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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 7 (1916)

Heft: 4

Artikel: Der Nachweis von Bact. coli im Wasser mit Hilfe der Milchzuckerpeptonagarschüttelkultur

Autor: Thöni, J. / Schaffer, F.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984125

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM SCHWEIZ. GESUNDHEITSAMT

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE
PUBLIÉS PAR LE SERVICE SUISSE DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 8. 20 per Jahrg. — Ausland Fr. 10. — oder M. 8. —.
Suisse fr. 8. 20 par année. — Etranger fr. 10. — ou M. 8. —.
Preis einzelner Hefte Fr. 1. 50 (Ausland M. 1. 50).
Prix des fascicules fr. 1. 50 (étranger M. 1. 50).

BAND VII 1916 HEFT 4

Der Nachweis von Bact. coli im Wasser mit Hilfe der Milchzuckerpeptonagarschüttelkultur.

Von J. THÖNI.

(Mitteilung aus dem Laboratorium des Schweizerischen Gesundheitsamtes, Bern. Vorstand: F. Schaffer.)

A. Einleitung.

Die Methoden zum Nachweis von *Bact. coli* sind zahlreich. Nach dem Prinzip, das ihnen zu Grunde liegt, kann man sie in zwei Gruppen einteilen. Bei den einen Verfahren werden durch chemische Zusätze oder durch hohe Temperaturen, bei den anderen durch Schaffung optimaler Entwicklungsbedingungen für *Bact. coli* inbezug auf Nährmedium und Temperatur die Begleitorganismen zu unterdrücken gesucht. Die Methoden der erstgenannten Gruppe werden nun im allgemeinen als wenig empfindlich beurteilt, weil die Agenzien, die ein Zurückdrängen der Nichtcolibakterien bedingen, *Bact. coli* selber auch schädigen. Bei den Verfahren der 2. Gruppe dient zur Anreicherung von *Bact. coli* ein flüssiges Nährmedium und zwar gewöhnlich eine Zuckerpeptonkochsalzlösung. Je nachdem darin Gasbildung auftritt oder nicht, wird die Kultur auf ein eventuelles Vorkommen von Colibakterien verarbeitet. Nur bei dem Verfahren nach *Petruschki* und *Pusch* [1]), das zur Vorkultur zuckerfreie Bouillon verwendet, sind die durch die kleinsten Aussatmengen trübe gewordenen Röhrchen weiter zu prüfen. Da nun der positive Gasbefund schon einen wichtigen Anhaltspunkt für die vorläufige hygienische Beurteilung eines Wassers bildet, so wird man im allgemeinen den mit zuckerhaltigen Nährböden arbeitenden Verfahren den Vorzug geben.

[1]) *Petruschki* und *Pusch*: *Bact. coli commune* als Indikator für Fäkalverunreinigung von Wässern. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1903, Bd. XLIII, S. 304.

Im Schweiz. Lebensmittelbuch, II. Auflage, 1909, werden zur Prüfung von Trinkwasser auf das Vorkommen von *Bact. coli* zwei Methoden angeführt nämlich:

1. die Gärungsprobe nach *Eijkman* und
2. das Verfahren nach *v. Freudenreich.*

Es war uns Gelegenheit geboten, beide im Laufe der letzten 2 Jahre an einem vielseitigen Prüfungsmaterial zu erproben. Dabei fiel das Ergebnis verschieden aus. Während das *Eijkman*'sche Verfahren in einer grossen Zahl von Fällen versagte,[1]) hat das *Freudenreich*'sche im allgemeinen befriedigende Resultate gegeben. Gelegentlich kam es indessen vor, dass bei demselben die Beurteilung der Milchzuckerbouillonkulturen Schwierigkeiten bot. Da die Gasbildung zuweilen erst dann in die Erscheinung tritt, wenn die Röhrchen geschüttelt werden, so ist man genötigt, diese Manipulation bei allen nicht Gärung zeigenden Kulturen vorzunehmen. In Kulturen, die neben Colibakterien in überwiegender Zahl sonstige thermophile Keimarten beherbergen, ist die Gasbildung meistens eine schwache. Werden sie geschüttelt, so treten gewöhnlich nur wenige Bläschen an die Oberfläche. Bei solchen Befunden ist dann nicht zu entscheiden, ob die Bläschen durch Zuckervergärung oder durch Luftaufnahme entstanden sind. Es ist nun, um das eventuelle Uebersehen der Gasbildung zu verhindern, empfohlen worden, die Bouillonröhrchen mit einem umgestülpten Glasröhrchen zu versehen, welches dann als Eudiometer zu funktionieren hat. Abgesehen davon, dass dadurch der Nachweis von Colikeimen umständlicher wird, kann es auch zweifelhaft erscheinen, ob diese Massnahme in allen Fällen den Zweck erfüllt.

Die obigen Gründe haben uns dann bewogen, der Frage näher zu treten, ob nicht bei der Prüfung des Wassers auf Vorkommen von *Bact. coli* zur Vorkultur an Stelle des flüssigen ein fester Nährboden sich besser eignen würde. Unsere Untersuchungen wurden mit einem 2 % Milchzucker enthaltenden Peptonkochsalzagar ausgeführt.[2]) Hierbei bedienten wir uns der sogenannten Schüttelkultur d. h. das Prüfungsmaterial wurde in den in Reagenzröhrchen resp. in sogenannten *Burri*'schen Röhren abgefüllten Nährboden eingesäet, durch eine kreisende Bewegung darin möglichst gleichmässig verteilt und der Agar erstarren gelassen.

