokokkenähnliches Aussehen haben. Die Stämme der *bovis-inulinaceus*-Gruppe wachsen immer in Ketten, die 4—7—12 und mehr Glieder aufweisen, in der Regel aber sehr unregelmässig aussehen, indem schon in 24stündigen Kulturen Involutionen häufig auftreten. Daneben kommen immer auch Einzel- und Diploformen vor. Sie bilden auf Agar und Gelatine etwas kleinere Kolonien (als *Sc. faecium*), die durchscheinend sind und leicht irisieren.

Alle Stämme sind bei 20° im Gelatinestich gewachsen, ohne die Gelatine zu verflüssigen.

#### *d. Diskussion der Bestimmungsergebnisse.*

Die Untersuchungen zeigten, dass die Einordnung der im Kuhkot vorhandenen Streptokokken in das Orla-Jensensche System möglich ist. Wir haben indessen wiederholt darauf hingewiesen, dass die Auseinanderhaltung nahe verwandter Arten mitunter schwierig war. Aus diesem Grunde haben wir die verwandten Arten zu Gruppen zusammengefasst, zumal die Systematik dadurch an Uebersichtlichkeit nur gewinnt. Die 70 bestimmten Kotstreptokokken verteilen sich auf die gebildeten 2 Gruppen wie folgt:

Bovis-Gruppe:	Total	49	Stämme
	<i>Sc. bovis</i> . . . . .	43	
	<i>Sc. inulinaceus</i> . . . . .	6	
Lactis-Gruppe:	Total	21	Stämme
	<i>Sc. faecium</i> . . . . .	17	
	<i>Sc. lactis</i> . . . . .	3	
	<i>Sc. glycerinaceus</i> . . . . .	1	

Die beiden Gruppen unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, dass die Bovis-Gruppe 2 Arten umfasst, die typische Stärke- und Pentosenvergärer sind und im allgemeinen ein etwas höheres Temperaturoptimum aufweisen als

die Species der Lactis-Gruppe, die Stärke und Inulin nie, wohl aber oft Mannit vergären. Zwischen *Sc. bovis* und *inulinaceus*, deren Gärbilder (vergl. Tabelle II) fast gleich sind, bestehen ausser dem Unterschied im Caseinabbauvermögen keine weitem wesentlichen Differenzen. Gleich verhält es sich mit den Species der Lactis-Gruppe, indem neben weitgehend gleichen morphologischen und physiologischen Eigenschaften unter den 3 Arten nur geringfügige Unterschiede bestehen. Dieser Umstand veranlasste *K. J. Demerter* (l. c.) festzustellen, dass sich zwischen den *Sc. faecalis* und *Sc. lactis* (Lister) keine prinzipielle Trennung durchführen lasse. Wir möchten an dieser Stelle auch die Ansicht von *J. M. Sherman* und *P. Stark* (l. c.) anführen, die glauben, dass man *Sc. faecalis* und *Sc. lactis* gut auseinander halten könne mit den Temperaturwachstumsgrenzen indem nach ihren Feststellungen *Sc. lactis* bei 45° C nicht mehr wachse.

Es ist festzustellen, dass ausser *Sc. lactis*, welcher in über 50 Kotproben nur drei Mal (worunter einmal auf angetrocknetem Kot) angetroffen wurde, auch die andern wichtigsten Milchsäurestreptokokken, die in den Molkereigewerben die Hauptrolle spielen: *Sc. thermophilus*, *Sc. cremoris* und *Bc. cremoris*, im Kot nicht oder nur sehr selten und akzessorisch vorkommen. Dieses Resultat geht auch aus den Untersuchungen *S. Orla-Jensens* (l. c. p. 187) hervor. Wenn es auch wahrscheinlich ist, dass jene Streptokokken zuweilen mit dem Futter in mehr oder weniger grosser Zahl in den Verdauungstraktus gelangen, so muss doch auf Grund vorliegender Untersuchungen angenommen werden, dass sie im Labmagen und Dünndarm, wenn auch nicht quantitativ abgetötet, so doch in der Zahl stark dezimiert werden. *P. Ankersmit* (l. c. p. 41) kommt z. B. nach eingehenden Untersuchungen zu folgendem Schluss: „Die höchsten Keimzahlen finden sich beim Rinde im Pansen, während im Labmagen immer eine bedeutende, manchmal fast bis zur Vernichtung gehende Reduktion eintritt. Im mittleren Dünndarm sind die Zahlen in der Regel noch kleiner als im Labmagen . . .“ Die folgende Uebersicht aus neueren Untersuchungen von *A. Voss* (l. c. p. 397) über die Milchsäurebakterienflora im Darminhalt des Rindes und ihre Beeinflussung durch Rübenblätterfütterung (l. c. p. 397) zeigt deutlich, wie stark die nicht endemischen, von aussen in den Darm gelangten Streptokokkenarten auf dem kurzen Weg vom Dünndarm in das Rectum reduziert werden. Bei 10 Versuchstieren konnte aus Dünndarm und Rectum folgende Anzahl Stämme isoliert werden:

	Dünndarm	Rectum
<i>Sc. cremoris</i> . . . .	8	—
<i>Sc. thermophilus</i> .	5	1
<i>Sc. lactis</i> . . . . .	—	1
<i>Tbm. lactis</i> . . . .	7	1
<i>Bc. arabinosaceus</i> .	1	—

*e. Vergleichende Untersuchungen mit den aus Milch und Käse isolierten Streptokokken.*

*Streptokokken aus Milch.* Um über die Beziehungen zwischen den Fäkalstreptokokken und den in Milch und Käse normalerweise vorhandenen Streptokokken näheren Aufschluss zu erhalten, haben wir eine Anzahl Stämme aus Handels- und Käsereimilch, sowie aus jungen Käsen isoliert und in gleicher Weise wie die Streptokokken aus Kot untersucht.

Herkunft der Proben	Anzahl der isolierten Stämme
5 verschiedene <i>Handelsmilchen</i> Bern, Liebefeld . . . . .	16
6 <i>Käsekessmilchen</i> : Liebefeld, Uettligen, Meikirch, Uzwil, Ferenberg . . . . .	19
<i>Lieferantenmilchen</i> von: Schüpfen, Köniz, Eschenbach, Schongau, Sursee, Kappelen . . . . .	13
Fettsirte*), Magenlab . . . . .	2
Total	50

Raumersparnishalber verzichten wir darauf, die Gärbilder der einzelnen Stämme, die sich wie folgt auf die verschiedenen Species verteilen, wiederzugeben.

Lactis-Gruppe: Total 43 Stämme	
Sc. lactis . . . . .	23
Sc. faecium . . . . .	16
Sc. glycerinaceus . . . . .	1
atypische Sc. . . . .	3
Bovis-Gruppe: Total 4 Stämme	
Sc. bovis . . . . .	3
Sc. inulinaceus . . . . .	1
Thermophilus-Gruppe: Total 3 Stämme	
Sc. thermophilus . . . . .	3
Total	50 Stämme

3 Stämme, wovon 2 aus Fettsirte, bzw. Magenlab stammen, weisen ein stark reduziertes Zuckervergärungsvermögen auf und müssen als atypische bezeichnet werden.

*Bromkresolpurpurprobe.* Obschon alle Stämme aus Milch stammen, finden sich doch 8, d. h. 16 %, die die Milch bei der Bromkresolpurpurprobe nur schwach säuern (weisslich-gelbe Färbung), ohne sie zu koagulieren.

*Lackmusmilchprobe.* Wiederum kann keine Relation zwischen dieser und der obgenannten Probe festgestellt werden. Einzig 2 Stämme röten die Milch bloss. Die von Ayers und Mitarbeitern sowie Demeter gemachte Feststellung, dass aus Milch isolierte Lactis-Stämme eine typische Lackmusmilchprobe geben, trifft für 3 Stämme nicht zu. Sie mussten aber wegen der fehlenden Thermoresistenz und dem mangelnden Aesculinspaltungsvermögen zur Species lactis und nicht zu faecium gerechnet werden.

*Aesculinspaltungsvermögen.* 24 Stämme spalteten Aesculin deutlich (tief-schwarze Färbung der Bouillon), 8 Stämme bräunten bloss, während die übrigen 18 Stämme Aesculin nicht spalteten. Es darf daraus geschlossen werden, dass ein Grossteil, der in Milch vorhandenen Streptokokken direkt oder indirekt fäkaler Provenienz ist. Eine kleine Zahl von Stämmen, die Aesculin nur mehr halb zu spalten vermögen, deutet darauf hin, dass diese Eigenschaft verloren gehen kann.

*Janusgrünprobe.* Das Vermögen, Janusgrün zu reduzieren, erwies sich auch hier nicht ausgesprochen spezifisch für Sc. lactis. Obwohl die Mehrzahl

\*) Nicht zentrifugierte Käsereimolke.



der Lactis-Stämme eine positive Janusgrünprobe gab, reduzierten einerseits einige Stämme nicht, anderseits reduzierten aber auch einige *Sc. faecium*, ein *Sc. thermophilus* und ein *Sc. inulinaceus*.

*Streptokokken aus Käse.* Die aus verschiedenen alten Emmentalerkäsen isolierten Streptokokken verteilen sich nach der in gleicher Weise wie für die Fäkalstreptokokken vorgenommenen Bestimmung auf die einzelnen Species wie folgt:

Lactis-Gruppe:	Total	12
<i>Sc. lactis</i> . . . . .		5
<i>Sc. faecium</i> . . . . .		2
<i>Sc. glycerinaceus</i> . . . . .		5
Bovis-Gruppe:	Total	3
<i>Sc. bovis</i> . . . . .		2
<i>Sc. inulinaceus</i> . . . . .		1
Thermophilus-Gruppe:	Total	5
<i>Sc. thermophilus</i> . . . . .		5
	Zusammen	20 Stämme

Das zahlreiche Vorkommen von *Sc. glycerinaceus* im Käse gegenüber dem nahezu völligen Fehlen in Milch lässt vermuten, dass er, wie oben schon bemerkt, eine Standortsmodifikation von *Sc. faecium* ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass J. M. Sherman und P. Stark (73) neben dem *Sc. glycerinaceus* besonders in eintägigem Emmentalerkäse den *Sc. faecalis* vorfanden: „a majority of the cultures of streptococcus faecalis and streptococcus glycerinaceus were obtained from one-day-old Swiss cheese“ (l. c. p. 276).

Sämtliche aus Käse isolierten Stämme koagulierten die Milch in der Bromkresolpurpurprobe und gaben auch eine typische Lackmusmilchprobe. Auffällig und bezeichnend war, dass alle *Sc. glycerinaceus*, die dem *Sc. faecium* sehr nahe stehen, neben den Stämmen des letztern das Aesculinspaltungsvermögen noch besaßen.

#### 4. Untersuchungen über das Vorhandensein von Betakokken im Kuhkot.

Nach den Angaben von S. Orla-Jensen (60) kommen im Kuhkot auch Vertreter der Gattung Betakokkus vor, die neben links drehender Gärungsmilchsäure beträchtliche Mengen von Nebenprodukten, wie flüchtige Säuren, Aromastoffe und z. T. Gas bilden. Morphologisch sollen diese Betakokken den Mikrokokken nahe stehen (p. 75: „micrococcus-like betacocci“, p. 107: „Often irregular forms dividing in two planes“). Eine Zeitlang glaubten wir, einige mikrokokkenartige, aus Kuhkot isolierte Stämme, die uns durch ihr Vermögen, Diacetyl + Acetylmethylcarbinol bilden zu können, auffielen, zu den Betakokken rechnen zu müssen, umsomehr, als einer dieser Stämme auf den optischen Drehsinn seiner Gärungsmilchsäure geprüft und dabei links — Milchsäure festgestellt wurde. Da die Stämme jedoch sowohl Katalase bildeten, als auch Nitrat reduzierten, mussten sie als Mikrokokken angesehen werden (vergl. Abschnitt Tetrakokken). Ausserdem erwähnt schon S. Orla-Jensen (l. c. p. 68) den Umstand, dass sich die optische Aktivität der Gärungsmilchsäure gewisser Stämme im Laufe der Zeit ändern kann. Seither haben C. Neuberg und E. Simon (58) ähnliche Verhältnisse bei den Essigbakterien festgestellt:

\* „War es P. Meyer geglückt, mit Angehörigen zweier verschiedener Bakteriengruppen, mit Milchsäurebazillen einerseits und Essigsäurebakterien andererseits, jeweils den einen möglichen optischen Antipoden der Mandelsäure aus Phenylglyoxal zu bereiten, so haben wir nunmehr den Nachweis erbracht, dass selbst die zur gleichen Species der Essigbakterien zählenden Vertreter sich hinsichtlich der stereochemischen Spezifität verschieden verhalten.“

Nach Untersuchungen von *Peterson*, *Pederson* und *Fred* (62), zitiert nach K. J. Demeter, gibt ein *Sc. lactis*-Stamm bei 15° rechts-, bei 37° und 45° reine links-Milchsäure. Diese Verhältnisse beeinträchtigen den Wert der optischen Aktivität der Gärungssäure von Milchsäurebakterien als charakteristische Specieseseigenschaft nicht unwesentlich. Dies berücksichtigend, haben wir trotz der konstatierten links-Milchsäure bei einem der 4 fraglichen Stämme zufolge der übrigen ausgesprochen für Mikrokokken typischen Eigenschaften (Katalasebildung, Nitratreduktion) eine Zuteilung dieser Stämme zur Gattung Tetrakokkus vorgenommen. Was ihre Isolierung betrifft, verweisen wir auf den folgenden Abschnitt über die Tetrakokken.

Orla-Jensen gibt für die Isolierung der Betakokken eine saure Zuckerbouillon (acid sugar broth) an. Bei Benützung dieses Nährbodens, wobei wir das pH variierten und ausser Rohrzucker auch Arabinose und Xylose, einzeln und gemischt, zusetzten, erhielten wir indessen aus allen untersuchten Kotproben (während der Gras- und Heufütterung entnommen) stets nur Streptokokken, zur Hauptsache *Sc. bovis*. Die so isolierten Stämme bildeten auch keine erhöhten Mengen flüchtiger Säuren, wie dies für Betakokken nach Orla-Jensen zutreffen sollte.

## 5. Die Tetrakokken.

Bei einigen Stämmen war die Bestimmung der Genus-Zugehörigkeit (ob Tetra-, Beta- oder Streptokokken) nur nach dem mikroskopischen Aussehen und dem kulturellen Verhalten nicht möglich. Nach Orla-Jensen ist das Katalasebildungsvermögen ein verbindliches Merkmal für die Zugehörigkeit zum Genus Tetrakokkus. Wir können die fast allgemeine Gültigkeit des Katalasebildungsvermögens der Tetrakokken als diagnostisches Merkmal dieser Organismengruppe bestätigen. Unter 40 aus Kot isolierten Stämmen fanden sich nur zwei, die in morphologischer und kultureller Hinsicht typische Mikrokokken waren und auch die Fähigkeit der Nitratreduktion aufwiesen, jedoch keine Katalase bildeten.

Orla-Jensen hat zu seinen Untersuchungen nur milchsäurebildende Mikrokokken herangezogen. Er bemerkt allerdings, dass zwischen säuernden und nicht säuernden Mikrokokken alle Uebergänge bestehen, dass es viele schwache Säurebildner (namentlich seine aus Kot isolierten Stämme 17—22) gibt und weist darauf hin, dass das Säurebildungsvermögen leicht geschwächt werden könne. Da wir unter den 50 Mikrokokkenstämmen aus Kot keine fanden, welche die Zuckernährböden gar nicht gesäuert haben, wohl aber ca.  $\frac{1}{3}$  der Stämme als sehr schwache Säurebildner bezeichnen mussten, haben wir alle Stämme der systematischen Prüfung unterzogen.

### a. Isolierung der Stämme.

Unter den im Kot anzutreffenden Organismen sollten nach den Angaben Orla-Jensens (l. c. p. 109) die Tetrakokken zahlenmässig die erste Stelle einnehmen. Schon bei den Isolierungsversuchen von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien, Streptokokken und Betakokken, während welchen insgesamt von

über 80 Kotproben aerobe und anaerobe Ausstriche auf gew. Schrägagar und z. T. Peptonschottenagar gemacht und Plattenkulturen mit den gleichen Nährböden angelegt wurden, haben wir stets konstatieren können, dass unter den Milchsäurebakterien die Streptokokken vorherrschend waren, die Tetrakokken, wenn überhaupt solche vorhanden waren, jenen gegenüber stark in den Hintergrund traten. Eine Anzahl Plattenkulturen von Kot auf genannten Nährböden, die bei 20 und 30° bebrütet und nur zwecks Isolierung von Tetrakokken angelegt wurden, ergaben eine Bestätigung der früheren Beobachtungen. Um feststellen zu können, ob Tetrakokken in jedem Kot vorhanden sind, legten wir Anreicherungskulturen in gewöhnlicher Bouillon und Peptonschotte mit je 15 % Na Cl-Zusatz an. Auf diese Weise konnten wir die Tetrakokken in allen untersuchten 25 Kotproben nachweisen. Anlässlich dieser Anreicherungsversuche wurden auch eine Anzahl Mikrobakterien isoliert (siehe unten).

b. Bestimmung der Stämme nach Orla-Jensen und G. J. Hucker.

Die Prüfung auf das Vergärvermögen der Kohlenhydrate, Glucoside und Alkohole ergab ausser den bereits erwähnten Uebergangstypen von den sehr schwachen bis zu den stärkern Säurebildnern ein Bild, das gut mit dem seinerzeit von Orla-Jensen gefundenen übereinstimmt. Eine Einteilung der Tetrakokken in die von diesem Autor vorgeschlagenen 3 Species (*Tc. casei*, vergärt Arabinose, Raffinose und Salizin, *Tc. liquefaciens*, vergärt Arabinose, Raffinose und Salizin nicht, *Tc. mycodermatus*, vergärt Arabinose, Glycerin und Sorbit, aber Raffinose und Salizin nicht) auf Grundlage ihrer Zuckervergärung allein, ohne Berücksichtigung des Oberflächenwachstums, des Wachstums auf Gelatine und des Caseinabbauvermögens, wäre, wie sich aus dem Vergärungsbild von 40 aus Kuhkot isolierten Stämmen ergab, nicht möglich. Da das Vergärungsbild der Tetrakokken nur wenig charakteristisch ist für die systematische Einteilung der Organsimen dieser Gruppe — schon Orla-Jensen (l. c. p. 80) stellte fest: „The relation of these bacteria to the different sugars has not quite the same value as in the case of the other lactic acid bacteria“ — haben wir ihm eine untergeordnete Bedeutung beigemessen und geben in Tabelle IV auch nur einige Vergärungstypen der Tetrakokken wieder.

(Siehe Tabelle IV.)

Von den 40 näher untersuchten Tetrakokkenstämmen haben wie erwähnt nur zwei keine Katalase gebildet, wogegen 4 Stämme kein Nitratreduktionsvermögen besaßen. Das Resultat der *Janusgrünprobe*, welches wir mit den Streptokokkenstämmen erhielten (siehe oben), veranlasste uns, auch mit den Tetrakokken die Janusgrünprobe auszuführen. Das Janusgrün wurde reduziert:

nach 3 Stunden von 34 Stämmen,  
nach 18 Stunden von 39 Stämmen.

Nur ein Stamm reduzierte Janusgrün nicht. Diese Probe leistete gute Dienste zur Erkennung der unter den isolierten Kokkenstämmen befindlichen Mikrokokken.

Die Fähigkeit der Tetrakokkenstämmen, Gelatine zu verflüssigen, wurde in zuckerfreier Nährgelatine geprüft; es wurde festgestellt, dass 34 von 40 Stämmen die Gelatine verflüssigten. Zwischen dem *Aesculinspaltungsvermögen* und der Specieszugehörigkeit — der Orla-Jensenschen wie der Huckerschen — waren keine Zusammenhänge festzustellen. Innerhalb jeder Art gab es Aesculin spaltende Stämme. Im Gegensatz zu den Streptokokken aus Kot, wo sozusagen alle Stämme die Aesculinbouillon schwärzten (einzelne wenige verfärbten

Kohlenhydratvergärungstypen bei den Tetrakokken aus Kuhkot.

Tabelle IV.

Stamm	Glycerin	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Sorbit	Mannit	Laeulose	Dextrose	Mannose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Salzin	Katalase	Gelatineverflüssigung	Nitratreduktion	Wachstum auf min. Nährboden	Farbe	Species n. Orla-Jensen (O.J.) bzw. Hucker (H.)
201	1,8	—	2,0	—	1,3	2,2	3,4	4,0	3,2	3,0	2,8	3,4	2,6	—	—	—	—	2,2	+	+	+	—	weiss	Tc. liquefaciens O. J. M. albus Hucker
204	3,4	—	2,0	—	0,4	1,6	2,8	3,6	3,0	2,8	2,8	3,2	2,8	2,0	—	1,8	—	1,6	+	+	+	—	gelb	Tc. liquefaciens O. J. M. citreus H.
207	3,2	1,1	2,9	0,6	0,6	1,6	3,8	4,0	3,6	3,0	3,0	3,0	2,6	—	—	—	—	2,2	+	+	+	+	weiss	Tc. liquefaciens O. J. M. caseolyticus H.
213	1,1	—	—	—	—	—	3,6	4,0	4,6	2,5	4,0	1,8	4,0	—	—	—	—	—	+	+	+	—	weiss	Tc. liquefaciens O. J. M. albus H.
217	1,8	—	2,5	1,3	2,5	2,2	4,5	4,5	4,0	2,5	2,5	3,8	2,9	—	—	—	—	1,1	—	—	+	—	weiss	Tc. casei O. J. M. epidermidis H.
223	—	0,6	0,6	—	—	—	1,8	2,2	1,8	—	1,5	1,1	1,1	—	—	—	—	—	+	—	—	+	weiss	Tc. casei O. J. M. candidus H.
236	2,0	—	—	—	—	—	3,4	3,4	2,2	2,5	3,0	2,8	3,5	1,6	1,6	1,1	—	1,1	+	+	—	—	weiss	Tc. liquefaciens O. J. M. freudenreichii H.

sie nur braunschwarz), fällt bei den Tetrakokken vorerst die grosse Zahl Aesculin nicht spaltender und alsdann auch die beträchtliche Anzahl Aesculinbouillon nur rotschwarz verfärbender Stämme auf.

Verfärbung der Aesculinbouillon:	Stämme aus:	
	Kot	Milch und Käse
tief schwarz . . . . .	13	11
rot-schwarz . . . . .	10	5
Total der Aesculin spaltenden . . . . .	23	16
Uebrige, Aesculin nicht spaltende . . . . .	17	24
	40	40

Nach dem Aesculinspaltungsvermögen zu schliessen, wären ungefähr die Hälfte der im Kot vorhandenen Tetrakokken endemische, im unteren Teil des Verdauungstraktus heimische Stämme. Die andere Hälfte der Tetrakokken ist wohl mehr als Passanten-Gruppe des Verdauungskanals anzusehen, d. h. Stämme, die keine weiteren Beziehungen zu den Verhältnissen im Darm haben, die bloss dank ihrer Widerstandsfähigkeit diesen noch in lebensfähigem Zustand verlassen.

Die Zusammenstellung in nachstehender Tabelle orientiert über die Hitze-resistenz von je 40 aus Kot bezw. Milch und Käse isolierten und untersuchten Tetrakokkenstämmen.

