

Zeitschrift: Plan : Zeitschrift für Planen, Energie, Kommunalwesen und Umwelttechnik = revue suisse d'urbanisme
Herausgeber: Schweizerische Vereinigung für Landesplanung
Band: 21 (1964)
Heft: 5

Artikel: Mikrobiologische Untersuchungsmethoden
Autor: Laurell, G. / Tullander, V.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-783795>

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: 12.02.2026

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

543.39.001.5

Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

Von Dr. med. Dozent G. Laurell und Dr. V. Tullander, Universitetets bakteriologiska Institution, Uppsala

Bakteriologische Wasseruntersuchungen zur Beurteilung der hygienischen Qualität des Wassers sind in allen Kulturländern seit 60 bis 70 Jahren ausgeführt worden. Ein bedeutender Teil des Interesses wurde dabei dem Isolieren coliformer Bakterien und der Differenzierung in *Escherichia coli*, *E. freundii*, *Aerobacter aerogenes* und anderer Arten dieser Gruppe gewidmet. Im Laufe der letzten Jahre sind aber auch andere Indikator-Organismen, wie Enterococcen und Clostridien, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt und neue Untersuchungsmethoden sind ausgearbeitet worden. Moderne Erkenntnisse haben auch die Hoffnung erweckt auf technische Standardmethoden zum Nachweis pathogener Mikroorganismen.

Als eine Folge des grossen Interesses, welches diesem Fach gewidmet worden ist, sind Hunderte von Arbeiten über verschiedene Medien und Methoden veröffentlicht worden und die Entwicklungslinien, die man in den verschiedenen Ländern verfolgt, haben stark gewechselt. Man kann Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Methoden finden, aber auch Unterschiede, und es ist offenbar, dass Ergebnisse einer Untersuchung in einem Lande nicht direkt mit Ergebnissen unter Verwendung einer anderen Technik in einem anderen Lande verglichen werden können. In bezug darauf ist es höchst wünschenswert, dass die bakteriologischen Untersuchungsmethoden so weit wie möglich standardisiert werden. Im Auftrag der Föderation Europäischer Gewässerschutz wurde die vorliegende Zusammenstellung ausgearbeitet. Sie umfasst eine Beschreibung und Besprechung jetziger Untersuchungsmethoden und soweit möglich einen Vorschlag zur Standardisierung. Um die Darstellung zu beschränken, ist die Zusammenstellung im Hinblick auf die auf diesem Gebiet ausserordentlich umfangreiche Literatur hauptsächlich auf diejenigen Methoden begrenzt worden, welche in den folgenden offiziellen Publikationen angegeben sind:

1. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung, 1960. Verlag Chemie, Weinheim-Bergstr.
2. The Bacteriological Examination of Water Supplies. Reports on Public Health and Medical Subjects, No. 71. London, 1957.
3. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Eleventh Edition 1960, American Public Health Association.
4. International Standards for Drinking-Water, WHO, Geneva, 1958.

5. OECD Working Party to Study Methods of Determining the Composition and Conditions of the Water of Streams. Reports from Sub-Group No. 3, Paris 6th November 1963 and 10th January 1964.

Ausserdem wird noch auf einige weitere Publikationen hingewiesen, die bei der Beurteilung der Methoden von Interesse sein können. Um den Teilnehmern den Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zu erleichtern, ist in den Beilagen die Zusammensetzung der Medien im einzelnen angegeben worden. Betreffend die direkte Herstellung dieser Nährmedien wird jedoch auf die offiziellen Vorschriften verwiesen.

Die Typen der Mikroorganismen und die Methoden, welche in Frage kommen können, ergeben sich aus dem Folgenden:

1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl in einem bestimmten Volumen Wasser.
2. Bestimmung der sog. Indikator-Bakterien. Das technische Verfahren bei diesen Methoden ist sehr verschieden, wie z. B. Kultivieren auf festen Nährböden, Verdünnungsverfahren in Gärröhrchen, Membranfiltermethode und Verdunstungsverfahren.
 - a) Coliforme Bakterien und *E. coli*,
 - b) Enterococcen,
 - c) *Clostridium welchii*.
3. Bestimmung pathogener Mikroorganismen.

Ausser der Zusammensetzung der Nährmedien werden auch die Bebrütungszeiten und Temperaturen besprochen.

Nährböden für Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Prinzipiell kann man zu diesem Zweck zwei verschiedene Nährböden unterscheiden, teils gelatinehaltige, teils agarhaltige Medien.

Gelatine. Von den offiziellen Vorschriften enthalten nur die deutschen eine Beschreibung gelatinehaltiger Nährböden. Inwiefern dieser Nährboden als optimal angesehen werden kann, ist schwer zu beurteilen, da es an Vergleichswerten mangelt. Als Gelatinegehalt sind für den Winter 100 g/l und für den Sommer 125 g/l angegeben. Bei diesen Konzentrationen soll der Nährboden bei Temperaturen bis 26 °C fest bleiben. Windle Taylor [40] gibt in seiner Monographie Gelatinemengen von 125 g/l bzw. 160 g/l an. Gemäss schwedischer Erfahrung ist es jedoch schwer, ein Ge-

latinemedium herzustellen, welches bei Temperaturen um 26 °C fest bleibt. Es hat sich auch erwiesen, dass Gelatine von ungleichmässiger Qualität sein und manchmal einen Zusatz von Konservierungsmitteln haben kann.

Agar-Agar. Agarhaltige Nährböden sind in sämtlichen offiziellen Vorschriften angegeben. In Standard Methods findet man sogar drei verschiedene Alternativen: Tryptone Glucose Extract Agar, Tryptone Glucose Yeast Agar und Milk Protein Hydrolysate Glucose Agar.

Folgende Brutzeiten und Temperaturen werden in Report 71 empfohlen: 22 °C bei Bebrütung während drei Tagen und 37 °C bei Bebrütung während 48 Stunden. In Standard Methods sind die entsprechenden Angaben 20 °C für 48 Stunden und 35 °C für 24 Stunden. Das Deutsche Einheitsverfahren hat keine spezielle Temperaturangabe. Die Anzahl Kolonien auf den Platten soll am besten zwischen 30 bis 300 liegen und unter Vergrösserung ausgezählt werden; $1,5 \times$ Diameter (amerikanisch), $2,5 \times$ Diameter (englisch) oder Stereolupe mit 6- bis 8facher Vergrösserung (deutsch). Es dürfte offenbar sein, dass Nährböden von so verschiedener Zusammensetzung sowie auch die verschiedenen Bebrütungstemperaturen und Zeiten nicht die gleichen Gesamtkeimzahl geben können. Nach einigen Verfassern, z. B. Wilson [41], kann man erwarten, dass Nährböden, die Hefeextrakt enthalten, grössere Gesamtkeimzahlen geben als diejenigen mit Fleischextrakt. Man kann jedoch in Frage stellen, ob die absoluten Zahlen eine grössere Rolle spielen, da ja vielmehr die Vergleiche unter den Keimzahlen von verschiedenen Untersuchungsstellen von Interesse sind. Es ist auch wohl bekannt, dass das Auszählen der Bakterien eine schwer zu standardisierende Methode ist, und dass man mit grossen Variationen der Ergebnisse rechnen muss. Laut Conn [11] ergab eine vergleichende Untersuchung, dass auch nach sorgfältiger Standardisierung bei Zählung derselben Petrischale durch zwei verschiedene Laboratorien, die Ergebnisse sich um 100 % voneinander unterscheiden konnten. Es scheint jedoch zweckmässig, den Bakterien gute Zuwachsbedingungen zu bieten, woraus man schliessen dürfte, dass Nährböden mit Hefeextrakt am besten passen würden. Bei Verwendung von Nährböden mit Hefeextrakt ist jedoch zu beachten, dass Zusammensetzung und zuwachsfördernde Eigenschaften des Hefeextrakts bedeutend variieren können. Darüber ist aber in den Vorschriften nichts angegeben und der einzige Hefeextrakt, dessen Herkunft zu ermitteln war, ist Yestreal, der von der Firma Brewers Food Supply Co. Ltd., England, hergestellt wird. Man kann übrigens schon hier die allgemeine Anmerkung vorbringen, dass die Deklarationen der meisten Medien, die bei den verschiedenen Untersuchungen zu Gebrauch kommen, unvollständig sind. Das gilt für so wichtige Bestandteile wie Pepton, Agar-Agar, Fleischextrakt u. dgl. Es ist wohl bekannt, dass es eine Menge verschiedener Fabrikate davon gibt und dass auch die Qualität verschieden ist. Um Ergebnisse verschiedener

Untersuchungen vergleichen zu können, ist es höchst wünschenswert, dass diejenigen Firmen angegeben werden, von welchen die Präparate für die Nährmedien stammen.

Der Wert der Gesamtkeimzahlbestimmungen bei verschiedenen Temperaturen ist von vielen Verfassern in Frage gestellt worden. Sie können jedoch in gewissen Fällen, speziell bei Untersuchung verschmutzter Oberflächenwässer, von Bedeutung sein, weshalb es als gute Praxis angesehen wird, solche Bestimmungen im Zusammenhang mit grösseren Wasseruntersuchungen durchzuführen.

Bestimmung der coliformen Bakterien und E. coli.

Zunächst sollen die Definitionen angeführt werden, welche für die coliformen Bakterien in Amerika, England bzw. Deutschland festgestellt worden sind.

Standard Methods 1960

All of the aerobic and facultative anaerobis Gram-negative, nonsporing rod-shaped bacteria which ferment lactose within 48 hours at 35 °C.