---

[1]) Bei Wässern, die neben *Bact. coli* auch *Bact. Güntheri* und Säurestreptokokken enthalten, war hier sehr häufig keine Gasbildung zu beobachten.

[2]) Die Bereitung dieses Milchzuckerpeptonagars geschieht auf folgende Weise: In 500 cm³ Leitungswasser werden 10 g Pepton (Witte) und 5 g Kochsalz unter schwachem Erwärmen aufgelöst. In einem zweiten Gefäss bringt man 15 g Agar in 400 cm³ Leitungswasser in Lösung (im Autoklav bei ³/₄ Atmosphären während ³/₄ Stunden oder durch Kochen auf offener Flamme). Beide Flüssigkeiten werden vereinigt, zusammen ¹/₄ Stunde im Dampftopf gelassen und, ohne zu neutralisieren, filtriert (im Heisswassertrichter). Dann fügt man dem Peptonagar noch 100 cm³ einer 20%igen Milchzuckerlösung bei, füllt mit heissem Wasser auf 1000 cm³ auf und mischt das Ganze gehörig durch. Der nun fertige Nährboden wird dann zu ca. 10 cm³ in Reagensgläser abgefüllt und an drei aufeinanderfolgenden Tagen während je 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert.

B. Experimenteller Teil.

1. *Vergleichende Untersuchungen über die Gasbildung in Milchzuckerbouillon (nach v. Freudenreich) und Milchzuckerpeptonagar in hoher Schicht (Schüttelkultur).*

Mit diesen Prüfungen verfolgten wir den Zweck, festzustellen, ob die von verschiedenen Autoren vertretene Ansicht, dass feste Nährmedien zur Entwicklung von *Bact. coli* sich weniger eignen als flüssige, für die Agarschüttelkultur begründet sei.

a) Mit Aufschwemmungen einer Reinkultur von Bact. coli.

Als Versuchsorganismen verwendeten wir 5 aus menschlichen Faeces isolierte Colistämme.

In einer ersten Reihe wurde von jedem Stamme jeweilen mit einer Nadelspitze Material der 24stündigen Schrägagarkultur entnommen und in 100 cm³ physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Davon ausgehend wurden durch fortlaufende je 10fache Verdünnung mit sterilem Wasser 7 Aufschwemmungen von abnehmender Dichte bereitet. Aus jeder Verdünnung wurde je 1 cm³ in ein Bouillonröhrchen und in ein Röhrchen mit geschmolzenem Agar eingetragen und die Kulturen bei 37° gehalten. Nach 24 Stunden zeigten sämtliche Röhrchen Gasbildung. Immerhin wiesen die mit der letzten Verdünnung beschickten Agarkulturen nur mehr vereinzelte Gasblasen (3—10) auf.

In einer 2. Reihe wurden daher zur Aussaat nur die drei letzten Verdünnungen (5, 6 und 7) des obigen Versuches und noch eine weitere (8.) benützt. Die Colibakterien waren also in diesem Falle während 24 Stunden im Wasser aufgeschwemmt gewesen (bei Zimmertemperatur). Die Beschickung der beiden Nährmedien wurde diesmal mit je 0,5 cm³ pro Bouillonröhrchen resp. Agarröhrchen vorgenommen. Ueber die Ergebnisse dieses Versuches orientiert Tabelle I.

Wie aus dieser Zusammenstellung zu entnehmen ist, war das Resultat inbezug auf die Anzahl der Gasbildung zeigenden Bouillon- und Agarkulturen ein übereinstimmendes. Bei beiden Nährmedien wiesen nach 24 Stunden je 13 Gasbildung auf. Vergleicht man ferner die Befunde der gleichen Verdünnung mit einander, so ergibt sich, dass einzig bei Fäkalcoli 3 bei den mit 6 und 7 geimpften Bouillonröhrchen insofern ein nicht gesetzmässiges Verhalten zu konstatieren war, als von diesen beiden nur die höhere Verdünnung Gärung bedingt hat. Es dürfte sich dabei wohl um einen zufällig in die stärkere Verdünnung verirrten Keim handeln. Die Aufschwemmungen von Fäkalcoli 5 haben in sämtlichen Röhrchen Gasbildung bewirkt, jedoch geht aus der mit Verdünnung 8 dieses Stammes gewonnenen Agarkultur hervor, dass dieselbe nur mehr vereinzelte Keime enthielt, während anscheinend in 0,5 cm³ derselben Verdünnung bei den übrigen keine Colikeime mehr vorkamen.

Tabelle I.

