Molds의 동정 I

결핵연구원

김 신 옥

=Abstract=

Molds Identification I

Shin Ok Kim

Department of Molecular Biology, Korean Institute of Tuberculosis, Seoul, Korea

Fungi constitute nonmotile eukaryotic organism that are devoid of chlorophyll and reproduce by spores. There are 100,000 validly described species of fungi and over 275 species of those described fungi have been reported to cause disease in man and animals. Molds called filamentous fungi belong to the class Hyphomycetes. In the identification of Molds, the cultures have been purified and then observe their colony characteristics and microscopic morphology. Visual colony examination is important identifying marker concerning color, texture, diffusible pigments, exudates, macroscopic structures, growth rates and colony topography. In addition to the overall appearance of the colony, final identification should be made by microscopic examination. Microscopic features provide by the asexual/sexual spores, cells per spore, color of spores, spore formation and fragmentation of hyphae. Biochemical tests are not as important as markers for identifying filamentous fungi as they are for yeasts and dermatophytes. **[Kor J Med Mycol 2003; 8(3): 97-102]**

Key Words: Identification, Molds, Filamentous fungi, Morphology

서 론

진균 (Fungi)은 종속영양으로 생활하는 진핵생물 (Eukaryotes)이며, 편모 (flagella)나 광합성 요소인 엽록소 (chlorophyll)를 가지고 있지 않으면서 포자로 증식한다[4]. 현재까지 100,000가지 이상의 진균들의 종 (species)이 보고되어 있으며[7], 병을 일으키는 것으로 보고된 것은 275종이 넘는다[9]. 대개의 진균은 해가 없거나 식품, 약품 생산, 산업 등에 유용하게 이용되고 있지만, 일부 균들은 독소를 가지고 있거나 allergy 반응을 일으키기도 하며 식물, 동물 및 사람에 이르기까지 병을 일으키기도 한다. 최근에는 면역기능이 저하된 환자가 증가함에 따라 피부에서부터 심부, 전신에 이르기까지 심각한 진균감염증이 많이 보고되고 있으며, 그에 따른 신속한 진단과 치료를 위해 진균동정의 필요성이 더욱 요구되고 있는 실정이다.

진균을 형태학적으로 보면 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 사상균이라고 하여 균사 (hyphae)라고 불리는 분지 하는 filaments를 가지는 Molds (moulds, filamentous fungi)와 구형 또는 단세포 형태의 발아 (budding)하는 포자를 가지면서, 점성의 균집락을

†별책 요청 저자: 김신옥, 137-900 서울특별시 서초구 우면동 14, 결핵연구원, 분자생물과
전화: (02) 576-4986, Fax: (02) 573-1914
e-mail: sinokm@hanmail.net

*본 논문은 2003년 6월 가톨릭 의과학연구원에서 개최된 대한의진균학회 제5차 워크샵에서 발표되었음.

형성하는 효모 (yeasts, yeast-like fungi)로 나뉜다. 진균은 그 생식 방법에 따라 크게 유성생식포자를 생산하는 접합균문 (Zygomycota), 자낭균문 (Ascomycota), 담자균문 (Basidiomycota)과 유성생식이 밝혀지지 않았거나 잃어버린 균들이 속한 불완전균문 (Deuteromycota)의 4문으로 나눌 수 있다[5]. 아직까지 많은 병원성 진균이 불완전균문에 속해 있다.

본 연구는 피부사상균을 제외한 사상균을 중심으로 하여 분류학적 위치, 동정을 위한 준비단계, 대표적인 진균의 동정 방법과 그 특징을 나열하였고, 실제로 적용할 수 있는 균동정을 위한 육안적 관찰 방법, 현미경적 관찰, 생화학적 검사 순으로 기술하였다.

