

# Qualitätssicherung bei entomopathogenen Nematoden

Arne Peters, e-nema, 24223 Raisdorf  
Klaus Iwahn, Öre Bio-Protect, 24223 Raisdorf  
Uschi Kölzer, Gab Biotechnologie, 75223 Niefern-Öschelbronn  
Frank Stepper, Sautter & Stepper, 72119 Ammerbuch

## Einleitung

Der Einsatz von Nutzarthropoden und Nematoden im Pflanzenschutz hat sich dank des Verzichts auf Registrierungsverfahren in den letzten 20 Jahren gut entfaltet. Die fehlende Registrierungspflicht verlangt vom Anwender jedoch viel Vertrauen in die Qualität der Produkte. Der Verein der Nützlingsanbieter Deutschlands e.V. (VND), hat sich daher entschlossen, Konzepte zur Sicherung der Qualität der Nützlinge zu erarbeiten. Insektenpathogene Nematoden gehören zu den meist verkauften Nützlingen im Gartenbau und sollen als Modell für ein Qualitätssicherungssystem dienen. Nach der Entwicklung von reproduzierbaren Qualitätstests in der ersten Projektphase (2001 bis 2002) wurden im zweiten Projektjahr die Transportbedingungen und ihr Einfluss auf die Qualität der Nematoden untersucht. Ein Auszug der Ergebnisse wird hier dargestellt. In einem Lehrgang am Ende der Tagung hatten interessierte Nützlingsberater Gelegenheit, die Qualität eines Nematodenprodukts mittels der Standardmethoden selbst zu untersuchen.

## Material und Methoden

### *Verwendete Nematoden*

Es wurden die Arten *Steinernema feltiae* und *Heterorhabditis bacteriophora* bearbeitet. Die Nematoden wurden in Bioreaktoren produziert und innerhalb von 4 Wochen nach Produktion untersucht oder den simulierten Transportbedingungen ausgesetzt.

### *Zählung der Nematoden*

Es wurden durchweg 50 Millionen Packungen untersucht. Die Methode läßt sich aber im ersten Schritt auf andere Packungsgrößen anpassen. Der Inhalt einer Packung wird vollständig in einen Behälter entleert. Pro Million Nematoden wird dem Packungsinhalt 100 ml Wasser zugegeben. Das Wasser sollte 10 bis 25°C warm sein. Eine 50 Millionen Packung wird folglich in 5000 ml Wasser aufgelöst. Die Suspension wird nun mindestens eine Minute lang heftig gerührt, bis sich keine Klumpen mehr in der Suspension befinden. Anschließend werden aus diesem Ansatz 3 Proben von je 100 µl in Reagenzgläser gegeben und auf 5 ml aufgefüllt. Während der Entnahme der Proben muss die Suspension weiterhin gerührt werden, oder aber durch Einblasen von Druckluft in Bewegung gehalten werden. In ungerührter Suspension sinken die Nematoden sehr schnell zu Boden. Aus den 3 Reagenzgläsern werden nun je 5 Tropfen á 100 µl auf eine Petrischale gegeben. Mit dem Stereomikroskop oder einer guten Lupe können nun die Nematoden pro Tropfen gezählt werden. Die Anzahl der Nematoden pro Packung ergibt sich aus der Gesamtzahl der in den 15 Tropfen gezählten Nematoden multipliziert mit  $1.67 \cdot 10^5$ \*

---

\* Dieser Faktor ergibt sich aus:  $5000 \text{ [ml Suspension]} \cdot 50 \text{ [Verdünnung im Röhrchen]} \cdot 10 \text{ [1000µl/100µl]} / 15 \text{ [Anzahl der ausgezählten Tropfen]}$ .

## Infektivitätstest

Neben der Anzahl lebender Nematoden ist die Infektivität, also die Fähigkeit Insekten abzutöten, ein wesentliches Qualitätsmerkmal. 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). 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. Im Praxistest werden die Nematoden in einer Dosierung, im ausführlichen Test in 5 verschiedenen Dosierungen eingesetzt. Eine weitere Schale wird als unbehandelte Kontrolle benötigt. Folgende Dosierungen werden bei den verschiedenen Nematodenarten eingesetzt (Nematoden pro Mehlwurm).

Tabelle 1: Dosierung der Nematoden im Infektivitätstest für die verschiedenen Nematodenarten. **Fettgedruckt** sind die Dosierungen, die im Praxistest eingesetzt werden. Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Relation werden alle Dosierungen getestet („wissenschaftlicher Test“).

Nematodenart	Nematoden pro Mehlwurm					
	<b>Dosis 0</b>	Dosis 1	Dosis 2	<b>Dosis 3</b>	Dosis 4	Dosis 5
<i>Steinernema feltiae</i>	<b>0</b>	2	5	<b>10</b>	20	40
<i>H. bacteriophora</i>	<b>0</b>	5	10	<b>20</b>	30	60
<i>H. megidis</i>	<b>0</b>	5	10	<b>20</b>	30	60
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<b>0</b>	1	2	<b>5</b>	10	20

Die gewünschten Dosierungen werden zu jeder Schale in 1ml Wasser zugegeben. Dazu werden aus der ursprünglichen Suspension je 1 ml entnommen und verdünnt, um die Konzentrationen pro ml zu erhalten. Die zum Verdünnen benötigte Menge Wasser errechnet sich aus der ermittelten Summe der Nematodenzahlen aus den 15 Tropfen (z.B. 300; siehe Zählung) multipliziert mit 50 (Verdünnung im Reagenzglas) geteilt durch 1,5 (Volumen [ml] in den 15 Tropfen) geteilt durch die gewünschte Dosis (z.B. 2) multipliziert mit der Anzahl der Mehlwürmer pro Testschale (=40). 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. Nach 7 Tagen werden die Schalen entleert und die Anzahl der toten Larven gezählt. Im Anhang ist ein Formblatt zur Ausführung des Qualitätstests beigelegt.

## Ermittlung der Temperatur und der Feuchtigkeit während des Versands

Um die Temperaturbedingungen während des Versands festzustellen, wurden elektronische Temperaturschreiber eingesetzt. Die Sensoren wurden dabei entweder außen an den Packungen angebracht, um die Daten in den Versandwagen und Lagerräumen zu ermitteln, oder innerhalb der Packungen, um die Daten während des Versands in unmittelbarer Nähe der Nematodenpackungen zu ermitteln.

## Simulation der Temperaturbedingungen in Klimaschränken

Um die verschiedenen Umverpackungen unter standardisierten Bedingungen zu vergleichen, wurden typische Temperaturprofile in Klimaschränken (Rumed 3200, Rubarth Apparate, Laatz) simuliert. Die Temperaturprofile im einzelnen sind im Ergebnisteil dargestellt. Es wurden folgende Umverpackungen untersucht:

- Luftpolsterumschläge: DIN A4 Umschläge, mit 4 x 50 Millionen Packungen gefüllt.