Testorganismen	Milchzuckerbouillonkulturen				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Verdünnungen				Verdünnungen			
	5	6	7	8	5	6	7	8
Fäkalcoli 1.	+	0 Klar	0 Klar	0 Klar	+ Mehrere Gasblasen	0	0	0
Fäkalcoli 2.	+	+	+	0 Klar	+ Zahlreiche Gasblasen; einige Risse	+ 2 Gasblasen; 2 Kolonien	+ 1 Gasblase; 1 Kolonie	0
Fäkalcoli 3.	+	0 Klar	+	0 Klar	+ Zahlreiche Gasblasen	+ 1 Gasblase; 1 Kolonie	0	0
Fäkalcoli 4.	+	+	+	0 Klar	+ Zahlreiche Gasblasen und Risse	+ Zahlreiche Gasblasen	+ Einige Gasblasen; 7 Kolonien	0 [1]) 1 Kolonie
Fäkalcoli 5.	+	+	+	+	+ Zahlreiche Gasblasen und Risse	+ Zahlreiche Gasblasen u. Kolonien	+ Zahlreiche Gasblasen und mehrere Kolonien	+ 2 Gasblasen; 2 Kolonien

[1]) Nach 36 Stunden eine Gasblase. + = Gasbildung. 0 = Keine Gasbildung.

b) Mit Mischaufschwemmungen von Bact. coli und Bact. Güntheri.

Das in Abwässern häufige Vorkommen von *Bact. Güntheri* neben *Bact. coli* und die von uns öfters gemachte Beobachtung, dass dann die Gasbildung in den zum Nachweis des letzteren Organismus angewendeten Nährmedien nicht immer oder nicht deutlich in die Erscheinung trat, liessen es als angezeigt erscheinen, auch das Verhalten von *Bact. coli* in Gegenwart von *Bact. Güntheri* bei diesen Prüfungen zu berücksichtigen.

Den im vorigen Versuch benützten Verdünnungen 5, 6, 7 und 8 der 5 Colistämme wurden einige Tropfen einer ebenfalls stark verdünnten Aufschwemmung von *Bact. Güntheri* zugesetzt und dann davon wieder mit je 0,5 cm³ die beiden Nährmedien beschickt. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° wurde der in Tabelle II wiedergegebene Befund festgestellt.

Von den 20 Bouillonröhrchen zeigten 7 deutlich Vergärung (Schaum an der Oberfläche), während bei 5 weitern die Gasbildung zweifelhaft war. Von den in gleicher Weise und gleicher Anzahl geimpften Agarröhrchen ergaben dagegen 11 eindeutige Gasentwicklung. Wie aus den Schüttelkulturen ersichtlich ist, war das Mengenverhältnis von *Bact. coli* zu *Bact. Güntheri* in den mit Verdünnung 8 beschickten Röhrchen wie 1:20—30.

Aus den obigen Untersuchungen geht somit hervor, dass zur Vorkultur von *Bact. coli*, wenn sich dasselbe allein vorfindet, Milchzuckerpeptonagar in hoher Schicht als ebenso geeignet gelten darf, wie die Milchzuckerbouillon, wenn es dagegen mit *Bact. Güntheri* vorkommt, das feste Nährmedium dem flüssigen entschieden überlegen ist.

2. Vergleichende Untersuchung über die Colizahl und die Gasbildung von Wässern, die mit Fäkalien infiziert sind.

In Anlehnung an den Zweck, der bei Wasseruntersuchungen durch den Colinachweis verfolgt wird, wurden 10 Proben von menschlichen Faeces mit Wasser aufgeschwemmt und auf das Vorkommen von *Bact. coli* geprüft. Die dabei angewandte Methodik war folgende: Ca. 1 g einer gewöhnlich frischen Fäkalprobe wird mit 30—40 cm³ sterilen Wassers in flambierter Reibschale zu einer homogenen Emulsion verrieben, dann in ein 100 cm³ fassendes Kölbchen gebracht und aufgefüllt. Mit dieser Emulsion werden 2 weitere Aufschwemmungen durch Ueberimpfen je 1 cm³ in ein zweites und dann in ein drittes Hunderterkölbchen bereitet. Zur Aussaat wird je 1 und $^1/_{10}$ cm³ aus jeder Aufschwemmung verwendet. Wir erhalten auf diese Weise folgende Verdünnungsreihe:

$$\text{Aufschwemmung 1} \begin{cases} 1\ \text{cm}^3 = {}^1/_{100} \\ {}^1/_{10}\ \text{»} = {}^1/_{1000} \end{cases}$$

$$\text{Aufschwemmung 2} \begin{cases} 1\ \text{cm}^3 = {}^1/_{10\,000} \\ {}^1/_{10}\ \text{»} = {}^1/_{100\,000} \end{cases}$$

$$\text{Aufschwemmung 3} \begin{cases} 1\ \text{cm}^3 = {}^1/_{\text{Mill.}} \\ {}^1/_{10}\ \text{»} = {}^1/_{10\,\text{Mill.}} \end{cases}$$

Tabelle II.