Erhitzungstemperatur und -Zeit:	Anzahl Stämme aus:	
	Kot	Milch und Käse
62° während 30 Minuten . . .	37	35
70° „ 20 „ . . .	16	11
75° „ 15 „ . . .	7	3
80° „ 10 „ . . .	3	2

Das Verhalten der Tetrakokkenstämme gegen höhere Temperaturen entspricht demjenigen der von Orla-Jensen untersuchten Stämme.

In morphologischer Hinsicht verhielten sich die Stämme ziemlich gleichförmig. Sie wiesen im mikroskopischen Bild neben in Haufen angeordneten runden Einzel-, Diplo-, z. T. auch Streptokokken, mehr oder weniger zahlreiche Tetraden auf. Nur bei 4 Stämmen konnten weder in festen noch flüssigen Kulturen niemals Tetraden festgestellt werden. Umgekehrt wuchs nur 1 Stamm vorwiegend in Tetraden. Die schwierige Feststellbarkeit von vorwiegendem Tetradenwachstum erweist die Systematik der Mikrokokken nach *G. J. Hucker* (39), welche u. a. auf die Wuchsform abstellt, als etwas unsicher.

Wir konnten feststellen, dass das Farbstoffbildungsvermögen bei drei Stämmen, welche anfänglich gelb waren, nach 2 Monaten verloren ging. Alle Stämme zeigten Wachstum in Milch. Innerhalb von 3 Wochen haben 28 Stämme die Milch bei 30° koaguliert, z. T. mit starker Molkenausscheidung und sichtbarer Eiweissauflösung, während 12 Stämme die Milch äusserlich nicht veränderten. Die teilweise stark zusammengezogenen Koagula und die niedrigen Säuregrade der geronnenen Milchen liessen darauf schliessen, dass wohl bei der Mehrzahl der Stämme Säure- und Labgerinnung nebeneinander verliefen. (Acido-Proteolyten nach *C. Gorini*.) Von den 28 Stämmen, die Milch koagulierten, wiesen nur 7 Säuregrade auf, die höher als 25 waren und höchstens 40 betrugten. Die übrigen 21 Stämme, welche die Milch noch dicklegten, unterschieden sich von den 12 Milch nicht gerinnenden im Säuregrad gar nicht. In beiden Gruppen schwankte er zwischen 12 und 24 Grad. Um auch eine Ein-

teilung der Mikrokokken nach der von G. J. Hucker aufgestellten Systematik vornehmen zu können, war eine Prüfung der Stämme auf Wachstum in einem mineralischen Nährboden mit einem Ammoniumsalz an Stelle von organischem Stickstoff notwendig. Wir benützten hiezu einen modifizierten Nährboden nach *Czapek-Dox* (zit. nach J. H. Birkingshaw and others, 7) folgender Zusammensetzung:

NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O . . . . .	4,921	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	1,00	g
KCl . . . . .	0,5	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5	g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,01	g
Glucose . . . . .	20,0	g
CaCO <sub>3</sub> . . . . .	28,0	g
dest. Wasser . . . . .	1000	ccm

In diesem Nährmedium wuchsen 18 von 40 Mikrokokkenstämmen fäkaler Herkunft. Die Tatsache, dass 45 % der Tetrakokkenstämmen mit einer anorganischen Stickstoffquelle auskommen können, zeigt, dass sich diese Organismengruppe im Grenzgebiet der Milchsäurebakterien befindet, denn auch *Orla-Jensen* führt als typische Eigenschaften der echten Milchsäurebakterien die Unfähigkeit, anorganischen Stickstoff biologisch zu verwerten, an. Nach den angeführten Eigenschaften der Stämme verteilen sie sich auf die folgenden drei von *Orla-Jensen* umschriebenen Tetrakokkenspecies:

- 30 Tc. liquefaciens
- 4 Tc. mycodermatus
- 6 Tc. casei

Während die Tc. casei- einerseits und Tc. mycodermatus-Stämme andererseits in ihren Eigenschaften ein einheitliches Bild boten, zeigten die Tc. liquefaciens-Stämme, welchen wohl das Gelatineverflüssigungs- und Caseinabbauvermögen gemeinsam war, ein buntes farbiges Bild und wiesen neben dem ordinären, kräftigen Oberflächenwachstum der Mikrokokken z. T. stark gekräuseltes, runzeliges (ähnlich demjenigen von *Bac. mesentericus*) oder dann wurzelartiges (wie *Bac. mycoides*) Wachstum auf. Die Verhältnisse erweckten den Eindruck, es sei sehr Verschiedenartiges in der *Orla-Jensen*schen Species *Tc. liquefaciens* zusammengefasst. In voller Würdigung der durch die Variationsfähigkeit bedingten Schwierigkeiten auf dem Gebiete der Mikrokokkensystematik erschien doch der Versuch einer etwas weitergehenden Gliederung der Mikrokokkenstämmen namentlich auch mit Rücksicht auf die in der Literatur gebräuchlichen Speciesbezeichnungen erwünscht. Auch *C. Gorini* (32), welcher sich allerdings in der Hauptsache mehr mit Mikrokokken aus Käsen und andern Molkereiprodukten befasste, weist auf die Variabilität dieser Organismen hin: «La différenciation des divers types de coccus producteurs d'acide et de présure qu'on rencontre dans les fromages n'est pas très aisée, à cause de l'inconstance de maints de leurs caractères», und schlägt deshalb nur eine Unterscheidung zwischen Gelatine verflüssigenden und nicht verflüssigenden Acido-Proteolyten vor. Eine etwas weitergehendere Einteilung der Mikrokokken ermöglicht die von *G. J. Hucker* (39) aufgestellte Systematik, die zugleich den Vorteil hat, dass sie die frühere Nomenklatur berücksichtigt. Dieser Autor teilt die Mikrokokken nach der Pigmentbildung, der Gelatineverflüssigung, der Nitratreduktion, dem Wachstumsvermögen mit nur anorganischen Stickstoffverbindungen und z. T. nach morphologischen Eigenschaften in 19 species ein. Eine Bestim-

mung unserer 40 Mikrokokkenstämme nach dieser Methode ergab folgende Verteilung auf die von G. J. Hucker umschriebenen Species:

12 M. caseolyticus	1 M. tetragenus
11 M. albus	1 M. flavus
5 M. freudenreichii	1 M. aureus
3 M. candidus	1 M. aurantiacus
2 M. citreus	1 M. epidermidis
2 M. conglomeratus	

Orla-Jensen glaubt, dass Vertreter der Art von Evans M. caseolyticus teilweise zu seinen Species Tc. casei und liquefaciens gehören oder wenigstens sehr nahe verwandt seien mit diesen. Wie oben schon erwähnt, ist nicht in allen Fällen eine sichere Unterscheidung zwischen M. albus (Rosenbach 1884) und M. tetragenus (Gaffky 1883) möglich, da nach Hucker hierfür das Tetradenbildungsvermögen entscheidend ist. Dieser Autor hält den M. albus für den verbreitetsten unter den weissen Mikrokokken und weist darauf hin, dass er auch oft „from pathogenic conditions“ isoliert wurde. M. freudenreichii kommt häufig in Milch (siehe unten) und an Molkereitensilien vor. Die MM. citreus, conglomeratus und flavus sind Vertreter der gelben, in der Regel schwach säuernden Mikrokokken, und stehen den MM. aureus und aurantiacus, die orange sind, nahe. Die MM. epidermidis (Kligler, 1913) und candidus (Cohn, 1879) kommen nach Hucker verhältnismässig oft in Milch vor.

### c. Mikrokokken aus Milch und Käse.

Trotzdem bekanntlich eine grosse Anzahl der Mikrokokken in der Milch aus dem Euter stammt, besteht anderseits zweifellos die Wahrscheinlichkeit, dass solche auch durch Kotinfektionen in die Milch und damit in den Käse gelangen können. Um festzustellen, ob hieraus isolierte Mikrokokken z. T. den gleichen Species angehören, wie diejenigen aus Kuhkot, wurden je 20 Stämme aus Milch und Käse nach Orla-Jensen und G. J. Hucker bestimmt.

Die Isolierung der Stämme erfolgte aus 10 Einzellieferantenmilchen von Schöpfheim und den Kessmilchen von Uettligen und Liebefeld, sowie aus eintägigen Käsen von Uettligen und Liebefeld durch direkte Abimpfung von Mikrokokkenkolonien ab Kulturen auf gewöhnlichem Schrägagar. Zehn Stämme wurden Anreicherungskulturen in Peptonschotte mit 15 % NaCl-Zusatz, die mit Proben von 1 bis 5 Monate alten Käsen beimpft worden waren, entnommen.

Die Bestimmung nach Orla-Jensen ergab folgende Artzugehörigkeit der Stämme:

Species	Anzahl in	
	Milch	Käse
Tc. liquefaciens . . . .	16	9
Tc. casei . . . . .	4	11
	<hr/> 20	<hr/> 20

Die Einteilung der Stämme nach der Methode von G. J. Hucker ergab folgende Verteilung auf die einzelnen Species:

Species	Anzahl in	
	Milch	Käse
<i>M. freudenreichii</i> . . . . .	5	3
„ <i>candidus</i> . . . . .	3	10
„ <i>epidermidis</i> . . . . .	1	—
„ <i>albus</i> . . . . .	4	1
„ <i>tetragenus</i> . . . . .	—	1
„ <i>caseolyticus</i> . . . . .	4	2
„ <i>citreus</i> . . . . .	1	1
„ <i>conglomeratus</i> . . . . .	1	2
„ <i>flavus</i> . . . . .	1	—
	20	20

Die grosse Zahl von Gelatine verflüssigenden Tetrakokken aus Milch fällt auf und ist, wie namentlich die Bestimmung nach Huckler zeigt, wohl durch Stämme fäkaler Herkunft bedingt. Bei der Bestimmung der aus Käse isolierten Stämme fiel vor allem der grosse Unterschied in den Arten zwischen den aus jungen und älteren Käsen herrührenden Mikrokokken auf. Während in den jungen Käsen die gleichen Arten, wie sie in der Milch vorkommen, anzutreffen waren, traten diese Arten in den einmonatigen Käsen schon sehr stark zurück und konnten in den älteren (bis 5 Monate alten) Käsen nie mehr isoliert werden. In den 2—5 Monate alten Käsen waren stets Mikrokokken, die wir als *M. candidus* (Huckler) bestimmten, vorherrschend. Es ist dies ein Organismus, der keine Katalase bildet, Nitrat nicht reduziert, Gelatine nicht verflüssigt, aber im mikroskopischen Bild ab festen und flüssigen Kulturen immer mehr oder weniger Tetraden zeigt, so dass auch hier zuweilen schwierig zu entscheiden ist, ob es sich um die Species *M. tetragenus* oder *candidus* handelt.

In einer neueren Arbeit hat *A. Grenz* (33) festgestellt, dass die Bakterienflora in den fortlaufenden Reifungsstadien des Tilsiterkäses einen auffallend konstanten Anteil an Mikrokokken (mit starkem, caseolytischem Ferment, ohne wesentliches Säuerungsvermögen) aufweist. Nach seinen Untersuchungen schwankt der prozentische Anteil der Mikrokokken an der Gesamtflora zwischen 14 % in der Kessmilch (8 % im frischen Bruch) und 21 % im 5 Monate alten Käse. Nach diesen Feststellungen würden die Mikrokokken an der Gesamtflora und eventuell auch am Reifungsprozess offenbar noch einen grösseren Anteil haben beim Tilsiter- als z. B. beim Emmentalerkäse.

*d. Diacetyl und Acetoin bildende Tetrakokken aus Kuhkot.*

Wir sind anlässlich der Versuche zur Isolierung von Betakokken auf solche Organismen gestossen und verweisen diesbezüglich auf den Abschnitt Betakokken. Dabei wurde als Anreicherungsflüssigkeit Milch unter Zusatz von 0,5 % Citronensäure (pH = ca. 4,0) verwendet. Der Citronensäurezusatz fördert nach *M. B. Michaelian*, *R. S. Farmer* und *B. W. Hammer* (55) das Wachstum der Diacetylbildner. Erlenmeyerkolben mit 300 ccm steriler angesäuerter Magermilch wurden mit den Kotproben beimpft und während 5—6 Tagen bei 20° bebrütet. Von 12 auf diese Art verarbeiteten Kotproben waren 9 Diacetyl + Acetoin positiv, indessen enthielten alle erhöhte Mengen flüchtiger Säuren. Die 3 Diacetyl negativen Kulturen fallen auf 7 während der Heufütterung entnommene Proben, wogegen alle 5 Kotproben aus der Zeit der Grasfütterung positiv waren. Aus den Diacetyl enthaltenden Proben wurden die Diacetyl bildenden Organismen reingezüchtet durch weitere Passagen in nun-



mehr weniger stark angesäuertes Milch (0,3 % Citronensäure). In Milch angesetzte Reinkulturen von Organismen, die vermutlich den gesuchten Butteraromastoff bildeten, wurden wie vorher die Ausgangskotkulturen nach folgenden Methoden auf den Gehalt an flüchtigen Säuren und das Gemisch von Diacetyl und Acetylmethylcarbinol geprüft.

Analog dem Vorgehen von *G. J. Hucker* (39), welcher der „gemeinen lactis-Gruppe“, deren Vertreter weniger als 10 % der Gärungssäure flüchtige Säuren bilden, die Organismen der „Aroma-Gruppe“ (Typen des *Sc. kefir*) gegenüberstellt, die bis zu 40 % der Gesamtacidität flüchtige Säuren produzieren, haben *W. A. Cordes* und *B. W. Hammer* (17) die Aromabildner von den gemeinen Milchsäurestreptokokken abgegrenzt. Aus 50 ccm Milchkultur des zu prüfenden Stammes, welchen 3 ccm  $nH_2SO_4$  beigegeben werden, destillieren sie mit Wasserdampf 2 Mal 10 ccm ab und titrieren diese mit  $n/20$  NaOH unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator. Werden zur Neutralisation von je 10 ccm Destillat weniger als 0,3 ccm  $n/20$  NaOH gebraucht, so handelt es sich um einen Vertreter der gemeinen Lactis-Gruppe; werden dagegen mehr als 0,8 ccm  $n/20$  NaOH zur Neutralisation benötigt, so hat man es mit Aroma bildenden Organismen zu tun. Anschliessend haben wir jeweilen die Bestimmung des von *H. Schmaljuss* (71) entdeckten wichtigsten Bestandteiles des Butteraromas Diacetyl, bzw. des Gemisches von Acetylmethylcarbinol + Diacetyl nach der Methode von *M. B. Michaelian*, *R. S. Farmer* und *B. W. Hammer* (55) vorgenommen. Die Bestimmung von Diacetyl + Acetoin wird so ausgeführt, dass 200 ccm Milchkultur plus 40 ccm 40prozentige Ferrichloridlösung mit Wasserdampf destilliert werden. Etwa 100 ccm Destillat werden mit einigen Tropfen Nickelreagens (2 Teile 20 proz. Hydroxylaminchlorid + 2 Teile Natriumacetat + 1 Teil Nickelchlorid) versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Bei Anwesenheit von Diacetyl + Acetoin scheidet sich ein roter Niederschlag aus.

Unter den aus den Diacetyl + Acetoin enthaltenden Kotmilchkulturen isolierten Organismen, die die beiden Stoffe auch als Reinkulturen produzierten, waren hauptsächlich Betabakterien, welche teilweise kräftig, teilweise auch nur sehr schwach Diacetyl bildeten und im folgenden Kapitel näher beschrieben sind. Daneben fanden wir 4 Diacetyl positive Tetrakokken, deren Eigenschaften in nachstehender Uebersicht angegeben sind.

Stamm	Flüchtige Säuren	Diacetyl + Acetoin	Katalase	Nitratredukt.
281	1,1*)	+++	+	+
282	1,0	++	+	+
283	0,8	+++	+	+
284	1,2	+++	+	+

\*) Anzahl ccm  $n/20$  NaOH, welche zur Neutralisation der ersten 10 ccm Destillat aus 50 ccm Milchkultur benötigt wurden.

Nur einer dieser vier Stämme hat die Aesculinbouillon geschwärzt. Wir erwähnen noch, dass aus den Kotproben nie *Bact. aerogenes*, das ja auch Diacetyl zu bilden vermag, isoliert werden konnte.

## B. Untersuchungen über das Vorkommen von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien.

### 1. Bisherige Untersuchungen.

Die ersten Untersuchungen über Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurestäbchen gehen auf *Escherich* (27) zurück. Er wies auf das Vorhandensein vieler grampositiver Stäbchen im normalen Stuhle von Brustkindern hin. Später gelang es *Moro* (56) das Milchsäurestäbchen, welches er wegen seiner vermeintlichen Vorliebe für saure Nährböden *Bacillus acidophilus* nannte, mit Hilfe von saurer Bierwürzebouillon anzureichern und zu isolieren.

Im Jahre 1899 fand *Tissier* (80) im Stuhl von Brustkindern den *Bacillus bifidus*, ein anaerobes, unbewegliches Stäbchen, häufig verzweigt mit oft keulenförmig verdickten Enden, als vorherrschenden Organismus. *Cahn* (16) beobachtete, dass in den Faeces von Säuglingen, die mit Kuhmilch ernährt werden, *Bac. acidophilus* vorherrscht. *Mereshkowsky* (53) untersuchte Menschen- und Hundefaeces auf das Vorhandensein von *Bac. acidophilus*. Er konnte ihn oft mit einer Passage durch saure Bouillon anreichern. Aus der bereits im vorhergehenden Abschnitt angeführten grundlegenden Arbeit von *P. Ankersmit* (3) über die Bakterienflora im Darmtraktus des Rindes sei noch folgendes erwähnt. Während beim Rinde nie langstäbchenförmige Milchsäurebakterien nachgewiesen werden konnten, fand dieser Autor in den Verdauungswegen des Milchkalbes, wo er höhere Keimzahlen antraf als beim Rind, neben dem *Bact. Güntheri* auch Vertreter der Milchsäurelangstäbchen vor. *F. Löhnis* (51, p. 69) sagt in Bezug auf die im Darmkanal anzutreffenden Arten von Mikroorganismen: „Es dürfte zweckmässig sein, die neben den Formen aus der *Coli-aerogenes*-Gruppe hier in Betracht kommenden Bakterien der Uebersichtlichkeit halber mit *H. Weiss* zunächst in drei Gruppen zu sondern, nämlich 1. solche, die bei saurer Reaktion gut gedeihen (*acidophile*), 2. solche, die alkalische Reaktion bevorzugen, 3. anaerobe“. „Die sog. *acidophilen* sind vom landwirtschaftlichen Gesichtspunkte aus entschieden von grösster Bedeutung. Denn zu ihnen gehören im weitern Sinne ausser den gasbildenden Milchsäurebakterien der *Coli-aerogenes*- bzw. *Pneumonie*-Gruppe die milchsäurebildenden Streptokokken (Laktokokken), ferner die für die Bereitung fermentierender Milch (*Kumis, Mazun, Ja-urt usw.*), wie von Käse, speziell mancher Hartkäse hervorragend wichtigen Laktobazillen, sowie die Mikrokokken aus der Verwandtschaft des *Micrococcus lactis acidii*. Als *acidophile* im engern Sinne kommen in erster Linie die Lactobacillen in Betracht, die speziell im Säuglings- wie im Kälberdarm in grösster Menge anzutreffen sind. Die Milchkost übt jedenfalls hierbei den entscheidenden Einfluss aus. Dass bei anderer Ernährungsweise *Bact. coli* im Darm die Vorherrschaft gewinnt, ist, wie *Beijerinck* betont, darin begründet, dass Laktokokken wie Laktobacillen neben Pepton auch noch Kohlehydrate benötigen, während dies bei *Coli* nicht der Fall ist. In den Vormägen der Wiederkäuer finden dagegen (ebenso wie oft im Magen carcinomkranker) infolge des Fehlens der Salzsäure, die wegen ihrer schwierigen Kultivierbarkeit leicht zu übersehenden Langstäbchen ebenso wie die Laktokokken eine zusagende Wirkungsstätte. Bei neutraler Reaktion können sie (nach *Rodella*) neben *Coli* gedeihen, im Rectum verdrängen sie (nach *Mereschkowsky*) unter Umständen *Coli* und die Fäulnisbakterien in auffallendem Grade. (Ihre z. T. ausgesprochen anaerobe Lebensweise, sowie die bei manchen dieser Langstäbchen wahrzunehmende Befähigung zur Bildung von verschiedenen Fettsäuren, u. a. Buttersäure, nähert sie gewissen Formen der Buttersäurebacillen-Gruppe)“. *F. Löhnis* kann also nicht auf Untersuchungen hinweisen, die den Nachweis erbringen, dass die Laktobazillen oder Milchsäurelangstäbchen ausser im Säuglings- und Kälberkot auch im Kuhkot vorhanden sind. Dagegen lässt er die Möglichkeit offen, spricht sogar die Vermutung aus, dass die Milchsäurelangstäbchen auch im Kot der Kühe vorkommen können. Anlässlich von Untersuchungen über die Darmflora beim gesunden Ochsen hat *A. Fischer* (28) im Dickdarm keine Laktobacillen angetroffen, wohl aber im Netzmagen. „Lange Milchsäurestäbchen haben wir im Netzmagen immer finden können. Sie produzieren aber im Widerspruch zu den Angaben *Wolffs* immer reichliche Mengen Gas“. Ob es sich aber unter diesen Umständen um echte Milchsäurestäbchen (eventuell *Bbm. breve* *Orla-Jensen*) gehandelt hat, erscheint namentlich mit Rücksicht auf spätere Untersuchungen fraglich.

In einer neueren Arbeit über „die Milchsäurebakterienflora im Darminhalt des Rindes und ihre Beeinflussung durch Rübenblätterfütterung“ konnte *A. Voss* (83), wenn auch nicht in den ausgestossenen Faeces, so doch speziell in den oberen Darmpartien vereinzelt langstäbchenförmige Milchsäurebakterien nachweisen. Vor der Verfütterung von Rübenblättern konnte er bei 10 untersuchten Tieren aus den Abschnitten des Dünndarmes 7, aus denjenigen des Rectums dagegen nur 1 Stamm *Tbm. lactis* isolieren. „Die Befunde ergaben einen wesentlich grösseren Artenreichtum in den Abschnitten des Dünndarms. Im Rectum ist die Flora der Milchsäurebakterien relativ eng begrenzt“. Bei der Prüfung des Darminhaltes unmittelbar nach der Periode der Rübenblattfütterung wurden bei insgesamt 2 Tieren nur je 3 Stämme Streptobakterien und Betabakterien, also keine *Bact. casei* epsilonartigen Thermobakterien gefunden. Wenn *A. Voss* gleichwohl schreibt (83, p. 420/21): „Im Verlaufe einer 13tägigen Fütterungsperiode mit frischen Zuckerrübenblättern (viel Oxalsäure

und Kohlehydrate) konnte bei den 2 Versuchstieren die angestrebte vollständige Umstellung der Darmflora zu Gunsten der Säurebildner, unter denen die Milchsäurebakterien eine auffallend grosse Rolle spielten, tatsächlich herbeigeführt werden“, so müsste sich diese Umstellung in der Gruppe der kokkenartigen Milchsäurebakterien vollzogen haben. Dies geht jedoch aus seinen angegebenen Resultaten nicht überzeugend hervor, da weder über die Milchsäurebakterienflora noch die übrige Flora quantitative Angaben gemacht werden, aus denen eine Umstellung zu Gunsten der erstern ersichtlich wäre.

