[Aus dem hygienischen Institut der Universität Bonn.]
(Damaliger Direktor: Prof. Dr. Kruse.)

Beiträge zur Methodik der Untersuchung der Bakterienflora des Säuglingsstuhles und zur Kenntnis seiner wichtigsten Bakterientypen.

Von

Dr. med. J. Basten.

(Hierzu Taf. I.)

Solange man zur Untersuchung des Säuglingsstuhles nur die gebräuchlichen aeroben bakteriologischen Züchtungsmethoden anwandte, erhielt man von seiner Flora ein falsches Bild. Erst nachdem Tissier, Moro und Finkelstein das anaerobe Verfahren und die Vorkultur in sauren Nährböden bei der Untersuchung eingeführt hatten, gelang es, die einzelnen Arten der das Bild des Säuglingsstuhles beherrschenden grampositiven Bakterien zu isolieren. Bei den genannten und den späteren Untersuchern¹ finden sich allerdings über die kulturellen Eigenschaften der grampositiven Bakterien und vor allem über ihr Mengenverhältnis zueinander sehr verschiedene Angaben. Wahrscheinlich sind diese zum großen Teil auf die ungleichen Methoden, mit denen gearbeitet wurde, zurückzuführen. Es erschien daher von Nutzen, erstens eine möglichst einfache zuverlässige Methode auszuarbeiten, nach der es möglich ist, sofort alle Arten der Bakterienflora eines Säuglingsstuhles in Reinkultur zu züchten und ihr Mengenverhältnis zueinander festzustellen, und zweitens mit dieser Methode zunächst einmal eine Reihe normaler Säuglingsstühle zu prüfen.

¹ Lit. bei Schmidt u. Strasburger, *Die Fäzes des Menschen*. 1910. 3. Aufl. S. 308 ff.

Die folgenden Untersuchungen wurden im Bonner hygienischen Institut auf Anregung und unter Leitung von Prof. Kruse ausgeführt, das Material wurde der Frauenklinik entnommen. Es wurden im ganzen 40 im wesentlichen normale Stühle von Brust- und Flaschenkindern im Alter von 3 Tagen bis 4 Monaten untersucht. In den meisten Fällen wurde der Stuhl mit dem von Strasburger angegebenen Glasröhrchen entnommen. In einer großen Anzahl stammte die Probe unmittelbar aus den vor der Benutzung im Dampf sterilisierten Windeln. Ein Unterschied in der Zusammensetzung der nach beiden Methoden entnommenen Stühle ließ sich nicht feststellen, weder zeigten sich bei der letzteren Methode wesentliche Verunreinigungen, noch wurde bei der ersteren ein Fehlen bestimmter Arten festgestellt.

Wir gelangten allmählich zu folgender Versuchsordnung: 5 Ösen Stuhl werden in 1^{cem} Bouillon zu einer Emulsion verrieben. Von der Emulsion wird zunächst ein Ausstrich gemacht, der nach Gram gefärbt und mit dünnem Fuchsin nachgefärbt wird. Mit einer Öse der Emulsion wird eine Traubenzuckeragarplatte (2 Prozent Tr.) beschickt. Sodann werden von je 0.1^{cem} der Emulsion 3 parallele Verdünnungsreihen von 10 Verdünnungen (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 usw.) in Röhrchen mit je 1^{cem} Bouillon angelegt. Die erste Reihe dient zur Züchtung der Anaerobier. Jede Verdünnung wird in je einem Röhrchen mit 20^{cem} flüssigem auf 40° erkaltetem Traubenzuckeragar verteilt. Die 2. Reihe dient zur Züchtung der Sporenbildner. Sie wird 20 Minuten lang bei 70° erhitzt und sodann wie oben mit Traubenzuckeragar beschickt. Die 3. Reihe wird, um einen elektiven Nährboden für den *Bac. acidophilus* zu erhalten, mit je 10^{cem} 1/2- bis 1 prozentiger essigsaurer Traubenzuckerbouillon beschickt.

