Zeitschrift

für

Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel,

sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 7.

1. April 1908.

15. Band.

Verwendbarkeit der Reduktaseprobe zur Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit der Milch.

Von

Chr. Barthel.

Mitteilung aus dem bakteriologischen Laboratorium der Zentralanstalt für landwirtschaftliches Versuchswesen auf Experimentalfältet bei Stockholm.

Der erste, der die Aufmerksamkeit auf das Reduktionsvermögen der Milch gelenkt hat, dürfte wohl Duclaux¹⁾ gewesen sein, der im Jahre 1887 in seinem klassischen Werke „Le Lait“ schreibt:

„Wenn man zu einer Milch, die nur einige Stunden alt ist, einen oder zwei Tropfen Indigocarmin setzt, sodaß sie eben blaßblau gefärbt wird, und eine Probe davon in einem Probiergläschen, welches man ganz mit derselben angefüllt hat, in den Thermostaten bringt, so nimmt man wahr, wie diese Milch in kürzerer oder längerer Zeit ihre weiße Farbe wieder annimmt und dann wieder blau wird, wenn man sie ziemlich langsam und in einem möglichst dünnen Strahl in ein Glas fließen läßt, sodaß sie während dieses Vorganges ausgiebig mit der Luft in Berührung kommt. Das Indigocarmin ist nämlich reduziert und in farblosen Zustand versetzt worden durch die Fermente der Milch, da diese Sauerstoff nötig haben, um zu leben“.

Winter Blyth²⁾ wies dasselbe Reduktionsvermögen der Milch auf Lackmus nach, aber das Verdienst, die Initiative zur Verwendung dieser reduzierenden Eigenschaft der Milch ergriffen zu haben, um hierauf die Qualitätsbeurteilung der Milch zu gründen, kommt Neisser und Wechsberg³⁾ zu, welche zu diesem Zwecke die Anwendung von Methylenblau-Lösung vorschlugen, da diese Lösung durch Reduktion entfärbt wird, indem sich dabei eine entsprechende Leukoverbindung bildet, wie solches bei Indigocarmin und Lackmus auch der Fall ist. Methylenblau wird nämlich von diesen Forschern bei ihrer bioskopischen Methode zum Nachweise von Beschädigungen bei lebenden Zellen und Organismen angewandt.

Im Jahre 1902 veröffentlichte Scharfing⁴⁾ eine Arbeit, in der er vorschlug, eine mit Formalin versetzte Methylenblau-Lösung anzuwenden, um zu bestimmen, ob eine Milch auf 78—80° erhitzt worden ist oder nicht. Milch, die nicht bis zu dieser Temperatur erhitzt worden ist, entfärbt nämlich formalinhaltige Methylenblau-Lösung in

¹⁾ Duclaux, Le Lait, études chimiques et microbiologiques. Paris 1887, S. 1.

²⁾ Analyst 1901, 26, 148.

³⁾ Münchener mediz. Wochenschr. 1900, No. 37.

⁴⁾ Diese Zeitschrift 1902, 5, 1113.

etwa 10 Minuten bei 40—50°, während erhitzte Milch keine Entfärbung bewirkt. Die von Schardinger angewandte Lösung, welche „Schardinger's Reagens“ genannt worden ist, hat folgende Zusammensetzung: 5 ccm gesättigte alkoholische Lösung von Methylenblau + 5 ccm Formalin + 190 ccm dest. Wasser.

Gleichzeitig fand indessen Schardinger auch, daß eine formalinfreie Methylenblau-Lösung¹⁾ (5 ccm Methylenblau + 195 ccm Wasser) durch die Milch um so schneller entfärbt wird, je näher die Milch dem Stadium ist, in welchem sie beim Kochen koaguliert. Er sagt über dieses Verhalten der Milch folgendes:

„Es bedarf wohl keiner ausführlichen Darlegung, wie bedeutungsvoll es für den Haushalt, für die Verarbeitung der Milch zu den verschiedenen Molkereiprodukten wäre, wenn die vorgeschlagene Reaktion auch einen sicheren Anhaltspunkt für die Beurteilung der „Frische“ der Milch gewähren würde. Die Ausführung dieser Reaktion ist ungleich einfacher als eine titrimetrische Bestimmung des Säuregrades der Milch und auch für Laien ohne besondere Schulung durchführbar.“

Man war also zu der Einsicht gelangt, daß man an dem Vermögen der Milch, Methylenblau schneller oder langsamer zu entfärben, einen ziemlich zuverlässigen Maßstab für die „Frische“ der Milch haben könne, welche ihrerseits mit dem Bakteriengehalt der Milch zusammenhängt. Auf Anregung von Neisser unternahm es nun H. Smidt²⁾, die hierher gehörigen Verhältnisse näher zu untersuchen. Smidt fand, daß für die Reduktion folgende Faktoren in Betracht kommen:

1. Milchzucker, sowie Substanzen, die erst beim Kochen in Wirksamkeit treten.
2. Reduzierende Fermente.
3. Die reduzierende Wirksamkeit der Bakterien.

Der Milchzucker bedarf, um reduzierend zu wirken, einer deutlich alkalischen Reaktion der Milch, was ja selten oder nie in der Praxis vorkommt. Formalin übt an und für sich keine reduzierende Einwirkung auf M.F.-Lösung aus. Die Reduktion der M.F.-Lösung schreibt Smidt einem besonderen Enzym zu, welches er Aldehydkatalase nennt. Daß es sich um ein Enzym handelt, geht nach Smidt einerseits daraus hervor, daß die Reduktion der M.F.-Lösung bei Erhitzung der Milch auf 78—80° aufhört, sowie andererseits daraus, daß Blausäure, welche ja ein spezifisches Enzymgift ist, schon in 0,01 %-iger Lösung die Reduktion der M.F.-Lösung verhindert. Ebenfalls wird die Reduktion durch einen höheren Formalingehalt der Lösung, als Schardinger ihn vorschreibt, gehemmt, und sie hört ganz auf, wenn der Formalingehalt mehr als 0,5 % beträgt. Das in Frage stehende Enzym wirkt als Katalysator und vermittelt die reduzierende Einwirkung des Formalins.

In einer späteren Arbeit³⁾ bestätigt Smidt seine früheren Angaben. Die Reduktion der M.F.-Lösung beruht also auf einem besonderen Enzym, der Aldehydkatalase; die Reduktion der M.-Lösung hingegen beruht auf bakterieller Einwirkung. Um in Wirksamkeit zu treten, erfordert die Aldehydkatalase die Gegenwart eines Aldehyds, wozu Formaldehyd am besten geeignet ist. Smidt stellt das Vorhandensein von wirklichen Reduktasen in der Milch entschieden in Abrede; denn die

¹⁾ Der Kürze halber soll im folgenden die formalinhaltige Methylenblau-Lösung (Schardinger's Reagens) mit M.F.-Lösung und die formalinfreie Methylenblau-Lösung mit M.-Lösung bezeichnet werden.

²⁾ Hygienische Rundschau 1904, 14, 1137.

³⁾ Archiv für Hygiene 1906, 58, 313.

Aldehydkatalase reduziert nicht an und für sich, sondern es wird die Reduktion durch das Formalin hervorgebracht; fernerhin beruht die Reduktion der M.-Lösung auf Bakterienwirkung, also nicht auf der eines etwa in der Milch vorhandenen Enzyms. Bei alter Milch geht nach Smidt die Reduktion einer M.F.-Lösung langsamer vor sich als diejenige einer M.-Lösung, was auf dem hemmenden Einfluß des Formalins auf die Mikroorganismen beruht.

Ganz anderer Ansicht über diese Sache ist Seligmann¹⁾, welcher auf Grund seiner Untersuchungen zu folgenden Schlußsätzen gelangt:

„Ein prinzipieller Unterschied zwischen der Reduktion einer M.F.-Lösung und einer M.-Lösung existiert nicht. Die Superoxydase und die Reduktase der Milch werden durch die organisierten Fermente hervorgerufen; sie sind Äußerungen bazillärer Wirksamkeit“. Weiter sagt er:

„Für die reduzierenden Eigenschaften der Kuhmilch kommen außer den Bakterien noch Abbauprodukte des Caseins in Betracht, wie wir sie experimentell durch bakterielle Prozesse erhalten haben. Da diese Körper allem Anschein nach analog Fermenten wirken, genügen möglicher Weise schon sehr geringe Mengen zur Erzeugung reduzierender Wirkungen. Es ist denkbar, daß solche Produkte schon in den Milchgängen des Muttertieres entstehen, gleichgültig, ob auf bakterieller oder auf rein autolytischer Basis, und so zur Annahme des Vorhandenseins präformierter Enzyme geführt haben.“

Diese Ansicht, daß die Reduktion sowohl einer M.F.-Lösung als einer M.-Lösung von einer und derselben Ursache ausgeht, hält Seligmann auch in einer späteren Arbeit²⁾ fest.