Da es ganz unwahrscheinlich ist, dass sich die Langstäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon* im Dünndarm weder bei normaler noch bei Rübenblätterfütterung vermehren, stellt sich die Frage, ob eventuell in einem oberen Teil des Verdauungskanals eine solche Vermehrung stattfindet, oder ob es sich bei allfällig im Darm vorhandenen Langstäbchen nur um von aussen mit dem Futter hereingekommene handelt. In einer neuern Arbeit von *H. Kreipe* (46) über die Milchsäurebakterienflora des Kuhpansens wird festgestellt, dass die Milchsäurelangstäbchen nicht zur endemischen Flora des Pansens gerechnet werden können. Der Autor konnte bei seinen Untersuchungen mit Hilfe von Anreicherungsverfahren aus dem Panseninhalt nur folgende Stämme isolieren:

- 4 Stämme *Tbm. lactis* (Orla-Jensen)  
(= *Bac. lactis acidi* Leichmann);
- 2 Stämme *Tbm. cereale* (Orla-Jensen)  
(= *Bac. Delbrückii*, Leichmann).

Um den Zusammenhang der älteren Nomenklatur mit der neueren herzustellen, sei nachstehend eine Uebersicht über die Namengebung gegeben.

- 1. *Thermobact. helveticum* Orla-Jensen  
Syn.: *Bact. casei epsilon* v. Freudenreich;
- 2. *Thermobact. lactis* Orla-Jensen  
Syn.: *Bac. lactis acidi* Leichmann;
- 3. *Thermobact. cereale* Orla-Jensen  
Syn.: *Bac. Delbrückii* Leichmann;
- 4. *Streptobact. casei* Orla-Jensen  
Syn.: *Bact. casei alpha* v. Freudenreich;
- 5. *Betabact. longum* Orla-Jensen  
Syn.: *Bact. casei delta* v. Freudenreich;
- 6. *Betabact. breve* Orla-Jensen  
Syn.: *Bact. casei gamma* v. Freudenreich.

Die Microbakterien (*lacticum*, *mesentericum*, *flavum*) Orla-Jensen wurden früher von *R. Burri* und *H. Weigmann* als „hitzeresistente Kurzstäbchen“ bezeichnet.

## 2. Eigene Untersuchungen.

Wenn man eine Kotemulsion im hängenden Tropfen betrachtet, ist man überrascht, so wenig Bakterien zu sehen. Diese Erscheinung ist wohl auf die Adsorption vieler Mikroorganismen an die festen Teilchen des Kotes zurückzuführen. Neben sehr kleinen, lebhaft beweglichen Kurzstäbchen sind Diplokokken, auch längere Stäbchen und noch seltener Streptokokken sichtbar.

Bei unsern Arbeiten nahmen wir uns anfänglich vor, einfach nach grampositiven langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien zu suchen, ob es sich dann im Einzelfall um *Bact. casei epsilon*, *alpha* oder *delta* handeln würde. Dieses Vorgehen schien uns zulässig, da unter den drei Species nur geringfügige mikroskopische und kulturelle Unterschiede bestehen. Später wurden auch spezifische Anreicherungsverfahren angewendet.

a. Direkte Isolierungsmethoden.

*Schüttelkulturen mit Peptonschottenagar.* Der verwendete Nährboden wies folgende Zusammensetzung auf: Zu 1 Liter Molke, die mit Milchsäure klar geschieden (enteiweisst) wurde, werden 10 g Witte-Pepton und 15 g Agar gegeben. Mit NaOH wird auf pH = 6,8 eingestellt. Im Laufe der Untersuchungen wurden insgesamt 37 Kotproben (aus verschiedenen Ställen, sowohl bei Heu- wie bei Grasfütterung entnommen) zu Schüttelkulturen auf diesem Nährboden verarbeitet. Da in den Kulturen nach einer 4—5 tägigen Bebrütung bei 30° (einige bei 37°) in den 3—4 ersten Verdünnungen gewöhnlich eine starke Gasbildung auftrat, so dass der Agar zerrissen wurde und daher auch in der untern Hälfte der hohen Schicht keine anaeroben Bedingungen mehr vorhanden waren, wurde den Kulturen gewöhnlich 1‰ steriles KNO<sub>2</sub> zur Unterdrückung der Gasbildung zugesetzt. Vorversuche mit Stämmen von *Bact. casei epsilon*, *alpha* und *delta* haben ergeben, dass diese Bakterien in Schüttelkulturen auf Peptonschottenagar mit und ohne Zusatz von 1‰ KNO<sub>2</sub> in den Verdünnungen gleich weit wachsen.

Da zum vorneherein anzunehmen war, dass die Langstäbchen nur in geringer Zahl im Kot zu finden sein werden, wurde das Augenmerk bei der Verarbeitung der Schüttelkulturen besonders auf die ersten Verdünnungen gerichtet. Die Milchsäurestäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon* (*Thermobact. helveticum*) bilden in der hohen Schicht linsenförmige Kolonien, die zuweilen gelappt und von einem Säurehof (Trübung) umgeben sind. Der Säurehof ist allerdings in den ersten 2 Verdünnungen einer Kotschüttelkultur, die durch die festen Teilchen des Kotes stark getrübt sind, nicht sichtbar. Es wurden jeweilen alle Kolonien, die in Frage zu kommen schienen, mikroskopisch und je nachdem auch kulturell verarbeitet. Aus den untersuchten 37 Proben konnten keine Langstäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon* isoliert werden, wohl aber 11 Milchsäurestäbchen, die nach der später erfolgten Bestimmung folgenden Orla-Jensenschen Species angehören:

- 5 Stämme *Betabacterium breve*,
- 2 Stämme *Betabacterium longum*,
- 1 Stamm *Streptobacterium plantarum*.

*Anaerobe Ausstriche.* Da die langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien auf Ausstrichen auf gewöhnlichem und Dextoseschrägagar unter dem anaeroben Verschluss, ausgeführt nach der *Wright-Burrischen* Methode, welche von *W. Ritter* und *W. Dorner* (66) (an Stelle von KOH oder NaOH wird eine gesättigte Sodalösung verwendet. Die hydrophile Watte wird mit je 1 ccm 20proz. Pyrogallol- dann conc. Sodalösung getränkt und das Gläschen sofort mit einem Gummistopfen verschlossen) modifiziert wurde, sehr gut wachsen, haben wir auch eine Anzahl Kotproben auf solche Ausstriche verarbeitet. Aus 48 Kotproben wurden mit Hilfe der anaeroben Ausstriche insgesamt 18 Milchsäurestäbchenstämme isoliert, wovon später 10 der näheren Prüfung unterzogen und wie folgt bestimmt wurden:

- 4 Stämme *Betabacterium breve*,
- 3 Stämme *Betabacterium longum*,
- 3 Stämme *Streptobacterium plantarum*.

In einzelnen wenigen Kotproben waren die Betabakterien recht zahlreich auf den Ausstrichen (entsprechend ca. 50 000 Organismen je Gramm Kot). In der überwiegenden Mehrzahl der positiven Proben konnte man jedoch mit dieser Methode nur je 1—2 Kolonien habhaft werden.

Zuweilen haben wir auf den anaeroben Ausstrichen leicht schleimige Kolonien angetroffen, die weder auf Ausstrichen noch in flüssigen oder festen Nährböden weitergezüchtet werden konnten. Da die Kolonien aus fadenförmigen Stäbchen bestanden, hat es sich in diesen Fällen vermutlich um Involutionsformen des *Bm. longum* oder irgendeinen Sporenbildner gehandelt.

Wenn der Kot lebensfähige Milchsäurestäbchen in Mengen von mindestens 100—1000 Keimen pro Gramm enthalten würde, so müssten diese mit Hilfe der anaeroben Ausstriche nachweisbar sein.

#### *b. Anreicherungsversuche in sterilisierter Milch.*

Da die Langstäbchen auf Milch bei 38 und 42° sehr gut wachsen und sie durch Säuerung des Milchzuckers schon in wenigen Stunden zum Gerinnen bringen, kann dieses Nährsubstrat als Anreicherungsflüssigkeit für Milchsäurelangstäbchen dienen. Durch die in kurzer Zeit gebildete beträchtliche Säuremenge müssten vor allem die Sporenbildner und die *Coli*-Bakterien in ihrer Entwicklung hintangehalten werden. Zudem wirkt die höhere Temperatur bereits hemmend auf diese Arten. Es wurden Kotverdünnungen in Milch zu 38, 45 und 48° gestellt. Nach 24 Stunden war die Milch gewöhnlich bis in die 3. oder 4. Verdünnung dick geworden und wies einen Säuregrad von ungefähr 40° in der 1. Verdünnung bis gegen 25° in der 3. oder 4. Verdünnung auf. Auf den anaeroben Ausstrichen, auf gewöhnlichem Agar, welche von den koagulierten Milchen gemacht wurden, wuchsen gewöhnlich vorwiegend Streptokokken neben *Coli*.

#### *c. Anreicherungsversuche in angesäuerter steriler Milch.*

Da anzunehmen ist, dass die Milchsäurelangstäbchen in abgeschwächtem Zustand im Kot sein werden und die Wachstumsbedingungen für sie noch nicht günstig genug sind, um neben den andern Bakterien aufkommen zu können, haben wir versucht, das pH der Anreicherungsflüssigkeit so einzustellen, dass es für das Anwachsen der Laktobazillen günstiger ist als für die Laktokokken. Aus Untersuchungen von *O. Svanberg* (76) über die Wachstumsgeschwindigkeit der Milchsäurebakterien geht hervor, dass das optimale pH der Laktokokken und dasjenige der Laktobazillen sehr nahe beieinander liegen (Opt. pH für Langstäbchen = 5,5, für *Sc. lactis* = 6,0). *O. Svanberg* hebt aber hervor, „dass in milchsäurehaltigen Medien die Laktokokken schon bei pH = 4,7 erheblich geschwächt werden, die Laktobazillen nicht, so dass, wenn die Acidität durch Milchsäuregärung hervorgerufen worden ist, die Verhältnisse bei etwa pH = 5 viel mehr zu Gunsten der Laktobazillen liegen, als wenn nur die H-Jonen-Kurven berücksichtigt werden. In noch höherem Grade ist dies in den essigsäurehaltigen Medien der Fall, woraus die besonders günstige Einwirkung dieser Säure bei der Gewinnung natürlicher Reinzuchten von *Bacterium casei* aus Kulturen, wo auch thermophile Laktokokken vorhanden sind, erhellt“. Wir haben daher das pH der Milch mit verdünnter Essigsäure auf 5 eingestellt und ihr gleichzeitig noch 0,5 % Witte-Pepton zugegeben. Auch mit diesem Nährboden konnten Langstäbchen weder angereichert noch isoliert werden.

#### *d. Anreicherungsversuche mit Schotte.*

Da die Milch wegen ihrer leichten Gerinnbarkeit nicht mit Säuren auf tiefere pH eingestellt werden kann, ohne dass sie gerinnt, wurden an ihrer Stelle Schotten verwendet. Die Schotten wurden aus Molke (Sirte) durch

Ausfällung des Albumins mit 3 Teilen 1prozentiger Milchsäure auf 100 Teile Molke hergestellt. Diese Schotten konnten nun ohne Nachteil gesäuert werden und hatten neben der Eigenschaft, für Milchsäurelangstäbchen ein gutes Nährmedium zu sein, weiter den Vorteil, dass Wachstum zufolge eintretender Trübung gut ersichtlich war. Es wurden Kotverdünnungen auf Schotten von pH 4,5; 5,0; 5,3; 5,6; 6,0 und 6,5 gemacht und zu 42° gestellt. Da auf den aus bewachsenen Verdünnungen (die im mikroskopischen Bild keine Langstäbchen aufwiesen) gemachten anaeroben Ausstrichen auf Dextroseagar auch wieder stark vorherrschend Streptokokken wuchsen (einige Ausstriche sahen sogar Reinkulturen von Streptokokken gleich), stellte sich die Frage, ob eventuell die langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien durch die in Überzahl vorhandenen Streptokokken so stark gehemmt werden, dass sie nicht zur Entwicklung zu bringen sind.

Nach z. Zt. im Gange befindlichen Untersuchungen von *R. Burri* gibt es eine Anzahl Streptokokkenstämme, die auf Langstäbchen stark hemmend wirken. *L. A. Rogers* (68) hatte schon festgestellt, dass die von *Sc. lactis* ausgeschiedene stark hemmende Substanz durch eine Kollodiummembran hindurch diffundiert, woraus zu schliessen ist, dass sie auch durch den Agarnährboden diffundieren wird und die Streptokokken-Kolonien also nicht nur in ihrer unmittelbaren Nähe Langstäbchen (Kolonien) hemmen werden.

Einige Stämme der im Kot am zahlreichsten vorhandenen Streptokokken wurden auf ihre Einwirkung auf Langstäbchen (aus Sirte) geprüft, aber bei keinem derselben konnte ein hemmender Einfluss konstatiert werden.

#### e. Anreicherungsversuche mit Malzmaische.

Wir versuchten hierauf noch mit dem von *G. Ruschmann* und *R. Koch* (70) ausgearbeiteten Anreicherungsverfahren für Milchsäurebakterien solche im Kot nachzuweisen. Das Verfahren beruht auf der Verwendung von Malzmaische als Nährboden unter streng anaeroben Bedingungen. Zu Malzmaische mit 4 % Extraktgehalt werden 2,5 % Hefeautolysat gegeben und auf pH = 5,5 eingestellt. Die Nährflüssigkeit wurde in enge Gläschen zu 10 ccm abgefüllt, so dass eine ziemlich hohe Schicht entstand. Vor dem Beimpfen wurde der Nährboden ausgekocht. Die Kotverdünnungsreihe wurde nicht auf der Nährflüssigkeit selber, sondern auf Wasser gemacht und dann überimpft, damit nicht zu stark umgeschüttelt werden musste; zudem wurden die beimpften Gläschen anaerob verschlossen. Trotz all diesen Vorsichtsmassnahmen gelang es auch mit diesem Verfahren nicht, langstäbchenförmige Milchsäurebakterien aus Kot zu isolieren. Dass die verwendete Anreicherungsflüssigkeit ein vorzüglicher Nährboden war, zeigte ein vergleichender Wachstumsversuch, wobei je ein Stamm Langstäbchen aus Sirte und „Käseinkultur“ auf die bei unsern Versuchen benützten Nährmedien angesetzt wurde. Die Malzmaische und die Peptonschotte erwiesen sich als die beiden besten Nährböden für Langstäbchen. Wenn die flüssigen Nährböden vor der Beimpfung ausgekocht und nach derselben anaerob verschlossen wurden, zeigte sich, dass die Langstäbchen auf den beiden genannten Nährmedien durchschnittlich 1—2 Verdünnungen weiter wuchsen als auf den übrigen festen und flüssigen Nährsubstraten.

#### f. Ueber das Vorkommen von langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien (*Typus Bact. casei epsilon*) im Kuhkot bei speziellen Fütterungsarten.

Wie schon bei den früheren Untersuchungen (Herbst 1932) festgestellt werden konnte, tritt kein Unterschied auf in der Kotflora bei Verfütterung

von jungem, frischem Klee gegenüber gewöhnlichem „Kunstwiesengras“. Milchsäurelangstäbchen konnten auch während der ausschliesslichen Verfütterung von Klee im Kot nicht nachgewiesen werden.

Von Interesse schien uns noch die Prüfung, ob eventuell eine Umstellung der Kotflora zu Gunsten der Milchsäurebakterien durch Verabreichung von Silofutter eintrete. Es wurden folgende Kotproben untersucht:

- 4 Proben während der Verabreichung von gew. Silofutter, im Liebefeldstall;
- 4 Proben während der Verabreichung von Silomais nach amerikanischer Art, im Liebefeldstall;
- 1 Probe während der Verabreichung von gew. Silofutter in der Waldau.
- 1 Probe während der Verabreichung von Silomais in Wildegg.

Die Proben wurden auf folgende Anreicherungs Nährböden verarbeitet und bei 38°, z. T. bei 45° bebrütet.

- a. Sterile Milch, der unmittelbar vor der Beimpfung 1<sup>0/100</sup> sterile Milchsäure zugefügt wurde;
- b. Sterile klargeschiedene Schotte auf pH = 5,2 (= Wachstumsoptimum für *Bact. casei* E) eingestellt. Die Gläschen wurden vor dem Beimpfen ausgekocht (Austreibung der Luft) und nachher anaerob verschlossen.

Auf den aus Anreicherungsflüssigkeiten hergestellten anaeroben Ausstrichen auf Dextrose-Schrägagar konnten nie Kolonien langstäbchenförmiger Milchsäurebakterien festgestellt werden. Sie wiesen vorwiegend Streptokokken- und Coli-, dann auch *Amylobacter*-Kolonien auf. Auch wenn es praktisch nicht von Bedeutung sein kann, wollten wir doch einmal untersuchen, ob bei Verabreichung von *Käsereikultur* (bei der Emmentalerkäsefabrikation verwendete Rohkultur von *Bact. casei* E von Freudenreich) mit dem Tränkewasser die Milchsäurelangstäbchen im Kot noch als lebensfähig nachweisbar seien. Während einer Woche wurden einem 1½-jährigen Ochsen morgens und abends je 1—3 Liter *Käsereikultur* gegeben. Grössere Quanten wurden leider vom Tier nicht eingenommen, schon die genannten mussten ihm eingegeben werden. Die Kotproben wurden in gleicher Weise wie diejenigen bei der Silofütterung verarbeitet. Am mikroskopischen Bild des Kotes konnte während des Versuches gegenüber vorher keine Veränderung beobachtet werden. Wie aus untenstehender Tabelle hervorgeht, traten im Kot, trotz Verabreichung von *Käsereikultur* keine lebensfähigen Milchsäurelangstäbchen auf.

Verabreichtes Quantum <i>Käsereikultur</i>		Mikr. Bild des Kotes	Anaerobe Ausstriche auf gew. Agar		Säuregrad n. Soxhlet-Henkel in Milch n. 24 Std.	Bemerkungen
morg.	abends		Coli	Streptok.		
1 1	2 1	Kurtzstäbchen, vorw. bewegl., Diplokokken, einige Langstäbchen (Sporenbildner) z. Teil beweglich	3 600 000	5 300 000	38°	Auf den anaeroben Ausstrichen aus den Anreicherungsflüssigkeiten Milch und Schotte wuchs stets ein Gemisch von Coli-Bakterien und Streptokokken. Diese waren stets in Überzahl auf den Ausstrichen aus Schotte
2 1	2 1		5 800 000	10 000 000	34°	
3 1	3 1		3 000 000	9 000 000	36°	
2 1	2 1		2 600 000	7 300 000	38°	
2 1	3 1		13 000 000	3 600 000	38°	
2 1	2 1		4 200 000	6 700 000	35°	

g. *Indirekter Beweis für das Fehlen der langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien vom Typus des Bact. casei epsilon im Kot.*

Von einer gutgewachsenen Kultur eines aus Sirte isolierten Langstäbchens wurde die Keimzahl mit Hilfe von Peptonschottenagar-Schüttelkuren und anaeroben Ausstrichen auf gewöhnlichem Agar bestimmt. Je 10 ccm sterilem Wasser wurde 1 g Kot zugegeben und diese Kotemulsion mit einer Verdünnungsreihe der Langstäbchenkultur beimpft. Das Erstellen dieser Verdünnungen erfolgte zu gleicher Zeit wie die Keimzahlbestimmung der Ausgangskultur. Nachdem dann die Keimzahl bekannt war, konnte errechnet werden, wieviel Langstäbchenkeime in jeder einzelnen Kotemulsion gewesen sein mussten. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, mit Ausgangskulturen, die 90, 650 und 120 Millionen Langstäbchenkeime enthielten. Man versuchte, die Langstäbchen einerseits in den Kotemulsionen direkt wieder nachzuweisen durch Verarbeitung dieser auf Peptonschottenagar hohe Schicht und Herstellung von anaeroben Ausstrichen auf gewöhnlichem Agar. Andererseits überimpfte man je die verbleibenden 9 ccm der Emulsionen auf Milch in Gärprobengläsern, welche zu 42° gestellt wurden. Hier konnten sich die Milchsäurelangstäbchen anreichern und waren dann leicht nachweisbar mittels anaerober Ausstriche.

Beim direkten Nachweis in den Kotemulsionen konnten mit Hilfe der Peptonschottenagarschüttelkulturen die Langstäbchen bei allen drei Versuchen bis in jene Kotemulsion nachgewiesen werden, in die noch ca. 90 bzw. 650 und 120 Keime hineingeimpft worden waren. Mit den anaeroben Ausstrichen konnten beim zweiten Versuch auch 650 Keime noch nachgewiesen werden, bei den beiden andern wurden die Langstäbchen eine Verdünnung weniger weit, also nur bis in die Emulsionen mit 900 und 1200 Keimen festgestellt.

Wie zu erwarten war, konnten die Milchsäurelangstäbchen in den Kotemulsionen durch einfache Anreicherung in Milch noch besser nachgewiesen werden. Beim zweiten Versuch gelang es, sie in der Emulsion mit 65 Keimen noch festzustellen.

Die vorstehenden Versuche zeigen, dass es möglich ist, lebensfähige Milchsäurelangstäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon* im Kot in einer Menge von 100 Keimen pro Gramm sicher nachzuweisen.

h. *Spezifisches Anreicherungsverfahren für Betabakterien.*

Während bisher Anreicherungsverfahren angewendet wurden, die besonders für die Isolierung von *Bact. casei epsilon* geeignet sind, soll im folgenden noch eine Methode zur Anreicherung von *Bact. casei gamma* und *Bact. casei delta*, welchen Orla-Jensen später die Namen *Betabact. breve* und *Betabact. longum* gab, beschrieben werden.

Nach dem Verhalten der bisher gelegentlich isolierten Betabakterien auf den gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden und auf Milch, wo sie nirgends kräftig wuchsen, und nach dem Vergärungsbild der Zuckerreihe der bereits isolierten Stämme suchten wir ein Nährmedium herzustellen, das uns die Anreicherung dieser Organismen unter möglichstem Ausschluss der andern im Kot vorherrschenden gestattete. Nach eingehenden Versuchen erhielten wir mit folgender Anreicherungsflüssigkeit die besten Resultate:

- 2 % Hefeextrakt (zuckerfrei),
- 1 % Arabinose,
- 1 % Xylose in Leitungswasser,
- pH mit HCl auf 4,0 eingestellt.



Sobald der pH auf 4,3—4,4 hinaufgeht, nehmen die Coliarten überhand. Aus den Kulturen, welche mit ca. 0,1—0,5 % Kot versetzt worden waren, wurden nach dreitägiger Bebrütung bei 30° anaerobe Ausstriche auf gewöhnlichen Fleischwasserpeptonagar gemacht. In den meisten Fällen erhielten wir sozusagen Reinkulturen von Betabakterien auf den Ausstrichen. Mit diesem Anreicherungsverfahren gelang es uns, in allen Kotproben Betabakterien nachzuweisen. Von den aus den Kotproben erhaltenen Stämmen haben wir 17 einer näheren systematischen Bestimmung unterzogen (vergl. Abschnitt k).

