

◆ 2주차 : 실험준비, 실험기구 및 실험조운영

1. 실험준비

1.1. 미생물 실험 전에 알아둘 것

미생물 실험은 취급하는 대상이 **눈으로 볼 수 없는 작은 생물이므로**, 미생물의 종류나 취급 방법에 따라 뜻하지 않은 **중대한 결과**를 가져오는 경우가 있다.

즉, 실험의 대상이 되는 미생물이 **병원성 미생물일 때** 부주의하게 다루면 **자신**이 **병원체의 감염**을 받을 위험성이 있을 뿐만 아니라, 주위 사람에게도 **위험을** 주게 되므로 **주의해야** 한다.

또한 미생물 실험에서는 **항상 완전한 무균 조작**이 따라야 한다. 순수 배양 상태로 보존된 균주이거나, 또는 여러 종류의 균종을 포함하고 있는 재료로부터 **목적하는 균주를 분리하여 실험할 경우**, 항상 **특정한 균주만**을 검토할 필요가 있으며, **조잡한 실험조작**으로 인해 **균종이나 균주가 혼입되면** 그 특정균의 성질과 **전혀 다른 결과**를 얻게 되기 때문에 모든 노력이 무의미하게 된다. 따라서 미생물 실험을 할 때에는 **살균과 무균 조작**이 무엇보다도 **중요한** 것이다.

1.2. 미생물 실험자의 자세

앞에서 언급하였듯이, 미생물은 크기가 작아서 **손으로** 만질 수도 없고 **눈으로** 볼 수도 **없다**. 또한 **살아 있는 생물**이기 때문에 **가만히** 두어도 어떤 **작용이** 진행된다. 어떤 미생물은 **사람과 가축에 가벼운 해**를 주거나 **치명적인 타격**을 주는 것도 있으므로, 이와 같은 것들을 다룰 때는 **특별히 주의**해야 한다.

어떤 **미생물**에 대해서 실험할 때는 그 **순수성**을 **유지**하면서 진행하여야 한다. 예를 들어 **잡균**에 **오염**된 것을 모르고 **실험을 진행**하고, 그 실험에서 나온 **결과**를 **새로운 지식**으로 받아들이는 **잘못**을 범해서는 안 된다. 따라서 **무균 조작**의 **기법**을 **원칙대로 철저히 지키고** **기구 사용법**도 바르게 **지켜야** 한다.

특히 **사람과 가축에 해**가 될 수 있는 **균을 다룰** 때는, 미생물이 **외부로 오염**되지 않도록 하고 **실험자의 손**을 **머리, 얼굴**, 특히 **코나 입**에 접촉하지 **않도록** 한다.

실험이 끝나면 **손이나 기구, 시료** 등을 **철저히 세척, 살균, 정리**한다.

1.3. 실험시 주의사항

미생물을 취급하는 실험자는 미생물의 감염 및 오염의 가능성을 항상 염두에 두고 안전한 실험을 위하여 아래 사항을 준수해야 한다.

- 1) 실험실에서는 항상 깨끗한 실험복을 착용한다.
- 2) 실험실과 실험대는 항상 청결하게 유지하며, 오염된 곳은 소독제로 소독한다.
- 3) 실험대는 필요한 도구를 제외하고는 불필요한 물건을 올려 놓지 않도록 한다.
- 4) 실험실 내의 각종 기구는 조심스럽게 취급한다.
- 5) 실험기구 및 약품 등은 깨끗이 정리 정돈한다.
- 6) 실험실 내에서는 잡담과 음식물 섭취를 금지한다.
- 7) 실험 중 실험 재료, 기구, 필기류, 손가락 등 어떤 물건도 절대로 입에 대지 말아야 한다.
- 8) 실험 중 창문이나 출입문을 닫아 공기의 유통에 의한 잡균 혼입에 의한 오염을 방지한다.