Indessen dürfte Seligmann mit dieser Ansicht ziemlich allein stehen. Orla Jensen³⁾, welcher den Ursprung der in der Kuhmilch vorhandenen Oxydasen und Reduktasen zu erforschen gesucht hat, schließt sich der Auffassung Smidt's an. Ebenso wie Smidt behauptet Orla Jensen, daß die Aldehydkatalase, welche seiner Ansicht nach richtiger Aldehydreduktase, in Übereinstimmung mit „Peroxydase“, genannt werden müßte, an die Fettkügelchen der Milch gebunden vorkommt. Es handelt sich hier jedoch nicht um eine gewöhnliche Adhäsion, wie solches bei der Katalase der Milch der Fall ist, welche auch zum größeren Teil an die Fettkügelchen gebunden ist; denn die Katalase läßt sich ohne Mühe aus dem Rahm auswaschen, was hingegen bei der Aldehydreduktase — wie wir uns in Übereinstimmung mit Orla Jensen ausdrücken wollen — nicht der Fall ist. Orla Jensen stellt die Vermutung auf, daß die Aldehydreduktase an die Storch'sche „Schleimmembran“ gebunden sei; es gelang ihm indessen nicht, mittels eines Präparates aus diesem Stoff, welches er von Professor Storch selbst erhalten hatte, die Reduktion einer M.F.-Lösung hervorzurufen, was allerdings nach Orla Jensen darauf beruhen konnte, daß das Präparat alt war. Daß die Reduktion einer M.-Lösung ausschließlich auf Bakterien beruht, bestätigt auch Orla Jensen vollkommen.

Die Ziegenmilch hat geringe oder keine Reduktionskraft; man glaubt, daß dies auf dem hohen Gehalt dieser Milch an Oxydase beruht, welches Enzym ja eine der Reduktase gerade entgegengesetzte Wirkung ausübt und somit die Wirkung der Re-

¹⁾ Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1906, 52, 161,

²⁾ Zeitschrift für angewandte Chemie 1906, 19, 1540.

³⁾ Orla Jensen, Oversigt over det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger 1906, No. 5.

duktase sozusagen „deckt“. Frauenmilch liefert nach Untersuchungen von Rullmann¹⁾ und Koning²⁾ keine oder keine nennenswerte Reduktasereaktion.

Wir wollen indessen bis weiterhin die theoretische Seite der Sache verlassen und statt dessen die Versuche besprechen, die bisher angestellt worden sind, um praktisch das Reduktionsvermögen der Milch gegenüber Methylenblau zu einem Maßstab für die Qualität der Milch in bakteriologischer Hinsicht zu verwenden. Smidt³⁾ wies zuerst nach, daß wirklich ein gewisser Parallelismus zwischen dem Bakteriengehalt der Milch und dem Reduktionsvermögen derselben besteht. Sein Verfahren bei der Vornahme der Reduktionsprobe war folgendes: Die von Neisser und Wechsberg angegebene M.-Lösung (Methylenblau 1,0, absoluter Alkohol 20,0, dest. Wasser 29,0), welche sich wegen ihres hohen Alkoholgehalts steril hält und daher als Stammlösung dienen kann, wird mit steriler Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 250 verdünnt. Diese verdünnte Lösung muß jedesmal neu bereitet werden, da sie sich nicht steril halten kann. Drei Tropfen dieser verdünnten Lösung wurden in Probierröhrchen eingeführt, welche fallende Mengen der zu untersuchenden Milch enthielten. Bei allen Röhrchen wurde sodann mit lange gekochter und wieder abgekühlter Milch bis zu gleichem Volumen aufgefüllt. Die Luft wurde durch Überschiebung mit Paraffinum liquidum abgeschlossen; die Probierröhrchen wurden bei 37° in den Thermostaten gestellt und in der Regel nach 2 Stunden untersucht. Zur Kontrolle diente ein Röhrchen mit der zum Auffüllen benutzten, gekochten Milch unter Zusatz von Methylenblau, sowie ein Röhrchen mit der Milch, die untersucht werden sollte, ohne Zusatz von Methylenblau.

Die Milchmenge — von der Milch, die geprüft werden sollte — variierte bei Smidt's Versuchen zwischen 0,01 und 4 cem; man erhält somit bei diesem Verfahren, welches zweifellos sehr mühsam ist, ein Maß für die geringste Milchmenge, die in einer gewissen Zeit eine M.-Lösung zu reduzieren vermag. Durch Vergleich mit dem Bakteriengehalt der Milch konnte Smidt feststellen, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen dem Bakteriengehalt und dem Reduktionsvermögen der Milch besteht. Nähere Untersuchungen hierüber hat er indessen nicht angestellt; er hebt aber mit Recht die Vorteile hervor, die diese Methode gegenüber dem zeitraubenden und mühsamen Abzählen von Bakterienkolonien auf Platten gewährt.

P. Th. Müller⁴⁾ hat sodann versucht, die Methodik der Untersuchung zu vereinfachen, zunächst dadurch, daß er, anstatt als Einheit die geringste Milchmenge, die innerhalb einer gewissen Zeit entfärbt wird, anzunehmen, als Einheit die Reduktionsgeschwindigkeit oder den Zeitraum, den eine gewisse Milchmenge erfordert, um eine gewisse Menge Methylenblau völlig zu entfärben, ansetzt. Dieses Prinzips hatten sich schon vorher Cathcart und Hahn⁵⁾ bei ihren Untersuchungen über die Reduktionswirkung von Bakterien bedient.

Es ist klar, daß man, wenn dieses Prinzip angewendet wird, strenge genommen nur eines einzigen Röhrchens bei der Untersuchung bedarf; Müller wendete jedoch,

¹⁾ Diese Zeitschrift 1904, 7, 81.

²⁾ Milchwirtschaftliches Zentralblatt 1907, 3, 41. Eine Probe Mischmilch von 5 Ammen, die ich aus dem Allgemeinen Kinderhause dank der Freundlichkeit Professor Medin's erhielt, entfärbte M.F.-Lösung in 3 Stunden und M.-Lösung in 24 Stunden.

³⁾ Hygienische Rundschau 1904, 14, 1137.

⁴⁾ Archiv für Hygiene 1906, 56, 108.

⁵⁾ Archiv für Hygiene 1902, 44, 295.

mehr der Kontrolle wegen, bei seinen Versuchen auch Rhrchen an, die $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ der ursprnglichen Milchmenge enthielten. Im einzelnen beschreibt Mller sein Verfahren bei den Versuchen folgendermaen:

„Drei Reagensrhrchen gewhnlichen Kalibers wurden mit je 2 ccm frischen Leitungswassers beschickt, ein viertes blieb zunchst leer. Es stellte sich bei der Keimarmut des Grazer Wassers, das etwa 20 Keime im Kubikzentimeter enthlt, als berflssig heraus, dasselbe vorher zu sterilisieren; es mag jedoch andernorts zweckmig erscheinen, gekochtes Wasser zu benutzen. Das leere Rhrchen und eines der wasserhaltigen wurden dann mit je 2 ccm der zu prfenden Milch versetzt; nach grndlicher Mischung wurden nun aus dem letzteren 2 ccm in das nchste, und aus diesem wieder 2 ccm in das vierte Glschen bertragen, aus welchem dann die berschssigen 2 ccm entfernt wurden. Alle Rhrchen enthielten somit die gleiche Menge Flssigkeit, nmlich 2 ccm, und zwar von der Vollmilch abwrts bis zur Verdnnung 1:8. Da dieses Verdnnungsverfahren — dasselbe, das bei den Agglutinationsversuchen allgemein verwendet wird — keinerlei minutise Ablesung mit Mepipetten erfordert, sondern nur eine Vollpipette zu 2 ccm ntig macht, so kann dasselbe ohne weiteres auch einem weniger geschulten Dienstpersonal berlassen werden, was unter Umstnden sehr erwnscht sein kann.

