[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.]
(Direktor: Prof. KISSKALT.)

Die Berechnung des Colititers mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsrechnung.

Von

Dr. F. Schütz,

Leiter des Untersuchungsamtes für ansteckende Krankheiten im Reg.-Bez. Königsberg i. Pr.

Der Wert des Colititers steht, so umstritten seine Bedeutung im allgemeinen auch ist, für ganz bestimmte Zwecke doch fest. Bei ein und demselben Wasser z. B. liefert eine fortlaufende Beobachtung mit Hilfe des Colititers sehr brauchbare Werte. Auch bei Desinfektionsversuchen, bei denen Wasser mit Colibazillen künstlich infiziert wird, ist der Colititer gut brauchbar. So haben auch wir (9) bei der Untersuchung über die Einwirkung von Ozon auf die Reinigung von Flußwasser mit dem Colititer gute Erfahrung gemacht.

Eine wesentliche Erleichterung für das Arbeiten mit dem Colititer hat uns die Angabe von Flügge(1) gebracht, der bekanntlich einen für diese Zwecke besonders geeigneten Nährboden empfohlen hat. Er löst 5^{grm} Milchzucker und 2.5^{grm} Pepton in 100^{ccm} Wasser und fügt zu dieser Flüssigkeit 0.11^{grm} Azolithmin, die schon vorher in 3^{ccm} Wasser gelöst waren. Diese Flüssigkeit ist nun noch nicht selbst der Nährboden, in dem die Colibazillen wachsen sollen; er wird es vielmehr erst dadurch, daß er aufs Zehnfache verdünnt wird, wozu man in der Regel gleich das zu untersuchende Wasser benutzt. Man bringt daher von der an drei aufeinander folgenden Tagen im Dampftopf je 20 Minuten lang sterilisierten Stammlösung eine bestimmte Menge zu dem Zehnfachen des zu untersuchenden Wassers, also z. B. 10^{ccm} zu 100^{ccm} Wasser, 100^{ccm} zu 1 Liter Wasser. Die gesamte mit Nährlösung vermischte Menge wird nun

entweder ganz oder nur zum Teil weiter untersucht in der Weise, daß Proben zu 100, 10^{ccm} und noch weniger oder auch in anderen beliebig zu wählenden Abfüllungen während 24 Stunden bei 37 Grad aufgestellt werden. Infolge seiner Eigenschaft den Milchzucker unter Säurewirkung zu vergären, wird der Colibacillus jede Probe röten, in der er auch nur in einem einzigen Exemplar vorhanden war. Aus der Anzahl der geröteten Abfüllungen wird dann diejenige Menge Wasser berechnet, die im Durchschnitt gerade einen Colibacillus enthält. Diese Zahl stellt bekanntlich den Colititer dar.

Wie schon oben erwähnt, haben wir selbst mit den Arbeiten auf die eben geschilderte Art und Weise bei unseren Untersuchungen nur gute Erfahrungen gemacht. Der Nährboden erwies sich als äußerst empfindlich und reagierte leichter als z. B. Bouillon oder Agar, bei denen der Nachweis von Colibazillen nicht so gut gelang. Andere in unserem Institut angestellte Versuche ergaben das gleiche in betreff des Eijkman-schen (2) und Bulirschens (3) Nährbodens, die beide bei 46 Grad arbeiten. Auch diese erwiesen sich als unterlegen dem Flüggeschen Nährboden, wie in eingehenden Versuchen festgestellt wurde. Wir sind daher durchaus berechtigt, dem Flüggeschen Nährboden bei der Bestimmung des Colititers vor anderen den Vorzug zu geben, um so mehr, als es nicht immer möglich sein wird, den großen Coliapparat von Marmann (4) zu verwenden.

Während nun im großen und ganzen die Bestimmung des Colititers mit dem Breslauer Nährboden nach den Anweisungen Flügges ganz leicht vonstatten geht, man aus der Anzahl der geröteten Proben sofort auf die Anzahl von Colibazillen schließen kann, ergeben sich bei genaueren Arbeiten einige Schwierigkeiten, auf die einzugehen Zweck vorliegender Mitteilung ist.