Report 71, 1957

All Gramnegative non-sporing rods capable of fermenting lactose with the production of acid and gas within 48 hours and 37 °C and of growing aerobically on an agar medium containing bile salt.

Deutsche Einheitsverfahren 1960

Zu der Gruppe der coliformen Bakterien gehören alle gramnegativen nicht sporebildenden Stäbchen, die bei einer Temperatur von 37 °C innerhalb von 24 bis 48 Stunden Milchzucker unter Bildung von Säure und Gas zu zersetzen vermögen.

Wie aus diesen Definitionen hervorgeht, die sich ihrerseits auf die bakteriologischen Untersuchungsmethoden der verschiedenen Länder gründen, liegen grosse Uebereinstimmungen, aber keine vollständige Identität vor. Die englische Definition setzt den Gebrauch von Galle im Substrat voraus, die amerikanische Bebrütung bei 35 °C, während die deutsche die Temperatur von 37 °C angibt. Weitere Unterschiede in bezug auf die Wahl von Nährmedien und Verifikationsmethoden sind leicht zu finden. Darum ist es offenbar, dass Ergebnisse, die mit der einen oder anderen Methode erhalten worden sind, nicht ohne weiteres gegeneinander gestellt werden können, sondern dass gleichwertige Bedingungen Voraussetzung sind. Beim Ausarbeiten dieses Berichtes hat es sich erwiesen, dass leider wenig Vergleiche dieser Art existieren. Dieser Umstand erschwert ohne Zweifel das Ziel dieses Berichts, Vorschläge für einheitliche europäische Normen für Wasseruntersuchungen vorzulegen. Die verschiedenen Methoden, die im Gebrauch sind, werden in folgender Ordnung behandelt.

*Methoden und Medien
zum Nachweis und zur Differenzierung
von coliformen Bakterien und E. coli*

- a) Bestimmung mit dem Verdünnungsverfahren in Gärröhrchen;
- b) Bestimmung auf festen Nährböden;
- c) Bestimmung mit der Membranfiltermethode;
- d) Differenzierung mit dem IMViC-Test.

Die Gärröhrchen-Methode

Der Vorgang bei der Coli-Titer-Bestimmung ist im Prinzip der folgende: Von der Probe wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, und eine Anzahl Röhrchen mit flüssigem Nährmedium zum Zuwachs und Nachweis von coliformen Bakterien wird mit bestimmten Mengen unverdünnter Wasserprobe bzw. Verdünnungen beimpft. Die Verdünnungen müssen so abgepasst sein, dass Grenzen des Vorkommens von Coli durch die Untersuchung enthüllt werden, d. h. so dass in einer Verdünnung die meisten Röhrchen positiv werden, in einer anderen die meisten Röhrchen negativ und einige positiv werden und schliesslich in einer Verdünnung keine coliformen Bakterien nachgewiesen werden können. Mit Hilfe der Tabellen, die auf Grund von Wahrscheinlichkeitsrechnungen konstruiert worden sind, kann dann die wahrscheinliche Anzahl coliformer Bakterien für alle möglichen Resultate der Untersuchung bestimmt werden. Die Zuverlässigkeit ist in ziemlich grossem Ausmasse von der Anzahl Röhrchen, die mit jeder Verdünnung geimpft werden, abhängig. So enthält man z. B. zuverlässigere Ergebnisse mit fünf Röhrchen von jeder Verdünnung als mit drei.

Nach der deutschen Methode wird das kleinste Volumen des Wassers bestimmt, in dem diese Keime noch nachweisbar sind. Offenbar ist diese Methode weniger zuverlässig als diejenige mit Wahrscheinlichkeitsrechnungen aus mehrfach parallelen Gärröhrchen.

Nach internationalem Usus wird die quantitative Untersuchung von coliformen Bakterien in folgende drei verschiedene Teste eingeteilt, je nachdem wie weit sie getrieben werden soll: 1. präsumtiver Test, 2. konfirmativer Test und 3. kompletter Test.

Präsumtiver Test. Dieser Test gibt eine Auffassung von der Gesamtzahl der laktosevergärenden Bakterien in der Wasserprobe. Der grösste Teil von diesen besteht aus coliformen Bakterien, aber auch aus anderen Laktosevergärrern, obwohl in geringerer Anzahl, vor allem einigen Coccon und Clostridien. Für diese erste Coliformenkultur können mehrere verschiedene Nährmedien verwendet werden, welche im Prinzip in zwei Gruppen eingeteilt werden können, teils diejenigen, welche keine hemmenden Stoffe enthalten, teils solche mit hemmenden Stoffen. Als Vertreter der ersten Gruppe finden wir die deutsche Laktoselösung (10 % bzw. 1 % Laktose) und die amerikanische Laktosebouillon (0,5 % Laktose). Ausser in dieser Hinsicht unterscheiden sich diese Nährlösungen voneinander dadurch, dass die deutsche Lösung nur Pepton, die amerikanische auch Fleischextrakt enthält.

Das bekannteste Nährmedium mit hemmendem Zusatz dürfte die Mac-Conkey-Bouillon sein. Diese Nährlösung wurde vor mehr als 50 Jahren von Mac Conkey eingeführt und sie enthält 0,5 % Galle oder geeignete Gallensalze. Der ursprüngliche Sinn davon war, die Verhältnisse im Darm nachzuahmen. Dieses Substrat hat sich besonders in den englischen Untersuchungen als verwendbar erwiesen, und die Frequenz falscher Ergebnisse ist in dem präsumtiven Test mit nur 0,5 bis 1,4 % für unbehandelte Oberflächenwässer angegeben worden. Man kann aber auch gewisse Nachteile bei dieser Nährlösung finden. Erstens kann Galle, wie es von Allen et al. [1] gezeigt wurde, eine hemmende Wirkung auf den Zuwachs einiger coliformer Bakterien haben, was ein Nachteil bei Untersuchungen von verschmutzten Oberflächenwässern sein kann. In solchen Gewässern muss man mit dem Vorkommen vieler verschiedener Arten von coliformen Bakterien rechnen, und eine vollständige Repräsentation aller dieser Arten in der Nährlösung kann für die Bestimmung des Ursprunges einer Verschmutzung wertvoll sein.

Ein anderer und vielleicht wichtiger Einwand ist, dass verschiedene Gallenpräparate verschieden stark hemmende Wirkung haben können. Dieses ist von den Forschern in England an englischen Präparaten gefunden worden, und bei Verwendung von Präparaten von internationaler Herkunft dürfte man mit noch grösseren Variationen rechnen können. Methoden für Prüfung von Gallenpräparaten sind z. B. von Burman [4] angegeben, man kann aber davon nicht absehen, dass solche Prüfungen für kleine Laboratorien mit kleinen Mitteln ein Nachteil sein können.

Es gibt nur wenige vergleichende Untersuchungen zwischen reinem Laktosemedium und Mac-Conkey-Bouillon. Jebb [20] hat jedoch mit Hilfe der Röhrchen-Methode die beiden Nährlösungen verglichen. Dabei erhielt er im grossen und ganzen die gleiche Ausbeute von coliformen Bakterien, prozentuell auf die Gesamtanzahl der untersuchten Röhrchen gerechnet. Die Anzahl der falschen positiven Röhrchen war jedoch viel grösser (191 im Vergleich zu 32) beim Gebrauch des reinen Laktosemediums. Diese Untersuchung ist jedoch in vieler Hinsicht kritisiert worden. Der Vergleich galt nur der Zahl der positiven Röhrchen und gibt keine Auskunft über die Streuung der individuellen Wasserproben. Die Kulturen wurden ausserdem bei 37 °C und nicht bei 35 °C bebrütet, welche Temperatur für das amerikanische Medium empfohlen wird. Schliesslich wurde noch ein anderes Pepton als das des Originalmediums verwendet. Bonde [3] erhielt in einigen Versuchen gleiche Ergebnisse mit Mac-Conkey-Bouillon, einfachem Laktosemedium und Glukosemedium, was die coliformen Bakterien betrifft. Gewisse Unterschiede in der Gasbildung konnten festgestellt werden, und Mac-Conkey-Bouillon gab dabei die gleichmässigsten Ergebnisse.

In vielen der anderen Nährlösungen, welche für den präsumtiven Test empfohlen werden, hat man versucht, die Galle durch irgend eine chemisch besser

definierbare Substanz zu ersetzen. Jameson und Emberley [19] haben als Ersatz 0,1 % Teepol vorgeschlagen. Dieses ist ein anionenaktives oberflächen-spannungs-herabsetzendes Mittel, welches in ihrem Falle von der Firma Shell Chemicals Ltd. Norman House, 105/104 Strand, London W. C. 2, geliefert wurde. Die von Amerikanern vorgeschlagenen Zusätze von 0,01 % Laurylsulfat, Mallmann et al. [31,] Mc Grady et al. [43] und Natriumricinoleat, Stark et al. [34] erwiesen sich ebenfalls als geeignet. Gegen alle diese Ersatzmittel kann man jedoch einwenden, dass ihnen eine hemmende Wirkung auf einige coliforme Bakterien nicht angesprochen werden kann. Irgendwelche augenfällige Hemmung kam zwar in den Untersuchungen von Jebb, wo Teepol und Laurylsulfat geprüft wurden, nicht zum Vorschein, grössere Versuche mit verschiedenen Typen von Wasser und verschiedenen Präparaten dürften jedoch notwendig sein, bevor man diese Frage sicher beurteilen kann.

