

Mycobacterium fortuitum-chelonei complex 및 신속발육 Mycobacteria 10개 균집합체의 거대집락형태

중앙대학교 의과대학 미생물학교실

최철순 · 전호진 · 양용태

= Abstract =

Giant Colonial Morphology of 10 Clusters of Rapidly Growing Mycobacteria Including *Mycobacterium fortuitum-chelonei* Complex on 7H10-Crocin Agar Medium

Chul Soon Choi, Ho Jin Jeon and Yong Tae Yang

Department of Microbiology, Chung-Ang University, College of Medicine, Seoul, Korea

We developed a giant colony test system with rapidly growing mycobacteria by stab-culture with a loopful inoculum of cells into Middlebrook 7H10 agar medium containing soluble extracts of the fruits of *Gardenia jasminoides* (7H10-crocin agar medium) and assessed the significance of the giant colony test with 28 strains of 10 clusters of rapidly growing mycobacteria classified by the simple biological 5-test characters.

Of the 10 clusters of mycobacteria tested, some of strains which belonged to cluster No. 1a, 5a and 11a did grow as gravis types, whereas most of other clusters gave mitis or intermedius types in their colonial sizes at 12 days culture. By this test, pathogenic strains of *M. fortuitum-chelonei* complex which belonged to cluster No. 5a, b, 7a and 8a, b could be divided into gravis, intermedius and mitis colony types and the gravis ones were characterized by bluish-white "mushroom-shaped" colonies with central complexes in the texture, whereas the intermedius gave grayish-white "flower-shaped" colonies with radiated folds, but without any central complexes. The mitis colonies were characterized by grayish-white smooth or smooth mucoid colonies and were common among the clusters in their shapes. The colony of *M. chelonei* was bluish-white mitis type and was characterized by its hilly rhizoid colony.

The gravis colony of cluster No. 1a identified as *M. phlei* was characterized by yellow "round straw-mat-shaped" or "chrysanthemum-shaped" colony with whole complexes in the texture, and the gravis colonies of the cluster No. 11a gave grayish-white "flower-shaped" colonies with central stamens, radiating trough and fine cup-shaped strands in the texture.

The four colony types of pathogenic species of *M. fortuitum-chelonei* complex on 7H10-crocin agar medium were distinctive from those of other clusters of rapidly growing mycobacteria and these results indicated that the giant colony test, in conjunction with the simple 5-test characters, would be of value in the differentiation of *M. fortuitum* complex from other clusters of rapidly growing mycobacteria.

Key Words: *Mycobacterium fortuitum-chelonei* complex, rapidly growing mycobacteria, colony morphology.

서 론

일부 병원성 mycobacteria는 corn meal-glycerol agar 또는 oleic acid-serum albumin-dextrose com-

plex(OADC)를 함유하는 Middlebrook 7H10한천배지에서 발육이 촉진되고 집락의 형태가 특이하기 때문에 이 배지를 이용한 세균집락형 조사는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 포함한 병원성 mycobacteria를 배양단계에서 신속히 동정하기 위

한 검사방법으로 많이 응용되었다^{11, 13, 14}.

그러나 일부 mycobacteria의 세균집락의 형태는 균종에 따라 다소 특이하지만 동일집락으로부터 취한 세균이라고 할지라도 여러 가지 배양조건, 즉 배지의 종류, 습도 및 산도, 접종액, 배양기간, 집락의 밀도등에 따라 다양한 집락형태를 나타내는 결점이 있다¹⁴. 또한 배양조건을 표준화한다 할지라도 mycobacteria의 집락의 형태는 세균의 개체(clone)

의 성장변이와 특성과 약제내성변이등에 따라 그 집락형이 변화된다¹⁵.

저자들은 7H10한천기본배지에 OADC 대신에 치자의 수용성 추출액(등황색 crocin색소액)을 추가한 배지(7H10-crocin배지)가 7H10배지 보다 mycobacteria 집락의 관찰을 용이하게 할 뿐아니라 일부 mycobacteria의 집락의 발육을 더욱 촉진시키고 crocin반응양성 세균의 집락을 청남색으로 침착시

Table 1. Cluster number, species and sources of strains of rapidly growing mycobacteria