Testorganismen	Milchzuckerbouillonkulturen				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Verdünnungen				Verdünnungen			
	5	6	7	8	5	6	7	8
Fäkalcoli 1 + Bact. Güntheri	+	+	0 Trübung	0 Trübung	+ Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	+ 1 Gasblase Zahlreiche Güntherikol.	0 Nur Güntherikol.	0 Ca. 30 Kol. Güntheri
Fäkalcoli 2 + Bact. Güntheri	+	+	? Trübung	0 Trübung	+ Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	0 Zahlreiche Güntherikol.	0 Zahlreiche Güntherikol.	+ 1 Kol. Coli ca. 25 Kol. Güntheri
Fäkalcoli 3 + Bact. Güntheri	+	+	0 Trübung	0 Trübung	+ Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	0 Zahlreiche Güntherikol.	0 Zahlreiche Güntherikol.	0 ca. 20 Güntherikol.
Fäkalcoli 4 + Bact. Güntheri	? Trübung	? Trübung	? Trübung	0 [1]) Trübung	+ Agarzylinder in Stücke zerrissen	+ Agarzylinder von zahlr. Gasblasen durchsetzt	0 [1]) 3 Coli Kol. ca. 8 Güntherikol.	0 ca. 15 Güntherikol.
Fäkalcoli 5 + Bact. Güntheri	+	0 Trübung	? Trübung	0 Trübung	+ Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	+ Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	0 Zahlreiche Gasblasen u. Güntherikol.	+ 1 Gasblase, 1 Kol. Coli u. ca. 10 Kol. Güntheri

[1]) Nach 36 Stunden Gasbildung. + = Gasbildung. 0 = Keine Gasbildung.

Die Ermittlung der Colizahl erfolgte mittelst Gelatinplatten sowie nach dem *Marmann*'schen Verdunstungsverfahren [1]), das wir in etwas modifizierter Weise wie folgt anwendeten: Die frisch gegossenen Endoplatten werden offen für ca. 1 Stunde im Brutschrank bei 37° zum Vortrocknen aufgestellt. Nach gleichmässiger Verteilung des Aussaatmaterials auf der Oberfläche stellen wir die Schalen wiederum offen in einen auf 41—42° C. erwärmten Brutschrank, dessen Zu- und Abluftöffnungen geöffnet sind. Nach 15—20 Minuten ist das Wasser gewöhnlich verdunstet, die Platten werden zugedeckt und kommen dann während 24 resp. 48 Stunden in den bei 37° eingestellten Brutschrank.

Auch die zur Prüfung auf Gasbildung benutzten Milchzuckeragarschüttelkulturen wurden jeweilen 24 resp. 48 Stunden bei 37° bebrütet.

Mit der Verarbeitung der Gelatineplattenkulturen warteten wir bis zum 5. oder 6., mitunter bis zum 10. Tage, um die Zahl der überhaupt entwicklungsfähigen Colikeime möglichst genau ermitteln zu können. Eine Verflüssigung trat bei höhern Verdünnungen, die ja hauptsächlich in Frage kommen, nicht ein. Was nun die Identifizierung der auf den Gelatineplatten gewachsenen Kolonien betrifft, so wurden aus den Kulturen, insofern die Kolonienzahl 30 nicht überschritt, nur die Kolonien, die sich von vorneherein als nicht zur Coligruppe gehörend (verflüssigende, farbstoffbildende etc.) feststellen liessen, unberücksichtigt gelassen. Alle übrigen wurden zwecks Prüfung auf Zuckervergärung und Indolbildung in Dextrose- und Lactoseagar bezw. in Peptonwasser abgeimpft. Sehr oft fertigten wir sodann von einem Teil der Kolonien noch Grampräparate an. Jene Organismen, die die beiden Zuckerarten bei 37° vergoren, ferner Indol bildeten und sich als gramnegativ erwiesen, wurden als zur Coligruppe gehörend betrachtet. Wir haben im ganzen auf diese Weise von Gelatineplattenkulturen über 200 Kolonien geprüft (Mindestzahl einer Untersuchnng = 12; Max.: 40).

Von den Endoplatten (*Marmann*'sches Verdunstungsverfahren) wurden jeweilen 1—2 Kolonien von jedem rotwachsenden Typus, insofern es sich um gramnegative Stäbchen handelte, ebenfalls auf Vergärung von Dextrose und Lactose, Bildung von Indol und Wachstum auf Gelatineplatten untersucht. Es haben sich dabei sämtliche mit Metallglanz, und ferner die dunkelroten mehr oder weniger flach ausgebreiteten als typische Coli erwiesen. Aber auch von den Rosafärbung zeigenden Kolonien, die hier nur spärlich vorkamen und auch nicht bei jeder Probe vertreten waren, gehörte die Mehrzahl diesem Colitypus an.

Bei der Prüfung der Milchzuckeragarschüttelkulturen wurde jeweilen vom letzten Gasbildung zeigenden Röhrchen sowie gewöhnlich 1—2 weiteren dieser Reihe Präparate angefertigt, indem wir sie in hängenden Tropfen und nach *Gram* gefärbt untersuchten. Stets wurden dabei gramnegative

[1]) *Marmann.* Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des *Bact. coli* im Wasser, zugleich ein Beitrag zum Verhalten dieses Keimes in Flüssen und Schwimmbassins. Centralblatt f. Bact., I. Abt., 1909, Bd. L, S. 267.

Stäbchen angetroffen, auch im hängenden Tropfen waren immer die als Coli anzusprechenden Zellen nachzuweisen. Eine andere als durch *Bact. coli* hervorgerufene Gasbildung kam somit bei diesen Röhrchen nicht in Frage. Neben den Colibakterien fanden sich namentlich in den weniger grossen Verdünnungen *Bact. Güntheri* und Streptokokken (Gram +) ferner in vereinzelten Fällen längere grampositive Stäbchen, die vermutlich zur Gruppe der echten Milchsäurelangstäbchen gehörten.