- 9) 실험과정 및 내용은 상세히 기술하고, 실험 결과는 사실대로 정확하게 기록 정리한다.
- 10) 실험 중에는 항상 안전에 유의하며 돌발 사고에 대처한다.
- 11) 실험에 사용된 미생물이나 재료, 기타 폐기물을 버릴 때에는 주의하여 지정된 장소에 정해진 방법에 따라 정확하게 처리한다.
- 12) 고형의 폐기물(고체배지, 페트리필름), 액체배지 등은 반드시 멸균하여 폐기한다. 멸균 폐기물 백을 사용한다.
- 13) 실험 후에는 손과 사용한 기구를 깨끗이 씻는다.
- 14) 배양된 균주는 허가 없이 실외로 가지고 나가는 것을 금지한다.
- 15) 실험실 내의 설비, 기구 및 소모품을 사용 후 원상태로 정리, 정돈한다.
- 16) 실험 종료 후 전등, 가스, 수도, 전열기 등이 제대로 정 위치에 원래 상태 대로 처리되어 있는지 철저히 확인해야 한다.

2. 실험 기구

식품 미생물 실험실은 각종 식품 시료로부터 미생물을, 분리 연구하고, 미생물을 무균상태에서 안전하게 보관 배양하며 시험 연구할 수 있는 시설이다. 이러한 업무를 수행하기 위해서는 각 종의 미생물용 실험 기구가 필요하며, 미생물 실험을 성공적으로 수행하기 위해서는 무균 조작 기술을 사용하여, 오염이 발생하지 않도록 상상력을 동원하여 실험 업무를 수행하여야 한다.

미생물 실험의 주요 업무는 미생물의 분리, 배양, 염색, 현미경 관찰, 보관, 이식, 멸균, 생화학 실험 및 실험 폐기물의 안전 처리 등이며, 식품 미생물 실험실에서는 주로 각종의 식품의 시료를 다루는 것이 특징이다. 식품 미생물 실험을 수행하는 데는 다음과 같은 기구들이 필요하다.

2.1. 초차 기구

새로 구입한 초차기구(초차기구)는 비눗물 등의 세제(detergent)를 솔에 묻혀서 기구 내외를 잘 닦은 다음 충분히 수세하여 사용한다.

한 번 사용한 기구는 물에 담가서 끓인 다음 수세하여 쓰도록 한다.

초차기구에는 많은 종류가 있으나 가열멸균이 반복되므로, 모두 경질의 초차제품을 사용하는 것이 안전하다.

1) 시험관 (Test tube)

고체배지나 액체배지를 넣어서 미생물의 보존이나 배양에 쓰인다.

길이 16cm, 지름 1.6cm의 중간 크기의 것이 가장 편리하게 사용되나 실험의 목적에 따라서 크기가 달라진다.

2) 플라스크 (Flask)

모양과 용량이 다른 여러 종류의 Flask가 있으며, 사용 목적에 따라 형태와 크기가 달라진다. 배지의 조제, 미생물의 배양, 기타 각종 반응 실험 등에 사용되고, 보통 미생물의 배양에는 삼각 flask가 많이 쓰인다.

3) 슬라이드 글라스 (Slide glass)와 커버 글라스 (Cover glass)

슬라이드 글라스는 가로 76mm, 세로 26mm, 두께 1.5mm 정도의 직사각형의 유리판이며,

커버 글라스는 가로 18mm, 세로 18mm, 두께 0.15~0.17mm 정도의 정사각형 유리판으로서, 이들은 현미경 관찰을 할 때 이용된다.

4) 배양접시 (Petri dish)

주로 평판 배양에 쓰이며, 지름 8~10cm, 깊이 1.5cm 의 것이 많이 사용된다.

일반적으로 유리제품(Pyrex glass), 이 외에 Ethylene oxide gas로 멸균되어 있는 플라스틱(Plastic) 제품도 있으며, 이것은 곧바로 사용할 수 있고, 사용 후에는 오토클라브(Autoclave)로 멸균하게 되면, 작게 덩어리지게 되므로, 버리기에 편리하다.