Cluster number	Species	Strain	Specimens of isolation	Sources of Country
1a	<i>M. phlei</i>	75-432	Soil	CUCM
	unidentified	K.O. Rho	Sputum	KIT
3a	<i>M. aurum-neoaurum-vaccae</i> complex	M.Y. Lee	Sputum	KIT
4a	Unidentified	S.U. Chee	Sputum	KIT
	Unidentified	80-465	Sputum	KIT
5a	<i>M. fortuitum</i> complex	TMC 1259	Sputum	NIAID
	<i>M. fortuitum</i> complex	Lamsey	Sputum	NIAID
	<i>M. fortuitum</i> complex	Starr	Sputum	NIAID
	<i>M. fortuitum</i> complex	Taylor	Sputum	NIAID
	<i>M. fortuitum</i> complex	16660	Sputum	TRU, QLD
	<i>M. fortuitum</i> complex	79-1404	Sputum	KIT
	<i>M. fortuitum</i> complex	79-1937	Sputum	KIT
5b	<i>M. fortuitum</i> complex	81-160	Sputum	KIT
	<i>M. fortuitum</i> complex	Y.H. Han	Sputum	KIT
7a	<i>M. fortuitum</i> complex	79-1936	Sputum	KIT
8a	<i>M. fortuitum</i> complex	11997	Sputum	TRU, QLD
8b	<i>M. chelonae</i>	TMC 1544	Sputum	NIAID
9a	<i>M. smegmatis</i>	79-1405	Sputum	KIT
	<i>M. smegmatis</i>	81-164	Sputum	KIT
	<i>M. smegmatis</i>	K.M. Lee	Sputum	KIT
	<i>M. smegmatis</i>	Y.H. Lim	Sputum	KIT
10a	<i>M. chitae</i> , Kanazawa strain	80-677	Sputum	KIT
10b	<i>M. lactae</i>	79-1052	Sputum	KIT
11a	<i>M. thamnopheos</i>	80-535	Sputum	KIT
	<i>M. thamnopheos</i>	80-539	Sputum	KIT
	<i>M. thamnopheos</i>	Y.S. Park	Sputum	KIT
	<i>M. thamnopheos</i>	T.H. Park	Sputum	KIT
12a	Unidentified	C.S. Park	Sputum	KIT
12b	Unidentified	H.S. Kang	Sputum	KIT

^aPresumptive species belonging to each cluster were based on the numerical taxonomic analysis of rapidly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy (Kubica et al., 1972; Saito et al., 1977; Tsukamura, 1981; Tsukamura et al., 1983).

^bCUCM: Chung-Ang University College of Medicine, KIT: The Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIH, USA, TRU, QLD: Tuberculosis Research Unit, Department of Public Health, Queensland, Australia.

키기 때문에 mycobacteria의 세균집락형의 관찰과 균종의 동정에 유용하다는 것을 보고하였다^{1, 2, 4}. 그러나 저자들은 7H10-crocin배지에 결핵균 이외의 기타 mycobacteria를 선상배양하여 세균집락형을 조사한 결과 일부 균종은 세균집락양이 많은 배양면위에서는 세균이 증식되지만 집락양이 적은 배양면위에서는 세균의 증식이 억제되어 집락이 관찰되지 않는다는 사실을 알았다⁴. 반대로 7H10-crocin배지에서 발육이 왕성한 균종은 집락이 밀집된 배양면 위에서는 물론 분리된 배양면 위에서 여러 가지 집락형태를 나타내기 때문에 전형적인 집락형을 결정하기가 어려웠다. 이러한 현상은 세균개체 (clone) 간의 집락변이와 세균개체 또는 집락간의 상호간섭현상에 의한 것으로 추정된다.

그러므로 저자들은 선상분리배양에서 관찰되는 동일균종의 균체단일개체(single clone)간의 유전적 또는 비유전적 성장변이(SR 변이)와 독성 및 약제내성변이 및 집락간의 간섭현상에 의한 집락형의 차이를 막기 위한 집락배양법으로서 다수의 클론(multi-clone)을 침자배양(비분리배양법)하여 균체상호간의 간섭작용 또는 상호협동작용하에서 성장하는 거대집락의 특이성을 검토하였다.

거대집락 시험에 의한 각종 mycobacteria의 형태학적 특이성을 조사하기 위한 목적으로 우선 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis-bovis* complex)이외의 기타 mycobacteria IV군(신속발육균)에 속한 *M. fortuitum-chelonae* complex를 포함한 10개 균집합체에 속한 28개 균주의 균체를 3mm 루프로 취하여 7H10-crocin한천평판 배지에 침자한 다음 35°C에서 12일간 배양하면서 성장속도(집락의 크기), 집락의 형태 및 집락의 색소생산을 비교한 결과 병원성 *M. fortuitum-chelonae* complex가 다른

균집합체로부터 감별될 수 있는 특이적 집락형태를 나타냈으므로 이에 보고한다.

재료 및 방법

1. Mycobacteria

1974년부터 1984년까지 대한결핵연구원에서 결핵환자 또는 유사결핵환자의 격담으로부터 분리된 mycobacteria VI군(신속발육균)과 National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH, USA와 Tuberculosis Research Unit, Department of Public Health, Queensland, Australia에서 분양받은 *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex의 표준균주를 포함한 28개 균주를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 균주는 단일균체(clone) 분리배양을 얻기 위하여 각 균체를 TB broth (Difco)에 접종하여 35°C에서 1주일간 배양한 다음 7H10 한천평판에 선상도말하여 35°C에서 2주일간 배양하였다. 이어서 각 평판배지에 발육된 대표적 단일집락을 선별하여 Lowenstein-Jensen (L-J) egg배지에 이식한 다음 35°C에 2주일간 증균배양한 것을 5°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

각 균주는 먼저 연구에서 5개 시험특성(5-test characters)을 이용한 간이생물학적 성장시험⁵에 의하여 12개 균집합체로 분류되었으며, 28개 균주는 10개 균집합체에 속하였다. 이 실험에 사용된 균주의 균집합체, 추정되는 균종 및 분리된 검사물과 분양처는 Table 1과 같다.