Ein ganz anderer Typus von Nährmedien, der aus vielen Gesichtspunkten sehr interessant ist, ist ein ganz synthetisches Medium auf der Basis von Glutaminsäure. Es wurde zuerst von Burman und Oliver [6] für coliforme Bakterien geprüft und später sind Modifikationen von u. a. Public Health Laboratory Service, Water Subcommittee und Gray [15] eingeführt worden. Bei der durch Gray zuletzt eingeführten Modifikation wurde das Medium bei verschiedenen pH 7,2 bis 6,7 und mit Zusatz von Natriumformiat geprüft. Es erwies sich, dass diese Variante im Vergleich mit Mac-Conkey-Bouillon eine sicherere Diagnostik von *E. coli* ermöglichte. Ein bestimmter Hemmungseffekt konnte für atypische coliforme Bakterien nachgewiesen werden. Der Vorteil dieses Nährmediums besteht darin, dass es ganz synthetisch ist, mit Bestandteilen, die chemisch gut definierbar sind. Die Nachteile sind, wie erwähnt, ein gewisser Hemmungseffekt und schlechtere Gasbildung, was das Ablesen erschwert. Gray meint jedoch, dass diese Schwierigkeiten durch Zusatz von Natriumformiat beseitigt werden können. Andere Untersucher wie z. B. Bonde [3] haben nicht den gleichen Erfolg mit diesem Medium gehabt. Bonde hat jedoch augenscheinlich in seinen Untersuchungen die ursprüngliche Lösung verwendet und nicht die von Gray empfohlene Modifikation.

Temperatur und Zeit der Bebrütung

Bei der Bestimmung der Anzahl coliformer Bakterien in einer Probe spielen Temperatur und Zeit der Bebrütung eine sehr grosse Rolle. In England empfiehlt man Bebrütung bei 37 °C mit Kontrolle nach 18, 24 und 48 Stunden. Das deutsche Einheitsverfahren empfiehlt dieselbe Temperatur mit Kontrolle nach 24 und 48 Stunden, wogegen die amerikanischen Vorschriften 35 °C und Kontrolle nach 24 bzw. 48 Stunden angeben. Nach schwedischen Erfahrungen führt eine Herabsetzung der Bruttemperatur auf 35 °C zu einer Zunahme der Anzahl coliformer Bakterien in etwa 30 bis 35 % aller Wasserproben. Diese Zunahme

ist gross genug, um einen auffälligen Ausschlag bei der Auswertung der Proben zu geben. Einige Forscher haben sogar noch niedrigere Temperaturen, z.B. 30 °C, vorgeschlagen, was aber kaum zu empfehlen ist. Die Mehrzahl der Bakterien, welche man dabei zusätzlich erhält, dürfte aus hygienischen Gesichtspunkten kein Interesse haben. Eine Verlängerung der Bebrütungszeit über 48 Stunden hinaus würde zweifellos die Anzahl der positiven Röhren vergrössern, aus praktischen Gesichtspunkten ist jedoch eine Verlängerung nicht erwünscht.

Konfirmativer Test

Es ist eine wohlbekannte Tatsache, dass auch andere Bakterienarten, wie Coccen und Clostridien, Laktose unter Gasbildung spalten können. Deren Vorkommen in verschiedenen Wässern kann wechseln, weshalb es notwendig sein kann, diese coliformverdächtigen Bakterien, die beim präsumtiven Test zum Vorschein gekommen sind, zu verifizieren. Das kann auf festen wie in flüssigen Nährmedien durchgeführt werden.

Feste Nährböden. Die gebräuchlichsten festen Nährböden dürfen Endo-, Eosin-Methylenblau- (EMB) und Mac-Conkey-Agar sein. Welcher davon verwendet wird, dürfte im grossen und ganzen eine Geschmacksache sein, die von der persönlichen Gewohnheit des Untersuchers abhängig ist. Die Anzahl der Röhren einer Gärungsreihe, die bei einer Verifizierung ausgestrichen werden sollen, ist sehr wichtig, und die Auffassungen scheinen in dieser Frage geteilt zu sein. Dem deutschen Einheitsverfahren gemäss sollen alle Röhren der Reihe mit der stärksten Verdünnung ausgestrichen werden, die Gasbildung oder nur Zuwachs gezeigt haben. Die amerikanischen Anweisungen empfehlen das Ausstreichen aller Röhren mit Gasbildung aus sämtlichen Verdünnungsreihen oder alternativ Röhren der zwei stärksten Verdünnungen, in welchen Gasbildung in 24 Stunden aufgetreten ist. Der schwedischen Auffassung nach sollen, falls mindestens ein Röhren in einer Verdünnungsstufe Säurebildung und Gasentwicklung gezeigt hat, sämtliche Röhren dieser Reihe mit Zuwachs ausgestrichen werden. Alle findet es wichtig, dass das Ausstreichen so ausgeführt wird, dass man von jedem Röhren Einzelkolonien erhält. Die Petrischalen werden bei der für den präsumtiven Test in den verschiedenen Ländern üblichen Temperatur bebrütet und nach 24 und 48 Stunden ausgezählt. Auf den verschiedenen Nährböden typische Kolonien werden als coliforme Bakterien gerechnet. Die verschiedenen Prinzipien für das Ausstreichen geben ohne Zweifel auch verschiedene Ergebnisse. In einem Falle werden auch Röhren, in denen keine Gasbildung vorgekommen ist, ausgestrichen und der konfirmative Test kann dann das Vorkommen coliformer Bakterien in denjenigen Röhren nachweisen, die sonst als negativ beurteilt worden wären. Eine umfassende schwedische Untersuchung hat gezeigt, dass dadurch etwa 10 % der Röhren «falsch» als positiv

gerechnet werden. Wenn aber das Konfirmieren nur auf diejenigen Röhrchen, die Gasbildung aufweisen, beschränkt wird, werden etwa 25 % der Röhrchen mit Zuwachs falsch als negativ klassifiziert. Die fehlende Gasentwicklung in solchen Röhrchen hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die Zahl der Laktose gärenden Bakterien im Verhältnis zu den nicht gärenden klein ist, wodurch der Zuwachs der ersteren gehemmt wird. Gemäss schwedischer und dänischer Erfahrung ist es eine gewöhnliche Erscheinung, dass man nur Säurebildung und nicht Gas erhält, wo konfirmierende Untersuchungen später das Vorkommen typischer coliformer Bakterien zeigen.

Flüssige Nährlösungen. Eine Nährlösung, die sowohl von englischer als auch von amerikanischer Seite für diesen Zweck vorgeschlagen wird, ist Brillantgrün-Laktoselösung. Mit einer grossen Oese (3 mm Diameter) wird Impfmateriel aus dem Röhrchen, das geprüft werden soll, in ein Brillantgrün-Röhrchen übertragen. Dieses Röhrchen wird 48 Stunden bebrütet, und Zuwachs mit Gasbildung wird kontrolliert. Das Vorkommen von coliformen Bakterien wird als bestätigt angesehen, sobald Entwicklung von Gas festgestellt werden kann. Grosse Serien von Untersuchungen von Bakterienstämmen wie auch von Wasserproben haben gezeigt, dass jedenfalls das Konfirmieren auf Endoagar und in Brillantgrün-Lösung gleichwertig sind. Die Brillantgrün-Methode ist bedeutend einfacher.

Kompletter Test

Besonders in den amerikanischen Vorschriften hat man dieses Verfahren ausführlich angegeben. Der Test ist für die verhältnismässig geringe Anzahl Fälle gedacht, in denen die konfirmative Untersuchung kein eindeutiges Ergebnis gezeigt hat. Die Kolonien auf dem festen Nährboden können ihrem Aussehen nach atypisch sein und die Gasbildung in Brillantgrün so gering, dass sie schwierig zu beurteilen sein kann. In solchen Fällen kann die Untersuchung bis zum kompletten Test erweitert werden. Im Prinzip bedeutet das, dass verdächtige Kolonien bzw. verdächtige Trübung in Lösungen weiter gezüchtet und auf Gasbildung, Sporenbildung und Färbungseigenschaften geprüft werden. Zu diesem Zweck werden flüssiges Laktosemedium und Schrägagar-Röhrchen verwendet. Werden bei der Untersuchung Gram-negative, nicht sporenbildende Stäbchen nachgewiesen, die Laktose unter Gasbildung zersetzen, so wird das Vorkommen von coliformen Bakterien als bestätigt angesehen. Geht man von einem Brillantgrün-Röhrchen aus, so stellt man erst eine Vorkultur auf festem Nährboden her, wonach die Untersuchung auf die obige Art ausgeführt wird. Die schwedischen Empfehlungen für komplette Verifizierung stimmen im grossen und ganzen mit den amerikanischen überein.

Bestimmung der Anzahl thermostabiler coliformer Bakterien

Es ist wohlbekannt, dass nicht alle coliformen Bakterien, die man im Wasser findet, die gleiche Signifi-

kanz für eventuelle fäkale Verschmutzung zu haben brauchen. Nur *E. coli* (*Bact. coli* Typ I) kann mit Sicherheit als ein direkter Indikator dafür angesehen werden, da unzählige Untersuchungen gezeigt haben, dass dieser Typus 97 bis 98 % der Darm-Coliflora des Menschen ausmacht. In einem verschmutzten Oberflächenwasser kann man damit rechnen, dass dieser Typus gleichzeitig mit anderen coliformen Bakterien vorhanden ist, weshalb es als von grösstem Interesse angesehen werden muss, die verschiedenen Arten mit geeigneten Methoden bestimmen zu können. Eine der bekanntesten Methoden, *E. coli* herauszudifferenzieren, gründet sich auf die ursprüngliche Beobachtung von Eijkman, dass *E. coli* bei 46 °C Glukose spalten kann. In späteren Untersuchungen haben z. B. Allen, Pasley und Pierce [1] gezeigt, dass diese Temperatur etwas kritisch ist, weshalb heute 44 °C für diese Probe meistens vorgezogen wird. In den amerikanischen Vorschriften wird immer noch 45,5 °C zugelassen. Glukose ist in der Regel gegen Laktose ausgetauscht worden, die ja in die meisten anderen Colimedien als Zuckerart eingeht.