In der folgenden Tabelle III werden von den 10 Fäkalienaufschwemmungen neben der Keimzahl die Befunde über die Zahl der Colikolonien auf Gelatine- und Endoplatten, sowie das Verhalten der Milchzuckeragarschüttelkultur der 3 Verdünnungen einer Reihe, die für unsere Frage Interesse bieten, wiedergegeben. Ein Blick auf diese Zusammenstellung zeigt, dass bei der Mehrzahl der Proben Keimzahl und Colizahl annähernd übereinstimmen. Was nun zunächst die nach den beiden Plattenverfahren erhaltenen Coliwerte anbetrifft, so geht aus der Uebersicht hervor, dass sie bei den Gelatinekulturen im allgemeinen höher ausfielen. In einigen Fällen, wie z. B. bei Probe 1 (Verdünnung $^1/_{10\,000}$), 5 (Verdünnung $^1/_{10\,000}$) und 9 (Verdünnung $^1/_{\text{Mill.}}$) war hier der Coliwert ein ganz erheblich grösserer. Bei coliarmen Wässern besteht demnach die Möglichkeit, dass das *Marmann*'sche Verdunstungsverfahren versagt.

Vergleicht man nun die Colizahlen und das Verhalten der Milchzuckeragarschüttelkulturen miteinander, so zeigt sich, dass auch die nach den Ergebnissen der beiden Plattenverfahren nur mehr vereinzelte Colikeime enthaltenden Proben *stets* innerhalb 24 resp. 48 Stunden Gasentwicklung hervorriefen. Damit charakterisiert sich die Milchzuckeragarhoheschichtkultur als sehr empfindlich zum Nachweise von *Bact. coli.*

3. *Ergebnisse einer Anzahl von Wasseruntersuchungen.*

Anlässlich einer systematischen Prüfung des Einflusses der Burgdorfer-Abwässer auf den Mühlebach war uns Gelegenheit geboten, Wasserproben von sehr verschiedener Beschaffenheit bakteriologisch näher zu verfolgen. Hierbei haben wir gelegentlich die Menge der Colibakterien nach dem *Marmann*'schen Verdunstungsverfahren und mittelst der Milchzuckeragarschüttelkultur bestimmt.

Die diesbezüglichen Befunde finden sich in Tabelle IV zusammengestellt.

Die Identifizierung der auf den Endoplatten (*Marmann*'sches Verfahren) gewachsenen Kolonietypen war wieder in der früher schon beschriebenen Weise vorgenommen worden. Auch bei diesen Untersuchungen haben sich die Fuchsinglanzkolonien als typische Coli erwiesen, während die dunkelroten ohne Metallglanz öfters und die rosa Kolonien in der überwiegenden Zahl nicht dieser Gruppe angehörten. Nach *Marmann* [1]) sollen einzig die mit Metallglanz wachsenden Typen als Coli gezählt werden, was, auf unsere

[1]) L. c.

Tabelle III.

Mit Fäkalien beschmutztes Wasser	Keimzahl pro cm³	Verdünnungen	Zahl der Colikolonien		Verhalten der Milchzuckeragarschüttelkulturen
			Gelatineplatten	*Marmann*'sches Verdunstungsverfahren	
Probe 1	400 000	1/10 000	25	9	Zahlreiche Gasblasen
		1/100 000	3	2	Vereinzelte Gasblasen
		1/Mill.	0	0	Steril
Probe 2	4 000 000	1/100 000	31	22	Agarzylinder dicht von Gasblasen durchsetzt
		1/Mill.	4	0	Agarzylinder von zahlreichen Gasblasen durchsetzt
		1/10 Mill.	0	0	Steril
Probe 3	11 000 000	1/100 000	72	114	Agarzylinder in Stücke zerrissen
		1/Mill.	9	4	Agarzylinder von zahlreichen Gasblasen durchsetzt
		1/10 Mill.	0	0	Vereinzelte Gasblasen
Probe 4	45 000 000	1/100 000	zu zahlreich	zu zahlreich	Agarzylinder zerrissen
		1/Mill.	42	48	Agarzylinder dicht von Gasblasen durchsetzt
		1/10 Mill.	3	0	Agarzylinder von zahlreichen Gasblasen durchsetzt
Probe 5	700 000	1/10 000	35	16	Agarzylinder dicht von Gasblasen durchsetzt
		1/100 000	4	3	Agarzylinder zeigt 2 Gasblasen
		1/Mill.	0	0	Keine Gasbildung
Probe 6	2 500 000	1/100 000	14	12	Agarzylinder von zahlreichen Gasblasen durchsetzt
		1/Mill.	2	0	Vereinzelte Gasblasen
		1/10 Mill.	0	0	Keine Gasbildung
Probe 7	40 000 000	1/100 000	96	87	Agarzylinder zerrissen
		1/Mill.	15	8	Agarzylinder zeigt zahlreiche Gasblasen
		1/10 Mill.	4	0	Keine Gasbildung
Probe 8	17 000	1/100	24	—	Agarzylinder von einigen Gasblasen durchsetzt
		1/1000	0	2	Agarzylinder zeigt wenige Gasblasen
		1/10 000	0	0	Keine Gasbildung
Probe 9	87 000 000	1/100 000	zu zahlreich	zu zahlreich	Agarzylinder zerrissen
		1/Mill.	82	22	Agarzylinder von Rissen und Gasblasen durchsetzt
		1/10 Mill.	8	—	Agarzylinder von einigen Gasblasen durchsetzt
Probe 10	60 000 000	1/100 000	zu zahlreich	zu zahlreich	Agarzylinder in Stücke zerrissen
		1/Mill.	48	38	Agarzylinder zerrissen
		1/10 Mill.	6	—	Agarzylinder von einigen Gasblasen durchsetzt

Tabelle IV.