Wir hatten in den ersten Versuchen die Verdünnungen in dem noch flüssigen, erkaltenden Agar selbst angelegt, gingen jedoch später zu den Bouillonverdünnungen über, da sie ein zuverlässigeres Bild von dem Mengenverhältnis der einzelnen Arten geben. Zur Züchtung der Anaerobier, insbesondere des *Bac. bifidus*, bewährte sich ausschließlich das Verfahren der hohen Traubenzuckeragarschicht. Auf der Platte fand stets sowohl bei Sauerstoffabsorption durch Pyrogallussäure wie bei der Verdrängung des Sauerstoffs durch Wasserstoff mittels des Kippschen Apparates eine Überwucherung durch die fakultativen Anaerobier: *Bac. coli*, *aerogenes* (Escherich) und *Streptococcus lacticus* (Kruse) statt. Besondere Schwierigkeiten bereitete es, den *Bac. acidophilus* in Reinkultur zu erhalten. In der von Moro als elektivem Nährboden für den *Bac. acidophilus* angegebenen frischen Bierwürze fanden wir stets auch ein üppiges Wachstum des *Streptococcus lacticus*. Eine Ansäuerung der Bierwürze in verschiedenen

Graden bewährte sich ebenfalls nicht. Mit angesäuerter einfacher Bouillon kamen wir ebenso wenig zum Ziele, auch mißlangen Versuche mit der Agarplatte unter Zusatz von Säure und unter Zusatz von Säure + Traubenzucker in verschiedenen Mengen. Dagegen gelang es uns, beinahe aus allen Stühlen den *Acidophilus* zu züchten mit der oben erwähnten von Finkelstein und Salge angegebenen und auch von Winkler empfohlenen ($\frac{1}{2}$ Prozent) essigsauen Traubenzuckerbouillon.

Es sei vorweg genommen, daß wir bei unserem allerdings nicht großen und auf die ersten Lebensmonate beschränkten Material weder im einfachen Ausstrichpräparat noch in den kulturellen Ergebnissen so beständige Unterschiede zwischen dem Stuhl normaler Brust- und Flaschenkinder feststellen konnten wie sie von Tissier u. a. gefunden wurden. Die Regel, daß der *Bifidus* für den ersteren, der *Acidophilus* für den letzteren charakteristisch wäre, hat also mindestens viele Ausnahmen. Es wurden nur Stühle von breiiger Konsistenz und der charakteristischen gelben Farbe zur Untersuchung verwandt. In der Mehrzahl der Fälle zeigt das Ausstrichpräparat nur grampositive Stäbchen. Ganz vereinzelt finden sich die kurzen gramnegativen an beiden Enden abgerundeten Stäbchen des *Coli-Aerogenes*, ebenso vereinzelt zeigen sich die ovalen, meist in Doppelform auftretenden ziemlich großen Formen des grampositiven *Streptococcus lacticus*. Die grampositiven Stäbchen zeigten in der Hälfte der Fälle vorwiegend die unregelmäßigen *Bifidus*-formen: verschiedener Größe, teilweise an den Enden zugespitzt, teilweise ausgefranst, andere an den Enden kolbig verdickt, wieder andere mit kolbiger Verdickung im Leib selbst (s. Taf. I, Fig. 1). Nur vereinzelte Formen haben die Gramfarbe nur teilweise angenommen. In einem Ausstrich sahen wir nur Formen mit ausgesprochener Polfärbung an beiden Enden, während der Leib nicht gefärbt war (Form und Größe der *Diphtheriebazillen*). In der Mehrzahl der Fälle fanden sich neben den *Bifidus*-formen teils kürzere teils längere, gleichmäßiger geformte und gefärbte grampositive Stäbchen. In etwa 30 Prozent der Fälle übertrafen diese Stäbchen an Zahl bei weitem die *Bifidus*-formen. Es sind dieselben Formen, die wir später in den Kulturen des *Bac. acidophilus* wiedersahen (s. Taf. I, Fig. 2).