1. 사상균의 분류학적 위치 (Classification)

1) The Five Kingdoms (계) of Organism (Margulis, 1974)[10]

Monera - Prokaryotes (bacteria, actinomycetes, blue green algae)
Protista - Eukaryotes, (protozoa, water or slime molds)
Fungi - Eukaryotes, (yeasts, molds, rusts, mushrooms)
Plantae - Eukaryotes, (mosses, plants)
Animalia - Eukaryotes, (worms, arthropods, mammals)

2) Fungi (계)

Zygomycota (문)
Ascomycota (문)
Basidiomycota (문)
Deuteromycota (문): Fungi imperfecti

3) Deuteromycota (Fungi imperfecti)

Blastomycetes (강): *Cryptococcus, Candida, Rhodotorula, Trichosporon*
Coelomycetes (강): *Phoma*
Hyphomycetes (강)[1]:
Moniliaceae: *Aspergillus, Penicillium, Acremonium, Fusarium*
Dematiaceae: *Cladosporium, Curvularia, Phialophora, Exophiala*

2. 사상균동정을 위한 준비단계

1) 순수배양 (purification of culture)[3]

임상검체로부터 1차 분리 배양된 균들은 박테리아나 효모 (yeast), 사상균들이 섞여 자라게 된다. 먼저 이들 효모나 박테리아로부터 동정하고자 하는 사상균을 순수분리해야 하며, 순수분리하기 위해서는 멸균된 백금이를 가지고 균집락의 표면 (conidial heads, hypha)을 살짝 건드려서 준비된 Sabouraud's agar 배지면에 streaking하여 분산시킨다.

오염정도가 심하거나, 서로 엉켜 혼합배양이 된 경우에는 순수배양된 균을 얻기 위해서 위의 과정을 여러 번 반복하거나 희석배양을 해야 하며, 매일 균집락의 모양을 살피면서 순수배양된 균인지를 확인해야 한다.

2) Bacteria가 아닌지 확인

어떤 bacteria는 yeast와 아주 비슷한 smooth, pasty, 또는 shinny, dull surface, yeasty의 균집락을 보일 때가 있는데 그런 경우에는 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 bacteria가 아닌지를 구별하여야 한다.

3) Actinomycetes가 아닌지 확인

Actinomycetes는 균집락이 작고, dry, wrinkled, powder의 모양을 띠게 되므로 이런 모양을 보이는 균집락은 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 Actinomycetes의 특징적인 thin, branching filaments (직경이 1.0 um 이하)가 아닌지를 구별하여야 한다[8].

4) 사용되는 배지

Cornmeal agar, Potato dextrose agar, neutral Sabouraud Dextrose agar, Malt extract agar, Czapek-Dox agar

사상균의 동정

일단 순수분리된 균이어야 하며 사상균을 동정하기 위한 1단계는 육안적 관찰로서 균의 성장속도, 균집락의 형태, 색깔, 배지의 뒷면, texture, diffusible pigments, exudates, growth zones, aerial or submerged hyphae, colony topography, hard mass of cells 등을 관찰, 기록하면서 이 단계를 통해 어떤 균일지 추정할 수 있으며, 2단계로 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 포자의 종류, 색깔, 크기, 포자형성, 등의 여러 가지 특징을 관찰 기록하면서 분류 key를 참고로 하여 동정을 하게 된다.

1. 제1단계: 육안적 관찰

1) 균집락의 형태와 색깔

균집락의 형태는 효모에서보다는 사상균의 동정에 더 유용한 요소이다. Wooly 또는 velvety 등의 texture와 균집락 표면의 색깔과 아울러 균의 이면(reverse)의 색깔도 중요한 요소이다[6]. 균집락의 색깔은 cream/yellow, orange/salmon, purple/pink, green, greenish black, light sand brown 등 다양하며, 균집락의 topography는 flat powdery/suede, flat loosely cottony, domed, densely cottony, heaped, wrinkled, mostly sub-agar growth 등 다양하다. 예를 들면 균집락의 색이 dark-olive에서 점차 black으로 변하면서 솜털 (fluffy) 모양의 균집락을 보이면 흑색사상균 (Dematiaceous hyphomycetes)일 가능성이 높다.

균집락의 형태에서 먼저 고려되어야 하는 것이 효모 (yeast)와 사상균의 차이인데, 대개의 경우 효모는 크림과 같은 균집락의 형태를 가지는 것이 사상균과 다른 특징인데 예외적으로 *Geothichum, Aureobasidium, Exophiala, Sporothrix schenckii* 등은 처음 분리될 때는 cream-colored이나 점차 black color를 띠는 yeast-like colonies를 가지는 molds인데, 계속해서 계대배양하게 되면 균사 형태로 자라게 된다.

육안으로 보는 균집락의 형태는 이와 같이 다양하며, 이것은 어떤 특정 균에 항상 적용되는 것이 아니고 균을 배양할 때 사용되는 배지의 종류에 따라서 언제든지 달라질 수 있다. *Coccidioides immitis*가 배지의 종류에 따라 다양한 균집락 형태를 나타내는 대표적인 예이다.