In jedes Rhrchen kamen dann 0,2 ccm Methylenblau-Lsung, welche durch 100-fache Verdnnung der oben erwhnten, von Neisser und Wechsberg angegebenen alkoholischen Stamm-lsung hergestellt worden war, und schlielich noch eine etwa 2 cm hohe Schicht von Paraffinum liquidum. Hierauf wurden die Reagensglschen in den auf 37 eingestellten Thermostaten gebracht und von Zeit zu Zeit beobachtet. Da, wie aus dem Folgenden hervorgehen wird, unter diesen Versuchsbedingungen bei alter und zersetzter Milch oft schon nach wenigen Minuten vollkommene Reduktion in der unverdnnten Probe eintritt, whrend bei reiner, frischer Milch hierzu viele Stunden erforderlich sind, so hat unsere Modifikation des Reduktionsversuchs, abgesehen von ihrer technischen Einfachheit, noch den weiteren Vorzug, unter gnstigen Umstnden binnen krzester Frist eine Entscheidung zu ermglichen.“

Die Ergebnisse, zu denen Mller mittels dieses Versuches gelangte und die auf einem umfassenden Versuchsmaterial beruhen, sind von so groem Interesse, da wir hier etwas nher auf dieselben eingehen wollen.

Mller fand also, da frischgemolkene und auf gewhnliche Weise behandelte Milch eine Reduktionszeit von 10—12 Stunden oder noch lnger erfordert. Milch, die bei hherer Temperatur aufbewahrt war, zeigte eine schnellere Zunahme des Reduktionsvermgens als Milch, die bei niedriger Temperatur aufbewahrt war. Koagulierte Milch reduziert schon nach einigen Minuten; bei lngerem Aufbewahren nimmt jedoch die Reduktionsgeschwindigkeit wiederum ab. Zusatz von Kuhkot in geringer Menge oder von saurer Milch zu reiner Milch verkrzt die Reduktionszeit betrchtlich. Eine gleiche Wirkung hat das Umfllen der Milch durch mehrere Behlter. Bei Schlu der Inkubationsperiode (Soxhlet) ist die Reduktionszeit ungefhr 1 Stunde. Die Aciditt und die Reduktionsgeschwindigkeit der Milch stehen in umgekehrtem Verhltnis zueinander, unabhngig von der Temperatur, bei der die Milch aufbewahrt worden ist. Die Reduktionsprobe liefert auch bei mit Soda versetzter Milch zuverlssige Ergebnisse, wenn nur bei dem Versuch die Milch nicht alkalisch ist. Zusatz von antiseptischen Mitteln, wie Borsure, Salicylsure, Formaldehyd, hemmt oder verhindert die Reduktionskraft der Milch. Milch, die 15 bis 30 Minuten auf 100 erhitzt worden ist, weist nur eine geringe Reduktionsgeschwindigkeit auf, welche jedoch beim Aufbewahren der Milch, besonders bei hherer Temperatur (32—37) allmhlich wieder zunimmt.

Mller schlgt ebenfalls vor, die Reduktionsprobe in einer einfachen und leicht ausfhrbaren Form im Haushalt anzuwenden, um zu beurteilen, ob eine

Milch als Nahrung für Säuglinge geeignet ist. Das hierbei einzuschlagende Verfahren wäre nach Müller's Vorschrift folgendes:

Apothekenfläschchen von 15—20 g Raumgehalt werden zur Hälfte mit Milch gefüllt. Man setzt 10—15 Tropfen M.-Lösung (0,02 g Methylenblau + 100 g Wasser) zu und überschichtet mit ungefähr 1 ccm Öl (Speiseöl). Sowohl das Öl wie die Farblösung muß man zuweilen im kochenden Wasserbade erhitzen, um eine allzu reichliche Zunahme von Mikroorganismen zu verhindern. Die Versuchsfläschchen werden, wohl verkorkt, in ein Wasserbad mit Wasser von 40° gesetzt. Jede Probe, die die M.-Lösung innerhalb einer Stunde entfärbt, muß als unbrauchbar zur Säuglingsernährung betrachtet werden.

Vergleichende Versuche in bezug auf den Bakteriengehalt der Milch und die Reduktionszeit hat Müller nicht angestellt.

Wir wollen nun zum Bericht über die Versuche übergehen, die während des verflossenen Jahres (1907) in dem bakteriologischen Laboratorium der Zentralanstalt für landwirtschaftliches Versuchswesen auf Experimentalfäلتet bei Stockholm zu dem Zwecke angestellt worden sind, zu untersuchen, ob es möglich ist, mittels der Reduktaseprobe eine einfache und zuverlässige Methode zur Beurteilung der Qualität der Milch in bakteriologischer Hinsicht zu erlangen.

1. Versuche über den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Reduktion von Methylenblau-Lösungen.

Die Methodik, die bei allen Versuchen zur Anwendung kam, war folgende: Die zu prüfende Milch wurde auf 4 Röhrchen verteilt, so daß in jedes Röhrchen 10 ccm kamen. Bei zweien der Röhrchen wurde Schardinger's Reagens (MF.-Lösung) zugesetzt und zwar in demselben Verhältnis, wie Schardinger selbst vorschlug, d. h. 0,5 ccm, während bei den beiden anderen Röhrchen formalinfreie M.-Lösung in derselben Menge zugesetzt wurde. Nach dem Vermischen, welches durch mehrmaliges Umrühren der Röhrchen geschah, wurde mit ungefähr 2 ccm Paraffinum liquidum überschichtet. Sodann wurden die Röhrchen in ein Wasserbad von 40° bis 45° gestellt, worauf jedesmal die Zeit der vollständigen Entfärbung notiert wurde.

Nach einigen allgemeinen, orientierenden Versuchen entschloß ich mich zur Anwendung der von Schardinger angewendeten, formalinfreien M.-Lösung, einerseits weil diese besonders einfach herzustellen ist (man hat nur zu 5 ccm einer gesättigten alkoholischen Stammlösung von Methylenblau 195 ccm dest. Wasser zuzusetzen), andererseits weil vergleichende Untersuchungen zwischen dieser und der von Müller angewendeten Lösung zeigten, daß bei sehr langer Reduktionszeit Müller's Lösung allerdings um eine oder zwei Stunden schneller reduziert wurde als die M.-Lösung, daß aber der Zeitunterschied zwischen der Entfärbung der beiden Lösungen sich bei kürzerer Reduktionszeit stark verminderte und bei einer Reduktionszeit von 1 bis 3 Stunden ganz verschwand; diese letztere ist aber gerade die Zeit, die die Probe bei ihrer praktischen Ausführung verlangt.

Hierauf wurde eine Reihe von Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf das Reduktionsvermögen der Milch angestellt. Bei diesen wurde die Milch im Wasserbade in Probierröhrchen eine bestimmte Zeitlang auf die in Frage kommende Temperatur erhitzt, worauf schnell abgekühlt wurde. Die so behandelte Milch wurde sodann auf die oben angegebene Weise untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche waren folgende:

Versuchs- Temperatur	Dauer der Erwärmung in Minuten	Entfärbungszeit	
		M.F.-Lösung	M.-Lösung
50°	Kontrollprobe	10 Minuten	5 1/2 Stunden
	15 Minuten	10 "	6 1/2 "
	30 "	10 "	6 1/2 "
65°	Kontrollprobe	17 Minuten	8 Stunden
	15 Minuten	17 "	>12 "
	30 "	25 "	>12 "
70°	Kontrollprobe	13 Minuten	8 1/2 Stunden
	5 Minuten	21 "	>24 "
	15 "	32 "	>24 "
75°	Kontrollprobe	13 Minuten	7 1/2 Stunden
	15 Minuten	nicht entfärbt	>12 "
80°	Kontrollprobe	13 Minuten	7 1/2 Stunden
	einen Augenblick	75 "	>12 "
80°	Kontrollprobe	14 Minuten	7 3/4 Stunden
	5 Minuten	nicht entfärbt	>12 "

Die Doppelproben stimmten sehr gut miteinander überein. Der größte beobachtete Zeitunterschied betrug einige Minuten bei der M.F.-Lösung und 1/2 Stunde bei der M.-Lösung. In letzterem Fall wurde die Mittelzahl beider Zeiten genommen. Die mit > 12 bezeichneten Zeiten bedeuten, daß die Proben nach 12 Stunden unverändert, aber nach 24 Stunden entfärbt waren.

