

RESEARCH ARTICLE

국내 기수역 환경의 균류 다양성

전유정, 고재덕, 문혜연*

국립낙동강생물자원관 담수생물연구본부 균류연구팀

Diversity of Fungi in Brackish Water in Korea

Yu Jeong Jeon, Jaeduk Goh, and Hye Yeon Mun*

Fungi Research Team, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

*Corresponding author: outcastm@nnibr.re.kr

ABSTRACT

We investigated the distribution and diversity of fungi in brackish water and soil from the Eulsukdo Island, Geumgang Estuary Bank, Suncheon Bay, Dae-ho Tide Embankment and coastal sand dune in Sinduri and Bu-nam Tide Embankment, Korea. Fungi were isolated from water samples by hand-pumped filtration, and soil samples were collected and diluted. The isolated fungi were incubated in potato dextrose agar at 25°C. A total of 173 fungal strains were isolated from brackish water and identified according to their respective internal transcribed spacer via phylogenetic analysis. The diversity of all fungal strains was analyzed according to diversity indices. The fungal strains belonged to any of 18 taxonomic orders: Pleosporales, Eurotiales, Capnodiales, Hypocreales, Polyporales, Saccharomycetales, Agaricales, Glomerellales, Mucorales, Dothideales, Russulales, Xylariales, Sordariales, Myrmecridiales, Tubeufiales, Onygenales, Cantharellales, and Amphisphaerales. *Cladosporium* spp. (20%), *Penicillium* spp. (19%), and *Fusarium* sp. (5%) comprised majority of the identified strains. Two species from the fungal isolates were newly identified in Korea: *Sarocladium kiliense* NNIBRFG3280 and *Fusicolla merismoides* NNIBRFG23708.



OPEN ACCESS

ISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 December, 48(4): 457-473
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200044>

Received: September 25, 2020

Revised: December 23, 2020

Accepted: December 24, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

기수역(brackish water)은 담수와 해수가 혼합되어 형성되는 지역으로 일반적으로 염분(NaCl)의 농도가 0.05%이하인 물은 담수(freshwater), 3%이상은 해수(seawater)라 하는데 중간을 기수(brackish)라 정의한다[1]. 미생물이 실제 이용할 수 있는 물의 양은 수분활성도(water acivity, a_w)로 나타낼 수 있는데, 종류수의 수분활성도는 1이 되며, 염분농도는 수분활성도를 감소시킨다. 해양에서 분리되는 미생물은 생장에 염분을 필요로 하는데 바닷물의 수분활성도에서 최적 생장하는 미생물을 호염성 미생물(halophile)이라 한다. 이 중 15-30%의 매우 높은 농도에서 생장 가능한 미생물은 극호염성미생물(extreme halophile)이라 한다. 균류 중에서는 대표적으로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* 등이 호염성 효모로 보고되어 있다[2].

본 연구에서는 국내 기수 환경의 물과 토양에서 균류를 분리 및 동정하여 지역에 따른 균류의 분포와 다양성지수를 확인하였다. 그리고 이들 중 국내 미기록 균류 2종을 선발하여 종 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시료 채집 및 균류 분리

부산 사하구 을숙도, 충남 태안군 금강하구둑, 전남 순천시 순천만습지, 충남 서산시 대호방조제, 태안군 신두리사구 및 부남방조제 기수지역에서 물과 퇴적물을 채집하여 균류를 분리하였다 (Table 1). 조사지점의 물시료를 50 mL 채취하여 현장에서 핸드펌프와 nitrocellulose membrane filter (pore size 0.45 μm MCE membrane, MF-MilliporeTM, Darmstadt, Germany)를 이용하여 여과하였다. 필터의 상면을 water agar (WA; 20g/L, agar) 각각 부착하여 15°C에서 1일간 배양 후, membrane filter 를 제거하고 실체현미경(Stemi 305, Carl Zeiss, CN, Germany)을 이용하여 밟아한 포자를 배지에서 분리하고 V8배지(V8A; 8% V8 juice [v/v] and 1.5 agar [w/v] adjusted to pH6.0 using 10 N NaOH)에 배양하였다. 채집된 토양시료는 10^1 , 10^2 , 10^3 으로 희석하여 50 ppm 항생제(streptomycin)가 첨가된 potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA)에 도말한 후 3-4일 동안 15°C에서 배양하였다. 배양된 배지에서 단포자 분리를 통해 V8 배지에 순수분리하였다. 순수분리한 균류는 PDA에 계대배양하였다.

Table 1. Environmental factors of sampling site.

Site	Collection date	Location (GPS)	Temperature (°C)	pH	Conductivity ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	DO (%)	DO (mg/L)	Salinity (%)
Eulsukdo Island	16.09.22	Saha District, Busan (N35°6'9.2" E128°56'38.2")	22	7.09	762.8	77.5	-	0.70
Geumgang Estuary Bank	19.02.21	Taean-gun, Chungnam (N35°59'37.6" E126°42'32.6")	-	7.94	644	111.6	11.46	2.75
Suncheon Bay	19.03.19	Suncheon-si, Jeonnam (N34°53'7" E127°30'34")	11.6	8.16	91.1	70.7	7.7	1.30
Dae-ho Tided Embankment	19.05.08	Seosan-si, Chungnam (N36°59'59" E126°27'12")	17.7	8.38	9430.0	164	15.68	2.95
Coastal sand-dune in Sinduri	19.05.09	Taean-gun, Chungnam (N36°50'35" E126°11'32")	17.6	8.41	9730	103.7	9.87	3.05
Bu-nam Tided Enbankment	19.05.09	Taean-gun, Chungnam (N36°37'30" E126°21'57")	16	8.4	7830.0	115.3	11.38	3.04

균류의 동정 및 계통수 작성

분리된 균주들의 ITS (internal transcribed spacer) 부위의 염기서열을 분석하기 위해 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3') 및 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer 를, RPB2 유전자분석을 위해서는 5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') 및 7cR (5'-CCCATRGCTTGYTRCCCAT-3') primer를 이용하여 분석한 후 NCBI의 BLAST를 사용하여 데이터베이스상의 기등록 균류들과의 상동성을 비교하였다[3,4]. 국내에 기록되지 않은 균류의 계통수 작성은 MEGA7을 이용하였다[5].

또한, 형태적 특징을 관찰하기 위해 광학현미경(H550S, Nikon, Yokohama, Japan)을 이용하여 화상자료를 확보하였다.

균류의 생장 특성 분석

국내 미기록 균류의 배지별 생장길이를 측정하기 위해 PDA, malt extract agar (MEA; 2% malt extract [w/v], 2% agar [w/v]), oatmeal agar (OA; Difco, Detroit, MI, USA), yeast extract peptone dextrose agar (YPDA; Difco, Detroit, MI, USA), 그리고 1x sea water PDA (1xSPDA, 2.4% NaCl [w/v], 0.7% MgSO₄·7H₂O [w/v], 0.53% MgCl₂·6H₂O [w/v], 0.07% KCl [w/v], 0.013% CaCl₂·2H₂O [w/v], PDA), 2x sea water PDA (2xSPDA, 4.8% NaCl [w/v], 1.4% MgSO₄·7H₂O [w/v], 10.6% MgCl₂·6H₂O [w/v], 0.14% KCl [w/v], 0.026% CaCl₂·2H₂O [w/v], PDA), 4x sea water PDA (4xSPDA, 9.6% NaCl [w/v], 2.8% MgSO₄·7H₂O [w/v], 2.12% MgCl₂·6H₂O [w/v], 0.28% KCl [w/v], 0.052% CaCl₂·2H₂O [w/v], PDA) 고체배지에 5, 15, 20, 25, 30°C에서 20일동안 배양하였다.

