韓 國 菌 學 會 誌 第1卷 2號
Kor. J. Mycol. Vol.1, No.2, p.25~30, 1973

닭의 肺에서 病原性 *Aspergilli*의 分離와 炭素源및 窒素源에 따른 培養條件에 關하여

李 培 咸·李 庚 培

建國大學校 應用科學研究所, 서울 保健專門學校

Studies on the Incubation Condition according to Carbon Source, Nitrogen Source and Isolation of Pathogenic *Aspergilli* from Lung of Domestic Fowls

Bae Ham Lee and Kyoung Bae Lee

Institute of Applied Sciences, Kon Kuk University and Seoul Health Junior College

Abstract : The Aspergilli can be isolated from many of damaged domestic fowl's lung which were collected at fowl slaughter house from July to August 1973, during two months at Dapsimri, Dongdaemoon-ku, Seoul city. The survey of incubation condition for carbon source and nitrogen source were summerized as follows:

1. One of the *Aspergillius fumigatus* group were isolated from damaged domestic fowl's lung.
2. In the preparation of isolation media, adding the 4 gs of silkworm pupa and Meju to Czapek's agar medium is more preferable than Austick's media (2% malt extract agar)
3. In survey of incubation condition, the growth rate and sporulation shown that higher differences according to varieties and amounts of C-source. And in the case of 20% C-source concentration shown that low growth rate than lower concentration of C-source.
4. In N-source, the growth rate indicated that some difference according to varieties of N-source, difference of growth rate demonstrated almost not shown at various amounts, differences of mycelium and sporulation was only detected reversely.

緖 論

*Aspergilli*의 病原性에 관한 報告는 이루어져 왔지만 다른 미생물 分野에 比하면 알려진 것이 적다. *Aspergilli*에 依한 病을 Aspergilosis라 하며 肺의 granulomatus, necrotizing과 cavitary disease等이며 病原性 *Aspergilli*에 관한 첫 報告는 Rayer & Montange(1842)이 bullfinch의 氣束에서 *Aspergillus candidus*를 分離한 것이며, 다시 Frensenius (1850~1863)에 依해서 *Aspergillus fumigatus*가 報告되었다. 또 Cramer(1859)에 依해서 *Aspergillus niger*가 報告되었으며, 그후 Ainsworth等(1959)에 依해 *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus flavus*. Langeron

(1922)에 依해 *Aspergillus terreus*. Marsalek (1960)에 依해 *Aspergillus retrictus*등도 報告되었다. 이들 菌株中 *Aspergillus fumigatus*는 가장 重要한 病原性 菌株로서 알려져 있으며, 呼吸系, 消化系, 神經系, 泌尿系, 皮膚系等에 感染되어 疾病을 일으킨다고 알려졌다. Savage & Isa(1933)는 닭의 呼吸器疾患에 있어서 發病의 90%, Witter & Chutt(1952)는 칠면조에 있어서 發病의 50%가 폐사된다고 報告하였다. 鳥類에 있어서 感染된 肺는 희색 또는 황색의 直經 3mm程度의 斑點을 形成하며 慢性疾患의 境遇는 1~5mm의 nodule을 形成한다는 것이 알려졌다.

우리나라에서 Aspergilli에 關한 硏究는 李(1968), 李等(1964), 金(1971) 等의 報告가 있으며 池(1973), 盧(1961), 張(1973)等은 耳鼻呴喉科 患者의 患部와 健康人의 같은 部位에서 Aspergilli를 分離 報告한 바가 있다. 그러나 아직까지 우리나라에서는 생물체의 組織에서 直接 分離 培養한 報告는 없다. 本 實驗에서는 이병가금의 肺에서 Aspergilli屬에 속하는 Strain을 分離하였다. 또 이에 對한 培養條件도 규명하였다.

實驗材料 및 方法

1. Sample의 蒐集

材料의 蒐集은 닭 3,000個體를 서울特別市內 Smoke 통닭공장에서 얻었고 그중 Aspergillosis의 特有한 symptom인 nodule을 形成한 10個의 肺와 正常肺 10個를 sample로 使用하였다.

Nodule의 形成狀態는 直徑 1~5mm程度의 담황색의 콩알 모양의 것이 1~3個씩 있었다.