- Schmalere Karton (S&S): Umverpackung der Firma Sautter und Stepper (S&S), mit 2 x 50 Millionen Packungen gefüllt.
- Großer Karton (S&S): Umverpackung der Firma Sautter und Stepper (S&S), mit 4 oder 8 x 50 Millionen Packungen gefüllt. Zeitungspapier zur Isolation
- Styroporkasten (Öre): Geschlossene Styroporboxen (Wandstärke 2,8cm) mit Deckel, mit 5,10 oder 40 x 50 Millionen Packungen gefüllt.
- Karton mit Styroporauskleidung (e-nema): Kartons, innen mit passenden Styroporplatten (Wanddicke 2,8cm) ausgekleidet, mit 16 x 50 Millionen Packungen gefüllt.

Zu den Packungen wurden in einigen Varianten Kühlelemente gelegt. Das Gewicht dieser Eis-gefüllten Akkumulatoren betrug 200 g.

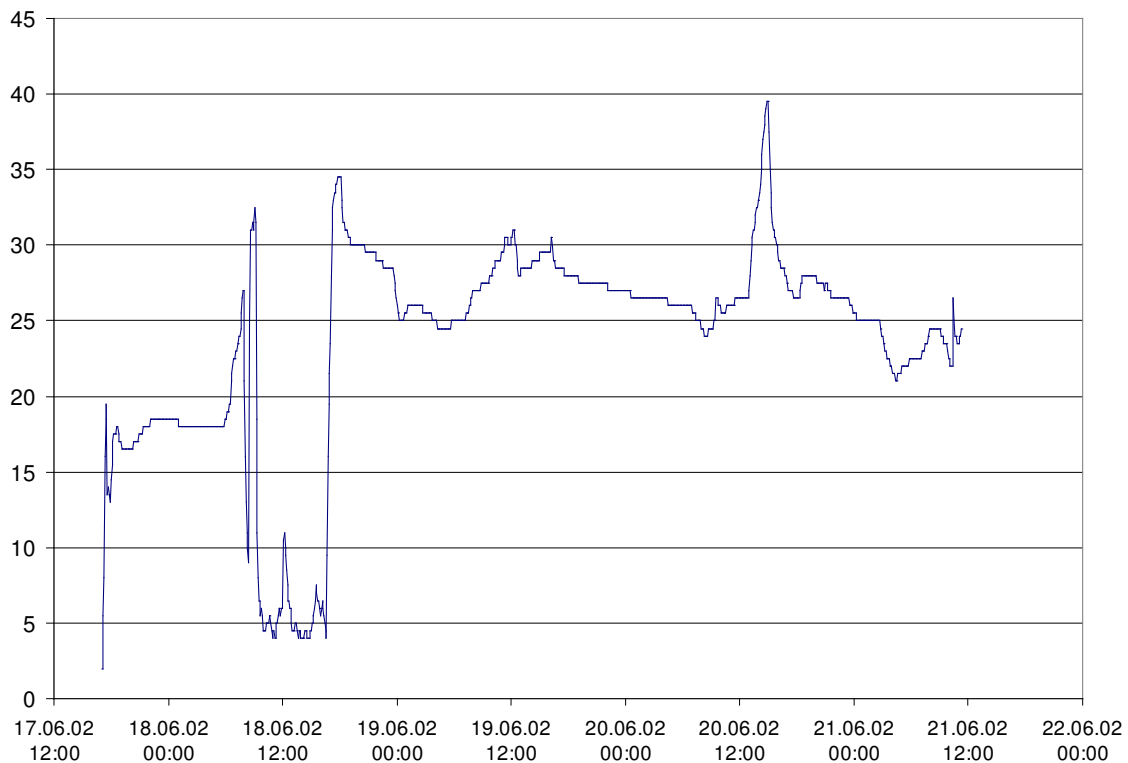


Abbildung 1: Temperatur in Luftpolsterumschlag im Sommer. Sensor an der Lasche eines Luftpolsterumschlages. Versand von Ralsdorf nach Niefern-Öschelbronn und zurück.

## Ergebnisse

Während des Transportes mit PostExpress oder UPS wurden Temperaturen bis zu 39°C gemessen (Abb. 1). Diese hohen Temperaturen waren aber auf wenige Minuten beschränkt. Im allgemeinen lag die Temperatur auch an warmen Tagen im Sommer zwischen 25 und 30°C. In einem Fall kühlte das Paket im Sommer auf fast 0°C ab (Abb. 2). Die Ursache für diese starke Abkühlung ist nicht bekannt, aber offenbar werden die Pakete im Sommer gelegentlich kühl gelagert.

Die ermittelten Temperaturdaten bildeten die Grundlage für simulierte Temperaturverläufe in Klimaschränken. Es wurde ein Verlauf von 2 Stunden 30°C und 46 Stunden 25°C programmiert. Wie erwartet, puffert die Zugabe von Eis die Temperaturveränderungen deutlich ab. In Verpackungen ohne Eis folgen die Verläufe sehr rasch der Umgebungstemperatur (Abb. 3). Die Packungen hatten innerhalb von 1 bis 2 Stunden die Umgebungstemperatur erreicht.

Ecolog TH2 ID:56678 ID-S2:20015409 ID-S4:20015915

Lesezeit: 05.07.2002 15:54:01

Aufzeichnungsintervall: 1 Min

Modulbeschreibung:

Datenbeschreibung: S. & St. - e-nema - S. & St. 18.6. - 29.6.02

A:\Vnd-04.MDF



A) S3: 18.06.2002 15:46:51 +19.8 °C: Abholung bei S. & St. / B) S3: 20.06.2002 15:31:51 +23.6 °C: Ankunft/Abholung bei e-nema / C) S1: 21.06.2002 13:01:51 +28.1 °C: Ankunft bei S. & St.

Fühler 3 zwischen Kartonhülle und Styroporplatte / Fühler 1 zwischen den Nematodentütchen

Maße Versandkarton: ca. 40 x 28 x 24 cm / Styroporisolation 30 mm durch Platten im Karton

Versand zu e-nema per UPS, zurück zu S. & St. per Post, beidesmal ohne Kühlakkus

bemerkenswert: extreme Abkühlung auf dem Versandweg von ca. 18.00 - 24.00 Uhr am 20.6.; Lagerung direkt unter Kaltluftgebläse?