Diese Versuche zeigen in Übereinstimmung mit denjenigen, die von den im vorhergehenden erwähnten Forschern ausgeführt wurden, daß die reduzierenden Bestandteile der Kuhmilch sich dem Erhitzen gegenüber wie Enzyme verhalten. Daß die Milch bei M.-Lösung immer, wenn auch erst nach langer Zeit, entfärbt wird, beruht natürlich darauf, daß nicht alle Bakterien durch das Erhitzen getötet werden, sondern sich allmählich wieder entwickeln. Um indessen festzustellen, daß die Entfärbung der M.F.-Lösung, wirklich auf einem besonderen Enzym und nicht auf Bakterienwirkung beruht, muß man die letztere auf irgend eine Weise beseitigen. Dies geschieht am einfachsten dadurch, daß man zu der Milch einen Stoff setzt, der die Enzyme möglichst unbeschädigt läßt, hingegen die Bakterienentwicklung hemmt. Solche Stoffe sind, wie bekannt, z. B. Chloroform, Toluol, Thymol, Benzol usw.

Es wurden daher neue Versuche in der Weise angestellt, daß Milch teils ohne, teils mit Zusatz von Chloroform und Toluol untersucht wurde, wobei man diese Stoffe verschieden lange Zeit hindurch einwirken ließ. Die Versuche lieferten folgende Ergebnisse:

Versuche mit Chloroform.

Erster Versuch: Morgenmilch von Hamra wurde auf zwei Kolben, zu 250 ccm in jeden, verteilt. Bei dem einen Kolben wurden 25 ccm (also 10 0/0) Chloroform zugesetzt. Die Kolben ließ man bis zum folgenden Tage im Kühlraum stehen,

worauf sie alsbald untersucht wurden. Hierbei wurden zuerst bakteriologische Untersuchungen an der mit Chloroform behandelten Milch vorgenommen, um die Sterilität derselben festzustellen. Man setzte 0,5 ccm der Milch zu 10 ccm Molkengelatine, goß hiervon Platten und ließ diese bei 20° stehen. — Säuregrad der Milch = 18° (Thörner).

Die Milch ohne Zusatz entfärbte M.F.-Lösung in 8 Minuten und M.-Lösung in 6 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Die Milch mit Chloroformzusatz entfärbte M.F.-Lösung in 27 Minuten, M.-Lösung dagegen wurde gar nicht entfärbt, wenigstens noch nicht in 24 Stunden. Hier ist also die Entfärbung der M.F.-Lösung zwar verlangsamt, jedoch nicht aufgehoben; dies scheint anzudeuten, daß das Enzym, die Aldehydreduktase, durch das Chloroform etwas geschwächt, jedoch nicht zerstört wurde. Auch die Peroxydase der Milch fand sich in der mit Chloroform behandelten Milch, wenn auch etwas geschwächt, noch vor, wovon ich mich durch Untersuchung mit Guajaktinktur und Wasserstoffsuperoxyd überzeugte. Es zeigte sich, daß die Platten noch nach 11 Tagen vollständig steril waren.

Dieser Versuch deutet also entschieden darauf hin, daß die Vermutung Smidt's richtig ist, daß nämlich die Reduktion der M.F.-Lösung von einem besonderen Enzym bewirkt wird, während die Reduktion der M.-Lösung auf bakterieller Wirkung beruht.

Ein zweiter Versuch wurde in derselben Weise, wie der vorhergehende angestellt. Jedoch wurden diesmal die Kolben zweimal 24 Stunden im Kühlraum stehen gelassen. — Säuregrad der Milch = 17°.

Nach 24 Stunden entfärbte die Kontrollprobe M.F.-Lösung in 5 Minuten und M.-Lösung in 9 Stunden.

Die Milch mit Chloroformzusatz entfärbte nach 24 Stunden M.F.-Lösung in 18 Minuten; M.-Lösung dagegen wurde überhaupt nicht entfärbt (Beobachtungszeit 24 Stunden).

Nach zweimal 24 Stunden entfärbt die Milch mit Chloroformzusatz M.F.-Lösung in 22 Minuten, M.-Lösung dagegen wurde nicht entfärbt. Die Guajakprobe lieferte an beiden Tagen ein positives Ergebnis. Die Gelatineplatten waren noch nach 10 Tagen steril.

Ein dritter Versuch wurde auf dieselbe Weise angestellt, die Milch wurde 24 Stunden im Kühlraum gehalten. — Säuregrad der Milch = 17°.

Die Milch ohne Zusatz entfärbte M.F.-Lösung in 12 Minuten und M.-Lösung in 10 Stunden.

Die Milch mit Zusatz entfärbte M.F.-Lösung in 19 Minuten; M.-Lösung dagegen wurde überhaupt nicht entfärbt (Beobachtungszeit 48 Stunden). Die Guajakreaktion war positiv. Bei diesem Versuche wurde auch qualitativ auf Katalase untersucht und zwar in der Weise, daß 10 ccm Milch mit 1 ccm 2%-iger Wasserstoffsuperoxyd-Lösung in Gärröhrchen bei 40° stehen gelassen und dann beobachtet wurde, ob Gasbildung infolge von Sauerstoffentwicklung durch die Katalase stattfand. Es trat in diesem Falle eine kräftige Gasentwicklung ein.

Versuche mit Toluol.

Ein Versuch mit Zusatz von 10% Toluol lieferte folgende Ergebnisse:

Zeit der Untersuchung	Milch ohne Toluolzusatz		Milch mit Toluolzusatz			
	M.F.-Lösung entfärbt in	M.-Lösung entfärbt in	M.F.-Lösung entfärbt in	M.-Lösung entfärbt in	Guajak-Probe	Auf Molken-gelatineplatten
Am Melktage	12 Minut.	11 Std.	18 Minut.	>24 Stunden	positiv	} Vereinzelte Kolonien } zahlreiche Kolonien
Nach 3 Tagen	—	—	26 "	nicht entfärbt	"	
" 5 "	—	—	22 "	desgl.	"	

Dieser Versuch lieferte also dasselbe Ergebnis wie die Behandlung der Milch mit Chloroform, aber die zugesetzte Toluolmenge war anscheinend zu gering, da die Milch ja nicht steril blieb. Jedoch hatte der Toluolzusatz in hohem Grade die Entwicklung der Bakterien gehemmt.

Daher wurde ein neuer Versuch mit einer größeren Menge Toluol, nämlich 20 0/0, angestellt. Die Milch mit Toluolzusatz entfärbte an demselben Tage M.F.-Lösung in 25 Minuten, M.-Lösung dagegen wurde überhaupt nicht entfärbt.

Guajakreaktion und Katalasereaktion waren positiv; Molkengelatineplatten blieben steril.

Die Versuche mit Chloroform und mit Toluol haben also dasselbe Ergebnis geliefert.

Wie schon erwähnt wurde, hebt Smidt¹⁾ hervor, daß die Aldehydreduktase an die Fettkügelchen gebunden sei. Nach seiner Behauptung liefert also der Rahm eine sehr starke Reaktion auf M.F.-Lösung, während die Magermilch, wofern man die Milch in einem scharf abrahmenden Separator entrahmt, gar keine Entfärbung der M.F.-Lösung zuwege bringt. Diese Verhältnisse wurden kontrolliert, indem dabei die Milch mittels eines Alfa-Separators A I entrahmt wurde. Der Fettgehalt der Magermilch betrug, nach Gottlieb-Röse bestimmt, 0,09 0/0. Die Abrahmungstemperatur war 35°.

Der Rahm reduzierte M.F.-Lösung in weniger als 1 Minute und M.-Lösung wurde in 7 Stunden entfärbt. Die Magermilch dagegen reduzierte M.F.-Lösung in 12 Minuten und M.-Lösung ebenfalls in 7 Stunden.

Dieses Ergebnis stimmt also nur insofern mit Smidt's Behauptung überein, als der Rahm unzweifelhaft ein außerordentlich viel größeres Reduktionsvermögen gegenüber einer M.F.-Lösung besitzt als die Magermilch. Schon unmittelbar nach dem Zusatz der M.F.-Lösung begann beim Rahm die Entfärbung. Die Magermilch hingegen verhielt sich hierbei genau so, wie nichtabgerahmte Milch. Bei Wiederholung des Versuches wurde dasselbe Ergebnis erhalten. Wenn also die Aldehydreduktase an die Fettkügelchen gebunden ist, so muß diejenige Menge derselben, die an die kleinen und wenig zahlreichen Fettkügelchen der Magermilch gebunden ist, hinreichend sein, um in gewöhnlicher Zeit die Reduktion der M.F.-Lösung hervorzurufen. Daß die Entfärbung der M.-Lösung ebenso langsam beim Rahm wie bei der Magermilch vor sich geht, beruht natürlich darauf, daß der Bakteriengehalt des Rahms und der

¹⁾ Hygienische Rundschau 1904, 14, 1137.

Magermilch ungefähr der gleiche ist, wie solches schon früher besondere Versuche verschiedener Forscher dargetan haben.

