

IV. Ueber die Zersetzungen der Milch und die biologischen Grundlagen der Gährungsphysiologie.

Von
Ferdinand Hueppe.

(Fortsetzung aus No. 48.)

Zuerst lenke ich Ihre Aufmerksamkeit auf einen Bacillus, welcher auf der Oberfläche der Kartoffel regelmässig vorkommt und der der gewöhnlichste der beim Sterilisiren der Kartoffeln zu bekämpfenden Organismen ist. Diese Bacillen bilden auf den Kartoffelscheiben gelblichweisse, stark gefaltete Häute, von denen sich lange Schleimfäden abheben lassen. Dieselben wirken sehr intensiv diastatisch, vermögen aber aus Zucker keine fadenziehende, schleimige, der Viscose ähnliche Substanz zu bilden. In der Milch bringen sie erst das Casein zur Gerinnung und überziehen die von ihnen allmählich fast ganz gelösten Caseincoagula mit einer dicken Schleimschicht.

Der zweite Organismus hat wegen seines Wachstums in Gelatine augenblicklich ein gewisses Interesse, weil er in Gelatine, besonders bei Plattenkulturen, eine ähnliche trichterförmige Verflüssigung hervorruft, wie es die Kommabacillen (Vibrionen) der Cholera asiatica zeigen. Diese Bakterienform, ein ziemlich grosser Kokkus, den ich im Wasser verschiedener Herkunft gefunden habe, peptonisirt das ausgeschiedene Casein weniger intensiv und sein weiteres Wachstum in Gelatine geht derart vor sich, dass er im Impfstiche und seiner allernächsten Umgebung die Gelatine verflüssigt, während die umgebende Gelatine noch lange festbleibt. Die oben angegebene Aehnlichkeit bezieht sich also nur auf das, Verwechslungen am meisten ausgesetzte, Anfangsstadium des Oberflächenwachstums.

Die wichtigsten aller in diese Gruppe gehörigen Organismen dürften wohl die Buttersäurebacillen sein, welche die Nährgelatine von oben anfangend allmählich vollständig verflüssigen, in der Milch das Casein erst zur Gerinnung bringen, dann peptonisiren und ohne Auftreten eines fauligen Geruches weiter unter Ammoniakbildung spalten. Naegeli hatte derartige Alterationen scheinbar sicher sterilisirter Milch auf eine Alteration der Milchsäurebakterien durch die zum Sterilisiren verwendete Hitze bezogen und in denselben einen Beweis gesucht für die Umwandlung der Hefenatur eines Pilzes in eine andere. Dagegen konnte ich sicherstellen, dass, wenn in scheinbar sicher sterilisirter Milch nachträglich derartige ammoniakalische Zersetzung eintritt unter gleichzeitigem Auftreten eines mehr oder weniger deutlichen bitteren Geschmacks, dies als Wirkung der resistenteren Buttersäurebacillen geschieht. Diese Bakterien vermögen Milchzucker direct nicht zu vergähren, wohl aber hydratisirten Milchzucker. Sie vermögen in Folge dessen in sterilisirter Milch keine Buttersäuregährung her-

vorzurufen, sondern nur dann, wenn der Milchzucker durch andere Bakterien hydratisirt ist oder milchsaure Salze vorhanden sind.

Ob diese Bacillen mit dem Pasteur'schen Buttersäureferment identisch sind, wie ich zuerst glaubte, vermag ich jetzt nicht mehr so bestimmt zu behaupten und auch Fitz, den wir die genaueste Kenntniss verschiedener specifischer Buttersäure bildender Bakterien verdanken, hat diese Frage noch offen gelassen. Eine Identität mit Praznomski's *Clostridium butyricum* ist mehr als fraglich. Diese Bacillen vermögen unstreitig bei Luftabschluss ihre Wirkung auszuüben, werden aber durch den Luftsauerstoff nicht getödtet und können spontan in der Milch ihre Wirkung ausüben unter Bedingungen, welche nichts mit Abschluss von Luftsauerstoff zu thun haben. Hiermit behaupte ich natürlich durchaus nicht, dass reichliche Anwesenheit von freiem Sauerstoff ihnen für ihre Gährwirkung besonders förderlich ist.