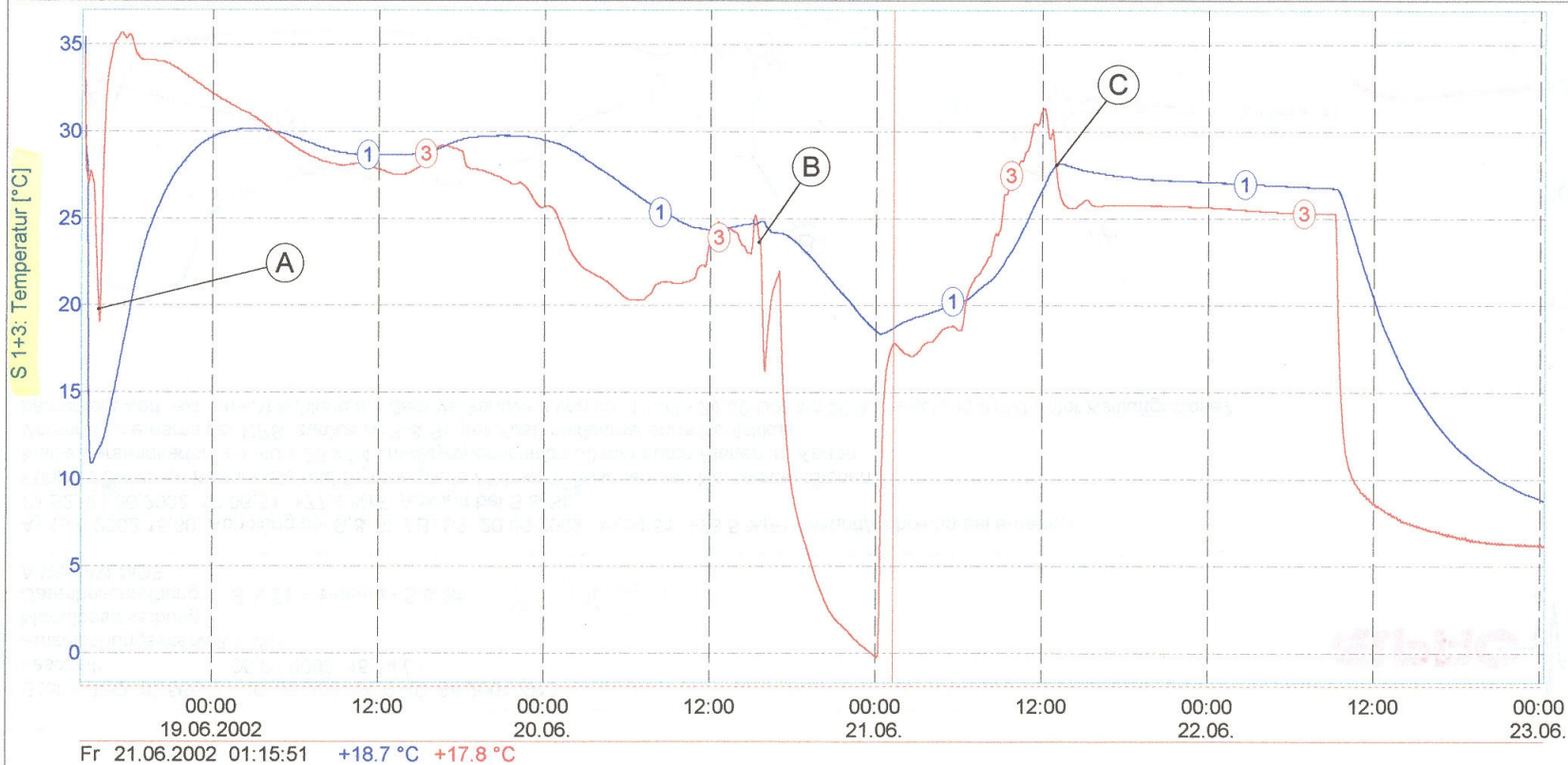


Abbildung 2: Temperaturdaten in Styropor-ausgekleidetem Karton im Juni (ohne Kühlelemente).

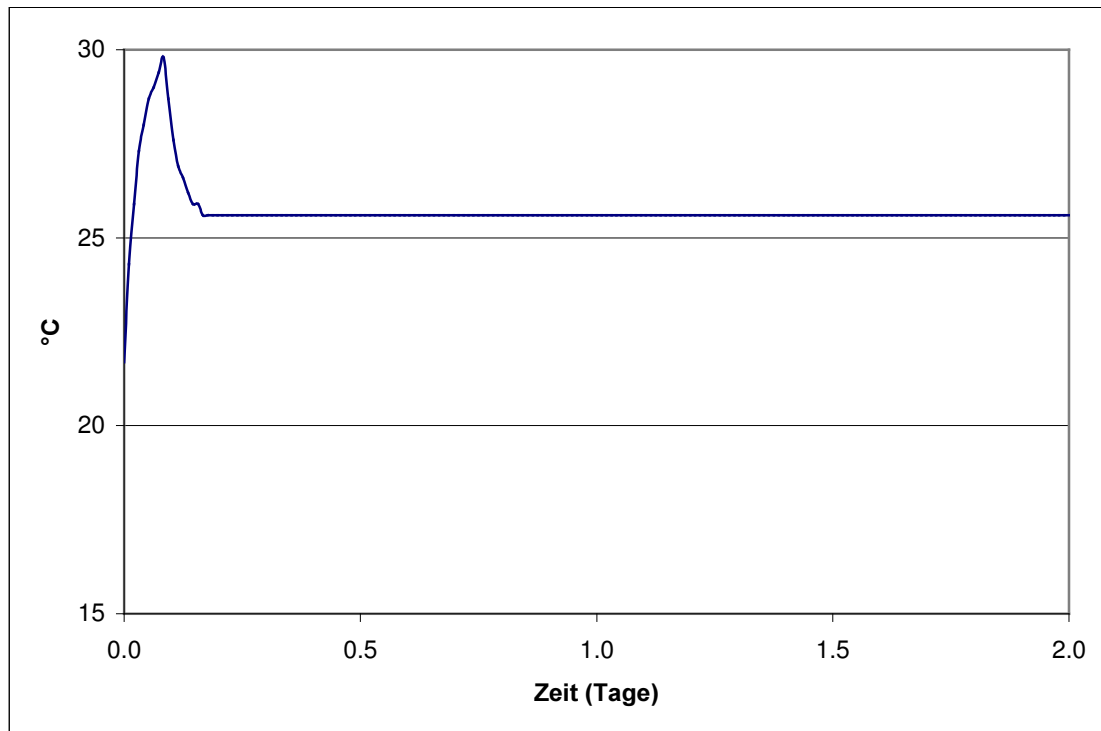


Abbildung 3: Temperaturverläufe in Luftpolsterumschlägen ohne Eis mit 2 Nematodenpackungen. Externer Temperaturverlauf: 30°C für 2 Std.; 25 °C für 46 Std

In der Packung von S&S mit 2 Kühlelementen dauerte es etwa 18 Stunden bis sich an den Messpunkten die Umgebungstemperatur eingestellt hatte. Nach 12 Stunden waren die 25°C erreicht (Abb. 4). Es ist deutlich eine Verzögerung des Aufheizens zu Beginn der Messung zu erkennen. Dies ist die Periode, in der die Kühlelemente schmelzen, selbst also eine konstante Temperatur von ca. 0°C beibehalten. Schließlich waren in der Verpackung von Öre mit 15 Kühlelementen nach 48 Stunden die Umgebungstemperaturen an den 3 Messpunkten noch nicht erreicht (Abb. 5). Die 20°C wurde nach 1.3 bzw. 1.75 Tagen überschritten. Auch hier war eine Periode stagnierender Temperatur zu beobachten. Am obersten Messpunkt (zwischen Eis und Beutel) war es hier deutlich kühler als an den Messpunkten in der Mitte und an der Außenwand der Verpackung. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Eventuell trägt die Wärmeentwicklung durch die Stoffwechselaktivität der Nematoden in der mittleren Schicht aber zu einer rascheren Erwärmung in diesem Bereich bei. Insbesondere *S. feltiae* ist noch bei tiefen Temperaturen aktiv und produziert dann Wärme. In den späteren Versuchen mit *H. bacteriophora* (Abb. 6) waren die Temperaturdifferenzen an den verschiedenen Messpunkten geringer.