2) 발육속도 (growth rate)

균집락의 발육속도는 크게 신속발육 (fast-growing), 중등발육 (moderate-growing), 지연발육 (slow-growing)으로 나뉘며 발육속도가 명확하게 구분되어 있는 것은 아니지만 신속발육은 대개 5일~일주일 이내에 full growth 되는 것을 말하며, 중등발육는 6~13일 이내에, 지연발육은 14일 또는 그 이상 지나야 발육하는 것을 말한다.

균의 발육속도는 어떤 병원균인지를 찾아내거나 동정하려고 할 때 유용하게 이용될 수 있다[7]. 예를 들면 현미경 관찰에서는 *Histoplasma capsulatum*과 유사하다고 생각되는데 만약 이 분리균이 2일 이내에 적당한 크기의 균집락으로 자란다면 *H. capsulatum*이 아닐 가능성이 높아진다. 이와 같이 발육속도가 균동정에 필수적이지만 접종된 균의 양, 사용되는 배지, 배양온도에 따라 많은 차이를 보일 수 있다. 대부분 병원성 진균은 30~32℃에서 잘 자란다.

3) 이형성 (dimorphism)

이형성은 병원성 진균을 동정하는데 아주 유용한 기준이 된다. 대개의 이형성 진균은 37℃에서 효모의 형태를 나타내고 25~30℃에서는 균사 형태를 보이는 것으로 *Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Sporothrix schenckii*가 전형적인 이형성 균들이다.

4) 발육온도

균의 발육온도는 진균을 동정하는데 아주 중요한 기준이 되며, 같은 속 (genus)에서도 종에 따라 달라지며, 같은 종 내에서도 thermotolerance가 서로 다른 경우가 있다. 예를 들면 *Cladosporium bantianum*은 42~43℃의 온도에서도 균이 자라므로 다른 *Cladosporium spp.* (*C. carrionii*)과 구별이 가능하다. 또한 *Aspergillus*의 다른 종들은 48℃에서는 살지 못하는데 *Aspergillus fumigatus*는 48℃에서도 잘 자란다.

2. 제2단계: 현미경 관찰

Lactophenol cotton blue wet mount 또는 slide culture preparation을 하여 관찰한다.

1) 포자

포자의 종류가 유성생식 형태 (teleomorph) 또는 무성생식 형태 (anamorph)로 생산된 것인지에 따라 균동정에 영향을 미친다[11]. 같은 종 안에서의 포자의 특징은 현미경으로 볼 때에는 사용된 배지에 따라 거의 차이가 없다.

(1) 포자의 종류

a. 무성생식포자 (asexual spores):

분아포자 (blastospores) - *Cladosporium spp., Candida spp.*

분절포자 (arthrospores) - *Coccicioides immitis, Geotrhchum*

후막포자 (chlamydospores) - *Candida albicans*

<대분생자 (macroconidia), 소분생자 (microconidia) - *Microsporum, Trichophyton*>

b. 유성생식포자 (sexual spores):

자낭포자 (Ascospores) - *Pseudallescheria boydii*

담자포자 (Basidiospores) - *Filobasidiella neoformans*

접합포자 (Zygospores) - *Mucor sp., Rhizopus sp.*

(2) cells per spore

특징: 1, 1~2, >2, all septa transverse, >2, some septa oblique or longitudinal

2) 포자의 색깔

특징: no color, green, brown/black

3) 포자형성 (spore formation)

무성포자를 가지고 있는 진균 (asexual fungi)을 속 (genus) 수준에서 동정하기 위해서는 포자의 모양이나 크기가 중요할 뿐 아니라 포자형성방식 (manner of sporulation)이 더욱 중요한 기준이 된다[3]. 예를 들면 *Helminthosporium*와 *Bipolaris*는 균집락의 형태나 포자의 모양으로 보면 서로 아주 비슷하지만 포자형성방식에서는 각각 차이가 있음에도 불구하고 종종 같은 균으로 잘못 동정되는 경우가 있다[7].

