

Baermann Funnel법의 선충 분리 여과지 선발

강헌일¹ · 은 근¹ · 하지혜¹ · 이재현¹ · 김동근² · 김용철^{1,2} · 최인수^{1,2*}¹부산대학교 식물생명과학과, ²부산대학교 생명산업융합연구원 선충연구센터

Screening of Tissue Papers for Nematode Extraction for the Baermann Funnel Method

Heonil Kang¹, Geun Eun¹, Jihye Ha¹, Jaehyun Lee¹, Donggeun Kim², Yongchul Kim^{1,2} and Insoo Choi^{1,2*}¹Department of Plant Bioscience, College of Natural Resource and Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea²Nematode Research Center, Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

ABSTRACT: The Baermann funnel method requires approximately four Kimwipe tissues for research a nematode count under a stereo microscope. To select more efficient and economical nematode extraction paper for nematode extraction, 15 different kinds of tissue papers were tested and compared with Kimwipe tissues. Nematode species used in the extraction efficiency tests include juvenile (J2) of *Heterodera* sp., J2 of *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Rhabditis* sp., *Acrobeloides* sp., *Panagrolaimus* sp., *Poikilolaimus* sp. and Diplogasterida. The extraction efficiency varied between 42.0 to 88.8%. Considering costs, extraction efficacy, and clarity, the Pulling Kitchen Towel (Monalisa Co., Korea) is the best tissue, with clarity A, isolation efficiency of 69.4% (not significantly different compared to Kimwipe 1 ply 88.8%), and ½ costs per isolation of Kimwipe 2 ply.

Key words: Baermann funnel method, Filter, Nematode extraction, Soil, Tissue paper

초 록: Baermann funnel법을 이용하여 비교적 선명한 선충 분리를 위해서는 Kimwipes 4매 정도를 여과지로 사용하여야 한다. 더욱 효율적이고 경제적인 선충 분리용 여과지를 찾기 위하여 시판되고 있는 15개의 제품을 Kimwipes와 비교 실험을 진행하였다. 선충 분리 효율 검증에는 *Heterodera* sp.의 유충, *Meloidogyne* sp.의 유충, *Pratylenchus* sp., *Rhabditis* sp., *Acrobeloides* sp., *Panagrolaimus* sp., *Poikilolaimus* sp. 그리고 Diplogasterida 등 8속의 선충을 이용하였다. 전체 선충 분리 효율은 42.0 - 88.8%로 나타났다. 1회 비용, 선충 분리 효율 그리고 선명도를 고려하였을 때, 선명도는 A이고 분리 효율은 69.4%로 Kimwipes 4장과 비슷하며($P=0.05$), 비용은 50% 저렴한 국내 업체 모나리자 사의 Pulling Kitchen Towel 1매 사용이 가장 적합하였다.

검색어: Baermann funnel법, 선충 분리, 여과지, 토양, 효율

동물계 선형동물문에 속하는 선충은 약 20,000여종이 기록되어 있으며, 식이습성이 식세균성(bacteriovorous), 식균성(fungivorous), 잡식성(omnivorous), 포식성(predatory), 식물 기생성(plant parasitic), 동물기생성(animal parasitic) 등으로 다양하며 아울러 크기와 움직임도 서로 다르다(Yeates, 1993; Kim et al., 2012). 토양 중에는 약 75만 마리/m²의 선충이 서식하고 있는데(Park et al., 1999), 선충은 유기물을 분해하여 무기

태 질소를 공급함으로써 토양생태계의 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다(Yeates, 1979; McSorley, 2004). 따라서 특정 지역의 토양 내 선충 상을 분석한다면 토양 생태계에 대한 가장 근본적인 이해도 가능할 것이다(de Ruiter et al., 2005).

토양 내 선충의 생태, 밀도 및 분포 분석 등을 위해서는 선충의 분리가 가장 기본이다. 토양 중의 선충 분리법으로는 Baermann funnel, flotation 및 sieving, Flegg modified Cobb technique 그리고 Oostencrink elutriator 등 여러 가지 분리법이 알려져 있다(Hallmann and Viaene, 2013). 선충의 종류나 목적에 따라 각 분리법 별로 장단점이 있으나, 일반적으로 토양의 살아있는 선

*Corresponding author: ichoi@pusan.ac.kr

Received June 27 2016; Revised September 21 2016

Accepted October 19 2016

층을 분리할 때에는 Baermann funnel법이 가장 많이 이용된다 (Whitehead and Hemming, 1965).