*i. Anreicherungsversuche für Streptobakterien.*

Die beiläufig isolierten Stämme von Streptobakterium plantarum auf Ausstrichen auf gewöhnlichem Agar veranlassten uns, den Kot auch planmässig auf das Vorhandensein von Streptobakterien zu untersuchen. Orla-Jensen unterscheidet neben dem Genus Thermobacterium ein Genus Streptobacterium. Die Streptobakterien wachsen im Unterschied zu den Thermobakterien weniger gut in Milch, dafür besser in Hefeextrakt, vergären Lactose zuweilen nicht, wachsen in kürzeren oder längeren Ketten und bilden inaktive oder rechts Milchsäure wie die Thermobakterien inaktive oder links Milchsäure bilden. Die Streptobakterien umfassen die beiden Species: Sbm. plantarum und Sbm. casei. Sbm. plantarum, welches auf Pflanzen vorkommt, unterscheidet sich von Sbm. casei, dem Bact. casei alpha hauptsächlich dadurch, dass es das Casein nicht abzubauen vermag. Da G. Ruschmann und R. Koch anlässlich von Untersuchungen über den Nachweis und die Verbreitung von Milchsäurebakterien auf den zur Einsäuerung gelangenden Grünfütterpflanzen das zahlreiche Vorkommen von Sbm. plantarum beobachten konnten und diese Organismen vornehmlich bei der Grünfütterung voraussichtlich in grossen Mengen in den Darmtraktus der Kühe gelangen, besteht die Möglichkeit, dass sie, trotzdem sie wahrscheinlich im Dünndarm sehr stark dezimiert werden, im Kot z. T. noch in lebensfähigem Zustand vorhanden sind.

Mit Hilfe von Anreicherungen in 2 % Hefeextrakt vom pH = 4,0, dem anfänglich Mannit und Sorbit (je ½ %), später 1 % Maltose, zugegeben wurde, konnten aus 42 Kotproben verschiedener Herkunft während der Grünfütterungsperiode nur 5 Mal Streptobakterien isoliert werden. (Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Vornahme von Isolierungsversuchen während der Heufütterung noch weniger Sbm. plantarum im Kot gefunden werden.)

Die vorliegenden Befunde berechtigen zu der Annahme, dass Sbm. plantarum nur beiläufig (und nur während der Grasfütterung) Anteil an der Kotflora hat.

*k. Bestimmung der isolierten stäbchenförmigen Milchsäurebakterien.*

Von den isolierten Milchsäurestäbchen aus Kuhkot wurden insgesamt 40 einer Prüfung auf ihr Vergärungsvermögen von Zuckern unterzogen. Nach deren Ergebnis, sowie nach ihren weiteren Eigenschaften verteilen sich die Stämme auf folgende nach Orla-Jensen umschriebenen Species:

- 8 Streptobakterium plantarum,
- 1 Streptobakterium casei,
- 21 Betabakterium breve,
- 10 Betabakterium longum.

*Die Streptobakterien.* Das Vergärungsbild dieser Gruppe ist nicht sehr einheitlich. Gemeinsam ist allen Stämmen, in Uebereinstimmung mit der

Beschreibung von Orla-Jensen, dass sie Maltose mit Vorliebe vergären. Die Stämme 305 und 306, welche ein Jahr vor ihrer Prüfung auf das Zuckervergärvermögen isoliert worden sind und in dieser Zeit möglicherweise die Eigenschaft, Pentosen zu vergären, verloren haben, unterscheiden sich in diesem Punkt von den übrigen 6 Stämmen.

In morphologischer Hinsicht wuchsen die Bbm. plantarum-Stämme auf gew. Agar meist in kürzeren, in gew. Bouillon in etwas längeren, oft stark geknickten Ketten. Sie zeichnen sich durch ein verhältnismässig gutes Oberflächenwachstum auf gewöhnlichem Agar aus, wo sie bis 1 mm grosse, erhabene, mattglänzende, milchig-weiße Kolonien bilden. In den Schüttelkuren auf hoher Schicht wuchsen alle Stämme fakultativ anaerob. Nach Orla-Jensen sollten die Streptobakterien „in der Regel auch gut in Milch wachsen“ (ausser in Hefeextrakt). Die Stämme 305 und 306 haben nach ihrer Isolierung Milch koaguliert; nachdem sie ein Jahr auf gew. Agar und gew. Bouillon weitergezüchtet worden sind, verloren sie diese Fähigkeit. Die übrigen 6 Stämme säuern die Milch alle leicht, koaguliert wird sie dagegen nur von den Stämmen 324, 331 und 338. Die Stämme haben ihr Temperaturoptimum bei 30°, wachsen indessen auch bei 20° noch gut. Der Stamm 307 musste zufolge seines beträchtlichen Caseinabbauvermögens (Zuwachs an löslichem N = 11,5 %, an Amino-N = 9,4 % des Gesamtstickstoffs) zur Species Sbm. casei (der von Freudenreichschen Art Bact. casei alpha) gerechnet werden. In seinen weiteren Eigenschaften stimmt er mit dem von *M. Duggeli* (25) beschriebenen Milchsäurestäbchen aus dem armenischen Mazun, das von Orla-Jensen ebenfalls als Sbm. casei angesprochen wurde, besonders auch im Gärbild überein. Die Gärungsmilchsäure der Streptobakterien 305 und 329, welche auf das optische Drehvermögen geprüft wurde, erwies sich bei beiden Stämmen inaktiv. Da sich die übrigen 6 ebenfalls als Streptobakterien bestimmten Stämme in den übrigen Eigenschaften nicht von den Nummern 305 und 329 unterscheiden, haben wir diese 8 Streptobakterien alle zur Species Sbm. plantarum gehörig angesehen. Diese Species sollte nach Orla-Jensen kein Casein abbauen. Bei den Prüfungen auf das Eiweissabbauvermögen wiesen indessen die Stämme Nr. 305 und besonders Nr. 329 (Zuwachs an löslichem N = 1,4 bzw. 3,8 %, an Amino-N = 0,85, bzw. 2,0 %) einen leichtern Caseinabbau auf, was darauf hindeutet, dass die Stämme der Species Sbm. casei nahestehen.

*Die Betabakterien.* Das Vergärungsbild dieser Gruppe fällt auf durch die geradezu regelmässigen Lücken im Vergärvermögen der Hexosen, derjenigen Zucker also, die, wenn Bakterien überhaupt Kohlehydrate angreifen, normalerweise zuerst vergären werden. Die wichtigsten Zucker wurden anlässlich der ersten Prüfung von den einzelnen Stämmen nach folgender Häufigkeit vergoren.

Laevulose	Dextrose	Mannose	Galactose	Lactose	Maltose
58,0 %	64,5 %	25,8 %	48,4 %	42,5 %	96,8 %

Alle Stämme (bis auf 310 und 322) haben Maltose vergoren, ein Disaccharid, das vermutlich zuerst enzymatisch in 2 Moleküle Dextrose gespalten werden muss, bevor es weiter vergoren werden kann. Dextrose selber wurde dagegen nur von 64,5 % der Stämme vergoren. Während die Stämme 309, 313, 315 und 318 neben den Pentosen Xylose, bzw. Arabinose überhaupt nur noch Maltose vergoren haben, hat Stamm 310 umgekehrt diese nicht gespalten, dafür nur die Pentosen vergoren. Woher rühren die häufigen unerklärlichen Defektstellen im Vergärvermögen dieser Bakteriengruppe? Die von Orla-Jensen untersuchten Betabakterienstämme, welche aus Kot, Käse, Kefir, sauren Kartoffeln

und Rüben etc. isoliert wurden, weisen die gleichen Verhältnisse im Vergärvermögen auf, wie die unsrigen. Wir können uns als Ursache für die häufigen Defektstellen im Vergärvermögen der Betabakterien nur die Einwirkung der Standortsumgebung auf die Organismen denken. Bei den aus Kot herrührenden Stämmen wäre eine solche Einwirkung durch Salzsäure, Galle, bakterielle Stoffwechselprodukte, Bakteriophagen etc. möglich. Eine derartige Beeinflussung des physiologischen Verhaltens muss natürlich auch für alle andern im Darmtraktus vorhandenen Arten eingeräumt werden, nur wirkt sie offenbar nicht auf alle gleich stark ein. Widerstandsfähige oder angepasste wie die sog. endemischen Arten werden durch diese Einflüsse naturgemäss weniger beeinträchtigt, abgesehen davon, dass sich diese Species, z. B. Coli und Streptokokken, erst in den unteren Darmpartien vermehren, wo ein Teil der erwähnten schädigenden Faktoren nicht mehr vorhanden ist. Es erscheint uns diese Erklärung umso wahrscheinlicher, als, wie hier ausdrücklich festgestellt sei, die Lücken im Gärbild der Betabakterien aus Kuhkot nur konstatiert werden können, wenn die Organismen unmittelbar oder doch kurze Zeit nach der Isolierung auf ihr Zuckervergärvermögen geprüft werden. Sind sie eine Zeitlang auf den gebräuchlichen Laboratoriumsnährböden weitergezüchtet worden, so hat, wie wir festgestellt haben, bereits eine Erweiterung des Vergärvermögens stattgefunden und es werden alsdann besonders die Hexosen gewöhnlich lückenlos vergoren. Orla-Jensen unterscheidet zwischen:

- a. Arabinose vergärende Stämme = *Bbm. breve*;
- b. Arabinose nicht vergärende, dafür Xylose vergärende Stämme = *Bbm. longum*.

In diesem Sinne verteilen sich unsere 31, als Betabakterien bestimmten Stämme auf:

21 *Bbm. breve*,  
10 *Bbm. longum*.

Nicht alle unsere Xylose vergärenden Betabakterien (*Bbm. longum*) waren, wie Orla-Jensen in seiner Umschreibung der Arten angibt, augenfällig länger als die Arabinose vergärenden. Bei 6 der 10 *Bbm. longum*-Stämme waren die Kettenglieder nicht länger als bei den *Bbm. breve*. Da wir weiter keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Species feststellen konnten und Orla-Jensen auch keine solchen anführt, besteht vom praktischen Standpunkt aus betrachtet, kein dringendes Bedürfnis, zwischen einem *Bbm. breve* und einem *Bbm. longum* zu unterscheiden. Die Gärungsmilchsäure der Stämme 309, 313 und 325, die auf die optische Aktivität geprüft wurde, erwies sich bei allen 3 Stämmen inaktiv.

Parallel zu der geringen Vergärfähigkeit der einfachen Zucker geht das teilweise schwache Oberflächenwachstum der Betabakterien auf gewöhnlichem und Dextroseagar. Bei den nur Maltose oder nur Pentosen vergärenden Stämmen sind die Kolonien auf diesen Nährböden bei einzelnen Stämmen kaum sichtbar. Wird dem gewöhnlichen Agar gerade jener Zucker zugesetzt, den die betr. Art mit Vorliebe vergärt, so wird das Oberflächenwachstum etwas deutlicher. Auf gewöhnlichem Agar wurden die Kolonien im allgemeinen bis  $1\frac{1}{2}$  mm gross im Durchmesser, von anfangs bläulicher, später gelblicher Farbe. Die Stämme 320 und 321, welche schon durch ihr sehr schwaches Vergärvermögen auffallen, zeichnen sich auch durch besondere, scheinbar leicht zerfliessende, an Sporenbildner erinnernde, nur viel schwächere Kolonien aus.

Das Kohlehydratvergärungsvermögen der Strepto- und Betabakterien aus Kuhkot. Tabelle VI.

Stämme	Glycerin	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Sorbit	Mannit	Lactose	Dextrose	Mannose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Salzin	Säurebild. in Milch	Nadelstichprobe, Kollor in Agar mit Anzeigegläsch	Species
301			3,4				4,0	4,5	3,6	4,0	4,0	5,2	2,9	4,0	—	—	—	—	2,9	—	breve
302		2,4	0,9				4,8	2,7	1,1	4,8	4,0	2,9	2,2	2,9	1,1	2,2	—	1,1	2,7	—	longum
303			2,9				5,6	3,8		3,2	3,8	4,0	5,0	2,9	—	—	—	—	9,0	—	breve
304	1,1		7,9				3,6	5,4		5,0	3,2	4,1	6,8	2,0	—	—	—	—	1,8	—	breve
305						0,9	5,6	5,6	4,0	5,4	4,5	5,6			7,2		0,9	0,9	2,7	—	plantarum
306							3,4	5,2	2,5	5,6		3,4	3,6		5,4		1,1	1,1	4,6	—	plantarum
307							2,5					0,9	3,6		0,4				11,1	—	casei
308		5,6	7,6									4,0							1,8	+	breve
309			5,0																3,4	+	breve
310		3,4	4,0									4,0							2,8	+	breve
311			4,0									0,7							3,1	+	breve
312		5,6	6,8					0,7	0,7			4,3							2,0	—	breve
313		1,4				2,2	4,5	4,5	5,2	6,3	4,7	7,4	3,4				1,1		3,6	+	longum
314			6,8									4,5							10,1	—	breve
315		3,4	5,6				1,4					4,5							1,8	+	breve
316		2,2	4,5				3,2	4,0				3,6							2,0	+	breve
317		4,0					4,0					5,6							2,0	+	longum
318		3,1	3,4					4,0		3,7	4,0	5,6	2,4						11,1	+	longum
319		5,2				0,7	4,0		1,1	0,7		1,8	0,9						1,6	+	breve
320			1,3									0,9							1,8	+	breve
321		1,8	1,1					1,8	2,0		1,3								3,4	+	breve
322		1,8	3,4					4,0			3,7								3,4	+	breve
323		5,6	3,4					4,0	4,0		3,4	4,5	5,2						3,4	+	breve
324		0,7						2,2	2,4		4,0	4,6					0,9		2,2	—	plantarum
325		5,6				0,9	3,4	3,8			3,6	4,0							11,3	+	longum
326		3,2					2,5	1,1			3,4	4,5							2,2	+	longum
327		7,6	3,8				3,8	4,5		2,9	4,5	4,5	1,1						2,7	+	breve
328		2,9	2,5							3,8	5,2	5,2							3,4	+	breve
329	0,9	0,7	1,1			4,1	4,7	4,0	4,2	3,4	2,4	5,2	2,0	2,0	1,8				1,8	+	plantarum
330	2,9	6,8	5,2			0,9	4,5	4,0	4,0	3,6	3,6	6,6	2,0	0,9			2,2		4,0	—	plantarum
331							3,4	4,5	4,0	4,0	4,0	4,5	3,4						9,0	—	plantarum
332		2,7					4,0	3,4		4,0	4,0	5,6		3,1					2,7	—	longum
333								4,5		2,9	4,5	2,4							4,8	—	plantarum
334		3,4	3,2				4,0	3,4	2,0	3,4	4,5	6,3							2,2	+	breve
335		2,9	2,9				2,7	4,5		3,4	2,9	4,5							2,5	+	breve
336		5,2					3,4	4,0		4,2	2,2	5,0	3,2						1,8	+	longum
337		4,5	6,8				3,4	1,8		0,4	2,2	3,8		3,4	1,3				2,7	+	breve
338						3,6	8,1	9,0	7,9	7,9	5,6	9,5	5,6		8,6		3,1		10,1	+	plantarum
339		4,0					6,8	9,0		4,5	7,4	5,2	4,5	3,4	1,1				3,8	—	longum
340		3,6						9,0	8,1	5,6	7,4	5,8	7,4	4,5					13,5	+	longum

Um die Stämme auf ihr Gasbildungsvermögen zu prüfen, haben wir sie auf gewöhnliche Bouillon mit je 0,5 % Arabinose-, Xylose- und Maltose-Zusatz und auf den entsprechenden Agar verimpft. Während auf der Bouillon nur mehr die Stämme 302, 309, 310, 313 und 319 Gas gebildet haben, sind die Stämme, welche eine positive Nadelstichprobe geben, im Agar mit dem Zuckergemisch zahlreicher (22) wie aus Tabelle VI ersichtlich. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, sind es nicht nur *Bbm. longum*-Stämme (= früheres *Bact. casei delta*), die eine positive Nadelstichprobe geben, sondern auch einige Vertreter von *Bbm. breve*. Wir bemerken, dass die Stämme, mit wenigen Ausnahmen, während den ersten Tagen nach ihrer Isolierung in gewöhnlicher oder Dextrose-Bouillon Gas produziert haben. Sie verloren das Gasbildungsvermögen in diesen Nährböden z. T. jedoch bald. Dieses Verhalten stimmt ganz mit diesbezüglichen Beobachtungen Orla-Jensens überein und erscheint charakteristisch für Betabakterien. Nach eingehenden Untersuchungen haben *R. Burri* und *W. Staub* (14) die Eigenschaften von *Bact. casei delta* von Freudenreich näher umschrieben. Sie beobachteten, dass sämtliche bei 20° gehaltenen delta-Kulturen in Peptonschotte nach 3 Tagen leichte Trübung aufwiesen, während alle Stämme nur mässige Trübung zeigten, wenn sie bei 30° bebrütet wurden. Milchkulturen, welche 14 Tage bei 20° und 30° bebrütet wurden, zeigten keine Spur von Gerinnung, während die gleichen Stämme bei 42° bebrütet, alle Milch zur Gerinnung brachten, wenn ihnen genügend Zeit gelassen wurde. Ueber das Gasbildungsvermögen von *Bact. casei delta* äussern sich die beiden Autoren wie folgt: „Nach unseren bisherigen Erfahrungen wird durch *Bact. casei delta* in Nährböden immer Gas gebildet, falls Milchzucker vorhanden ist und es gleichzeitig nicht an einer geeigneten Stickstoffquelle fehlt“ (l. c. p. 634). Es fiel ihnen weiter auf, dass in einer an und für sich günstigen Nährflüssigkeit wie z. B. Peptonschotte weniger Gas gebildet wird, als in einem festen Nährboden, z. B. Peptonschottenagar. „Wir sind zur Annahme geneigt, dass die Ueberlegenheit des festen Nährbodens unmittelbar mit der gallertigen Beschaffenheit der Masse zusammenhängt“. Weiter konnten *R. Burri* und *W. Staub* beweisen, dass das von *Bact. casei delta* gebildete Gas nur aus Kohlensäure besteht.

Anlässlich der Isolierung der Betabakterien aus Kuhkot beobachteten wir, dass nur wenige Stämme auf Peptonschotte, dagegen alle mehr oder weniger gut auf gewöhnlicher Nährbouillon wachsen. Als wir später alle 31 Betabakterien von einer 48 Stunden alten Bouillonkultur auf Peptonschotte überimpften, wuchsen 16 Stämme nicht oder nur sehr schwach, wogegen die übrigen 24 kräftiger wuchsen auf Peptonschotte als auf Bouillon. Von 11 Stämmen, welche nach ihrer Isolierung bei 20 und 30° Milch innert wenigen Tagen dicklegten, hatten 6 nach einigen Wochen diese Eigenschaft verloren. Die Bebrütung der Milchkulturen bei 42° bestätigte dagegen die von *R. Burri* und *W. Staub* gemachte Beobachtung, dass das Milchkoagulationsvermögen bei höherer Temperatur ausgeprägter vorhanden ist, indem von den 31 Milchkulturen bei dieser Temperatur 17 innerhalb einer Woche koaguliert waren, wogegen von den zur gleichen Zeit angelegten Kulturen bei 20 und 30°, wie schon erwähnt, nur noch 5 dick wurden.

Im weiteren fand auch das von *R. Burri* und *W. Staub* entdeckte bessere Gasbildungsvermögen des *Bact. casei delta* auf festen Nährböden durch unsere Untersuchungsergebnisse eine Bestätigung, indem von 31 Betabakterienstämmen im Agar mit dem Zuckergemisch 22, in Bouillon mit dem Zuckergemisch dagegen nur 9 Gas bildeten.

1. Ueber das Diacetyl + Acetylmethylcarbinolbildungsvermögen der Betabakterien.

Anlässlich der Versuche zur Isolierung der Diacetyl + Acetylmethylcarbinol bildenden Organismen aus Kuhkot (siehe Kapitel: Betakokken und Tetrakokken) wurde festgestellt, dass die gramnegativen Organismen des Kuhkotes diese Eigenschaft nicht besitzen, weil sie der Coli- und nicht der Aerogenes-Art angehören. Dagegen konnten aus den Diacetyl + Acetoinpositiven Kuhkotproben (Kulturen in Milch mit 0,5 % Citronensäure) neben einigen als Tetrakokken bestimmten Organismen mehrheitlich Betabakterien isoliert werden, die als Reinkulturen in Milch die für das Butteraroma typischen Produkte bildeten. Während auch unter Benützung des Anreicherungsverfahrens mit Milch, die durch Zusetzen von steriler Citronensäure auf pH = ca. 4,0 gebracht wurde, in Bestätigung der früheren Ergebnisse (vergl. dieses Kapitel, b) aus allen untersuchten Kotproben Betabakterien isoliert werden konnten, besaßen dagegen nicht alle isolierten Stämme das Vermögen, Diacetyl + Acetylmethylcarbinol zu bilden. Von insgesamt 22 mit dem angegebenen Kulturverfahren gewonnenen Betabakterien verhielten sich in dieser Hinsicht 7 stark positiv und 15 negativ oder nur sehr schwach positiv, d. h. nur ca.  $\frac{1}{3}$  der Stämme vermochte als *Reinkultur* in Milch den Butteraromastoff in beträchtlicher Menge zu produzieren. Einige der 15 Stämme ohne Diacetyl- bildungsvermögen, worunter namentlich solche, die Milch nicht koagulierten, wurden auch in Mischkulturen mit einem säuernden Streptokokkus zusammen Diacetylnegativ befunden. Dagegen bildeten sie teilweise etwas mehr flüchtige Säuren, entsprechend 0,5 bis 0,7 ccm n/20 NaOH (normal = 0,3 ccm n/20 NaOH). Ueber die Eigenschaften der Diacetyl-positiven Stämme, die nach den oben beschriebenen Verfahren sowohl auf das Vermögen flüchtige Fettsäuren, als dasjenige Diacetyl + Acetoin bilden zu können, geprüft wurden, orientiert nachstehende Tabelle:

Stamm	Flüchtige Säuren *)	Diacetyl + Acetoin
I	1,4	+++
II	1,1	+++
III	0,9	++
IV	0,8	+
V	1,2	++
VI	1,2	++
VII	1,0	+++

\*) Die Zahlen bedeuten Anzahl ccm n/20 NaOH, die zur Neutralisation der ersten 10 ccm Wasserdampfdestillat aus 50 ccm Kultur nötig waren.

Die Kulturen wurden meistens bei 20° bebrütet, einzelne mit gleichem Erfolg bei 30°. Wir beobachteten anfangs, dass Kulturen, welche bei 20° nach 4 Tagen noch negativ waren, später positiv wurden, was uns veranlasste, von da ab die Kulturen erst nach Stägiger Bebrütung zu untersuchen. Mit Ausnahme von Stamm IV vermochten sämtliche Stämme als Reinkulturen in steriler Milch kräftig Diacetyl + Acetoin zu bilden. Diese Eigenschaft der Stämme verstärkte sich noch ein wenig, wenn die Reinkulturen in Milch mit 0,3 % Citronensäure angesetzt wurden. Daneben gab, wie erwähnt, das Destillat aus der Milchkultur einiger Stämme nach dem Zusatz des Nickelsalzes einen so schwachen roten Niederschlag, dass diese Stämme nicht als Diacetyl + Acetoin positiv angesprochen werden konnten.