다양성 지수

Shannon diversity index (H)는 community 안에서 종 다양성을 보는 지수로서, abundance와 evenness를 동시에 수치화한다. 수치가 높아질수록 종이 다양하게 분포하고 있음을 나타낸다[6]. Shannon's equitability (E_H)는 H 를 H_{max} ($\ln S$) 값으로 나눈것으로서, 0과 1사이 값이 검출되며, 1은 완벽한 evenness를 나타낸다[6]. Shannon's evenness index (SEI)는 H 를 최대값으로 나눈 것으로서 군집에서의 상대적인 abundance를 나타낸다[6](Table 2).

Simpson's diversity index (D)는 서식지 내에서의 종 다양성을 정량화하는데 주로 사용한다. 존재하는 종의 수와 각 종의 abundance를 나타낸다. D 의 값은 0과 1사이이며, 0은 무한한 다양성을 나타내고, 1은 다양성이 없음을 보여준다[7](Table 2).

Table 2. The formula of diversity index.

Diversity index	Formula
H (Shannon diversity index)	$-\sum(P_i \times \ln(P_i))$
E_H (equitability)	$-\sum(P_i \times \ln(P_i)) / \ln S$
Simpson's index	$-\sum(P_i \times \ln(P_i)) / \ln(\max)$
SEI (Shannon's evenness index)	$\sum(n/N)^2$

* P_i : Proportion of S made up of the i th species; S : Total number of species in the community (richness).

결과

국내 기수역 중 6개의 지역으로부터 을숙도에서 21 군주, 금강하구둑에서 16군주, 순천만습지에서 25군주, 대호방조제에서 44군주, 신두리사구에서 27군주, 부남방조제에서 40군주로 총 173 군주를 분리, 동정하였다. NCBI의 GenBank로부터 모든 군주에 대하여 등록번호를 부여받았다 (Table 3). 각 지역에서 분리된 군류의 다양성은 Table 4에 나타난 바와 같다.

Table 3. The identification of fungi isolated in this study.

Place	Sample	Fungal Isolates	Taxonomy		Accession No.
			Order	Genus	
Eulsukdo Island	Soil	NNIBRFG3252	Amphisphaerales	<i>Neopestalotiopsis</i>	MW237676
	Soil	NNIBRFG3253	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW237677
	Soil	NNIBRFG3254	Hypocreales	<i>Albifimbria</i>	MW237678
	Soil	NNIBRFG3255	Pleosporales	<i>Paraconiothyrium</i>	MW237679
	Soil	NNIBRFG3260	Hypocreales	<i>Purpureocillium</i>	MW237680
	Soil	NNIBRFG3265	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW237681
	Soil	NNIBRFG3266	Pleosporales	<i>Paraconiothyrium</i>	MW237682
	Soil	NNIBRFG3269	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW237683
	Soil	NNIBRFG3273	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW237684
	Soil	NNIBRFG3274	Tubeufiales	<i>Letendrea</i>	MW237685
	Soil	NNIBRFG3276	Pleosporales	<i>Pyrenophaetopsis</i>	MW237686
	Soil	NNIBRFG3277	Myrmecridiales	<i>Myrmecridium</i>	MW237687
	Soil	NNIBRFG3278	Hypocreales	<i>Hypocrea</i>	MW237688
	Soil	NNIBRFG3279	Hypocreales	<i>Trichoderma</i>	MW237689
	Soil	NNIBRFG3280	Hypocreales	<i>Sarocladium</i>	MW237690
	Soil	NNIBRFG3281	Hypocreales	<i>Trichoderma</i>	MW237691
	Soil	NNIBRFG3284	Pleosporales	<i>Neostagonospora</i>	MW237692
Geumgang Estuary Bank	Soil	NNIBRFG3286	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	MW237693
	Soil	NNIBRFG3289	Polyporales	<i>Irpex</i>	MW237694
	Soil	NNIBRFG3291	Hypocreales	<i>Trichoderma</i>	MW237695
	Soil	NNIBRFG3292	Pleosporales	<i>Arthopyrenia</i>	MW237696
	Filtered water	NNIBRFG20717	Pleosporales	<i>Phoma</i>	MW221078
	Filtered water	NNIBRFG20743	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221079
	Filtered water	NNIBRFG20744	Pleosporales	<i>Epicoccum</i>	MW221080
	Filtered water	NNIBRFG20745	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221081
	Filtered water	NNIBRFG20846	Pleosporales	<i>Phoma</i>	MW221082
	Filtered water	NNIBRFG21992	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221083

Table 3. The identification of fungi isolated in this study. (continued)

Place	Sample	Fungal Isolates	Taxonomy		Accession No.
			Order	Genus	
Geumgang Estuary Bank	Filtered water	NNIBRFG22251	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221089
	Filtered water	NNIBRFG22253	Pleosporales	<i>Curvularia</i>	MW221090
	Filtered water	NNIBRFG22254	Mucorales	<i>Mycocladus</i>	MW221091
	Filtered water	NNIBRFG22255	Hypocreales	<i>Volutella</i>	MW221092
	Filtered water	NNIBRFG22257	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221093
Suncheon Bay	Filtered water	NNIBRFG21998	Hypocreales	<i>Beauveria</i>	MW221094
	Filtered water	NNIBRFG21999	Sordariales	<i>Phialemonium</i>	MW221095
	Soil	NNIBRFG22000	Pleosporales	<i>Phaeosphaeria</i>	MW221096
	Soil	NNIBRFG22001	Pleosporales	<i>Paraphoma</i>	MW221097
	Soil	NNIBRFG22002	Saccharomycetales	<i>Galactomyces</i>	MW221098
	Soil	NNIBRFG22003		<i>Trichoderma</i>	MW221099
	Filtered water	NNIBRFG22259	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221100
	Filtered water	NNIBRFG22262	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221101
	Soil	NNIBRFG22263	Hypocreales	<i>Trichoderma</i>	MW221102
	Soil	NNIBRFG22265	Saccharomycetales	<i>Galactomyces</i>	MW221103
	Soil	NNIBRFG22270		<i>Paraphoma</i>	MW221104
	Soil	NNIBRFG22795	Hypocreales	<i>Metarhizium</i>	MW221105
	Soil	NNIBRFG22796	Pleosporales	<i>Phaeosphaeria</i>	MW221106
	Soil	NNIBRFG22800	Pleosporales	<i>Paraphoma</i>	MW221107
	Soil	NNIBRFG22805	Hypocreales	<i>Acremonium</i>	MW221108
	Soil	NNIBRFG22808	Pleosporales	<i>Ascochyta</i>	MW221109
	Soil	NNIBRFG22809	Hypocreales	<i>Acremonium</i>	MW221110
	Soil	NNIBRFG22810	Pleosporales	<i>Paraconiothyrium</i>	MW221111
	Soil	NNIBRFG22811	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221112
	Soil	NNIBRFG22814	Hypocreales	<i>Sarocladium</i>	MW221113
	Soil	NNIBRFG22816	Pleosporales	<i>Paraphoma</i>	MW221114
	Soil	NNIBRFG22817	Polyporales	<i>Efibia</i>	MW221115
	Soil	NNIBRFG22819	Pleosporales	<i>Paraphoma</i>	MW221116
	Soil	NNIBRFG22821	Pleosporales	<i>Phoma</i>	MW221117
	Soil	NNIBRFG22822	Hypocreales	<i>Parasarocladium</i>	MW221118
Dae-ho Tide Embankment	Soil	NNIBRFG22275	Pleosporales	<i>Alternaria</i>	MW221119
	Soil	NNIBRFG22276	-	<i>Cleistothelobolus</i>	MW221120
	Filtered water	NNIBRFG22277	Russulales	<i>Peniophora</i>	MW221121
	Filtered water	NNIBRFG22278	Polyporales	<i>Irpe</i>	MW221122
	Filtered water	NNIBRFG22875	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221123
	Filtered water	NNIBRFG22876	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221124
	Filtered water	NNIBRFG22877	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221125
	Filtered water	NNIBRFG22878	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221126
	Filtered water	NNIBRFG22880	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221127
	Filtered water	NNIBRFG22882	Pleosporales	<i>Epicoccum</i>	MW221128
	Filtered water	NNIBRFG22887	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221129
	Filtered water	NNIBRFG22890	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221130