Baerman funnel법에는 토양과 선충을 분리하기 위해 여과지가 사용되는데, 일반적으로 Cottenwool Filter Paper와 Kimwipes가 사용된다(Ayoub, 1977). 최근 Kimwipes 2매로 선충을 분리하였을 때 토양에 이물질이 너무 많아 해부현미경 하에서 선충의 관찰에 어려움이 있었다. 국내 연구로서는 1985년 Cho와 Choi는 Crown Hankie 4매를 Baermann funnel 여과지로 선발하였으나 Crown Hankie는 30년 전 제품으로 더 이상 구입이 불가능하다(Cho and Choi, 1985). 따라서 본 연구에서는 현재 우리나라에서 시판되고 있는 화장지류 중에서 Kimwipes에 비하여 선충 분리 효율이 비슷하거나 높으면서 이용성 및 경제적으로 가장 적합한 선충 분리용 여과지를 구하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

여과지 수집 및 1차 선발

시중에 시판되고 있는 6종의 화장지류와 5종의 키친타올류, 3종의 물티슈류, 그리고 2종의 냅킨류 등 총 16종의 제품을 수집하여 실험에 사용하였다(Table 1). Baermann funnel 선충 분

리법에는 젖은 토양이 사용됨으로 선충 분리용 여과지로 사용하기 위해서는 필수적으로 물속에서 잘 찢어지지 않아야 한다. 따라서 수집한 제품들을 수분에 대한 장력시험을 실시하여 1차 선발을 하였다. 수분에 대한 장력시험은 10 cm × 10 cm의 휴지에 물 1 ml을 적셔 무게 추를 이용하여 장력을 측정하고, Kimwipes 1매의 장력을 기준으로 Kimwipes 보다 강한 것과 비슷한 것은 +, 약한 것은 - 로 하여 선발하였다.

1차 선발 여과지에 대한 선명도 검증

수분에 대한 장력시험을 통하여 1차로 8종의 제품을 선발하고, 각 여과지 별로 매수를 달리하여 선충 분리 시의 선명도를 조사하였다. 선명도 조사는 1차 선발된 8종의 제품들 가운데 Kimwipes를 각각 2매, 3매, 4매, 5매, Kimtowel ½매, Pulling Kitchen Towel 2매를 추가하여 총 14처리로 시험을 실시하였다(Table 2). 선충 검경시의 선명도를 조사하기 위하여 발 토양을 채집하여 직경 1 mm 채로 쳐서 굵은 돌은 걸러내고, 남은 토양 300 cm³를 취하여 Baermann funnel법으로 선충을 분리하였다(Table 2) (Southey, 1986). 약 24시간 후 여과지를 통과한 선충을 취하여 해부현미경 하에서 선명도를 확인하였다. 선명도는 8배 해부현미경하에서 한 시야 당 토양입자 수를 헤아려 A=0-100, B=101-200, C=201-300, D=301-400, E=400개 이상

Table 1. List of tissues used for the nematode-extraction tissue test

| Categorize | Manufacturer | Trade Name | Strength ^a |
|---------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Facial Tissue | Yuhan-kimberly Ltd. | Kimwipes | + |
| | Asia Pulp & Paper Co., Ltd. | Hello | - |
| | Monalisa Co., Ltd. | Good | - |
| | Samjung Pulp Co., Ltd. | Basic | - |
| | Yuhan-kimberly Ltd. | Deluxe | - |
| | Yuhan-kimberly Ltd. | Aloe | - |
| Kitchen Towel | Yuhan-kimberly Ltd. | Scott-t | + |
| | Yuhan-kimberly Ltd. | Scott-f | + |
| | Monalisa Co., Ltd. | Vellagio | + |
| | Dae Wang Paper Co., Ltd. | King | + |
| | Monalisa Co., Ltd. | Pulling Kitchen Towel | + |
| Wet Tissue | AJ Co., Ltd. | Soft | - |
| | Yuhan Kimberly Co., Ltd. | Huggies | - |
| | Yuhan Kimberly Co., Ltd. | Ultra | + |
| Napkin | Yuhan Kimberly Co., Ltd. | Kleenex | - |
| | Yuhan Kimberly Co., Ltd. | Kimtowel | + |

^a '+' = Tolerable with Kimwipes 1 ply (standard) by tolerance test of 1 ml water/100 cm² tissue, '-' = Not tolerable to 1 ml water/100 cm² tissue.