*m. Ueber das Vorkommen von Mikrobakterien im Kuhkot.*

Der Vollständigkeit halber möchten wir auch unsere Beobachtungen über das Vorhandensein von Mikrobakterien im Kuhkot anführen, obwohl eine ganz neue Arbeit über das Vorkommen dieser Bakterien in Fäkalien, speziell auch in Kuhkot von A. Wittern (88) Aufschluss gibt. In der älteren Literatur wird diese Organismengruppe ausser von *Orla-Jensen* (60), der ihr die Genusbezeichnung „Mikrobakterien“ gab, nur beiläufig von *Weigmann* und *Wolf* (84) erwähnt. Schon im Jahre 1905 fielen diese Organismen *R. Burri* anlässlich von Untersuchungen pasteurisierter Milch auf und wurden von ihm als „hitze-resistente Kurzstäbchen“ bezeichnet. Hinsichtlich Oberflächenwachstum und in physiologischer Beziehung stehen die Mikrobakterien den Tetrakokken nahe, und sind auch im Grenzgebiet der Milchsäurebakterien.

Von A. Wittern (88, p. 444) wurde betreffs des Vorkommens gefunden, „dass die Mbn. in Milch, Milchprodukten, *Fäkalien* und auf Gräsern selten vorhanden sind“. Aus im ganzen 10 untersuchten Fäkalproben konnten mit Hilfe von Anreicherungsverfahren

- 2 Stämme Mbm. lacticum und
- 1 Stamm Mbm. flavum

isoliert werden und aus Kuhstall-Luft 2 Stämme Mbm. lacticum und 3 Mbm. flavum.

Neben der Widerstandsfähigkeit gegenüber höhern Temperaturen haben die Mikrobakterien auch das Wachstumsvermögen bei höhern Salzkonzentrationen gemeinsam mit den Tetrakokken. Aus diesem Grunde haben wir bei der Isolierung der Tetrakokken aus Kot in der Anreicherungsflüssigkeit — gewöhnliche Bouillon oder Peptonschotte + 15 % NaCl — oft auch Mikrobakterien neben den Mikrokokken vorgefunden. Unter 25 Kotproben, die zur Anreicherung von Tetrakokken in die genannten Nährflüssigkeiten verimpft wurden, enthielten 18 nach 3—4tägiger Bebrütung bei 30° neben den gesuchten Tetrakokken auch Mikrobakterien.

In ähnlicher Weise erhielten wir anlässlich der Isolierung der Tetrakokken aus Milch 5 Stämme Mikrobakterien (aus 10 Einzellieferantenmilchen) und aus eintägigen Käsen 4 Stämme (aus 9 Käsen). Die Bestimmung der Stämme ergab folgende Verteilung auf die *Orla-Jensenschen Species*: Mbm. lacticum und Mbm. flavum:

Stämme aus	Kot	Milch	Käse
Mbm. lacticum . . .	11	3	2
Mbm. flavum . . .	7	2	2

Mbm. lacticum, so benannt, weil es häufig in Milch vorkommt, hat weisses bis gelblich-weisses Oberflächenwachstum, Mbm. flavum bildet gelbe Kolonien; beide Mikrobakterien sind sehr kleine Stäbchen, morphologisch ähnlich bestimmten Propionsäurebakterien, jedoch etwas plumper als diese. Die dritte *Orla-Jensensche* Mikrobakterienart Mbm. mesentericum mit runzeligem Oberflächenwachstum wurde nie beobachtet.

*Orla-Jensen* charakterisiert die Mikrobakterien als meistens Nitrat reduzierende und Katalase bildende Organismen. Während alle unsere Stämme, sowohl die aus Kot wie die aus Milch und Käse herrührenden, Katalase-positiv waren, — viele Stämme spalteten das Wasserstoffsperoxyd sehr stürmisch und verhielten sich gleich wie die Tetrakokken — war anderseits das Nitrat-reduktionsvermögen weniger regelmässig vorhanden als bei den Mikrokokken.

Von den 18 aus Kot stammenden Mikrobakterien reduzierten nur 8 Nitrat und unter 9 Stämmen aus Milch und Käse waren 5 reduzierende. Das Nitratreduktionsvermögen wurde in einwöchigen Kulturen in gewöhnlicher Fleischbouillon mit 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub> KNO<sub>3</sub>-Zusatz mit dem Nitritreagens Sulfanilsäure + Naphtylamin geprüft. Da das Reagens sehr empfindlich ist, und im positiven Falle normalerweise ein tief roter Niederschlag entsteht, haben wir nur eine tiefrote Färbung noch als positive Nitratreduktion angesprochen, wogegen eine rosarote Färbung als negativ taxiert wurde. Von den 27 auf Hitzeresistenz geprüften Mikrobakterien hielten 15 (10 aus Kot und 5 aus Milch) eine Temperatur von 60° C während 30 Minuten und 4 (3 aus Kot und 1 aus Milch) eine solche von 70° während 20 Minuten aus. Das Aesculinspaltungsvermögen von 7 Stämmen (6 aus Kot, 1 aus Milch) weist daraufhin, dass die Gruppe der Mikrobakterien der endemischen Darmflora sehr nahe steht.

Wenn die Mikrobakterien zahlenmäßig nur einen kleinen Anteil an der Gesamtflora des Kuhkotes haben, so treten sie nach unsern Feststellungen im Kot doch etwas häufiger auf, als man nach den Untersuchungen von A. Wittern annehmen musste.

### Ueber die Mikroflora des Kälberkotes.

Das Fehlen der langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien in den Faeces ausgewachsener Rinder, wie es sich bei unsern hierüber durchgeführten Untersuchungen ergab, veranlasste uns, die Milchsäurebakterienflora beim Milchkalb und deren durch die Verabreichung abnehmender Milchmengen bedingte Veränderungen einer Prüfung zu unterziehen.

Der Nachweis der drei verschiedenen Typen von Milchsäurelangstäbchen: *Bact. casei epsilon*, *casei alpha* und *casei delta* von Freudenreich auf den Kälberlabmägen durch *J. Thöni* (78) wies auf das Vorkommen dieser Gruppe im Verdauungskanal des Milchkalbes hin. Schon *P. Ankersmit* (l. c. p. 40) hebt auf Grund seiner eingehenden Untersuchung der Flora in den verschiedenen Darmabschnitten bei 4 Milchkalbern den bedeutenden Unterschied gegenüber den Feststellungen beim erwachsenen Rind hervor.

„Zunächst sind die Keimzahlen im Labmagen des Milchkalbes bedeutend höher als diejenigen der entsprechenden Abteilung beim Rinde, welche Tatsache namentlich bedingt wird durch das Auftreten der säurebildenden von *B. Güntheri* verschiedenen Stäbchen, die offenbar identisch sind mit einem Teil der als „acidophile“ Bakterien in der Literatur erwähnten Arten“. „Man muss den Eindruck gewinnen, dass im Mastdarm und sehr wahrscheinlich auch im Blinddarm des Kalbes normalerweise eine starke Bakterienvermehrung vor sich geht, an welcher die nicht gasbildenden kräftigen Säurebildner den Hauptanteil nehmen, während die Vertreter der *Coli*-Gruppe eine untergeordnete Rolle spielen.“

Wie schon das mikroskopische Bild des Kälberkotes erwarten lässt, haben wir es hier mit einem bedeutend keimreicheren Material zu tun als beim Kuhkot. Wir mussten daher immer 3—4 Zehntelsverdünnungen mehr anlegen als beim Kot der Kühe, um die Keimzahlen bestimmen zu können. Einige Proben von verschiedenen alten Kälbern und später periodisch gefasste (beim gleichen Kalb) wurden auf folgende Nährböden verarbeitet. Von allen Proben wurden Schüttelkulturen auf Peptonschottenagar und anaerobe Ausstriche auf gewöhnlichem Agar gemacht. Ausserdem wurden zuweilen Kulturen in Peptonschotten unter anaerobem Verschluss und in Milch angelegt. Zur Bestimmung des Colititers verwendeten wir gewöhnlich die Gentianaviolett-Galle-Pepton-Milchzuckerlösung nach *Kessler* und *Svenarton* (44).



**Periodische Untersuchung der Kotflora eines Kalbes.**

*Tabella V.*

Alter des Kalbes	Fütterung	Bact. bifidum	Stäbchenförmige Milchsäurebakterien vom Typus d. Bact.			Streptokokken	Coli-Arten
			casei epsilon	casei alpha	casei delta		
2 Wochen	Milch . . . . .	1 000 000 000	7 000 000 000	200 000 000	—	—	ca. 1 000 000 Gasbildung unregelmäss.
1 Monat	Milch, wenig Heu . . . . .	8 000 000 000	30 000 000 000	300 000 000	—	100 000	nirgends Gas
1½ Monat	Milch, Heu . . . . .	300 000 000	500 000 000	—	1 000 000	5 000 000	10 000 000
3 Monate	Milch, Heu, Kraftfutter . . . . .	40 000 000	—	500 000 000	4 000 000	1 000 000	100 000 000
4 Monate	Milch, Heu, Kraftfutter . . . . .	300 000	—	30 000 000	3 000 000	6 000 000	10 000 000
5 Monate	Milch, Heu, Kraftfutter . . . . .	70 000 000	—	4 000 000	weniger als 10 000	8 000 000	10 000 000
6 Monate	wenig Milch, Heu, Kraftfutter	20 000	—	weniger als 10 000	300 000	10 000 000	1 000 000 000
7 Monate	wenig Milch, Heu, Kraftfutter	weniger als 1 000	—	weniger als 1 000	800 000	700 000	100 000 000
8 Monate	wenig Milch, Heu, Kraftfutter	weniger als 1 000	—	weniger als 1 000	200 000	12 000 000	1 000 000 000

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die fortlaufende Entwicklung der Flora im Kot des 1—8 Monate alten Milchkalbes sind in Tabelle V zusammengestellt. Nach unseren Feststellungen ist das *Bact. bifidum* (Tissier 1899) der vorherrschende Organismus in den Faeces des Milchkalbes und geht in der Zahl erst mit dem fortschreitenden Entzug der Milch zurück. *Bact. bifidum* ist ein charakteristisches grampositives Stäbchen, das in der Regel verzweigt ist, mit keulenförmig angeschwollenen Enden und ausgesprochen anaerobes Wachstum aufweist. Es bildet in Peptonschottenagar hoher Schicht linsenförmige oder gelappte, im Durchmesser bis 2 mm grosse Kolonien. Auch P. Ankersmit traf diesen Organismus im Mastdarm des Milchkalbes. „Die C-Kultur liess neben den vorherrschenden Kolonien des Säurestäbchens ziemlich viele Kolonien der oben genannten verzweigten Bakterien erkennen“ (l. c. p. 39). Neben dem *Bact. bifidum*, und dieses in einzelnen Fällen an der Zahl übertreffend, finden sich die Milchsäurestäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon*, *casei alpha* und *casei delta* im Kälberkot. Wir haben die drei Typen anlässlich unserer Untersuchungen nur nach dem Säurebildungsvermögen in Milch und nach dem kulturellen und morphologischen Verhalten unterschieden. Die Milchsäurestäbchen, die als Typus *Bact. casei epsilon* angesprochen wurden, koagulierten Milch innert 12 Stunden bei 38° und bildeten 70—90 Säuregrade (Soxhlet-Henkel). Die als *Bact. casei alpha* bestimmten Stäbchen koagulierten die Milch gewöhnlich in 1—3 Tagen, während die *Bact. casei delta*-Stämme dafür noch längere Zeit brauchten oder Milch gar nicht koagulierten und gewöhnlich eine positive Nadelstichprobe gaben, d. h. wenig Gas bildeten. Es fällt auf, dass die Milchsäurestäbchen vom Typus des *Bact. casei epsilon* sowohl beim periodisch untersuchten Kalb (vergl. Tabelle V), wie auch bei andern gleich alten Tieren, von einem bestimmten, relativ frühen Zeitpunkt ab, ungefähr im dritten Monat, wo schon eine gewisse Menge Heu verzehrt wird, in den Faeces nicht mehr zu finden sind. Demgegenüber ist das *Bact. casei alpha* während einer längeren Periode im Kot vorhanden. Es geht an der Zahl erst stark zurück mit dem Entzuge der Milch, während das *Bact. casei delta* auffälligerweise erst nach den ersten geringen Rauhfutteraufnahmen in beträchtlicher Anzahl festgestellt werden konnte. Die Streptokokken scheinen anfänglich überhaupt nicht, jedenfalls nur in geringer Zahl, vorzukommen, nehmen aber dann gegen das Ende der Periode, während welcher Milch verabreicht wird, eine vorherrschende Stellung ein. Es sei erwähnt, dass wir hier im Unterschied zu der Streptokokkenflora des Kuhkotes, wo der *Sc. bovis* stark vorherrscht, auch den *Sc. faecium* recht häufig angetroffen haben. Die *Coli*-Arten treten schon im Anfang in beträchtlicher Zahl auf. Wie wir beobachten konnten, werden sie jedoch in den Schüttelkulturen auf Peptonschottenagar durch die grosse Anzahl kräftiger Säurebildner, wie sie in der ersten Zeit im Kot auftraten, gehemmt, so dass je nachdem in der ganzen Verdünnungsreihe, oder nur in bestimmten Verdünnungen die Gasbildung unterbleibt.

Zusammenfassend ergibt sich aus der periodischen Untersuchung der Flora des Kälberkotes, dass in der Zeit ausschliesslicher Milchnahrung die kräftig Milchsäure bildenden, stäbchenförmigen Bakterien vorherrschen. Sie büssen ihre Vorherrschaft in dem Masse, wie die Milch durch Kraft- und Rauhfuttermittel ersetzt wird, ein und es stellt sich die Kotflora des Jungtiers ein, die durch das Vorherrschen der *Coli*-Arten neben beträchtlichen Mengen Streptokokken und Betabakterien gekennzeichnet ist.

## C. Das Vorkommen von Propionsäurebakterien.

### 1. Bisherige Untersuchungen.

Die Propionsäurebakterien wurden 1906 von *Freudenreich* und *Orla-Jensen* (30) zum ersten Mal im Landwirtschaftlichen Jahrbuch der Schweiz beschrieben. Die Untersuchungen der beiden Autoren erstrecken sich auf die nähere Beschreibung von 3 Bakterienarten, die dieser Gruppe angehören, und auf die Ausarbeitung eines Anreicherungsverfahrens für Propionsäurebakterien. Ihre Anreicherungsflüssigkeit weist folgende Zusammensetzung auf:

- 1 l Wasser,
- 20 g Pepton Witte,
- 2 g Dikalziumphosphat,
- 5 g Kochsalz,
- 20 g milchsaurer Kalk.

Mit diesem Nährmedium gelang es ihnen, die Propionsäurebakterien vorab aus Emmentalerkäse, dann auch aus Naturlab, Milch, Schabzieger und Limburgerkäse zu isolieren.

*Thöni* und *Allemann* (79) fanden 1908, dass die roten Punkte im Emmentalerkäse durch *Bact. acidi propionici* var. *rubrum* verursacht sind. *J. Thöni* fand auch Propionsäurebakterien bei Untersuchungen über die Bakterienflora auf den Labmägen. Dieser Fundort wies auf das eventuelle Vorkommen dieser Gruppe im Verdauungskanal hin, weshalb *J. Thöni* die Propionsäurebakterien direkt im Kot nachzuweisen versuchte. Im Tätigkeitsbericht der milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Versuchsanstalt Liebefeld pro 1911 (Landw. Jahrbuch der Schweiz, 1912, S. 481) schreibt *R. Burri* in Erwähnung einer Arbeit von *J. Thöni* hierüber folgendes: „Es sind 15 frische Kotproben, die von verschiedenen Kühen des Liebefeld-Stalles stammten, einer diesbezüglichen Untersuchung unterzogen worden. Zur Isolierung der gesuchten Bakterien dienten nicht Anreicherungskulturen, sondern jede einzelne Kolonie der Peptonschottenagarschüttelkulturen passender Verdünnung wurde zuerst mikroskopisch und dann kulturell auf das Verhalten gegen Sauerstoff geprüft.“ Der Berichterstatter gibt die Resultate von 6 Untersuchungen an, nach denen pro g Kot 2000 bis 30 000 000 Propionsäurebakterien gefunden wurden und schreibt weiter: „Auffallenderweise ist es uns nicht gelungen, aus Milchproben unseres Stalles, sowie aus Milchproben von den Ställen unseres auswärtigen Lieferanten typische Propionsäurebakterien zu isolieren. Wir werden den Ursachen dieses Verhaltens nachspüren und den hier berührten Fragen weitere Beachtung widmen.“ *Gerda Troili Petersson* (81) fand, dass ein schwach alkalisch gemachter Schottenagar die Kultur der Propionsäurebakterien bei Anwesenheit von *Sc. lactis* wesentlich erleichtert.

Die Calciumlactatanreicherungsflüssigkeit, hergestellt nach den Angaben von *Freudenreich* und *Orla-Jensen*, ergibt ein pH von 5,2. *J. M. Sherman* (74) empfiehlt statt des Calciumlactates, welches Anlass zu Umsetzungen gibt, wobei schwerlösliche, den Nährboden trübende Verbindungen entstehen, Natriumlactat zu nehmen und das pH auf 7,2 einzustellen (Zusatz von Milchsäure neutralisiert mit NaOH). *Sherman* machte auch gute Erfahrungen ohne vorausgehende Anreicherung, direkt mit Schüttelkulturen, wobei er der Anreicherungsflüssigkeit einfach 1,5 % Agar zusetzte.

*C. B. van Niel* (59) verwendet statt eine peptonhaltige Nährlösung eine solche mit Hefeextrakt. 1 Liter Hefeextrakt + 20 g Natriumlactat werden nach dem Erhitzen auf pH = 7 eingestellt. Da von *Freudenreich* und *Orla-Jensen* konstatierten, dass Propionsäurebakterien in zuckerhaltigen Nährböden besser wachsen, verwendet *van Niel* bei seinen anaeroben Plattenkulturen den Hefeextraktnatriumlactatagar mit 2 % Dextrosezusatz. Er führt auch einea synthetischen Nährboden an, um Propionsäurebakterien aus Gärterde isolieren zu können, fügt aber bei, dass Propion- wie Milchsäurebakterien nur bei Gegenwart von organischen Stickstoff-Verbindungen wachsen.

In einer neueren Arbeit geben *C. H. Werkmann* und *S. E. Kendall* (85) eine Klassifikation der Propionsäurebakterien auf Grund ihres Verhaltens gegenüber Kohlehydraten, Alkoholen und Glucosiden. Sie unterscheiden zwei Gruppen: Saccharose- und Maltose-Vergärer und -Nichtvergärer mit zusammen 9 Species.

## 2. Eigene Untersuchungen.

### a. Wachstums- und Anreicherungsversuche.

*Wachstumsversuche mit verschiedenen Propionsäurebakterienstämmen.* Um sichere Grundlagen zu erhalten und um namentlich über die Brauchbarkeit der in Frage kommenden Laboratoriumsnährböden orientiert zu sein, untersuchten wir zuerst die Wachstumsverhältnisse von 3 aus Emmentaler- und 2 aus Schachtelkäse isolierten Propionsäurebakterienstämmen. Bei gleichem Nährboden zeigten sich unter den verschiedenen Stämmen weder in der Wachstumsgeschwindigkeit, noch in der Wachstumsstärke auffallende Unterschiede.

Wir verglichen die gewöhnliche, für Propionsäurebakterien sehr gut geeignete Peptonschotte (Herstellung früher beschrieben) mit den Lactat-Anreicherungsflüssigkeiten nach von Freudenreich und Orla-Jensen, bezw. J. M. Sherman und van Niel einerseits und andererseits auch die entsprechenden mit 1,5 % Agarzusatz verfestigten Nährböden untereinander. An Stelle der von van Niel verwendeten Hefeextraktlösung setzten wir als Stickstoffquelle 4 % Hefeextrakt (hergestellt von der Difco Co. N. Y.) zu. Um sonst gleiche Bedingungen zu haben, wurden die pH aller Medien mit Natronlauge bezw. Milchsäure auf 7,2 eingestellt.

Trotzdem wir die flüssigen Nährmedien vor der Beimpfung stets auskochten, zeigten sie sich für die Kultur der anaeroben Propionsäurebakterien gegenüber den festen nicht überlegen. Auf dem Natriumlactat-Hefeextrakt-nährboden (flüssig und fest) war die Wachstumsgeschwindigkeit etwas kleiner als auf der Peptonschotte. Während auf dieser schon nach 3 Tagen Wachstum sichtbar war, trat es auf dem erstgenannten Nährboden erst nach 5 bis 6 Tagen deutlich auf. Demgegenüber ist die besonders interessante Tatsache hervorzuheben, dass die Propionsäurebakterien auf dem Natriumlactat-Nährmedium, namentlich in den drei ersten Verdünnungen häufig Gas bildeten (der Agar wurde leicht zerrissen), während auf Peptonschottenagar nie eine Gasbildung festgestellt werden konnte. In den beiden entsprechenden flüssigen Nährmedien beobachteten wir bei offenen Kulturgläschen nie eine Gasbildung, wogegen diese durch Verschliessen der Gläschen mit dichten Stopfen leicht nachzuweisen war. Bei den Wachstumsversuchen haben wir jeweils 6- bis 8stellige Zehntels-Verdünnungsreihen auf Wasser hergestellt und aus diesen genau gleiche Mengen in die zu vergleichenden Nährmedien eingimpft.

Um Raum zu sparen, geben wir nur das Resultat der Versuche an. Unter den beschriebenen Umständen wuchsen die Propionsäurebakterien auf den festen Natriumlactat-Hefeextrakt-Nährböden in gleich grossen, aber weniger zahlreichen Kolonien, als auf dem Peptonschottenagar, so dass Wachstum auf diesem Nährboden durchschnittlich um eine Verdünnung weiter auftrat.

*Anreicherungsversuche von Propionsäurebakterien aus Kot.* Die Nährlösung nach van Niel (2,5 % Hefeextrakt + 2 % Natriumlactat, nach dem Erhitzen auf pH = 7 eingestellt) wurde in 3 dl-Flaschen mit Bügel-Gummverschluss abgefüllt und sterilisiert. Hierauf wurden 4 Flaschen mit je 3 % Kot von verschiedenen Kotgemischen beimpft und während 14 Tagen bei 30° bebrütet. Nach dieser Zeit zeigte sich beim Oeffnen der Flaschen eine intensive, übelriechende Gasentwicklung, indem starkes Ueberschäumen eintrat. Daraus liess sich schon schliessen, dass wohl nicht die Propionsäurebakterien die Vorherrschaft behaupteten. Die Verarbeitung der Anreicherungskulturen auf Peptonschottenagar zeigte denn auch bei allen 4 Proben bis in die 8. und 9. Verdünnung ( $1/10$ -Reihe) starke Gasbildung. Der vorherrschende Organismus war Coli (Indol-

positiv nach Kowacks). Eine Wiederholung des Versuches, wobei jedoch nur 0,1 % Kot verimpft wurde, ergab wiederum das gleiche Resultat und zeigte, dass nicht die grossen Impfmengen am Misslingen der Propionsäurebakterienanreicherung schuld sind.