Auf die erste, allerdings sehr leicht zu behebende Schwierigkeit stößt man, wenn sehr viele Colibazillen im Wasser vorhanden sind, so daß auf 5^{ccm} schon mehr als ein Colibacillus kommt. Man muß dann kleinere Abfüllungen aufstellen, die natürlich nicht ebenso hergestellt werden können wie die 5, 10 und noch mehr Kubikzentimeter Wasser enthaltenden Proben. Aus allgemeinen Gesichtspunkten empfiehlt es sich überhaupt, nicht weniger als 5^{ccm} Gesamtflüssigkeit in einem einzelnen Röhrchen aufzustellen. Um nun auch Proben, die weniger Wasser als 5^{ccm} enthalten, mit in Rechnung ziehen zu können, verdünnt man die Stammlösung selbst erst mit sterilem destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 und füllt in Röhrchen zu 10^{ccm} ab. In diese Röhrchen wird die gewünschte Menge Wasser hineingeimpft, die man jetzt so klein, wie man irgend will, z. B. 1, 0.5, 0.1 usw. Kubikzentimeter wählen kann. Die Bestimmung des

Colititers auch in kleineren Mengen als 5 ^{ccm} wäre also mit dem beschriebenen Kunstgriff leicht behoben.

Anders stehen die Dinge nun bei der Berechnung des Titers selber, und gerade in diesem Punkt sind die Angaben in der Literatur äußerst dürftig. Dies mag jedoch im folgenden seine Begründung haben: Die ersten Autoren, die mit dem Colititer gearbeitet haben, wie Petruschky und Pusch(5) gingen so vor, daß sie in eine Nährlösung von dem zu untersuchenden Wasser hineinimpften 100, 10, 1, 0.1, 0.01 ^{ccm} und noch geringere Mengen. Von jeder Größenordnung wurde nur eine Probe aufgestellt, und die kleinste Menge Wasser, bei der Coli noch nachgewiesen werden konnte, war dann der Colititer; so arbeiteten auch noch Konrich(6) und Oettinger(7). Es war nun bei der Angabe des Colititers, worauf besonders Oettinger hinweist, darauf zu achten, daß wenn z. B. die Einerprobe ein Vorhandensein, die Zehntelprobe ein Fehlen von Colibazillen angab, in einem Kubikzentimeter sicherlich ein Bacillus vorhanden war. Wahrscheinlich aber waren zu gleicher Zeit weniger als 10 Exemplare vorhanden, denn sonst hätte ja auch die Zehntelprobe positiv ausfallen müssen. Bestimmte man daher den Colititer zu 0.01 ^{ccm}, so bedeutete diese Angabe, daß in einem Kubikzentimeter Wasser 100 bis 1000 Colikeime enthalten waren. Der Titer bewegte sich daher immer nur zwischen Grenzwerten, die weit auseinander lagen und zur feineren Bestimmung derjenigen Menge Wassers, die nun wirklich einen einzigen Colikeim enthielt, nicht herangezogen werden konnten.

Wollte man den Titer genauer bestimmen, so mußten unbedingt Abfüllungen benutzt werden, die in ihrer Menge zwischen den bis dahin bei diesen Untersuchungen üblichen einzelnen Proben lagen. Man ging also dazu über, außer den bisher gebrauchten auch Fünzfziger-, Fünfer-, Zweier-Proben anzusetzen; endlich beschränkte man sich auch nicht mehr auf eine einzige Probe in jeder Größenordnung, sondern stellte namentlich in der Zehner- und der Einer-Ordnung mehrere Proben auf. Flügge(1) empfahl Aufstellungen von 10 mal 1 ^{ccm}, 5 mal 2 ^{ccm}, 2 mal 5 ^{ccm} und 2 mal 10 ^{ccm}. Mehrere von den kleineren Abfüllungen zusammengerechnet ergaben, worauf z. B. Kisskalt(8) in seinem weiter unten erwähnten Beispiel besonders aufmerksam macht, eine Abfüllung von einer höheren Größenordnung. Es ist klar, daß jetzt eine neue Methode gefunden werden mußte, den Colititer zu berechnen. Flügge selbst gibt bei der Mitteilung seines Nährbodens keine Norm an. Ein schönes Beispiel, wie die Berechnung des Colititers bei einer derartigen Versuchsanordnung zu geschehen hat, findet sich jedoch bei Kisskalt. Es heißt da:

„Sind Colibazillen gefunden in 100, 50, 2 mal 10, 1 mal 10, 1 mal 1 ^{ccm}, dagegen nicht in 2 mal 10, 5, 4 mal 1 ^{ccm}, so haben sich in diesem

Fälle stets Bazillen gezeigt in 100 und 50^{cem}, nicht stets in 10^{cem}, sondern nur 3 mal (5 und 5 mal 1^{cem} ergänzen sich auf 10^{cem}). In 50^{cem} sind also 3 Colibazillen; in 16·67^{cem} ist mithin 1 Bacillus gewesen.“

Der Titer ist also in dem Kiskaltschen Beispiel 16·67^{cem}. Versuchsanordnung wie Berechnung des Colititers stellen gegenüber den alten Anschauungen einen ganz wesentlichen Fortschritt dar. Allein auch sie genügen noch nicht allen Eventualitäten.

So einleuchtend nämlich die geschilderte Berechnungsart unter einfachen Verhältnissen auch erscheint, so wenig befriedigt sie bei verwickelter Lage der Dinge. Nehmen wir z. B. nur an, daß in dem oben erwähnten Fall die Probe zu 50^{cem} blau geblieben wäre — ein, wie sich bei längeren Arbeiten herausstellt, gar nicht seltenes Ereignis —, so hätten sich Bazillen gezeigt stets in 100^{cem}, dagegen nicht in 50^{cem}. Wir hätten also Rötung und damit Colibazillen gefunden in der Hunderter-Probe einmal, in den Zehner-Proben zweimal und in den Einer-Proben wieder einmal, im ganzen also viermal. Die untersuchte Wassermenge, in der diese Rötungen beobachtet wurden, betrug 200^{cem}; darin sind, wie gesagt, viermal Colibazillen gefunden, der Titer beträgt demnach $200^{\text{cem}} : 4 = 50^{\text{cem}}$. Nun ist aber noch eine andere Berechnungsart möglich. Man faßt zu diesem Zweck alle Proben mit Ausnahme der Hunderter zusammen, weil sich ja in 100^{cem} stets Bazillen gezeigt hatten. Der Titer ist so zu berechnen, daß 100^{cem} durch 3 geteilt werden, was 33^{cem} ergibt. Dies Resultat weicht von dem vorigen sehr ab und ist nur dadurch zustande gekommen, daß die gerötete 100^{cem} Probe einmal mit in Rechnung gesetzt worden ist, einmal nicht. Endlich aber besteht nun noch die dritte Möglichkeit, daß bei einem Ausfall der Reaktion wie eben angenommen, ein Bacillus schon auf 16·67^{cem} kommt, und damit der im vorherigen Absatz berechnete Titer zu Recht besteht. Wie nämlich weiter unten auseinandergesetzt werden wird, braucht ein Fünfziger-Kölbchen durchaus nicht immer gerötet zu sein, wenn schon 17^{cem} Wasser einen Bacillus enthalten. Zusammenfassend kann man also sagen, daß vor allen Dingen Unklarheit darüber herrscht, wie weit man bei der Berechnung die Proben zu einem Ganzen zusammenfassen soll. Ferner wurde bisher überhaupt nicht darauf Rücksicht genommen, daß bei einer Versuchsanordnung, wie eben beschrieben, in der Reihe der aufgestellten Proben „Springer“ — blau gebliebene Proben inmitten der geröteten — gar nicht so selten zu beobachten sind.