Table 3. The identification of fungi isolated in this study. (continued)

Place	Sample	Fungal Isolates	Taxonomy		Accession No.
			Order	Genus	
Dae-ho Tide Embankment	Filtered water	NNIBRFG22943	Pleosporales	<i>Alternaria</i>	MW221131
	Filtered water	NNIBRFG22945	Pleosporales	<i>Epicoccum</i>	MW221132
	Filtered water	NNIBRFG22946	Pleosporales	<i>Didymella</i>	MW221133
	Filtered water	NNIBRFG22971	Xylariales	<i>Apiospora</i>	MW221134
	Filtered water	NNIBRFG23675	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221135
	Filtered water	NNIBRFG23678	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221136
	Soil	NNIBRFG23694	-	<i>Hypozyma</i>	MW221137
	Soil	NNIBRFG23697	Onygenales	<i>Chrysosporium</i>	MW221138
	Soil	NNIBRFG23700	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221139
	Soil	NNIBRFG23702	Hypocreales	<i>Neonectria</i>	MW221140
	Soil	NNIBRFG23706	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221141
	Soil	NNIBRFG23708	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221142
	Soil	NNIBRFG23709	Pleosporales	<i>Phoma</i>	MW221143
	Soil	NNIBRFG23710	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221144
	Soil	NNIBRFG23713	Hypocreales	<i>Volutella</i>	MW221145
	Soil	NNIBRFG23714	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221146
	Soil	NNIBRFG23716	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221147
	Soil	NNIBRFG23717	Saccharomycetales	<i>Geotrichum</i>	MW221148
	Filtered water	NNIBRFG23837	Agaricales	<i>Schizophyllum</i>	MW221149
	Filtered water	NNIBRFG23838	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221150
	Filtered water	NNIBRFG23839	Russulales	<i>Peniophora</i>	MW221151
	Soil	NNIBRFG23840	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221152
	Soil	NNIBRFG23842	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	MW221153
	Soil	NNIBRFG23844	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221154
	Soil	NNIBRFG23850	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221155
Coastal sand-dune in Sinduri	Filtered water	NNIBRFG23860	Polyporales	<i>Irpe</i>	MW221156
	Filtered water	NNIBRFG23861	Polyporales	<i>Antrodiella</i>	MW221157
	Soil	NNIBRFG23952	Hypocreales	<i>Acremonium</i>	MW221158
	Filtered water	NNIBRFG23957	Polyporales	<i>Irpe</i>	MW221159
	Filtered water	NNIBRFG23958	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221160
	Filtered water	NNIBRFG23959	Polyporales	<i>Irpe</i>	MW221161
	Filtered water	NNIBRFG23960	Cantharellales	<i>Ceratobasidium</i>	MW221162
	Filtered water	NNIBRFG23064	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221163
	Filtered water	NNIBRFG23065	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221164
	Filtered water	NNIBRFG23066	Pleosporales	<i>Didymella</i>	MW221165

Table 3. The identification of fungi isolated in this study. (continued)

Place	Sample	Fungal Isolates	Taxonomy		Accession No.
			Order	Genus	
Coastal sand-dune in Sinduri	Filtered water	NNIBRFG23681	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221173
	Filtered water	NNIBRFG23683	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221174
	Filtered water	NNIBRFG23685	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221175
	Filtered water	NNIBRFG23686	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221176
	Filtered water	NNIBRFG23687	Pleosporales	<i>Alternaria</i>	MW221177
	Filtered water	NNIBRFG23691	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221178
	Filtered water	NNIBRFG23692	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221179
	Filtered water	NNIBRFG23864	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221180
	Filtered water	NNIBRFG23866	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221181
	Filtered water	NNIBRFG23867	Agaricales	<i>Schizophyllum</i>	MW221182
	Soil	NNIBRFG23869	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221183
	Soil	NNIBRFG23870	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221184
	Soil	NNIBRFG23872	Pleosporales	<i>Didymella</i>	MW221185
	Soil	NNIBRFG23873	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221186
	Soil	NNIBRFG23875	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221187
	Soil	NNIBRFG23876	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221188
	Soil	NNIBRFG23899	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221189
Bu-nam Tide Embankment	Filtered water	NNIBRFG23005	Hypocreales	<i>Trichoderma</i>	MW221190
	Filtered water	NNIBRFG23006	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221191
	Filtered water	NNIBRFG23007	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221192
	Filtered water	NNIBRFG23008	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221193
	Filtered water	NNIBRFG23009	Pleosporales	<i>Phoma</i>	MW221194
	Filtered water	NNIBRFG23010	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221195
	Filtered water	NNIBRFG23011	Pleosporales	<i>Epicoccum</i>	MW221196
	Filtered water	NNIBRFG23013	Pleosporales	<i>Epicoccum</i>	MW221197
	Filtered water	NNIBRFG23014	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221198
	Filtered water	NNIBRFG23015	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221199
	Filtered water	NNIBRFG23016	Mucorales	<i>Mucor</i>	MW221200
	Filtered water	NNIBRFG23017	Pleosporales	<i>Alternaria</i>	MW221201
	Filtered water	NNIBRFG23018	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221202
	Filtered water	NNIBRFG23120	Saccharomycetales	<i>Galactomyces</i>	MW221203
	Filtered water	NNIBRFG23121	Pleosporales	<i>Didymella</i>	MW221204
	Filtered water	NNIBRFG23122	Glomerellales	<i>Gibellulopsis</i>	MW221205
	Filtered water	NNIBRFG23124	Hypocreales	<i>Fusarium</i>	MW221206
	Filtered water	NNIBRFG23661	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221207
	Filtered water	NNIBRFG23662	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221208
	Filtered water	NNIBRFG23665	Glomerellales	<i>Colletotrichum</i>	MW221209
	Filtered water	NNIBRFG23667	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221210
	Filtered water	NNIBRFG23668	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221211
	Filtered water	NNIBRFG23669	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221212
	Filtered water	NNIBRFG23671	Pleosporales	<i>Alternaria</i>	MW221213
	Filtered water	NNIBRFG23672	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221214

