

Mihaela Zec¹, Mirjana Brmež², Marija Ivezić², Emilija Raspudić², Ivana Majić²
znanstveni rad

Usporedba učinkovitosti različitih metoda izdvajanja nematoda iz tla

Sažetak

Cilj je istraživanja utvrditi koja je metoda izdvajanja nematoda najučinkovitija te kojom se dobiva najčišći uzorak. Cilj je također odrediti kojom metodom se dobiva najveći broj nematoda nakon 24 sata, a kojom nakon 48 sati.

Uzorci su prikupljeni na polju na kojem je prethodno uzgajan krumpir, veličine 1700 m². Uzorkovanje je obavljeno 21.3.2011. na području Našica. Ukupno je prikupljeno te analizirano šest uzoraka. Izdvajanje nematoda iz tla izvršeno je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, u Zavodu za zaštitu bilja, Katedra za entomologiju i nematologiju, pomoću tri metode: Seinhorstovom metodom boca (Seinhorst, 1956.), Cobbovom metodom sita (Cobb, 1918.) i Baermannovom metodom lijevaka (Baermann, 1917.).

Baermannovom metodom lijevaka dobili su se najčišći uzorci. Nakon 24 sata broj nematoda bio je 463 jedinke. Nakon 48 sati broj nematoda nije se značajnije promijenio, izbrojane su 472 nematode. Seinhorstovom metodom boca taj broj je 251 jedinka nakon vremena od 24 sata. Broj nematoda značajnije je porastao nakon 48 sati, nađeno je 644 nematode. Cobbovom metodom sita dobiveni su prljavi uzorci. Broj nematoda u posljednjem pokusu bio je 194 jedinke nakon 24 sata, a nakon 48 sati broj je porastao na 520 jedinki. Ukupna brojnost izdvojenih nematoda metodom sita bila je 714, metodom boca 895, a metodom lijevaka 935 jedinki.

Zaključuje se kako su najčišći uzorci dobiveni Baermannovom metodom lijevaka. Cobbova metoda sita pokazala se prilično neučinkovitom i složenom. Dokazano je kako vrijeme izdvajanja utječe na brojnost nematoda, a na izdvajanje utječe vlažnost tla te tip tla. Najjednostavnija, najbrža (24 sata) i učinkovita metoda pokazala se Baermannova metoda lijevka.

Glavne riječi: nematode, metode izdvajanja, metoda boca, metoda sita, metoda lijevaka

Uvod

Nematode su najbrojnija skupina višestaničnih organizama na Zemlji. Oblikom tijela podsjećaju na konac ili vlakno, prema čemu su dobile ime i to od grčkih riječi „*nēma*“, „*nēmatos*“ što znači nit ili konac te „*eidōs*“ – slično. Do danas je opisano oko 28 tisuća vrsta (Hugot i sur., 2001.), a od toga su 20 tisuća stanovnici tla (Bongers i Ferris, 1999.). Nalazimo ih kao slobodnoživuće vrste ili vrste koje parazitiraju biljke, životinje i ljude. Zbog velike prilagodivosti različitim ekološkim uvjetima predstavljaju dominantnu skupinu mikrofauune. Bez obzira na stanište i način života, životna aktivnost nematoda ovisi o prisutnosti

vode kao primarnom ekološkom čimbeniku. Tako i u tlu, vodeni film obavija čestice tla i na taj način osigurava kretanje i životne procese nematoda (Bongers i Ferris, 1999.).

Na raznolikost nematoda u tlu utječu vegetacija, kultivacija, klimatski i pedološki čimbenici. Na brojnost nematoda kao i na dinamiku populacije utječe velik broj različitih čimbenika kao što su način života, pokretljivost, sposobnost i brzina reprodukcije, mortalitet, biljni pokrov i količina organske tvari u tlu, dostupnost hrane, povijest ekosustava, temperatura i vlaga tla, aeriranost, prirodni neprijatelji te razna uznemirenja nematofaune.

Nematode se u tlu nalaze najčešće u blizini same površine, do dubine 15-ak cm. Najveća populacija nematoda nalazi se u tlima bogatima organskim tvarima, dok u tlima gdje postoji nedostatak kisika smanjuje se njihova brojnost. Također reagiraju na prisustvo CO₂, pH reakciju tla te na kemijske elemente prisutne u tlu (Ivezić i sur., 1990.).