5) 피펫 (Pipette)

배지의 조제, 미생물의 이식, 균수의 측정 등에 이용되며, 일정한 용적을 취할 수 있는 **홀피펫**(Whole pipette), 눈금이 있어 **임의 량의 액체**를 취하는데 편리한 **매스 피펫**(Mass pipette), 측정하는 **용적이 극히 미량일 때** 사용하는 **마이크로 피펫**(Micro pipette) 등이 있다.

6) 기타

비어커(Beaker), **깔데기**(Funnel), **눈금 실린더**(Mass cylinder), **뷰렛**(Burette), **도말봉**(Spreader, Conradi bar), **희석병**(Dilution bottle) 등이 사용된다.

각종 시험관 (Test tube)



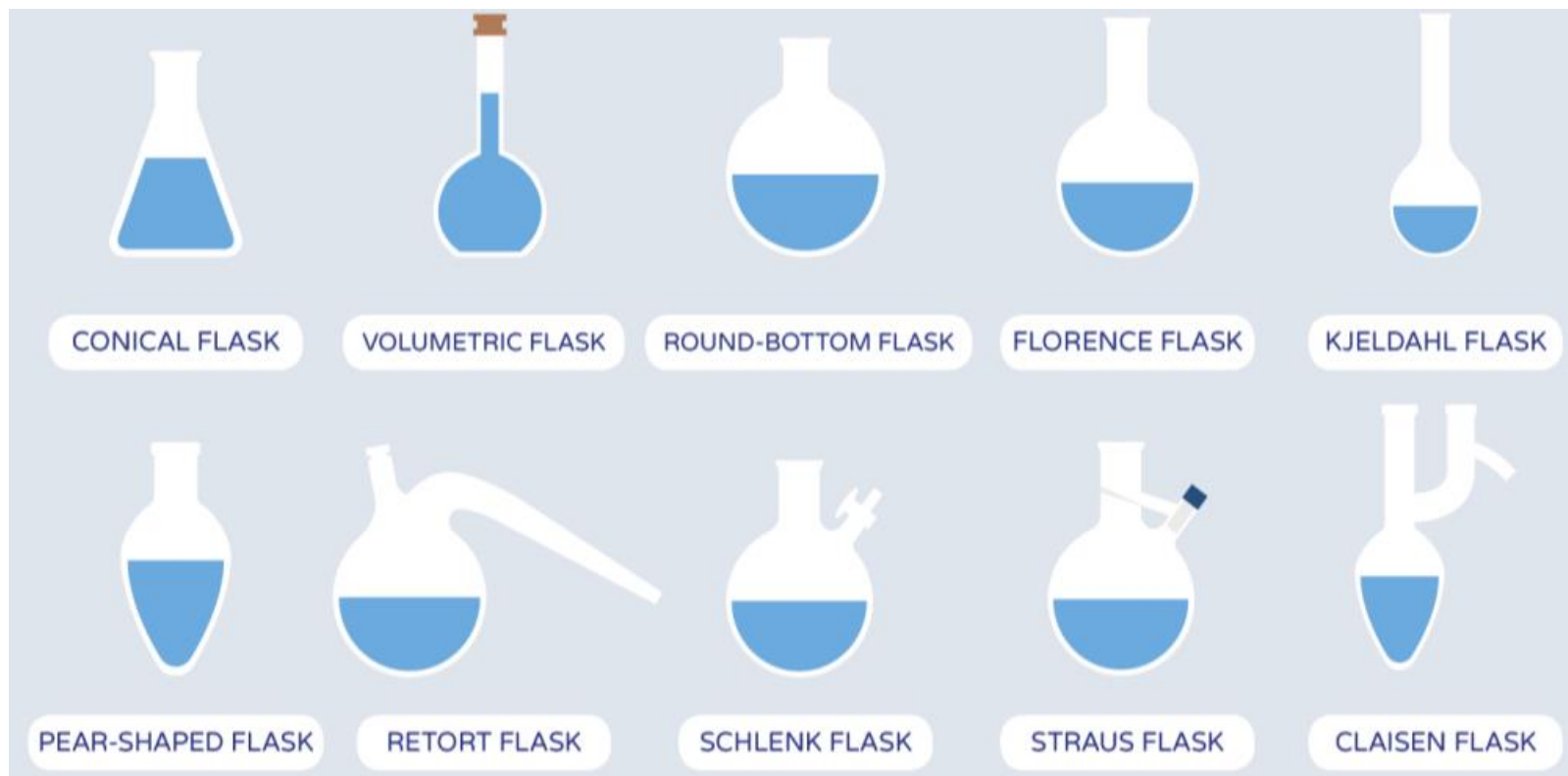
플라스크 (Flasks)