Fragt man sich nach der Ursache der verschiedenen Resultate, so kann nur ein Punkt für das Zustandekommen der Abweichungen maßgebend gewesen sein. Es wurde bei der Berechnung allen geröteten Proben bis zu einer im einzelnen Fall jedesmal anscheinend willkürlich

neu zu wählenden Grenze dasselbe Gewicht beigelegt, gleichgültig, ob die Rötung in der Hunderter- oder nur der Einer-Probe aufgetreten war. Es ist ja klar, daß die Berechnungsart wohl am Platze ist, wenn die Grenzen der für die Berechnung zusammenzufassenden Proben nicht zu weit auseinander liegen. Anders ist es jedoch, wenn, wie bei der vorliegenden Annahme, die Fünzfziger-Probe blau geblieben ist, so daß die Rötung des Hunderter-Kölbchens ebenso wie die des Einer-Röhrchens bewertet wird.

Hier zeigt nun die Wahrscheinlichkeitsrechnung, wie auch diese Schwierigkeit überwunden wird. Sie zeigt vor allen Dingen nämlich, daß wir ganz und gar nicht erwarten dürfen, in dem Doppelten derjenigen Wassermenge, die einen Bacillus enthält, auch wieder ein Exemplar im Minimum vorzufinden. Bezeichnet n die Anzahl Kubikzentimeter, die im Durchschnitt einen Bacillus enthält, so ist die Wahrscheinlichkeit (W) für das Eintreten bzw. die Wahrscheinlichkeit (U) für das Nichteintreten des Farbumschlages, wobei sich $W + U$ zu 1 ergänzen:

Volumen	W	U	Volumen	W	U
0.1 n	0.095	0.905	1.8 n	0.835	0.165
0.2	0.181	0.819	2.0	0.865	0.135
0.3	0.259	0.741	2.2	0.889	0.111
0.4	0.330	0.670	2.4	0.909	0.091
0.5	0.394	0.606	2.6	0.926	0.074
0.6	0.451	0.549	2.8	0.939	0.061
0.7	0.503	0.497	3.0	0.950	0.050
0.8	0.551	0.449	3.5	0.970	0.030
0.9	0.593	0.407	4.0	0.982	0.018
1.0	0.632	0.368	4.5	0.989	0.011
			5.0	0.993	0.007
1.2	0.699	0.301	5.5	0.996	0.004
1.4	0.753	0.247	6.0	0.998	0.002
1.6	0.798	0.202			

Die Berechnung der Tabelle wird in der Weise vorgenommen, daß z. B. $U(2.6 n)$ gleich $e^{-2.6}$ ist; e ist ein unendlicher Dezimalbruch (die Basis der sog. natürlichen Logarithmen), der auf fünf Stellen abgekürzt gleich 2.71828 ist. Man findet dann $U(1 n)$ gleich 0.368. W berechnet sich stets aus $1 - U$, also für $W(1 n)$ findet sich der Wert 0.632. $U(2 n)$ ergibt sich aus $0.368 \times 0.368 = 0.135$, $U(3 n)$ aus $0.135 \times 0.368 = 0.050$ usw., mit einem Wort, alle übrigen Zahlen für U ergeben sich als Potenzen von 0.368.

Eine Betrachtung der Tabelle lehrt nun, daß bei n cem selbst der Farbumschlag nur mit einer W von 0.632 eintritt, bei 2.0 n ist W erst gleich 0.865, bei 3 n gleich 0.950. Man kann daraus sehr deutlich

ersehen, wie leicht sogenannte Springer in der Reihe der Proben vorkommen. Aus der Tabelle wird ferner ersichtlich, welches Gewicht den einzelnen geröteten Proben zukommt, je nachdem, ob sie $1n$, $2n$ usw. Kubikzentimeter enthalten.

Nachdem wir gesehen haben, daß die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Farbumschlags in dem Vielfachen derjenigen Wassermenge, die gerade einen Bacillus enthält, weit hinter dem von vornherein anzunehmenden zurückbleibt, erhebt sich die Forderung, es möglichst zu vermeiden, in einer Ordnung nur eine einzige Probe aufzustellen. Das Bestreben muß vielmehr dahin gehen, in jeder Ordnung recht viele einzelne Proben zu haben, um Zufälligkeiten möglichst aus dem Wege zu gehen. Allerdings wird dieses Bestreben in der Praxis dadurch begrenzt werden, daß für ein und dasselbe Wasser immer nur eine nicht allzugroße Anzahl von Proben aufgestellt werden können. Man wird also in dieser Hinsicht ein gewisses Übereinkommen treffen müssen, nach dem in der Praxis dann zukünftig gearbeitet wird.