Table 3. The identification of fungi isolated in this study. (continued)

Place	Sample	Fungal Isolates	Taxonomy		Accession No.
			Order	Genus	
Bu-nam Tide Embankment	Filtered water	NNIBRFG23674	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221215
	Soil	NNIBRFG23780	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221216
	Soil	NNIBRFG23781	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221217
	Soil	NNIBRFG23782	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221218
	Soil	NNIBRFG23783	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	MW221219
	Filtered water	NNIBRFG23833	Dothideales	<i>Kabatiella</i>	MW221220
	Filtered water	NNIBRFG23835	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221221
	Soil	NNIBRFG23851	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221222
	Soil	NNIBRFG23852	Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	MW221223
	Soil	NNIBRFG23853	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221224
	Soil	NNIBRFG23862	Agaricales	<i>Schizophyllum</i>	MW221225
	Soil	NNIBRFG23937	Eurotiales	<i>Penicillium</i>	MW221226
	Filtered water	NNIBRFG23948	Dothideales	<i>Aureobasidium</i>	MW221227
	Filtered water	NNIBRFG23949	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221228
	Filtered water	NNIBRFG23950	Capnodiales	<i>Cladosporium</i>	MW221229

Table 4. Diversity index and distribution of fungi isolated brackish water.

Fungal genera	Sampling site						Total
	Eulsukdo Island	Geumgang Estuary Bank	Suncheon Bay	Dae-ho Tide Embankment	Coastal sand-dune in Sinduri	Bu-nam Tide Embankment	
<i>Aaospaeria</i>		1					1
<i>Acremonium</i>			2	1			3
<i>Albifimbia</i>	1						1
<i>Alternaria</i>				2	2	2	6
<i>Antrodiella</i>				1			1
<i>Apiospora</i>				1			1
<i>Arthopyrenia</i>	1						1
<i>Ascochyta</i>			1				1
<i>Aspergillus</i>	1			1		2	4
<i>Aureobasidium</i>						1	1
<i>Beauveria</i>			1				1
<i>Ceratobasidium</i>				1			1
<i>Chrysosporium</i>				1			1
<i>Cladosporium</i>	1	2		7	10	14	34
<i>Cleistothellobolus</i>				1			1
<i>Colletotrichum</i>						1	1
<i>Curvularia</i>		1					1
<i>Didymella</i>				1	2	1	4
<i>Efibula</i>			1				1
<i>Epicoccum</i>		1		2	2	2	7
<i>Fusarium</i>	1	1	1	2	1	3	9
<i>Galactomyces</i>			2			1	3
<i>Geotrichum</i>				1			1
<i>Gibellulopsis</i>						1	1

Table 4. Diversity index and distribution of fungi isolated brackish water. (continued)

Fungal genera	Sampling site						Total
	Eulsukdo Island	Geumgang Estuary Bank	Suncheon Bay	Dae-ho Tide Embankment	Coastal sand-dune in Sinduri	Bu-nam Tide Embankment	
<i>Hypozyma</i>				1			1
<i>Hypocrea</i>	1						1
<i>Irpex</i>	1			4			5
<i>Kabatiella</i>						1	1
<i>Letendraea</i>	1						1
<i>Metarhizium</i>			1				1
<i>Mucor</i>					1	1	2
<i>Mycocladus</i>		1					1
<i>Myrmecridium</i>	1						1
<i>Neonectria</i>				1			1
<i>Neopestalotiopsis</i>	1						1
<i>Neostagonospora</i>	1						1
<i>Paraconiothyrium</i>	2	1	1				4
<i>Paraphoma</i>			5				5
<i>Parasarocladium</i>			1				1
<i>Penicillium</i>	2	4	2	11	7	7	33
<i>Peniophora</i>				2			2
<i>Phaeosphaeria</i>			2				2
<i>Phialemonium</i>			1				1
<i>Phoma</i>		2	1	1		1	5
<i>Purpureocillium</i>	1						1
<i>Pyrenophaetopsis</i>	1						1
<i>Sarocladium</i>	1		1				2
<i>Schizophyllum</i>				1	1	1	3
<i>Stagonosporopsis</i>					1		1
<i>Trichoderma</i>	3		2			1	6
<i>Verticillium</i>		1					1
<i>Volutella</i>		1		1			2
Total	21	16	25	44	27	40	173
Diversity index							
SDI	2.76	2.25	2.62	2.62	1.78	2.24	3.14
EH (equitability)	0.91	0.81	0.81	0.69	0.54	0.61	0.61
Simpson's index	0.07	0.13	0.09	0.11	0.23	0.17	0.09
SEI	2.51	1.63	1.63	1.09	0.77	0.85	0.89

* SDI: Shannon's diversity index, SEI: Shannon's evenness index

을 속도에서 분리된 21개 균주 중 균류는 Ascomycota문이 대부분이었고 1개 균주가 Basidiomycota문 Polyporales목의 *Irpex*속에 속했다. Ascomycota문에 속하는 균주는 Capnodiales 목에 속하는 *Cladosporium*속과 Pleosporales목에 속하는 *Arthopyrenia*속, *Paraconiothyrium*속, *Neostagonospora*속, *Pyrenophaetopsis*속, Tubeufiales목의 *Letendraea*속, Eurotiales목의 *Aspergillus* 속, *Penicillium*속, Amphisphaeriales목의 *Neopestalotiopsis*속, 그리고 Hypocreales목의 *Hypocrea*속, *Trichoderma*속, *Fusarium*속, *Purpureocillium*속, *Sarocladium*속, *Albifimbria*속, *Myrmecridium*속으로 확인되었으며 Hypocreales목이 38%(8균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다(Table 4).

금강하구둑에서 분리된 균류 또한 Ascomycota문이 대부분이었고 1개 균주가 Mucromycota 문 *Mycocladus*속에 속했다. Ascomycota문에 속하는 균주는 Capnodiales목 *Cladosporium*속과 Pleosporales목의 *Aaosphaeria*속, *Phoma*속, *Epicoccum*속, *Paraconiothyrium*속, *Curvularia*속, Eurotiales 목의 *Penicillium*속, Glomerellales목의 *Verticillium*속, Hypocreales목의 *Fusarium*속, *Volutella*속으로 확인되었으며 Eurotiales목의 *Penicillium*속이 25%(4균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다(Table 4).

순천만습지에서 분리된 균류는 Ascomycota문이 대부분이었고 1개 균주가 Basidiomycota문 Polyporales목의 *Efibula*속에 속했다. Ascomycota문에 속하는 균주는 Pleosporales목의 *Ascochyta* 속, *Phoma*속, *Paraconiothyrium*속, *Paraphoma*속, *Phaeosphaeria*속, Eurotiales목의 *Penicillium*속, Saccharomycetales목의 *Galactomyces*속, Hypocreales목의 *Acremonium*속, *Metarhizium*속, *Beauveria* 속, *Trichoderma*속, *Fusarium*속, *Parasarocladium*속, *Sarocladium*속, *Phialemonium*속으로 확인되었으며 Pleosporales목이 40%(10균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다(Table 4).