Es gibt mehrere verschiedene Mittel, diese Temperaturtoleranz auszunützen, um *E. coli* zu erhalten. Am einfachsten dürfte es sein, die thermostabilen coliformen Bakterien auf dieselbe Weise zu bestimmen, welche für die Bestimmung der Gesamtzahl der coliformen Bakterien beschrieben worden ist, mit dem Unterschied, dass die Röhrchen direkt bei höherer Temperatur bebrütet werden. Nach 24 und 48 Stunden werden die Kulturen kontrolliert, wobei Säure- und Gasbildung als Zeichen von Zuwachs thermostabiler *E. coli* betrachtet wird. Weiteres Konfirmieren wird dabei als nicht notwendig angesehen. Dieses ist das in Schweden jetzt verwandte Verfahren. Die Methode hat gewisse Nachteile. Nach mehreren Verfassern, wie Mackenzie [28], Clegg [8] und Allen et al. [1], gibt diese Direktbebrütung zu niedrige Werte, da nicht alle *E. coli* bei direkter Bebrütung bei dieser höheren Temperatur auswachsen können. Im Report 71 wird darum Direktbebrütung nicht empfohlen. Es muss jedoch bemerkt werden, dass diese Versuche mit MacConkey-Bouillon ausgeführt worden sind. Das Verfahren, welches vor allem von Engländern empfohlen wird, ist darum etwas anders, und man geht dabei von Gärröhrchen der 37 °C-Reihe aus. Nach dieser Methode, die von Mackenzie, Taylor und Gilbert [29] ausgearbeitet ist, wird jedes positive Röhrchen der 37 °C-Reihe teils in einem Brillantgrün-Galle-Röhrchen, teils in einer Peptonlösung weiterkultiviert. Beide werden bei 44 °C 24 Stunden bebrütet. Bei denjenigen Röhrchen, die Gasbildung im Brillantgrün-Röhrchen und eine positive Indolprobe im Peptonröhrchen, mit Kovacs Reagenz geprüft, aufweisen, kann *E. coli* vorausgesetzt werden. Die Indolprobe wird hier eingeschlossen, weil atypische coliforme Bakterien, wie z. B. Irregular II und VI, die Eigenschaft besitzen, bei 44 °C zu wachsen, aber eine negative Indolprobe geben. Diese Probe wird als sehr zu-

verlässig angesehen und ist ausserdem viel rascher als der IMViC-Test, der bis fünf Tage dauern kann. Bei einer kleineren Untersuchung erhielt der Engländer Houghton [18] eine Uebereinstimmung von 90 % zwischen diesen beiden Verfahren. Es ist jedoch nicht klar, inwieweit ebensogute Ergebnisse auch in anderen Ländern erwartet werden können. Von englischer Seite hat man betont, dass die Frequenz atypischer thermostabiler Stämme in Ländern mit tropischem Klima viel höher sein kann. Als Beispiel dafür kann die Untersuchung von Raghavachari und Iyer [36] in Indien erwähnt werden, welche gezeigt hat, dass dort 67 bis 70 % der aerogenes-ähnlichen Stämme thermostabil waren. Ebenso hat Boizot [2] in Malaya gezeigt, dass 13,3 % seiner Aerogenes-Stämme bei 44 °C wachsen konnten.

Um noch rascher ein Resultat erhalten zu können, hat Windle Taylor [42] versucht, das Brillantgrün-Röhrchen schon nach sechsständiger Bebrütung zu kontrollieren, wobei das Ergebnis in 95 % mit dem der 24ständigen Bebrütung übereinstimmte. Wenn die Röhrchen beim präsumtiven Test das erste Mal schon nach 24 Stunden kontrolliert und gleichzeitig für weitere Züchtung abgeimpft werden, kann die Untersuchung einer Wasserprobe in eiligen Fällen schon 30 Stunden nach dem Beginn der Untersuchung beendet werden. Das kann bei Trinkwasseruntersuchungen von grossem Interesse sein. Ob es für Vorfluteruntersuchungen im Zusammenhang mit verschmutzten Oberflächenwässern die gleiche Bedeutung hat, kann jedoch in Frage gestellt werden.

Temperaturkontrolle

Bei dieser Untersuchungsmethode wird in denselben Vorschriften der Temperaturkontrolle grosse Bedeutung beigemessen und grössere Temperatortoleranzen als $\pm 0,2$ °C werden nicht zugelassen. Weder gewöhnlichen Brutschränken noch selbst solchen mit Wasserbadmantel wird ausreichende Genauigkeit zugebilligt. Ein genau kontrolliertes Wasserbad wird als am günstigsten angesehen.

Bestimmung coliformer Bakterien und E. coli auf festen Nährböden

Selbstverständlich ist es möglich, die Anzahl der coliformen Bakterien auch durch Direktimpfung eines festen Nährbodens zu bestimmen. Dazu ist jedoch zu bemerken, dass diejenigen coliformen Bakterien, die man auf diese Weise erhält, nicht den Ansprüchen der Definition entsprechen, da man auf einem festen Nährboden nur Säurebildung nachweisen kann. Mehrere Verfasser haben auch in Frage gestellt, ob man unbedingt dieselben Arten coliformer Bakterien auf festen Nährböden bzw. in Gärröhrchen bestimmt. Mit Rücksicht darauf, dass das untersuchte Wasservolumen in gewöhnlichen Fällen klein ist, nur einige ml, sind ziemlich verschmutzte Wässer Voraussetzung für ein zuverlässiges Ergebnis. Diese kleinen Volumina bedeuten auch ein ernstes Risiko für grosse Streuung der Versuchsergebnisse, und es wird darum empfohlen, zwei

Platten von unverdünntem Wasser bzw. den Verdünnungen anzusetzen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Kolonien sehr schwer zu erkennen und zu zählen sein können, besonders wenn andere Bakterienarten auf den Platten wachsen. Man kann viele verschiedene Typen von Medien zu diesem Zweck gebrauchen. In den deutschen Einheitsverfahren wird Endoagar vorgeschlagen, das in allen Ländern ein wohlbekanntes Medium ist. Temperatur und Zeit der Bebrütung sind die gleichen wie bei der Methode mit Gärröhrchen. Im Vergleich zu dieser soll die Plattenmethode etwas höhere Koloniezahlen geben.

Man hat auch angestrebt, feste Nährböden zu erhalten, die eine direkte Differenzierung zwischen coliformen Bakterien und *E. coli* erlauben. Für wie spezifisch auch immer ein Medium bei seiner Neueinführung gehalten worden sein mag, so hat sich doch stets früher oder später gezeigt, dass Schwierigkeiten bei der Differenzierung auftreten. Darum ist es oft notwendig, die Differenzierung mit Verifikationen zu ergänzen, z. B. dem IMViC-Test, der ziemlich zeitraubend ist. In den Händen eines geübten Untersuchers kann eine Untersuchung auf festen Nährböden ausserordentliche Ergebnisse bringen. In den Händen eines weniger geübten kann die Methode trügerisch sein. Zu heisse Nährböden beim Einimpfen der Wasserprobe, schlechte Verteilung der Bakterien in der Petrischale usw. können falsche Ergebnisse verursachen.

Eine Methode mit Verwenden fester Nährböden, die nur in den deutschen Einheitsverfahren beschrieben ist, ist das Verdunstungsverfahren. Dieses wird als speziell geeignet für stärker verschmutzte Wässer angegeben, und je nach dem Nährboden, der zur Züchtung verwendet wird, können 5 bis 25 ml untersucht werden. Das Wasservolumen wird gleichmässig auf dem Nährboden verteilt und die Verdunstung wird im Brutschrank bei 40 °C während 1 bis 2 Stunden durchgeführt, wobei die Schalen ohne Deckel bebrütet werden. Es gibt auch einen speziellen Apparat, um die Verdunstung zu beschleunigen. Die weitere Bebrütung kann bei beliebiger Temperatur durchgeführt werden, und das Auszählen geschieht nach denselben Normen wie bei den anderen Methoden. Wie zuverlässig diese Methode im Verhältnis zu den anderen ist, geht nicht aus den deutschen Vorschriften hervor. Es kann jedoch vermutet werden, dass schwärmende Bakterien diese Methode jedenfalls bei Verwendung von Endoagar stören können.

Bestimmung der Zahl der coliformen Bakterien und E. coli mit Membranfilter

Diese Methode geht darauf hinaus, eine bestimmte Wassermenge durch eine spezielle Filtermembran zu filtrieren, wobei die Bakterien auf der Oberfläche der Membran zurückgehalten werden. Diese Membran wird dann auf einen geeigneten Nährboden gelegt. Nährstoffe und Indikatorstoffe diffundieren durch die Membran, was genügt, den auf ihrer Oberseite liegenden Bakterien die Möglichkeit zu geben, Kolonien zu

entwickeln, die auf die übliche Weise gezählt und identifiziert werden können.

Zur Durchführung dieser Methode ist eine spezielle Ausrüstung notwendig, die von den Herstellern dieser Filter geliefert wird. Sie ist einfach und das technische Verfahren beim Filtrieren bietet keine besonderen Schwierigkeiten. Die Verfahren für die Sterilisation der Filter sind angegeben, aber eine solche dürfte kaum notwendig sein, da die Firmen sterile Standardfilter in geeigneten Verpackungen liefern. Die Membranfilter-Methode wurde erst in Deutschland während des Zweiten Weltkrieges eingeführt, aber heute werden Filter auch in anderen Ländern hergestellt. Bei den Versuchen, die in Schweden ausgeführt worden sind, sind hauptsächlich amerikanische Filter der Firma Millipore Filter Corporation, Bedford, Massachusetts, verwendet worden.

