

## Standardarbeitsanweisung für den Nachweis von Mikroorganismen in flüssigen Proben

---

- Benötigte Materialien:
  - Membranfilterstand mit Vakuumpumpe
  - Pipetten mit sauberen Pipettenspitzen
  - Membranfilter (0,45 µm)
  - Pinzette
  - Schere oder Skalpell
  - Verschießbare 10 ml Gefäße zum Temperieren
  - Wasserbad (37 °C)
  - Objektträger und Deckgläser, Filterpapier
  - Steriles, membranfiltriertes Wasser
  - Evtl. Tris-Puffer zum Waschen des Filters nach der Probenfiltration: 0.1 M Puffer mit 120 mM NaCl, pH7, steril (entspricht pro Liter membranfiltriertes Wasser (Bidest) 12.114 g Tris, 5.96 g NaCl, pH mit 25%iger HCL einstellen, dann autoklavieren).
- Die Reagentien (Färbereagenz mit roter Kappe, Färbereagenz mit grüner Kappe und die Mikroskopierflüssigkeit) werden bereitgestellt und auf Raumtemperatur temperiert

### Ausmischen der Färbelösung

- Das Färbereagenz mit der roten Kappe enthält sowohl den Puffer als auch die Färbechemikalien I (**ROT**)
- Das Färbereagenz mit der grünen Kappe enthält den Lebend Farbstoff (10 µl) (**GRÜN**).
- Das Vial mit der grünen Kappe wird vorsichtig geöffnet, der Deckel mit der Unterseite nach oben griffbereit zur Seite gelegt.
- Das Vial mit der roten Kappe wird geöffnet, es wird die Gesamtmenge entnommen (990 µl) und in das offene Vial (**GRÜN**), pipettiert. Anschließend wird es wieder mit der grünen Kappe verschlossen und kräftig geschüttelt.
- Dies ist die fertige Gebrauchslösung, ergibt 1000 µl Gebrauchslösung E, hält sich bei 4° C ein bis zwei Tage, reicht für 12 Proben.

**Färbung:**

- kleine Petrischale
- Filterpad mit glatter Seite nach oben in die Petrischale legen
- 80 µl Gebrauchslösung E auf das Pad pipettieren
- 35 ml Probe auf sterilem Glasstand auf weissen Polycarbonatfilter abfiltrieren. !!! Probe nicht zu lange Unterdruck aussetzen, da Bakterien noch leben!!!
- FEUCHTEN !!! Filter vom Stand nehmen
- SOFORT Viereck aus dem Filter ausschneiden
- SOFORT auf getränktes Pad legen
- In 37°C Umgebung 10 min inkubieren
- Filter trocken
- Mit 2 Tropfen der Mikroskopierflüssigkeit überschichten – 3 Minuten warten
- Deckglas auflegen, anpressen, Flüssigkeitsüberstand mit Filterpapier aufnehmen

-wichtig-

das Pad darf nicht mit Alkohol in Berührung kommen. Dies kann z.B. über die Pinzette oder durch offenes Liegen an Luft geschehen, in der Alkohol durch z.B. das Reinigen von Arbeitsflächen enthalten ein kann. Wenn dieser Ratschlag nicht beachtet wird, kann es zu deutlichen Rot- oder Grünfärbungen des Hintergrundes kommen.

Die ausgezählte Zellzahl entspricht den Zellen im filtrierte Probevolumen

Der Objektträger wird untergelegt und die gesamte Filterfläche wird kontrolliert.

- „Lebende Keime“ leuchten grün auf
- „tote Keime“ leuchten rot auf

**Anmerkung:**

Falls der Hintergrund zu schnell grün wird oder die lebenden Keime nicht gut zu sehen sind, kann das Waschen des Filters mit 0,1 M Tris Lösung Matrixeffekte der Probe mit den Färbereagentien abschwächen.