2. 세균배지

Middlebrook 7H10 한천배지(Difco)를 기본배지로 하여 glycerol은 추가했으나 OADC는 추가하지

Table 2. Colonial morphology of scotochromogenic stains of rapidly growing mycobacteria on 7H10-crocin agar medium^a

Cluster number	Suspected species	Strain	Colony form	Colony morphology		
				Internal structure	Margine	Elevation
1a	<i>M. phlei</i>	75-432	Gravis	R, Round with complex	Undulate	Raised
		KO Rho	Mitis	R, Round with radiation	Erose	Raised
3a	<i>M. aurum-neoaurum-vacciae</i> complex	MY Lee	NG	NG	NG	NG
4a	Unidentified	SU Chee	Mitis	S, Round with wrinkled center	Entire	Umbonated
4b	Unidentified	80-465	Mitis	S, Round	Entire-angular	Domed

NG: Visible colony was not observed

^aScotochromogenic indicates yellow pigmentation of colony on 7H10-crocin agar plates

않고 대신 crocin색소액을 추가한 7H10-crocin 한천배지를 사용하였다. 즉, 7H10 기본배지를 0.5% glycerol 과 1% 치자 수용액을 "Spectronic 20"를 이용하여 600nm에서 OD=0.02의 crocin색소를 함유하도록 농도를 조절한 증류수에 용해하였다. 이것을 15Lbs에서 15분간 멸균한 다음 90mm페트리 접시에 20ml씩 분주하여 약 6mm 두께의 평판배지를 만들었다. 평판배지는 제조후 5°C에 보존하면서 1주일 이내에 사용하였다.

3. 세균침자배양

세균집락이 거대집락형으로 성장하도록 하기 위하여 배양기 안에서 미리 건조시킨 7H10-crocin 평판배지를 4구획으로 나눈다음 각 구획의 중앙에 L-J egg사면배지에 발육된 균체를 직경 3mm 멸균 루프로 한루프씩 취하여 약 3mm 깊이로 침자하여 세균을 접종하였다. 접종이 끝난 평판배지는 배양 기간에 배지가 건조되는 것을 막기 위하여 종이테이프로 잘 밀봉한 다음 35°C 배양기에서 12일간 배양하였다.

4. 거대집락의 형태관찰

거대집락의 관찰은 배양 제 4일, 제 7일 및 제 12일에 집락의 크기, 집락의 형태(내면의 조면성, 융기 및 집락변연의 만곡성) 및 집락의 색소침착을 조사하였다.

세균집락의 크기는 집락의 장경과 단경을 micro-caliper로 측정하여 평균치를 구하였으며, 배양 제 12일에 직경이 10mm 이상되는 것을 대형집락형(*gravis*), 6.0~9.9mm 범위내의 집락을 중형집락형(*intermedius*), 그리고 5.9mm 이하의 집락을 소형집락형(*mitis*)으로 분류하였다.

성 적

1. 색소생산-균집합체의 집락형태

7H10-crocin한천배지에서 황색색소를 생산하는 균집합체 1a, 3a, 4a 및 4b에 속한 균주의 거대집락의 특성은 Table 2와 같다. 토양에서 분리된 균집합체 1a에 속한 *M. phlei* 75-432의 집락의 크기는

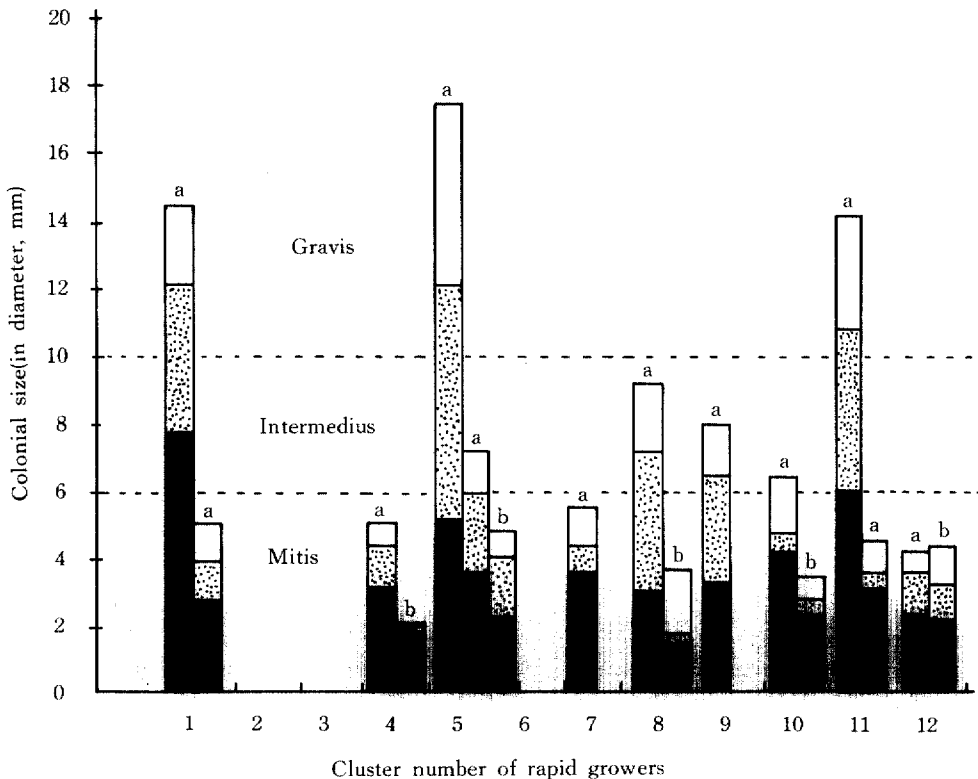


Fig. 1. Colonial size of 12 clusters of rapidly growing mycobacteria at 4 days (■), 7 days (▒) and 12 days (□) culture at 35°C. *Gravis*: ≥ 10 mm, *Intermedius*: ≥ 6.0 mm, and *Mitis*: ≤ 5.9 mm in diameter of colony size at 12 days culture. Cluster number was classified by simple biological tests, according to method described by Choi et al.,(1985).