특징: fragmentation of hyphae, singly at any one point, in succession (forming chains), in succession (forming clusters), inside large (>50 um) structure

3. 제3단계: 생화학적 검사 (biochemical tests)

피부사상균을 제외한 일반 사상균의 동정에 있어서는 생화학적인 검사들이 효모에서처럼 중요한 지표로서 사용되지는 않지만 진단을 목적으로 하는데 사용되는 생화학적 검사 방법으로는 *Trichophyton mentagrophytes*와 *T. ruburum*을 구별하는데 사용되는 urease test가 있고, gelatin hydrolysis test는 *Cladosporium*이 병원성 균인지 부생성 (saprophytic) 균인지를 알고자 할 때 사용한다. 그밖에도 병원성 dematiaceous fungi를 최종 동정하기 위해서 tyrosine, xanthine, casein, starch의 가수분해능을 검사하기도 하며, 부수적으로 Cycloheximide resistance를 보기도 하는데 Cycloheximide (0.5 mg/ml)를 첨가한 배지에서 *Aspergillus, Pseudallescheia boydii, Cryptococcus neoformans, Fusarium, Candida, Absidia, Mucor, Rhizopus* 등의 성장이 억제된다.

사상균 동정을 위한 GUIDELINES

1. 균집락의 형태적인 관찰[2]

1) 균집락이 양털모양 (wooly)이고,
신속발육 (fast-growing),
7일 이내에 petri dish의 뚜껑까지 꽉 채우면:
Rhizopus, Mucor, Absidia

2) 균집락의 색깔이 white to gray, gray-brown, or black이고
ⓐ 양털모양 (wooly)이고,
신속발육 (fast-growing),
배지의 뒷면이 dark shade or black이면:
Alternaria spp., Helminthosporium spp., Curvularia spp.
ⓑ 편평 (flat)하며, velvety, black,
신속발육 (fast-growing),
배지의 뒷면이 black이면:
Cladosporium spp.
ⓒ 지연발육 (slow-growing), suede aerial mycelia, olive-black to black,
배지의 뒷면이 black이면:
Cladosporium spp., C. carrionii, C. bantianum, Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi, F. compactum.
ⓓ 신속발육, 처음에는 white and wooly,
점차 grayish white로 변하면서,
배지의 뒷면이 black이면:
Allescheria boydii.
ⓔ 신속발육, 처음에는 white and thin, 점차 yellowish, 나중에는 black으로 변하면:
Aspergillus niger.
ⓕ 아주 느리게 발육, 조밀한 균집락, gray or black, 짧고 양털모양의 기중균사 (aerial hyphae), 배지의 뒷면이 black이면:
Madurella grisea.
ⓖ Very slow-growing, black colonies have a dark brown diffused pigment,
배지의 뒷면이 black이면:
Madurella mycetomii.
ⓗ 중등발육 (moderately fast-growing),

양가죽모양 (suede)의 기중균사,
gray-black to black, cream 모양의,
배지의 뒷면이 black이면:
Phialophora jeanselmei,
Cladosporium werneckii,
Aureobasidium pullulans,
Fonsecaea dermatitidis.

3) 신속발육, brightly colored with suede to wooly mycelia이면:
Penicillium spp., *Fusarium spp*.,
Aspergillus spp., *Trichoderma spp*.

4) 만약, 양털모양으로부터 양가죽모양에 이르기까지, whitish, 배지의 뒷면이 다양한 색깔을 띠면서:
ⓐ 지연발육이면서 균집락의 색이 buff이면:
Histoplasma capsulatum,
Blastomyces dermatitidis.
ⓑ 중등발육이면:
Coccidioides immitis, *Geotrichum spp*.,
Chrysosporium spp., *Sepedonium spp*.

5) Powdery or granular colonies, various shades of white, yellow, purple, brown이면:
Epidermophyton floccosum, *Microsporum spp*.,
Trichopyton spp., *Scopulariopsis spp*.,
Paecilomyces spp., *Chrysosporium spp*.

6) Small glabrous colonies in shades of light brown to black, 배지의 뒷면이 black이면:
Sporothrix schenckii, *Geotrichum spp*.,
Cephalosporium spp.

2. 현미경 관찰[2]

1) 무격벽, 무색의 넓은 균사를 가지고, 다양한 크기의 포자낭 (sporangia): Mucormycetes
ⓐ 포자낭과 축주 (columella)가 있고,
가근 (rhizoids)이 없음: *Mucor spp*.
ⓑ 포자낭과 축주 (columella)가 있고,
rhizoids present with nodal sporangiophores:
Rhzopus spp.
ⓒ 포자낭과 축주 (columella)가 있고, rhizoids present with internodal sporangiophores:
Absidia spp.