대호방조제에서 분리된 균류는 Ascomycota문 및 Basidiomycota문에 속했으며 Ascomycota 문에 속하는 균주는 *Cleistothelobolus*속, *Hypozyma*속과 Capnodiales목의 *Cladosporium*속, Pleosporales목의 *Phoma*속, *Didymella*속, *Epicoccum*속, *Alternaria*속, Eurotiales목의 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, Onygenales문의 *Chrysosporium*속, Saccharomycetales문의 *Geotrichum*속, Hypocreales 문의 *Acremonium*속, *Fusarium*속, *Neonectria*속, *Volutella*속, Xylariales문의 *Apiospora*속이 확인 되었고 Basidiomycota문에 속하는 균주는 *Cantharellales*목의 *Ceratobasidium*속, Agaricales목의 *Schizophyllum*속, Polyporales목의 *Antrodiaella*속, *Ipex*속, Russulales목의 *Peniophora*속이 확인되었다. 그 중 Eurotiales목의 *Penicillium*속이 25%(11균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다(Table 4).

신두리사구에서 분리된 균류는 Ascomycota문이 대부분이었고 Basidiomycota문 Agaricales목의 *Schizophyllum*속, Mucromycota문 Mucorales목의 *Mucor*속에 각각 1개 균주씩 속했다. Ascomycota 문에 속하는 균주는 Capnodiales목의 *Cladosporium*속, Pleosporales목의 *Didymella*속, *Epicoccum*속, *Stagonosporopsis*속, *Alternaria*속, Eurotiales목의 *Penicillium*속, Hypocreales목의 *Fusarium*속이 확인 되었고 Capnodiales목의 *Cladosporium*속이 37%(10균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다(Table 4).

부남방조제에서 분리된 균류 또한 Ascomycota문이 대부분이었고 Basidiomycota문 Agaricales 목의 *Schizophyllum*속, Mucromycota문 Mucorales목의 *Mucor*속에 각각 1개 균주씩 속했다. Ascomycota문에 속하는 Capnodiales목의 *Cladosporium*속, Dothideales목의 *Aureobasidium* 속, *Kabatiella*속, Pleosporales목의 *Phoma*속, *Didymella*속, *Epicoccum*속, *Alternaria*속, Eurotiales 목의 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, Saccharomycetales목의 *Galactomyces*속, Glomerellales목의 *Collectotrichum*속, *Gibellulopsis*속, Hypocreales목의 *Trichoderma*속, *Fusarium*속이 확인되었고 Capnodiales목의 *Cladosporium*속이 35% (14균주)로 가장 많은 비중을 차지하였다. 6개의 기수 역에서 Ascomycota문이 90.8% (157균주)로 대부분을 차지하였고, 그 중에서 Capnodiales목의 *Cladosporium*속이 19.7% (34균주)로 가장 많았고, Eurotiales목의 *Penicillium*속이 19% (33균주)로 그 다음 비중을 차지하였다(Table 4).

Taxonomy

Sarocladium kilense (Grütz) Summerbell, Studies in Mycology 68: 158 (2011) [MB#519592]

(Fig. 1 and Fig. 2)

Characterization: NNIBRFG3280균주는 PDA배지에 배양했을 때 30°C에서 0.34 mm/day 정도로 느리게 생장하였다. PDA배지에서 균사체는 가운데 부분이 흰색을 띠다가 중간부분은 연한 분홍색이고 가장자리 부분은 흰색을 띠었다(Fig. 1A). MEA, OA, YPDA 배지에서는 콜로니의 가운데 부분은 분홍색을 띠고 중간은 연한 노란색을 가장자리 부분은 흰색을 띠었다(Fig. 1B-D). 대체로 30°C에서 잘 생장하였으며, YPDA배지에서 가장 높은 생장율을 보였다. 염분농도가 높은 4xSPDA에서는 생장하지 않았다(Fig. 1G).

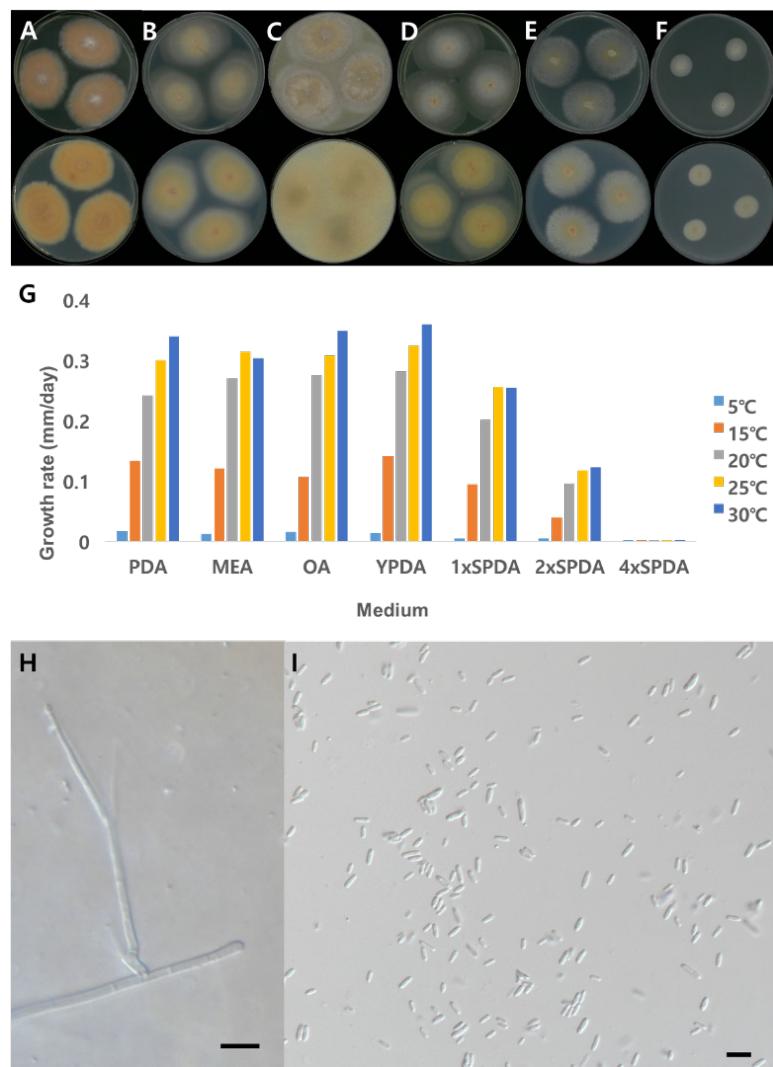


Fig. 1. Cultural and morphological characteristics of NNIBRFG3280. Macro-morphology of front and back. A: Potato dextrose agar (PDA), B: Malt extract agar (MEA), C: Oatmeal agar (OA), D: Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA), E: 1x sea water PDA (1xSPDA), F: 2x sea water PDA (2xSPDA), G: Growth rate on media. Micro-morphology of conidiophore (H) and conidia (I). Size bar is 10 μm .