Die folgende Versuchsanordnung zeigte uns nochmals, dass in der Anreicherungsflüssigkeit von van Niel keine Propionsäurebakterien aus Kuhkot angereichert werden können. Die Natriumlactat-Hefeextraktnährflüssigkeit wurde in hoher Schicht in enge Reagenzgläschen abgefüllt, die vor dem Beimpfen ausgekocht und nach demselben mit dem anaeroben Verschluss versehen wurden. Einige in dieser Weise hergestellte Verdünnungsreihen von verschiedenen Kotgemischen wiesen jedoch nach der üblichen Bebrütung in jeder bewachsenen Verdünnung die vorherrschenden Coli-Arten auf.

*b. Nachprüfung von J. Thöni's Propionsäurebakteriennachweis im Kuhkot.*

*Methode von J. Thöni.* Wie bereits in der Literaturübersicht angeführt wurde, hat J. Thöni zur Isolierung der Propionsäurebakterien jede einzelne Kolonie der Peptonschottenagarschüttelkulturen passender Verdünnung zuerst mikroskopisch und dann kulturell auf das Verhalten gegen Luftsauerstoff geprüft. Er gibt das Resultat von 6 Untersuchungen, wonach pro g Kot 2000 bis 30 Millionen Propionsäurebakterien gefunden wurden.

Wir haben uns dieser Methode zur Untersuchung von insgesamt 29 Kotproben bedient, dabei jedoch, wie aus der untenstehenden Tabelle hervorgeht, nur in 3 Fällen die gesuchten Bakterien gefunden. Zu Beginn unserer Untersuchungen richteten wir das Augenmerk hauptsächlich auf die mittleren und letzten Verdünnungen, entsprechend den zahlenmässigen Angaben von J. Thöni. Verteilung und Grösse der Kolonien in diesen Verdünnungen liessen die Vermutung, dass es sich darunter z. T. um solche von Propionsäurebakterien handeln könnte, ohne weiteres zu. Die linsenförmigen grossen Kolonien (1—1½ mm Durchmesser) fanden sich oft vorwiegend in der sogenannten „mikroaerophilen Zone“ der hohen Schicht, kamen jedoch in der unteren Hälfte, wie auch im obersten Zentimeter, der nur von fakultativ anaeroben Organismen bewachsen wird, zuweilen vor. Das mikroskopische Bild zeigte gewöhnlich sehr ungleichförmige Organismen (Involutionenformen, selbst wenn die Kulturen nur 6 Tage bei 30° und weitere 8 Tage bei 20° bebrütet wurden), grosse und kleine, eckige und kurzstäbchenartige Einzelkokken, grösstenteils regellos, nur selten in kurzen Ketten angeordnet. Die kulturelle Verarbeitung dieser Kolonien zeigte, dass es sich in den wenigsten Fällen um Propionsäurebakterien handelte. Die Mehrzahl davon erwies sich als Streptokokken, einige als Coli.

Das im Verhältnis zu den Befunden von J. Thöni spärliche Vorhandensein von Propionsäurebakterien bei unsern Untersuchungen veranlasste uns, speziell noch die ersten Verdünnungen der Verdünnungsreihen nach dem Vorkommen dieser Organismen zu untersuchen. Wenn sie im Kot tatsächlich vorhanden wären — wenn auch in geringer Zahl — so sollten sie in diesen Verdünnungen, die allerdings durch Gasbildner stark zerrissen wurden, dennoch zu gut sichtbaren Kolonien auswachsen. Trotzdem aus diesem Bereich sehr viele den Propionsäurebakterienkolonien ähnliche Kolonien mikroskopisch und kulturell verarbeitet worden sind, konnten die gesuchten Bakterien nur in den in Tabelle VII angegebenen Fällen isoliert werden. In den positiv ausgefallenen Proben waren die Propionsäurebakterien gewöhnlich in den Verdünnungen II und III und auch IV (entsprechend  $\times 100$ , bzw. 1000 und 10 000 Bakterien pro Gramm Kot) vorhanden.

*Nitratzusatz zu den Schüttelkulturen.* Da bei der Kultur von an Gasbildnern (Coli) reichen Kotproben auf Peptonschottenagar die anaeroben Bedingungen der hohen Schicht zufolge der Zerklüftung stark beeinträchtigt werden, haben wir, um die Gasbildung stark zu unterdrücken, den Kulturen jeweilen 1‰ Nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) zugesetzt. Vorversuche mit verschiedenen Propionsäurebakterienstämmen (aus Emmentaler- und Schachtelkäse) haben uns gezeigt, dass sie in der Kultur durch diesen Zusatz nur sehr schwach bis gar nicht beeinträchtigt werden.

*Pasteurisation der Schüttelkulturen.* Verschiedene Beobachtungen, wie das Vorkommen von Propionsäurebakterien in Schachtelkäsen und in Käsen, welche aus pasteurisierter Milch hergestellt wurden, liessen darauf schliessen, dass diese Bakterien relativ hitzeresistent sind. Wir haben deshalb eine Anzahl Schüttelkulturen vor der Bebrütung 10 Minuten auf 65—70°, z. T. auch nur auf 55—60° erhitzt. Dadurch wurden die nicht sporenbildenden Gasbildner etwas unterdrückt. Der erwartete Erfolg, ein zahlreicheres Auftreten von Propionsäurebakterienkolonien, stellte sich jedoch nicht ein. Es ist anzunehmen, dass die Schutzwirkung des Käses auf die Propionsäurebakterien bei der Erhitzung grösser ist als diejenige der verwendeten Agarnährböden. Wie wir in diesem Zusammenhang feststellten, werden auch Reinkulturen von Propionsäurebakterien bei Temperaturen von 70—80° in Agarschüttelkulturen erheblich dezimiert.

*Schüttelkulturen mit Natriumlactatagar.* Noch verhältnismässig gute Resultate erhielten wir mit dem Natriumlactathefeextraktwasseragar, dem Spezialnährboden für Propionsäurebakterien, auf welchem jedoch die Coli- und Streptokokkenarten, die beiden im Kuhkot vorherrschenden Bakteriengruppen, auch wachsen. Da der verwendete Hefeextrakt vollständig zuckerfrei war (stark gasbildende Coli-Stämme produzierten in Durham-Röhrchen mit einer 4%igen Hefeextraktlösung kein Gas, trotz gutem Wachstum), muss angenommen werden, dass Coli auch Natriumlactat vergären kann, weil es im erwähnten Nährboden stets lensenförmige Gasblasen hervorrief, ohne jedoch die Agarschicht zu zerreißen, wie das sonst auf zuckerhaltigen Nährböden der Fall ist. (Da die Coli-Stämme auf Wasseragar mit Natriumlactatzusatz ebenfalls kein Gas bilden, besteht auch die Wahrscheinlichkeit, dass sie möglicherweise beim Sterilisieren des Spezialnährbodens aus dem Lactat entstandene Spaltprodukte vergären.) Auch die im Kuhkot vorkommenden Streptokokken wachsen gut auf dem Natriumlactatnährboden. Da die anaeroben Verhältnisse der hohen Schicht durch die nur schwache Gasbildung der Colibakterien nicht beeinträchtigt werden, erwies sich der Natriumlactat-Hefeextrakt-Wasseragar für die Isolierung der Propionsäurebakterien aus Kuhkot als am besten geeignet. Er wurde deshalb bei unsern Untersuchungen am meisten verwendet.

*Versuche mit Kaliumcyanidzusätzen.* In einer neuen Arbeit weisen *H. Braun* und *K. Guggenheim* (10) daraufhin, dass man sich der Hemmung der Gasbildung durch Cyanide mit Vorteil zur Reinzüchtung von *Anaerobiern* in hohen Schichten bedienen kann, da diese bekanntlich Cyaniden gegenüber wenig empfindlich seien. Die Autoren führen z. B. an, dass *Bact. coli* bei verschieden grossen KCN-Zusätzen zu Pepton-Fleischwasser-Traubenzuckeragar sich wie folgt verhält:

- m/100 KCN: kein Wachstum,
- m/250 KCN: Wachstum in der mikroaerophilen Zone,
- m/500 KCN: anaerobes Wachstum,
- m/1000 KCN: fak. anaerobes Wachstum ohne Gasbildung.

Demgegenüber mussten wir feststellen, dass die aus Kot isolierten Streptokokken- und Coli-Stämme bei m/100 KCN gut wuchsen (einige Colistämme bildeten sogar bei 2m/100 KCN noch Gas!), wogegen die Propionsäurebakterienstämme erst bei viel geringeren KCN-Zusätzen zu wachsen anfangen, nämlich bei m/500 KCN bis m/1000 KCN.

*Diskussion des Resultates der Isolierung von Propionsäurebakterien aus Kuhkot.* Tabelle VII enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse über die im Laufe eines Jahres untersuchten Kotproben verschiedener Provenienz und bei verschiedenen Fütterungsarten entnommen.

Tabelle VII.

**Häufigkeit der Isolierung von Propionsäurebakterien aus Kuhkot.**

Kulturverfahren	Anzahl Proben	Zahl der isolierten Stämme
Schüttelkulturen mit Peptonschottenagar nach J. Thöni . . . . .	29	3 (4)
„ mit 1‰ KNO <sub>3</sub> Zusatz . . . . .	17	2
„ pasteurisiert . . . . .	7	1
Schüttelkulturen mit Natriumlactat-Hefeextrakt-Wasseragar	43	6 (7)
Total	96	12

Die gesuchten Bakterien konnten in rund 12 % der Proben festgestellt werden, in Mengen von 200 bis 50 000 pro Gramm Kot. Es wurden 7 (bezw. 9) Stämme während der Dörrfutter- und 4 während der Grünfutterperiode isoliert. Ein weitergehender Zusammenhang zwischen der Fütterungsart und dem Vorkommen der Propionsäurebakterien wurde nicht beobachtet. Ein aus Kälberkot isolierter Stamm wurde ebenfalls mit den übrigen aus Kuhkot herrührenden Stämmen der näheren Prüfung unterzogen. Anlässlich der Verarbeitung von Kälberfaecesproben (ca. 25) haben wir 3 Mal Propionsäurebakterien angetroffen.

Aus den vorliegenden Befunden ergibt sich, dass die Propionsäurebakterien im Kuhkot mehr beiläufig oder gar nur zufällig vorkommen. Wovon ihr Vorkommen, bezw. Fehlen abhängt, dürfte indessen schwierig festzustellen sein.

*Brauchbarkeit der angewandten Kulturmethoden.* Um über Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit der benützten Isolierungsverfahren Aufschluss zu erhalten, suchten wir die kleinste zu Kot gegebene Menge Propionsäurebakterien, welche wir noch nachweisen konnten, festzustellen.

*Versuchsordnung.* Eine 5 Tage alte Peptonschottenkultur eines aus Kot isolierten Propionsäurebakterienstammes wurde auf den Keimgehalt pro ccm geprüft und zu diesem Zwecke auf Peptonschotten- und Natriumlactatagar hohe Schicht verarbeitet (die später ermittelte Keimzahl betrug 1,2 Milliarden pro ccm). Jene Ausgangskultur diente zur Herstellung einer achtstelligen Verdünnungsreihe in sterilem Wasser. Von jeder dieser Verdünnungen wurde je 1 ccm in ein Röhrchen mit 9 ccm einer 10prozentigen Kotemulsion überimpft. Aus den mit absteigenden Mengen Propionsäurebakterien versetzten Kotemulsionen wurden quantitative Schüttelkulturen auf Peptonschottenagar mit 1‰ Nitratzusatz und auf Natriumlactatagar angelegt. Nach 4 und 8 Tagen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurden aus den Kotemulsionen erneut Schüttelkulturen angelegt.

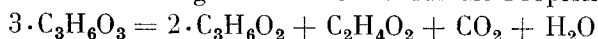
*Resultat.* In den Kulturen der beiden Nährböden, welche sofort und 4 Tage nach der Beimischung der Kotemulsionen angelegt wurden, waren die Propionsäurebakterien durchschnittlich bis in die 8. Verdünnung nachweisbar, d. h. bis in jenes Gläschen, in welches noch ca. 12 Bakterien hineingeimpft worden

waren. In den 8 Tage alten Kotemulsionen waren sie auf dem Peptonschottenagar auch noch bis in die 8. Verdünnung, auf dem Natriumlactatagar dagegen nur noch bis in die 7. Verdünnung (entsprechend ca. 120 Bakterien) nachweisbar.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Propionsäurebakterien mit den beiden benützten Nährböden im Kot nachweisbar sind, wenn sie sich darin in einer Anzahl von 100 je Gramm befinden.

c. Bestimmung der isolierten Propionsäurebakterienstämme.

*Lactatvergärung.* Obwohl die kulturellen Eigenschaften selten bei einer Bakterienart so charakteristisch sind wie gerade das ausgesprochen anaerobe Wachstum bei den Propionsäurebakterien, und dieses Verhalten auch bei unsern aus Kot isolierten Stämmen sehr ausgeprägt in Erscheinung trat, haben wir dennoch zur sichern Identifizierung 5 unserer Stämme einer näheren Prüfung hinsichtlich ihrer Gärprodukte unterzogen. Zur Bestimmung des Verhältnisses der in den Kulturen gebildeten flüchtigen Fettsäuren unter einander, benützten wir das Verfahren der fraktionierten Wasserdampfdestillation nach *Duclaux* (23). Die Stämme wurden zuerst auf Peptonschotte in Dreizehliterflaschen mit Bügelgummiverschluss geimpft. Nach 20 Tagen wurden je 100 ccm der gut gewachsenen Kulturen mit Schwefelsäure aufgeschlossen und die flüchtigen Fettsäuren abdestilliert. Die Destillate der 5 Stämme wurden hierauf fraktioniert destilliert und die Reihen der Titer der einzelnen Fraktionen mit den Tabellen von *Duxlaux* verglichen. Alle 5 Stämme zeigten das Verhältnis der gebildeten Säuren von Essigsäure: Propionsäure = 1:1 (vergl. Tabelle VIII). Nach der von *Orla-Jensen* aufgestellten Formel für die Propionsäuregärung



wären aber 2 Moleküle Propionsäure auf 1 Molekül Essigsäure zu erwarten. Das gefundene Verhältnis der Säuren (1:1) erklärt sich daraus, dass in der Peptonschotte neben der Milchsäure auch der vorhandene Milchzucker vergärt wurde, wobei, wie *Orla-Jensen* zeigen konnte, bei Gegenwart von Milchzucker neben Milchsäure verhältnismässig mehr Essig- als Propionsäure gebildet wird. Um die etwas unbekanntene Komponente Milchzucker auszuschliessen, wurden die Stämme noch auf Hefeextrakt (0,5 %) und Natriumlactat (3 %) angesetzt. Auch auf dieser Nährlösung trat kräftiges Wachstum ein. Bei der Prüfung des Säureverhältnisses stimmten die Titer der fraktionierten Destillationen von allen 5 Stämmen ziemlich genau mit denjenigen *Duclaux* für das Verhältnis Essigsäure:Propionsäure = 1:2 überein, d. h. das Verhältnis schwankte von 1:(1,9—2,2) (vergl. Tabelle VIII).

**Bestimmung des Verhältnisses der von den Propionsäurebakterien aus Kuhkot gebildeten flüchtigen Fettsäuren.**

*Tabelle VIII.*

Fraktion	Von <i>Duclaux</i> angegebene Titer für das Verhältnis Props.: Essigs. = 1:1	Titer der auf Peptonschotte angesetzten Kulturen					Fraktion	Von v. <i>Niel</i> angegebener Titer für das Verhältnis Props.: Essigs. = 2:1	Titer der auf Hefeextrakt mit Natriumlactat angesetzten Kulturen				
		Stämme							Stämme				
		405	408	409	411	412			405	408	409	411	412
3	29,3	29,7	29,6	29,4	29,7	29,2	3	31,4	31,3	31,4	31,3	31,0	31,4
4	39,1	39,8	39,8	39,5	39,5	39,0	4	41,5	41,5	41,6	41,5	41,9	41,4
5	48,9	49,7	50,0	49,5	49,2	48,9	5	51,7	51,6	51,7	51,5	51,9	51,8
6	58,6	59,5	59,9	59,1	59,1	58,4	6	61,5	61,4	61,4	61,4	61,8	61,6
7	68,5	69,4	69,6	69,2	69,0	68,3	7	71,5	71,1	71,2	71,1	71,5	71,6
8	78,5	79,3	79,2	79,1	79,0	78,5	8	81,0	80,8	80,9	80,9	81,2	81,0
Propionsäure: Essigsäure = 1:1							Propionsäure: Essigsäure	1,9:1	2,0:1	1,9:1	2,2:1	2,0:1	



### Zuckervergärung.

In morphologischer Hinsicht unterschieden sich die aus Kot isolierten Propionsäurebakterien nicht. Es mussten alle Stämme zu der von v. Freudenreich und Orla-Jensen umschriebenen Species *Bact. acidi propionici* b (Kurzstäbchen) gerechnet werden. Wie aus Tabelle IX ersichtlich ist, zeigen die Stämme in ihrem Vermögen Kohlehydrate, Alkohole und Glucoside zu vergären auch nur geringfügige Unterschiede. Das sehr einheitliche Vergärungsbild stimmt ganz mit dem von *C. H. Werkman* und *S. E. Kendall* (l. c., p. 19) für das Propionibakterium *Shermanii* gegebene überein und zeichnet sich namentlich durch das fehlende Vergärungsvermögen für die beiden Disaccharide: Saccharose und Maltose aus. Es sei noch darauf hingewiesen, dass Aesculin nur leicht vergoren, jedoch so stark gespalten wird, dass bei Zugabe von Ferrisalz eine sehr kräftige Schwarzfärbung entsteht (nach Dible ein für *Darmstreptokokken* charakteristisches Verhalten).

Tabelle IX.

Das Kohlehydratvergärungsvermögen der Propionsäurebakterien aus Kuhkot.

Stamm	Arabinose	Xylose	Dextrose	Laevulose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Dextrin	Stärke	Inulin	Aesculin	Salzin	Glycerin	Mannit
402	1,1	---	4,5	3,4	4,5	---	---	6,1	---	---	---	---	1,1	---	4,5	---
403	0,8	---	5,8	3,1	4,5	---	---	6,8	---	---	---	---	0,4	---	5,2	---
405	2,9	---	6,3	4,0	4,2	0,4	---	8,1	---	---	---	---	0,4	---	4,0	---
408	1,1	---	6,8	4,5	4,0	0,9	---	6,1	---	---	---	---	1,1	---	4,5	---
409	4,0	---	5,8	3,6	4,5	0,4	---	5,8	---	---	---	---	0,4	---	3,1	---
411	1,8	---	5,6	3,4	4,0	---	1,1	7,0	---	---	---	---	0,6	---	4,5	---
412	1,1	---	5,4	2,7	4,0	1,2	---	5,6	---	---	---	---	0,8	---	4,0	---
435	---	---	4,5	3,1	5,6	0,9	---	6,6	---	---	---	---	0,9	---	3,1	---
452	---	---	5,8	3,4	4,0	0,4	---	6,3	---	---	---	---	0,4	---	3,4	---
464	1,3	---	4,2	2,7	---	1,1	---	5,4	---	---	---	---	0,9	---	5,4	---
485	0,6	---	4,5	3,1	3,1	---	---	4,7	---	---	---	---	1,1	---	4,5	---
491	2,9	---	2,9	2,5	3,4	---	---	3,6	---	---	---	---	0,6	---	4,0	---
492	1,3	---	5,8	4,0	4,3	0,6	---	5,9	---	---	---	---	0,8	---	4,8	---
494	0,8	---	4,3	3,4	3,1	---	---	5,2	---	---	---	---	1,8	---	3,5	---

## D. Das mengenmäßige Vorkommen der für die Molkereigewerbe unerwünschten Organismen.

### 1. Die Coli-aerogenes-Gruppe.

Dass die Kotflora stets Vertreter aus der Gruppe der gramnegativen gasbildenden Kurzstäbchen in auffälliger Zahl aufweist, wird in der einschlägigen Literatur überall angeführt. Auf diese näher einzutreten, würde zu weit führen. Wir möchten deshalb nur auf einige sachbezügliche Arbeiten hinweisen.

Die Frage, ob diese Bakteriengruppe bei Grün- oder Dürrfütterung im Kot zahlreicher vertreten ist, wird nicht eindeutig entschieden. *A. Fischer* bemerkt z. B. (28) „Fütterungsversuche haben gezeigt, dass *Bact. coli* nicht, wie *E. Wüthrich* und *E. von Freudenreich* (90) beobachtet zu haben glaubten, häufiger bei der Winterfütterung als bei der Grasfütterung auftritt, vielmehr scheint das Gegenteil der Fall zu sein.“

Verschiedene Autoren haben festgestellt, dass die Darmflora durch verschiedene Fütterungsarten nur unbedeutend oder gar nicht beeinflusst wird. So konnten z. B. *Wüthrich*

und v. Freudenreich das *Bact. lactis aerogenes* bei Verfütterung von Biertrebern, in denen es in wesentlichen Mengen enthalten war, im Kot nicht nachweisen. Anlässlich einer Untersuchung über die Entstehung geblähter Milch hat *W. Dörner* (22) den Rinderkot während längerer Zeit auf den Gehalt an Gasbildnern geprüft. „Schon aus der Tabelle I (p. 783) ist zu entnehmen, dass der Futterwechsel jedenfalls keinen grossen Einfluss auf den Gasbildnergehalt des Kotes ausüben konnte.“ Aus weiteren Untersuchungen ging „unzweifelhaft hervor, dass die Zahl der im Kote anwesenden mittelst Milchsäurezuckerbouillon nachweisbaren Gasbildner weder durch Verfütterung von altem Gras, noch von Heu, noch von Maissilofutter, noch endlich von jungem Gras eine Aenderung erfährt“. Dagegen „zeigte sich die sehr bemerkenswerte Tatsache, dass es Kühe gibt, welche beständig, d. h. mindestens während Monaten, einen an den genannten Gasbildnern armen und andere, welche einen an Gasbildnern reichen Kot abscheiden“. „Bezüglich der Artzugehörigkeit der im Kot anwesenden Gasbildner haben wir folgendes beobachtet: Im Monat September haben wir im Kot Bakterien festgestellt, die alle charakteristischen Eigenschaften von *Bact. aerogenes* aufwiesen. Wir hatten damals den Eindruck, dass wenigstens bei alten Kotproben mit hohem Gasbildnergehalt der genannte Organismus durchaus im Vordergrund stand. Später fanden wir nur noch bewegliche Organismen, die wir ohne weiteres als *Bact. coli* ansprechen mussten.“ Für die Unterscheidung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* geben *R. Burri* und *M. Dügge* (13) eine einfache Methode an, welche auf der Feststellung des Verhältnisses zwischen Kohlen säure und Wasserstoff im gebildeten Gas der zu prüfenden Stämme beruht. „Vergleichende Untersuchungen bei 65 aus Milchgärproben isolierten der *Coli-aerogenes*-Gruppe angehörenden Stämmen führten dazu neben *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* auch den Typus *Bact. acidilactici* aufrecht zu erhalten. Massgebend waren bei dieser Einteilung neben den Dimensionen und der Beweglichkeit der Stäbchen die Menge und Zusammensetzung der Gärungsgase.“ *Maulhardt* (52) nahm eine Klassifizierung der im Kot vorhandenen gramnegativen Lactose vergärenden Bakterien vor und stellte fest, dass *Bact. coli* leicht von *Bact. lactis aerogenes* unterschieden werden kann; dagegen ist eine Differenzierung zwischen *Bact. coli* und *Bact. acidilactici* (dieses soll unbeweglich sein) nicht stichhaltig, da dabei nur auf die Beweglichkeit abgestellt werden muss, diese für die *Coli*-Gruppe jedoch nur ein fakultatives Merkmal sei. *L. A. Rogers*, *W. M. Clark* und *A. Evans* (69) fanden unter 150 aus Kuhkot isolierten Stämmen nur einen, welcher als *Bact. aerogenes* bezeichnet werden musste; die übrigen 149 Stämme gehörten zur Art *Bact. coli*. Bei unsern Untersuchungen verwendeten wir für die Bestimmung des Colititers in den Kotproben die von *Kessler* und *Svenarton* (44) angegebene Gentianaviolett-Galle-Pepton-Milchzuckerlösung, die nach vergleichenden Untersuchungen von *W. Ritter* (65) für die quantitative Bestimmung der *Coli-aerogenes*-Bakterien in Milch und Lab als am besten geeigneter Nährboden beurteilt wurde.

