

# Zur Methodik des Nachweises von Bact. coli im Wasser, unter spezieller Berücksichtigung der im Schweiz. Lebensmittelbuch aufgenommenen Verfahren

Autor(en): **Minder, Leo / Rieter, E.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **8 (1917)**

Heft 1

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-984293>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Zur Methodik des Nachweises von *Bact. coli* im Wasser, unter spezieller Berücksichtigung der im Schweiz. Lebensmittelbuch aufgenommenen Verfahren.

Von Dr. LEO MINDER.

(Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium der Stadt. Zürich,  
Vorstand: Stadtchemiker E. Rieter.)

Allen bis jetzt vorgeschlagenen Methoden zum Nachweis von *Bact. coli*, so zahlreich sie sind, haften noch verschiedene Mängel an. Es ist dies erklärlich, indem sowohl das Milieu, aus dem ein Mikroorganismus gezüchtet wird, wie die Anpassung an bestimmte Verhältnisse, gemeinübliche Eigenschaften unterdrücken, ebenso auch neue hervorbringen können. Dem Bakteriologen treten daher, von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet, grosse Hindernisse entgegen, präzise analytische Methoden auszuarbeiten.

Die erste und zweite Auflage des Schweiz. Lebensmittelbuches enthalten zwei Verfahren zum Nachweis von *Bact. coli* im Trinkwasser:

1. die Methode von *Freudenreich*;
2. die Methode von *Eijkman*.

In der neuen dritten Auflage ist die Methode von *Eijkman* weggelassen und an ihre Stelle

3. das Verfahren von *Thöni*<sup>1)</sup>  
aufgenommen worden.

Die Ueberlegungen, welche diesen elektiven Methoden zur Trennung und Charakterisierung von *Bact. coli* zu Grunde liegen, sind folgende:

## 1. Methode von *Freudenreich*.

Bei dieser wird als Nährsubstrat eine Milchzuckerpeptonlösung benutzt. *Bact. coli* bildet aus Zuckerarten Säure, ist daher gegen seine eigenen Stoffwechselprodukte (Säuren) weniger empfindlich. *Freudenreich* setzt also seiner Nährlösung als Hemmmittel für andere Wasserbakterien, welche grösstenteils ein schwach alkalisches Substrat bevorzugen, etwas Milchsäure zu. Die Bruttemperatur beträgt 37° C., also die optimale für *Bact. coli*. Sie hat zugleich den Vorzug, dass viele Wasserbakterien bei dieser Temperatur nicht mehr zu gedeihen vermögen.

## 2. Methode von *Eijkman*.

Nach dieser wird mit neutralem oder ganz schwach alkalischem Traubenzuckerpeptonwasser gearbeitet, und zwar bei einer Bruttemperatur von 46° C. Andere Wasserbakterien werden durch die hohe Temperatur in

<sup>1)</sup> *J. Thöni*: Der Nachweis von *Bact. coli* in Wasser mit Hilfe der Milchzuckerpepton-agarschüttelkultur. Diese Mitteilungen, 1916, 7, 125.

ihrem Wachstum zurückgehalten. *Eijkman* misst seiner Methode den Vorzug bei, dass mittels derselben harmlose Kaltblütlercolibakterien nicht zur Entwicklung gebracht werden können.

Beide oben beschriebene Methoden können mit einer vom Analytiker regulierbaren Annäherung quantitativ gestaltet werden.

Verimpft man abgestufte Wassermengen, z. B. 0,1, 1, 10, 100 cm<sup>3</sup> in ebenso viele Röhrrchen oder Kölbchen mit Nährflüssigkeit, so liefert das mit der geringsten Menge Wasser beschickte, noch Gasbildung oder Trübung zeigende Röhrrchen, den sog. *Colititer*.

Zeigen z. B. alle Röhrrchen von 1 cm<sup>3</sup> Wasser an aufwärts Bakterienwachstum resp. Gasbildung, dasjenige mit 0,1 cm<sup>3</sup> dagegen nicht mehr, so schliessen wir daraus, dass das zu prüfende Wasser mindestens 1, aber weniger als 10 Colibakterien in 1 cm<sup>3</sup> Wasser enthält.

### 3. Methode von Thöni.

Dieselbe verzichtet bei dem verwendeten Nährsubstrat auf den Zusatz einer für Nicht-Colibakterien entwicklungshemmenden Substanz. Das Substrat besteht aus neutralem Milchzuckerpeptonwasser, welches durch Agarzusatz versteift wird. Die Bruttemperatur beträgt 37° C. Die Beschickung der Agarröhrrchen mit Wasser erfolgt abgestuft nach Analogie des Verfahrens zur Auffindung des Colititers. *Thöni* erblickt in seiner Methode folgende Vorzüge:

1. Eine allfällige Gasbildung kann in dem festen Nährsubstrat nicht übersehen werden. Die Gasblasen werden vielmehr an Ort und Stelle fixiert.
2. Die Gasbildung zeigenden Kolonien können in den Röhrrchen mit der geeigneten Verdünnung direkt gezählt werden.

### Eigene vergleichende Versuche mit den verschiedenen Methoden.

Um die praktische Brauchbarkeit jeder dieser beschriebenen Methoden für sich und im Vergleich gegen andere zu erproben, wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

- a) Parallelversuche der Titermethoden von *Freudenreich* und *Eijkman* zum Vergleich mit den Ergebnissen des *Marmann'schen* Verdunstungsverfahrens<sup>1)</sup>.
- b) Diagnostizierung einer Anzahl der auf *Endoagarplatten* nach dem Verdunstungsverfahren ausgewachsenen Kolonien.
- c) Vergleichende Untersuchungen des Titerverfahrens nach *Freudenreich* mit dem Verfahren von *Thöni*.