Table 2. Ex traction efficiency of tissue for nematode-extraction in Baermann funnels

| Tissues ^a | Nematode extraction efficiency (%) | | | | | | | | | | Price/ Isolation (won) |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|
| | <i>Heterodera</i> spp. | <i>Meloidogyne</i> spp. | <i>Rhabditis</i> spp. | <i>Pratylenchus</i> spp. | <i>Acroboloides</i> spp. | Diplogasteridae | <i>Panagrolaimus</i> spp. | <i>Poikilolaimus</i> spp. | Total ^c | Clarity ^d | |
| Kimwipes (1) ^b | 57.4 | 100.0 | 100.0 | 70.9 | 90.7 | 95.0 | 97.5 | 98.8 | 88.8 A | E | 9 |
| Kimwipes (2) | 56.5 | 100.0 | 85.7 | 87.3 | 82.8 | 74.3 | 96.8 | 89.2 | 84.1 AB | E | 18 |
| Kimwipes (3) | 56.5 | 68.6 | 85.7 | 87.3 | 79.8 | 73.3 | 92.8 | 83.1 | 78.4 ABC | D | 28 |
| Kimwipes (4) | 63.5 | 68.6 | 82.9 | 100.0 | 70.4 | 67.3 | 93.6 | 67.5 | 76.7 ABC | C | 37 |
| Kimwipes (5) | 42.4 | 62.9 | 74.3 | 76.4 | 65.3 | 68.3 | 90.7 | 47.6 | 66.0 BCDE | B | 46 |
| Scott-t (1) | 49.4 | 100.0 | 80.0 | 54.5 | 71.5 | 80.2 | 88.6 | 86.7 | 76.4 ABC | E | 51 |
| Scott-f (1) | 28.2 | 97.1 | 74.3 | 54.5 | 74.1 | 46.5 | 83.5 | 42.2 | 62.6 BCDEF | E | 55 |
| Vellagio (1) | 35.3 | 57.1 | 51.4 | 65.5 | 68.3 | 67.3 | 52.5 | 39.8 | 54.7 DEF | C | 10 |
| King (1) | 14.1 | 11.4 | 25.7 | 0 | 60.2 | 64.4 | 92.4 | 67.5 | 42.0 F | A | 12 |
| Pulling Kitchen Towel (1) | 56.5 | 62.9 | 51.4 | 76.4 | 81.3 | 68.3 | 78.8 | 79.5 | 69.4 ABCDE | A | 8 |
| Pulling Kitchen Towel (2) | 21.2 | 40.0 | 97.1 | 32.7 | 63.0 | 51.5 | 59.7 | 28.9 | 49.3 EF | A | 16 |
| Ultra (1) | 42.4 | 97.1 | 91.4 | 76.4 | 72.6 | 80.2 | 67.4 | 72.3 | 75.0 ABCD | D | 31 |
| Kimtowel (1/2) | 84.7 | 40.0 | 68.6 | 54.5 | 95.0 | 83.2 | 57.2 | 83.1 | 70.8 ABCD | E | 23 |
| Kimtowel (1) | 28.2 | 74.3 | 60.0 | 32.7 | 87.6 | 79.2 | 52.5 | 73.5 | 61.0 CDEF | E | 46 |

^aManufacturer of tissues see Table 1.

^bNumber means ply of tissues.

^cTotal of 8 replications. Number in columns followed by the same letter were not significantly different ($P=0.05$), according to Duncan's multiple range test.

^dNumber of debris per 80X visual field under a stereo microscope; A = 0-100, B = 101-200, C = 201-300, D = 301-400, and E = above 400.