Die Nematodenpackungen wurden einerseits den simulierten Temperaturverläufen ausgesetzt, um den wahren Temperaturverlauf innerhalb der Umverpackungen unter Berücksichtigung der durch die Nematoden produzierten Wärme nachzumessen. Des weiteren wurden diese Packungen auch dem zuvor entwickelten standardisierten Qualitätstest unterzogen. Dabei wurde zum Vergleich Nematoden der gleichen Produktionscharge getestet, die ohne Unterbrechung der Kühlkette gelagert wurden. Die simultane Untersuchung in den verschiedenen Laboratorien erlaubte eine Validierung der Qualitätstests.

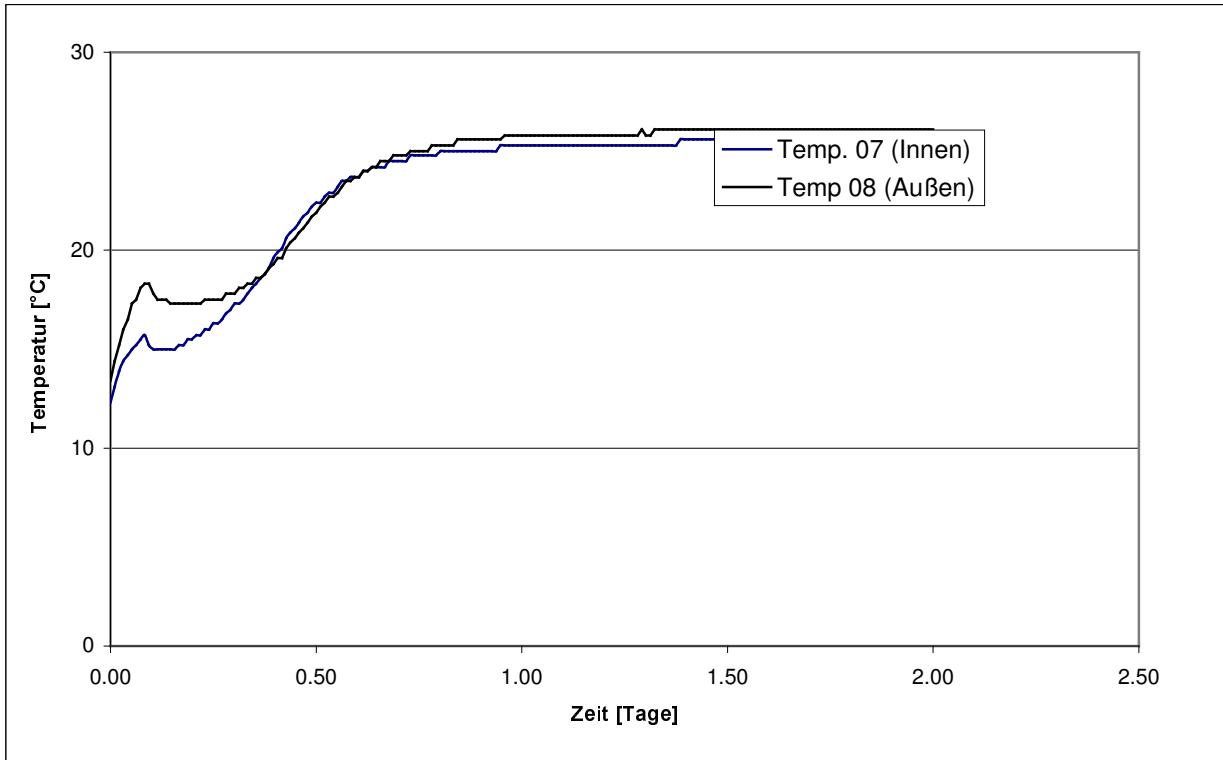


Abbildung 4: Temperatur- und Feuchtigkeitsverläufe in Karton mit 2 Kühlelementen und Zeitungspapier als Isolationsmaterial. Inhalt 8 Nematodenpackungen (*Steinernema feltiae*). Messung an 2 Messpunkten. Externer Temperaturverlauf: 30°C für 2 Std.; 25°C für 46 Std.

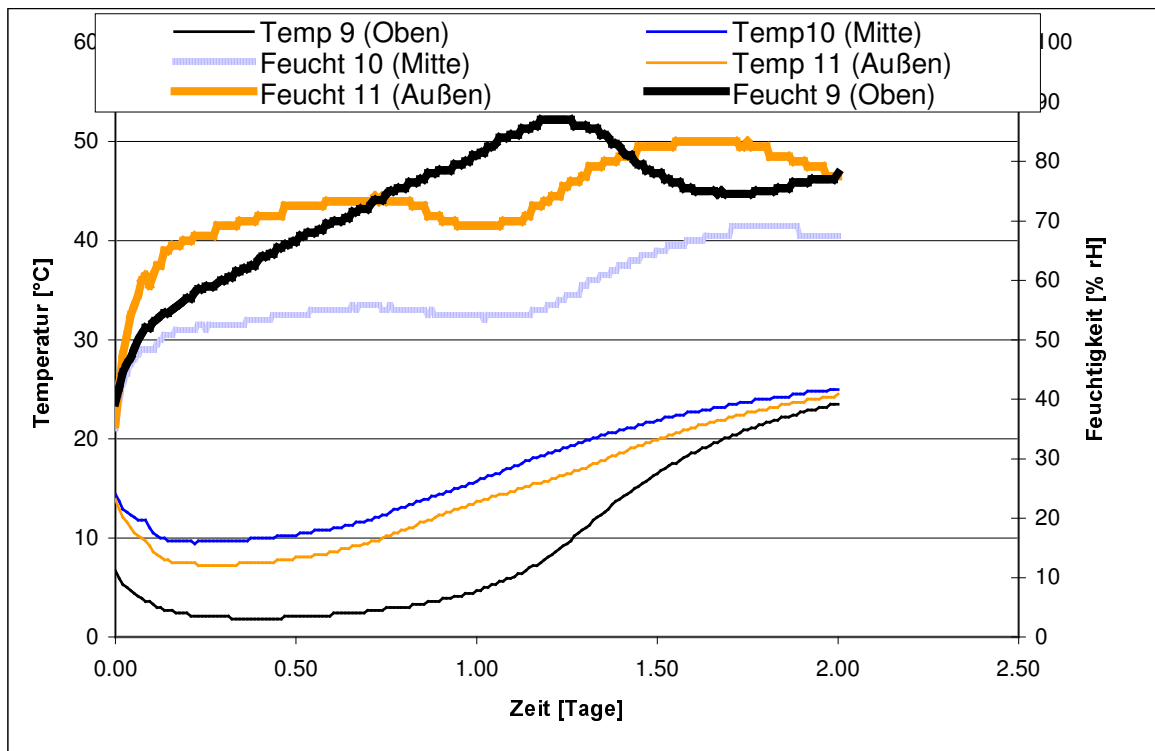


Abbildung 5: Temperatur- und Feuchtigkeitsverläufe in Styroporbox mit 15 Kühlelementen und 40 Nematodenpackungen (*Steinernema feltiae*) an 3 Messpunkten. Externer Temperaturverlauf: 30°C für 2 Std. 25°C für 46 Std.