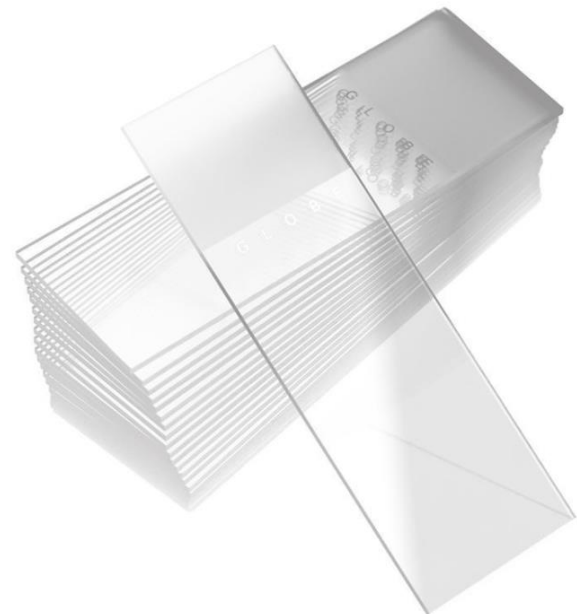
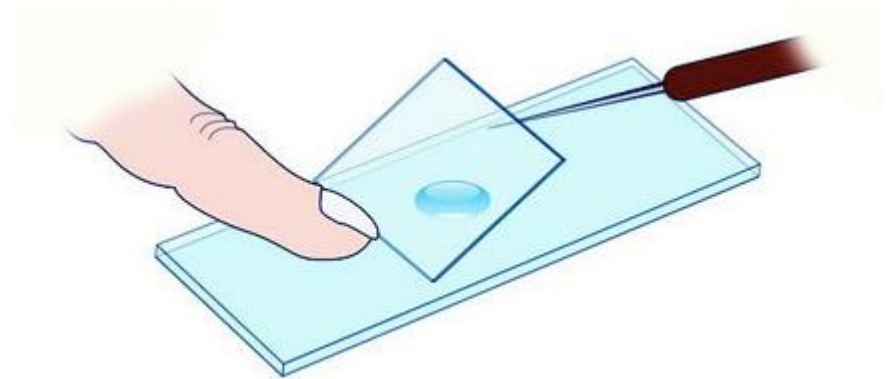
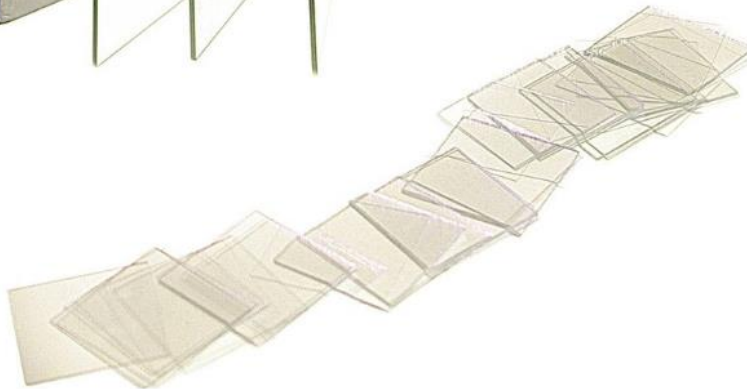
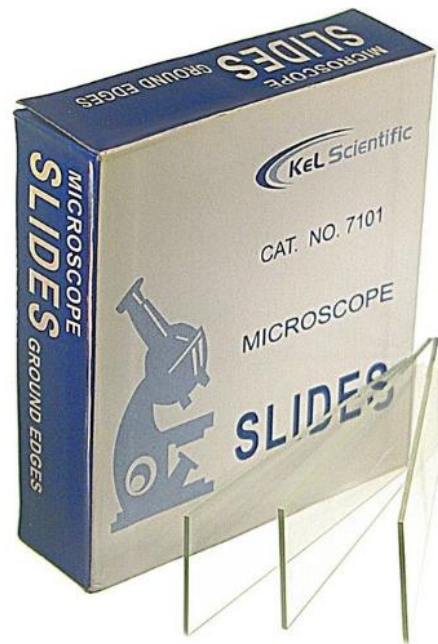
페른바흐 flask