Nematode variraju u osjetljivosti pri onečišćenju okoliša i promjenama u tlu pa se koriste pri analizi kvalitete tla (Porazinska i sur., 1999.), a zbog sve veće brige za okoliš, koriste se i kao pokazatelji razine onečišćenja tla, količine organske tvari u tlu te cjelokupne biogenosti i zdravlja tla (Bongers i Ferris, 1999.). Od 1970. godine nematode se koriste kao bioindikator onečišćenja staništa (Neher, 2001.) te bioindikator promjena u agroekosustavu (Beres i Husti, 2006.; Brmež i sur., 2007.).

Kako bismo nematode mogli lakše proučavati i istraživati, potrebno ih je izdvojiti iz određenih supstrata, za što postoje posebne metode. Obrada uzoraka sastoji se od izdvajanja nematoda iz supstrata te identifikacije i brojenja istih. Identifikacija nematoda treba biti brza i pouzdana. Istraživanja treba provoditi svake tri do četiri godine kako bi se dobila jasna predodžba određene populacije te njihova distribucija unutar nekog područja. Metode se svrstavaju u dvije grupe: metode izdvajanja koje se temelje na pokretljivosti nematoda i one koje ovise o veličini i gustoći populacije nematoda. Većina metoda izdvajanja neizravne su te sastavljene od niza postupaka. Najvažniji čimbenici koji mogu utjecati na učinkovitost izdvajanja uključuju izbor metode, vrijeme izdvajanja, vrstu materijala, tip tla te vrstu nematoda.

Metode se mogu razlikovati i prema materijalu iz kojeg se nematode izdvajaju: tlo, biljni materijal te različiti drugi supstrati.

Neke su metode izdvajanja nematoda iz tla učinkovitije kod određenih vrsta nematoda, dok su druge učinkovitije kod određene vrste tla. Također postoje metode koje zahtijevaju skupu opremu ili suprotno tomu, naporan rad, što se najčešće koristi u različitim istraživanjima.

Metoda koja se koristi za izdvajanje velikog broja nematoda iz većih uzoraka tla je metoda sita (Cobb, 1918.). Njen nedostatak jest to što zahtijeva skupa sita, iskustvo te se

¹ Mihaela Zec, mag.ing.agr

² prof.dr.sc. Mirjana Brmež, prof.dr.sc. Marija Ivezić, prof.dr.sc. Emilija Raspudić, doc.dr.sc. Ivana Majić, Zavod za zaštitu bilja, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1D, Osijek

nematode teže uočavaju pod mikroskopom zbog sitnih čestica organske tvari. Suprotno toj metodi, metoda lijevka (Baermann, 1917.) učinkovita je za izdvajanje aktivnih nematoda iz malih uzoraka tla. Erlenmeyer metoda (Seinhorst 1956.) ili metoda boca koristi se za izdvajanje aktivnih nematoda iz tla. Relativno visoka učinkovitost ekstrakcije može se dobiti jednostavnom opremom i malom količinom vode. Međutim, metoda zahtijeva intenzivan rad te dosta vremena. Oostenbrinkov aparat (Oostenbrink, 1954.) koristi se za izdvajanje nematoda iz tla, riječnog mulja, stelje i drugih supstrata. U usporedbi s metodom boca, taloženje teških čestica tla lakše je kontrolirati tom metodom te se dobivaju čišći i pregledniji uzorci. S druge strane, oprema je skupa te sama metoda zahtijeva relativno velike količine vode. Metoda centrifuge (Gooris i D'Herde, 1972.) koristi se za izdvajanje aktivnih, kao i neaktivnih nematode iz tla, sedimentata i gnojiva. Omogućuje obradu velikih uzoraka. Velika prednost je to što je pogodna za izoliranje neaktivnih nematoda.

Za razliku od prethodno spomenutih metoda izdvajanja nematoda iz tla, postoje metode koje ovise o vrstama i brojnosti nematoda te vrsti i količini uzorka. To su metode izdvajanja nematoda iz biljnog tkiva kao što su korijenje, lukovice, lišće ili stabljike.