Wir haben zu unseren Versuchen das aus 30 Metern Tiefe heraufgepumpte Zürichseewasser, welches zur Speisung der Filteranlagen der

<sup>1)</sup> *Marmann*: Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des *Bact. coli* im Wasser, etc. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., 1909, Bd. L, S. 267.



Züricher Trinkwasserversorgung dient, gewählt. Dieses Wasser darf in bakteriologischer Hinsicht als Typus eines leicht bis mässig verunreinigten Oberflächenwassers gelten.

Das *Marmann'sche* Verdunstungsverfahren ist im Prinzip einfach. In einer Petrischale, die mit einem festen Spezialnährboden zur Erkennung von *Bact. coli* beschickt ist, wird eine bestimmte Wassermenge in einem geeigneten Apparate, in welchem die Temperatur nicht über ca. 35° C. steigen darf, zur Verdunstung gebracht. Colikeime werden dadurch auf der Oberfläche des Nährbodens fixiert und können bei Bruttemperatur zu leicht erkennbaren Kolonien auswachsen.

Als Nährsubstrate kommen bis jetzt in erster Linie zur Verwendung: der *Endo'sche* Fuchsinulfitagar und der Lackmus-Laktoseagar von *Drigalski-Conradi*. Sowohl die Einfachheit der Herstellung, wie auch die guten Resultate bei der Anwendung haben uns bestimmt, dem *Endo*agar den Vorzug zu geben.

Was die Zusätze bei der Herstellung desselben anbetrifft, haben wir uns an die Originalvorschrift von *Endo* und die Ergänzungen von *P. Klinger*<sup>1)</sup> gehalten. Die Herstellung geschah demnach in folgender Weise:

In einem Kolben mit 250 cm<sup>3</sup> Wasser werden 15 g Agar einige Stunden quellen gelassen und dieser dann während 45 Minuten bei  $\frac{3}{4}$  Atmosphären Druck in den Autoklaven gestellt. Inzwischen werden in einem zweiten Kolben zu weiteren 250 cm<sup>3</sup> Wasser 5 g Liebig's Fleischextrakt, 5 g Pepton, 2,5 g Kochsalz und 10 g Milchzucker gesetzt und auf dem Wasserbad zur Lösung gebracht. Beide Lösungen werden nun zusammengossen, gut durchmischt, neutralisiert und mit 5 cm<sup>3</sup> einer 10%igen Sodalösung (Calc. Soda) versetzt. Dann wird durch ein Faltenfilter im Heisswassertrichter filtriert und das Filtrat auf 500 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Alsdann gibt man weiter hinzu: 2,5 cm<sup>3</sup> einer konzentrierten, alkoholischen Fuchsinlösung (10 g kristallisiertes Fuchsin werden mit 100 cm<sup>3</sup> 96%igem Alkohol genau 20 Stunden stehen gelassen, hierauf die Lösung abgegossen und filtriert), ferner 12,5 cm<sup>3</sup> einer 10%igen Lösung von nicht verwittertem Natriumsulfit (frisch bereitet).

Das fertige Substrat soll in der Kälte farblos bis leicht rosa gefärbt sein. Es wird zu ca. 10 cm<sup>3</sup> in Reagensgläser, oder wenn für eine längere Aufbewahrung bestimmt, in sterile Erlenmeyerkölbchen abgefüllt. Hierauf erfolgt während 30 Minuten die Sterilisation im Dampftopf.

Bei stark verunreinigtem Wasser genügt es, auf die frisch gegossene und im Brutschrank mit abgehobenem Deckel vorgetrocknete Petrischale 1 cm<sup>3</sup> oder noch weniger Wasser gleichmässig zu verteilen. Die Eindunstung kann dann im Brutschrank vorgenommen werden. Zur Untersuchung von wenig verunreinigtem Wasser muss eine verhältnismässig grosse Wassermenge verarbeitet werden; wir haben bei unseren Versuchen gewöhnlich 10 cm<sup>3</sup> eingedunstet. Zur möglichst raschen Eindunstung einer solchen

<sup>1)</sup> *P. Klinger*: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 24, S. 35.

Wassermenge ist aber ein spezieller Apparat erforderlich, z. B. ein Serum-eindunstungsapparat, wie solche in grösseren bakteriologischen Laboratorien zur Verfügung stehen. In Ermangelung eines derartigen oder ähnlichen Apparates haben wir uns mit relativ einfachen Mitteln eine Einrichtung konstruiert, die ihren Zweck vollauf erfüllt hat, nämlich: Bei einer Turbinenzentrifuge wurde die Zentrifugenschüssel entfernt und an deren Stelle der Deckel eines zylindrischen Blechkastens von ca. 30 cm Durchmesser und 45 cm Höhe (grösse Blechbüchse) zentrisch verschraubt. Dieser Deckel, nun Boden des Apparates, erhält ein nicht zu kleines seitliches Loch, das zum Durchlassen einer Bunsenflamme dient. An Stelle der Zentrifugenhülsen wird mit der Turbinenachse ein Blechventilator (radial geschlitztes Blech) verbunden, dessen Durchmesser nahezu demjenigen des Kastens entspricht. Der Oberteil des Kastens erhält 2—4 grössere Löcher, welche dem Luftaustritt dienen. Der Apparat ist so gebrauchsfertig und wird in der folgenden Weise praktisch verwendet:

2—3 Petrischalen werden auf den Boden des Apparates gebracht und dort mit ca. 10 cm verflüssigtem Endoagar beschickt. Sobald der Agar erstarrt ist, wird die Flamme des Bunsenbrenners angezündet, der Kasten darüber gestülpt und der nun auf etwa halber Höhe desselben sitzende Ventilator in Rotation versetzt. Vorher hat man durch Ausprobieren die Flamme ein für allemal so gestellt, dass die Temperatur im Kasteninnern ca. 35° C. nicht übersteigt, was durch in seitliche Löcher eingesetzte Thermometer, oder noch besser durch kleine Maximathermometer, welche in Petrischalen gelegt werden, geschehen kann. Nun werden die Agarplatten vortrocknet, aber nur so weit, dass der Nährboden nicht rissig wird. Ist dies geschehen, so erfolgt die Beschickung mit dem zu untersuchenden Wasser mittels steriler Pipetten. Es ist von Vorteil, die einmal gegossenen Platten nicht mehr von der Stelle zu rücken, damit die Oberfläche des Substrates genau einnivelliert bleibt.

Mit einem derartigen Apparate gelang es, 10 cm<sup>3</sup> Wasser in ca. 40 Minuten völlig einzudampfen. Die Platten werden dann in den Brutschrank (37° C.) gelegt. Das Auszählen der entwickelten Kolonien erfolgt am besten erstmals nach 24 Stunden, nach 48 Stunden wird eine Nachzählung vorgenommen.

Die Säurebildner nun, worunter Colibakterien, vermögen auf dem farblosen *Endoagar* das Fuchsin vom Sulfit zu trennen und wachsen daher zu leicht bis intensiv roten Kolonien aus. Den Colibakterien kommt zudem die Merkwürdigkeit zu, dass die Kolonien oft einen metallischen Fuchsinglanz erhalten. Ein Hauptübelstand liegt bei diesem Nährboden darin, dass tiefrote bis blassrote Kolonien den Colibakterien zugehören können, während umgekehrt auch einzelne andere Bakterien tiefrot auswachsen. Doch wird es dem geübten Beobachter bald gelingen, Colikolonien von denen anderer Bakterien zu unterscheiden. Der Prozentsatz der zweifelhaften Kolonien ist im allgemeinen nicht gross.



In der folgenden Tabelle I haben wir eine Serie unserer vergleichenden Untersuchungen nach dem *Marmann'schen* Verdunstungsverfahren, den Titermethoden von *Freudenreich* und *Eijkman* zusammengestellt. Zur weiteren Orientierung sind auch die am 5. Tag gezählten Keimzahlen beigegeben. Der leichteren Uebersicht wegen sind alle Colizahlen auf 20 cm<sup>3</sup> Wasser umgerechnet. Zudem haben wir nicht die Höhe des Colititers, sondern die aus den Titerzahlen sich ergebenden Minimalzahlen von Colibakterien in 20 cm<sup>3</sup> Wasser angegeben. Die Colizahlen nach dem Verdunstungsverfahren sowie die Colititerzahlen sind immer nach 48 Stunden erhalten.

Tabelle I.<sup>1)</sup>

Keimzahl	Kolonien nach dem Verdunstungsverfahren			Colizahl nach Freudenreich	Colizahl nach Eijkman	Keimzahl	Kolonien nach dem Verdunstungsverfahren			Colizahl nach Freudenreich	Colizahl nach Eijkman
	Fuchsinglänzende	rot	Fuchsinglänzende + rot				Fuchsinglänzende	rot	Fuchsinglänzende + rot		
335	—	—	20	10	1	1500	8	24	32	10	20
207	—	—	6	1	—	1660	4	22	26	20	20
237	—	—	12	1	weniger als 1	1380	0	20	20	20	20
183	8	4	12	20	2	6610	12	6	18	10	20
194	4	4	8	1	1	—	4	4	8	20	10
443	4	0	4	2	1	670	2	2	4	10	10
191	0	20	20	10	4	3180	16	2	18	200	weniger als 2
5070	32	8	40	20	20	2150	4	2	6	10	4
1807	4	12	16	20	10	780	2	4	6	10	weniger als 2
1620	24	0	24	20	20	6580	4	2	6	20	10
640	6	0	6	10	4	2220	2	2	4	10	20
1910	28	24	52	10	20	2040	2	0	2	20	10
1740	16	16	32	10	20	1320	4	0	4	10	4
1390	10	14	24	200	20	1170	0	2	2	10	20
1560	18	24	42	10	20	1420	2	2	4	4	4
1200	10	22	32	20	20	1590	2	4	6	10	—
3260	32	20	52	20	20	1020	4	8	12	10	—
1560	2	4	6	10	200	620	2	2	10	10	—
2600	10	22	32	10	10	680	6	0	6	20	—
2230	2	16	18	10	10	330	4	0	4	4	—
1710	2	18	20	20	20	527	4	0	4	4	4
1490	4	20	24	200	10	1367	2	2	4	2	weniger als 1
2290	8	40	48	10	20						

Die Zahlen der fuchsinglänzenden und roten Kolonien nach dem *Marmann'schen* Verdunstungsverfahren sind getrennt, sowie summiert rubriziert.

Da uns nun die nach dem *Marmann'schen* Verdunstungsverfahren erhaltenen Colizahlen das Kriterium zur Bewertung der Titerverfahren liefern sollen, müssen wir vorerst feststellen, wie viele von den fuchsinglänzenden bzw. roten Kolonien mit grosser Wahrscheinlichkeit Colibakterien waren.