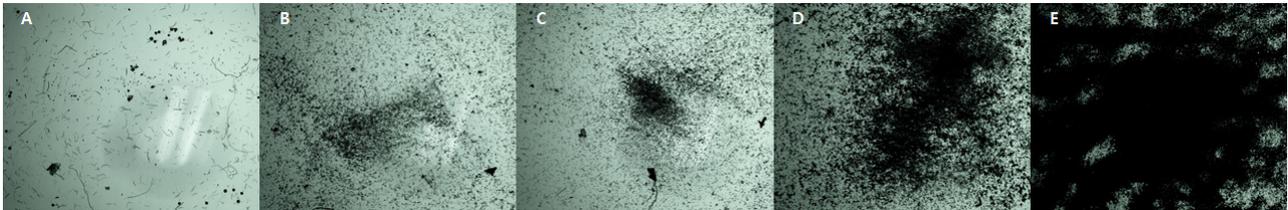


Fig. 1. Clarity of tissue for nematode-extraction in Baermann funnels (A = 0-100, B = 101-200, C = 201-300, D = 301-400, and E = above 400 per 80X).

의 5단계로 하였다(Fig. 1).

선충 여과 효율 검증

선충은 크기와 움직임을 고려하여 식물기생성선충에 속하는 *Heterodera* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. 등 3종과 자유생활선충에 속하는 *Rhabditis* sp., *Acrobeloides* sp., *Diplogasteridae*, *Panagrolaimus* sp. 그리고 *Poikilolaimus* sp. 등 5종, 총 8속의 선충을 이용하여 여과 효율을 조사하였다 (Table 2). *Heterodera* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. 등 3종의 선충은 토양으로부터 분리하였으며, *Rhabditis* sp., *Acrobeloides* sp., *Diplogasteridae*, *Panagrolaimus* sp. 그리고 *Poikilolaimus* sp. 등 5종의 선충은 배양배지로부터 분리하여 1 ml당 1000마리씩 시험에 사용하였다. 각각의 선충을 1차 선별된 여과지를 사용하여 Baermann funnel법으로 분리하고, 약 24시간 후 여과지를 통과한 선충을 채취하여 해부현미경을 이용해 각 여과지 별로 통과된 선충의 마리수를 측정하여 분리효율을 조사하였다. 8속의 선충 여과 효율은 통계분석 SAS 프로그램(SAS 9.4, SAS Institute Inc., USA)을 이용하여 Duncan 다중 검정법($P=0.05$)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

수집 여과지의 장력실험

토양 선충의 분리에 이용되는 여과지 선별을 위하여 수집한 16개 제품의 수분에 대한 장력을 알아보고자 물 1 ml을 각각의 화장지에 떨어뜨려 장력시험을 한 결과 Hello, Good, Basic, Deluxe, Aloe 이상 5종의 화장지류와 Kleenex 냅킨은 물에 쉽게 풀어져 Kimwipes 보다 낮은 장력을 나타냈다. 물티슈류 중 Soft와 Huggies는 섬유조직이 쉽게 떨어져 나와 해부현미경 하에서 선충과 혼란을 일으키기에 선충 분리에 사용되기에는 부적합하였다. Cho와 Choi (1985)는 여과지의 향수처리 유무에 따라서 선충의 분리효율이 작게는 23%에서 많게는 53%까지

차이가 난다고 하였으므로, 수분에 대한 장력이 강하면서 향수 처리가 되지 않은 8종의 제품을 1차 선별하였다(Table 1).

선충 분리 선명도

선명도는 해부현미경 하에서 선충 속 구분 용이성에 따라 판정하였는데, A와 B는 선충관찰이 용이하였으며, C에서는 관찰은 가능하나 속 동정의 어려움이 있었다. 선명도 D에서는 선충의 움직임만을 관찰할 수 있는 정도였고, E에서는 거의 관찰이 불가능하였다. 토양 300 cm³을 사용하여 선명도 검정한 결과, Kimwipes 1매와 2매에서는 선명도 E, 3매의 선명도는 D, 4매에서는 C, 5매를 사용하였을 때 선명도는 B로 나타나 선충 종 동정을 위해서는 Kimwipes 4매 이상이 필요하였다. Scott-t와 Scott-f 사용 시에는 선명도는 E로 나타났으며, Ultra는 선명도 D 그리고 Kimtowel을 사용하였을 때 선명도는 E로 관찰이 어려웠으며, Vellagio 사용 시 선명도가 C로 나타났다. King 1매와 Pulling Kitchen Towel 1매와 2매 사용 시에는 선명도가 A로 나타나 선충 밀도 및 종 관찰에 가장 용이하였다(Table 2).