Laufende Nr.	Herkunft der Wasserprobe	Zeit der Entnahme	Keimzahl pro cm³	Zahl der Colikolonien nach dem *Marmann*'schen Verdunstungsverfahren			
				Aussaatmenge			
				1 cm³	1/10 cm³	1/100 cm³	1/1000 cm³
1	Emmefluss, oberhalb Burgdorf	26. V. 15	910	11	1	0	0
2	Mühlebach, nach Verunreinigung mit einem Teil der Burgdorfer-Abwässer	26. V. 15	20000	nicht feststellbar	nicht feststellbar	10	0
3	Mühlebach, nach Verunreinigung mit sämtlichen Burgdorfer-Abwässern	26. V. 15	17000	nicht feststellbar	nicht feststellbar	10	0
4	Mühlebach, ca. 2700 m unterhalb Burgdorf	26. V. 15	21000	nicht feststellbar	nicht feststellbar	9	0
5	Mühlebach, ca. 3800 m unterhalb Burgdorf	26. V. 15	13000	nicht feststellbar	nicht feststellbar	10	0
6	Mühlebach, ca. 4300 m unterhalb Burgdorf	26. V. 15	26000	—	nicht feststellbar	27	—
7	Brunnenstube der alten Wasserversorgung von Kirchberg	26. V. 15	10	0	0	—	—
8	Emmefluss, oberhalb Burgdorf	12. VII. 15	3200	5	0	0	—
9	Waschhäuslibach, ca. 5 m oberhalb seiner Vereinigung mit dem Mühlebach	12. VII. 15	130000	—	—	13	0
10	Mühlebach, bei Eintritt in das Burgdorfer-Stadtgebiet	12. VII. 15	12000	—	—	5	0
11	Mühlebach, ca. 1900 m unterhalb Burgdorf	12. VII. 15	44000	—	—	21	2
12	Mühlebach, ca. 2000 m unterhalb Burgdorf, unterhalb der Einmünd. des neuen Kanales	12. VII. 15	67000	—	—	29	0
13	Mühlebach, ca. 2700 m unterhalb Burgdorf	12. VII. 15	59000	—	—	39	0
14	Mühlebach, ca. 3800 m unterhalb Burgdorf	12. VII. 15	70500	—	—	42	3
15	Mühlebach, ca. 4300 m unterhalb Burgdorf	12. VII. 15	280000	—	—	ca. 100	6
16	Brunnenstube der alten Wasserversorgung von Kirchberg	12. VII. 15	700	10	0	—	—

Gasbildung und Zahl der Colikolonien bei der Milchzuckeragarschüttelkultur				Es fanden sich Colikeime in cm³	
Aussaatmengen				bei dem Verdunstungsverfahren	bei der Milchzuckeragarschüttelkultur
1 cm³	1/10 cm³	1/100 cm³	1/1000 cm³		
Agarzylinder mit einigen Gasblasen	Vereinzelte Gasblasen; 1 Kol.	0	0	10—11	10
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen; 20 Kol.	0	1000	2000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder gehoben; vereinzelte Gasblasen	0	1000	100—900
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zeigt einige Gasblasen; 1 Kol.	900	1000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen; 7 Kol.	0	1000	700
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder mit einigen Rissen	Agarzylinder gehoben und von Gasblasen durchsetzt; 4 Kol.	2700	4000
Kein Wachstum	Kein Wachstum	—	—	0	0
Agarzylinder von Gasblasen durchsetzt	Agarzylinder von Gasblasen durchsetzt	0	0	5	10—90
Agarzylinder in kl. Stücke zerrissen	Agarzylinder in kl. Stücke zerrissen	Agarzylinder in Stücke zerrissen	Agarzylinder von Gasblasen durchsetzt; 2 Kol.	1300	2000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	0	500	100—900
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zeigt einige Gasblasen; 2 Kol.	2000—2100	2000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder mit einigen Gasblasen; 3 Kol.	2900	3000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen; ca. 20 Kol.	0	3900	ca. 2000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder mit mehreren Gasblasen durchsetzt; 8 Kol.	3000—4200	8000
Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen: Kol. ?	0	6000	100—900
Agarzylinder zerrissen Kolonienzahl ?	0	0	0	10	1—9

Untersuchungen angewendet, bei verschiedenen Proben eine zu niedrige Colizahl ergeben hätte. Die gleiche Beobachtung, dass noch zuweilen nicht Fuchsinglanz zeigende Kolonien doch den typischen Coli angehören, hat auch *Sulzer* [1]) gemacht.