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen erstreckten sich in ziemlich regelmässigen Zeitabständen vom 26. Oktober 1914 bis 10. Mai 1915.

*Sulzer* <sup>1)</sup> kam bei seinen eingehenden Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen:

	Typ. Coli	Atyp. Coli	Keine Coli
	%	%	%
Von den Kolonien mit Fuchsinglanz waren	96,7	1,5	1,8
» » » ohne » »	72,9	5,1	22,0
» » » mit Rosafärbung »	11,3	2,3	86,4
» » » ohne » »	0	0	100

Nach diesen Resultaten kommt man also der tatsächlichen Colizahl am nächsten, wenn fuchsinglänzende und tiefrote Kolonien gezählt werden, was übrigens auch von *Oettinger* <sup>2)</sup> konstatiert worden ist.

Ohne alle zur Verfügung stehenden Methoden zur Diagnostizierung von *Bact. coli* angewendet zu haben, haben wir jeweilen einige fuchsinglänzende und tiefrote Kolonien von den *Marmann'schen* Platten abgeimpft und folgende Prüfungen vorgenommen:

Verhalten in bezug auf:

- a) Zuckervergährungsvermögen in *Freudenreich'scher* Nährlösung bei 37° C.
- b) Zuckervergährungsvermögen in *Eijkman'scher* Nährlösung bei 46° C.
- c) Form und Färbbarkeit nach *Gram*.
- d) Beweglichkeit im hängenden Tropfen.

Die Resultate dieser Prüfungen waren:

- Von 70 fuchsinglänzenden Kolonien lieferten
- 60 Gas in *Freudenreich'scher* Nährlösung,
  - 10 Trübung in *Freudenreich'scher* Nährlösung,
  - 59 Gas in *Eijkman'scher* Nährlösung,
  - 11 Trübung in einzelnen Röhrrchen, in anderen trat kein Wachstum ein.

Auf Grund von 28 mikroskopischen Weiterprüfungen der Bakterien in den Gasbildung oder Trübung zeigenden Röhrrchen mit *Freudenreich'scher* Nährlösung erwiesen sich alle als Gramnegativ und beweglich. Morphologisch: plumpe Kurzstäbchen.

Ein anderes Verhalten zeigten 43 rote (tiefrote) Kolonien. Von diesen lieferten:

- 10 Gas in *Freudenreich'scher* Nährlösung,
- 33 Trübung in *Freudenreich'scher* Nährlösung,
- 8 Gas in *Eijkman'scher* Nährlösung,
- 35 Trübung in einzelnen Röhrrchen, in der Mehrzahl kein Wachstum.

<sup>1)</sup> *W. Sulzer*: «Zur Frage des Colinachweises in Oberflächenwässern». Dissertation. Zürich 1913.

<sup>2)</sup> *W. Oettinger*: «Die bakteriolog. Kontrolle von Sandfilteranlagen». Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, 1912, Bd. LXXI, S. 1.



Von 16, wie oben angegeben, mikroskopisch untersuchten Präparaten, waren 14 Gramnegativ und beweglich. Morphologisch: plumpe Kurzstäbchen. Einmal war die Gasbildung hervorgebracht durch Hefe, einmal die Trübung hervorgerufen durch Kokken.

Ohne diesen Stichproben eine grössere, als die ihnen zukommende Bedeutung beizumessen, dürfen wir sagen, dass sie die von den angeführten Autoren aufgefundenen Tatsachen, wenigstens was die fuchsinglänzenden Kolonien anbetrifft, bestätigen. Wenn z. B. von 70 fuchsinglänzenden Kolonien nur 60 in *Freudenreich'scher* Nährlösung Gas bildeten, so ist durchaus nicht etwa der Schluss gerechtfertigt, dass 85% typische, 15% atypische Coli waren. Denn einmal wirkt wahrscheinlich schon das Sulfit des *Endoagars* schädigend auf Colibakterien, zudem ist die in der *Freudenreich'schen* Lösung enthaltene Milchsäure mindestens keine auf *Bact. coli* vorteilhaft wirkende Substanz.

Wir konnten gelegentlich konstatieren, dass Bakterien einer fuchsinglänzenden Kolonie vorerst 24 Stunden in Nährbouillon gebracht, sich derart erholten, dass sie zu kräftigen Gasbildnern in *Freudenreich'scher* Nährlösung wurden, während direkte Ueberimpfung von derselben Kolonie entweder nur kümmerliche Gasbildung oder sogar nur Trübung erzeugte.

Aehnlich ist vielleicht das Verhalten der roten Kolonien zu interpretieren, obwohl uns nicht entgehen darf, dass darunter die Zahl der zuckervergärenden Organismen in *Freudenreich'scher* Nährlösung relativ gering ist. Wir können also aus diesen Befunden nur die Möglichkeit ableiten, dass bei unseren Versuchen ein geringerer Prozentsatz der roten Kolonien zu den typischen Colibakterien zu zählen ist, wie Sulzer gefunden.

Wir können aber daran festhalten, dass fuchsinglänzende Kolonien auf der *Endoplatte* mit grosser Sicherheit zu den typischen Colibakterien gehören, tiefrote teilweise zu den typischen, teilweise zu den atypischen zu zählen sind. Praktisch wird man also fuchsinglänzende und tiefrote Kolonien zusammenzählen, wobei eine übergrosse Zahl tiefroter Kolonien im Verhältnis zu den fuchsinglänzenden möglicherweise noch ein Fingerzeig auf die Zahl der atypischen Kolonien und damit auf den Charakter der Verunreinigung des zu untersuchenden Wassers geben kann.