Fig. 2. Giant colonies of different clusters of rapidly growing mycobacteria stab-cultured into 7H10-crocin agar plates and cultured at 35°C for 12 days. $\times 3.7$. Note the "round straw-mat-shaped" gravis colony (R) of cluster No. 1a or *M. phlei* strain 75-432 and mitis colony(R) of the same cluster strain KO Rho. Umbonated mitis colony(S) of cluster No. 4a strain SU Chee and domed mitis colony(S) of cluster No. 4b strain 80-465. "Mushroom-shaped" gravis colonies(R) of cluster No. 5a or *M. fortuitum* complex strain TMC 1529(top of middle) and Ramsey(bottom). "Flower-shaped" intermedius colonies(R) of cluster No. 5a strain 16660(top of right) and cluster No. 8a strain 11997(bottom of right), and mitis colonies(S) of cluster No. 5a strain Starr(2nd of right) and Taylor(3rd of right). Mitis colonies of cluster No. 5b strain 81-160 (irregular margin) and strain YH Han(wavy margin) and mitis colony(S) of cluster No. 7a strain 79-1936. Note the "rhizoid" and heaped up "hilly" mitis colony(SM) of cluster No. 8b or *M. chelonae* strain TMC 1544.

배양 제 4 일에 7.85mm, 제 7 일에 13.25mm, 제 12 일에 15.25mm로서 대형집락형(R)이었으며, 집락은 전체가 많은 복합체(complex)로 구성되어 마치 "짚방석"(straw-mat shaped) 또는 "국화꽃"(chrysanthemum-shaped)모양을 나타냈으며, 집락의 색깔은 회황색을 정하였다(Fig 2 참조). 객담에서 분리된 균집합체 1a에 속한 다른 한균주(K.O. Rho)는 배양 제 12일에 집락의 크기는 5.07mm로서 소형집락형(R)이었으며, 방사성으로 뻗은 줄무늬가 있고, 변연부는 엷상이었다(Fig. 2 참조). 균집합체 2군에 속한 사용균주는 없었으므로 집락형은 알 수 없었으며, 균집합

체 3a군에 속한 분리균주(M.Y. Lee)는 이 배지에서 증식되지 않았다. 균집합체 4a에 속한 한분리균주(S.U. Chee)는 배양 제 12일에 집락의 크기는 5.0mm로서 소형집락형(S)으로 발육했으며, 중앙에 주름잡힌 균색(cord)이 집결되어 약간 융기(umbonated)되었으며 변연부는 비교적 원형이었다. 균집합체 4b에 속한 분리균주(80~465)는 배양 제 12일에 집락의 크기가 단지 1.8mm로서 왜소집락형(S)을 나타냈으며, 중앙이 무덤모양으로 심히 융기(heap-up)되었고, 변연부는 5~6각형이었다.

Table 3. Colony size of *M. fortuitum-chelonei* complex on 7H10-crocin agar medium

Cluster number	Strain	Colony size(mm) ^a		
		4	7	12 days
5a	Gravis			
	TMC 1529	5.70	13.10	17.70
	Lamsey	5.45	11.15	16.60
	Mean	5.58±0.13	12.12±0.98	17.15±0.55
	Intermedius			
	79-1404	6.65±	8.75	9.70
	16660	3.20±	6.90	8.85
	Mean	4.93±1.23	7.83±0.93	9.28±0.43
	Mitis			
	79-1937	3.20	4.55	7.85
	Starr	2.80	4.85	6.63
	Taylor	2.65	4.34	5.10
Mean	2.88±0.23	4.58±0.21	6.53±1.13	
5b	81-160	2.40	4.25	6.00
	YH Han	2.20	3.90	4.38
	Mean	2.30±0.10	4.08±0.18	5.18±0.83
7a	79-1936	3.60	4.90	5.55
8a	11997	2.95	6.95	9.18
8b	TMC 1544	1.40	1.68	3.65

^aColony size was the mean of longitudinal and transverse diameters of giant colony.

