

Dr. Arne Peters

a.peters@e-nema.de; e-nema GmbH, Klausdorfer Str. 28-36, 24223 Raisdorf

/

Protokoll zur Qualitätsuntersuchung von Nematoden (V. 2)

1. Ausgangspunkt

Nematoden in Verkaufsformulierung (50 Millionen Einheit)

2. Zählung

2.1. Tüte öffnen und Inhalt in 5 Liter Wasser (10 bis 20°C) auflösen (Eimer mit Durchmesser 15 bis 25 cm). Das Zählen von Stichproben aus der Tüte ist nicht empfehlenswert, da die Nematoden nicht unbedingt gleichmäßig verteilt sind.

2.2. Suspension 1 Minute lang heftig rühren und anschließend mit Schlauch belüften (Aquariumpumpe).

2.3. Unmittelbar vor der Probenahme Ursuspension nochmals durchrühren. Aus dieser Suspension 3 x 100 µl entnehmen und in 3 saubere Reagenzgläschen (6 bis 10 ml Fassungsvermögen) füllen.

2.4. Reagenzgläschen mit 4,9 ml (Glaspipette) auf 5 ml auffüllen

2.5. Reagenzgläschen gut schütteln (Öffnung mit sauberem (!) Daumen oder Deckel verschließen) und sofort 100 µl als Tropfen auf eine Petrischale geben.

2.6. Vorgang 2.5. wiederholen, bis 5 Tropfen von jedem Reagenzglas aufgetragen sind.

2.7. Es sollten nur lebende Nematoden gezählt werden: Zur Unterscheidung lebende und toter Nematoden:

Lebend	Tot
<ul style="list-style-type: none"> • Bewegung • Ruhefomen: <ul style="list-style-type: none"> Steinernema: J-Form (Kopf oder Schwanz abgeknickt) S.feltiae: eingerollt (in dieser Position sind sie Stressresistenter) <p>⇒ i.d.R fangen die Nematoden an, sich nach kurzer Zeit im Wasser wieder zu bewegen. Zugabe von einige Kristallen Zitronensäure kann die Nematoden ebenfalls aktivieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • i.d.R langgestreckt, mit schrumpelter Oberfläche • schon länger tote EPN : durscheinend mit blasigen Auftreibungen im Körper <p>⇒ frisch tote EPN sind schwer von lebenden zu differenzieren</p> <p>⇒ Tod durch rasches austrocknen: EPN können verschieden Formen aufweisen, weisen i.d.R aber auch eine schrumpelte Oberfläche auf</p>

2.8. Die Nematoden in den 15 Tropfen zählen und Ergebnisse hier eintragen:

	Tropfen 1	Tropfen 2	Tropfen 3	Tropfen 4	Tropfen 5	Summe
Gläschen 1						
Gläschen 2						
Gläschen 3						
TOTAL:						

2.9. Die mittlere Anzahl an Nematoden pro 50 Millionen Einheit ergibt sich als

$$TOTAL \times 166667^* \text{ Nematoden}$$

Aus der Summe der Zählergebnisse errechnet sich ferner der Korrekturfaktor für die Einstellung der Dosierungen in 3.4:

$$\text{Korrekturfaktor} = TOTAL / 300$$

* Diese Zahl ergibt sich aus:

50 [Verdünnung im Reagenzglas] · 5000 [ml Ursuspension] · 10 [100µl Tropfen pro ml] / 15µl [ausgezählte Tropfen]

3. Biotest mit Mehlwürmern

- 3.1. Trockener Quarzsand (0.1 bis 0.4 mm Korngröße) wird durch Zugabe von Leitungswasser auf 10% Feuchtigkeit eingestellt. Für jede zu testende Nematodencharge werden 900 g Sand benötigt (1000 g Substrat = 900 g Sand + 100 g Wasser).
- 3.2. Der feuchte Sand wird gut durchmischt und je 200 g in verschließbare Plastikschalen (Grundfläche ca. 10 x 10 cm, Höhe mindestens 2 cm, z.B. Gefrierdosen) gefüllt. Für jede Nematodencharge werden 2 („Praxistest“) bzw. 6 („wissenschaftlicher Test“) Schalen benötigt.
- 3.3. Die Nematoden werden in 1 ml in die Mitte der Schalen pipettiert. Folgende Dosierungen sind vorgesehen:

Bei 40 Mehlwürmern/Schale	Dosis 0	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5
<i>Steinernema feltiae</i>	0	80	200	400	800	1600
<i>H. bacteriophora</i>	0	200	400	800	1200	2400
<i>H. megidis</i>	0	200	400	800	1200	2400
<i>Steinernema carpocapsae</i>	0	40	80	200	400	800

Fettgedruckt sind die Dosierungen, die in dem *Praxistest* eingesetzt werden. Im *ausführlichen Test* werden alle Dosierungen getestet.

- 3.4. Die Suspensionen mit verschiedenen Nematodenkonzentrationen werden aus der Ursuspension hergestellt: Je 1000 µl aus der Ursuspension wird mit Wasser gemäß der folgenden Tabelle aufgefüllt. **Die hier angegebenen Zahlen sind mit dem Korrekturfaktor (siehe 2.9) zu multiplizieren !**

Zugabe an Leitungswasser (in ml) zu 1000 µl Ursuspension mit 10000 Nematoden / ml						
Bei 40 Mehlwürmern / Schale	Dosis 0	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5
<i>Steinernema feltiae</i>	-	125,00	50,00	25,00	12,50	6,25
<i>H. bacteriophora</i>	-	50,00	25,00	12,50	8,33	4,17
<i>H. megidis</i>	-	50,00	25,00	12,50	8,33	4,17
<i>Steinernema carpocapsae</i>	-	250,00	125,00	50,00	25,00	12,50

Fettgedruckt sind die Dosierungen, die in dem *Praxistest* eingesetzt werden. Im *ausführlichen Test* werden alle Dosierungen getestet.

- 3.5. Aus den so eingestellten Dosierungen wird je Schale 1000µl zugegeben. In jede Schale werden 40 frische lebende Mehlwürmer gegeben. Die Schalen werden verschlossen, wobei eine Belüftung durch ca. 10 Nadelstich-große Löcher gesichert bleiben muß und bei 22 bis 25°C gelagert.
- 3.6. Nach 7 Tagen werden die Schalen entleert und die Anzahl der toten Larven gezählt und in folgende Tabelle eingetragen:

Nematode:						
Dosis						
Anzahl tote						

- 3.7. Die beobachtete Mortalität sollte mittels der Mortalität in der Kontrolle (Dosis 0) korrigiert werden: $M_k = (M_b - M_c) / (1 - M_c)$

M_k = korrigierte Mortalität; M_c = Mortalität Kontrolle (Dosis 0); M_b = beobachtete Mortalität.

Ist $M_k \geq 50\%$ für Dosis Nr. 3, so ist die Infektivität gut, bei $\geq 30\%$ zufriedenstellend, niedrigere Werte sind inakzeptabel

Bezugsquellen für Material (Beispielpreise):

Einstellbare Pipetten (Fisherbrand): 50-200 µl	Art. Nr. 64890511	101,75	€
Einstellbare Pipette (Fisherbrand): 100 – 1000 µl	Art. Nr. 64890510	101,75	€
Spitzen dazu: 1000 Stück	Art. Nr. 64039207	14,32	€
Glaspipette (1ml)	Art. Nr. 62752070	2,20	€
Glaspipette (5ml)	Art. Nr. 62752075	2,58	€
Pipettierbälle	Art. Nr. 35494450	6,39	€

Alles bei Fisher Scientific (Tel: 01805-258221; Fax 01805-258223)

Es kann auch mit Arzneimittelspritzen (1ml) gearbeitet werden !

Falls eine genaue Waage ($\pm 0.5g$) verfügbar ist, kann die Wassermenge auch hiermit abgewogen werden !