Vergleichen wir die Zahlen der nach dem *Marmann'schen* Verdunstungsverfahren gefundenen Kolonien (fuchsinglänzende plus rote) auf Tabelle I einerseits mit den Keimzahlen, andererseits mit den aus dem Colititer nach *Freudenreich* berechneten Zahlen, so ergibt sich in grossen Zügen eine gleichsinnige Schwankung aller drei Werte. Was uns besonders interessiert ist, dass hohen Colizahlen auf der *Endoplatte* fast ausnahmslos auch hohe Titerzahlen entsprechen. Wenn bisweilen die Zahlen auf der *Endoplatte* Werte erreichten, die bis zu 52 gehen, die Titerzahlen aber bei 10 und 20 stehen bleiben, so sind die Gründe dafür äussere. Zur Ermittlung des Colititers haben wir stets 0,1, 1, 2, 5, 10 und 20 cm<sup>3</sup> Wasser in die Röhren verimpft, wodurch der Intervall zwischen 0,1 und 1 beträchtlich wird.



Die im Schweiz. Lebensmittelbuch niedergelegten Methoden haben aber nicht den Sinn, zur wissenschaftlich präzisen Ausmittelung des Coligehaltes eines Trinkwassers zu dienen. Eine Methode ist für die Praxis der Wasseruntersuchung als brauchbar zu bezeichnen, sobald sie den Gehalt eines unreinigten Wassers an *Bact. coli* in dem Grade anzeigt, dass dasselbe als verdächtig erscheinen muss. Ziehen wir diesen Gesichtspunkt zur Beurteilung der Titermethoden heran, so ergibt die *Freudenreich'sche* Titermethode verglichen mit dem *Marmann'schen* Verdunstungsverfahren gute Resultate. Fast ausnahmslos, wenn das Verdunstungsverfahren Zahlen liefert, die ungefähr einem oder mehr Colibakterien im  $\text{cm}^3$  Wasser entsprechen, zeigte auch der Titer 0,5 bis 1 oder mehr Coli im  $\text{cm}^3$  an.

*Wir schliessen daraus, dass das Marmann'sche Verdunstungsverfahren die Mengen der Colibakterien im Wasser naturgemässer wiedergibt, der Colititer in Freudenreich'scher Nährlösung aber zur Beurteilung desselben in praktischer Hinsicht gute Resultate liefert.*

In der Neuauflage des Schweiz. Lebensmittelbuches wird im Kapitel «Wasser» als typisch für *Bact. coli* im engeren Sinne (Darmcoli) die Indolbildung angesehen. Ob mit Recht, möge vorläufig dahingestellt bleiben. Wir haben bei einer Anzahl Untersuchungen jeweils die titerbestimmenden Rörchen nach der Methode *Freudenreich* auf Indolbildung weitergeprüft. Von 19 Untersuchungen erhielten wir:

Indolbildung (meist nach 24 Stunden) in 18 Fällen;  
keine Indolbildung (nach 10 Tagen) in 1 Fall.

Wenn wir auf Tabelle I die Resultate der Titermethode nach *Freudenreich* mit denjenigen des *Eijkman'schen* Verfahrens vergleichen, so können wir sie als ordentlich übereinstimmend bezeichnen. Jedoch dürften eine Reihe in erster Linie rein praktische Erwägungen der *Freudenreich'schen* Methode den Vorzug sichern, nämlich:

1. Die *Eijkman'sche* Methode arbeitet bei einer Bruttemperatur von  $46^\circ \text{C}$ ., die auch von *Eijkman* selbst streng verlangt wird. Einige Grade über oder unter dieser Temperatur beeinträchtigen die Resultate bis zum völligen Misserfolg. Diese Temperatur ist nun nicht immer leicht bei Brutschränken, speziell wenn nicht sehr empfindliche Thermoregulatoren angebracht sind, einzuhalten; dies besonders bei den starken Tag- und Nachtschwankungen der Aussentemperatur im Frühjahr, Herbst und Winter.

2. Die *Freudenreich'sche* Methode zeigt den Titer gewöhnlich mit grosser Sicherheit an, d. h. wir haben in den fraglichen Rörchen meist deutliche Gasbildung und nur vereinzelt Trübung. Die für *Bact. coli* fakultative Eigenschaft des Gasbildens aus Zuckerarten ist bei der *Eijkman'schen* Methode sehr oft unterdrückt, und das Bakterienwachstum spärlich, beides wohl infolge der hohen Temperatur. Die Titerfeststellung wird dadurch bei der *Eijkman'schen* Methode erschwert.

Wichtig ist nun, ob der *Eijkman*'schen Methode vor der *Freudenreich*-schen darum der Vorzug zu geben sei, weil bei ihr die harmlosen Kaltblütlercolibakterien nicht zur Entwicklung gebracht werden.

Schon die in Tabelle I zusammengestellten Resultate lassen gewisse Schlussfolgerungen zu.

Wie früher bereits bemerkt, diene zu unseren Untersuchungen Seewasser, welches infolge seines reichen, tierischen Lebens in erster Linie als Träger von Kaltblütlercolibakterien in Betracht kommen muss. Die *Eijkman*'sche Methode zeigt aber im grossen und ganzen nicht weniger Colibakterien an als die *Freudenreich*'sche und das *Marmann*'sche Verdunstungsverfahren.

Um über diese Frage weiter Aufschluss zu erhalten, haben wir 10 Stämme von Kaltblütlercolibakterien aus Fischdärmen isoliert. Diese konnten weder nach *Freudenreich*, noch nach *Eijkman* zur Entwicklung gebracht werden.