Table 4. Colony morphology of *M. fortuitum-chelonei* complex on 7H10-crocin agar medium

Cluster number	Strain	Colony form	Pigmentation	Colony morphology ^a			
				Internal structure		Margin	Elevation
5a	TMC 1529	Gravis	Bluish-white	R,	Round with central complex	Entire	Raised
	Ramsey	Gravis	Bluish-white	R,	Round with central complex	Entire	Raised
	16660	Intermedius	Grayish-white	SR,	Round with radiated wrinkle	Undulate	Raised
	79-1404	Intermedius	Grayish-white	SR,	Round with radiated wrinkle	Undulate	Raised
	79-1937	Mitis	Grayish-white	S,	Concentric	Entire	Hilly
	Starr	Mitis	Grayish-white	S,	Round	Undulate	Raised
	Taylor	Mitis	Bluish-white	SM,	Round	Entire-undulate	Raised
5b	81-160	Mitis	Grayish-white	R,	Longitudinal	Erose	Raised
	YH Han	Mitis	Grayish-white	S,	Round	Undulate	Raised
7a	79-1936	Mitis	Grayish-white	S,	Round	Entire-undulate	Raised
8a	11997	Intermedius	Grayish-white	SR,	Round with radiated wrinkle	Undulate	Raised
8b	TMC 1544	Mitis	Bluish-white	R,	Irregular	Rhizoid	Hilly

^aColony morphology was observed at 12 days culture. R: Rough colony, S: Smooth colony, SM: Smooth mucoid colony and SR: Smooth and Rough colony.

Table 5. Colonial morphology of other clusters of rapidly growing mycobacteria on 7H10-crocin agar medium

Cluster number	Strains	Colony from	Pigmentation	Colony morphology			
				Internal structure		Margine	Elevation
9a	81-164	Intermedius	Grayish-white	R,	Round	Erose	Raised
	79-1405	Intermedius	Grayish-white	R,	Round	Erose	Raised
	KM Lee	NG					
	YH Lim	Intermedius	Grayish-white	R,	Round with radiation	Erose	Raised
10a	80-677	Intermedius	Bluish-white	S,	Round with blue center	Undulate	Raised
10b	79-1052	Mitis	Yellow-orange	SM,	Round	Entire	Raised
11a	80-535	Gravis	Grayish-white	R,	Round with concentric center and marginal radiation	Lobate	Raised
	80-539	Gravis	Grayish-white	R,	Round with concentric center and marginal radiation	Lobate	Raised
	YS Park	Mitis	Bluish-white	S,	Round with bluish center	Entire-undulate	Raised
	TH Park	Mitis	Bluish-white	S,	Round with bluish center	Entire-undulate	Raised
12a	CS Park	Mitis	Bluish-white	S,	Round	Entire	Raised
12b	HS Kang	Mitis	Brownish-white	S,	Round	Entire	Raised

2. *M. fortuitum-chelonei* complex의 집락형태

균집합체 5a, 5b, 7a, 8a 및 8b에 속한 *M. fortuitum-chelonei* complex 12개 균주의 거대 집락의 크기와 집락의 특성은 Table 3 및 Table 4와 같다.

즉, *M. fortuitum* complex 5a에 속한 7개 균주 중에 2주(TMC 1529 및 Lamsey)는 대형 집락형(R)으로, 2주(79-1404 및 16660)는 중형 집락형(S.R)으로, 그리고 3주(79-1937, Starr 및 Taylor)는 소형 집락형(S 또는 SM)으로 성장하였다.

대형 집락형은 중앙부위에 부정형의 복합체를 갖고 변연부는 비교적 원형이었다. 사진상으로도 그 형태는 마치 “버섯”(mushroom-shaped)모양을 나타냈으며, 집락의 색깔은 청백색을 정하였다. 중형 집락형(S.R)은 방사성으로 주름잡힌 융기선을 갖고 있었다. 변연부는 파상(wavy)이었으며, 집락의 색깔은 회백색을 정하였다. 사진상으로도 집락은 “꽃잎”같이 보였다. 소형 집락형은 평활하고 점액성의 습윤한 S 또는 SM 집락으로서 변연부는 원형에 부분적 파상 또는 분엽상이었다. Taylor가 청백색을 정하는 것을 예외로하고 나머지 균주는 모두 회백색을 정하였다. 균집합체 5b에 속한 81-160과 Y.H. Han은 소형 집락형(S.R)으로서 변연부는 파상 또는 분

엽상이고 집락의 색깔은 역시 회백색이었다. 균집합체 7a 및 8a는 5a에서 관찰되는 중형 집락과 같은 특성을 나타냈다. 한편 균집합체 8b에 속한 *M. chelonei* TMC 1544의 집락은 소형 집락형(R)으로 수지상의 융기된 집락이 “(rhizoid hilly)” 특이적이었다.

3. 기타 균집합체의 집락형태

7H10-crocin배지에서 황색색소를 생산하지 않은 기타 균집합체 9a, 10a, b, 11a, b 및 12a, b의 거대 집락의 특성은 Table 5와 같다.

