◈ 5주차 : 미생물 배양법 – 개인위생 미생물

미생물은 토양, 공기, 물, 음식물, 폐수 및 동물의 체내 외 등 **거의 모든 곳에서 발견**된다. 그러나 미생물의 **종류 및 양**은 그 미생물이 서식하는 **물리적, 화학적, 생물학적 환경**에 다라 매우 다르다.

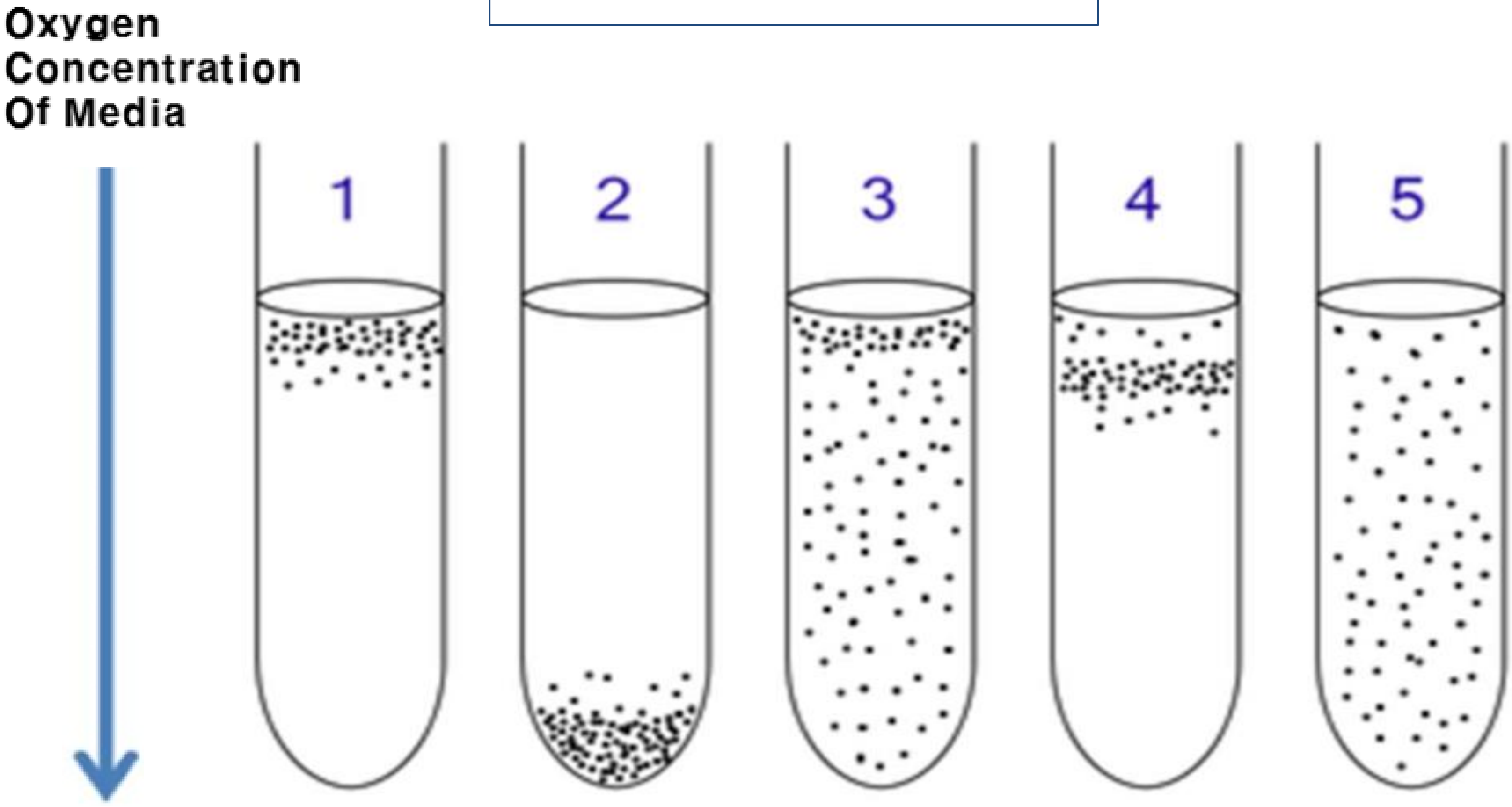
배양(Culture)이란? 미생물 **증식에 적합한 환경**을 인위적으로 조성하여 **미생물을 키우는 것**으로, 연구, 조사, 관리 또는 산업적인 목적으로 미생물을 배양한다.