Auf Grund unserer Ergebnisse dürfte also die *Eijkman*'sche Methode auch in dieser Hinsicht keinen Vorzug vor der *Freudenreich*'schen davontragen.

Das Verfahren von *Thöni* zur Ermittlung der Colizahl sucht gewissermassen die Vorzüge der Titermethoden mit dem *Marmann*'schen Verfahren zu vereinigen, indem das Wasser in das verflüssigte Nährsubstrat nach Analogie der Titermethode verimpft wird und zudem die Kolonien in dem erstarrten Nährsubstrat bei geeigneter Wahl der Verdünnung zählbar werden sollen. Ein besonderer Vorteil sieht *Thöni* ferner darin, dass entstandenes Gas in dem festen Substrat am Entweichen verhindert wird, somit nicht übersehen werden kann.

Eine Nachprüfung dieses Verfahrens schien uns um so mehr geboten, als *Thöni* selbst in seiner Publikation nur recht spärliche Belegezahlen über dessen Brauchbarkeit für *wenig verunreinigte Wässer*, also solche, die für Trinkzwecke in Frage kommen können, gibt.

Unseres Erachtens haften dem Verfahren von *Thöni* zum voraus prinzipielle Bedenken an. *Thöni* verwendet ein neutrales Nährsubstrat, also ein Substrat, in welchem bei der Temperatur von 37° C., wenn nicht alle, so doch eine Anzahl thermophiler Bakterien auswachsen und den Befund stören können.<sup>1)</sup> Würde in Trinkwässern im grossen und ganzen *Bact. coli* das vorherrschende thermophile Bakterium sein, so würde die Methode in dieser Hinsicht etwas gewinnen. Dies trifft nun aber nicht zu.

Bei 66 untersuchten Seewasserproben erhielten wir mit Hilfe des Thermophilititers und Colititers nach *Freudenreich*:

10 oder mehr Mal so viele thermophile Bakterien als Colibakterien in 19 Fällen.

5 mal mehr thermophile Bakterien in 18 Fällen.

3 mal mehr thermophile Bakterien in 18 Fällen.

Gleichviel thermophile Bakterien in 11 Fällen.

<sup>1)</sup> Anaerobe Verhältnisse herrschen aus dem auf S. 39 zu besprechenden Gründen im Substrat nicht.



Daraus folgt ohne weiteres, dass die Zahl der thermophilen Bakterien diejenige der Colibakterien gewöhnlich um ein Mehrfaches übertrifft, trotzdem unser Seewasser noch verhältnismässig arm an thermophilen Bakterien sein dürfte.

Die nächste Tabelle II gibt die Parallelversuche an, die wir mit der *Freudenreich'schen* Titermethode und dem Verfahren von *Thöni* erhielten. Zur Untersuchung gelangte ebenfalls Seewasser. Die Versuche erstreckten sich in regelmässigen Abständen vom 5. Juni bis 31. Juli 1916.

In der Tabelle ist die Höhe der Titer direkt angegeben, also nicht wie in der Tabelle I die Colizahl auf 20 cm<sup>3</sup> Wasser umgerechnet. Die Methodik richtete sich genau nach der Originalvorschrift von *Thöni*.

Es ist nun in erster Linie zu bemerken, dass uns das Auszählen der Kolonien, wie *Thöni* angibt, bei unsern Versuchen nie gelang. Entweder war die Gasbildung derart, dass überhaupt keine Kolonien zu sehen waren, oder dann entwickelten sie sich in grösserer Zahl ohne eine Spur von Gasbildung, sodass zum voraus die Diagnose auf Colikolonien wegfallen musste. Aus diesem Grunde ist in der Tabelle auch nur der zu vermutende Titer angegeben.

Die Tabelle lässt erkennen, dass die *Thöni'sche* Methode fast immer mehr Colibakterien anzeigt, als der Titer nach *Freudenreich*. Der Versuch, die nach dem *Thöni'schen* Verfahren erhaltenen Kolonien weiter zu prüfen, konnte aus den schon angeführten Gründen nicht ausgeführt werden. Doch scheint uns, nachdem wir uns über die Zuverlässigkeit der *Freudenreich'schen* Titermethode orientiert haben, das Vorhandensein von beträchtlich mehr Colibakterien, als die genannte Titermethode anzeigt, wenig wahrscheinlich.

Dem *Thöni'schen* Verfahren hängt im weitern noch ein praktischer Mangel an. Sobald nämlich grössere Wassermengen (10—20 cm<sup>3</sup>) verarbeitet werden müssen, so werden die Röhrchen sehr oft, wenn auch nur ganz kurze Zeit in den Brutschrank gestellt, schon derart mit einer Unzahl kleiner Gasblasen durchsetzt, dass das Substrat oft geradezu undurchsichtig wird. Es ist dies auf die aus dem Wasser austretenden Gase zurückzuführen. Gelegentlich konnten wir auch beobachten, dass eine grössere Menge dieser einzelnen Gasblasen sich zu grösseren vereinigten, sodass dann aus diesem Grunde schon das Urteil, ob Gasbildung durch Bakterien hervorgerufen, oder in der vorher angegebenen Weise entstanden, nicht klar beurteilt werden oder sogar zu Fehlschlüssen führen kann. Man könnte diesem Uebelstande allenfalls dadurch abhelfen, dass das zu untersuchende Wasser zuerst in den Brutschrank gestellt würde, um das gelöste Gas auszutreiben. Dies würde aber nicht nur eine Komplikation des Verfahrens bedeuten, sondern dieses mit einer weiteren Fehlerquelle belasten.