루병 flask



슬라이드 글라스 (Slide glass)
커버 글라스 (Cover glass)



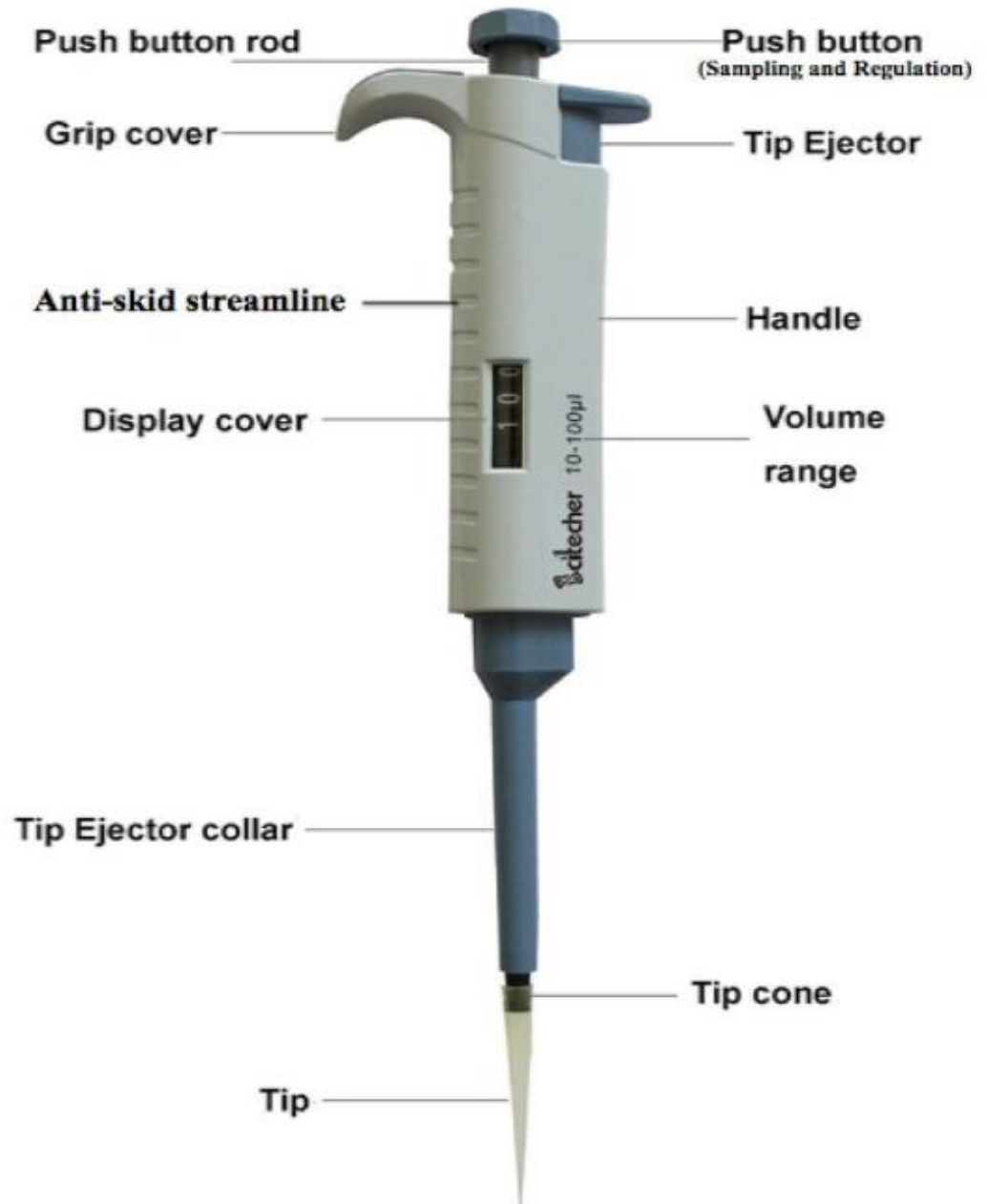
패트리 디시
(Petri dish)