선충의 분리 효율

선충의 크기 및 움직임을 고려하여 순수 분리 배양된 8속의 선충을 각각의 여과지를 이용하여 Baermann funnel법에 적용한 24시간 후 선충 분리 효율은 Kimwipes 1매 사용 시 88.8%, Kimwipes 2매 84.1%, Kimwipes 3매 78.4%, Kimwipes 4매 76.7%, Kimwipes 5매 66.0%로 매수가 증가하면 분리효율이 약간씩 떨어지는 것으로 나타났다(Table 2). 8속의 선충 분리 효율에 대한 시험 결과 Kimwipes 1매, Kimwipes 2매, Kimwipes 3매, Kimwipes 4매, Scott-t 1매, Ultra 1매, Pulling Kitchen Towel 1매에서의 분리 효율이 좋았으며($P=0.05$), King 1매 사용 시 분리효율이 가장 낮았다(Table 2).

결과를 종합하여 볼 때, 기존 Kimwipes 2매 사용 시 분리효율은 높으나 선명도가 낮아 선충 검정에 어려움이 있고, 반면 매수를 증가하였을 때 경제성과 편리성 및 분리효율이 낮아졌

다. Pulling Kitchen Towel 1매 사용 시 1회 분리 비용이 Kimwipes 2매 보다 55.6% 저렴하고, 선명도 A로 선충 관찰이 용이하며, 선충 분리 효율은 Kimwipes 5장(66.0%) 보다 약간 높은 69.4%였고, Kimwipes 1장(88.8%)과 통계적 유의성($P=0.05$)은 없었다. 또한, 1회 분리 시 1매를 사용하기 때문에 여과지 사용 편리성이 좋았다(Table 2). 따라서 Baermann funnel법에 사용되는 여과지로 모나리자사의 Pulling Kitchen Towel 제품의 1매 사용이 Kimwipes를 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

Literature Cited

- Ayoub, S.M., 1977. Plant Nematology: An agricultural training aid. Sacramento: State of California, Dept. Food and Agriculture.
- Cho, M.R., Choi, Y.E., 1985. Selection of tissue papers for nematode extraction from soil in combined screening-funnel method. Korean J. Plant Prot. 24, 39-44.
- de Ruiter, P.C., Neutel, A.M., Moore, J.C., 2005. The balance between productivity and food web structure in soil ecosystems, in: Bardgett, R.D., Usher, M.B., Hopkins, D.W. (Eds.), Biological Diversity and Function in Soil. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 139-153.
- Hallmann, J., Viaene, N., 2013. Nematode extraction. Bull. OEPP. 43, 471-495.
- Kim, D.G., Park, B.Y., Ryu, Y.H., 2012. Soil nematode fauna in Dokdo island of Korea. Res. Plant Dis. 18, 381-386.
- McSorley, R., 2004. Soil-Inhabiting Nematodes. The University of Florida. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/soil_nematode.htm.
- Park, H.C., Kim, S.M., Kim, Y.C., Lee, C.Y., Choi, I.S., 1999. Occurrence of nematodes in carrot fields. J. Agri. Tech. & Dev. Inst. 3, 31-34.
- SAS. 2014. SAS/STAT Software for PC. Release 9.4 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Southey, J.F., 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Her Majesty's Stationery Office, London, UK, pp. 202.
- Whitehead A.G., Hemming, J.R., 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. Appl. Biol. 55, 25-38.
- Yeates, G.W., 1979. Soil nematodes in terrestrial ecosystems. J. Nematol. 11, 213-229.
- Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G., Freckman, D.W., Georgieva, S.S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. J. Nematol. 25, 315-331.
- Yeates, G.W., Bongers, T., 1999. Nematode diversity in agroecosystems. Agr. Ecosyst. Environ. 74, 133-135.