2. 菌의 分離

Nodule의 形成部位를 멸균수로 5回 水洗한 후 2% malt agar plate와 Czapek agar에 메주와 누에번데기를 1*l*當 4g씩 添加 media에 이식하여 3日間 37°C에서 培養 分離하였다.

細菌等의 汚染을 막기 위해서 streptomycin을 1*l*當 100mg을 添加하였다.

3. 菌의 同定

本 實驗에서 菌의 同定은 Raper와 Fennell(1965)의 分類法에 따라 同定하였다.

4. 培地 및 培養條件

Czapek agar를 基本培地로 하여 Table 1에서와 같이 C-source로는 saccharose, fructose 및 lactose 3種을 使用하여 1*l*當 10g, 30g, 100g, 200g의 농도로 區分하였다.

N-source는 Sodium nitrate와 28% Ammonium hydroxide 2種을 使用하여 1*l*當 Sodium nitrate는 1g, 3g, 10g, 20g으로 2%8 Ammonium hydroxide는 1cc, 3cc, 10cc, 20cc로 區分하였다. 그리고 自然培地로서 市販메주와 누에번데기 2種을 使用하였다. 市販메주는 1*l*當 5g, 15g, 50g, 100g, 누에번데기는 3g, 8g, 25g, 50g을 Sodium nitrate를 빼고 使用하였다 (Table 2).

또한 Sodium nitrute가 포함된 Czadek agar에 市販메주, 누에번데기를 4g, 8g을 各各 添加한 培地를 使用하였다. 여기에서 4g, 8g 添加는 Sodium nitrate의 N-source가 있으므로 自然培地에 添加가 分離培養에서의 影響을 調査할 目的이었다.

5. 培養 條件

30±1°C와 37±1°C에서 6日間 培養하였다.

성장율은 各 4 plate의 平均을 잡았다.

結 果

1. 菌의 同定

本 實驗에서 同定된 菌은 plate에서 회청색의 velvety한 colony를 형성하고 뒷면은 약간 갈색을 띈다.

conidial head는 10±4μ×15±4μ이었고 무색 형활한 conidiophore는 길이가 100~150μ이었다. Vesicle의 모양은 flask形이며 sterigmata의 着生이 vesicle의 3/4정도였다. Sterigmata는 1 series이고 5±2μ이고 conidia는 globose 또는 subglobse였고 1±0.2μ이였다.

이러한 특징으로 볼때 Raper와 Fennell(1965)의 分類法에 따라 *Aspergillus fumigatus* group으로 同定하였다.

2. C-source에 따른 影響

Czapeak agar에서 saccharose는 C-source 3%를 標準으로 하였다. 本 菌株는 Table 3에서 보는바와 같이 saccharose區에서는 5日後 30°C에서 3%일때 65mm로 가장 좋았고 1%, 10%, 는 各各 58mm였고 22%에서는 51mm였다. Lactose區에서는 saccharose 및 fructose에 비해 mycelium形成 및 spore形成이 빈약하였으며, 5日後 30°C에서 1%, 및 3%에서는 38mm였고 10%에서는 45mm, 20%에서 46mm였다 fructose區에서는 5日後 30°C에서 各 濃度에 따라

41~46mm로 saccharose에 比해 성장율이 낮았고 spore形成은 별차가 없었다(Table 3, Table 6).

그리고 本 菌株는 성장율이 全區에서 37°C가 30°C보다 비교적 좋았다(Table 3).

3. N-source에 따른 影響

Sodium nitrate區의 N-source는 Table 4에서 보는 바와같이 5日後 30°C에서 50~60mm로 성장율의 差가 별로 없었고 Table 7에서와 같이 sporulation은 3g區에서 가장 양호하고 20g區에서는 3g區에 比해 불량했으며 1g區에서 10g 및 20g區보다 불량했다. Aerial hypha는 1g에서 특히 많았고 3g, 10g, 20g區에서는 별차가 없었다.

Ammonium hydroxide(28%)區에서는 5日後 30°C에서 35~40mm로 sodium nitrate의 50~60mm에 比해 성장율이 낮았고(Table 4), sporulation은 20cc에서만 正常的이고 10cc, 3cc, 1cc로 내려가면서 불량했다(Table 7).

또 aerial hypha는 1cc區에서 많았고 3cc, 10cc, 20cc區로 올라갈수록 적어졌다. 溫度에 따른 影響은 37°C때가 30°C보다 全區에서 sporulation이나 성장율이 良好하였다(Table 4, Table 7).