Bei den Untersuchungen über die Zusammensetzung der Flora des Milchkalbkotes haben wir festgestellt, dass sich der mittlere *Coli*-Titer zwischen 100 Millionen bis 1 Milliarde (Gasbildner auf dem Gentianaviolett-nährboden je Gramm Kälberfaeces) bewegt. Sogar Keimzahlen von 10 Milliarden waren feststellbar. Diese hohen *Coli*-Keimzahlen traten nicht selten im Kot halbjähriger Maststierkälber auf, die neben ihrem Hauptfutter, der Buttermilch, auch Kraftfutter und wenig Heu erhielten. Deren Faeces wurden namentlich im Hinblick auf den hohen Gehalt an Gasbildnern zeitweilig untersucht. Bevor wir auf die im Kuhkot gefundenen Colititer eintreten, möchten wir diejenigen, welche wir bei den 1 bis 2½-jährigen Rindern vorfanden, anführen. Anlässlich von Untersuchungen über die Beeinflussung des Buttersäurebazillengehaltes im Kot von 1 bis 1¾-jährigen Stieren bei Verfütterung von Silofuttern, die nach verschiedenen Methoden hergestellt worden waren, haben wir geprüft, ob dabei jeweilen auch der Colititer Aenderungen erfahre. Während wir nach dieser Richtung bei Verfütterung der verschiedenen Silofutter keine Beeinflussung beobachten konnten, fiel uns anderseits der allgemein hohe Gehalt an Coliarten auf. Wie die parallel zu diesen Untersuchungen vorgenommenen Prüfungen der Colititer von Kotproben 1 bis 2½-jähriger Rinder zeigten, waren die hohen Colititer der Stiere nicht durch das verabreichte Silofutter, wohl aber

durch das Alter der Tiere bedingt. Die Faeces der in Prüfung stehenden Rinder, welche normal gefüttert wurden (November bis April Dürrfutter, im Mai Weide, anschliessend Grünfütterung im Stall), wiesen trotz des z. T. vorgeschrittenen Alters — die Rinder I und II waren 1 Jahr älter als die Stiere — annähernd gleich hohe Coli-Titer auf wie diejenigen der Stiere (vergl. Tabelle X).

**Coli-Titer bei 1- bis 2½jährigen Rindern.**

*Tabelle X.*

Monat	Rind I	Rind II	Rind III	Rind IV	Rind V	Stiere (Silofutter)
November	100 000	100 000 000	10 000 000	—	—	10 000 000
Dezember	10 000 000	10 000 000	10 000 000	1 000 000	10 000 000	100 000
Januar	100 000	10 000 000	100 000	1 000 000	100 000 000	100 000 000
Februar	1 000 000	100 000	10 000 000	100 000 000	10 000 000	1 000 000 000
März	10 000 000	100 000 000	100 000 000	1 000 000	100 000 000	10 000 000
April	100 000	10 000 000	1 000 000	100 000	1 000 000	100 000 000
Mai	1 000 000	100 000	10 000 000	1 000 000	10 000 000	1 000 000
Juni	100 000	10 000 000	1 000 000	1 000 000	10 000 000	10 000 000
Juli	1 000 000	—	10 000 000	10 000 000	1 000 000	—

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Colititer des Kotes von 1 bis 2½jährigen Rindern im Mittel schwanken zwischen 1 Million bis 10 Millionen (ausnahmsweise 100 Millionen). Obwohl diese Tiere sozusagen das gleiche Futter erhalten wie Kühe, fällt es auf, dass der Colititer ihrer Faeces nur wenig niedriger ist als derjenige der Kälber.

**Coli-Titer bei 4- bis 10jährigen Kühen.**

*Tabelle XI.*

Monat	Nuggi	Roma	Tubi	Dori	Züsi	Fürst
November	1 000	100 000	1 000 000	10 000	1 000	100 000
Dezember	100	10 000	1 000 000	10 000	100 000	100 000
Januar	10 000	100 000	10 000 000	100 000	10 000	10 000
Februar	10 000	1 000	1 000 000	100 000	100 000	10 000
März	10 000	1 000	1 000 000	1 000	1 000	100 000
April	1 000	100 000	1 000 000	10 000	10 000	1 000
Mai	100	10 000	100 000	100 000	10 000	100 000
Juni	10 000	100 000	1 000 000	10 000	100 000	10 000
Juli	10 000	10 000	100 000	1 000 000	10 000	10 000

Der Gasbildergehalt im *Kuhkot* schwankte im Durchschnitt zwischen 10 000 und 100 000 je Gramm. Nicht selten ging er bis auf 1000 und sogar 100 zurück, erreichte aber zuweilen auch eine Million. Insbesondere der Kot der Kuh Tubi nahm insofern eine Ausnahmestellung ein, als sein mittlerer Colititer sich stets etwas über den übrigen bewegte (Durchschnitt: 1 Million) und ausnahmsweise 10 Millionen erreichte (vergleiche Tabelle XI). Diese Resultate stellen eine Bestätigung der von *W. Dorner* (l. c.) gemachten Feststellungen dar. Der Kot von Nuggi wies während der Versuchszeit einen verhältnismässig konstanten, niedrigen Colititer, dafür, wie wir mit Hilfe von Bouillon und Milchkulturen feststellten, stets einen etwas höheren Gehalt an Streptokokken auf. Um abzuklären, ob diese Feststellung allgemeine Gültigkeit habe, ob neben einem niedrigen Coli-Titer gewöhnlich ein höherer Streptokokken-Titer (und umgekehrt) einhergehe, haben wir eine grössere Anzahl Kotproben von einzelnen Kühen nach dieser Richtung untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die erwähnte Möglichkeit nicht zutrifft. So ent-

hielt der Kot der Kuh Züsi, welcher, wie aus Tabelle XI hervorgeht, auch einen niedrigen Colititer hat, nicht einen grösseren, sondern noch geringern Gehalt an Streptokokken.

Hinsichtlich der Artzugehörigkeit der Gasbildner im Kot haben wir folgendes festgestellt. Aus den bewachsenen Verdünnungen im Gentianaviolett Nährboden wurden zeitweise Ausstriche auf gewöhnlichem Schrägagar gemacht und die hierbei isolierten Stämme näher untersucht. Bei der grossen Mehrzahl der Stämme handelte es sich um bewegliche, Milchzucker gut vergärende und Milch koagulierende Kurzstäbchen. Sämtliche Stämme bildeten Indol aus Tryptophan (Caseinpepton) und schwärzten den Aesculinnährboden. Obwohl sie im Oberflächenwachstum gelegentlich Unterschiede zeigten, gehörten sie alle zur Species *Bact. coli* (Escherich). Im Kot einiger Kühe (z. B. Vera und Tubi) traten regelmässig — bei andern Tieren beiläufig — neben den gelappten durchsichtigen Coli-Kolonien erhabener, noch üppiger wachsende, schmutziggraue Kolonien auf. Diese ebenfalls kräftig Gas bildenden Kurzstäbchen, welche unbeweglich waren, glaubten wir, weil sie Indol und kein Acetoin (Acetylmethylcarbinol, ein nach Voges-Proskauer \*) für *Bact. aerogenes* typisches Gärprodukt) bildeten, auch als *Bact. coli* ansprechen zu müssen. In diesem Zusammenhang möchten wir auch auf die in der Literatur und selbst in der Systematik der Coli-aerogenes-Gruppe häufig erwähnten Zwischenformen hinweisen. Da auch nach neueren noch unveröffentlichten Untersuchungen von *J. Häni* die früher von *A. Wolff* (88a) in Milch gefundenen Alkalibildner einen wesentlichen Bestandteil der Frischmilchflora bilden, haben wir auch auf das Vorkommen dieser Organismen im Kuhkot geprüft. Wir haben sie jedoch nicht angetroffen. Eine Anzahl dieser Organismengruppe nahestehende Stämme, deren Kulturen z. B. auch starken Fischgeruch aufwiesen, mussten zufolge ihrer Indolbildung zu der Coli-Species gerechnet werden. In einer Arbeit über die quantitative Bestimmung der Coli-aerogenes Bakterien in Milch und Lab führt *W. Ritter* (65) an, dass bei Verwendung von Lab, das selbst grosse Mengen von Coli-Bakterien (bis 10 000 000 je ccm) enthält, nicht unbedingt Presslerkäse entstehen müssen. Hierzu bemerkt *C. Hüttig* (42), nach seinen Untersuchungen dürfte es sich um *gewöhnliche Darmcoli* gehandelt haben, die im Käse überhaupt keine Blähung hervorrufen. Die beste Nachweismethode für Blähungserreger in Käsemilch ist die vom Referenten (*C. Hüttig*, 43) in der milchwirtschaftlichen Zeitung 1933, Nr. 58, vorgeschlagene Milchagarschüttelkultur, die nur solche Coli-aerogenes-Keime anzeigt, die auch im Käse zu Blähungen Anlass geben.“ Um nicht die Meinung aufkommen zu lassen, die aus Kuhkot isolierten Coli seien identisch mit den „gewöhnlichen Darmcoli“ Hüttigs, stellen wir fest, dass von 20 Coli-stämmen aus Kuhkot sämtliche in der Milchagarschüttelkultur nach *C. Hüttig* (bei 30°) starke Gasbildung hervorriefen. (Es ist damit natürlich noch nicht gesagt, immerhin aber zu vermuten, dass sie auch im Käse Blähung verursachen würden.) Ausser dem *Bact. coli* haben wir im Kuhkot während der Heufütterung keine weiteren gramnegativen Stäbchen festgestellt. Während den Grünfütterperioden 1932 und 1933 haben wir in einigen wenigen Kotproben auch das von *R. Burri* und *M. Dügge* (24) auf grünen Pflanzen gefundene und daselbst weitverbreitete *Bact. herbicola aureum* Dügge angetroffen. Es ist indessen nicht ganz ausgeschlossen, dass bei ausschliesslichem Weidegang *Bact. aerogenes*, das ja hauptsächlich in der Erde häufig vorkommt, doch gelegentlich auch im Kot, eher aber noch in der Milch auftreten kann.

---

\*) C. H. Werkmann, Journ. of Bact., Band 20, 1930.

## 2. Die Buttersäurebazillen.

Die Gefahr, welche namentlich der Emmentalerkäserei durch die hauptsächlich mit den Süssgrünfütterarten in grosser Menge in den Kuhkot und damit in die Milch gelangenden Buttersäurebazillen erwächst, wurde an der milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld durch *R. Burri*, *J. Kürsteiner*, *W. Staub* u. a. gründlich abgeklärt. *J. Kürsteiner* (48) konstatierte, dass sich „auch im Kot von Kühen, die kein Süssgrünfütter erhalten, regelmässig beschränkte Mengen von Buttersäurebazillensporen finden“. Anlässlich von im Frühjahr 1919 erfolgten Kotuntersuchungen fand er durchschnittliche Mengen von Buttersäurebazillensporen je g Kot von 150, bezw. 460. Auf Grund aller gemachten Erfahrungen und Beobachtungen liegt aber nach *J. Kürsteiner* die Gefahr nachträglicher intensiver Blähung der Emmentalerkäse erst vor, wenn die Buttersäurebazillenzahl im Kuhkot 1000 und mehr im Gramm erreicht.

*W. Dörner* (21) stellte fest, dass beim gebräuchlichen Nachweisverfahren mit Traubenzuckeragar von den „in Dextroseagar ausgesäten vegetativen Formen des *Bac. amylobacter* nur ca. 2 %, von den ausgesäten Sporen sogar nur ca. 3 ‰ zu Kolonien auswachsen.

Bei einer Nachprüfung des *Ruschmannschen* Kartoffelbreiverfahrens zum Nachweis von Buttersäurebazillen durch *W. Ritter* (64) konnte eine wesentliche Ueberlegenheit desselben über das Dextroseagarverfahren (unter Verwendung pasteurisierten Materials) nicht festgestellt werden. „Das Dextroseagarverfahren verdient den Vorzug nicht nur, weil es wissenschaftlich auf besserer Grundlage steht und darum eindeutige Ergebnisse liefert, sondern auch, weil es in der Durchführung einfacher ist.“

Tabelle XII.

**Amylobactertiter im Kot bei Verabreichung verschiedener Silofütter.**

Verabreichtes Silofütter	Datum	Zahl der untersuchten Kotproben	Durchschnittl. Buttersäurebazillengehalt je g Kot	Durchschnittlicher Buttersäurebacillengehalt je g Futter		
				Maximal	Minimal	Durchschn.
Vor der Verabreichung von Silofütter	20. Nov. bis 27. Nov.	3	400	1 000	100	—
Aus überständigem Klee gras hergestelltes Silofütter	28. Nov. bis 20. Dez.	10	900 000	10 000 000	100 000	200 000
Körnermaissilo	21. Dez. bis 14. April	12	28 000	100 000	1 000	1 500
Aus überständigem Klee gras hergestelltes Silofütter	15. April bis 23. Mai	5	300 000	1 000 000	100 000	200 000
Grassilo mit Konsatz von A. Messmer	24. Mai bis 27. Juni	4	8 000	10 000	1 000	1 100

Um mit den bisherigen Resultaten vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, haben wir von den Kotproben ebenfalls pasteurisierte, quantitative Verdünnungsreihen auf Dextroseagar hergestellt. In Uebereinstimmung mit den Konstatierungen von *J. Kürsteiner* fanden wir unter insgesamt 16 Kotproben 13, welche in der Verdünnung III (entsprechend mindestens 100 Keimen pro g) Gasbildung, herrührend von Buttersäurebazillen, zeigten. Weitere zwei Proben

wiesen Buttersäurebazillengehalte von weniger als 100 und eine Probe von mindestens 1000 auf je g.

Da auf dem Gutsbetrieb Liebefeld vom 25. November 1932 bis 15. Juni 1933 an einjährige Mastochsen Silofutter verabreicht wurde, das nach verschiedenen neuen Methoden hergestellt worden war, hatten wir Gelegenheit, den Einfluss der einzelnen Sorten auf die Kotflora hinsichtlich Buttersäurebazillengehalt zu beobachten.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle XII zusammengestellt. In beiden Fütterungsperioden rief das aus Klee gras hergestellte Silofutter durchschnittlich die grössten Buttersäurebazillengehalte im Kot hervor. In der zweiten Fütterungsperiode, in welcher Klee grassilofutter verabreicht wurde, ist der durchschnittliche *Amylobacter*-Gehalt sowohl des Futters wie des Kotes etwas niedriger als in der ersten, was möglicherweise mit der längeren Lagerzeit des Futters im Zusammenhang steht.

Es sei noch erwähnt, dass das Klee grassilo aus sogenanntem überständigem Klee gras (nach System Th. Schweizer) hergestellt wurde. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, vermag die Ueberreife des Futters bei der anschliessenden Ensilage keine genügende Herabsetzung des Buttersäurebazillengehaltes zu bedingen.

In Uebereinstimmung mit früheren Feststellungen an der Versuchsanstalt Liebefeld fanden wir bei der Verfütterung von Körnermaissilo niedrigere *Amylobacter*-Keimzahlen im Kot als beim Verabreichen von gewöhnlichem Silofutter. Auch wies das aus gewöhnlichem Gras mit Konsa-Zusatz (von A. Messmer, Zürich) hergestellte Silo, wie auch der Kot der damit gefütterten Tiere einen verhältnismässig niedrigen Titer an *Bac. amylobacter* auf.

### 3. Die anaeroben, Eiweiss abbauenden Sporenbildner.

Ein für die Emmentalerkäseerei unter Umständen sehr gefährlicher Organismus ist der *Bac. putrificus*. Um dem Auftreten dieses Schädlings vorzubeugen, sind nach J. Kürsteiner (49) neben einer zweckmässigen Käseertechnik alle Infektionsmöglichkeiten der Kessmilch mit *Bac. putrificus* nach Möglichkeit auszuschalten. In der Verunreinigung der Milch durch Kotteilchen besteht zweifellos eine Infektionsgefahr für den Käse. Um über die Grösse derselben Aufschluss zu erhalten, haben wir eine Anzahl quantitative Untersuchungen über den Gehalt an anaeroben, Eiweiss abbauenden Sporenbildnern im Kuhkot ausgeführt.

Auf dem *Achalme*(1)-Nährboden (Gläschen mit 9 ccm Wasser und ca. 1 g Hühnereiweiss, sterilisiert) wurden quantitative Verdünnungsreihen der Kotproben erstellt, pasteurisiert, anaerob verschlossen und 4 Wochen bei 37° bebrütet. Die zeitweise Verarbeitung der Verdünnungen, in denen das Eiweiss zersetzt war, ergab in vielen Fällen ein Gemisch von Typen aus der Gruppe der Erreger stinkender Fäulnis, von denen die meisten zum Typus *Bac. putrificus* (*coli*) Bienstock L. et N. gehörten, andere mehr Aehnlichkeit mit *Bac. verrucosus* (Zeissler) und z. T. mit *Paraplectrum foetidum* aufwiesen. Unter den aus Käse isolierten und als *Bac. putrificus* bezeichneten Eiweiss abbauenden Sporenbildnern gibt es nach Beobachtungen am Liebefelder Institut (W. Ritter und P. Ritter) auch alle möglichen Typen mit end- und mittelständigen Sporen, bewegliche und unbewegliche, z. T. gasbildende und solche, die stets Gas bilden. Ein Vergleich einer Anzahl aus Kot isolierten *Bac. putrificus*-Stämme mit solchen aus Käse ergab Uebereinstimmung in den wichtigsten Eigenschaften.

Wir hielten es deshalb für zulässig, bei den quantitativen Untersuchungen über das Vorkommen von anaeroben, Eiweiss abbauenden Sporenbildnern im Kuhkot, die für die Emmentalerkäseerei gefährlich sein können, einfach auf die Verdünnungen abzustellen, in denen eine Auflösung des Eiweisses stattgefunden hatte.

Tabelle XIII.

Anzahl anaerobe, Eiweiss abbauende Sporenbildner im Kuhkot.

Monat	Bethli	Roma	Lerch	Dori	Vera	Nuggi
November . . . . .	10 000	100	1 000	10	1000	100
Dezember . . . . .	1 000	10 000	100	100	100	1000
Januar . . . . .	1 000	1 000	1 000	100	100	1000
Februar . . . . .	1 000	1 000	1 000	100	1000	10
März . . . . .	1 000	10 000	10 000	1000	10	100
April . . . . .	1 000	100	1 000	100	100	100
Mai . . . . .	100	100	1 000	1000	100	10
Juni . . . . .	1 000	1 000	100	100	1000	100
Juli . . . . .	100	10	1 000	100	100	100
August . . . . .	1 000	1 000	100	100	10	10

In Tabelle XIII sind die Titer der anaeroben, Eiweiss abbauenden Sporenbildner im Kot von 5 Kühen und 1 Rind zusammengestellt. Der mittlere Gehalt an Putrificus-ähnlichen Organismen im Kot bewegt sich zwischen 100 bis 1000 je Gramm. In ganz vereinzelt Fällen wurde die Zahl 10 000 (3 Proben) festgestellt. Noch öfter wurde jedoch die angegebene mittlere Grenze unterschritten, indem in 5 Proben je nur mindestens 10 (d. h. Eiweisszersetzung bis in die zweite Verdünnung im Achalme-Nährboden) Organismen nachweisbar waren. Wie aus der Tabelle hervorgeht, bestehen nur sehr geringe individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Dagegen befindet sich der mittlere Titer seit der Grünfütterung näher bei 100 als 1000. Es sei noch erwähnt, dass der Titer an Eiweiss abbauenden anaeroben Sporenbildnern beim Rinde Bethli im Durchschnitt eher etwas höher ist als bei den Kühen.

**Zusammenfassung.**

*Kugel- bzw. kettenförmige Milchsäurebakterien.* Von den Milchsäurebakterien stehen im Kuhkot die Vertreter der Gattung *Streptokokkus* mengenmässig im Vordergrund. In einzelnen Proben können sie zahlreicher sein als die Coli-Arten. Die Arten der Kuhkotstreptokokken sind jedoch relativ eng begrenzt. Sie beschränken sich ausschliesslich auf die Zugehörigkeit zu der *Sc. bovis*- und der *Sc. lactis*-Gruppe. *Sc. bovis*, welcher sich von dem ihm sehr nahe verwandten *Sc. inulinaceus*, mit dem er die nach ihm benannte Gruppe bildet, nur durch sein Caseinabbauvermögen unterscheidet, ist der vorherrschende, gemeine Kuhkotstreptokokkus. Beide Arten dieser Gruppe stimmen in ihrem kulturellen und morphologischen Verhalten (Wachstum vorwiegend in kürzeren Ketten), sowie im Vergärvermögen (Vergärung von Stärke und Inulin, Nichtvergärung von Mannit) überein. Ihr Wachstum in Milch ist allgemein gut, wogegen ihr Säuerungsvermögen teilweise gering ist. Während die Vertreter der *Sc. lactis*-Gruppe des Kuhkotes denjenigen der *Sc. bovis*-Gruppe zahlenmässig nachstehen, sind sie ihnen dagegen im Milchsäuerungsvermögen etwas überlegen. Der vorherrschende Representant der *Sc. lactis*-Gruppe im Kot ist der *Sc. faecium*, welcher sich abgesehen von dem ihm grösstenteils fehlenden Caseinabbau-

vermögen, von dem sehr nahe verwandten *Sc. lactis* nur durch sein höheres Temperaturmaximum unterscheidet. Von sämtlichen aus Kot isolierten Streptokokken gaben 83 % eine typische Lackmusmilchprobe im Sinne K. J. Demeters. Diese Probe kann daher nicht, wie es bisher von verschiedenen Autoren geschah, als nur für *Sc. lactis* charakteristisch angesehen werden. Die Mehrzahl der Kuhkotstreptokokken ruft in Milch einen rein sauren Geruch und Geschmack hervor; eine zurücktretende Anzahl verursachte in Milch malzartigen oder brenzlichen Geschmack, der bei einzelnen Stämmen mitunter bald verloren ging. Keiner der Stämme zeigte eine typische Hämolyse. Das Caseinabbauvermögen einzelner Stämme und die optische Aktivität der Gärungsmilchsäure wurden bestimmt. Sowohl aus Milch wie aus Käse konnten Aesculin spaltende *Sc. faecium*- und *Sc. bovis*-Stämme isoliert werden.

Während anlässlich unserer Untersuchungen aus dem Kuhkot nie typische *Betakokken* isoliert werden konnten, fanden wir wohl einige diesen nahestehenden Organismen, denen das Vermögen, flüchtige Säuren und Diacetyl + Acetoin zu bilden, eigen war, die jedoch mit Rücksicht auf ihre übrigen Eigenschaften zur Gattung *Tetrakokkus* gerechnet werden mussten.