Die Frage, ob die Aldehydreduktase etwa in größerer Menge in den Zentrifugenschlamm übergeht, wurde ebenfalls durch einige Versuche untersucht. Andere Milchenzyme, wie die Peroxydase und die Katalase, gehen beim Zentrifugieren zum größten Teil in den Zentrifugenschlamm über, was darauf beruht, daß diese Enzyme in frischgemolkener Milch an die in der Milch vorhandenen weißen Blutkörperchen (Leukocyten) gebunden sind, wie ich bereits früher¹⁾ nachgewiesen habe und was später von Orla Jensen²⁾ bestätigt worden ist.

Der Schlamm wurde aus dem Separator unmittelbar nach dem Entrahmen entnommen. Nachdem die anhaftende Milch abgespült war, wurde der Schlamm zu einer homogenen Masse verrührt. Von dieser wurden ein paar Gramm in Proberröhrchen übertragen, welche 10 ccm destilliertes Wasser enthielten. Nach dem Umschütteln wurde eine graue Aufschlammung erhalten; diese entfärbte M.F.-Lösung in 8 Minuten und M.-Lösung in 6 Minuten. Die Guajakreaktion war positiv.

Der Versuch wurde auf dieselbe Weise wiederholt, jedoch mit steriler Milch statt des Wassers. M.F.-Lösung wurde in 6 Minuten und M.-Lösung in 4 Minuten entfärbt.

Zu derselben Aufschlammung wurden 10% Chloroform gesetzt. Nun wurde weder M.F.-Lösung noch M.-Lösung entfärbt, wenigstens nicht innerhalb der 24 Stunden, während deren die Röhrchen beobachtet wurden. Molkengelatineplatten, mit 0,5 ccm der Aufschlammung bereitet, blieben steril. Nach 24 Stunden langem Aufbewahren war das Verhältnis hinsichtlich der Entfärbung dasselbe.

Dieser Versuch zeigt also deutlich, daß die Aldehydreduktase sich nicht in nennenswerter Menge im Separatorschlamm vorfindet, daß sie also nicht an die weißen Blutkörperchen oder an andere in der Milch vorhandene Zellelemente gebunden sein kann. Das beträchtliche Vermögen des Schlammes, sowohl M.F.-Lösung als M.-Lösung zu reduzieren, muß ausschließlich seinem großen Gehalt an Mikroorganismen zugeschrieben werden.

Koning³⁾ glaubt gefunden zu haben, daß die Entfärbung einer M.F.-Lösung durch Einleiten von Kohlensäure in die Milch beschleunigt wird. Ich selbst habe eine solche Einwirkung nicht nachweisen können; sowohl die natürliche wie die mit Kohlensäure behandelte Milch entfärbten M.F.-Lösung in 10 Minuten und M.-Lösung in 10 Stunden. Es zeigte sich also durchaus kein Unterschied. Das Hindurchleiten von Luft hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Reduktionsgeschwindigkeit.

Mechanische Bearbeitung der Milch scheint gleichfalls keinen Einfluß auf das Reduktionsvermögen der Milch zu haben, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht:

50 Liter Morgenmilch wurden auf 50° erwärmt. Nachdem Proben entnommen waren, wurde die Milch 15 Minuten lang einer Bearbeitung in einem holstein'schen Butterfaß unterworfen, worauf wiederum Proben entnommen wurden.

Die Kontrollmilch entfärbte M.F.-Lösung in 8 Minuten und M.-Lösung in

¹⁾ Milch-Ztg. 1899, 28, No. 31; auch Nordisk Mejeri-Tidning 1899, No. 16 und Revue Générale du Lait 1903/4, 1, 193.

²⁾ Orla Jensen, Oversigt over det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger 1906, No. 5.

³⁾ Milchwirtschaftliches Zentralblatt 1907, 3, 41.

7 Stunden; die bearbeitete Milch entfärbte M.F.-Lösung in 8 Minuten und M.-Lösung in $6\frac{1}{2}$ Stunden.

Ein besonders hervortretender Unterschied war also nicht vorhanden.

Zusatz von Säuren übt eine hemmende Einwirkung auf die Reduktion der M.F.-Lösung, aber nicht der M.-Lösung aus, solange es sich um so kleine Säuremengen handelt, daß die Milch nur 21–24 Säuregrade aufweist.

Folgende Versuche weisen dieses Verhältnis nach:

Zu zwei Portionen Morgenmilch von je 50 ccm wurden 2,5 bzw. 5,0 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Milchsäure gesetzt, infolgedessen zeigte

die Kontrollmilch	18 Säuregrade
dieselbe + 2,5 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Milchsäure	21 „
„ + 5,0 „	24 „

Diese Säuregrade entsprechen einem beginnenden Sauerwerden der Milch, liegen jedoch unterhalb des Säuregrades, bei dem die Milch beim Erhitzen bis zum Siedepunkt koaguliert. Es entfärbte:

	M.F.-Lösung	M.-Lösung
die Kontrollmilch	in 11 Minuten	in 7 Stunden
dieselbe + 2,5 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Milchsäure . „	14 „	7 „
„ + 5,0 „ „ . „	18 „	7 „

Ein zweiter Versuch wurde genau auf dieselbe Weise angestellt, jedoch mit $\frac{1}{10}$ N.-Schwefelsäure statt der Milchsäure. Die Säuregrade waren vollkommen dieselben wie bei dem vorhergehenden Versuch. Es entfärbte:

	M.F.-Lösung	M.-Lösung
die Kontrollmilch	in 13 Minuten	in 10 Stunden
dieselbe + 2,5 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Schwefelsäure „	16 „	10 „
„ + 5,0 „ „ . „	24 „	10 „

Ein weiterer Versuch mit Schwefelsäure lieferte folgende Ergebnisse: Es entfärbte

	M.F.-Lösung	M.-Lösung
die Kontrollmilch	in 18 Minuten	in 10 Stunden
dieselbe + 2,5 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Schwefelsäure „	22 „	10 $\frac{1}{2}$ „
„ + 5,0 „ „ . „	27 „	10 $\frac{1}{2}$ „

Bei Milch, die von selbst sauer geworden ist, gestaltet sich das Verhältnis ganz anders. Hier wird sowohl M.F.-Lösung als auch M.-Lösung in sehr kurzer Zeit entfärbt, obwohl der Säuregrad der Milch zuweilen sehr hoch ist. Dies geht aus nachstehenden Versuchen hervor:

Säuregrade der Milch	Entfärbungszeit	
	M.F.-Lösung	M.-Lösung
24	6 Minuten	8 Minuten
26	4 „	4 „
37	3 „	3 „
41	3 „	3 „
43	5 „	2 „

Die Ursache dieser schnellen Reduktion sowohl der M.F.-Lösung als der M.-Lösung ist natürlich in dem überaus großen Bakteriengehalt solcher sauren Milch zu suchen.

Orla Jensen¹⁾ hat gezeigt, daß verschiedene Mikroorganismen ein sehr verschiedenes Reduktionsvermögen gegen Methylenblau besitzen, und hat in einer Tabelle die Ergebnisse seiner Untersuchungen hierüber zusammengestellt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die echten Milchsäurebakterien (welche zur Gruppe des *Bacterium lactis acidii* gehören), sowie Coli- und Aerogenes-Arten sehr langsam reduzieren, während die in der Milch konstant vorkommenden indifferenten Mikrokokken und auch die Buttersäurebakterien Methylenblau sehr schnell entfärben. Ich habe ebenfalls solche Versuche mit Milchkulturen von verschiedenen Bakterienarten, die normal in der Milch vorkommen, angestellt und bin der Hauptsache nach zu den gleichen Ergebnissen gelangt, wie Orla Jensen. Jedoch habe ich bei den echten Milchsäurebakterien bedeutend längere Reduktionszeiten gefunden; ja, eine vollständige Entfärbung wurde fast niemals erhalten. *Bacterium lactis aerogenes* entfärbte sowohl M.F.-Lösung als M.-Lösung in 6 Minuten. *Bacterium coli commune* entfärbte M.F.-Lösung in sehr langer Zeit und M.-Lösung in 40 Minuten. Die von mir in frisch-gemolkener Milch gefundenen weißen und gelben indifferenten Mikrokokken²⁾ haben ein sehr starkes Reduktionsvermögen gegenüber Methylenblau. So entfärbte *Micrococcus candicans* sowohl M.F.-Lösung als M.-Lösung in 5 Minuten. *Micrococcus B* (Barthel) entfärbte beide Lösungen in 2 Minuten und *Micrococcus D* (Barthel) in 4 Minuten. *Bacillus subtilis* bedurfte 13 Minuten, um M.F.-Lösung und 12 Minuten, um M.-Lösung zu entfärben.