Disekcija (Ayoub, 1977.) je pogodna za dijagnostičke svrhe. Istraživanja o vrstama nematoda često uključuju proučavanje penetracije i razvoj unutar biljaka, najčešće korijena, a u tu svrhu razvijeni su mnogi postupci bojenja tkiva (Daykin i Hussey, 1985.). Metoda inkubacije (Young, 1954.) pogodna je za izdvajanje aktivnih endoparazitskih nematoda dok se kombinacija maceracije i prosijavanja (Southey, 1970.) koristi za izdvajanje kako aktivnih tako i neaktivnih endoparazitskih nematoda iz korijena. Ta je metoda brza jer ne ovisi o pokretljivosti nematoda.

I na kraju, postoje posebne metode za izdvajanje cista jer se njihova veličina, oblik i težina razlikuju od drugih faza razvoja nematoda. "Baunacke metoda" ili metoda bijele posude (Baunacke, 1922.) koristi se za izdvajanje cista iz suhog tla, veličine uzorka do 50g. Metoda je vrlo jednostavna, brza, jeftina i ne zahtijeva velike količine vode. Ipak, učinkovitost izdvajanja i veličina uzorka ograničeni su te rezultati ovise o sposobnosti osobe koja izdvajanje obavlja na taj način. Fenwickov aparat (Fenwick, 1940.) može se koristiti za izdvajanje cista iz vlažnog tla, uzorka do 300g.

Cilj je ovog rada usporediti brojnost nematoda u uzorku tla nakon izdvajanja nematoda metodom boca (Seinhorst, 1956.), metodom sita (Cobb, 1918.) te metodom lijevka (Baermann, 1917.). Utvrdit će se koja metoda je najučinkovitija te kojom se dobiva najčišći uzorak. Cilj je također odrediti kojom metodom se dobiva najveći broj nematoda nakon 24 sata, a kojom nakon 48 sati.

Materijal i metode

Brojnost nematoda proučavana je na polju na kojem je kao pretkultura uzgajan kumpir. Uzorci su uzeti 21.3.2011. na području Našica. Prikupljanje uzoraka obavljeno je na



Slika 1. Otvajanje nematoda od čestica tla – 10 minuta (Foto: M. Zec)



Slika 2. Sadržaj boca A i C propušta se kroz sita od 100 µm do 25 µm (Foto: M. Zec)

polju veličine 1700m². Uzorkovanje je učinjeno nematološkom sondom promjera 2cm, više od 30 uboda na dubini 15 do 20cm. Nakon toga uzorci su spremljeni u plastične vrećice s priloženom karticom na kojoj je zapisano vrijeme, lokalitet, uzgajana kultura te površina polja. Tlo se zatim čuvalo u hladnjaku pri temperaturi od +4°C sve do izdvajanja nematoda pomoću tri metode. Ukupno je prikupljeno te analizirano šest uzoraka. Tlo je prosijano neposredno pred izdvajanje nematoda.

Izdvajanje nematoda iz tla izvršeno je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, u Zavodu za zaštitu bilja, na Katedri za entomologiju i nematologiju, pomoću tri metode; Seinhorstovom metodom boca (Seinhorst, 1956.), Cobbovom metodom sita (Cobb, 1918.) te Baermannovom metodom lijevka (Baermann, 1917.). Uzorak tla je bio 100 g.

Za izdvajanje nematoda iz tla korištena je metoda boca ili Erlenmeyer metoda (Seinhorst, 1956.) koja se temelji na sedimentaciji tla u četiri boce (A, B, C i D) ispunjene vodom, pri čemu dolazi do odvajanja nematoda od čestica tla u vodenu suspenziju tijekom određenog vremenskog razdoblja.

Uzet je poduzorak tla, prosječnog volumena oko 100cm³. Uzorak je prvo prosijan kroz obično sito te pomiješan s 1000 ml vode i smješten u bocu A. Preostale tri boce napunjene su čistom vodom. Boca A s vodenom suspenzijom tla ostavi se stati u vremenskom razdoblju od 10 minuta povrh boce B, pri čemu dolazi do izdvajanja nematoda od čestica tla, no i znatna količina tla i težih čestica tla prelazi u bocu B. Kako bi se odvojile čestice tla od nečistoća (pr. kamenje, organske nečistoće), boca B ostavi se povrh boce D nakratko, oko dvije minute. Posljednja boca A ostavi se povrh boce C idućih 10 minuta kako bi se preostale nematode dodatno odvojile od čestica tla u vodenu suspenziju (Slika 1.). Suspenzija iz boce A i C propusti se kroz nekoliko sita različitih otvora od 100 µm prema 25µm (Slika 2.), a boca B preko jednog sita od 60 µm. Nematode ostaju na površini sita dok ostatak suspenzije tla i vode prolazi sita koja se ispiru pod mlazom vode u čistu posudu. Sadržaj posude u koju je isprano sito boce B, izlije se preko sita 90 do 50µm na kojem je položen nematološki filter papir.