균집합체 11a에 속한 4개 균주 중에 2개 균주는 대형 집락형(R)을 나타냈으며 9a에 속한 3주 모두와 10a에 속한 1주는 중형 집락형(R 또는 S)을 나타냈다. 균집합체 11a의 한주와 12a, b 각 한주는 모두 공통적 형태를 갖는 소형 집락형(S)을 나타냈다. 균집합체 11a에 속한 대형 집락은 집락의 중앙에 집결된 축색이 환상고리에 둘러싸이고, 이 환상고리에서 시작하여 변연부까지 함몰된 도랑(trough)이 연결되어 마치 중앙분화구에서 흐르는 하천과 같은 형태를 나타냈다. 사진상으로는 마치 분엽상의 “수술을 갖는 꽃잎”의 형태로 나타났다. 또한 각 분엽위에는

Fig. 3. Giant colonies of different clusters of rapidly growing mycobacteria stab-cultured into 7H10-crocin agar plates and cultured at 35°C for 12 days. ×3.7. Note the intermedium colonies(R) of cluster No. 9a strain 81-164(top) and strain 79-1405(bottom), intermedium colony(S) of cluster No. 10a strain 80-677, mitis colony(SM) of cluster No. 10b strain 76-1052, “flower-shaped” gravis colonies(R) with central stamens and acircular band of cluster No. 11a strain of 80-535(top) and strain 80-539(bottom of right), and mitis colonies(S) of the same cluster strain YS Park(top) and strain TH Park(bottom). Mitis colonies(S) of cluster No. 12a strain CS Park and cluster No. 12b strain HS Kang.

섬세한 흰색무늬가 마치 종의 형태를 나타내고 있다. 소형집락형으로 나타난 기타 균집합체 11a에 속한 균주(Y.S Park 및 T.H. Park), 균집합체 12a(C.S.Park) 및 균집합체 12b(H.S. Kang)는 모두 평활하고 습윤한 S집락형으로서 다른 평활소형집락형들과 형태학적으로 구별하기 힘든 공통적인 형태를 나타냈다. 그러나 집락의 색깔이 12b 균집합체가 갈색을 정하는 것을 제외하고 모두 청백색을 정할 뿐 아니라 집락의 중앙부에 국한하여 청자색의 색

소침착이 있는 것이 특이적이었다. 모든 균집합체의 대부분의 평활소형집락형(S)들은 집락의 형태로는 상호간에 감별하기가 어려웠으며 단지 색소생산의 차이에 의하여만 감별되었다(Fig 2 및 3).

고 찰

최근 mycobacteria IV군(신속발육균)에 속한 *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex가 유사체결

핵환자, 창상감염증 및 여러 가지 병원내 감염증환자로부터 자주 분리되고 있을뿐 아니라 각종 항결핵약제에 높은 내성을 나타내기 때문에 치료면에서 이 균종을 검사물속에 흔히 상재하고 있는 다른 비병원성 신속발육균으로부터 신속히 분류동정할 수 있는 간이하고 특이적인 실험실 검사법이 필요하다^{3,7-10}. 실험실 간이검사법으로는 세균집락의 형태에 의한 동정¹¹과 몇가지 생물학적 성상을 이용한 간이생물학적 검사법이 보고되었다^{4,14-16}.

선상분리배양에서 관찰되는 세균집락형은 비록 동일집락에서 발육된 균을 집중균으로 사용한다 할지라도 집락의 형태는 각 단일균체(clone)의 성장변이와 독성 및 약재내성변이 그리고 집락간의 상호작용에 의하여 변화됨으로 부정확한 형태를 나타내는 결점이 있다¹⁴.

그러므로 이 연구에서 저자들은 각각 다른 집락 형태를 나타내는 여러 클론(multi-clone)의 상호간섭 또는 협동작용에 의하여 증식되는 거대집락의 특성을 조사하기 위하여 mycobacteria IV군(신속발육균)의 10개 균집합체를 7H10-crocin 한천평판배지에 천자배양하여 형성되는 거대집락의 성장속도(집락의 크기), 형태 및 색소생산성을 비교하였다.

7H10-crocin 배지에서 황색색소를 생산한 균집합체 1a, 4a, b 중에서 1a에 속한 *M. phlei* 75-432의 거대집락의 형태는 마치 “짚방석”(round straw-mat-shaped)모양의 특이적 대형집락(R)을 나타내고 객담에서 분리된 다른 균집합체들은 형태학적으로 특이성이 없는 소형집락형(S 또는 R)을 나타냈다.

균집합체 5a, b 및 8a에 속한 *M. fortuitum*은 3개 집락형, 즉 “버섯”(mushroom-shaped)모양의 대형집락형(R), “꽃잎”(flower-shaped)모양의 중형집락형(SR) 그리고 특이성이 없는 평활한 소형집락형(S, SR, R)으로 분류되었다. *M. fortuitum*의 대형집락은 이 특이형태에 의하여 균집합체 1a의 대형집락과 균집합체 11a의 대형집락으로부터 쉽게 감별되었다. *M. fortuitum*의 중형집락형도 유일한 집락형으로서 역시 특이적이었다. 소형집락은 형태적으로 1a, 4a, b, 11a, 12a, b의 소형집락과 매우 유사하였으나 색소생산에 의하여 구별되었다. 즉, *M. fortuitum*의 소형집락의 색깔은 청회백색 또는 청백색으로서 색소생산이 집락전체에 균등하게 착색되어 있는 반면 균집합체 1a와 4a, b의 집락은 색깔이 황색을 정하였으며 균집합체 11a, 12a, b는 청백색의 색소가 집락의 중앙에만 침착되어 있어서 색소생산에 의하여 상호간에 감별되었다.