2) Septate, branching hyphae; either conidia or hyphae, or both, tan to dark brown:
Dematiaceous fungi:
ⓐ Large, dark, septate conidia with thin or thick walls; septa in one or two lanes:
Alternaria spp., *Helminthosporium spp*.,
Stemphylium spp., *Curvularia spp*.
ⓑ Large, dark, single conidia: *Nigrospora spp*.
ⓒ Large numbers of small conidia arranged in branching, budding heads:
Cladosporium spp., *Fonsecaea spp*.
ⓓ 화병모양의 분생자병 (conidiophores)으로부터 포자가 생산:
Phialophara verrucosa, *Fonsecaea spp*.
ⓔ Thick, large, black cells forming the hyphae, 그 중 일부는 light-colored blastospores를 생산: *Aureobasidium pullulans*.

3) Septate, branching, hyaline hyphae:
ⓐ 특징적인 분생자두 (conidial heads)의 모양[12]:
Aspergillus spp., *Penicillium spp*.,
Paecilomyces spp., *Scopulariopsis spp*.
ⓑ 분생자병 (Conidiophores), terminating in clusters of conidia: *Fusarium spp*.
ⓒ Conidia borne individually on hyphae:
Sepedonium spp., *Monosprium spp*.
ⓓ Hyphae forming large numbers of arthrospores:
Geotrichum spp.
ⓔ Dark, large bodies scattered through the hyphal growth: *Chaetomium spp*., *Phoma spp*.

결 론

Fungi는 진핵생물이며 현재까지 100,000가지 이상의 진균의 종이 보고되어 있으며 사람에게 병을 일으키는 것으로 보고된 것은 275종이 넘는다. Molds는 분지하는 균사를 가지므로, 사상균이라고 불리며 분류학적 위치로는 Hyphomycetes에 속한다.

Molds를 동정하기 위해서는 먼저 순수분리된 균이어야 하고, 동정하기 위한 1단계는 육안적 관찰로서 균집락의 색깔, 성장속도, 형태, 배지의 뒷면, texture, colony topography 등을 기초로 하여 어떤 균

일 가능성을 추정한 후에 제2단계로는 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여 현미경하에서 포자의 종류 (유성 · 무성포자), 포자의 색깔, 크기, 포자형성방식, 균사의 형태 등의 여러 특징을 관찰 기록하면서 분류 key를 참고로 하여 최종 동정을 한다. 피부사상균과 효모의 동정에서는 생화학적 검사 (biochemical tests)가 중요한 지표로 사용되지만, Molds에서는 진단을 목적으로 사용하는 경우 이외에는 중요한 지표로써 사용되지 않는다.

진균을 동정하는 것이 쉽지 않은 이유는 첫째, 진균이 자라는 환경 조건에 따라 형태적 특징이 달라질 수 있는 점 둘째, 진균의 구조를 묘사하는 용어가 잘 정리되어 있지 않고 복잡하고 광범위하므로 정확한 지식을 가지고 있는 사람이 아니고는 전문서적에 기술된 분류를 위한 key를 활용하기 어려워서 동정하는 데에 많은 어려움이 있다.

참 고 문 헌

1. Barron GL. The genera of Hyphomycetes from soil. Huntington: Robert E. Krieger Co., 1977: 1-16
2. Doory YA. Laboratory Medical Mycology. Philadelphia: Lee & Fibiger, 1980: 112-124
3. Evans EG, Richardson MD. Medical Mycology; A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1989: 47-65, 171-173
4. Hoog GS, Guarro J. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995: 1-16
5 Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington D.C.: American Society for microbiology, 1992: Section 6
6. Koneman EW, Roberts GD, Wright SF. Practical Laboratory Mycology (2nd). Baltimore: Williams & Wilkins, 1978: 19-39
7. Kwon-chung KJ, Bennet JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lee & Fibiger, 1992: 3-78
8. Larone DH. Medically Important Fungi (3rd); a Guide to Identification. Washington D.C.: American Society for microbiology, 1995: 53-59
9. McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press, 1980: 619-620
10. Margulis L. The classification and evolution of prokaryotes and eukaryotes. In "Handbook of Genetics" (R. C. King, ed.), New York: Plenum, 1974: 1-41
11. Moore GS, Jaciow DM. Mycology for the Clinical Laboratory. Reston: Reston publishing Co., 1979: 1-10
12. Raper KB, Fennell DI. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965: 13-34