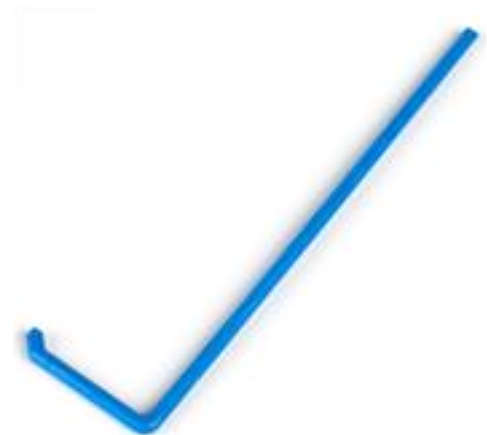
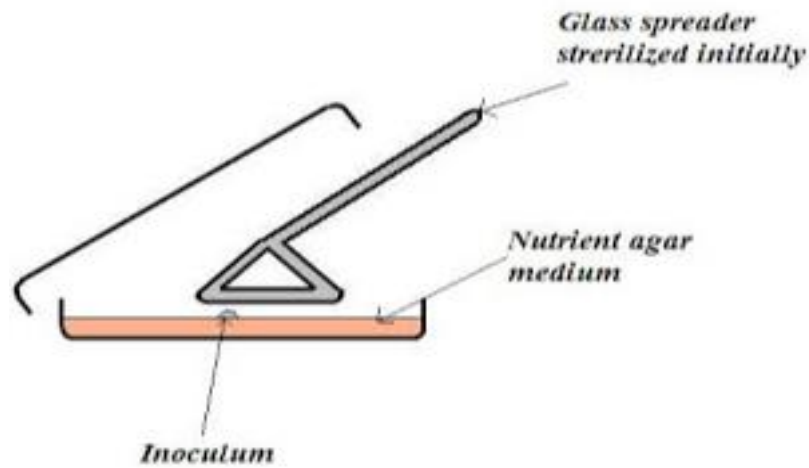
피펫 (Pipette)



마이크로 피펫 (Micro pipette)



스프레다/콘라디봉 (Spreader/Conradi bar)



희석병 (Dilution bottle)



2.2. 접종 기구

1) 백금이 (Loop)

- 중량용 백금이 : 1 백금이의 균액 중량이 2mg이 되도록 만들어진 백금이.

보통 직경 1mm의 백금선을 사용하여, 내경 2~4mm의 백금이를 만들어 Ring 부분에 채워진 균액의 중량이 2mg이 되도록 링크기를 조절한다. 일정 농도의 균액을 제조할 때나 접종균량을 한정하는 실험을 할 때 사용하며, 액체배지, 사면배지, 평판배지 등에 효모나 호기성 세균을 이식 및 도말 할 때 이용한다.

- 표준용 백금이 : 1 백금이 용량이 정해져 있는 백금이. 1/100ml($10\mu\ell$), 1/200ml($5\mu\ell$), 1/300ml, 1/400ml, 1/500ml, 1/1000ml($1\mu\ell$) 등 백금이가 1회용 플라스틱 제품 시판중. 액상물질 속의 균수 측정에 이용.