Die Membranfilter-Methode ist bis jetzt hauptsächlich zur Bestimmung der Bakterienzahl in reinen Wässern verwendet worden. Durch ihre Einfachheit hat sie offenbare Vorteile. Filtration kann unter einfachen Bedingungen ausgeführt werden. Membranfilter können nach geeigneter Behandlung mit der Post verschickt werden usw. Wenn es sich um verschmutzte Wässer handelt, hat sich diese Methode als weniger brauchbar erwiesen, und man hat es bis jetzt nicht ratsam gefunden, sie als Alternative zur Gärrohrchen-Methode zu empfehlen. Die hauptsächliche Schwäche der Methode scheint zu sein, dass es noch keinen Nährboden gibt, der so spezifisch ist, dass man am Aussehen der Kolonien direkt entscheiden kann, was bei 35–37 °C coliforme Bakterien sind bzw. was bei 44 °C *E. coli* ist. Die jetzigen Nährmedien haben auch offenbar hemmende Einwirkung auf den Zuwachs einiger coliformer Bakterien, und mehrere Forscher haben gezeigt, dass man grosse Unterschiede zwischen der Bakterienzahl der Membranfilter- und der der Gärrohrchen-Methode erhalten kann. In einem von MacCarthy [33] angeführten Beispiel war die mit Membranfilter bestimmte Bakterienzahl 80 und die der Röhrchen-Methode 800. Mit geeigneten Veränderungen der Technik kann man die Ergebnisse zu besserer Uebereinstimmung bringen. Bedeutende Arbeit wird auch auf das Herstellen geeigneter Nährmedien verwendet, und es ist nicht unwahrscheinlich, dass diese Methode Boden gewinnen wird. In bezug auf die Unschlüssigkeit, die noch herrscht, scheint jedoch eine eingehende Beschreibung in diesem Bericht kaum gerechtfertigt, sondern eine kürzere mag genügen. Die Methoden, die hier unten beschrieben werden, sind teils den offiziellen Beschreibungen entnommen, teils auch dem Bericht, den die OECD Working Party bei ihrer Tagung in Paris im November 1963 abgegeben hat. Laut diesem Pariser Bericht wird die Züchtung in England zurzeit auf folgende Weise durchgeführt. Nach der Filtrierung wird die Membran auf eine Nährkartonscheibe (NKS) gelegt, die mit besonderer Nährlösung mit Teepol eingetränkt ist. Die Membran und die NKS werden zusammen bebrütet, erst 4 Stunden bei 37 °C und danach 14 Stunden bei 35 °C. Die Temperatur-

änderung wird automatisch in speziellen Brutschränken durchgeführt. Beim Auszählen werden alle gelben Kolonien als coliforme Bakterien angesehen und die Ergebnisse werden als mit denen der Gärrohrchen-Methode bei Kontrolle nach 48 Stunden gut übereinstimmend betrachtet.

Bei Bestimmung von *E. coli* werden die Membrane zunächst auf NKS mit spezieller Nährlösung während zwei Stunden bei 37 °C bebrütet. Dann werden sie auf NKS mit spezieller Mac-Conkey-Bouillon übertragen, wonach eine Bebrütung von 14 Stunden bei 44 °C folgt. Beim Auszählen werden gelbe oder braune Kolonien als *E. coli* gerechnet. Diese Methoden sind offenbar vor allem von Metropolitan Water Board, London, ausgearbeitet worden und dürften eine Modifikation der Methode von Barman [5] sein.

Diese Technik, die von automatischen Brutschränken ausgeht, ist jedenfalls für ein kleines Labor nicht ganz unkompliziert und hat dem Pariser Bericht nach bei Flusswasseruntersuchungen nicht ganz befriedigende Resultate gegeben. Eine nicht unbedeutende Anzahl derjenigen Kolonien, die beim Auszählen typisch aussahen, haben sich bei weiterer Untersuchung als andere coliforme Bakterien oder anaerogene Stämme erwiesen, und nur 82 % sind als echte *E. coli* erkannt worden. Wenn Teepol-Nährlösung für Untersuchungen bei 44 °C benützt wurde, war die Uebereinstimmung noch schlechter, ungefähr 70 %. In demselben Bericht findet man auch ein französisches Medium, das für Oberflächenwasser passen soll. Es basiert auf Laktose mit Zusatz von Triphenyltetrazoliumchlorid und Tergitol 7. Die Probe wird auf übliche Weise filtriert, wonach die Membran auf den Nährboden aufgelegt wird. Bebrütung bei 37 °C und 44 °C während 24 Stunden. Charakteristisch für coliforme Bakterien auf diesem Nährboden ist ein gelbes Halo an der Peripherie der Kolonie, deren Eigenfarbe zwischen Gelb und Ziegelrot variiert. Sehr kleine Kolonien vom gleichen Aussehen können vorkommen, sie werden jedoch nicht gerechnet, da es sich bei ihnen meistens um Enterococcen handelt.

Die bei 44 °C bebrüteten typischen *E. coli*-Kolonien sind 1 bis 2 mm gross und die Farbe variiert zwischen Gelb und Gelborange. Die Kolonie ist von einer feinen durchsichtigen Zone umgeben. Von jeder Probe können typische Kolonien durch Subkultivieren in Peptonwasser und Brillantgrün-Bouillon verifiziert werden. Kolonien, die in beiden diesen Proben positiv reagieren, können dann serologisch gegen bekannte pathogene *Coli*, die Infantile Gastroenteritis verursachen, geprüft werden.

In dem deutschen Einheitsverfahren wird Endoagar empfohlen mit Bebrütung bei 37 °C bzw. 44 °C während 24 Stunden. Die annähernde Anzahl der coliformen Bakterien und *E. coli* kann durch Auszählen dieser Platten berechnet werden. Für ein sicheres Differenzieren wird das Herstellen von Reinkulturen und die Prüfung durch IMViC empfohlen.

Auch Standard Methods weisen in erster Linie auf ein modifiziertes M-endo-Medium hin, aber es wird

betont, dass man in unbekannten Wässern bei Bebrütung atypische Kolonien erhalten kann, die Verifizierung durch Subkultivieren und Identifizierung mit den üblichen Methoden erforderlich machen. Besonders wird angegeben, dass die modifizierten Endo-Medien, die für Membranfilter gebraucht werden, Kolonien ergeben, die nicht ganz mit den von anderen in Standard Methods angegebenen Endo-Medien übereinstimmen. Als erwünschte Anzahl Kolonien auf einem Membranfilter wird 20 bis 80 angegeben und die Auszählung soll bei 10- bis 15facher Vergrößerung ausgeführt werden.

Differenzierung der coliformen Bakterien durch den IMViC-Test

Der IMViC-Test ist eine klassische Differenzierungsmethode, die allen Wasserbakteriologen wohl bekannt ist. Sie beruht auf der unterschiedlichen Reaktion verschiedener coliformer Bakterien gegenüber der Methylrot-Probe und der Voges-Proskauer-Reaktion, bzw. dem unterschiedlichen Indolbildungsvermögen und der unterschiedlichen Fähigkeit der Bakterien, in Citratlösung zu wachsen. Mit Hilfe dieses Tests kann man die Colibakterien in Arten wie *Escherichia coli*, *E. freundii* und *Aerobacter aerogenes* einteilen. Der Vorteil der Methode sind die Differenzierungsmöglichkeiten. Sie hat jedoch auch Nachteile. Für ein kleineres Labor ist es zweifellos immer eine Belastung, mehr umfassende und komplizierte Methoden aufzunehmen, die ausserdem mehrere Tage dauern, bevor sie fertig sind und das Abschliessen einer Wasseruntersuchung unnötigerweise verzögern. Einige der eingeschlossenen Tests, wie die Methylrot- und Citratreaktion, können auch schwierig deutbare Reaktionen ergeben. Darum scheint IMViC eher für mehr vorgeschrittene Analysen geeignet zu sein, als für direkte Routinearbeit. Darum werden im folgenden einige wichtige Fakta nur kurz berührt, welche für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von Bedeutung sind.

Indol-Probe. Dabei wird die untersuchte Kultur in ein Röhrchen mit 5 ml Nährlösung abgeimpft. Nach eintägiger Bebrütung bis 35 bis 37 °C wird das Reagenz zugesetzt. Wenn Indol vorhanden ist, nimmt das Reagenz eine dunkelrote Farbe an. Sowohl die Zusammensetzung des Nährmediums als auch die des Indol-Reagenz' sind von Bedeutung. Ljutov [26] hat in einer umfassenden Arbeit gezeigt, dass verschiedene Peptone höchst variierende Halte von Tryptophan enthalten können, ein Bestandteil, der für ein richtiges Resultat Voraussetzung ist. Darum ist es laut Ljutov am besten, dem Nährmedium Tryptophan zuzusetzen, um die wechselnde Peptonqualität zu eliminieren. Ein Zusatz von 0,01 % Tryptophan ist zu wenig, man empfiehlt 0,1 % für sichere Ergebnisse. Ljutov verwendet in seiner Arbeit das Reagenz nach Ehrlich, in allen drei offiziellen Verfahren wird jedoch das Reagenz nach Kovacs empfohlen.