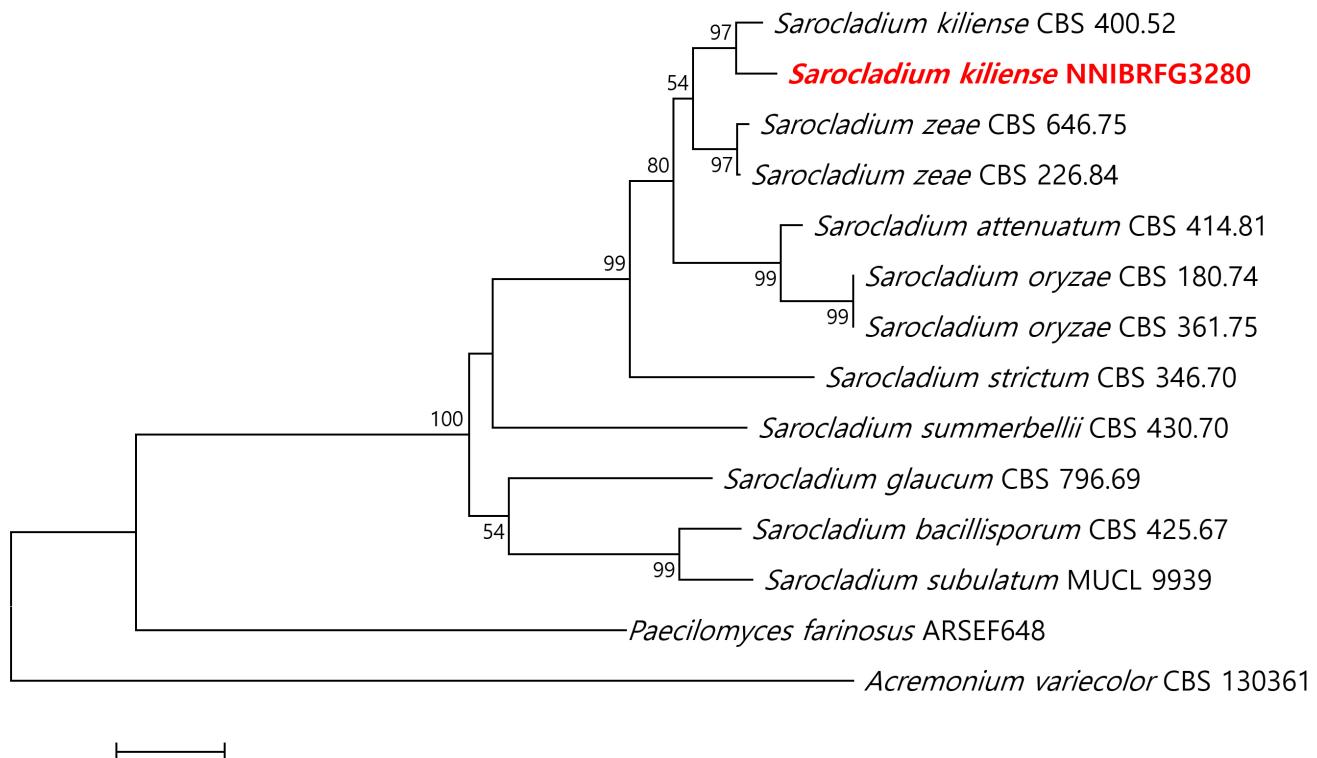


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Sarocladium kiliense* NNIBRFG3280 and closely related species based on a neighbor-joining analysis of the internal transcribed spacer (ITS) sequences. The sequence of *Paecilomyces farinosus* and *Acremonium variecolor* were used as an outgroup. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) from 1,000 replications. The bar indicates the number of substitutions per position. The new isolate from the present study is shown in bold and red.

균사는 투명하고 매끄러운 표면을 가지며 너비는 1-3 μm 이다. Phialides는 균사에서 개별적으로 뻗어 있었으며 길이가 20-41 μm , 너비가 1-2.5 μm 이었다. 분생포자(conidia, n=20)는 길쭉한 원통형이거나 타원형의 모양이며 매끄러운 표면을 가지고 있었고 길이가 4-7 μm , 너비는 2-3 μm 이었다(Fig. 1H and Fig. 1I).

Habitat: 기수역의 퇴적물

Specimen examined: 부산시 사하구 을숙도, 2016.09.22., NNIBRFG3280, 국립낙동강생물자원관

Note: 1925년 Grütz에 의해서 *Acremonium kiliense*로 처음 보고되었으며[8] 2011년 Summerbell에 의해 *Sarocladium kiliense*로 다시 명명되었다[9]. Summerbell 등[9]이 보고한 바에 의하면 *Sarocladium*은 *Acremonium*과 달리 길쭉한 phialides를 가지며 adelophialides를 많이 생산하고 길쭉한 분생자를 가지는 형태적 특징이 있다. *Sarocladium* 속엔 10종이 속해 있으며 그 중 *S.kiliense*는 배지별 다른 콜로니 색을 띠는 특징을 가지는데 NNIBRFG3280 균주 또한 같은 특징을 보였다. NNIBRFG3280균주의 ITS영역을 blast한 결과, *S. kiliense* (MT000479)와 99.79%의 높은 유사도를 보였으며 계통수에서도 *S. kiliense*와 같은 clade에 위치하여 최종적으로 *S. kiliense*로 동정하였

다. NNIBRFG3280균주는 염분 0.7%인 기수액의 퇴적물에서 분리하였으며 30°C에서 염분 6%인 2xSPDA에서 생장하는 것으로 보아 염분내성이 있는 균류로 확인되었다(Fig. 1F and Fig. 1G).

Fusicolla merismoides (Corda) Gräfenhan, Seifert & Schroers, Studies in Mycology 68: 101 (2011) [MB#519438](Fig. 3 and Fig.4)

Characterization: NNIBRFG23708균주는 PDA배지에 배양했을 때 25°C에서 0.14 mm/day 정도로 느리게 생장하였다. PDA배지에서 균사체는 가운데 부분이 옅은 노란색을 띠다가 가장자리 부분은 흰색을 띠었다(Fig. 3A). MEA, OA, YPDA 배지에서도 PDA배지에서와 비슷한 양상을 보였으며(Fig. 3B-D), 염분이 포함된 배지에서는 옅은 분홍색을 띠었다(Fig. 3E and Fig. 3F). 대체로

