



Kolla på minimaskar

Text: Britt-Marie Lidesten



Oftast tänker vi inte på alla små kryp som lever i marken, vi ser dem inte utan förstoring men om de inte fanns skulle det få stor betydelse. En grupp av små maskar som vi ska studera närmare i den här artikeln kallas nematoder.

Nematoder lever under mycket varierande livsbetingelser. Vissa arter, som potatisnematoden, är besvärliga skadedjur. Några tropiska arter kan ge svåra sjukdomar hos människa. En art av nematod används också för bekämpning av så kallade mördarsniglar. Många arter lever i marken och ingår i näringsväven tillsammans med bland andra bakterier, hjuldjur, björndjur, hoppstjärter och kvalser. Här beskrivs hur man kan locka fram nematoder från kompostjord.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), en av de marklevande nematoderna, är en mycket välundersökt modellorganism. Genomet sekvenserades redan 1997 och Nobelpriset i medicin eller fysiologi 2002 gick till Sydney Brenner, H. Robert Horvitz och John E. Sulston för deras studier av *C. elegans*. John E. Sulston studerade hur varje cell utvecklas, från den ursprungliga befruktade äggcellen till de 959 celler som finns i en vuxen individ. Det finns kollektioner av *C. elegans* som innehåller stammar med ett naturligt ursprung, så väl som ett stort antal stammar där varje stam har minst en variant av de olika generna som finns i *C. elegans*.

Könsbestämning

Webbplattformen www.wormbook.org är mycket innehållsrik. Bland annat beskrivs hur

könsbestämning och befruktning fungerar. När man tar del av beskrivningen inser man hur annorlunda det kan fungera i jämförelse med människan.

C. elegans har två kön i likhet med människan, men där slutar likheterna. Hos *C. elegans* finns hermafroditer och hannar. Hermafroditer är modifierade honor som under ett stadium i larvutvecklingen tillverkar och sparar spermier, som sedan används i ett senare skede för att befrukta de egna äggen. Hermafroditer är normalt diploida, med fem par autosomer och två X-kromosomer. De bildar vanligen gameter som har en X-kromosom och vid befruktningen bildas därför avkomma med två X-kromosomer. I sällsynta fall kan hannar bildas om en X-kromosom går förlorad. Hannar kan para sig med och överföra spermier till hermafroditer. Hannar har också fem par autosomer, men bara en X-kromosom. De bildar spermier som antingen har en X-kromosom eller saknar X-kromosom, lika antal av varje typ. Detta innebär att halva antalet spermier ger upphov till hannar.

Odling av nematoder

Nedan beskrivs hur nematoder av olika slag, bland annat *C. elegans*, kan isoleras från jord och odlas på agarplattor.

Många intressanta frågeställningar väcks med konkret utgångspunkt i odling av levande nematoder. Olika jordar kan jämföras: kompostjord brukar ha gott om nematoder, men hur är det med jord från en barrskog eller lövskog? Var på plattorna befinner sig nematoderna och varför just där? Kan man se skillnad på olika ar-

ter av nematoder? Har de yttre olikheter? Rör de sig på olika sätt? Hur reagerar de på olika smaker och lukter? Hur påverkas de av ljus och temperatur? Vilka organismer ingår tillsammans med nematoderna i näringsvävarna i jordarna? Vad upptäckte nobelpristagarna i medicin eller fysiologi när de studerade nematoder? Vad forskar man på i dag med utgångspunkt i nematoder? Mycket finns också att ta del av i nedanstående referenser.

Beredning av odlingsplattor

Nedan beskrivs ett medium, (Nematode Groth Medium, NGM), som fungerar bra för isolering av nematoder. Fördelen med detta medium är att lagom mycket odlade bakterier, som behövs som mat till nematoderna, utvecklas medan oönskade mikroorganismer från jordprover hämmas i sin tillväxt. En begränsad bakterieväxt gör att maskarna syns bättre. Anpassa volymer av mediet efter behovet av odlingsplattor.

NGM-medium:

- 3 g NaCl
- 17 g agar
- 2,5 g pepton
- 975 ml H₂O
- 5 mg/ml kolesterol i etanol (autoklavera inte), 1 ml
- 1 M kaliumfosfatbuffert, pH 6.0 (108.3 g KH₂PO₄, 35.6 g K₂HPO₄, H₂O tillsätts till 1 liter), 25 ml
- 1M MgSO₄, 1 ml
- 1M CaCl₂, 1 ml
- Petriskålar
- E-kolv, 2 l

Beredning av mediet

1. Blanda 3 g NaCl, 17 g agar och 2.5 g pepton i en tvåliters E-kolv. Tillsätt 975 ml H₂O. Täck kolvens mynning med aluminiumfolie. Autoklavera.
2. Kyl kolven i vattenbad (55 °C) i 15 minuter. Tillsätt 1 ml 1M CaCl₂, 1 ml 5 mg/ml kolesterol i etanol, 1 ml 1M MgSO₄ och 25 ml 1M kaliumfosfatbuffert. Blanda om.
4. Fyll petriskålar till 2/3 med lösningen.
5. Låt gärna plattorna stå i rumstemperatur i två till tre dagar för att upptäcka kontaminerade plattor och för att fukten ska torka. Plattorna är hållbara i flera veckor om de förvaras i en lufttät behållare i rumstemperatur.

Ympning med bakterier

Material

- *E. coli*
- Steril tops eller ympnål

- NGM-plattor

Sprid ut *E.coli* på ett begränsat parti i mitten av plattorna. Maskarna tillbringar mesta tiden i bakteriemattan och om bakterierna sprids ut till plattans ytterkanter kan maskarna krypa upp på väggarna och torka ut och dö. Låt bakteriemattan växa till i rumstemperatur över natten eller i 37 °C i cirka åtta timmar. Plattorna kan förvaras i kylskåp under några dagar om försöken inte startar omedelbart. Maskarna trivs bäst mellan 16 och 25 °C.

Isolering av nematoder från jord

Det enklaste sättet att locka fram nematoder från ett jordprov är att använda NGM-plattor ympade med *E.coli* där jorden läggs runt kanten på agarplattan. (Se bild föregående sida) Maskar som äter bakterier kryper ut från jorden och ut på bakteriemattan. Nematoder som rör sig snabbt, exempelvis *C. elegans*, tar sig ut på bakteriemattan inom några minuter till timmar. För att hindra spridning kan man isolera plattorna med nematoder med tape eller plastfilm och undvika att öppna dem efter det att odlingen startats.

Material

- NGM-plattor ympade med *E.coli*
- Jord från kompost, eventuellt jord från trädgård, lövskog, barrskog

Metodbeskrivning

1. En agarplatta med NGM-medium med en matta av *E.coli* i mitten används för att odla fram nematoder från jord.
2. Sprid 1-2 gram jord i ytterkanten av agarplattan, utanför mattan av bakterier. Jordproverna kan vägas för att man ska få en uppfattning om antalet maskar per mängd jord. Fukta jorden med 1 ml vatten.

Resultat och utvärdering

Efter några timmar upp till någon dag studeras plattan i stereolupp. Maskarna kan leva i flera dagar på plattan.

Referenser

WormBook. The Online Review of *C.elegans* BIOLOGY. www.wormbook.org

- Introduction to sex determination. Robert K. Herman, Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota
- Maintenance of *C.elegans*. Theresia Stiermage
- Isolation of *C. elegans* and related nematodes. Theresia Stiermage

Wormatlas, www.wormatlas.org, med ett fantastiskt fint bildmaterial.

WormClassroom: www.wormclassroom.org