Die Methylrot-Reaktion. Die Nährlösung, welche dafür verwendet wird, ist eine Pepton-Dextrose-Lö-

sung, die auch für Voges-Proskauer geeignet ist. Die Bakterienkultur, welche untersucht werden soll, wird in ein Röhrchen eingeimpft und während fünf Tagen bei 35 bis 37 °C bebrütet. Dann werden 4 bis 5 Tropfen Methylrot-Lösung zugesetzt. Wenn *E. coli* oder *E. freundii* vorhanden sind, erhält man eine rot-violette Farbe, da diese Arten die Eigenschaft besitzen, Säure zu bilden. Auch diese Probe ist von Ljutov [27] gründlich untersucht worden. Er hat gefunden, dass die Peptonqualität von Bedeutung ist, und dass die Variationen in den Ergebnissen teils von dem verwendeten Fabrikat abhängig sein können, teils sogar von Unterschieden zwischen verschiedenen Lieferungen derselben Marke. Die Bruttemperatur ist von besonderer Bedeutung, und Ljutov erhielt die besten Resultate bei 27 °C. Die Brutzeit konnte dann auch auf 3 Tage abgekürzt werden. Letzteres muss jedoch aus praktischen Gesichtspunkten als nicht zweckmässig angesehen werden, da ein spezieller Brutschrank zu diesem Zweck nahezu unerlässlich ist. Als Reagenz verwandte Ljutov eine 0,04 %-Methylrot-Lösung in 95 % Alkohol, welche bessere Ergebnisse erbrachte als folgende drei Lösungen: 1. 0,07 % Methylrot in 95 % Alkohol, 2. die Lösung von Clark und Lubs, 3. Natriummethylrot in 95 % Alkohol. Bei positiver Reaktion erhält man angeblich einen klaren Umschlag zum Roten, bei negativer dagegen eine deutliche gelbe Farbe. Farbenabtönungen wie rötlich Orange oder Ziegelrot sind jedoch nicht ungewöhnlich, was Schwierigkeiten bei der Beurteilung verursachen kann.

Voges-Proskauer-Probe. Das Nährmedium ist dasselbe wie für die Methylrot-Probe. Die Bakterien werden in ein Röhrchen geimpft und bebrütet, laut Standard Methods 48 Stunden bei 35 °C und laut deutschem Einheitsverfahren 5 Tage bei 37 °C. Nach gewissen Verfassern soll die Züchtung bei 30 °C ausgeführt werden, da die Aktivität einiger Stämme bei 37 °C niedrig ist. Der schnellste Weg, das Vorkommen von Acetylmethylcarbinol nachzuweisen ist, sowohl Voges-Proskauer-Reagenzien als auch Kaliumlauge zuzusetzen. Positive Reaktion ergibt dabei eine weinrote Farbe.

Die Citrat-Probe. Dabei verwendet man ein festes oder flüssiges Nährmedium, und die einzige Kohlenstoffquelle der Bakterien ist Citrat. Die mit Bakterien beimpften Medien werden bei 35 bis 37 °C bebrütet. Für flüssige Nährlösungen werden dafür von Standard Methods 72 bis 96 Stunden empfohlen, während die Deutschen Einheitsverfahren sich mit 48 Stunden begnügen. Für feste Nährböden werden 48 Stunden empfohlen. Wachstum auf den Nährmedien soll das Vorkommen von *A. aerogenes* oder *E. freundii*, kein Wachstum das von *E. coli* indizieren. Bei dieser Probe muss man mit einer Reihe von Schwierigkeiten rechnen. Kontaminierende Bakterien, die auf dem Substrat gedeihen, was bei Wasseruntersuchungen meist verwendet wird, können zu falschen Ergebnissen führen. Kleine Mengen organischer Stoffe, die beim Impfen mit übertragen werden, können genügen, den Bakterien Möglichkeit zu geben, auf dem Citratme-

dium zu wachsen. Das Uebertragen von einer so kleinen Menge wie 0,01 ml Peptonwasser bedeutet einen Zuschuss von 10 mg organischer Substanz zu 10 ml Citratmedium. Die Citrat-Probe kann darum für den Routinegebrauch Schwierigkeiten bieten.

Fäkale Streptococcen

Fäkale Streptococcen kamen ungefähr gleichzeitig mit den coliformen Bakterien zur Anwendung bei hygienischen Wasseruntersuchungen. Die Methoden, welche anfangs gebraucht wurden, waren jedoch kompliziert und zeitraubend und der Streptococcen-Nachweis fand keine grössere Nutzenanwendung. Um die Mitte der vierziger Jahre erschienen aber neue selektive Medien, und das Interesse für diese Diagnostik hat seither stetig zugenommen, besonders in Amerika.

Die fäkalen Streptococcen sollen im Vergleich zu den coliformen Bakterien den Vorteil haben, dass sie sich nicht in der Natur vermehren. Im Gegenteil wird mit der Zeit ihre Anzahl kleiner und das Vorkommen fäkaler Streptococcen kann angeblich als ein wirklicher Indikator fäkaler Verschmutzung betrachtet werden. In einigen Untersuchungen hat man auch gezeigt, dass fäkale Coli rascher aus einem Wasser verschwinden als fäkale Streptococcen, und man hält diese Untersuchungsmethode deshalb für empfindlicher als die Coli-Probe.

Die enthusiastischsten Verteidiger der Streptococcen-Methode meinen, deren Vorteile wären so gross, dass es nicht undenkbar sei, dass sie die Coli-Probe mit der Zeit ersetzen werde. Unter solchen Umständen könnte sie als eine Routinemethode zumindest neben der Coli-Probe ohne Bedenken angenommen werden.

Es kann jedoch kaum verleugnet werden, dass viele Fragen beantwortet und Probleme gelöst werden müssen, bevor dieser Standpunkt vertreten werden kann. Die quantitative Verteilung von Enterococcen und coliformen Bakterien in verschiedenen Gewässern variiert bedeutend. Verschiedene Beispiele dafür sind bekannt. Bei einer Untersuchung von Wasser aus New Haven Harbor erhielten Lattanzi und Mood [23] das Verhältnis 63 : 1 zwischen den coliformen Bakterien und Streptococcen. In einem anderen Versuch von Litsky, Rosenbaum und France [25] war das Verhältnis 13,3 : 1. Um noch ein Beispiel zu nennen, erhielt Slanetz [37] folgende Verhältnisse zwischen Enterococcen und coliformen Bakterien: 1,9 : 1 in verschiedenen Wasserproben, 1 : 1,7 im Abwasser und 15 : 1 in Tier-Faeces. Diese augenscheinlich grossen Unterschiede in den Ergebnissen finden offenbar ihre Erklärung in den verwendeten Nährboden-Typen. Bei stärker hemmenden Medien wird der Quotient für die Streptococcen unvorteilhafter, bei schwächer hemmenden vorteilhafter.

Die Wahl der Medien ist von dem Typus der fäkalen Streptococcen, den man als bedeutungsvoll angesehen hat, bestimmt worden. Geht man von Shermans Kriterien für Enterococcen aus, welche oft synonym für fäkale Streptococcen gebraucht werden, wird man wahrscheinlich ein Nährmedium wählen, welches viel

zu selektiv ist. Einige Streptococcen wie *S. bovis* und *S. equinus* passen nicht in die klassische Definition und es kann auch in Frage gestellt werden, ob es nicht von Interesse wäre, orale humane Streptococcen wie *S. salivarius* und *S. mitis* zu bestimmen. Die heute weitgehend akzeptierte Auffassung scheint zu sein, dass man ein Medium wählt, welches so wenig wie möglich hemmend ist.

Im Hinblick auf diese wechselnden Auffassungen ist es kaum erstaunlich, dass so eine grosse Anzahl Medien mit verschiedenem Grad von Selektivität vorhanden ist. In Proceedings Rudolfs Research Conference 1961 in New Brunswick haben Mallmann [30] und Slanetz [37], zwei hervorragende Forscher auf diesem Gebiet, dieses Problem in zwei Artikeln besprochen. Eine umfassende Uebersicht hat auch Kjellander [22] in seiner 1960 veröffentlichten Dissertation gegeben. Eine Reihe hemmender Substanzen, wie Tellurit, Thalliumacetat, Aethylviolett, Natriumazid u. a., sind geprüft worden. Die meisten modernen Medien scheinen jedoch auf Natriumazid zu basieren, die Konzentration dieser Substanz variiert in den verschiedenen Untersuchungen von 0,01 bis 0,04 %. Es ist jedoch unklar, welches dieser azidhaltigen Medien vorzuziehen ist, da grössere vergleichende Untersuchungen fehlen und auch nicht alle bekannteren Medien geprüft worden sind. Bei einem von Croft 1959 [13] durchgeführten Vergleich, an dem acht Laboratorien teilnahmen, gab (AD) Azid-Dextrose-Bouillon mit (EVA) Aethylviolett-Azid-Bouillon als konformierendes Medium die gleiche Ausbeute wie M-Enterococcen-Agar. Gepufferte Azid-Glyzerin-Glukose (Bagg) führte bei 20,8 % der untersuchten Wasserproben zu einem niedrigeren Ergebnis. In diesen Vergleich nicht einbezogen waren indessen neue Medien wie das von Kenner, Clark und Kabler [21] oder das von Colobert und Morelis [10]. Kenner et al. haben bei ihrem eigenen Vergleich gefunden, dass ihr Medium dem M-Enterococcen-Agar sowie der Bagg-Bouillon und der AD-EVA-Bouillon überlegen ist. Andererseits hat Slanetz, der das M-Enterococcen-Agar eingeführt hat, sein Medium dem von Kenner nicht unterlegen gefunden. Kjellander hat schliesslich noch ein neues Medium eingeführt. Es enthält Natriumazid als hemmende Substanz, aber ausserdem Sorbitol. Der Grund dafür ist, dass es verschiedene Arten von Streptococcen bei Mensch und Tieren gibt und dass die Frequenz sorbitolgärender Streptococcen beim Menschen bedeutend höher ist, als bei Tieren. Nach Kjellander kann man mit diesem Medium eine Auffassung bekommen, nicht nur darüber, ob eine Verunreinigung vorliegt, sondern auch über ihre Herkunft.