Es erscheint vielleicht auffallend, daß hier von dem Vermögen der Bakterien, eine M.F.-Lösung zu entfärben die Rede ist, da ja oben darauf hingewiesen wurde, daß die Reduktion der M.F.-Lösung auf einem besonderen Enzym, nämlich der Aldehydreduktase, beruht; dies schließt indessen keineswegs aus, daß außer der Aldehydreduktase auch die Bakterien auf die M.F.-Lösung einwirken können. Der Formalingehalt der M.F.-Lösung ist tatsächlich so unbedeutend, daß er nicht, oder doch in den meisten Fällen wenigstens nicht, auf die Entwicklung der Bakterien hemmend einzuwirken vermag³⁾.

2. Versuche über die praktische Verwendbarkeit der Reduktaseprobe.

Nachdem sich nun aus den im vorhergehenden besprochenen Versuchen ergeben hat, daß die Natur der Milchreduktasen in einer Weise aufzufassen ist, die mit der Darlegung von Smidt übereinstimmt, gehe ich nunmehr zum Bericht über die Versuche über, die von mir über die praktische Verwendbarkeit der Reduktaseprobe zur Beurteilung der Milch in bakteriologischer Hinsicht angestellt worden sind.

Zuerst wurde eine Reihe von Versuchen vorgenommen, bei denen Morgenmilch eines und desselben Tages im Kühlraum bei einer Temperatur von 8—10° hingestellt wurde. Jeden Tag wurde der Säuregehalt der Milch und ihr Bakteriengehalt, sowie

¹⁾ Orla Jensen, Oversigt over det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger 1906, No. 5.

²⁾ Milch-Ztg. 1903, 32, 626 und Revue Générale du Lait 1904, 1, 505.

³⁾ Will man daher eine M.F.-Lösung benutzen, um zu untersuchen, ob die Milch erhitzt worden ist oder nicht, so darf man, wie auch Brand (Münchener mediz. Wochenschr. 1907, No. 17) bemerkt, nicht die bakterielle, bei niedriger Temperatur vor sich gehende Reduktion anwenden, sondern muß sich der enzymatischen Reduktion bei 68—70° bedienen.

ihr Reduktionsvermögen festgestellt. Auch der Geruch und der Geschmack der Milch wurde untersucht. Zur Bestimmung der Zahl der Bakterienkolonien wurde Molken-gelatine angewendet.

Die Versuchsergebnisse waren folgende:

Morgen- milch	Aufbewah- rungszeit in Tagen	Säuregrade (Thörner)	Bakterien- Kolonien in ccm Milch	Entfärbungszeit	
				M.F.-Lösung	M.-Lösung
I	—	18	220 000	9 Minuten	9 Stunden
	1	19	650 000	11 "	7½ "
	2	19	10 000 000	6 "	5½ "
	3	19	54 400 000	6 "	20 Minuten
II	—	18	56 000	12 Minuten	10¾ Stunden
	1	18	760 000	8 "	9¾ "
	2	18	5 200 000	8 "	8½ "
	3	18	15 120 000	6 "	1½ "
	4	20	49 000 000	5 "	19 Minuten
III	—	18	90 000	13 Minuten	12 Stunden
	1	18	110 000	12 "	12 "
	2	18	848 000	15 "	11 "
	3	18	21 920 000	12 "	8¾ "
	4	18	36 000 000	6 "	29 Minuten
IV	—	18	205 000	12 Minuten	8¾ Stunden
	1	18	520 000	11 "	7 "
	2	18	3 120 000	9 "	7 "
	3	18	48 500 000	8 "	40 Minuten
V	—	17	10 000	14 Minuten	11 Stunden
	1	18	165 000	10 "	8½ "
	2	18	1 500 000	8 "	7 "
	3	18	15 800 000	6 "	65 Minuten
	4	18	47 500 000	4 "	12 "

Aus diesen Versuchen gehen mehrere, sehr interessante Tatsachen hervor. Zunächst sehen wir, daß die Milch bei der angewendeten niedrigen Temperatur sich bis zu fünf Tagen halten kann, ohne daß sich der Säuregrad in nennenswerter Weise erhöht. Der Bakteriengehalt steigt jedoch, wie man sieht, sehr beträchtlich, trotz der niedrigen Temperatur. Die Milchsäurebakterien entwickeln sich allerdings nicht; dagegen wächst eine ganze Zahl anderer Arten, die gegen niedrige Temperatur weniger empfindlich sind, kräftig. Daß der Bakteriengehalt der Milchproben so verschieden war, und zwar schon am ersten Tage, hat einfach darin seinen Grund, daß die Milchproben von verschiedenen Lieferanten stammten. Am letzten Tage bei jedem Versuche war die Milch in allen Fällen immer noch völlig frisch, sowohl nach Geschmack als nach Geruch. Ein paar Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, säuerte sie jedoch sozusagen auf einmal. Man sieht also, daß eine Reduktionszeit von ungefähr einer Stunde und darunter gerade dem Zeitpunkt entspricht, bei dem die Milch sich ganz nahe am Schluß der Inkubationsperiode (Soxhlet) befindet. Dieses ist aber

völlig dasselbe Ergebnis, zu dem P. Th. Müller¹⁾ gelangt ist. Ebenso geht aus diesen Versuchen hervor, daß dieses Stadium der Veränderung der Milch einem Bakteriengehalt von rund 40—50 Millionen Bakterien im ccm entspricht.

In Abweichung von den Angaben sämtlicher Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, habe ich niemals finden können, daß alte Milch eine M.F.-Lösung langsamer reduziert, als eine M.-Lösung. Die Ursache dieser angeblichen Erscheinung soll der hemmende Einfluß des Formalins auf die Bakterienentwicklung sein. Aus meinen Versuchen geht aber mit aller nur wünschenswerten Deutlichkeit hervor, daß die Entfärbung der M.F.-Lösung und die der M.-Lösung im ganzen betrachtet, parallel gehen. Das wichtigste Ergebnis dieser Versuche ist jedoch das, daß die Prüfung des Reduktionsvermögens der Milch uns in den Stand setzt, zu sehen, ob eine Milch frisch oder alt ist, selbst in den Fällen, in denen die Bestimmung des Säuregrades mittels Titration, wie auch der Geruch und der Geschmack noch gar keine Entscheidung gestatten.

Es erübrigte also nunmehr, in der Praxis, d. h. bei Milch, von deren Alter und hygienischer Beschaffenheit im allgemeinen man noch gar keine Kenntnis hat, die Verwendbarkeit der Reduktionsprobe zu prüfen.

Hierbei wurde in der Weise verfahren, daß Milchproben in verschiedenen Milchgeschäften und Milchhandlungen in Stockholm angekauft wurden. Ich versuchte durch eine solche Maßnahme Milch von möglichst verschiedenem Alter und verschiedener Beschaffenheit zu erlangen. Die Proben wurden gegen 8 Uhr morgens eingekauft und gegen $\frac{1}{2}$ 11 Uhr in Behandlung genommen. Zuerst wurden Proben zur Bakterienzählung entnommen. Darauf wurde der Geschmack und der Geruch der Milch untersucht und zugleich der Säuregrad bestimmt. Schließlich wurde das Reduktionsvermögen gegenüber M.F.-Lösung und M.-Lösung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren folgende:

Probe No. 1 (25. V. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7 $\frac{1}{2}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 $\frac{1}{2}$ Uhr nachmittags; enthielt augenscheinlich Schmutz.

Nicht völlig frischer Geruch; schwach saurerer Geschmack. — Säuregrade = 22.

M.F.-Lösung wird in 3 Minuten und M.-Lösung in 5 Minuten entfärbt.

Bakteriengehalt: 125 000 000 pro ccm.

Diese Milch hätte ja schon wegen ihrer Unreinheit, ihres relativ hohen Säuregrades und ihrer organoleptischen Eigenschaften als ungeeignet zum Verbrauch erklärt werden können, aber es ist doch interessant, zu sehen, wie die Reduktaseprobe auf unverkennbare Weise die schlechte Qualität dieser Milch bestätigt. Der Bakteriengehalt ist ja auch über die Massen groß.

Probe No. 2 (25. V. 07). Eingekauft in einer Milchniederlage um 7 $\frac{3}{4}$ Uhr vormittags. Die Milch war am vorhergehenden Tage in die Stadt gebracht worden und war dazu bestimmt, an Wiederverkäufer verabfolgt zu werden, aber der Geschmack war so anormal, daß die Milch nicht verkauft werden konnte, sondern auf Veranlassung der Gesundheitspolizei an den Produzenten zurückgesandt wurde.