Bei der Ermittlung der Resultate der Milchzuckeragarschüttelkulturen gingen wir in folgender Weise vor. Nach 24- resp. 48stündiger Bebrütung bei 37° wurden die Röhrchen kontrolliert und bei dem letzten Gärung zeigenden einer Reihe, insofern es möglich war, die einzelnen Kolonien, welche als Gasbildner sich äusserten, gezählt. Stimmte die Zahl der gasbildenden Kolonien der Schüttelkultur mit der Colizahl nach dem Verdunstungsverfahren überein, so beschränkte sich die weitere Untersuchung dieser Kolonien (der Schüttelkultur) auf die Feststellung ihres mikroskopischen Befundes, was an Hand von Präparaten im hängenden Tropfen und nach *Gram* gefärbt erfolgte. Bei einigen der Kulturen war indessen die Gasbildung in diesem Zeitpunkte bereits so weit vorgeschritten, dass eine genaue Ermittlung jener Kolonien, welche die Gärung hervorgerufen hatten, nicht mehr möglich war. Wir haben in diesen Fällen den Coligehalt in analoger Weise bestimmt, wie dies bei der Feststellung des Colititers nach *Petruschki* und *Pusch* geschieht.

In den letzten beiden Kolonnen der Tabelle IV findet sich die einerseits nach dem *Marmann*'schen Verdunstungsverfahren und anderseits mittelst der Milchzuckeragarschüttelkultur festgestellte Anzahl von Colikeimen pro cm^3 Wasser. Von den 16 Wasserproben stimmen bei 8 die Resultate sozusagen überein, bei 5 hat die Milchzuckeragarschüttelkultur höhere Werte ergeben, während bei 2 Proben die Colizahl nach dem *Marmann*'schen Verfahren grösser ausfiel. Sehr beträchtlich ist der Unterschied bei einer Probe, Nr. 15, bei welcher im cm^3 nach dem Verdunstungsverfahren 6000, mit der Schüttelkultur (Gasbildung mit $^1/_{100}$ cm^3) 100—900 Colikeime ermittelt wurden. Die grosse Differenz der beiden Befunde legt ohne weiteres den Gedanken nahe, dass diese nicht durch die Verschiedenheit der Kulturverfahren bedingt sein kann. Die betreffende Wasserprobe war sehr stark mit erdigen Bestandteilen verunreinigt, welches Moment eine gleichmässige Verteilung der Keime ausschliesst, da dieselben in ausserordentlich variierender Zahl an den Flöckchen haften können und ein zufälliges Hineingelangen eines solchen Partikelchens in das Aussaatmaterial zu ganz abnormen Resultaten führen kann.

Die Zahlenergebnisse der beiden Verfahren dürfen als gut übereinstimmend bezeichnet werden, wenn wir in Betracht ziehen, dass es bei dem colireichen Material fast ausnahmslos notwendig war, mit Verdünnungen zu arbeiten, deren Keimzahl dann durch entsprechende Multiplikation zur Feststellung der Colizahl im cm^3 des Ausgangsmaterials dient, wobei natürlich auch eventuell durch Zufälligkeiten bedingte Versuchsfehler eine entsprechende Vergrösserung erfahren. Da die Agarschüttelkultur bei 5 von 16 Wasser-

[1]) *Sulzer W.*: Die Frage des Colinachweises in Oberflächenwässern unter besonderer Berücksichtigung neuerer Methoden. Zürich, 1913.

proben höhere Coliwerte ergab, so spricht das dafür, dass diese Methode zum mindesten ebenso empfindlich ist, wie das Verdunstungsverfahren.

Wir haben in der Folge bei einer grösseren Zahl von Wasseruntersuchungen den Coligehalt mittelst der Milchzuckeragarschüttelkultur bestimmt, wobei jeweilen die Gärungserreger aus dem mit der kleinsten Aussaatmenge beschickten Röhrchen mit Hilfe von Endo- oder Gelatineplatten isoliert und auf ihre Colizugehörigkeit geprüft wurden. Stets konnten Vertreter des *Bact. coli* angetroffen werden, indessen kam es gelegentlich vor, dass dieselben das Indolbildungsvermögen vermissen liessen; diese letztern Typen gehörten also nicht dem eigentlichen Fäkalcoli an. Anderweitige, nicht der Coliaërogenesgruppe zuzuzählende Keimarten, wie z. B. Buttersäureorganismen, denen durch dieses Kulturverfahren (Anaërebiose) ebenfalls zusagende Entwicklungsbedingungen geboten sind, haben wir niemals angetroffen.

C. Zur Methodik des Milchzuckeragarschüttelkulturverfahrens.

Bei dem quantitativen Nachweis von *Bact. coli* mittelst Milchzuckeragar in hoher Schicht (Schüttelkultur) wird, je nachdem die Colizahl oder der sogenannte Colititer zu bestimmen ist, von der Gasbildung zeigenden Kolonie oder Kultur ausgegangen. Die Ermittlung der Colizahl setzt nun das Vorhandensein einer Kultur voraus, in welcher dieser Organismus in beschränkter Zahl vertreten ist, weil bei den dicht besäeten Röhrchen die Gasbildung gewöhnlich einsetzt, bevor makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet sind und eine Zählung derselben auf Schwierigkeiten stösst. Kulturen, bei denen die Zahl der Gasbildung zeigenden Kolonien 20 übersteigt, dürften sich im allgemeinen für diesen Zweck nicht mehr eignen. Wird daher im Aussaatmaterial eine grössere als diese Menge vermutet, so sind Verdünnungen zu verwenden. Bei Kenntnis der Herkunft des Wassers wird man im allgemeinen mit zwei, höchstens drei auskommen.