Auch kann von der Intensität der Gasbildung im *Thöni'schen* Nährsubstrat keineswegs annähernd auf grössere oder geringere Zahl von Gasbildnern geschlossen werden. Einmal konnten wir beobachten, dass eine noch kaum wahrnehmbare Kolonie zu unterst im Röhrchen den ganzen Agarzylinder vollständig zu zerreißen anfang und schliesslich zerriss.



Tabelle II.

Keimzahl am 5. Tag gez.:	Resultat nach:	Verhalten in der Milchzuckerpeptonagarschüttelkultur (Methode von Thöni)				Mutmass- licher Titer nach Thöni	Titer nach <i>Freuden- reich</i>
		Aussaattmengen					
		1 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	10 cm <sup>3</sup>	20 cm <sup>3</sup>		
435	24 Std.	0	0	0	unzählige Gasblasen	20	10
	48 »	0	0	unzählige Gasblasen	» »		
387	24 Std.	0	0	vereinzelte Gasblasen; kleine Kolonien	imoberen Teil d. Röhr- chens vereinz. Gas- blasen; Mitte grös- serer Gasblasenkom- plex	10	40
	48 »	0	vereinzelte Kolonien	wie vorher	wie vorher		
245	24 Std.	0	unzählige Gasblasen	viele Kolonien	unzählige Gasblasen; viele Kolonien	5 ?	über 40
	48 »	0	wie vorher	wie vorher	wie vorher		
400	24 Std.	0	0	0	0	10	40
	48 »	0	0	viele kleine Gasblasen; viele Kolonien	viele kleine Gasblasen; viele Kolonien		
225	24 Std.	0	viele kleine Gasblasen; viele Kolonien	viele kleine Gasblasen; viele Kolonien	viele kleine Gasblasen; viele Kolonien	5	20
	48 »	0	wie vorher	wie vorher	wie vorher		
630	24 Std.	0	Gasblasen	Gasblasen	Gasblasen	5	20
	48 »	Kolonien	Gasblasen u. Kolonien	Gasblasen u. Kolonien	Gasblasen u. Kolonien		
635	24 Std.	0	Gasblasen und viele Kolonien	Gasblasen und viele Kolonien	Gasblasen und viele Kolonien	1	20
	48 »	unzählige Gasblasen	unzählige Gasblasen	unzählige Gasblasen	unzählige Gasblasen		

472	24 Std. 48 »	mehrere Kolonien » »	Gasbl. u. viele Kolon. » » » »	Gasbl. u. viele Kolon. » » » »	Gasbl. u. viele Kolon. » » » »	5	20
257	24 Std. 48 »	0 0	Kolonien »	Gasblasen u. Kolonien » » »	Gasblasen u. Kolonien » » »	10	über 40
352	24 Std. 48 »	0 0	zahlreiche Kolonien » »	viele Gasblasen; zahl- reiche Kolonien viele Gasblasen; zahl- reiche Kolonien	viele Gasblasen; zahl- reiche Kolonien viele Gasblasen; zahl- reiche Kolonien	10	über 40
1012	24 Std. 48 »	0 0	0 0	unzählige Gasblasen » »	Agarzylinder zerrissen » »	10	20
720	24 Std. 48 »	0 0	ein Gasblasenkomplex viele Gasblasen	zahlreiche Gasblasen » »	Agarzylinder zerrissen » »	5	5
405	24 Std. 48 »	0 0	Kolonien »	Gasblasen u. Kolonien » » »	unzählige Gasblasen » »	10	10
300	24 Std. 48 »	Kolonien »	unzähl. Kol. u. Gasbl. » » » »	Kolonien u. Gasblasen Agarzylinder zerrissen	Agarzylinder zerrissen » »	5	10
220	24 Std. 48 »	0 0	0 0	unzählige Gasblasen » »	unzählige Gasblasen » »	10	10
250	24 Std. 48 »	0 0	0 0	0 0	Gasblasen Agarzylinder zerrissen	20	über 40
440	24 Std. 48 »	0 0	unzählige Gasblasen » »	unzählige Gasblasen » »	unzählige Gasblasen » »	5	40
290	24 Std. 48 »	0 0	0 0	ein Gasblasenkomplex Agarzylinder zerrissen	unzählige Gasblasen » »	10	20

Das Verfahren von *Thöni* hat uns also bei unseren Versuchen mit wenig verunreinigtem Oberflächenwasser nicht befriedigt. Es haften ihm zum voraus theoretische Bedenken an, die sich als gerechtfertigt erwiesen. Es zeigt praktisch die Colizahl weniger eindeutig an als der Colititer nach *Freudenreich*, ist aber bedeutend umständlicher als das Titerverfahren.

Schliesslich geben wir noch eine kurze Erläuterung zur Methodik des *Freudenreich*'schen Titerverfahrens, wie es sich bei uns bewährt hat.

Bei ganz unbekanntem und in bezug auf Reinheit zweifelhaften Wässern empfiehlt es sich, zur Titerbestimmung 0,01, 0,1, 1 und 5 cm<sup>3</sup> Wasser zu verimpfen. Zweckmässig setzt man jeden Versuch doppelt an. Bei stark verunreinigten Wässern werden die Differenzen der beiden Versuchsreihen im allgemeinen nicht wesentlich. Soll mehr als 5 cm<sup>3</sup> Wasser verarbeitet werden, so ist dafür zu sorgen, dass die Nährlösung nicht zu stark verdünnt wird. Zur Bestimmung der Titerzahl in 5—20 cm<sup>3</sup> Wasser benutzen wir grössere Reagensröhren von ca. 3 cm Durchmesser und 20 cm Länge. Will man noch höher gehen, so behilft man sich so, dass die verhältnismässig grossen Wassermengen in sterile Erlenmeyerkolben abgefüllt und die ungefähr berechnete Menge einer vorrätigen konzentrierten, sterilisierten Nährlösung zugefügt wird.