Sito se polaže na metalni križasti stalak u plitku posudu ispunjenu vodom. U sredinu sita na filtere polaže se satno staklo. Sadržaj posude A i C boce istrese se preko satnog stakalca na sito 25 μ m. Ono se potom položi u Petrijevu posudu i prelije s 50ml vode. Nakon toga sito se položi u posudu i prelije sa 100ml vode. Nematode prolaze kroz filter papir i to u posudu s vodom u kojoj je položeno sito. Uzorci se pregledavaju nakon 24 sata ili 48 sati, pri čemu se kroz navedeno vremensko razdoblje omogućio nematodama prolazak kroz sita u vodu, a preostale organske nečistoće zadržale su se na situ ili filter papiru.

Druga korištena metoda bila je lijevak metoda, tj. Baermannova metoda. Aparat se sastoji od lijevaka na čijim krajevima su gumene cijevi pričvršćene stezaljkom. Lijevci su u uspravnom položaju te napunjeni vodom (Slika 3.). Unutar lijevaka nalaze se sita s nematološkim filter papirom.

Postupak je jednostavan. Lijevci se učvrste u stalak. Preko sita se stavi filter papir te se sita namjestu u lijevke. Tada se na sita stavlja uzorak tla do 100g. Nakon toga, lijevak se do samog ruba ispuni vodom (Slika 4.). Poslije određenog vremena, nematode kroz sito prelaze u vodu lijevka. Tu ih se nakon 24 ili 48 sati prikuplja u 5-10 ml suspenzije s nematodama te su spremne za brojenje i identifikaciju.

Metoda sita (Cobb, 1918.) upotrebljava se za izdvajanje aktivnih nematoda iz tla. Nematode se odvajaju od čestica tla nakon što se uzorak tla pomiješa s vodom te se stvori suspenzija. Takva suspenzija se pretače preko nekoliko sita različitih veličina otvora od 1000 – 45 μ m pa se ovom metodom izdvajaju nematode različitih veličina. Nematode pri pretakanju ostaju na situ, dok manje čestice tla i drugih nečistoća prolaze sito.

Uzorak tla od 100g izmiješa se u velikoj čaši volumena dvije litre s jednom litrom vode u homogenu suspenziju. Ta suspenzija treba odstajati oko 15 sekundi dok se vrtlog u



Slika 3. Aparatura za Baermannovu metodu lijevaka (Foto: M. Zec)



Slika 4. Lijevak s uzorkom tla ispunjen vodom (Foto: M. Zec)