Wir möchten zu diesem Zweck vorschlagen, sich bei den Proben in jeder Ordnung auf 10 zu beschränken und es so einzurichten, daß immer 10 Proben der einen Ordnung gleich einer Probe der nächst höheren Ordnung sind. Bei der Ordnung mit der größten Wassermenge — meistens wohl 100 ccm —, kann es bei einer einzigen Probe bleiben. Für gewöhnlich hätte man dann bei der Untersuchung eines Wassers anzusetzen:

eine Probe zu 100 ccm ,
 10 Proben zu 10 ccm ,
 10 Proben zu 1 ccm .

In jeder Ordnung ist dann die Anzahl Röhrchen hinreichend groß genug, daß die Wahrscheinlichkeit, mit der das betreffende Resultat erhalten worden ist, gut berechnet werden kann. Sind z. B. in der Zehner-Ordnung von 10 Proben 6 gerötet, so ist die Wahrscheinlichkeit $\frac{6}{10} = 0.6$. Diese Wahrscheinlichkeit findet sich nicht ganz genau, aber doch annähernd in der mitgeteilten Tabelle. Wir nehmen den nächstliegenden Wert aus der Spalte W zu 0.593. Hierfür beträgt, wie aus der linken Kolonne an entsprechender Stelle zu ersehen ist, das Volumen $0.9n$. Die Ordnung der Reihe, für die die eben berechnete Wahrscheinlichkeit gilt, nämlich 10 ccm , ist also gleich $0.9n$. Folglich:

$$\begin{aligned} 9n &= 100, \\ n &= 100:9 = 11.1\text{ ccm}. \end{aligned}$$

In dem angenommenen Falle ist also schon in 11.1 ccm 1 Colibacillus enthalten.

Der Titer ist damit bestimmt, wenn die Einer-Reihe keine Rötung zeigt. Kommt aber auch hier ein Farbumschlag vor, so ist die Wahrscheinlichkeit für das erhaltene Ereignis und weiter daraus diejenige Anzahl Kubikzentimeter zu berechnen, die einen Bacillus enthalten, alles genau so, wie oben angegeben ist. Meistens werden die Resultate für die einzelnen Ordnungen sich gut decken oder doch nur ganz geringe Differenzen zeigen, wenn eben die oben beschriebene Versuchsanordnung befolgt wird. Will man das endgültige Resultat dann nochmals recht genau bestimmen, so kann von allen Werten das Mittel genommen werden, was aber, wie gesagt, wohl meistens nicht nötig sein wird. Die besten Resultate liefert immer die Ordnung, bei der sich annähernd die Hälfte der Röhren gerötet haben, also im Beispiel die Zehner-Ordnung (6 von 10). Wenn man eine solche Ordnung hat, kann man die übrigen getrost vernachlässigen, falls sich nicht etwa besonders auffällige Springer zeigen.

Durch die Einführung einer weiteren Tabelle kann man die Berechnung des Colititers noch mehr vereinfachen.

Wir hatten oben folgende Gleichung:

$$0.9n = 10,$$

aus der n durch Multiplikation beider Seiten der Gleichung mit 10 und Division durch 9 berechnet wurde. Diese beiden Rechnungen kann man nun dem einzelnen speziellen Fall vorweg nehmen, so daß aus dem neuen Wert multipliziert mit der Ordnung der Reihe — in unserem Fall 10 — sich der Titer ergibt. Bei zehn Röhrchen in jeder Ordnung sind, abgesehen, daß alle rot sind, neun verschiedene Fälle möglich. Entweder ist gerötet ein Röhrchen oder zwei oder drei usw. bis neun. Die Wahrscheinlichkeit beträgt also 0.1 oder 0.2 oder 0.3 usw. Für diese neun Zahlen finden sich entsprechende Werte in der Kolonne links für Volumen, stets n multipliziert mit einem Dezimalbruch. Wird dieses Produkt durch den Dezimalbruch dividiert, so findet man n und auf der andern Seite der Gleichung den reziproken Wert für den Dezimalbruch. Bezeichnet nun r die Anzahl der geröteten Röhrchen einer Ordnung, μ die reziproken Werte für die Dezimalbrüche, so ergibt sich folgende Tabelle:

r	μ	r	μ
1	9.5	6	1.1
2	4.5	7	0.8
3	2.8	8	0.6
4	2.0	9	0.4
5	1.4		

Mit den Zahlen für μ ist daher die Ordnungszahl zu multiplizieren, wenn der Titer berechnet werden soll. Sind also im Textbeispiel von