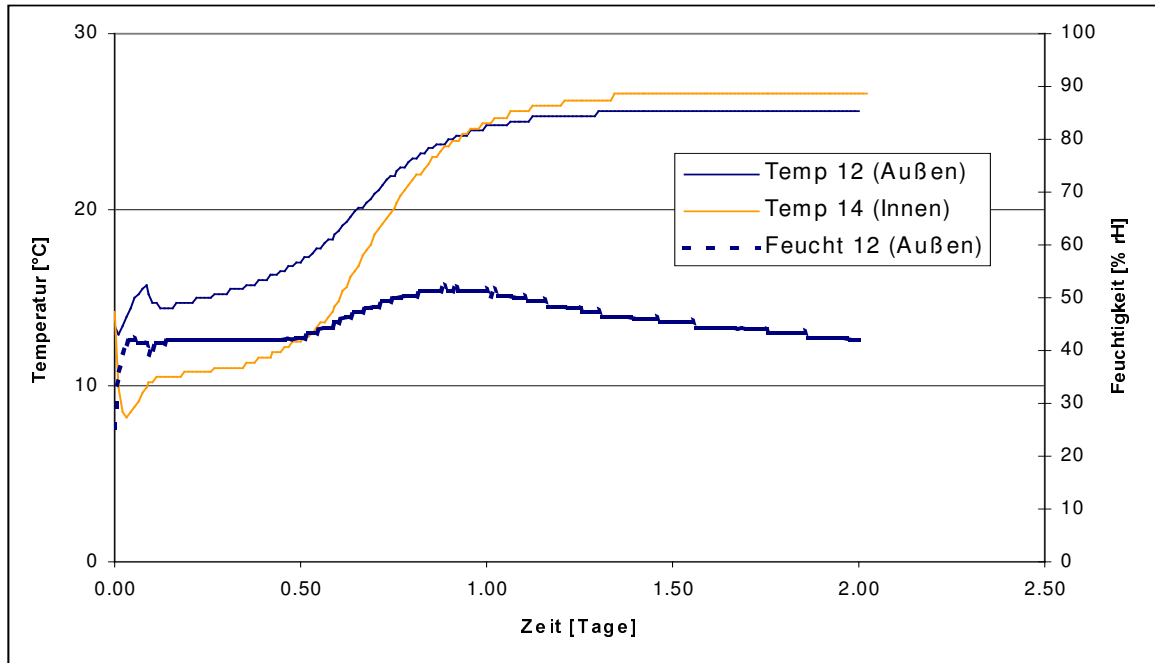


Abbildung 6: Temperaturverläufe in Styroporbox mit 2 Kühlelementen und 2 Nematodenpackungen (*Heterorhabditis bacteriophora*) an 2 Messpunkten. Externer Temperaturverlauf: 30°C für 2 Std.; 25°C für 46 Std.

Im ersten Versuch wurden *S. feltiae* Nematoden verglichen, die in Luftpolsterumschlägen ohne Eis, in Kartons mit 2 Eisakkus auf 8 Nematodenpackungen und Zeitung als Isolationsmaterial, sowie in Styroporkästen mit 40 Packungen und 15 Eisakkus gelagert wurden. Die Anzahl der *Steinernema feltiae* in den Packungen unterschied sich signifikant zwischen den Umverpackungen (Abb. 7). Übereinstimmend stellten die Laboratorien Öre, GAB und e-nema eine auffallend niedrige Nematodenzahl in den Beuteln aus der großen Styroporbox fest. Auch die Beutel aus den anderen Umverpackungen wiesen statistisch signifikant geringere Zahlen auf als in der durchgehend gekühlt gelagerten Referenz. Zwischen den Umverpackungen mit Zeitung und Kühlelementen und der einfachen Verpackung wurden keine Unterschiede festgestellt. Die Abweichung vom Sollwert (20 Nematoden pro Tropfen) war jedoch in allen Behandlungen signifikant. Um die Qualität sicherzustellen, sollten also noch etwas mehr Nematoden eingepackt werden. Einzig im Labor S&S wurden überhaupt keine Unterschiede in den Nematodenzahlen ermittelt. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt.

Entsprechend den Unterschieden in der Anzahl der Nematoden pro Packung unterscheidet sich auch die Infektivität der Nematoden. Wieder zeigen die Nematoden aus der Styroporbox die geringste Infektivität (Abb. 8). Die ermittelten Werte, gemessen in Anzahl befallener Mehlwürmer bei einer Dosis von 10 Nematoden/Larve, unterscheiden sich zwischen den Laboratorien zwar erheblich; betrachtet man aber die Rangfolge der Infektivität, so kommen alle Labore zu dem gleichen Ergebnis ansteigender Infektivität: „Styroporbox + Eis“ < „Luftpolsterumschlag“ < „Zeitung + Eis“ < „Referenz“. Die Reproduzierbarkeit des Tests ist insofern gegeben, allerdings kann auf eine Referenz nicht verzichtet werden.