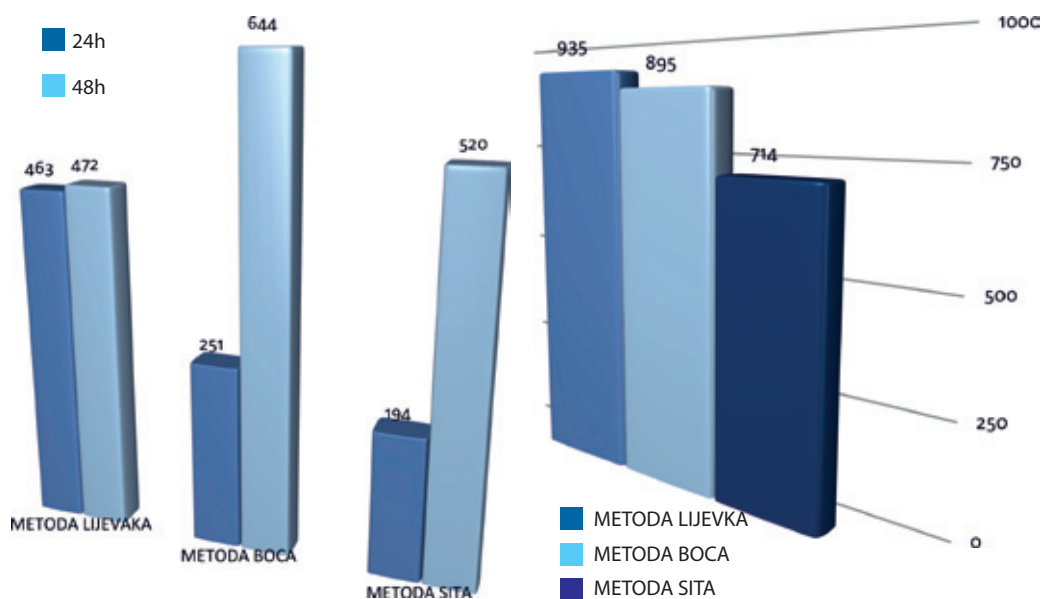


Slika 5. Suspenzija iz posude 1 u posudu 2 kroz sito od 1000 i 500 μ m (Foto: M. Zec)



Slika 6. Suspenzija iz plastične posude 3 pažljivo se izliva preko satnog stakla u ekstrakcijsko sito (Foto: M. Zec)

vodi smiri, potom se suspenzija pretače bez taloga u plastičnu posudu 1. Preostali talog u visokoj čaši treba ponovno izmiješati s vodom te nakon 15 sekundi pretočiti suspenziju u posudu 1. Taj se postupak ponavlja tri puta. Nakon ponavljanja postupka talog iz visoke posude treba baciti. Suspenziju iz posude 1 zatim pretačemo kroz sito od 1000 i 500 μ m u posudu 2 (Slika 5.). Nakon što se pretoči, sito je potrebno blago potopiti i protresti u suspenziji kako nematode ne bi zaostale na njemu. Ostaci nečistoća na situ od 1000 i 500 μ m zatim se odbacuju. Suspenzija iz posude 2 nakon toga se pretače kroz sito od 350 μ m u posudu 1. Nematode i ostatci sa sita ispiru se u posudu 3 ili u kolekcijisku posudu u kojoj će se ispirati sva sita. Suspenziju iz posude 1 pretače se kroz sito od 175 μ m u posudu 2. Ostatke s tog sita treba ispirati u posudu 3 za prikupljanje nematoda. Suspenzija iz posude 2 pretače se kroz sito od 100 μ m u posudu 1. Ostatke s tog sita ispiru se u posudu 3 za prikupljanje nematoda. Suspenzija iz posude 1 pretače se kroz sito od 45 μ m u posudu 2. Ostatci sa sita opet se ispiru u posudu 3 za prikupljanje nematoda. Nakon toga ponavlja se prethodni korak, katkada i nekoliko puta kako bi se izdvojile sve sitne nematode. Suspenzija u posudi 2 koja je prošla nekoliko puta sito od 45 μ m može se odbaciti. Nakon svega navedenog, dva nematološka filter papira pričvršćuju se na ekstrakcijsko staklo pomoću prstena. Filtere je potrebno navlažiti kako ne bi bilo zraka među njima. Ekstrakcijsko sito polaže se na metalni križasti stalak u plitku posudu ispunjenu vodom. U sredinu sita na filtere polaže se satno staklo. Nakon toga pripremamo ekstrakcijsku posudu u koju se ulijeva 100 ml vode. Suspenzija iz tri plastične posude pažljivo se izliva preko satnog stakla u ekstrakcijsko sito (Slika 6.). Posljednjih 200 - 300ml suspenzije treba dobro promiješati i brzo izliti. Nakon toga vadi se satno staklo te se prati kako se sva voda izliva s filtera. Podiže se ekstrakcijsko sito i polaže ga se u vlažnu ekstrakcijsku posudu. Ona se može prekriti poklopcem ako postoji mogućnost isparavanja te isušivanja filtera, odnosno vode iz posude. Suspenzija iz ekstrakcijske posude nakon 24 do 48 sati izlije se u čašu i uzorak je spreman za nematološku analizu.