2) 백금구 (Hook)

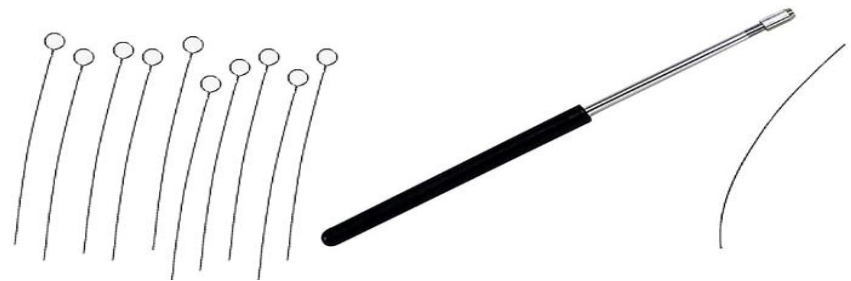
백금선의 앞 끝 2~3mm를 직각으로 구부린 것으로
곰팡이 등의 포자 접종용으로 사용된다.

3) 백금선 (Needle)

직경 약 1mm되는 백금선 또는 니크롬선
(Nichrome)으로 길이 약 5~7cm로 만듦.
주로 혐기성 세균의 고층배지 천자 접종
(Stab inoculation)에 이용된다.



백금이 (Innoculation loop)

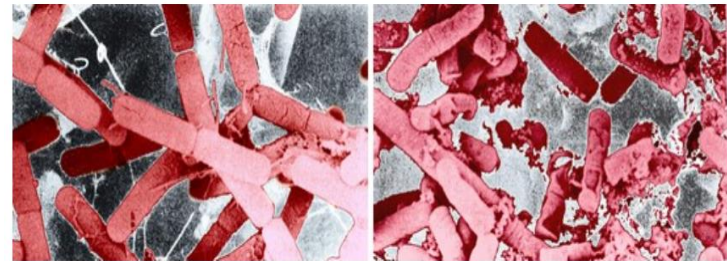


2.3. 실험용 기구

1) 고압증기 멸균기 (Autoclave)

Autoclave는 멸균 온도, 시간 및 배기판이 자동으로 조절되며, Autoclave 내에 고압 수증기를 주입하여, 15PSI (lbs/inch²), 121°C에서 15분간 처리함으로써, 멸균 목적을 이룰 수 있다. 1lbs = 0.454kg

대부분의 미생물 배지나 초자 기구의 멸균에 사용되며, 솜, 종이, 목재, 토양 등의 재료도 멸균할 수 있다.



2) 건열 멸균기 (Dry oven)

Dry oven은 유리 기구류, 금속류 및 도자기류 등의 멸균에 널리 사용되며 150~200°C의 온도를 유지하는 것이 일반적이다.

3) 배양기 (Incubator)

각 종의 미생물 배지를 접종하여 일정한 방법으로 일정한 온도에 유지 보관 함으로써 접종된 미생물의 생장을 유도하기 위한 장치로서 일반 배양기, 진탕 배양기, 연속 배양기 등의 여러 종류가 있다.

일반적으로 곰팡이, 효모는 25~30°C, 세균은 30~37°C에서 배양하므로, 수시로 정확한 온도계를 써서 배양기 온도를 확인해야 하며, 여러 온도를 사용할 때는 각 온도에서 전용 배양기를 사용하는 것이 좋다. 미생물이 접종되는 Petri dish는 4개 이상 포개 놓지 않고, Petri dish 사이는 2.5cm 정도 떼어 놓아서 배지에 온도 전달 잘 되도록 해야 한다.

한편 Petri dish는 배양시 뒤집어 넣어서 Petri dish 내에 수증기가 응축하여 배지 표면에 떨어지는 것을 방지해야 한다.

진탕 배양기는 호기성 세균을 진탕 배양하는 진탕 장치가 부착된 배양기이다. 진탕 장치에는 회전식(Rotating)과 왕복식(Reciprocating)이 있으며, 접종된 액체 배지를 담은 여러 가지 크기의 Flask를 고정하는 홀더(Holder)가 있다.

4) 무균상자 (Clean bench)

무균의 실험대 역할을 하는 것이 Clean bench로서, 깨끗한 공기를 고효율 Filter로 제균하여, Clean bench 안으로 불어 넣고, 외부의 압력보다 높은 Air curtain이 형성되어 있어서, 외부의 오염 공기는 들어가지 못하게 차단되어, 작업대 위의 공간은 무균 상태로 된다.