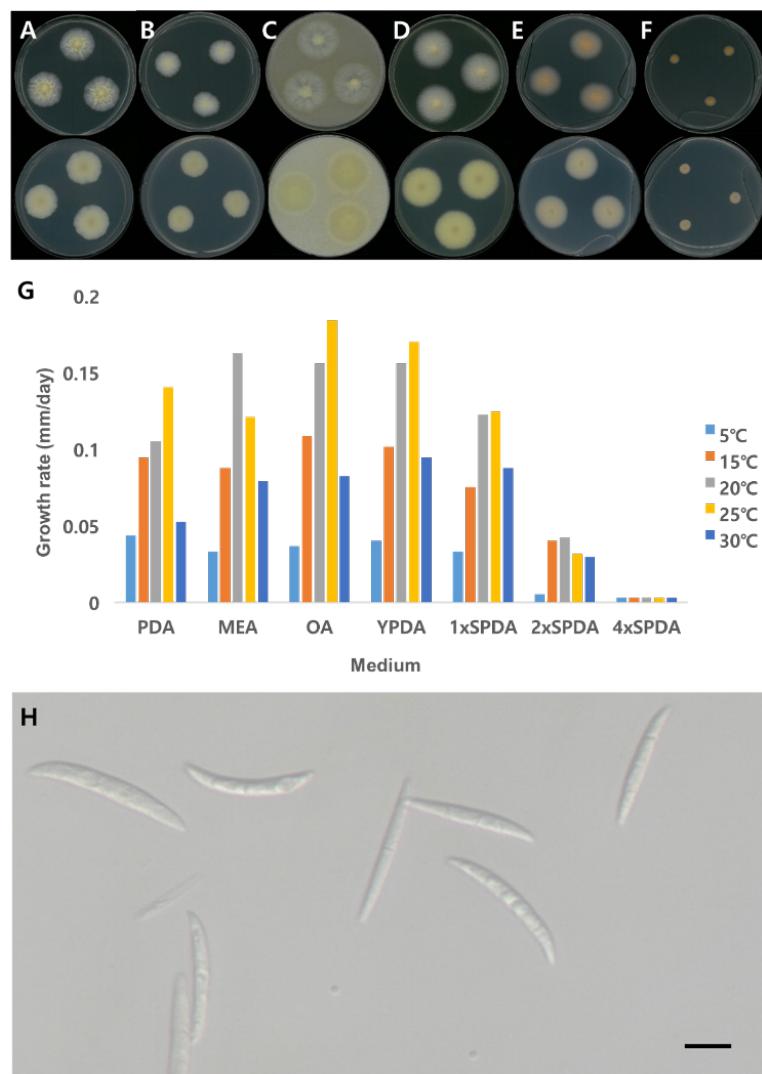


Fig. 3. Cultural and morphological characteristics of NNIBRFG23708. Macro-morphology of front and back. A: Potato dextrose agar (PDA), B: Malt extract agar (MEA), C: Oatmeal agar (OA), D: Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA), E: 1x sea water PDA (1xSPDA), F: 2x sea water PDA (2xSPDA), G: Growth rate on media. H: Micro-morphology of conidia. Size bar is 10 μm.

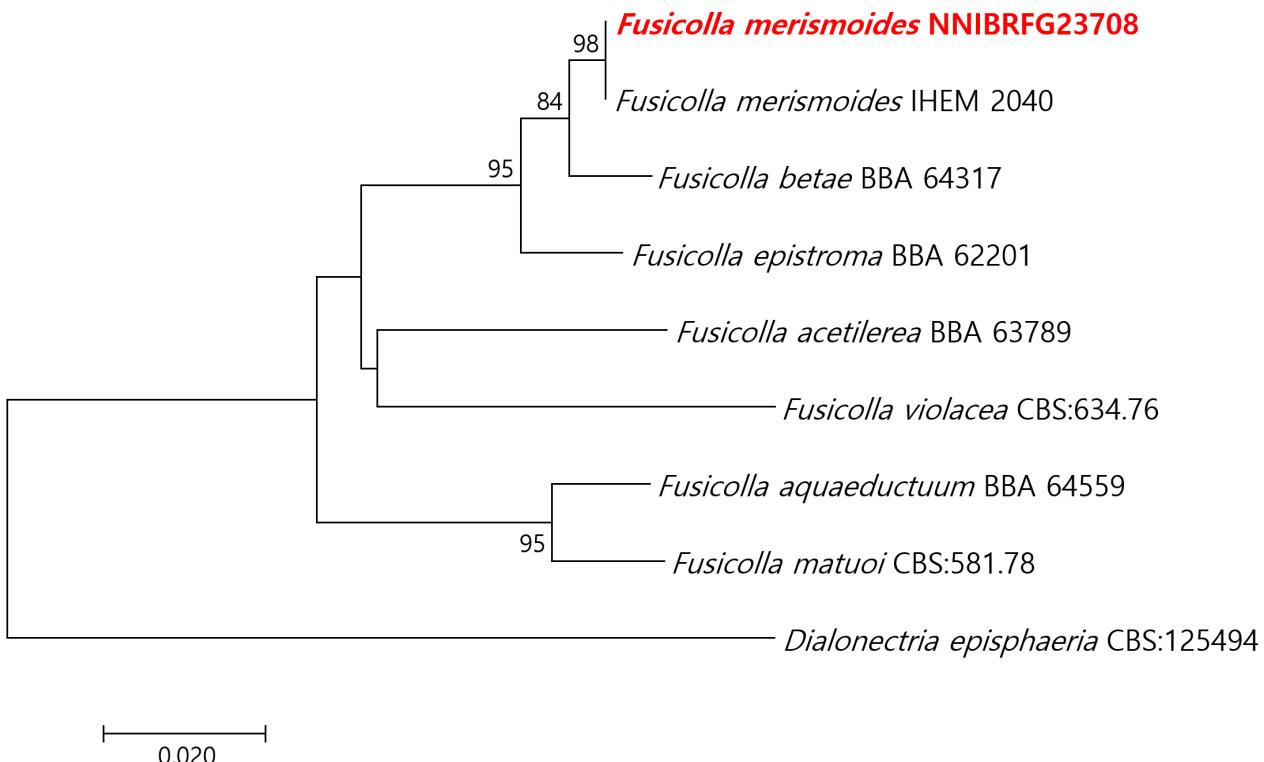


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Fusicolla merismoides* NNIBRFG23708 and closely related species based on a neighbor-joining analysis of RPBS2 gene sequences. The sequence of *Dialonectria episphaeria* was used as an outgroup. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) from 1,000 replications. The bar indicates the number of substitutions per position. The new isolate from the present study is shown in bold and red.

25°C에서 잘 생장하였으며, 염분농도가 높은 4xSPDA에서는 생장하지 않았다(Fig. 3G).

Microconidia는 관찰되지 않았고 macroconidia의 길이는 145-228 μm이고 너비는 15-26 μm이며 1-3개의 격막을 가지고 있고 길쭉한 모양으로 끝이 뾰족하고 약간 휘어져있다(Fig. 3H).

Habitat: 기수역의 퇴적물

Specimen examined: 충청남도 서산시 대호방조제, 2019.05.08., NNIBRFG23708, 국립낙동강생물자원관

Note: *Fusicolla merismoides*는 보통 토양과 오염된 물에서 분리되었으며 1838년 Corda에 의해서 *Fusarium merismoides*로 처음 보고되었다[10]. NNIBRFG23708균주의 ITS염기서열을 NCBI에서 blast한 결과, *Fusarium merismoides* (MT072065)와 100%의 유사도를 보였다. 이 균주를 최종 동정하기 위해서 ITS영역으로는 확인이 불가능하여 RPB2 유전자를 분석하여 계통수를 작성한 결과, *Fusicolla merismoides*와 같은 clade에 묶이는 것을 확인할 수 있었다. NNIBRFG23708균주는 염분 2.95%인 기수역의 퇴적물에서 분리되었으며 25°C에서 염분 6%인 2xSPDA에서 생장하는 것으로 보아 염분내성이 있는 균류로 확인되었다(Fig. 3F and Fig. 3G).

고찰

염분이 있는 인도의 맹그로브 숲과 solar saltern의 물 및 토양으로부터 *Aspergillus* 속 및 *Penicillium* 속이 주로 검출되었고[11], 오클라호마의 Great Salt Plains 호수의 토양에서는 *Aspergillus* 속 및 *Penicillium* 속 등이 분리되었다[12]. 우리나라의 고창과 무안갯벌에서는 *Penicillium* 속이 가장 많았고, 그 다음으로 *Fusarium* 속 및 *Aspergillus* 속이 많았다[13,14]. 본 연구에서는 목 수준에서는 Pleosporales 목, Eurotiales 목, Capnodiales 목이 가장 많이 검출되었고, 속 수준에서는 *Cladosporium* 속 및 *Penicillium* 속이 우점하는 것으로 나타나 다른 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다(Fig. 5). 각 기수지역으로부터 다양성지수를 도출한 결과, Shannon's diversity index와 Simpson's index 모두 염분이 낮게 측정된 을숙도 지역에서 가장 다양성이 높게 나왔으며, 염분이 제일 높았던 신두리사구 지역에서는 낮게 나왔다(Table 3). 이는 염분에 내성이 있는 균류의 다양성이 높지 않음을 보여준다.