4. 自然培地에서의 影響

自然培地는 市販메주와 누에번데기를 使用하였다. Czapek agar에서 sodium nitrate를 빼고 메주를 1*l* 當 5g, 15g, 50g, 100g를 抽出하여 培養한 結果 5日後 30°C에서 생장율은 48~50mm로 sodium nitrate의 49~60mm에 比해 약간 낮았으나 28% ammonium hydroxide의 35~40mm에 比해 양호했다(Table 5).

Sporulation은 sodium nitrate區와 별 差가 없었고 各 濃度中 50g에서 Sporulation이 가장 좋았고, 15g, 100g區에서는 50g에서보다 떨어졌으며, 5g에서는 덜 좋았다(Table 7. Table 8). Colony의 전면 색갈은

Table 1. Concentration of various N-source in the media.

	Nutritional source	Concentration(g/*l*)			
C-source	Saccharose	10	30	100	200
	Fructose	10	30	100	200
	Lactose	10	30	100	200
N-source	Sodium nitrate	1	3	10	20
	*28% Ammonium Hydroxide	1	3	10	20

* Unit: cc

Table 2. Composition of various natural media

Nutritional source	Concentration(g/*l*)			
Meju	5	15	50	100
Silk-worm pupa	3	8	25	50
Meju, Silk-worm pupa	*S.3+*M.4+*K.4			
Meju	*S.3+*M.8			
Silk-worm pupa	*S.3+*K.8			

* S: sodium nitrate
M: Meju
K: Silk-worm pupa

Table 3. Growth rate of *Asp. ochracious* on the 3 types of C-source.

Source \ Days \ temp.(°C) \ Conc.(%)		3		4		5		6	
		30	37	30	37	30	37	30	37
Saccharose	1	19	20	28	40	36	51	45	70
	3	21	22	34	42	50	53	58	71
	10	22	24	38	43	52	53	53	72
	20	17	19	25	39	32	48	52	70
Lactose	1	8	10	13	15	20	23	28	30
	3	8.5	11	14	18	20	25	29	33
	10	8.5	12	16	20	25	26	35	36
	20	7.5	10	18	21	25	30	39	44
Fructose	1	11	10	15	16	18	23	21	30
	3	12	13	18	19	24	29	28	35
	10	13	14	17	20	25	38	30	40
	20	10	12	23	24	32	37	38	49

Table 4. Growth rate of *Asp. fumigatus* on N-source

Source	Conc.(g/dl)	3		4		5		6	
	Temp.(°C) / Days	30	37	30	37	30	37	30	37
Sodium nitrate	1	18	36	33	54	49	up	60	*up
	3	23	36	38	55	60	up	68	up
	10	20	37	34	56	52	up	66	up
	20	20	38	31	57	50	up	62	up
*28% Ammonium hydroxide	1	17	30	29	50	40	75	52	up
	3	16	30	26	49	35	70	49	up
	10	16	30	26	52	38	70	50	up
	20	14	30	23	43	35	62	45	up

* unit: cc.
up: over growth

Table 5. Growth rate of *Asp. ochracious* on natural media.

Source	Conc.(g/l)	3		4		5	
	Temp.(°C) / Days	30	37	30	37	30	37
Meju	5	22	28	31	43	48	55
	15	22	28	31	42	48	45
	50	22	28	30	43	47	55
	100	22	28	32	43	48	55
Silk-worm pupa	3	21	25	32	39	41	51
	8	22	25	33	42	42	54
	25	19	25	32	43	42	58
	50	20	25	32	45	41	90
*Cz+M		32	34	55	61	up	up
*Cz+L		35	38	56	62	up	up
*Cz+M+L		31	35	50	58	up	up

* Cz+M: Czapek agar+Meju 8gs
Cz+L: Czapek agar+Silk-worm pupa 8gs
Cz+M+L: Czapek agar+Meju 4gs+Silk-worm pupa 4gs

Table 6. Sporulation of *Asp. fumigatus* on the various on C-source

Source	Concentration(%)	Sporulation
Saccharose	1	+++
	3	+++++
	10	++++
	20	++++
Fructose	1	+++
	3	+++++
	10	+++++
	20	++++
Lactose	1	+
	3	+
	10	++
	20	+++

* + : very poor ++ : poor +++ : good
++++ : very good +++++ : excellent

sodium nitrate를 빼고 누에번데기를 1*l*當 3g, 8g, 25g, 50g을 抽出하여 培養한 結果 5日後 30°C에서 성장율은 50~53mm로 Sodium nitrate區의 49~60mm에 비해 약간 낮았고 28% ammonium hydroxide區의 35~40mm와는 별차이가 없었다.