*Thöni* erwähnt, dass die Gasbildung im flüssigen Substrat selbst bei Anwendung von geeigneten Gasfängern leicht übersehen werden, oder die aufgefangene Gasmenge von im Wasser gelösten Gasen herkommen könne. Bei Verwendung der *Durham*'schen Gärröhrchen jedoch, wie diese bei uns schon seit Jahren in Gebrauch, haben wir diesen Uebelstand nicht nennenswert empfunden. Werden grössere Wassermengen verwendet, kann man zur Sicherheit bereits nach etwa 1—2 Stunden die Kontrolle auf etwa aus dem Wasser stammendes Gas vornehmen. Bei Anwendung von Erlenmeyerkolben empfiehlt es sich, nach etwa 12 und 18 Stunden nachzusehen, ob Gasbildung eingetreten ist; auf diese Weise ist dieselbe kaum zu übersehen.

Die Feststellung des Colititers kann in der Regel nach 24 Stunden geschehen. Es empfiehlt sich aber, das Resultat nach 48 Stunden nachzuprüfen.

### Zusammenfassung.

Unsere Erfahrungen über die besprochenen Methoden des Nachweises von *Bact. coli* können wir wie folgt zusammenfassen:

1. Die Titermethode nach *Freudenreich* kann ihrer Einfachheit und praktisch genügenden Genauigkeit wegen empfohlen werden.

2. Die Titermethode nach *Eijkman* besitzt gegenüber der *Freudenreich*'schen mindestens keine Vorteile.

3. Das *Marmann*'sche Verdunstungsverfahren gibt die Colizahl präziser und naturgemässer wieder als die Titermethoden; es ist daher für Laboratorien, die sich häufig mit Wasseruntersuchungen befassen, zu empfehlen, besonders da die notwendige Apparatur mit verhältnismässig geringen Mitteln beschafft werden kann.



4. Das Verfahren von Thöni befriedigt nicht, denn:

- a) Es sprechen theoretische Bedenken dagegen.
- b) Die praktischen Ergebnisse fallen ausserdem weniger eindeutig aus als bei den besprochenen Verfahren.
- c) Eine allfällige Weiterprüfung verdächtiger Kolonien ist schwer bis unmöglich.<sup>1)</sup>

## Bemerkungen zu der vorstehenden Arbeit von Dr. Leo Minder:

« Zur Methodik des Nachweises von *Bact. coli* im Wasser unter spezieller Berücksichtigung der im Schweizerischen Lebensmittelbuch aufgenommenen Verfahren. »

Von J. THÖNI.

In der vorstehenden Publikation kommt Herr Dr. *Leo Minder* auf Grund von vergleichenden Prüfungen zu dem Schlusse, dass die Milchzuckeragarschüttelkultur für den Colinachweis nicht befriedige. Da bekanntlich meine Untersuchungen<sup>2)</sup> über diese Frage zu ganz wesentlich von den *Minder*'schen Ergebnissen abweichenden Befunden geführt haben, so war ich bemüht, nach den Ursachen zu suchen, die die widersprechenden Resultate zeitigen konnten. Ihr Auffinden bot keine Schwierigkeiten. Sie sind zur Hauptsache auf eine verschiedene Auffassung über die zur Lösung derartiger Aufgaben anzuwendende Arbeitsmethodik von Dr. *Leo Minder* und mir zurückzuführen. Bevor daher auf die Berechtigung der Einwände, die *Minder* gegen mein Verfahren erhebt, im einzelnen einzutreten ist, erscheint es angezeigt, sich zunächst darüber Rechenschaft zu geben, wie der Genannte überhaupt seine Befunde bei dieser vergleichenden Prüfung ermittelt hat.

Bei der ersten Serie von Untersuchungen, in der also die Verfahren von *Eijkman*, *v. Freudenreich* und *Marmann* berücksichtigt worden sind, wurde mit den erst genannten beiden Verfahren jeweilen die kleinste Menge Wasser, die noch Gasbildung resp. Trübung bewirkte, festgestellt. Der auf diese Weise gefundene Zahlenwert wurde dann als «Colititer» aufgefasst und hieraus die Colizahl berechnet. *Minder* hat also in Wirklichkeit bei Anwendung der *Eijkman*'schen und *v. Freudenreich*'schen Methodik den Gastest und nicht den Colititer ermittelt. Dass nun eine Benutzung des Gastestes an Stelle des Colititers nicht statthaft ist, da auch andere Bak-

<sup>1)</sup> Wie aus den nachstehenden Bemerkungen des Herrn Dr. Thöni ersichtlich ist, können die Ergebnisse dieser Arbeit nicht in allen Punkten als stichhaltig anerkannt werden. Wir halten indessen eine gründliche Besprechung der für die Trinkwasseruntersuchung wichtigen Methodik des Nachweises von *Bact. coli* für angezeigt (Redaktion).

<sup>2)</sup> *J. Thöni*, Der Nachweis von *Bact. coli* im Wasser mit Hilfe der Milchzuckerpeptonagarschüttelkultur. Diese Mitteilungen, 1916, 7, 125.