Gewöhnlich interpretirt man das Auftreten und Wirken dieser Bakterien in der Milch derart, dass man annimmt, die Milchsäurebakterien absorbirten erst den in der Milch gelösten Sauerstoff und setzten dadurch erst die Buttersäurebakterien in den Stand, ihre Wirkung auszuüben. Diese Erklärung halte ich deshalb für nicht richtig, weil auch in diesen späteren Stadien durch Absorption immer Sauerstoff in der Milch vorhanden ist, den die Milchsäurebacillen einfach deshalb nicht durch ihre Lebensthätigkeit zum Verschwinden bringen können, weil die vorher von ihnen gebildete Milchsäuremenge die Milchsäurebakterien selbst in einen Zustand der Unthätigkeit und Vermehrungsunfähigkeit versetzt hat, so dass sie überhaupt erst dann wieder wirken und sich vermehren, also auch Sauerstoff verbranchen können, wenn die Säure neutralisirt wird. Die Wirkung der Buttersäurebacillen geht also, in der Regel wenigstens, in diesen späteren Stadien der Milchezersetzung vor sich trotz der Anwesenheit von Luftsauerstoff.

Von pigmentbildenden Bakterien, welche gleichzeitig Pigment bilden und das Casein fällen und lösen, führe ich einige an. Einer derselben, ein Bacillus, ruft auf der Rahmschicht intensiv blauschwarze Flecken hervor, welche aber wohl zu unterscheiden sind von den himmelblauen Flecken der sogenannten blauen Milch; über dem ausgeschiedenen Casein bildet sich eine schwarzblaue Peptonlösung.

Die Bacillen des blaugrünen Eiters wirken ähnlich, nur zeigt die Rahmschicht grünliche Flecken, und das Serum hat einen Stich ins grünliche. Interessanter, besonders bei directem Vergleiche mit den gleichfalls gelbes Pigment bildenden und daneben Milchsäuregährung veranlassenden Mikrokokken der Osteomyelitis, ist eine orange Sarcine, welche die Gelatine ähnlich verflüssigt, auf der Oberfläche des Rahms orange Flecken hervorruft und das Casein auch bei schwach alkalischer Reaction zur Ausscheidung bringt und dann peptonisirt.

Auch bei diesen Organismen, welche ich aus einer grösseren Zahl ausgewählt habe, ist die Specificität der Wirkung, die Abhängigkeit der typischen Wirkung von den in den Culturen constanten Bakterien nicht zu verkennen. Auch diese Bakterien können wir einstweilen als Arten ansprechen.

Der Milchzucker vermag direct wie schon erwähnt, die Buttersäuregährung nicht einzugehen, auch die alkoholische Gährung durch Hefe geht er nur indirect ein, nur nach vorausgegangener Spaltung unter Wasseraufnahme. Wo wir in der Milch eine alkoholische Gährung durch Hefe beobachten, finden wir immer neben der Hefe die vorbereitende Wirkung eines andern Mikroorganismus.

In Kumys, dem aus Stutenmilch hergestellten Milchwein der eurasischen Steppenvölker, scheint sich, soweit die ungenügenden Mittheilungen ein Urtheil gestatten, die Wirkung zusammzusetzen aus der Thätigkeit der Milchsäurebakterien und der Hefe. Viel interessanter ist der noch nicht lange zu unserer Kenntniss gelangte, aus Kuhmilch hergestellte Milchwein, der Kefir der mohamedanischen Bergvölker des Kaukasus, welche durch Anwendung dieses alkoholischen Getränkes in geschickter Weise die Gebote des Propheten zu ungehen wissen und in einer Anwandlung von Humor das Ferment noch obendrein Hirse des Propheten nennen. Dieses Kefirferment wächst makroskopisch in blumenkohlähnlichen warzigen Klümpchen, welche oft bis zu Haselnussgrösse wachsen, von denen sich dann wieder kleine Partikel losreissen, die wieder für sich weiter wachsen. Jedes solches, makroskopisch höchst charakteristisch wachsendes Kefirkorn stellt im reinen Zustande eine Symbiose von drei Mikroorganismen her, deren keiner zur vollständigen Wirkung fehlen darf. Diese drei Organismen sind die mit den Bacillen der spontanen Milchsäuregährung identischen kurzen Stäbchen, ein grösserer, von Kern als *Dispora caucasica* bezeichneter Bacillus und eine Culturbefe. Die Milchsäurebakterien führen einen Theil des Milchzuckers in Milchsäure und Kohlensäure über, während ein anderer Theil des durch dieselben Organismen hydratisirten Milchzuckers durch die Hefe die alkoholische