Grafikon 1. Brojnost nematoda u uzorcima koji su stajali 24 sata i u uzorcima koji su stajali 48 sati

Grafikon 2. Ukupna brojnost izdvojenih nematoda

Nakon obavljenog izdvajanja nematoda iz tla, slijedi njihovo prebrojavanje. Po mogućnosti, prebrojavanje je najbolje obaviti neposredno nakon izdvajanja nematoda. U suprotnom, može doći do razvoja gljivica ili bakterija u suspenziji te se broj nematoda može smanjiti radi ugibanja. Ako prebrojavanje nije moguće odmah nakon izdvajanja nematoda, suspenzije je najbolje spremirati u hladnjak na temperaturu $+4^{\circ}\text{C}$. Prebrojavanje se obavlja pomoću mikroskopa. Koristi se iscrtana Petrijeva posuda ili Thoma-ova komora.

Rezultati i rasprava

Uzorci tla analizirani su pomoću Seinhorstove metode boca, Cobove metode sita te Baermannove metode lijevaka. Navedene tri metode uspoređene su da bi se odredila njihova učinkovitost prema dobivenom broju nematoda iz uzoraka tla. Izdvojene nematode prebrojavane su u dva navrata, u uzorcima koji su stajali 24 sata te onima koji su stajali 48 sati.

Baermanovom metodom lijevaka dobili su se najčišći uzorci. Nakon 24 sata broj nematoda bio je 463 jedinke. Nakon 48 sati broj nematoda nije se značajnije promijenio. U uzorku su izbrojane 472 nematode. Seinhorstovom metodom boca taj broj je 46% manji, tj. 251 jedinka, nego kod prethodne metode nakon vremena od 24 sata. Broj nematoda je značajnije porastao nakon 48 sati, izbrojano je 644 nematode. Treba napomenuti kako su uzorci dobiveni takvim oblikom izdvajanja bili relativno čisti.

Za razliku od prva dva pokusa, uzorci dobiveni Cobbovom metodom sita bili su puni

nečistoća. Broj nematoda dobivenih tom metodom nakon 24 sata bio je 194 jedinke. Broj nematoda porastao je nakon 48 sati na 520 jedinki. Postoji mogućnost kako je i u uzorku nakon 24 sata bio veći broj nematoda, međutim zbog prljavštine se nisu mogle uočiti. Nakon 48 sati došlo je do taloženja čestica tla pa je prebrojavanje bilo lakše (Grafikon 1.).

Ukupna brojnost izdvojenih nematoda Cobbovom metodom sita u uzorku pregledanom nakon 24 sata te u onom pregledanom nakon 48 sati bila je 714 nematoda. Seinhorstovom metodom boca ukupna brojnost nematoda u oba uzorka (nakon 24 sata i nakon 48 sati) bila je 895 jedinki, dok je najviše nematoda izbrojano u uzorcima dobivenim Baermannovom metodom lijevaka, 935 jedinki (Grafikon 2.).

Baermannova metoda se i ovdje istaknula kao najbolja metoda za kvantitativna istraživanja. Isto to naveli su Reuss i Funke, 1995., prilikom ispitivanja učinkovitosti Baermannove metode.

Kiritani i Matsuzaki, 1969., pretpostavili su da nematode postanu neaktivne ako se duže vrijeme nalaze u vodi te njihov broj opada s vremenom. Za razliku od njihovih rezultata, Baermannovom metodom nije došlo do opadanja brojnosti nematoda s vremenom, tj. nakon 48 sati, ali isto tako nije došlo ni do značajnijeg porasta brojnosti. Upravo zbog toga može se potvrditi pretpostavka kako su nematode postale zaista neaktivne kroz određeno vremensko razdoblje.

Cobb je 1918. predložio kombinaciju metode sita i Baermannove metode. Rezultatima dobivenim ovim istraživanjem može se potvrditi ta pretpostavka s obzirom na čistoću uzoraka dobivenih metodom lijevaka. Uspoređujući navedene dvije metode, može se zaključiti kako je puno uspješnija Baermannova metoda, čime se potvrđuju i zaključci Saunders i All, 1982.

Flegg, 1967., dolazi do zaključaka kako vrijeme i temperatura imaju utjecaj na izdvajanje nematoda Cobbovom metodom sita. Prilikom ovog istraživanja, temperatura nije bila jedan od pratećih parametara, ali vrijeme se pokazalo kao bitan čimbenik. Nakon 48 sati u uzorcima je broj nematoda gotovo tri puta porastao.