Auf der Platte zeigen sich stets nach 24 Stunden die üppigen Kolonien des *Coli* oder *Aerogenes* und dazwischen die etwas mehr opaken weit kleineren Kolonien des *Streptococcus lacticus*. Diese beiden Arten vermißten wir in keinem Stuhl. Je dreimal sahen wir Hefepilze und Heubazillen. Dreimal zeigten sich auf der Platte die Kolonien des *Staphylococcus albus*, einmal Streptokokkenkolonien vom Typus des *Streptococcus pyogenes*.

In der ersten zur Züchtung des *Bac. bifidus* bestimmten mit hohem Traubenzuckeragar beschickten Verdünnungsreihe machte sich stets bis zur dritten Verdünnung, in zwei Fällen sogar bis zur zehnten Verdünnung, in den übrigen Fällen meist bis zur fünften oder sechsten Verdünnung nach 24 Stunden bei 37° starke Gasbildung bemerkbar. Dieselbe geht aus von den Kolonien des *Coli-Aerogenes*. Neben diesem zeigten sich meist bis zur dritten bis fünften Verdünnung die ovalen, manchmal bis zu 5^{mm} im Durchmesser großen Kolonien des *Streptococcus lacticus*. Nach 3 bis 4 Tagen kommen dann dazwischen die kleinen weißlichen, unregelmäßigen, vielfach manlbeerartigen Kolonien des *Bac. bifidus* zum Vorschein. Von der 3. Verdünnung ab waren sie stets neben dem Gasbildner isolierbar, von der siebenten bis achten Verdünnung ab sahen wir in den meisten Fällen nur *Bifiduskolonien* und zwar stets, abgesehen von den Kolonien, die mit *Bac. acidophilus* verunreinigt waren, in der anaeroben Zone des Agar: Bei der Züchtung des *Bac. acidophilus* in Traubenzuckerbouillon sahen wir öfters Formen des *Bac. bifidus* meist mit Verzweigungen. Einmal, im Stuhl 37, zeigte sich hierbei ein außerordentlich starkes Wachstum des *Bac. bifidus* mit zahlreichen Verzweigungen und Auftreibungen durch die ganze Verdünnungsreihe der Traubenzuckerbouillon hindurch, in den schwächeren Verdünnungen mehr *Acidophilus* als *Bifidus*, in den stärkeren Verdünnungen überwucherte der letztere den ersteren jedoch erheblich. Bei der Weiterzüchtung des *Bifidus* aus diesem Medium trat wieder streng anaerobes Wachstum hervor. In Symbiose mit anderen Bakterien, in unserem Falle mit *Acidophilus*, gedeiht also der *Bac. bifidus* auch in lufthaltigem Nährboden.

Aus der hohen Traubenzuckeragarschicht gelingt es leicht, die *Bifiduskolonien* abzustechen und in anderen Nährböden weiter zu züchten. Allerdings sind sie sehr oft, wie auch oben schon angedeutet, mit *Acidophilus* verunreinigt. Eine Reinzüchtung in aeroben Bedingungen ist uns nicht gelungen. Am besten gedeiht er in hoher 2 prozentiger Zuckeragarschicht, ohne Unterschied bei Zusatz von Traubenzucker, Rohrzucker oder Malzzucker. Nach drei Tagen zeigen sich entlang dem ganzen Stich zusammenhängend weiße unregelmäßige Kolonien bis 1^{cm} von der Oberfläche entfernt. Bei Zusatz von Milchzucker dagegen sahen wir nur kümmerliches Wachstum. Dieselben Ergebnisse hatten wir bei der Züchtung in anaerober 2 prozentiger Zuckerbouillon: nach drei Tagen leichte Trübung, in den folgenden Tagen Bildung von Wolken, die sich bald zu Boden senken. In einfachem Agar, einfacher Bouillon sahen wir kein, in Milch nur geringes Wachstum. Die Milch koaguliert nicht. Gasbildung war in keinem Falle festzustellen, in zuckerhaltigen Nährböden wurde in gewissem Maße Säure gebildet. Je 10^{cem} Nährboden von 6 ge-

prüften Stämmen (Zuckeragar) brauchten zur Neutralisation bei Phenolphthaleinindikator im Durchschnitt bei Zusatz von Traubenzucker: 1.2 bis 1.4, von Rohrzucker 1.0 bis 1.6, von Malzzucker 1.5 bis 2.5 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge.