균집합체 5a, b 및 8a에 속한 *M. fortuitum*의 10개 균주중에 미국 NIH에서 분양받은 TMC 1529

와 Lamsey만이 대형집락형을 보이고 호주의 Queensland결핵연구소에서 분양받은 2개 균주(16660과 11997)가 모두 중형집락을 나타냈으며, 국내의 유사폐결핵환자의 객담에서 분리된 균주 4주중 단지 1주가 중형집락을 나타내고 나머지 3주가 모두 소형집락형을 나타내는 것으로 보아 집락형의 분포가 지역간의 차이 그리고 실험실에 오래동안 제대함에 의하여 영향을 받지않나 하는 의심을 갖게 하였다. 그러나 NIAID에서 분양받은 2개 균주 Starr와 Taylor은 폐결핵환자의 객담에서 분리된 후 약 20년간 실험실에서 제대되었음에도 불구하고 거대 집락의 형태가 여전히 평활한 소형집락형을 나타내는 것으로 보아 지역간의 거대 집락형분포의 차이와 단일클론이 배양기간에 성장변이로 인한 SR 집락 변이는 있을 것으로 추정되지만, 배양 또는 계대기간이 길어짐에 따라 평활집락이 모두 조면집락으로 바뀌거나 대형집락으로 바뀌지는 않는 것같이 생각된다.

그러나 *M. fortuitum*의 대형집락은 모두 조면집락형(R형)이고 소형집락은 모두 평활집락형(S 또는 SM형)인데 반하여 중형집락이 S.R형을 나타낸 것으로 보아 중형집락이 중간형으로 추정되었다. 그러나 *M. fortuitum*이 환자로부터 처음 분리된 때부터 분리균주는 모두 S형 아니면 R형으로 나타나는 성적으로¹²⁻¹⁴ 보아 S형과 R형의 집락형의 차이는 역시 병원성결핵균이 모두 R형인 것과 같이 *M. fortuitum*의 집락형차이는 병원성과 깊은 관계가 없는 것으로 생각된다.

한가지 흥미있는 관찰은 거대집락의 내면이 조면집락(R)형의 클론에서 증식된 거대집락은 역시 모두 R형의 대형집락형을 나타냈으며, 평활집락(S)형의 클론에서 증식된 거대집락은 모두 S형의 소형집락형으로 발육되었다는 사실이다. 또한 성적에는 없으나 거대집락형의 특이적 형태가 균주에 따라 세가지 형으로 일정하게 나타났다는 점이다. 이 성적으로 보아 거대집락의 형태와 S.R형은 우세한 집락형에 의하여 결정된다는 것을 의미한다. 거대집락의 크기가 중간형일 때는 S.R형의 특성을 나타냈는데 이것은 S.R형의 클론수가 상호비슷하거나 발육이 상호우세하기 때문일 것으로 추정된다.

균집합체 8b에 속한 *M. chelonae* TMC 1544는 실험에 사용된 10개 균집합체 중에서 유일한 특이적 집락형태를 보인 균종이었다. 즉 거대집락의 형태는 변연부는 수지상(“rhizodes”)으로 불규칙하고, 내면은 윤활하고 점조한 S형이지만 언덕과 같이 움기(heaped up)되어 마치 바다가운데에 우뚝 솟은 섬과같은 집락형을 보이는 점으로 보아 7H10-crocin

배지에 대하여 우성(eugonic)균주에 속한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 실험에 사용된 균주가 단지 한주에 불과하므로 이 집락형이 *M. chelonae*의 전형적 거대집락형인지 아닌지에 대하여는 앞으로 더 많은 균주를 이용하여 추시되어야 할 것이다.

이 연구에서 각 균집합체의 단일클론(single clone)에 의하여 만들어지는 일반 집락형과 많은 클론(multi-clones)에 의하여 만들어지는 거대집락형 간에 발육속도와 집락형태의 특성은 자세히 비교되지 않았으나 거대집락시험이 분리단일집락시험보다 기타 mycobacteria IV군(신속발육군)에 속한 각종 균종 또는 균집합체의 동정에 훨씬 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

이상의 성적을 종합하여 볼 때 7H10-crocin 배지를 이용한 거대집락 시험(giant colony test)은 배양이 간단하고 한개의 배지에 최소한 4주를 검사할 수 있는 경제성이 있으므로 유사폐결핵환자에서 분리되는 *M. fortuitum-chelonae* complex를 포함한 신속발육군의 집락의 특이적 형태에 의하여 각 균종을 동정하고 집락형의 분포에 의한 역학조사를 위한 간이실험실 검사법으로 이용될 수 있다고 사료된다.

결 론

결핵균 이외의 기타 mycobacteria IV군(신속발육군)에 속한 *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex를 포함한 10개 균집합체를 거대집락의 형태에 의하여 분류동정할 수 있는지를 조사하기 위한 목적으로 10개 균집합체를 치자의 수용성 추출액을 함유하는 Middlebrook 7H10 한천배지(7H10-crocin 배지)에 침자배양(비분리배양법)하여 거대집락의 특성을 조사하였다. 1979년부터 1984년까지 유사폐결핵환자의 객담에서 분리된 균주와 실험실에 보존된 표준균주 28개 균주를 먼저 간이생물학적 성상 검사에 의하여 12개 균집합체로 분류하였으며, 각 실험균주가 속한 10개 균집합체의 거대집락의 크기, 형태 및 색소생산성을 비교하였다. 연구의 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 7H10-crocin 배지에서 황색색소를 생산한 기타 mycobacteria IV군의 균집합체 1a, 4a, b중에 1a에 속한 *M. phlei*는 특이적인 회황색의 “짚방석”(round straw-mat-shaped)모양의 대형집락형(R)을 나타냈으며, 다른 균주들은 황색의 공통적 소형평활집락형(S)을 나타냈다.