Bei coliarmen Wässern kann die Verimpfung einer grösseren Menge von Aussaatmaterial nötig werden, wobei zu bemerken ist, dass gleiche Teile von Nähragar und Impfflüssigkeit nach dem Erstarren eine für weitere Verarbeitung noch genügend feste Gallerte bilden.

Das Wachstum der Colikeime in der Agarhoheschichtkultur bei 37° ist ein rasches, so dass ihre in Form verdickter, glattrandiger Linsen auftretenden Kolonien sich meist schon durch die Grösse von anderen Keimarten unterscheiden lassen.[1]) Nach 12stündiger Bebrütung, selten früher, beginnt bei den nicht zu dicht besäeten Kulturen die Gasbildung,[2]) wobei direkt an der Kolonie oder in unmittelbarer Nähe eine kleine Gasblase gebildet wird, die sich nach und nach vergrössert. Je nach der Intensität der Gasentwicklung und Lage der Gasblasen kann indessen nach einiger Zeit eine Vereinigung

[1]) Auch werden durch dieses Verfahren die nur aërob wachsenden Arten, die im Wasser in grosser Menge vertreten sein können, ausgeschaltet.

[2]) Bei Anwesenheit zahlreicher Colikeime ist nach dieser Zeit der Agarzylinder gewöhnlich in Stücke zerrissen.

von zwei oder mehreren erfolgen. Um die genaue Zahl der Gasbildung zeigenden Kolonien zu ermitteln, ist es daher angezeigt, die Kulturen während der Bebrütungszeit einige Male zu kontrollieren. Bezüglich der Frage über die Dauer der Aufstellung der Kulturen bei 37° ist zu bemerken, dass mitunter bei vereinzelten Colikolonien die Gasbildung erst nach 24 Stunden erfolgt, weshalb es sich empfiehlt, die Bebrütung auf 36 Stunden auszudehnen.

Zur endgültigen Entscheidung der Frage, ob die als gasbildend ermittelten Kolonien dem *Bact. coli* angehören, genügt im allgemeinen ihre mikroskopische Prüfung (hängender Tropfen und Grampräparat) und die Feststellung ihres kulturellen Verhaltens im Gelatinestich resp. auf Gelatineplatten.

Insofern es sich um die Bestimmung der Colizahl handelt, wobei Einzelkolonien weiter zu verarbeiten sind, so werden an Stelle der gewöhnlichen Reagensgläser als Kulturgefässe zweckmässig die sog. *Burri*'schen Röhren [1]) verwendet.

Bei Trinkwasseruntersuchungen ist nun gewöhnlich die Frage zu entscheiden, ob in einer bestimmten Wassermenge, z. B. 10, 5, 1, 0,1 cm^3 noch Colikeime vorkommen, d. h. der Colititer zu bestimmen. Er wird in analoger Weise festgestellt wie bei flüssigen Nährmedien und zwar auf Grund des letzten noch Gärung zeigenden Röhrchens einer Verdünnungsreihe. In diesem Falle erübrigt sich die bakteriologische Diagnose der einzelnen Kolonien der Gasbildung aufweisenden Kultur und es genügt die Untersuchung der aus dem Agarzylinder ausgepressten Flüssigkeit (sog. Kondenswasser). Dabe erfüllen auch die gewöhnlichen Reagensgläser ihren Zweck.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass die Milchzuckeragarschüttelkultur zum Zwecke des Nachweises von *Bact. coli* in Wässern als ebenso empfindlich gelten darf wie die Milchzuckerbouillonkultur. Gegenüber diesem letzteren Verfahren bietet sie zudem folgende Vorteile:

a) Infolge der Benützung eines festen Nährmediums in hoher Schicht bleiben die durch die Zuckervergärung auftretenden Gasblasen im Nährbodenzylinder gefangen oder bedingen ein Zerreissen desselben, wodurch ein Uebersehen der Gasbildung ausgeschlossen ist.

b) Sie ermöglicht eine direkte Ermittlung der Gärung zeigenden Kolonien und dadurch die Feststellung der Colizahl.

Als weitere Vorzüge dieses Verfahrens, z. B. gegenüber der Verdunstungsmethode, sind noch zu erwähnen die geringen Anforderungen, welche an die Technik der Nährbodenbereitung gestellt werden und, was besonders für jene Laboratorien, die nicht so häufig in die Lage kommen, Wasseruntersuchungen auszuführen, in Betracht fällt, die Möglichkeit einer längeren Aufbewahrung des fertigen Nährmediums, ohne dass eine Abnahme seiner Leistungsfähigkeit zu befürchten ist.

[1]) *Burri R.*: Zur Isolierung der Anaëroben. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 1902, S. 533