Unsere Stämme waren bis zu 4 Wochen haltbar. Die im frischen Ausstrichpräparat und in frischen Kulturen relativ einfachen Formen des *Bac. bifidus* (s. Taf. I, Fig. 3) zeigen in den älteren Kulturen die mannigfachsten Variationen. Wir sehen hier die merkwürdigsten Verzweigungen, baumartige Gebilde mit stärkerer Färbbarkeit an den Verzweigungsstellen und keulenförmigen Verdickungen an den Enden (s. Taf. I, Fig. 4). Dieselben Formen sahen wir auch in der oben beschriebenen Symbiose mit *Bac. acidophilus*.

In der Verdünnungsreihe der essigsauren Traubenzuckerbouillon sahen wir in 90 Prozent der Fälle nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank, allerdings nie über die sechste Verdünnung hinaus, zahlreiche *Acidophilus*-formen neben vereinzelt *Bac. bifidus*, *Streptococcus lacticus* und *Aerogenes*. Ein 72stündiger Aufenthalt im Brutschrank schädigte die übrigen Formen derart, daß wir auf der ausgestrichenen Traubenzuckeragarplatte meist eine Reinkultur von *Bac. acidophilus* erhielten. Die Kolonien auf der Platte zeigen nach 24 Stunden meist Stecknadelkopfgroße, haben einen glatten Rand, sind etwas erhaben und von hellgelber Farbe. Dazwischen finden sich manchmal mehr flache Kolonien mit einem dunklen punktförmigen Zentrum und hellen geflechtartigen Ausläufern. Bei Überimpfen der runden erhabenen Kolonien auf andere Platten zeigten sich öfters die flachen, geflechtartigen Kolonien, beim Überimpfen der letzteren Art beobachteten wir vielfach das umgekehrte Verhalten. Dazwischen fanden sich Übergänge. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß, je länger der *Acidophilus* in der essigsauren Traubenzuckerbouillon verblieb, und je älter die Stämme waren, desto häufiger nachher die flachen geflechtartigen Kolonien auftraten. Auf Agar und Gelatine wächst der *Acidophilus* weniger gut. In anaerobem zuckerhaltigen Agar zeigt sich nach 24 Stunden entlang des ganzen Stiches sehr üppiges Wachstum bis zur Oberfläche, nach einigen Tagen trübt sich der Nährboden sehr stark, durch Säurebildung bedingt. 10 cm^3 Nährboden (Agar mit 2 Prozent Zucker) von 6 geprüften Stämmen brauchten zur Neutralisation bei Zusatz von Traubenzucker 8 bis 9.6 cm^3 , von Rohrzucker 7.6 bis 9.1 cm^3 , von Milchezucker 5.5 bis 8.1 cm^3 , von Malzzucker 3.0 bis 4.3 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge. In Milch und Zuckerbouillon zeigt sich spärliches Wachstum, nach 24 bis 48 Stunden gerinnt die erstere. In Zuckerbouillon tritt nach 24 Stunden durch das Bazillenwachstum Trübung auf, die sich nach einigen Tagen zu Boden setzt.

Der *Bac. acidophilus* ist unbeweglich; er färbt sich gut und gleichmäßig nach Gram. In Gestalt und Form entspricht er in frischen Kulturen etwa den Typhusbazillen, nur ist er oft in geringem Maße gekrümmt (s. Taf. I, Fig. 5). In älteren Kulturen, vor allem in den oben beschriebenen geflechtartigen Kolonien, finden sich lange, vielfach verschlungene Fäden, die, je älter die Kulturen sind, um so mehr in der Dicke und Färbbarkeit variieren (s. Taf. I, Fig. 6). Verzweigungen sahen wir beim *Acidophilus* nie. In flüssigem Nährboden sind die Stäbchen meist kürzer und liegen vielfach in Kettenform hintereinander. Wir sahen Ketten bis zu 10 Gliedern.