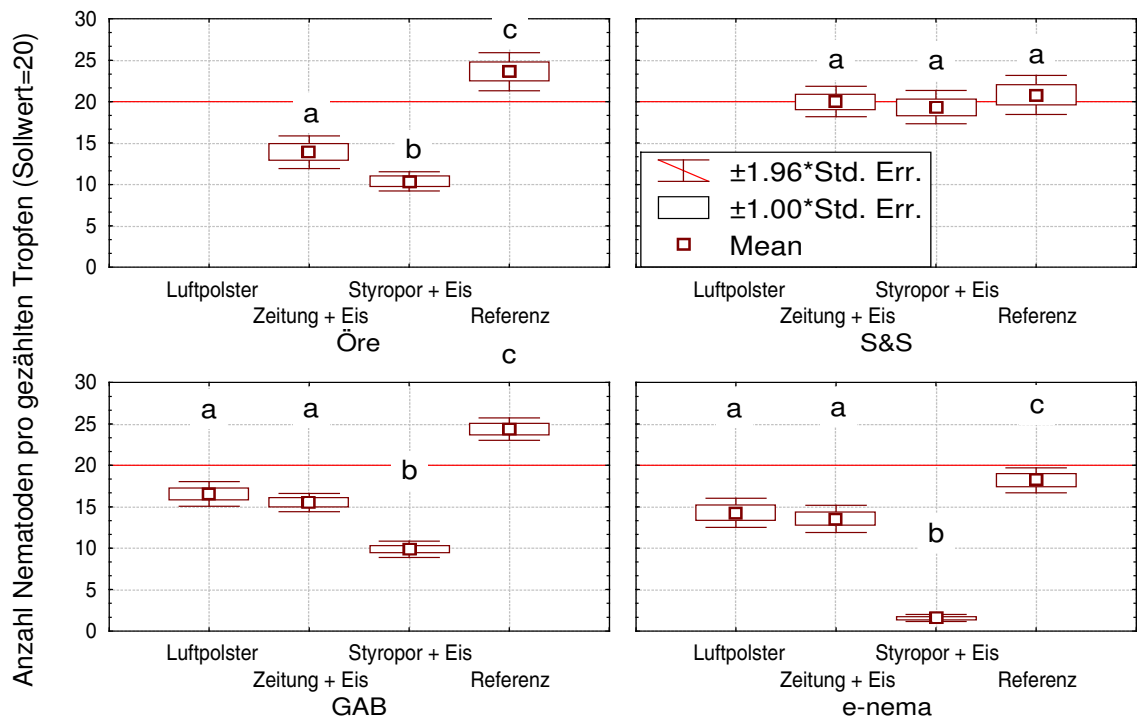


Abbildung 7: Anzahl lebender *Steinernema feltiae* in Beuteln aus unterschiedlichen Umverpackungen ermittelt in 4 Laboratorien. Die Umverpackungen wurden für 2 Std. 30°C und 46 Std. 25°C aufbewahrt. Sollwert für 50 Millionen Nematoden pro Beutel: 20 Nematoden pro Tropfen. Signifikante Unterschiede zwischen den Chargen innerhalb eines Labs sind durch unterschiedliche Buchstaben markiert (ANOVA, Tukey-Test  $p < 0.05$ ).

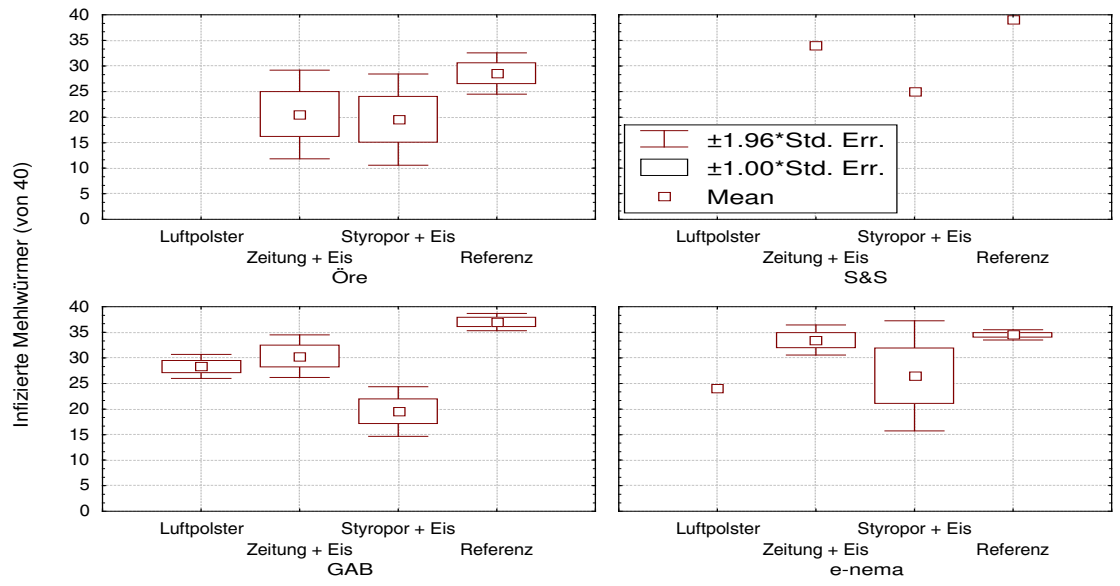


Abbildung 8: Infektivität von *Steinernema feltiae* aus Beuteln in verschiedenen Umverpackungen (siehe Abb.7) ermittelt von 4 Laboratorien

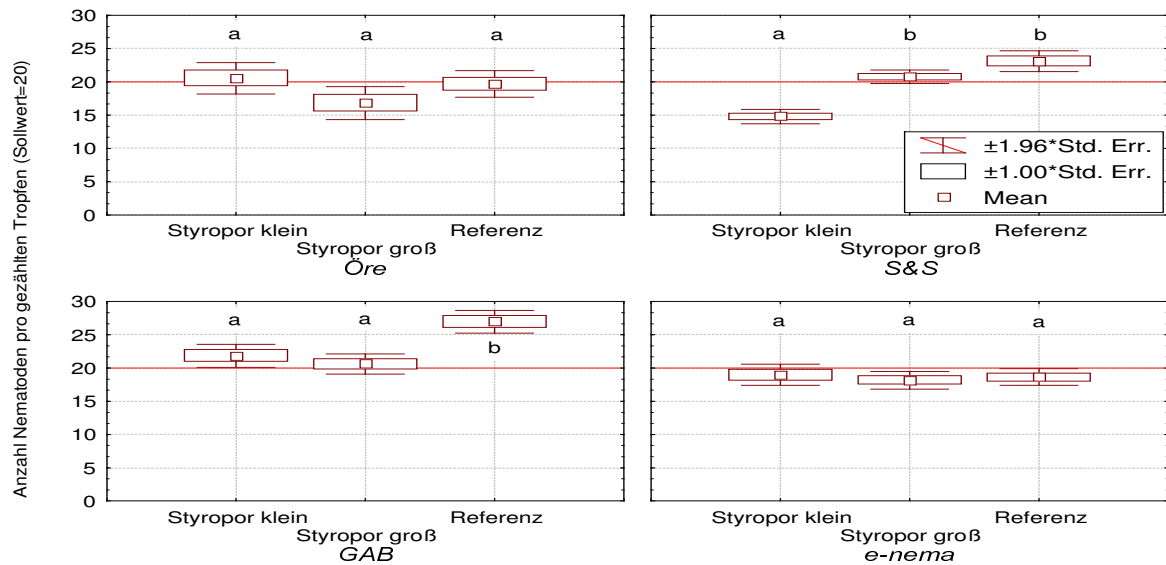


Abbildung 9: Anzahl von *Heterorhabditis bacteriophora* in Beuteln aus verschiedenen Umverpackungen ermittelt von 4 Laboratorien. Kleine Styroporboxen enthielten 2 Eisakkus und 5 Nematodenpackungen, große boxen enthielten 8 Eisakkus und 20 Packungen. Die Umverpackungen wurden bei 2 Std. 30°C und 46 Std. 25°C aufbewahrt. Sollwert für 50 Millionen Nematoden pro Beutel: 20 Nematoden pro Tropfen. Signifikante Unterschiede zwischen den Chargen innerhalb eines Labors sind durch unterschiedliche Buchstaben markiert (ANOVA, Tukey-Test  $p < 0.05$ ).