Mit Rücksicht auf die noch herrschenden Zweifel betreffend die geeignete Form des Streptococcen-Testes, ist dieser nicht als Routinemethode in den offiziellen Vorschriften eingeführt. In Report 71 sind indessen zwei Medien dafür angegeben: ein Natriumazid-Medium nach Hannay und Norton und eine Tellurit-Laktose-Bouillon.

Standard Methods nennen den Streptococcen-Test

als eine Methode im Versuchsstadium und empfehlen drei Medien, die alle Natriumazid enthalten. Zwei davon sollen für den Röhrchen-Test verwendet werden nach der gleichen Technik, die für die coliformen Bakterien gebräuchlich ist. Die Wasserprobe, die untersucht werden soll, wird dabei zunächst in eine Serie Röhrchen mit Azid-Dextrose-Bouillon (Mallmann und Seligmann) gebracht, und die Röhrchen werden bei 35 °C 24, eventuell 48 Stunden bebrütet. Diejenigen Röhrchen, die Wachstum aufweisen, werden sodann in Aethylviolett-Azid, Bouillon (Litsky, Mallmann, Fifield) bei 35 °C 48 Stunden subkultiviert. Trübung oder eine purpurfarbene, scheibenförmige Ausfällung am Boden des Röhrchens wird als Beweis für das Vorkommen von Enterococcen gewertet. Das dritte Medium, M-Enterococcen-Agar (Slanetz, Bartley) ist für Membranfilter bestimmt. Das Membranfilter wird, nachdem die Wasserprobe hindurchgesaugt worden ist, direkt auf Platten mit diesem Medium gelegt und bei 35 °C 48 Stunden bebrütet. Alle roten und rosa Kolonien werden als Enterococcen gerechnet. Die Auszählung der Kolonien soll bei etwa zehnfacher Vergrößerung durchgeführt werden.

Clostridium welchii

Es ist seit langem wohlbekannt, dass *Clostridium welchii* im Darm des Menschen und warmblütiger Tiere vorkommt. *Clostridium welchii* tritt daher auch im Abwasser auf, und mehrere Forscher, wie z. B. Wilson in England, haben deshalb vorgeschlagen, den Organismus als Indikatorbakterium bei Wasseruntersuchungen zu verwenden. Mehrere Forscher fanden es indessen schwer, eine Korrelation zwischen coliformen Bakterien, *Cl. welchii* und dem Verunreinigungsgrad eines Wassers nachzuweisen. Das quantitative Vorkommen von *Cl. welchii* im Darm ist auch niedrig im Vergleich mit coliformen Bakterien, was den Test naturgemäss weniger empfindlich macht. Andererseits sind die Sporen sehr resistent, was ermöglicht, eine Verunreinigung auch in solchen Situationen nachzuweisen, wo die coliformen Bakterien auf Grund ungünstiger äusserer Bedingungen zugrunde gegangen sind. Das kann beim Studium von biologischen Reinigungseffekten wertvoll sein, z. B. bei Abwasserreinigung oder in verhältnismässig reinen Gewässern, wo eine Verunreinigung weit zurück liegt. Inwieweit solche Situationen bei der Analyse von verschmutzten Oberflächenwässern auftreten, kann in Frage gestellt werden. In jüngerer Zeit hat Bonde [3] umfassende Studien an *Cl. welchii* ausgeführt und die Frage seiner Anwendbarkeit als Indikatororganismus erneut aktualisiert. In den offiziellen Anweisungen findet man auch nicht unerwartet nur in Report 71 einen Hinweis auf Substrate. Zwei Medien werden empfohlen, von denen das eine zu sogenannter stürmischer Fermentation in Lackmusalb und das andere zu Sulfidreduktion auf der Basis von Natriumsulfat und Eisensulfat führt. Bonde hat diese Medien mit kleineren Modifikationen bei seiner Arbeit verwendet.

Untersuchung von pathogenen Bakterien

Der direkte Nachweis von pathogenen Bakterien im Wasser gibt zweifellos eine adäquatere Aufklärung über die Ansteckungsgefahr eines Wassers als nur Indikatororganismen. Das Interesse für diese Untersuchungsform hat auch in den letzten Jahren stetig zugenommen, und es existieren mehrere Methoden. Collet und Mitarbeiter [9] verwenden Membranfilter und filtrieren 1 bis 2 Liter Wasser. Das Membranfilter wird dann auf ein geeignet selektives Salmonella-Shigella-Medium gebracht, das bei 37 °C 48 Stunden bebrütet wird.

Eine andere Methode ist die sogenannte Hyflo-Super-cel, die auf Kieselgur basiert. Um die Filterkapazität zu erhöhen und Blockierung des Filters zu verhindern, kann die Kieselgur dem Wasser direkt zugesetzt werden. Die Kieselgur kann sodann in ein flüssiges Anreicherungsmedium überführt werden oder die Züchtung kann direkt auf festem Salmonella-Shigella-Medium geschehen.

Eine wertvolle Methode scheint auch Moores [34] sogenannter «sewage swab» zu sein. Dabei wird der «swab» direkt in das Wasser, das untersucht werden soll, ausgesetzt und mehrere Tage exponiert. Bakterientragende Partikel bleiben im «swab» hängen, und indem dieser in ein selektives Anreicherungsmedium überführt wird, kann man aus diesem Medium später pathogene Organismen herauszüchten. Dies ist eine handliche Methode, allerdings ist sie nur vom qualitativen, aber nicht vom quantitativen Gesichtspunkt aus befriedigend.

Verdächtige Bakterienkolonien, die auf den verschiedenen Nährböden wachsen, werden mit bekannten Methoden biochemisch und serologisch verifiziert.

Die Fluoreszenztechnik ist ein interessanter Zusatz in der bakteriologischen Diagnostik. Mit ihrer Hilfe ist es denkbar, eine pathogene Bakterie in einem Wasser auf bedeutend schnellere Weise als bisher zu diagnostizieren.

Am Bakteriologischen Institut in Uppsala sind verschiedene Methoden für die Untersuchung von verschmutzten Oberflächenwässern geprüft worden. Membranfilter erwiesen sich auf Grund zu langer Filtrierzeiten als weniger geeignet. Moores «sewage swab» ergab die besten Resultate. Die Fluoreszenzmethode erwies sich als voll verwendungsfähig und war, nach allem zu urteilen, empfindlicher als die konventionellen Methoden. Ihr Nachteil ist zurzeit mangelhafte Spezifität betreffend Salmonellabakterien auf Grund von Mitagglutination.

Vorschlag

für von der Föderation Europäischer Gewässerschutz zu empfehlende Methoden

Betreffend diese Aufgabe haben die Berichtersteller gefunden, dass grosse Schwierigkeiten vorliegen. Wie aus der vorgelegten Uebersicht hervorging, existieren eine Reihe verschiedener Medien und Bestimmungsmethoden für jeden Typ von Untersuchung. In

verschiedenen Ländern hat man verschiedene Wege gesucht, und lokale Traditionen haben sich herausgebildet. Als Beispiel dafür mag genannt werden, dass die Mac-Conkey-Bouillon seit über 50 Jahren in England im Gebrauch ist. Man kann erwarten, dass sehr überzeugende Beweise vorgelegt werden müssen, bevor eine wohl eingearbeitete Methode aufgegeben wird. Es muss deshalb leider festgestellt werden, dass vergleichende Untersuchungen unter völlig gleichwertigen Bedingungen ausserordentlich selten sind, und kaum eine davon ist ganz einwandfrei. Es ist erstaunlich, dass so wichtige Angaben wie die Herkunftsbezeichnungen von Pepton und Hefe- und Fleischextrakt, die in das Medium eingehen, oft fehlen. Aus diesem Gesichtspunkt wäre ein wohl definiertes, ganz synthetisches Medium, wie z. B. das von Burman und Oliver, das auf Glutaminsäure basiert, für die Colidiagnostik vorzuziehen. Für dieses Medium fehlen jedoch bis jetzt restlos überzeugende Resultate, und verschiedene Forscher sind zu verschiedenen Schlussätzen gelangt. Gegen diesen Hintergrund scheint es eine besonders angelegene Aufgabe für die FEG, zu solchen vergleichenden Untersuchungen anzuregen. Von schwedischer Seite erklären wir uns gern bereit, an einer solchen internationalen Zusammenarbeit teilzunehmen.

Unser Vorschlag ist im Einvernehmen mit Professor H. Lundbäck und Professor L. O. Kallings am Staatlichen Bakteriologischen Laboratorium in Stockholm gemacht. Er stimmt im wesentlichen mit den offiziellen Normen überein, die heute in Schweden für Wasseranalysen gelten. Betreffend die Bestimmung von coliformen Bakterien und *E. coli* werden zwei Alternativen vorgelegt. Die eine entspricht der Methode, die in Schweden gebräuchlich ist, die andere dem Vorschlag, welcher von der OECD Working Party in Paris im November 1963 vorgelegt wurde. Dieses Komitee hat praktisch auf das selbe Ziel hingearbeitet, wie die FEG, nämlich eine Standardisierung der Untersuchungsmethoden, und wir haben es deshalb für richtig befunden, seinen Vorschlag hier als Alternative zu unserem eigenen aufzustellen.