또한 내부에서 취급하는 미생물이 밖으로 산란되지 않도록 되어 있으므로, 실험자 보호 위해 Clean bench 내에서 미생물을 다루는 것이 좋다. Clean bench에는 대개 초기의 작업대 살균을 위해 자외선 등을 장치하고 있다.

5) 집락계수기 (Colony counter)

Petri dish에 배양한 미생물의 군락의 수를 세는 데에 사용되는 장치로서 확대경을 이용한, 일반적인 평판배지용 Quebec colony counter와 전자식 자동계수기 등이 있다.

6) 항온수조 (Water bath)

항온수조는 주로 멸균한 후에 한천배지를 Petri dish에 붓기 전에 응고하지 않도록 45~50°C에 잠시 보관하는 경우에 많이 사용하며 미생물 배양을 실시할 때에도 많이 사용된다.

굳은 한천배지는 98°C 이상으로 가온 해야만 용해되므로, 굳은 배지를 용해하는 데에는 항온수조를 사용할 수 없으며, 이 때에는 전자오븐이나 Autoclave 사용한다.

7) 광학현미경 (Light microscope)

미생물의 **형태적 특징**을 **관찰**하기 위하여 **광학 현미경**을 **사용**한다.

8) 기타

pH Meter, 저울(Balance), Blender, Magnetic stirrer, Stomacher, Vortex mixer, 온도계, 냉장고 등이 사용된다.

- **스토마커 (Stomacher) :**

미생물 시료 균질기





Magnetic stirrer



Loop & Needle



Blender



Vortex mixer



Slide & Cover glass



Water bath



Dry oven



Incubator



Clean bench

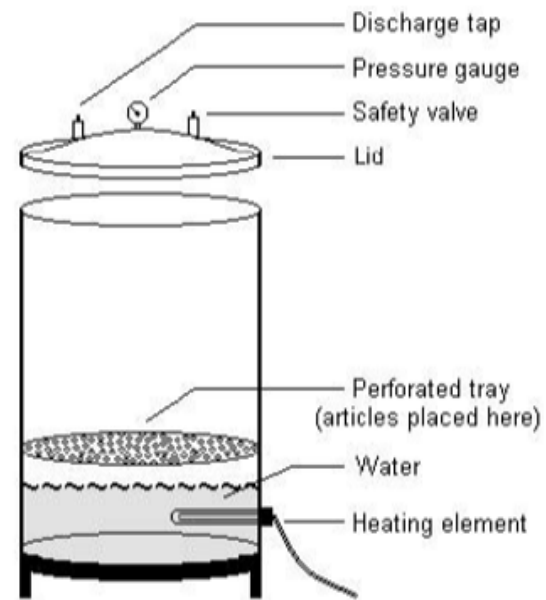


Colony counter



Autoclave

Types of Autoclaves



3. 실험조 운영

A반 실험조		B반 실험조	
1조	이생명, 김효은, 서혜원, 차유하	1조	이제혁, 박정연, 임영아, 김채영
2조	이정환, 오서빈, 안수빈, 윤서연	2조	이준형, 정혜린, 이지수
3조	이대진, 강우진, 임예림, 노현희	3조	유기명, 김혜림, 원지원, 조은진
4조	한상욱, 이해리, 정다은	4조	이택기, 노주연, 김수인
5조	강병인, 유지은, 이은서	5조	이진, 장은서, 이소민, 서예원
6조	박지은, 김경희, 김민	6조	김수린, 김소연, 김아연
7조	이승현, 손다빈, 남혜원	7조	박종은, 유진, 송예림
8조	박혜영, 임정현, 엄하희, 조서연	8조	서예지, 권지은, 조수민

❖ 차주 실험준비

멸균법 - 화염, 건열, 고압증기 멸균법

감사합니다 !

2주차 동영상 수업을 마치며...
다음 주 미생물 실험실에서 뵙겠습니다 !