Table 7. Growth rate of *Asp. ochracious* on N-source

Source \ Temp.(°C) / Days	Conc. (%)	3		4		5		6	
		30	37	30	37	30	37	30	37
Sod. nitrate	1	14	19	22	30	34	37	43	56
	3	12	18	24	33	40	42	50	53
	10	15	21	26	36	35	53	50	75
	20	15	22	24	38	35	52	49	79
*28% Ammonium hydroxide	1	18	19	31	36	40	49	52	62
	3	15	16	26	35	39	46	50	60
	10	14	15	23	28	35	45	47	51
	20	8	10	16	23	30	36	47	48

* Unit: cc

Table 8. Sporulation of *Asp. ochracious* on several natural media

Source	Concentration(g/*l*)	Sporulation
Meju	5	++
	15	+++
	50	+++++
	500	++++
Silk-worm pupa	3	+
	8	++
	25	+++++
	50	++++
*Cz+M		+++++
*Cz+L		+++++
*Cz+M+L		++++++

* Cz+M: Czapek agar+Meju 8gs
Cz+L: Czpeak agar+Silk-worm pupa 8gs
Cz+M+L: Czapek agar+Meju 4gs+Silk-worm pupa 4gs

Sporulation은 1*l*當 3g에서 아주 불량했고 8g에서는 약간 불량했으며 25g, 50g에서는 正常이었다(Table 5, 6, 8).

Sodium nitrate를 넣은 완전 Czapek agar에 메주를 8g 添加한 培地, 누에 번데기를 8g 添加한 培地 및 메주와 누에번데기를 各各 4g씩 添加한 培地에서 培養한 結果 5日後 30°C에서의 생장율은 各各 60mm 以上으로 sodium nitrate區의 47~60mm나 28% ammonium hydroxide區등에 比해 良好하였다.

특히 메주와 누에번데기를 各各 4g씩 添加한 培地에서 잘 分離되었다.

考 察

*Aspergilli*에 依한 病을 infection(mycosis), allergy toxicosis 3가지로 나누며, infection은 1차감염과 2차감염으로 나눈다.

*Aspergilli*에 의해 infection된 病을 一般的으로 Aspergillosis라 한다.

Infection되는 部位는 主로 肺, 귀, 각막, 심막등이다.

Austwick(1962)는 2% malt extract agar medium이 *Aspergilli*의 分類에 가장 적합하다고 보고했다.

Sabourauds glucose agar나 maltose agar는 病原性 fungus의 分離에 전통적으로 아직 불충하다고 인정되어 있다.

本 實驗에서는 2% malt extract agar medium과 Czapek agar에 메주와 누에번데기를 1*l*當 各各 4g씩 添加한 培地를 使用하였다.

다른 자연기질보다 메주와 누에번데기는 우리나라에서 *Aspergill*가 가장 잘 서식하는 자연기질로서 本 實驗에 使用하였다.

分離結果 Czapek agar는 本 菌株分類에 있어서 과거 Austwick(1962)가 고안한 2% malt agar보다 더 적합하다.

分離된 菌株를 가지고 Table 2, Table 3, Table 4에서와 같이 C-source의 種類와 量을 바꿔가며 培養한 結果 C-source에서는 種類와 量에 따라 생장율과 sporulation의 差가 많았으며 20%에서는 생장율이 떨어졌다.

N-source에 따른 影響은 種類에 따라 생장율의 差가 약간 생기나 量에 따라서는 거의 생기지 않고, 다

만 mycelium의 發育差가 많이 생겼다. 메주나 번데기의 自然 N-source를 添加한 培地에서 생장율이나 spore形成이 가장 좋았다.

摘 要

1973年 7月 서울特別市內 Smoke통닭 工場에서 얻은 이병닭 肺에서 Aspergilli를 分離할 수 있었고 또 C-source 및 N-source의 培養條件을 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. *Aspergillus fumigatus* group에 屬한 1 strain을 分離 하였다.