Stark unreiner, nicht definierbarer Geruch; widriger Geschmack, sodaß die Milch unmöglich genossen werden konnte. — Säuregrade = 17.

M.F.-Lösung wird in 4 Minuten, aber M.-Lösung erst in 10 Stunden entfärbt.

Bakteriengehalt: 1 728 000 pro ccm.

Hier ist allerdings aus dem Säuregrade, welcher vollkommen normal ist, wie auch aus der langen Reduktionszeit bei der M.-Lösung zu folgern, daß die Milch in hygienischer Hinsicht als fehlerfrei zu betrachten sei. Der Bakteriengehalt ist auch nicht als besonders hoch

¹⁾ Archiv f. Hygiene 1906, 56, 108.

anzusehen, da es sich um gewöhnliche Handelsmilch handelt. Der Fehler mußte also bei dieser Milch durchaus spezifischer Natur sein; bei näheren Nachforschungen ergab sich denn auch, daß hier ein Fütterungsfehler vorlag. In das Futter waren nämlich große Mengen Ackerklasper (*Thlaspi arvense*) geraten, und der schlechte Geschmack rührte unzweifelhaft hiervon her.

Probe No. 3 (25. V. 07). Eingekauft um 8 $\frac{1}{2}$ Uhr vormittags in einer Milchhandlung. Die Milch war an demselben Morgen gegen 7 Uhr eingeliefert worden und wurde unter der Bezeichnung „tuberkelfreie Milch“ verkauft.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 17.

M.F.-Lösung wird in 11 Minuten und M.-Lösung in 9 Stunden entfärbt.

Bakteriengehalt: 800 000 pro ccm.

Diese Milch ist also als sehr gut zu betrachten. Sowohl Geruch und Geschmack als auch Säuregrad beweisen dies. Die Reduktaseprobe bestätigt somit vollkommen das Ergebnis der übrigen Prüfungen.

Probe No. 4 (29. V. 07). Bei dieser und den folgenden Prüfungen wurde die Milch auch durch die Guajakprobe untersucht, um festzustellen, ob die Milch pasteurisiert war oder nicht. In der Mehrzahl der Fälle weiß man nämlich nicht, ob die Milch, die man in Stockholm kauft, erhitzt worden ist oder nicht. Der Grund, weshalb nicht die Storch'sche Reaktion zu diesem Zweck angewendet wurde, war der, daß die Guajakreaktion langsamer vor sich geht als die Reaktion mit Paraphenylendiamin. Man kann also bei der Guajakprobe ungefähr einen Begriff von der Temperatur bekommen, bis zu der die Milch erhitzt worden ist, je nach der größeren oder geringeren Geschwindigkeit, mit der die Blaufärbung hervortritt. Die Storch'sche Reaktion ist so empfindlich, daß, sofern die Milch nicht bis auf mindestens 80° erhitzt worden ist, sie augenblicklich stark indigoblau gefärbt wird.

Eingekauft in einer Milchhandlung um 7 Uhr vormittags. Die Milch war am vorhergehenden Tage eingeliefert worden, war aber zwei Tage vor dem Einkauf in der Stadt angekommen.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 18.

M.F.-Lösung wird in 4 Minuten und M.-Lösung in 2 $\frac{3}{4}$ Stunden entfärbt. (Beginnende Entfärbung innerhalb 1 Stunde.)

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 25 600 000 pro ccm.

Diese Milch schien also nach der gewöhnlichen Untersuchung gut zu sein, aber die Reduktaseprobe, ebenso wie die Bakterienzählung, zeigt, daß sie als recht schlecht anzusehen war.

Probe No. 5 (29. V. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7 $\frac{1}{2}$ Uhr vormittags. Eingeliefert am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Sehr schwach unreiner Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 18.

M.F.-Lösung wird in 6 Minuten und M.-Lösung in 10 Stunden entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 8 800 000 pro ccm.

Probe No. 6 (29. V. 07). Eingekauft um 8 $\frac{1}{4}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags. Die Milch war nach Angabe pasteurisiert.

Normaler Geschmack und Geruch. — Säuregrade = 16.

M.F.-Lösung wird in 7 Minuten und M.-Lösung in 7 Stunden entfärbt. (Beginnende Entfärbung innerhalb 2 Stunden.)

Guajakprobe: Beginnt nach 8 Minuten blau zu werden; Storch'sche Reaktion: Wird sofort blau.

Bakteriengehalt: 15 200 000 pro ccm.

Probe No. 7 (17. VII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7 $\frac{1}{2}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Säuerlicher Geruch; sehr schwach säuerlicher Geschmack. — Säuregrade = 21.

M.F.-Lösung wird in 6 Minuten und M.-Lösung in $5\frac{1}{2}$ Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 86 640 000 pro ccm.

Probe No. 8 (17. VII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um $8\frac{1}{4}$ Uhr vormittags; eingeliefert an demselben Tage.

Unreiner Geruch; normaler Geschmack. — Säuregrade = 14.

M.F.-Lösung wird in 15 Minuten und M.-Lösung in 5 Stunden entfärbt.

Guajakprobe: Beginnt nach 2 Minuten blau zu werden.

Bakteriengehalt: 6 640 000 pro ccm.

Diese Milch scheint bei ziemlich niedriger Temperatur pasteurisiert worden zu sein. Darauf deutet sowohl die ziemlich lange Entfärbungszeit bei M.F.-Lösung, als auch der niedrige Säuregrad und die relativ langsame Guajakreaktion.

Probe No. 9 (17. VII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um $8\frac{3}{4}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags. Die Milch war in hohem Grade verunreinigt.

Unreiner Geruch; schlechter, nicht säuerlicher Geschmack. — Säuregrade = 19.

M.F.-Lösung wird in 4 Minuten und M.-Lösung in 6 Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 106 000 000 pro ccm.

Diese Milch war also von sehr schlechter Beschaffenheit.

Probe No. 10 (31. VII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 8 Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Saurer Geruch; saurerer Geschmack. — Säuregrade = 22.

M.F.-Lösung wird in 12 Minuten und M.-Lösung in 12 Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 120 000 000 pro ccm.

Probe No. 11 (31. VII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um $7\frac{1}{2}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 13.

M.F.-Lösung wird in 23 Minuten und M.-Lösung in 9 Stunden entfärbt.

Guajakprobe: negativ.

Bakteriengehalt: 8 240 000 pro ccm.

Diese Milch war, wie sich deutlich gezeigt hat, bei mindestens 80° pasteurisiert worden.

Probe No. 12 (7. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 8 Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 17.

M.F.-Lösung wird in 6 Minuten und M.-Lösung in $2\frac{3}{4}$ Stunden entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 15 000 000 pro ccm.

Probe No. 13 (7. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um $8\frac{1}{4}$ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Kein Geruch; schwach unreiner Geschmack. — Säuregrade = 20.

M.F.-Lösung wird in 3 Minuten und M.-Lösung in 5 Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 160 320 000 pro ccm.

Probe No 14 (7. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung; eingeliefert am vorhergehenden Tage um $6\frac{1}{2}$ Uhr nachmittags.

Normaler Geruch; Kochgeschmack. — Säuregrade = 13.

M.F.-Lösung wird in 24 Stunden nicht entfärbt; M.-Lösung wird in 7 Stunden entfärbt.

Guajakprobe: negativ. — Storch'sche Reaktion: negativ.

Bakteriengehalt: 7224 000 pro ccm.

Diese Milch war also bei über 80° pasteurisiert worden.

Probe No. 15 (13. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7¹/₄ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4¹/₄ Uhr nachmittags.

Normaler Geruch und Geschmack. Stark verunreinigt. — Säuregrade = 16.

M.F.-Lösung wird in 4 Minuten und M.-Lösung in 12 Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 109 000 000 pro ccm.

Probe No. 16 (13. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7¹/₂ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 4 Uhr nachmittags.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 16.

M.F.-Lösung wird in 8 Minuten und M.-Lösung in 7¹/₂ Stunden entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 10 400 000 pro ccm.

Probe No. 17 (13. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung um 7¹/₂ Uhr vormittags; eingeliefert am vorhergehenden Tage um 6¹/₄ Uhr nachmittags.

Normaler Geruch; schwacher Kochgeschmack. — Säuregrade = 14.

M.F.-Lösung wird in 45 Minuten und M.-Lösung in 8¹/₂ Stunden entfärbt.

Guajakprobe: negativ.

Bakteriengehalt: 4500 000 pro ccm.