10 Proben 6 gerötet, so ist der Titer $= 10 \times 1.1 = 11^{\text{cem}}$. Sind von 10 Proben der Einer-Ordnung 2 gerötet, so ist der Titer gleich $1 \times 4.5 = 4.5^{\text{cem}}$. Bei Ordnungen nach dem Dezimalsystem ist demnach bei der betreffenden μ -Zahl nur der Punkt zu ändern, sonst ist eine kleine Multiplikation vorzunehmen. Auf jeden Fall dürfte die Bestimmung des Colititers mit der kleinen 9reihigen Tabelle äußerst einfach sein.

Durch unseren Vorschlag hoffen wir das Problem mit Hilfe mathematischer Grundsätze in einer auch in der Praxis wohl durchzuführenden Weise gelöst zu haben und dabei auch der Wirklichkeit näher gekommen zu sein, als es bisher der Fall war. Zu wünschen ist nur, daß die neue Berechnungsart sich bald einbürgert, damit auch an der Hand von praktischen Beispielen die Anwendbarkeit der neuen Methode dargetan werden kann.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Dr. Kaluza für die liebenswürdige Bereitwilligkeit zu danken, mit der er mir bei der speziell mathematischen Seite der Frage Unterstützung und Rat hat zuteil werden lassen.¹

¹ Anmerkung bei der Korrektur: Nach Fertigstellung der Arbeit erschien von Krombholz der erste Teil eines Aufsatzes „Über Keimzählung mittels flüssiger Nährböden mit besonderer Berücksichtigung der Colititerverfahren“ im *Archiv für Hygiene*. Bd. LXXXIV. 2. u. 3. Heft. In der Arbeit wird unter anderem auch das Problem des Colititers gestreift, dessen Ausfall bei Anstellung der Reaktion so oft zu scheinbaren Widersprüchen führte. Auch Krombholz findet mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsrechnung jedoch eine Lösung dieser Widersprüche, wenngleich über die Berechnungsart für den einzelnen Fall noch nichts Näheres mitgeteilt wird.

Der Verfasser.

Literatur-Verzeichnis.

1. Flügge, Die hygienische Kontrolle zentraler Wasserversorgung. *Zeitschrift für Med. Beamte.* 1908. Beilage: *Offizieller Bericht über die 25. Hauptversammlung des Preuß. Med. Beamtenvereins.* S. 20.
2. Eijkman, Die Gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung. *Zentralblatt für Bakteriologie.* I. Orig. 1904. Bd. XXXVII.
3. Bulir, Bedeutung und Nachweis des *Bact. coli* im Wasser und eine neue Modifikation der Eijkmanschen Methode. *Archiv für Hygiene.* 1907. Bd. LXII.
4. Marmann, Ein neues Verfahren zum quantitativen Nachweis des *Bact. coli* im Wasser. *Zentralblatt für Bakteriologie.* I. Orig. 1909. Bd. LVI.
5. Petruschky und Pusch, *Bacterium coli* als Indikator für Fäkalverunreinigung von Wässern. *Diese Zeitschrift.* 1903. Bd. XLIII. S. 304.
6. Konrich, Zur Bewertung des *Bacterium coli* im Wasser. *Klin. Jahrbuch.* 1910. Bd. XXIII. S. 1.
7. Oettinger, Die bakteriologische Kontrolle von Sandfilteranlagen. *Diese Zeitschrift.* 1912. Bd. LXXI.
8. Kiskalt, *Praktikum der Bakteriologie.* 3. Aufl. S. 103.
9. Schütz, Die Reinigung von Flußwasser mittels Ozon. *Ebenda.* 1915. Bd. LXXIX.