Die im Stuhle des Erwachsenen regelmäßig auftretenden anaeroben, zur Gruppe der Buttersäurebazillen gehörenden Sporenbildner haben wir im Ausstrichpräparat des Säuglingsstuhles niemals gesehen. Mit der oben angegebenen Züchtungsmethode fanden wir in 40 Prozent der Fälle meist nur in der ersten Verdünnung vereinzelte scheibenförmige, streng anaerob wachsende Kolonien. Die von uns isolierten Stämme zeigten in Agar und Zuckeragar gleich gutes streng anaerobes Wachstum bis 1^{cm} von der Oberfläche entfernt. In zuckerhaltigen Nährböden tritt starke Gasbildung auf. Bei der anaeroben Züchtung von Milch ist nach 24 Stunden die Eprouvette zur Hälfte mit Gas gefüllt, die Milch hat sich gesondert in stark übelriechende bräunlich verfärbte feste Massen, die durch die Gasbildung nach oben getrieben werden, und klares Serum. In frischen Kulturen färben sich diese Bakterien gut nach Gram, bilden ziemlich dicke regelmäßige große Stäbchen und Fäden. In alten Kulturen verlieren sie sehr bald die Gramfärbbarkeit. Die isolierten Stämme stimmen mit den Kultureigenschaften des *Bac. perfringens* (Tissier) überein. Aus dem Umstande, daß sich ausgebildete Formen im Ausstrichpräparat niemals fanden, glauben wir schließen zu dürfen, daß sich die Kolonien nur aus den im Stuhle vorhandenen Sporen entwickeln.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß neben dem *Bac. bifidus* einen Hauptbestandteil der Bakterienflora des Säuglingsstuhles bei Brust- und Flaschenkindern der *Bac. acidophilus* bildet. Wenn wir bei der kulturellen Züchtung auch den *Bac. bifidus* meist noch in der achten und neunten Verdünnung, in einigen Fällen sogar bis zur zehnten Verdünnung fanden, den *Acidophilus* dagegen nie über die sechste Verdünnung hinaus und in 10 Prozent der Fälle überhaupt nicht fanden, so glauben wir doch zu dem vorstehenden Schlusse und somit zu der obigen Deutung des Ausstrichpräparates berechtigt zu sein, da die zur Züchtung des *Acidophilus* verwandte essigsäure Traubenzuckerbouillon nur ein elektiver, aber keineswegs idealer Nährboden für ihn ist. Während die übrigen Bakterien durch den Säurezusatz nach

72 Stunden abgetötet werden, ist der *Acidophilus* resistenter gegen Säure, aber keineswegs unempfindlich. Nach 10 Tagen ließ auch er sich aus der essigsauren Traubenzuckerbouillon nicht mehr weiterzüchten, während wir Stämme aus Traubenzuckeragar nach 3 Monaten noch überimpfen konnten. Es erscheint uns daher nicht gerechtfertigt, von einer *Bifidus*-flora des Säuglingsstuhles zu reden und den *Bac. acidophilus* als zufälligen Nebebefund zu betrachten.

Erklärung der Abbildungen.

(Taf. I.)

Fig. 1. Säuglingsstuhl mit vorwiegend den unregelmäßigen Formen des *Bacillus bifidus*. Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 4.

Fig. 2. Säuglingsstuhl mit vorwiegend den regelmäßigen Formen des *Bacillus acidophilus*. Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 4.

Fig. 3. Reinkultur (8 Tage alt) von *Bacillus bifidus*. Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 4.

Fig. 4. Reinkultur von *Bacillus bifidus* (4 Wochen alt). Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 6.

Fig. 5. Reinkultur von *Bacillus acidophilus* (24 Stunden alt). Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 6.

Fig. 6. Reinkultur von *Bacillus acidophilus* (4 Wochen alt). Vergrößerung: Zeiß' Ölimmersion, Okular 4.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 6.