Im Gegensatz zu S. Orla-Jensen, welcher die *Tetrakokken* nach ihrem mengenmässigen Vorkommen an die erste Stelle unter den Milchsäurebakterien im Kuhkot stellt, stehen die *Tetrakokken* nach unsern Befunden den Milchsäurestreptokokken zahlenmässig nach. Neben dem Nitratreduktions- und dem Katalasebildungsvermögen ist auch das Janusgrünreduktionsvermögen charakteristisch für Vertreter der Gattung *Tetrakokkus*. Die gleichen Mikrokokkenarten, wie sie im Kuhkot vorhanden sind, können z. T. auch aus Milch und jungen Emmentalerkäsen isoliert werden.

*Stäbchenförmige Milchsäurebakterien.* Die *langstäbchenförmigen* Milchsäurebakterien vom Typus *Bact. casei epsilon* kommen wohl in den Faeces junger Kälber, die fast ausschliesslich Milch erhalten, vor. Sie fehlen indessen in den Faeces ausgewachsener Rinder ganz. Dagegen konnten wir feststellen, dass Milchsäurestäbchen der Gattung *Betabakterium* (Typus: *Bact. casei delta* und *Bact. casei gamma*) im Kuhkot stets, sowohl bei der Gras- wie bei der Heufütterung, vorhanden sind. Die *Betabakterien* gehören zufolge ihres regelmässigen Auftretens, wie ihrer übrigen Eigenschaften neben den Strepto- und *Tetrakokken* zur endemischen Flora des Kuhkotes. Ein Teil der *Betabakterien* vermag in Reinkultur in Milch kräftig das typische *Butteraroma* zu bilden, welches auf chemischem Wege durch die Bestimmung von Diacetyl + Acetylmethylcarbinol nachgewiesen wurde (bisher war nur bekannt, dass das *Butteraroma* von gewissen *Betakokken* in Mischkultur mit *Sc. lactis* produziert wird). Es wird ein Verfahren zur Isolierung der *Betabakterien* aus Kuhkot angegeben. Im Kot kommen auch Vertreter der Gattungen: *Streptobakterium* (Typus: *Bact. casei alpha*) und *Mikrobakterium* (Typus: resistente Kurzstäbchen) vor. Letztere fallen durch ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Salzkonzentrationen und Hitze auf.

*Propionsäurebakterien.* Sie kommen im Kuhkot und auch im Kälberkot mehr beiläufig oder gar nur zufällig vor. Es handelt sich um die Art: *Bact. acidi propionici* b v. Freudenreich (Kurzstäbchen). Auf einem 4prozentigen Difcohefeextrakt-Natriumlactat-Wasseragar, pH = 7,2 bildeten die Propionsäurebakterienstämme oft soviel Gas, dass der Nährboden leicht zerrissen wurde.

*Die unerwünschten Mikroorganismen.* Während *Bact. aerogenes* im Kuhkot überhaupt nicht vorkommt, ist *Bact. coli* im allgemeinen als der vorherrschendste Organismus der Kotflora anzusehen. Der Kälberkot und sogar der



Kot bis 2½-jähriger Rinder weist die höchsten Colititer auf. In den Faeces der Kühe sinkt der Colititer zuweilen auf den Streptokokkentiter herab und in einzelnen Fällen sogar noch etwas darunter. Die Untersuchungen über den normalen Gehalt des Kuhkotes (ohne Silofutter) an *Bac. amylobacter* brachten eine Bestätigung früherer Ergebnisse. Die Veränderungen des Amylobacteriters während der Verabreichung von nach verschiedenen Verfahren hergestellten Silofutterarten wurden untersucht. Der mittlere Gehalt an *Bac. putrificus* ähnlichen Organismen im Kuhkot bewegt sich zwischen 100 bis 1000 je Gramm.

*Ergebnisse allgemeiner Natur.* Dem *Aesculinspaltungsvermögen* kommt besondere Bedeutung zu als charakteristische Eigenschaft der endemischen Bakterienarten des Kuhkotes. Von den aus Kuhkot isolierten Streptokokken spalteten 98 %, von den Betabakterien- und Colistämmen je 100 % Aesculin. Den Tetrakokken-, Streptobakterien- und Mikrobakterienstämmen, welche eine Mittelstellung einnehmen, ist das Aesculinspaltungsvermögen nur teilweise eigen. Da das Aesculinspaltungsvermögen eine sehr konstante Eigenschaft der Kuhkotstreptokokken ist, die den Streptokokken anderer Herkunft fehlt, darf bei den aus Milch und Käse isolierten Streptokokken, welche Aesculin spalten, auf fäkale Provenienz geschlossen werden.

Die verhältnismässig hohe *Hitzeresistenz* der Milchsäurebakterien des Kuhkotes ist namentlich bei den Streptokokken, den Tetrakokken und den Mikrobakterien des Kuhkotes ausgeprägt vorhanden.

Es wurde gezeigt, dass von Vertretern der beiden Gattungen des Kuhkotes: Betabakterium und Tetrakokkus *Diacetyl* + *Acetylmethylcarbinol* produziert wird. Neben der Bildung dieses Hauptbestandteiles des Butteraromas in Reinkulturen in Milch vermögen die beiden Organismengruppen auch einen beträchtlichen Teil ihrer Gärungssäure in Form von flüchtigen Säuren zu produzieren.

Die in der Einleitung gestellte Hauptfrage betreffend die vom molkerei-gewerblichen Standpunkt aus nützlichen Fäkelorganismen ist nach unsern Untersuchungen nun dahin zu beantworten, dass im Kuhkot eine zu beachtende Anzahl Milch- bzw. Propionsäurebakterienarten vorhanden sind, die mit den für die Molkereigewerbe nötigen Organismenarten teilweise identisch sind, teilweise diesen so nahe stehen, dass sie sich nur im Sinne von Standortsmodifikationen von einander unterscheiden. Daneben finden sich eine Anzahl Milchsäurebakterienarten, welche sich von denjenigen, die in der Käserei, Butterei usw. unentbehrlich sind, deutlich unterscheiden. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass die für die Emmentalerkäserei so wichtigen Säurebildner vom Typus des *Tbm. helveticum* (*Bact. casei epsilon*) im Kuhkot nicht nachgewiesen werden konnten.

Die vorliegende Untersuchung ist im Laboratorium der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern ausgeführt worden. Es sei mir auch hier gestattet, dem Vorstand der Anstalt, Herrn Prof. Dr. R. Burri für die Anregung zu dieser Arbeit und die mir reichlich zuteil gewordene Unterstützung während der Durchführung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Herrn Prof. Dr. M. Düggele, Vorstand des Landwirtschaftlich-bakteriologischen Instituts der E. T. H. Zürich, bin ich zu bestem Dank verpflichtet für sein bereitwilliges Entgegenkommen und seine wertvollen Ratschläge. Es ist mir ein besonderes Bedürfnis, allen Herren Assistenten der Versuchsanstalt Liebefeld, die mir jederzeit mit Rat und Tat bereitwillig beigestanden sind, herzlich zu danken.

## Recherches sur les bactéries importantes en industrie laitière contenues dans les fèces de bovins.

### Résumé.

Etant donné que dans un travail précédent, nous avons démontré que l'infection de lait par les fèces bovines n'avait pas l'importance qui lui est attribuée généralement au point de vue quantitatif, il était nécessaire d'étudier également le côté qualitatif de la question. Nous avons en particulier cherché à déterminer quelle pouvait être la part des bactéries utiles et nuisibles en industrie laitière provenant de l'infection fécale qui bien qu'inévitable en pratique peut être réduite considérablement. Voici en résumé les résultats obtenus :

*Ferments lactiques appartenant aux coccacées.* Quantitativement les *streptocoques* constituent le groupe le plus important des ferments lactiques contenus dans les excréments de vache. Ils peuvent dans certains cas y être en plus grand nombre que les bactéries du groupe coli. Qualitativement les streptocoques des fèces de bovins appartiennent à un nombre restreint d'espèces; ils se placent exclusivement dans les groupes *Sc. bovis* et *Sc. lactis*. *Sc. bovis* qui forme le groupe qui porte son nom avec le *Sc. inulinaceus* est l'organisme prépondérant, le streptocoque ordinaire des fèces de vaches. Le *Sc. inulinaceus* lui est proche et ne s'en différencie que par son pouvoir de dégrader la caséine. A part cela les deux espèces présentent les mêmes caractères morphologiques et physiologiques (formation de chaînettes de peu d'articles, fermentation de l'amidon et de l'inuline, non-fermentation de la mannite). A l'ordinaire, ils se développent bien dans le lait mais présentent souvent un pouvoir acidifiant assez faible. Tandis que quantitativement le groupe du *Sc. bovis* domine, les représentants du groupe *Sc. lactis* font preuve d'un pouvoir acidifiant plus élevé. L'espèce la plus fréquente de ce dernier groupe dans les fèces bovines est le *Sc. faecium* qui se différencie du *Sc. lactis* d'abord par sa température maximale plus élevée et en n'attaquant que rarement la caséine.

83 % des souches de streptocoques isolées de fèces ont donné une réaction typique dans le sens de K. J. Demeter sur le lait tournesolé. Cette épreuve n'est donc pas caractéristique seulement pour le *Sc. lactis* comme certains auteurs l'ont admis. La majorité des souches de streptocoques des fèces bovines provoque une acidité et odeur franches dans le lait. Une minorité a la propriété de donner un goût malté ou de brûlé au lait. Certaines souches ont perdu cette propriété au bout de peu de temps. Aucune souche n'a de pouvoir hémolytique typique. Le pouvoir d'attaquer la caséine et le pouvoir rotatoire de l'acide lactique formé par certaines souches a été déterminé. De cultures de *Sc. faecium* et *Sc. bovis* clivant l'esculine ont été obtenues à partir de lait et de fromage.

Tandis que nous n'avons pas réussi au cours de nos recherches à isoler des *bétacoques* typiques dans les fèces de vaches, nous avons trouvé quelques bactéries analogues susceptibles de former des acides volatils ainsi que du diacétyle et de l'acétyle méthyl carbinol mais que les autres propriétés ont fait classer dans le groupe des tétracoques.

Contrairement à S. Orla-Jensen qui a trouvé qu'au point de vue quantitatif les *tétracoques* prépondéraient dans les fèces de vaches nous avons trouvé leur nombre inférieur à celui des streptocoques. Les facultés de réduire des nitrates,

de former de la catalase et la réduction du vert de Janus sont caractéristiques pour le groupe des tétracoques. Nous avons retrouvé les espèces des fèces dans le lait et le jeune fromage d'Emmental.

*Lactobacilles.* Les ferments lactiques en forme de longs bâtonnets du type Bact. casei epsilon se trouvent dans les excréments de jeunes veaux alimentés presque exclusivement au lait. Par contre, ils font entièrement défaut dans les fèces de bovins adultes.

Nous avons constamment trouvé des bâtonnets du groupe bêtabactérium (Bact. casei delta et Bact. casei gamma) dans les fèces de vaches que ces dernières soient au régime vert ou au régime sec. Les bêtabactéries appartiennent par conséquent à la flore régulière des fèces comme les streptocoques et les tétracoques. Les bêtabactéries sont susceptibles en partie de produire dans du lait stérilisé l'arome du beurre. Le diactyle et l'acétylméthylcarbinol produits ont été déterminés par l'analyse chimique. (On admettait jusqu'ici que seul un mélange de bêtacoques et de *Sc. lactis* ou *cremoris* était susceptible de produire cet arôme.) Un procédé spécial pour l'isolation des bêtabactéries à partir de fèces a été indiqué. Les excréments de vaches contiennent également les représentants des genres *streptobacterium* (type Bact. casei alpha) et *microbacterium*. Ces derniers sont remarquables à cause de leur résistance à des concentrations salines et des températures élevées.

*Bactéries propioniques.* Ces microbes ne se trouvent qu'occasionnellement dans les fèces de vaches. Nous avons trouvé l'espèce Bact. acidi propionici b de Freudreich. Sur un milieu gélosé contenant 4 % d'extrait de levure Difco, du lactate de sodium et neutralisé au p. H. 7,2 les bactéries propioniques ont souvent formé assez de gaz pour déchirer la gélose.

*Les bactéries indésirables.* Tandis que *Bact. aerogenes*, l'agent usuel du gonflement sous presse du fromage ne se trouve pas dans les excréments de vaches, *Bact. coli* y est généralement l'organisme prépondérant. Les fèces de veaux et de jeunes animaux (jusqu'à 2 ans et demi) présentent les titres en Bact. coli les plus élevés. Chez les vaches, le nombre des colibactéries est quelquefois égal au nombre des streptocoques et descend même au-dessous dans certains cas. Les recherches sur la teneur des fèces en Bact. amylobacter ont confirmé les résultats obtenus précédemment à Liebefeld. La teneur moyenne en microbes ressemblant au Bac. putrificus varie d'environ 100 à 1000 par gramme.

*Considérations générales.* La faculté de cliver l'esculine semble être une propriété commune à presque tous les microbes fécaux. 98 % des streptocoques, 100 % des bêtabactéries et des souches de Bact. coli la présentaient. Les tétracoques, les streptobactéries et les microbactéries des fèces ont une position intermédiaire en ce sens qu'ils n'attaquent pas toujours ce produit. Etant donné que la propriété de cliver l'esculine manque aux streptocoques de provenance extrafécale, on peut conclure que des streptocoques ayant la propriété de cliver l'esculine isolés de lait ou de fromage, sont d'origine fécale.

Les streptocoques, les tétracoques et les microbactéries des fèces se distinguent par leur résistance à des températures relativement élevées.

Nous avons démontré que des souches de bêtabactéries et de tétracoques sont susceptibles de produire du diacétyle et de l'acétylméthylcarbinol. A part la formation dans le lait de la substance essentielle de l'arome du beurre, ces microbes y produisent une quantité assez forte d'acide volatil.

La question qui a fait l'objet principal du présent travail se résout donc comme suit: Les fèces de vaches contiennent un nombre appréciable de ferments lactiques et propioniques identiques ou presque identiques aux espèces nécessaires en industrie laitière. Les fèces contiennent aussi un certain nombre d'espèces de ferments lactiques nettement différentes des espèces utiles en fromagerie et en beurrerie. Il est intéressant de relever que les lactobacilles du type *Tbm. helveticum* (*Bact. casei epsilon*) si importants en fromagerie n'ont pas pu être décelés dans les fèces de vaches.

### Literaturverzeichnis.

- 1) *Achalme*, ann. de l'Inst. Past. 16, 1902, p. 653. — 2) *Andrewes* u. *Horder*, Lancet 2, p. 708 u. 775. — 3) *P. Ankersmit*, Diss. Lausanne, 1905. — 4) *Ayers, Johnson* u. *Mudge*, Journ. inf. Dis. 34, p. 29—48. — 5) *S. V. Bagger* (zit. nach H. Schönfeld), Ztrbl. f. Bakt. I, O. 99, 1926, p. 391. — 6) *Chr. Barthel*, Methoden zur Untersuchung v. Milch, P. Parey, Berlin, 1920. — 6a) *J. Baumann*, Schweiz. Milchzeitung, Nr. 72, 1932. — 7) *J. H. Birkingshaw* and others, Bioch. Journ. 25, p. 1525. — 8) *L. Bitter* u. *L. Buchholz*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 95, 1925, p. 38—61. — 9) *Blythe, A. Eagles* und *W. Sadler*, Nature, 130, 1932, p. 278. — 10) *H. Braun* u. *K. Guggenheim*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 127, p. 100. — 11) *R. Burri*, Das Tuscheverfahren etc., G. Fischer, Jena, 1909. — 12) *R. Burri*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1912, p. 481. — 12a) *R. Burri*, World's Dairy Congress 1928 London, Report of Proc., p. 690—697. — 13) *R. Burri* u. *M. Düggeli*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 49, 1909, p. 145—174. — 14) *R. Burri* u. *W. Staub*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1918. — 16) *Cahn*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 30, p. 721. — 17) *W. A. Cordes* u. *B. W. Hammer*, Res. Bull. 66, 1921. — 18) *K. J. Demeter*, Milchw. Forsch. 5, 1928, p. 505 bis 531. — 19) *K. J. Demeter*, Milchw. Forsch. 8, 1929, p. 201—267. — 20) *J. W. Dible*, Journ. of Pathol. u. Bact. 25, 1925, p. 1. — 21) *W. Dorner*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1924, p. 26. — 22) *W. Dorner*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1925. — 23) *E. Duclaux*, Traité de microbiologie, T. 3, Masson Paris, 1900. — 24) *M. Düggeli*, Ztrbl. f. Bakt. II, 12 u. 13, 1904. — 25) *M. Düggeli*, Ztrbl. f. Bakt. II, 15, 1905, p. 577—600. — 26) *Escherich*, Stuttgart, 1886. — 27) *Escherich*, Fortschritte der Mediz. 3, 16 u. 17 (zit. n. W. Maurer, Diss., Kiel 1929). — 28) *A. Fischer*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 77, 1915. — 29) *Frazier* u. *Rupp*, Journ. of Bact. 16, 1928, p. 57—64. — 30) *v. Freudenreich* u. *Orla-Jensen*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1906. — 31) *Fuller* u. *Armstrong*, Journ. of inf. dis. 13, 1913, p. 442. — 32) *C. Gorini*, Rev. gén. du lait, 8, 1912, p. 3—12. — 33) *A. Grenz*, Milchw. Forsch. 14, p. 140. — 34) *Gröning*, Diss., Bern 1901. — 35) *B. W. Hammer* u. *M. P. Backer*, Res. Bull. 99, 1926. — 36) *F. C. Harrison* u. *J. van der Leek*, Ztrbl. f. Bakt. II, 22, p. 547. — 37) *L. Heim*, Zeitschr. f. Hyg. 101, 1923, p. 104—118. — 38) *Hirsch*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 22, 1897, p. 369. — 39) *G. J. Hucker*, N. Y. State agr. Exp. Stat. Techn. Bull. 143, 1928. — 39a) *G. J. Hucker*, N. Y. State agr. Exp. Stat. Techn. Bull. 190, 1932. — 40) *G. J. Hucker*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. III, 1929, p. 9—22. — 41) *W. Hüttemann*, Diss., Bern 1905. — 42) *C. Hüttig*, milchw. Lit. Bericht, 77, Kiel 1933. — 43) *C. Hüttig*, Milchw. Ztg. 58, 1933, p. 881—883. — 44) *Kessler* und *Svenarton*, Journ. of Bact. 14, 1927, p. 47. — 45) *Kjeldahl* nach *G. Wiegner*, Anleitung zum quant. agrikult.-chem. Prakt., Verl. Borntraeger, Berlin 1926. — 46) *H. Kreipe*, Diss., Kiel 1927. — 47) *Kruse*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 34, p. 737. — 48) *J. Kürsteiner*, Schweiz. landw. Mtshefte, Nr. 1—4, 1926. — 49) *J. Kürsteiner*, Schweiz. Milchztg., Nr. 10, 1932. — 50) *Lehmann* u. *Neumann*, J. F. Lehmanns Verlag, München 1927. — 51) *F. Löhnis*, Hdb. d. ldw. Bakt., Borntraeger, Berlin 1910. — 52) *Maulhardt*, Ztrbl. f. Bakt. II, 82, p. 135—136 (Ref.). — 53) *Mereschkowsky*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 40, 1906, p. 118—125. — 54) *K. Meyer* u. *H. Schönfeld*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 99, p. 416. — 55) *M. B. Michaelian*, R. S. Farmer und *B. W. Hammer*, Res. Bull. 155, 1933. — 56) *Moro*, Jahrb. f. Kinderheilkunde, 52, 1900, p. 38. — 57) *Neubauer*, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilkunde, 31, 1905, p. 153—176. — 58) *C. Neuberger* u. *E. Simon*, Bioch. Zt. schr. 179, 1926, p. 444. — 59) *C. B. van Niel*, The propionic acid bacteria, Haarlem 1928. — 60) *S. Orla-Jensen*, Kopen-

- havn, 1919. — 61) *Ohlsson*, nach *Abderhalden*, Handb. d. biol. Arb.-Methoden, 6, p. 745–776. — 62) *Pederson, Peterson* u. *Fred*, Journ. of Biol. Chem. 68. — 63) *Popoff*, Ztrbl. f. Bakt. II, 11, 1904, p. 217. — 64) *W. Ritter*, Ldw. Jahrb. d. Schweiz, 1932, p. 601–608. — 65) *W. Ritter*, Milchw. Forsch., 15, 1933, p. 154–168. — 66) *W. Ritter* u. *W. Dorner*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 125, p. 379. — 67) *A. Rochaix*, compte rendu d. l. soc. d. biol., 90, 1924, p. 771. — 68) *L. A. Rogers*, Journ. of Bact. 16, 1928. — 69) *L. A. Rogers, W. M. Clark* u. *A. Evans*, Journ. of Inf. Dis. 15, 1914, p. 100–123. — 70) *G. Ruschmann* u. *R. Koch*, Ztrbl. f. Bakt. II, 80, 1930, p. 1. — 71) *H. Schmalfuss*, Ztschr. f. angew. Chemie 41, 1928, p. 847. — 72) *H. Schönfeld*, Ztrbl. f. Bakt. I, O. 99, p. 388–401. — 73) *J. M. Sherman* u. *P. Stark*, Journ. of Bact. 22, 1931, p. 275–285. — 74) *J. M. Sherman*, Journ. of Bact. 6, 1921, p. 379–394. — 75) *van Slyke*, nach *E. Abderhalden*, Hdb. d. biol. Arb.-Meth. 5, p. 1017. — 76) *O. Svanberg*, Zeitschr. f. phys. Chemie, 108, p. 144. — 77) *Thiercelin*, compte rendu d. séances d. l. soc. d. biol. 51, 1899, p. 551. — 78) *J. Thöni*, Ann. agr. de la Suisse, 1906, p. 153. — 79) *Thöni* u. *Allemann*, Ldw. Jahrb. d. Schweiz, 1908. — 80) *Tissier*, Thèse 269, Paris 1899. — 81) *Gerda Troili-Petersson*, Ztrbl. f. Bakt. II, 34, p. 494. — 82) *A. J. Virtanen* u. *E. Lundmark*, Milchw. Forsch. 8, 1929, p. 373–382. — 83) *A. Voss*, Milchw. Forsch. 8, 1929, p. 383–422. — 84) *Weigmann* u. *Wolff*, Ztrbl. f. Bakt. II, 20, 1908. — 85) *C. H. Werkman* u. *S. E. Kendall*, Iowa State Coll. Journ. of Science 6, 1931, p. 17–32. — *G. Wiegner*, siehe Nr. 45. — 86) *Winslow* u. *Palmer*, Journ. of infect. dis. 7, 1910, p. 1–10. — 87) *E. Wirth*, Ztrbl. f. Bakt. I, 99, 1926, p. 266–292. — 88) *A. Wittern*, Ztrbl. f. Bakt. II, 87, p. 412–446. — 88a) *A. Wolff*, Ztrbl. f. Bakt. II, 20, 1908. — 89) *E. Wüthrich* u. *E. v. Freudenreich*, Ztrbl. f. Bakt. II, 1895, p. 873–879. — 90) *E. Wüthrich* u. *E. v. Freudenreich*, Ztrbl. f. Agr. Chem., 1898, p. 285.
-