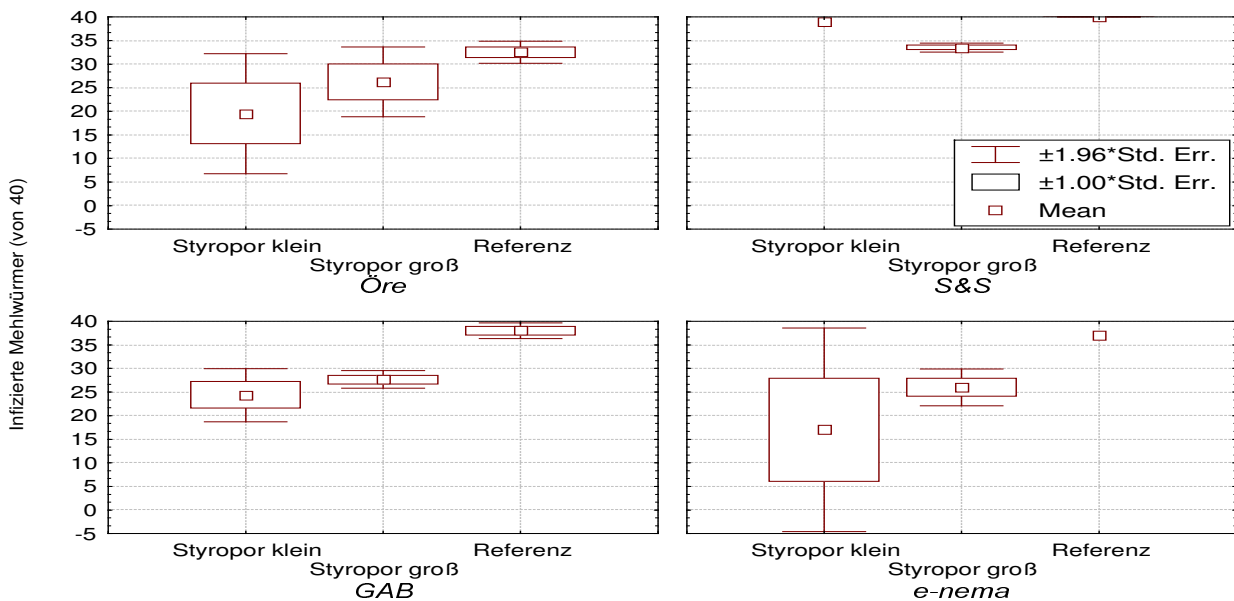


Abbildung 10: Infektivität von *Heterorhabditis bacteriophora* aus Beuteln in verschiedenen Umverpackungen (siehe Abb. 9) ermittelt von 4 Laboratorien.

Im zweiten Temperaturverlauf wurden *H. bacteriophora* Packungen untersucht. Beide untersuchten Umverpackungen enthielten Kühlelemente. Nur 2 der 4 Labore konnten Unterschiede in der Anzahl der Nematoden pro Packung nachweisen (Abb. 9). In der Infektivität stellten die beteiligten Labore ÖRE, GAB und e-nema wiederum die gleiche Rangfolge fest, wobei ein Ausreißer die Daten bei e-nema stark beeinflusste.

Es war eine leichte, nicht signifikante Abnahme der Infektivität nach Inkubation der Nematoden in den Klimaschränken zu beobachten.

## Erfahrungen und Ergebnisse der Lehrveranstaltung in Erfurt

Zu dem Kurs hatten sich 20 Teilnehmer von den wichtigsten Nützlingsberatungsstellen in Deutschland angemeldet. Der Kurs wurde mit 4 Personen intensiv betreut. Die Teilnehmer sollten Anzahl und Infektivität von Nematoden in 50 Millionen Packungen von *S. feltiae* feststellen. Jede Gruppe bearbeitete eine Packung der gleichen Verpackungscharge. Bei der praktischen Arbeit mit den Nematoden taten sich einige Fehlerquellen auf. So war zum Beispiel der richtige Gebrauch von Pipetten nicht allen Kursteilnehmern geläufig. Sehr lehrreich war die Erfahrung, welche große Ungenauigkeiten durch unzureichendes Rühren der Nematodensuspension bei der Probenahme entstehen können. Den Kursteilnehmern wurde so klar, wie rasch die Nematoden in wässriger Suspension absinken und sie werden das zukünftig auch bei der Beratung berücksichtigen. Die Fehlerquellen konnten während des Kurses weitgehend ausgeräumt werden und die Zählergebnisse stimmten zwischen den Gruppen recht gut überein (Abb. 11). In der Gruppe 2 wurden offensichtlich durch falsches Bedienen der Pipette zu hohe Werte gezählt.

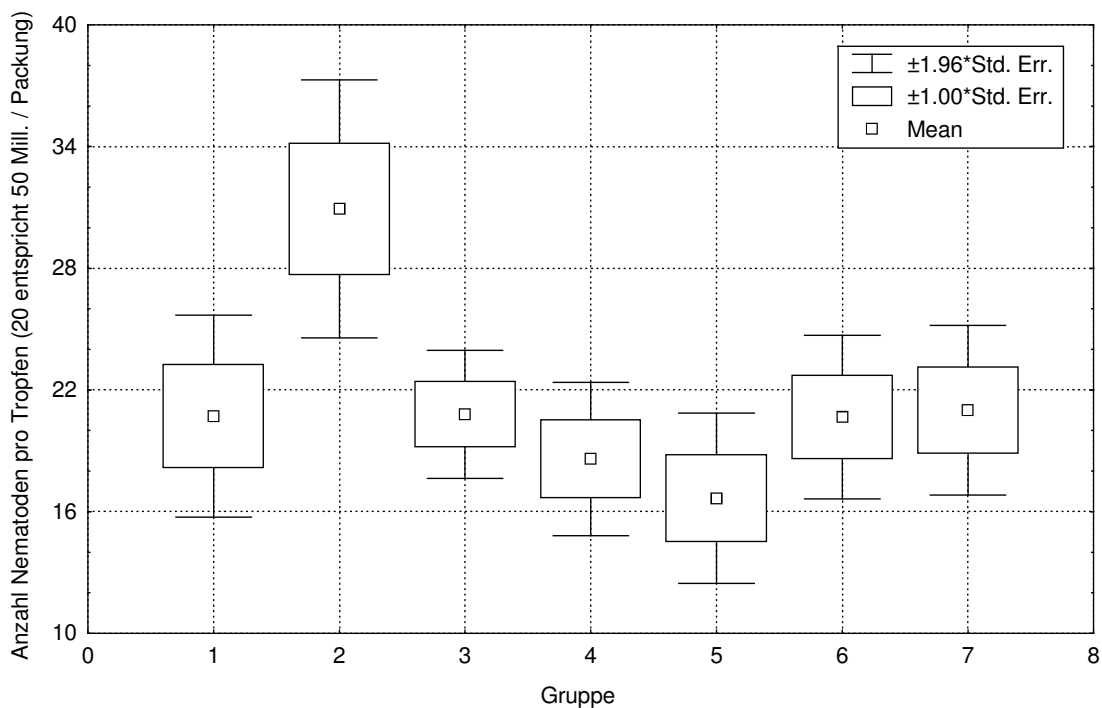


Abbildung 11: Zählergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen der Lehrveranstaltung in Erfurt. Ermittelt wurde die Anzahl der Nematoden in 50 Millionen Packungen von *Steinernema feltiae*. Ein Zählwert von 20 entspricht 50 Millionen Nematoden pro Packung. Von Gruppe 8 wurden keine Werte übermittelt.