Gährung eingeht. Gleichzeitig mit dieser Wirkung lösen die längeren Stäbchen der Dispora das Casein der Milch und führen es allmählich in Pepton und weitere Spaltungsproducte über. Ich begnüge mich hier mit diesen kurzen auf das Studium der Reinculturen sowohl als des fertigen Getränkes basirten Angaben, durch welche ich hoffe die bisherigen Mittheilungen wesentlich berichtigt zu haben und aus denen schon genügend hervorgehen dürfte, dass je nach der Temperatur und dem Stadium der Zersetzung die chemische Analyse höchst differente Resultate ergeben muss, die bis jetzt nicht richtig verstanden wurden, weil eben das, was diese Gährung zu einer der interessantesten macht, die Symbiose von drei Fermentorganismen nicht richtig erkannt worden war. Als Diäteticon ist der Kefir wohl eines der wichtigsten, welches wir in den letzten Jahren kennen gelernt haben, und welches selbst dadurch nichts an Werth verlieren sollte, dass es aus dem Osten zu uns gekommen ist.

Neben der Gerinnung des Caseins durch Säure- oder Labbildende Bakterien markiren sich für das Auge von den spontanen Zersetzungen der Milch am auffallendsten die Pigmentbildungen durch Bakterien. Ausser den schon wegen ihrer anderweitigen Beziehungen besprochenen möchte ich Ihnen noch zwei hierher gehörige Organismen zeigen. Der erste ist der Bacillus der sogenannten blauen Milch. Derselbe pflanzt sich durch Theilung und Bildung endständiger, endogener Sporen fort; die Theilung führt die Langstäbchen in Kurzstäbchen über, ohne dass es jedoch bei Reinculturen zu einem Arthrosporenähnlichen Zerfallen in Kokken- oder Gonidienähnliche Bildungen kommt. Bei der Hartnäckigkeit, mit welcher der von Neelsen bei Ausserachtlassen von Reinculturen behauptete, aber nicht bewiesene und beim Ausgangspunkt von Reinculturen leicht zu widerlegende Pleomorphismus dieser Organismen immer wieder zum Beweise der Formunbeständigkeit der Bakterien überhaupt herangezogen wird, sehe ich mich veranlasst noch einmal zu erklären, dass ein derartiger Pleomorphismus sich nur beim Ausgang von nicht reinem Material findet und die darauf bezüglichen Angaben nur der Ausdruck derartigen Vermureinigungen der Cultur sind.

Die Bakterien der blauen Milch rufen nicht die früher erwähnte blauschwarze Farbe hervor, sondern eine himmelblaue, aber nur dann, wenn die Milch gleichzeitig sauer wird. In sterilisirter Milch, welche durch diese Bakterien nicht sauer wird oder gerinnt, sondern flüssig bleibt und allmählich schwach alkalische Reaction annimmt, rufen sie nur eine Vorstufe der blauen Farbe hervor, welche je nachdem die Anfangsreaction amphoter oder schwach sauer war, der Milch eine nach unten zu abnehmende graue oder blaugraue Färbung ertheilt. Synthetisch vermögen diese Organismen aus weinsaurem Ammoniak eine grüne Vorstufe der blauen Farbe zu bilden, und ebenso in Lösungen von milchsaurem Ammoniak; in den letzteren Lösungen ist der grüne Ton nur vorübergehend vorhanden und geht bald in ein intensives Himmelblau über. In Gelatine wachsen diese Bakterien in Form flacher grauweisser glänzender Knöpfchen, in deren Umgebung die Gelatine grün wird; in den Reagirläsern tritt in den obern Schichten der Gelatine allmählich eine braune Färbung auf.

Anfangs wächst in der Gelatine sehr ähnlich ein anderer Bacillus, welcher allmählich ein mehr blattförmiges Oberflächenwachsthum zeigt, in der Gelatine eine sehr ähnliche grüne Färbung veranlasst, aber in Reagirläsern nicht die braune Färbung der obern Partien bewirkt und der Gelatine eine intensive grüne Fluorescenz ertheilt. Die Aehnlichkeit ist also nur eine oberflächliche und bei Verwendung durchsichtiger, fester Medien relativ leicht zu erkennen. In der Milch, welche sie ebenfalls nicht zur Gerinnung bringen, bewirken diese Bakterien eine sehr schwache grüne Färbung der oberflächlichen Partien.