2. 균집합체 5a, b 및 8a에 속한 *M. fortuitum* complex는 청백색의 “버섯”(mushroom-shaped) 모

양의 대형집락형(R), 회백색의 “꽃잎”(flower-shaped)모양의 중형집락형(S.R) 및 회백색의 공통적 소형평활집락형(S, SM)으로 분류되었다. 균집합체 8b에 속한 *M. chelonae*는 특이적 수지상의 산형집락 “rhizodes” colony을 나타냈다. *M. fortuitum-chelonae* complex의 배가지 집락형중에 대형, 중형 및 산형 집락은 특이적이었으며 공통적 소형평활집락은 단지 색소생산성에 의하여만 감별될 수 있었다.

3. 7H10-crocin 배지에서 황색색소를 생산하지 않은 기타 균집합체 7a, 9a, 10a, b, 11a 및 12a, b에 속한 균주는 11a 균집합체가 집락의 중앙에 균색이 환상고리에 둘러싸여 마치 “꽃수술이 있는 꽃잎”모양의 대형집락형(R)과 공통적 평활소형집락형(S)으로 분류되었으며 기타 균집합체는 모두 공통적 소형집락형(S)을 나타냈다. 그러나 11a, 및 12a, b의 청백색의 평활소형집락은 색소침착이 집락의 중앙에 국한하여 청자색으로 착색되는 것이 특징적이었다.

이 성적은 7H10-crocin 한천배지를 이용한 거대집락 시험은 *M. fortuitum-chelonae* complex의 동정을 위한 보조적실험실 검사법으로 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

참 고 문 헌

- 1) 봉만전, 정상인, 최철순, 양용태: 치자(Gardeniae fructus)의 수용성 추출액(crocin 색소)이 괴혈성세균의 증식에 미치는 영향. 중양의대지, 8: 343, 1983.
- 2) 정상인, 최철순, 양용태: 치자(Gardeniae fructus)의 수용성 추출액첨가배지에서의 각종 세균의 crocin 반응. 중양의대지, 7: 301, 1982.
- 3) Band, JD, Ward, JI and Fraser, DW: Peritonitis due to a *Mycobacterium chelonae*-like organism associated with intermittent chronic peritoneal dialysis. *J. Infect. Dis.* 149: 19, 1982.
- 4) Choi, CS, Chang, JD and Yang, YT: Classification of Mycobacteria Group IV into 12 clusters by combined use of five-test characters and differentiation of *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex (in Korean). *Chung-Ang J. Med.* 10: 281, 1985.
- 5) Choi CS, Kim JH, Yoon YD, Lee HS and Lee TC: Subdivision of opportunist mycobacteria by the difference of pigment production on Löwenstein-Jensen medium containing crocin. *J. Kor. Soc. Microbiol.* 9: 33, 1974.

- 6) Choi, CS, Shin, SS, Chung, SI and Yang, YT: Antibacterial activity of soluble extracts of *Gardenia jasminoides* against mycobacteria other than tubercle bacilli (in Korean). *J. Kor. Soc. Microbiol.* **21** : 53, 1986.
- 7) Dalovisio, JR and Dankey, GA: Problems in diagnosis and therapy of *Mycobacterium fortuitum* infections. *Am. Rev. Resp. Dis.* **117** : 625, 1978.
- 8) Foz, A, Roy, C. and Turado, J: *Mycobacterium chelonae* iatrogenic infections. *J. Clin. Microbiol.* **7** : 319, 1978.
- 9) Gruff, H and Henning, HG: Pulmonary mycobacteriosis due to rapidly growing acid-fast bacillus, *Mycobacterium chelonae*. *Am. Rev. Resp. Dis.* **105** : 618, 1972.
- 10) Hoffman, PC, Fraser, DW and Robicsek, F: Two outbreaks of sternal wound infections due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. *J. Infect. Dis.* **143** : 533, 1981.
- 11) Mitchison, DA: A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *J. Med. Microbiol.* **5** : 165, 1972.
- 12) Ratledge, C and Stanford, J: The Biology of the Mycobacteriae: Physiology, Identification and Classification, Vol. 1, New York, Academic Press, 1982.
- 13) Runyon, EH: Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am. J. Clin. Pathol.* **54** : 578, 1970.
- 14) Runyon, EH, Karlson, AG, Kubica, GP and Wayne, LG : *Mycobacterium*. IN Lennette, EH, Balows, A, Hauslar, WJ Jr: Manual of Clinical Mycobiology, 3rd ed., pp 150-179, Washington, DC. American Society for Microbiology, 1980.
- 15) Vestal, A: Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Washington DC., DHEW Publ. No.(CDC) 76-8230, 1976.
- 16) Yang, SW, Choi, CS, Chung, SI and Yang, YT: Simple biological tests for differentiation of *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex (in Korean). *Chung-Ang J. Med.* **8** : 349, 1983.