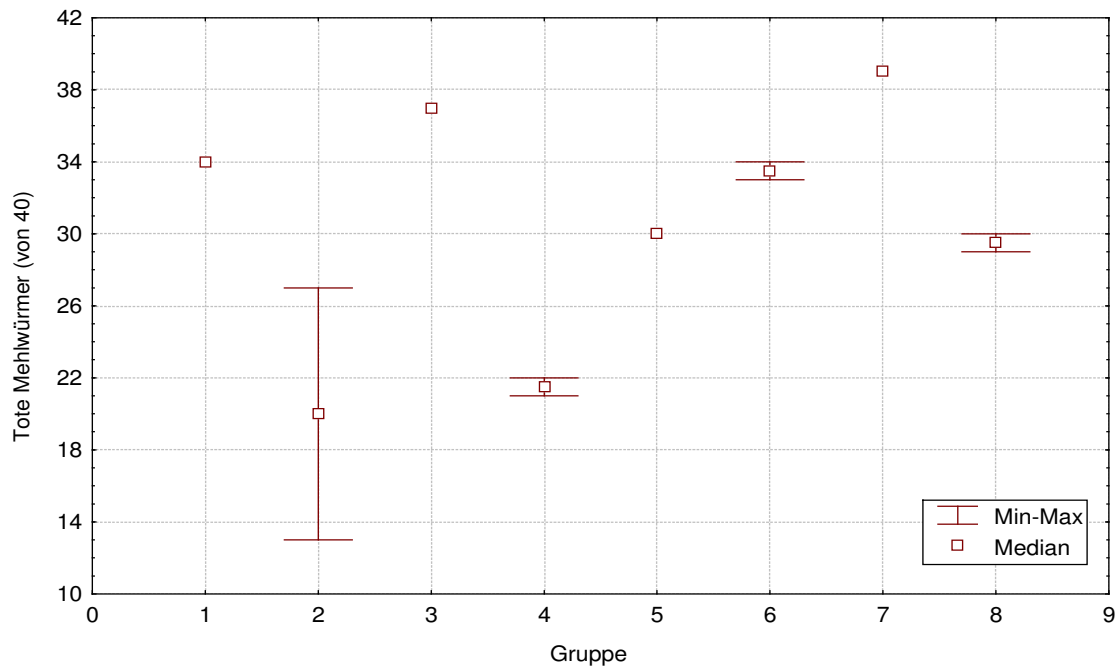


Abbildung 12: Ergebnisse des Infektivitätstest der Arbeitsgruppen der Lehrveranstaltung in Erfurt. Ermittelt wurde die Anzahl toter Mehlwürmer nach 7-tägiger Inkubation mit 10 *Steinernema feltiae* pro Mehlwurm. Nur Gruppe 2, 4, 6 und 8 hatten 2 parallele Infektivitätstests vorbereitet.

Die Infektivität konnte während des Lehrgangs nicht ausgewertet werden. Die Teilnehmer hatten die Testschalen jedoch vorbereitet, bei Zimmertemperatur gelagert und die Ergebnisse nach 7 Tagen ermittelt. Es zeigte sich eine recht gute Übereinstimmung zwischen den Gruppen (Abb. 12). Der niedrige Wert in Gruppe 2 wird durch den Fehler in der ermittelten Nematodenzahl verständlich. Da die Nematodenzahl offensichtlich überschätzt wurde, wurden im Infektivitätstest auch weniger Nematoden eingesetzt. Diese Erklärung greift nicht für die Gruppe 4. Die Abweichung kann hier im nachhinein nicht erklärt werden.

## Diskussion

Der Einfluss der simulierten Transportbedingungen auf die Qualität der Nematoden war im allgemeinen gering. Es wurde deutlich, daß Polsterumschläge und Kartons mit Papierisolierung ohne Zugabe von Kühlelementen keine nennenswerte Abpufferung der Umgebungstemperatur bewirken. Selbst in den Luftpolsterumschlägen überdauerten *H. bacteriophora* aber einen Versand über einen Tag ohne Schaden. Da der Postversand im Regelfall innerhalb von 15 bis 20 Stunden erfolgt, ist also auch im Sommer ein Versand in diesen Packungen akzeptabel. Nur bei extrem hohen Temperaturen sollte man auf eisgekühlte Packungen zurückgreifen. Der VND hat für seine Mitglieder aufbauend auf dieses Projekt Richtlinien erstellt. Für den Versand der Nematoden über eine längere Zeit (z.B. ins Ausland) müssen die Bedingungen optimiert werden. Entscheidend ist, die Nematoden gut gekühlt einzupacken, um ein Aufheizen von innen heraus zu verhindern.

Überaus erfreulich war die Resonanz auf die Lehrveranstaltung. Die Teilnehmer haben durch den Vergleich mit den anderen Gruppen Vertrauen in die Methoden zur Qualitätsbeurteilung gefasst. Zur unabhängigen Qualitätsbeurteilung steht außerdem die GAB Biotechnologie zur Verfügung.

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"> <li>• Bewegung</li> <li>• Ruheformen:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Steinernema: J-Form (Kopf oder Schwanz abgeknickt)</li> <li>S.feltiae: eingerollt (in dieser Position sind sie Stressresistenter)</li> </ul> </li> </ul> <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"> <li>• i.d.R langgestreckt, mit verschrumpelter Oberfläche</li> <li>• schon länger tote EPN : durchscheinend mit blasigen Auftreibungen im Körper</li> </ul> <p>⇒ frisch tote EPN sind schwer von lebenden zu differenzieren</p> <p>⇒ Tod durch rasches austrocknen: EPN können verschiedenen Formen aufweisen, weisen i.d.R aber auch eine verschrumpelte 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						
<b>TOTAL:</b>						

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:

$$Korrekturfaktor = TOTAL / 300$$

\* 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 8% 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>Steinemema feltiae</i>	<b>0</b>	80	200	<b>400</b>	800	1600
<i>H. bacteriophora</i>	<b>0</b>	200	400	<b>800</b>	1200	2400
<i>H. megidis</i>	<b>0</b>	200	400	<b>800</b>	1200	2400
<i>Steinemema carpocapsae</i>	<b>0</b>	40	80	<b>200</b>	400	800

**Fettgedruckt** sind die Dosierungen, die in dem *Praxistest* eingesetzt werden. Im *wissenschaftlichen 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 verdünnt. **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>Steinemema feltiae</i>	-	125,00	50,00	<b>25,00</b>	12,50	6,25
<i>H. bacteriophora</i>	-	50,00	25,00	<b>12,50</b>	8,33	4,17
<i>H. megidis</i>	-	50,00	25,00	<b>12,50</b>	8,33	4,17
<i>Steinemema carpocapsae</i>	-	250,00	125,00	<b>50,00</b>	25,00	12,50

**Fettgedruckt** sind die Dosierungen, die in dem *Praxistest* eingesetzt werden. Im *wissenschaftlichen 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						

Bezugsquellen für Material:

Einstellbare Pipetten ( <i>Fisherbrand</i> ): 50-200 µl	Art. Nr. 64890511	101,75	€
Einstellbare Pipette ( <i>Fisherbrand</i> ): 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	€

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