한편 Nayak 등[11]의 연구에서는 곰팡이의 순수분리시에 염분이 함유된 배지를 사용하여 절대호염성(obligate halophile) 곰팡이를 분리할 수 있었으나, 본 연구에서는 일반 PDA에 배양하여 통

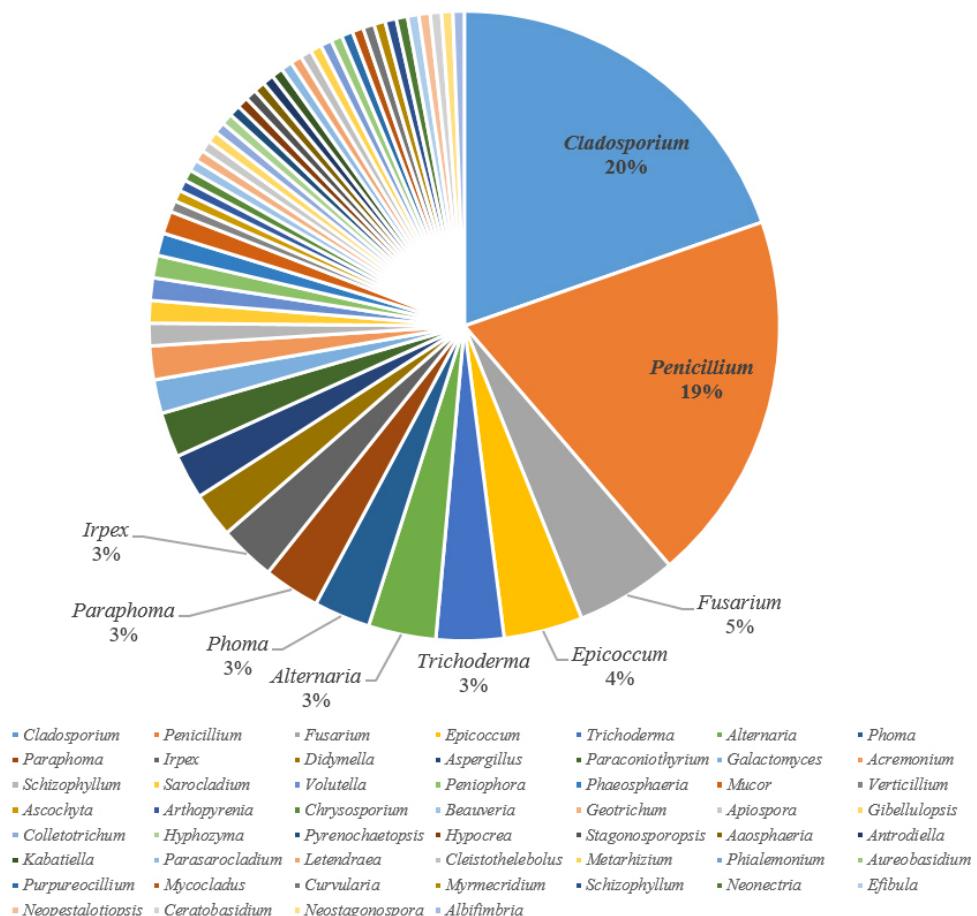


Fig. 5. Genus composition of all fungi isolated from brackish water. The graph expressed that all isolated fungal strains belong to the genus (%).

성호염성(facultative halophile) 곰팡이만을 분리할 수 있었다. 국내 미기록으로 확인된 두 균주 역시 넓은 범위의 염분내성을 가지고 있지만 염분 배지에서 최적 생장을 하지 않는 것으로 보아 통성호염성 곰팡이임을 알 수 있다(Fig. 1 and Fig. 3).

적 요

본 연구에서는 국내 기수 환경의 물과 토양에서 균류의 다양성을 확인하기 위해 을숙도, 금강 하구둑, 순천만습지, 대호방조제, 신두리사구 및 부남방조제 총 6지점의 현장조사 및 시료를 채집하였다. 현장에서 여과한 담수시료와 담수퇴적물로부터 곰팡이를 순수분리하여 PDA배지에 접종한 후 25°C에서 배양하였다. 기수역 시료에서 순수분리된 균주는 총 173균주로 ITS 부분을 분석하여 속 수준으로 동정하였다. 분리 동정된 균주를 다양성 지수를 이용하여 분석하였다. 분리된 균류는 Pleosporales, Eurotiales, Capnodiales, Hypocreales, Polyporales, Saccharomycetales, Agaricales, Glomerellales, Mucorales, Dothideales, Russulales, Xylariales, Sordariales, Myrmecridiales, Tubeufiales, Onygenales, Cantharellales, Amphisphaerales 목에 속하며 *Cladosporium*속이 20%로 가장 우점하며, 그 다음은 *Penicillium* (19%), *Fusarium* (5%)의 순서로 많이 분포하였다. *Sarocladium kiliense* NNIBRFG3280와 *Fusicolla merismoides* NNIBRFG23708를 국내 기수환경에서 발굴하였으며, 이를 국내 미기록종으로 보고하고자 한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NNIBR202001105).

REFERENCES

1. Rheinheimer G. Microbial ecology of a brackish water environment. New York; Heidelberg; Berlin: Springer-Verlag; 1977. P. 1-4. Doi:10.1007/978-3-642-66791-6.
2. Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitas A. Halotolerant and halophilic fungi. J Mycres 2009;113:1231-41.
3. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
4. O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M, Chang DC, Wang JN, Park BJ, Sutton DA, Benjamin L, Lindsley M, Padhye A, et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J of Clinical Microbiol 2007;45:2235-48.
5. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
6. Shannon CE. A mathematical theory of communication. The Bell Sys Tech J 1948;27:379-423.
7. Simpson EH. Measurement of diversity. Nature 1949;163:688.

8. Giraldo A, Gené J, Sutton DA, Madrid H, de Hong GS, Cano J, Decock C, Crous PW, Guarro J. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia* 2015;34:10-24.
9. Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoong GS, Starink M, Arocha Rosete Y, Guarro J, Scott JA. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomatix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud in Mycol* 2011;68:139-62.
10. Gräfenhan T, Schroers HJ, Nirenberg HI, Seifert KA. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilvella*, and *Volutella*. *Stud in Mycol* 2011;68:79-113.
11. Nayak SS, Gonsalves V, Nazareth SW. Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian J of Geo-Marine Scien* 2012;41:164-72.
12. Evans S, Hansen RW, Schneegurt MA. Isolation and characterization of halotolerant soil fungi from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Cryptogamie Mycol* 2013;34:329-41.
13. You YH, Yoon H, Woo JR, Seo Y, Kim M, Lee G, Kim JG. Diversity of endophytic fungi from the roots of halophytes growing in Go-chang salt marsh. *Kor J Mycol* 2012;40:86-92.
14. You YH, Yoon H, Seo Y, Kim M, Kang MS, Kim C, Ha SC, Cho GY, Kim JG. Genetic diversity of culturable endophytic fungi isolated from halophytes naturally growing in Muan salt marsh. *J Life Sci* 2012;22:970-80.