Auch diese Milch ist deutlich bei mindestens 80° pasteurisiert worden.

Probe No. 18 (27. VIII. 07). Entnommen auf der „Nordstation“ um 8 Uhr vormittags; Morgenmilch desselben Tages.

Säuregrade = 17.

M.F.-Lösung wird in 10 Minuten entfärbt; M.-Lösung wird in 10 Stunden noch nicht entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 288 000 pro ccm.

Probe No. 19 (27. VIII. 07). Entnommen auf der „Nord-Station“ um 8 Uhr vormittags; Morgenmilch desselben Tages.

Säuregrade = 17.

M.F.-Lösung wird in 8 Minuten entfärbt; M.-Lösung wird in 10 Stunden noch nicht entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 1 120 000 pro ccm.

Probe No. 20 (30. VIII. 07). Eingekauft in einer Milchhandlung.

Normaler Geruch und Geschmack. — Säuregrade = 19.

M.F.-Lösung wird in 5 Minuten und M.-Lösung in 15 Minuten entfärbt.

Guajakprobe: positiv.

Bakteriengehalt: 115 000 000 pro ccm.

Es geht aus diesen 20 Untersuchungen unzweideutig hervor, daß die Reduktaseprobe von sehr großem Wert sein kann, wenn es gilt, eine Milch in hygienisch-bakteriologischer Hinsicht zu beurteilen. Alle die Milchproben, welche M.-Lösung in kürzerer Zeit als in 1 Stunde entfärbten, welche aber im übrigen keine Anzeichen der Verschlechterung zeigten, säuerten schon nach einigen Stunden, wenn sie bei Zimmertemperatur hingestellt wurden. Sie standen also an der Grenze, bei der sie in Verderbnis übergehen mußten.

Die Reduktion der M.F.-Lösung kann offenbar nicht als Anhalt für die Beurteilung der Qualität der Milch dienen. Jedoch geht auch aus diesen Untersuchungen hervor, daß bei alter Milch die Reduktion der M.F.-Lösung in der Regel schneller eintritt als diejenige der M.-Lösung, in Übereinstimmung mit dem, was ich schon oben hervorgehoben habe.

Bei pasteurisierter Milch geht die Reduktion der M.F.-Lösung mehr oder weniger langsam vor sich, was von der Pasteurisierungstemperatur abhängt; man kann daher auf diese Weise wertvolle Anhaltspunkte erhalten, wenn es sich um die Beurteilung von Handelsmilch handelt. Die diesbezüglichen Verhältnisse sind übrigens schon Gegenstand einer Untersuchung von Buttenberg¹⁾ gewesen.

Ohne Zweifel dürfte eine Milch, die so große Mengen von Bakterien enthält, daß diese 100 000 000 und darüber pro ccm ausmachen, nicht zum direkten Konsum verkauft werden. Am allerwenigsten dürfte sie als Nahrungsmittel für Säuglinge in Frage kommen. Nun geht jedoch mit völlig überzeugender Deutlichkeit aus den oben beschriebenen Versuchen hervor, daß derartige Milch, welche an der Grenze des Verderbens steht, tagtäglich in den Milchhandlungen Stockholms verkauft wird; natürlich muß sich gerade der ärmere Teil der Bevölkerung mit einer solchen Ware begnügen, da diese Leute nicht in der Lage sind, die teurere kontrollierte Milch zu kaufen. Allerdings muß zugegeben werden, daß es mit großen Schwierigkeiten verknüpft ist, eine solche stark bakterienhaltige Milch zu erkennen. Diese Schwierigkeiten mußten so lange bestehen, als man nur die Geruchs- und Geschmacksprobe, sowie unter Umständen die Bestimmung des Säuregrades zur Verfügung hatte. Bakterienzählungen kann man ja nicht bei allen den Hunderten von Milchproben, die untersucht werden müssen, vornehmen; dies würde ungeheure Anforderungen in bezug auf Zeit und Kosten mit sich führen. Hier wird, wie es scheint, die Reduktaseprobe von wirklichem und großem Nutzen sein können.

Die Ausführung der Probe ist ja die denkbar einfachste; sie geschieht in folgender Weise:

10 ccm der zu untersuchenden Milch werden mit 0,5 ccm der im vorhergehenden besprochenen formalinfreien Methylenblau-Lösung versetzt, mit einigen ccm Paraffinum liquidum überschichtet und in ein Wasserbad von 40—45° gestellt. Die Zeit, in der die Entfärbung vor sich geht, wird notiert. Tritt die Entfärbung schon in einigen Minuten ein, so enthält die Milch sicherlich hundert Millionen oder noch mehr Bakterien pro ccm. Auch in den Fällen, in denen die Entfärbung innerhalb 1 Stunde bewirkt wird, muß die Milch als eine solche betrachtet werden, die allzu stark bakteriell verunreinigt ist, als daß sie als Nahrungsmittel, insbesondere für Säuglinge, dienen könnte. Milch, die innerhalb 3 Stunden entfärbt wird, muß als Milch von geringerer Qualität angesehen werden, während Milch, die mehr als 3 Stunden zur Entfärbung der M.-Lösung erfordert, als gute Handelsmilch betrachtet werden kann. Die Probe braucht also nicht längere Zeit als 3 Stunden in Anspruch zu nehmen.

Es müssen immer zwei Proben derselben Milch untersucht werden.

Vor der Gärprobe, welche ja im übrigen eine einfache und gute Auskunft gebende Probe bei Milch in bakteriologischer Hinsicht ist, hat die Reduktaseprobe den Vorzug, daß sie sich in bedeutend kürzerer Zeit ausführen läßt.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1906, 11, 377.

Nachtrag.

Nach dem Abschluß des Manuskriptes sind noch zwei Abhandlungen erschienen, die sich auf die Reduktasen der Milch beziehen und die ich in vorstehender Arbeit nicht mehr habe berücksichtigen können. Die eine dieser Arbeiten, von A. Hesse¹⁾, beschäftigt sich hauptsächlich mit der Frage, ob man mittels der Schardinger'schen Probe beurteilen kann, ob und inwieweit ein Zusatz von gekochter zu roher Milch stattgefunden hat; sie enthält im übrigen nichts Neues.

Aus der zweiten Abhandlung, die von E. Seligmann²⁾ verfasst ist, mag hier nur kurz hervorgehoben werden, daß ihr Verfasser auch hier noch ganz und gar dieselbe Stellung in der Reduktasefrage einnimmt, wie in seinen früheren, schon erwähnten Arbeiten.

Schließlich möchte ich noch mitteilen, daß auf meine Veranlassung die Reduktaseprobe jetzt Verwendung findet als grundlegende Probe in den Vereinen zur Beurteilung der allgemeinen Güte der Milch, die gerade augenblicklich sich hier in Schweden zu bilden beginnen. In Dänemark bestehen solche Vereine bereits; aber dort begnügt man sich damit, den Geruch und Geschmack für die Beurteilung und Klassifizierung der Milch zugrunde zu legen.

¹⁾ Milchwirtschaftl. Zentralblatt 1908, 4, 49.

²⁾ Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1907, 58, 1.

Welchen Wert hat die Bestimmung des Aschengehaltes und die Ausführung der Ley'schen Reaktion bei der Honiguntersuchung?

Von

F. Schwarz.

Mitteilung aus dem Chemischen Untersuchungsamte der Stadt Hannover.

Wer sich öfters mit Honiguntersuchungen beschäftigt, weiß, daß die Beurteilung des Honigs zu den undankbarsten Aufgaben der Nahrungsmittelkontrolle gehört.

Verfälschungen mit Stärkesirup und Rohrzucker, welche früher häufiger vorkamen und die innerhalb gewisser Grenzen leicht nachzuweisen waren, findet man heute fast nicht mehr. An ihre Stelle sind seit einigen Jahren fast ausschließlich die Mischungen mit Invertzuckersirup getreten, denen die Chemie fast machtlos gegenüber steht. Die polarimetrischen Prüfungen, welche eine Verfälschung mit Stärkesirup oder mit Rohrzucker bald erkennen lassen, versagen hier vollkommen; auch eine Bestimmung von Glykose und Fruktose führt nicht zum Ziele, weil der Invertzuckersirup des Handels heute in den meisten Fällen von dem Invertzucker des Naturhonigs, dem der Menge nach wesentlichsten Bestandteil des Honigs, chemisch nicht mehr unterschieden werden kann.

Ein etwaiger Nachweis muß sich demnach auf die Nebenbestandteile des Honigs stützen. Durch Beimischung von Invertzuckersirup zu Naturhonig wird das Aroma