Kvantitativnu učinkovitost Cobbove metode proučavao je Townshend, 1967. Pretpostavio je kako na učinkovitost metode utječe tip tla. To se može potvrditi i ovim istraživanjem. Zbog glinenog tipa tla, došlo je do težeg izdvajanja i manje brojnosti nematoda. Tlo je odigralo ulogu i u čistoći samog uzorka jer je zbog previše zaostalih čestica tla bilo onemogućeno lako prebrojavanje te postoji mogućnost kako je broj nematoda u uzorku i znatno veći.

Analizom ukupne brojnosti nematoda može se pretpostaviti kako su sve metode imale približno sličnu učinkovitost izdvajanja nematoda. Sličan broj nematoda u svojim

istraživanjima dobili su 1976., Harrison i Green.

Persmark i sur., 1992., suprotno tome zaključuju kako se najučinkovitija metoda za slobodnoživuće nematode pokazala Seinhorstova metoda boca, dok je najmanji broj endoparazitskih nematoda dobiven Cobbovom metodom. Ovim se radom može potvrditi kako je brojnost nematoda bila približna, ali da se najlošijom od navedene tri metode pokazala zaista Cobbova metoda sita.

Najveća brojnost dobila se metodom lijevaka, a najmanja metodom sita. Nagy, 1996., navodi kako je u usporedbi ove tri metode, metoda boca dala znatno više rezultata u odnosu na metodu sita te iznosi kako su najlošiji rezultati dobiveni upravo metodom lijevaka. Nasuprot njegovim rezultatima, brojnost je bila približna, ali ipak se najlošije pokazala metoda sita.

Zaključci

Cilj ovog rada bio je usporediti brojnost nematoda u uzorku nakon izdvajanja nematoda metodom boca (Seinhorst, 1956.), metodom sita (Cobb, 1918.) te metodom lijevaka (Baermann, 1917.), brojnost je određivana nakon 24 sata te nakon 48 sati. Također utvrdilo se i koja metoda je najučinkovitija te kojom se dobio najčišći uzorak.

Najveća brojnost izdvojenih nematoda nakon 48 sati – 644 nematode Seinhorstovom metodom boca.

Najveća brojnost izdvojenih nematoda nakon 24 sata – 463 nematode Baermannovom metodom lijevaka.

Najčišći uzorci - Baermannova metoda lijevaka.

Uzorci puni nečistoća - Cobbova metoda sita.

Vrijeme se pokazalo kao važan čimbenik kod određivanja brojnosti nematoda metodom sita i metodom boca.

Učinkovitost izdvajanja približna je kod metode boca te metode lijevaka.

Metoda sita pokazala se prilično neučinkovitom i složenom.

Najjednostavnija, najbrža (24 sata) i učinkovita - Baermannova metoda lijevaka.

Literatura

- Ayoub, S. M.** (1977.): Plant Nematology – an agricultural training aid. NemAid Publ. Sacramento, California 1:155.
Baermann, G. (1917.): Eine einfache Methode Zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdpro-

ben. Geneesk. Tijdschr. Ned.- Indie 57:131-137.

Baunacke, W. (1922.): Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Rübennematoden, Heterodera schachtii Schmidt. Arb. Biol. Reichsanst. Berlin 11: 185-288.

Beres, K., Husti, I. (2006.): Alternative indicators in food chain according to life quality and sustainability. Cereal Research Communications, 34 (1): 801- 804.

Bongers, T., Ferris, H. (1999.): Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Trends in Ecology & Evolution, 14 (6): 224-228.

Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Tripar, V., Baličević, R. (2007.): Nematode communities as bioindicators of antropogenic influence in agroecosystems. Cereal Research Communications, (35)2:297-300.

Cobb, N. A. (1918.): Estimating the nematode population of the soil. Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric., No.1: 48 pp.

Daykin, M. E., Hussey, R. S. (1985.): Chapter on Staining and Histopathological Techniques in Nematology 39-46 in Advance Treatise on Meloidogyne. Vol. II- Methodology (K.R.Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser, eds.). North Carolina State University Graphics: 213pp.

Fenwick, D. W. (1940.): Methods for the recovery and counting of cysts of Heterodera schachtii from soil. The Journal of Helminthology, 18: 155-172.

Flegg, J. J. M. (1967.): Extraction of Xiphinema and Longidorus species from spoil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. Ann. appl. Biol., 60:429-437.

Gooris, J., D'Herde, C. J. (1972.): A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of Meloidogyne spp. from soil. Stat. Nematol. Entomol. Res. Stat. Ghent, 35 p.