Diejenigen Medien und Methoden, welche nach Auffassung der Berichtersteller in Frage kommen sollten, werden im folgenden aufgeführt und begründet.

1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Es ist üblich, in irgendeiner Form die Gesamtzahl der Bakterien in einer Wasserprobe zu bestimmen. Ihrem Wert kann indessen keine so grosse Bedeutung zugemessen werden, als dass mehr als ein Typ von Medium angewandt zu werden brauchte. Es ergibt sich dabei als am natürlichsten, das Gelatinemedium wegzulassen. Dieses Medium ist nicht ganz leicht herzustellen und auch die wechselnde Qualität der Gelatine bereitet zusätzliche Schwierigkeiten. Ferner kann reichliches Auftreten von gelatineverflüssigenden Bakterien die Auszählung stören. Mit Rücksicht darauf erscheint es geeigneter, die Gesamtkeimzahl auf einem

agarhaltigen Medium zu bestimmen. Die Bestimmungen sollten ausgeführt werden teils mit Bebrütung bei etwa 22 °C und Auszählung nach drei Tagen, teils mit Bebrütung bei 35 °C und Auszählung nach einem Tag. Die niedrigere Temperatur von 35 °C wurde aus praktischen Gründen gewählt, da sie auch für die Bestimmung von coliformen Bakterien empfohlen werden wird.

2. Bestimmung von coliformen Bakterien und *E. coli*

Wir haben gefunden, dass gegenwärtig die Gär-röhrchen-Methode die meisten Vorteile bietet. Sie ist gut eingearbeitet und in allen Ländern bekannt, die mit bakteriologischen Wasseranalysen arbeiten. Als erste Alternative möchten wir die in Schweden eingeführte Routinemethode nennen. Für coliforme Bakterien umfasst dieser Vorschlag sowohl einen präsumtiven als auch einen konfirmativen und einen kompletten Test. Als Medium möchten wir ein reines Laktosemedium ohne Zusatz von hemmenden Substanzen empfehlen. Hierdurch kann zwar eine höhere Frequenz falscher positiver Proben beim präsumtiven Test erwartet werden, aber das dürfte durch eine grössere Ausbeute an coliformen Bakterien aufgewogen werden. Ein Medium von diesem Typ fordert jedoch Verifizierung mit einem konfirmativen Test von weiterem Umfang. Dabei sollten nach unserer Auffassung in jeder Serie, wo Säure- und Gasbildung auftritt, alle Röhrchen, die Trübung zeigen, ausgestrichen werden. Für den konformativen Test können sowohl Endoagar als auch Brillantgrün-Röhrchen angewendet werden. Betreffend die Bebrütungstemperatur schliessen wir uns der amerikanischen Auffassung an, dass sie 35 °C sein sollte, da dabei eine signifikant grössere Ausbeute an coliformen Bakterien gewonnen wird. Für *E. coli* empfehlen wir Direktbebrütung in reiner Laktosebouillon bei 44 °C. Man trifft gelegentlich die Auffassung, dass dies eine etwas niedrigere Ausbeute gäbe, aber es ist auf jeden Fall ein Vorteil, dass die ganze Untersuchung gleichzeitig auf einem einheitlichen Medium durchgeführt wird.

Als Alternative zu diesem Vorschlag haben wir die vom Pariser Komitee empfohlene Methode gewählt. Sie basiert auf Mac-Conkey-Bouillon für die präsumtive Züchtung, und für die konfirmative Züchtung wird Brillantgrün-Bouillon verwendet. Der Nachweis von *E. coli* geschieht durch Sekundärzüchtung auf Brillantgrün-Bouillon bei 44 °C.

Betreffend den Vorschlag des Pariser Komitees können keine Detailanweisungen gegeben werden, da solche im Rapport fehlen. Das Prinzip für die Methode ist in diesem Bericht bereits berührt worden.

3. Uebrige Methoden

Die Membranfiltermethode ist in vieler Hinsicht interessant. Sie ist indessen noch nicht reif für eine routinemässige Anwendung. Ein sehr wesentlicher Einwand ist, dass sie Resultate ergibt, die mit denen der Röhrchen-Methode nicht ganz übereinstimmen. Die

sanitäre Beurteilung eines Wassers baut heute im wesentlichen auf einer umfangreichen, gesammelten Erfahrung von Untersuchungen mit der Röhrchen-Methode. Bevor die Membranfilter sie ersetzen können, ist eine sehr weitgehende Uebereinstimmung zwischen den beiden Methoden erforderlich. Diese Situation ist bisher noch nicht eingetroffen.

Weder die Enterococcen- noch die Clostridien-Teste können bislang als genügend ausgeprobt angesehen werden, um als Routinemethode eingeführt zu werden.

Die Bestimmung der pathogenen Mikroorganis-

men in einem Wasser kann heute mit einer Reihe verschiedener Methoden relativ leicht durchgeführt werden. Die meisten davon bauen auf Filtrierung von Wasser und Sekundärzüchtung in selektiven Medien von gebräuchlichem Typ. Moores «swab» ist einfach und zuverlässig, liefert aber keine Angaben über die Quantität der untersuchten Bakterien. Die Fluoreszenztechnik bietet offensichtlich neue, interessante Möglichkeiten. In Erwartung der kommenden Entwicklung erscheint es nicht angebracht, eine spezielle Methode für Routinegebrauch zu empfehlen.

Literatur

1. Allen L. A., Pasley G. M., Pierce M. A. F.: J. Gen. Microbiol. 7:257, 1952.
2. Boizot G. E.: J. Hyg. 41:566, 1941.
3. Bonde G. J.: Bacterial Indicators of Water Pollution. Teknisk Förlag, Copenhagen, 1962.
4. Burman N. P.: Proc. Soc. Water Treatment and Exam. 4:10, 1955.
5. Burman N. P.: Proc. Soc. Water Treatment and Exam. 9:60, 1960.
6. Burman N. P., Oliver C. W.: Proc. Soc. Appl. Biol. 15:1, 1952.
7. Clark W., Lubs H.: J. Inf. Dis., 17:160, 1915.
8. Clegg L. F. L.: J. Path. Bact. 53:51, 1941.
9. Collet E., Johnston R., Leo F., Croft C. C.: A.J.P.H. 43:1438, 1953.
10. Colobert L., Morelis P.: Ann. Inst. Pasteur, 94:120, 1957.
11. Conn H. W.: Publ. Health Rep. 30:2349, 1915.
12. Cooper K. E., Linton A. H.: Monthly Bull. Ministry Health Service. 6:204, 1947.
13. Croft C. C.: A.J.P.H. 49:1379, 1959.
14. Fleming A.: J. Path. Bact. 35:831, 1932.
15. Gray R. D.: J. Hyg. 57:249, 1959.
16. Hajna A. A.: Publ. Health Lab. 9:80, 1951.
17. Harold C. H.: Annual Rep. Metropolitan Water Bd., London 31st, 1936. Her Majesty's Stationary Office, London.
18. Houghten G. U.: Proceedings Rudolfs Research Conference, June 1961. New Brunswick, N. J.
19. Jameson J. E., Emberley N. W.: J. Gen. Microbiol. 15:198, 1956.
20. Jebb W. H. H.: J. Hyg. 57:184, 1959.
21. Kenner B. A., Clark H. F., Kabler P. W.: Appl. Microbiol. 9:15, 1961.
22. Kjellander J.: Enteric Streptococci as Indicators of Fecal Contamination of Water. Acta Path. et Microbiol. Scandinav. Suppl. 136, vol. 48, 1960.
23. Lattanzi W. E., Mood E. W.: Sew. and Ind. Wastes, 23:1154, 1951.
24. Litsky W., Mallman W. L., Fifield C. W.: A. J. P. H. 43:873, 1953.
25. Litsky W., Rosenbaum M. I., France R. L.: Appl. Microbiol. 1:247, 1953.
26. Ljutov V.: Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 46:349, 1959.
27. Ljutov V.: Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 51:369, 1961.
28. Mackenzie E. F. W.: 33rd Ann. Rep. Dir. Water Exam. Mit Water Bd. London, 1938.
29. Mackenzie E. F. W., Taylor E. W., Gilbert W. E.: J. Gen. Microbiol. 2:197, 1948.
30. Mallman W. L.: Proceedings Rudolfs Research Conference June 1961. New Brunswick, N. J.
31. Mallman W. L., Darby C. W.: A. J. P. H. 31:127, 1941.
32. Mallman W. L., Seligmann E. B.: A. J. P. H. 40:286, 1950.
33. McCarthy J. A.: Proceedings Rudolfs Research Conference June 1961. New Brunswick, N. J.
34. Moore B., Perry E. L., Chard S. T.: J. Hyg. 50:137, 1952.
35. Public Health Laboratory Service Water Sub-Committee 56:377, 1958.
36. Raghavachari T. N. S., Iyer P. V. S.: Indian J. Med. Res. 26:867, 1939.
37. Slanetz L. W.: Proceedings Rudolfs Research Conference June 1961, New Brunswick, N. J.
38. Slanetz L. W., Bartley B. H.: J. Bact. 74:591, 1957.
39. Stark C. N., England C. W.: J. Bact. 29:26, 1935.
40. Thresh, Beale, Surkling (Revised by E. W. Taylor). The Examination of Waters and Water Supplies, 7th Ed. J. A. Churchill 1958.
41. Wilson C. G. et al.: Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. London, No. 206, 1935.
42. Windle, Taylor E.: J. Hyg. 53:50, 1955.
43. McGrady: A. J. P. H. 33, 1199, 1943.