2. 分離用 培地로서는 Czapek agar에 누에, 메주를 4g씩 添加한 것이 과거 Austuwick(1962)가 보고한 2% malt extract agar medium보다 양호하였다.

3. 培養에 있어서 C-source는 種類와 量에 따라 생장율과 sporulation의 差가 많았고 20%에서 생장율이 떨어졌다. N-source에서는 種類에 따라 생장율의 차가 생기나 量에 따라서는 생장율의 差가 거의없고 다만 mycelium과 sporulation에서 差가 생겼다.

References

Ainsworth, and P.K.C. Austwick.(1959): Fungal Disease of Animals. *Commonwealth Breau of Animal Health Review Series*, No. **6**, 148 pp. Commonwealth Agricultural Bureaux, Fornham Royal. Bucks, England

Ainsworth, and P.K.C. Austwick.(1955): A survey of animal mycosesin Boitain: General aspects. *Vet. Record* **67** : 88—97.

Austwick, P.K.C.(1962): The presence of *Aspergillus fumigatus* in the lungs of dairy cows. *Lab. Insect* **11** : 1065—1072.

Cramer, C.(1859): Ueben eine neue fadonpizgattung, Sterigmatosystis vierteuahe sschrift Naturf rsch. *Ges., Zurich* **4** : 325.

Fresenius, G(1850—1863): Beitrage Zur Mykologie. 13 Plates, 111 pp. Part, pp. 1—38, 1850 : part 2, pp. 39—80, 1852 : partz, pp. 81—111 H.L. Bronner, Frankfurt amm.

Frischbier, and Richtesteiger.(1941): Bildung von oxalsaure durch *Aspergillus niger* in Brot und der streuz. *Veterinark.* **53** : 391.

Langeron, M.(1922): Surun Champignon d'ume otomycose bresillienne sterigmatocystis Hortai. *Bull Sac. Pathol. exotigue* **15** : 383.

Lucet, A.(1897): De I' *Aspergillus fumigutus* Chez animaux demestiques et dans lesseufs en incubation, *Etude Clinique et etperimen tuls* 108 pp. ch. Medel. Paris.

Marsalek, E., Z. Zizka, V. Riha, J. Dusek, and C. Dvoracek(1960): Plion aspergillozoas gneraliza c, Vyvolama druhem *Aspergillus* resrtictus casopis *Lekaru Ceskych* **99** : 1285.

Raper. K.B. and D.I. Fennell.(1965): The genus *Aspergillus*, The Wlliam & Wilkins Co., Baltimore.

Raver and Montagne,(1842): Mycose. *Aspergillare* dans les poches aeriennes d'un bouvreuil *J. Inst.* p. 270 Müller's Arch.

Robin, C.(1853): Historie naturrelle des vegetaux parasites cui crossent sur phomme et sur les animanx vivants, 702pp. Paris.

Savage, A., and J.M. Isa.(1933): A note on mycotic pneumonia of chicken. *Sci. Agr.* **13** : 341.

Sluyter(1947): De vegetabilibus organismi Animalis parasites ac de novo. epiphyto in pityriasi versicolore obvio dissertation, 14pp.

Witter, J.P, and H.L. Chute,(1952): *Aspergillosis* in turkeys, *J. Am. Vet. Ned. Assoc.* **121** : 387—388.

張明雄(1973): 耳鼻咽喉科 患者에서 分離한 *Aspergillus niger* group의 分類學的 硏究·建國大學校 大學院 生物學科 碩士學位論文.

池重敏, 宋達源(1973): 外耳道 眞菌症의 臨床的 및 細菌學的 觀察. 大韓耳鼻咽喉科學會誌 16 : 1—13.

金尙材(1971): 韓國產 *Aspergillus*에 관한 分類學的 硏究. 韓國微生物學會誌 9 : 1—26.

李有福(1964): 韓國의 Systemic mycosis와 fungus특수염색에 관한 연구. 大韓 내과학회잡지 Vol. 5. No. 9—525.

李培咸, 金尙材, 李浩原(1968): 韓國產 *Aspergillus*에 對한 分類學的 硏究. 韓國微生物學會誌 6 : 6—10.

廬敬千(1961): 韓國健康人の耳鼻咽喉科領域における眞菌分布に關する硏究. 耳臨. **54** : 525—537.

林大銑外 4人(1963): 상악동에 發生한 *Aspergillosis*의 1예 보고. 中央醫學 **5**. 435.