Harrison, J. M., Green, C. D. (1976.): Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. Annals of Applied Biology Volume 82, Issue 2, pp. 299-308.

Hugot, J., Baujard, P., Morand, S. (2001.): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. Nematology, Volume 3, Number 3: 199-208.

Ivezić, M., Šamota, D., Raspudić, E. (1990.): Utjecaj povišenih doza kalija na fitoparazitne nematode kukuruza. Glasnik zaštite bilja 9-10: 352-353.

Kiritani, K., Matuzaki, T. (1969.): On the extraction rate of nematodes by the Baermann Funnel. Bull. Kochi. Inst. Agric. For. Sci. 2: 25-30.

Nagy, P. (1996.): A comparison of extraction methods of free-living terrestrial nematodes. Acta Zool Acad Sci Hung, 42:281- 7.

Neher, D. A. (2001.): Role of Nematodes un Soil Helth and Their Use as Indicators. Journal of Nematology, 33(4):161-168.

Oostenbrink, M. (1954.): Een doelmatige methode voor het toetsen van aaltjesbestrijdingsmiddelen in grond met Hoplolaimus uniformis als proefdier. Meded. LandbHoges. Gent 19: 377-408.

Persmark, L., Banck, A., Andersson, S., Jansson, H. B. (1992.): Evaluation of Methods for Extraction of Nematodes and Endoparasitic Fungi From Soil Nematologica, Volume 38, Numbers 1-4: 520-530.

Porazinska, D. L., Duncan, L. W., McSorley, R., Graham, J. H. (1999.): Nematode communities as indicators of status and processes of a soil ecosystem influenced by agricultural management practices. Applied Soil Ecology, 13: 69-86.

Ruess, L., Funke, W. (1995.): Nematode fauna of a spruce stand associated with forest decline. Acta Zool. Fenn. 196: 348-51.

Saunders, M. C., All, J. N. (1982.): Laboratory extraction methods and field detection of entomophilic rhabditoid

nematodes from soil Environ. Entomol., 11: 1164-1165.

Seinhorst, J. W. (1956.): The quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica 1: 249-267.

Southey, J. F. (1970.): Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Tech. Bull. 2. Her Majesty's Stationary Office: 148 pp.

Townshend, J. L. (1967.): Gamma irradiation of Heterodera schachtii. Nematologica 13:586-592.

Young, T. W., (1954.): An Incubation Method for Collecting Migratory Endoparasitic Nematodes. Pl. Dis. Rptr., 38: 794-795.

scientific study

Comparison of efficiency of different methods of extracting nematodes from the soil

Summary

The goal of this research was to determine which method of extracting nematodes is the most efficient and which one enables the cleanest sample. The goal was also to determine which method is best for obtaining the highest number of nematodes after 24 and 48 hours. Samples were collected in the field of 1700 m², where potato was previously cultivated. The sampling was performed on March 21, 2011 in the area of Našice. A total of six samples was collected and analyzed. The extraction of nematodes from the soil was performed on Faculty of Agriculture in Osijek, Department for Plant Protection, Chair for Entomology and Nematology by three methods: Seinhorst's bottle method (Seinhorst, 1956), Cobb's sieving method (Cobb, 1918) and Baermann's funnel method (Baermann, 1917).

Baermann's sieving method obtained the cleanest samples. After 24 hours the count of nematodes was 463 individuals. After 48 hours the count of nematodes did not change significantly. There were 472 nematodes. In Seinhorst's bottle method, that count amounts 251 individuals after 24 hours. The count of nematodes significantly increased after 48 hours and it was 644 nematodes. Dirty samples were obtained by Cobb's sieving method. The count of nematodes in the last experiment was 194 individuals after 24 hours, and the count increased to 520 individuals after 48 hours. The total number of extracted nematodes by the sieving method was 714, by the bottle method it was 895 and by the funnel method it was 935 individuals. It can be concluded that the cleanest samples were obtained by Baermann's funnel method. Cobb's sieving method has shown itself to be quite inefficient and complicated. It has been proved that time of extraction affects the number of nematodes, and soil humidity and kind of soil affect the extraction. Baermann's funnel method has shown itself to be the simplest, fastest (24 hours) and a very effective method.

Keywords: nematodes, extraction methods, bottle method, sieving method, funnel method



u PRAVI ČAS!