Wenn ich mich auch über die durch Bakterien gebildete Pigmente selbst noch sehr reservirt aussprechen muss, da ich noch keine Zeit gefunden habe meine früheren Untersuchungen nach dieser Hinsicht in genügender Ausdehnung wieder aufzunehmen, glaube ich doch schon zu dem einen Schlusse berechtigt zu sein, dass diese Pigmente höchst wahrscheinlich ganz verschiedenen chemischen Gruppen angehören. Einzelne dieser Pigmente scheinen überhaupt keine einheitlichen Körper zu sein, andere stehen den Anilinfarben sehr nahe, ohne aber mit den bis jetzt bekannten identisch zu sein, andere gehören zu den Phenolfarbstoffen und ihre Bildung aus den Albuminanten steht der normalen Zersetzung der Eiweissstoffe näher. Zu dem Schlusse aber halte ich mich für durchaus berechtigt, dass die bis jetzt mir bekannt gewordenen Pigmentbakterien, von denen ich Ihnen einige für die Milchzersetzen interessanter vorgeführt habe, einstweilen als Arten anzusehen sind, da sie in den Culturen sich als höchst formbeständig und in ihren Wirkungen als entsprechend specifisch wirkungsconstant erwiesen haben. Wo Abweichungen vorzukommen scheinen, sind es rein chemische, als einfache Farbreactionen auftretende Alterationen, welche bei Beachtung aller Verhältnisse, der biologischen und chemi-

schen, die Constanz nur um so glänzender bestätigen, und nur bei mangelhafter Beobachtung der gesammten Erscheinungen eine Deutung im Sinne der Inconstanz gestatten.

Das berühmte *Oidium lactis* ruft keine sichtbaren Alterationen der Milch hervor und scheint ganz auf das bekannte Oberflächenwachsthum beschränkt zu sein. Ausser dem gewöhnlich vorkommenden habe ich noch eine zweite Art oder Varietät dieses *Oidium lactis* kennen gelernt, so dass wir uns dieser Form gegenüber, wie es auch die leider unvollendet gebliebenen Untersuchungen von Stahl wahrscheinlich machen, möglicherweise in derselben Unkenntniss befinden, wie vor wenigen Jahren den Aspergillen und Mucorineen gegenüber. Meine früheren Misserfolge beim Impfen mit dem gewöhnlichen *Oidium lactis* glaube ich jetzt, nachdem ich Culturen von ächtem wirksamen Favuspilz gesehen habe, dahin interpretiren zu müssen, dass diese beiden Pilze nicht identisch sind.

Wenn meine Untersuchungen auch ganz unzweideutig ergeben haben, dass die spontanen Zersetzungen der Milch auf äussere Ursachen zurückgeführt werden müssen, auf das Hineingelangen von Fermentorganismen oder Keimen derselben in die Milch, so bin ich doch weit entfernt zu behaupten, dass in der Milch nicht auch Umsetzungen vor sich gehen können, welche auf chemische Fermente, auf ächte Enzyme der Brustdrüse zurückzuführen sind. Für die Existenz von derartigen Enzymen der Brustdrüse, welche die Milch also bei der Secretion schon enthält, sprechen die Beobachtungen von Meissner über das labähnliche Aanscheiden des Caseins der Ziegenmilch bei Ausschluss jeder Mitwirkung von Organismen, und ältere Beobachtungen von Schär über diastatische Enzyme der Milch. Die meisten der hierher gehörigen Mittheilungen sind aber ohne Rücksicht auf etwaige Betheiligung von Fermentorganismen und ohne Kenntniss der hierzu erforderlichen Methoden angestellt, so dass Reserve derselben gegenüber um so mehr geboten ist, als viele sich leicht direct widerlegen lassen.

Nachdem ich Sie so mit den wichtigsten Ergebnissen meiner Untersuchungen durch Demonstration der Reinculturen der Fermentorganismen und ihrer sichtbaren Effecte auf die Milch bekannt gemacht habe, glaube ich mich der Verpflichtung nicht entziehen zu dürfen, die Consequenzen dieser Ermittlungen für die biologischen Grundlagen der Gährungsphysiologie wenigstens kurz zu besprechen.

(Schluss folgt.)