미생물의 배양에는 **배지, 산소, 온도 등** 여러 가지 물리적, 화학적 및 생물학적 인자들이 관여한다.

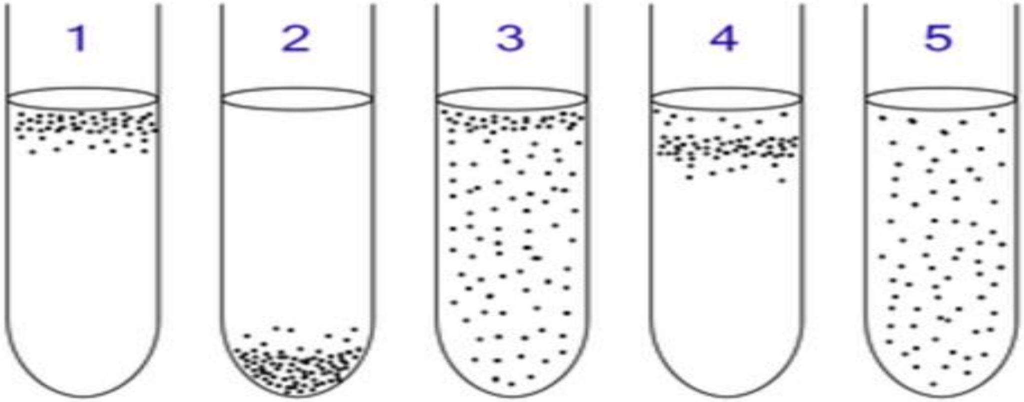
미생물을 배양하는 방법에는 **호기성 배양법(Aerobic culture method)**, **미호기성 배양법(Microaerophilic culture method)**, **혐기성 배양법(Anaerobic culture method)** 등 이 사용된다.

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

미생물 생육과 산소



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다



Aerobic and anaerobic bacteria can be identified by growing them in test tubes of thioglycollate broth:

1: Obligate aerobes need oxygen because they cannot ferment or respire anaerobically. They gather at the top of the tube where the oxygen concentration is highest.

2: Obligate anaerobes are poisoned by oxygen, so they gather at the bottom of the tube where the oxygen concentration is lowest.

3: Facultative anaerobes can grow with or without oxygen because they can metabolise energy aerobically or anaerobically. They gather mostly at the top because aerobic respiration generates more ATP than either fermentation or anaerobic respiration.

4: Microaerophiles need oxygen because they cannot ferment or respire anaerobically. However, they are poisoned by high concentrations of oxygen. They gather in the upper part of the test tube but not the very top.

5: Aerotolerant organisms do not require oxygen as they metabolise energy anaerobically. Unlike obligate anaerobes however, they are not poisoned by oxygen. They can be found evenly spread throughout the test tube.

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

1. 호기성 배양법(Aerobic culture method)

호기성균 및 통성혐기성균을 **공기 환경 하에서 배양**하는 방법이다. 배지의 **건조를 방지**하고 **세균의 오염을 방지**하기 위하여 접종된 **평판을 뒤집어서 배양**한다.

액체배지 배양할 때는 진탕기에서 **진탕 배양**을 하면 산소의 주입이 빨라 세균의 증식이 더욱 왕성해 진다.

대부분의 **세균은 35~37'C**에서 잘 발육하며 **효모, 곰팡이는 25~28'C**에서 배양한다.

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

2. 미호기성 배양법(Microaerophilic culture method)

미호기성 배양법을 시행하는 경우는, 주로 *Campylobacter*의 분리를 위해서 시행한다. *Campylobacter*는 5~10%의 CO2와 5% 전후의 O2 분압 조건이 있어야 발육한다. **특수한 혼합 Gas**(**N2 : CO2 : O2 = 85 : 10 : 5**)를 Jar 내에 주입하여 배양한다. 이와 같은 환경이 될 수 있도록 **가스 발생 봉투가 시판**되고 있다

Campylobacter 박테리아는 지금까지 약20종의 균이 발견되었으며 그 중 **식중독과 관련**된 것은 대부분 ***Campylobacter jejuni*** 에 의해 발생합니다.

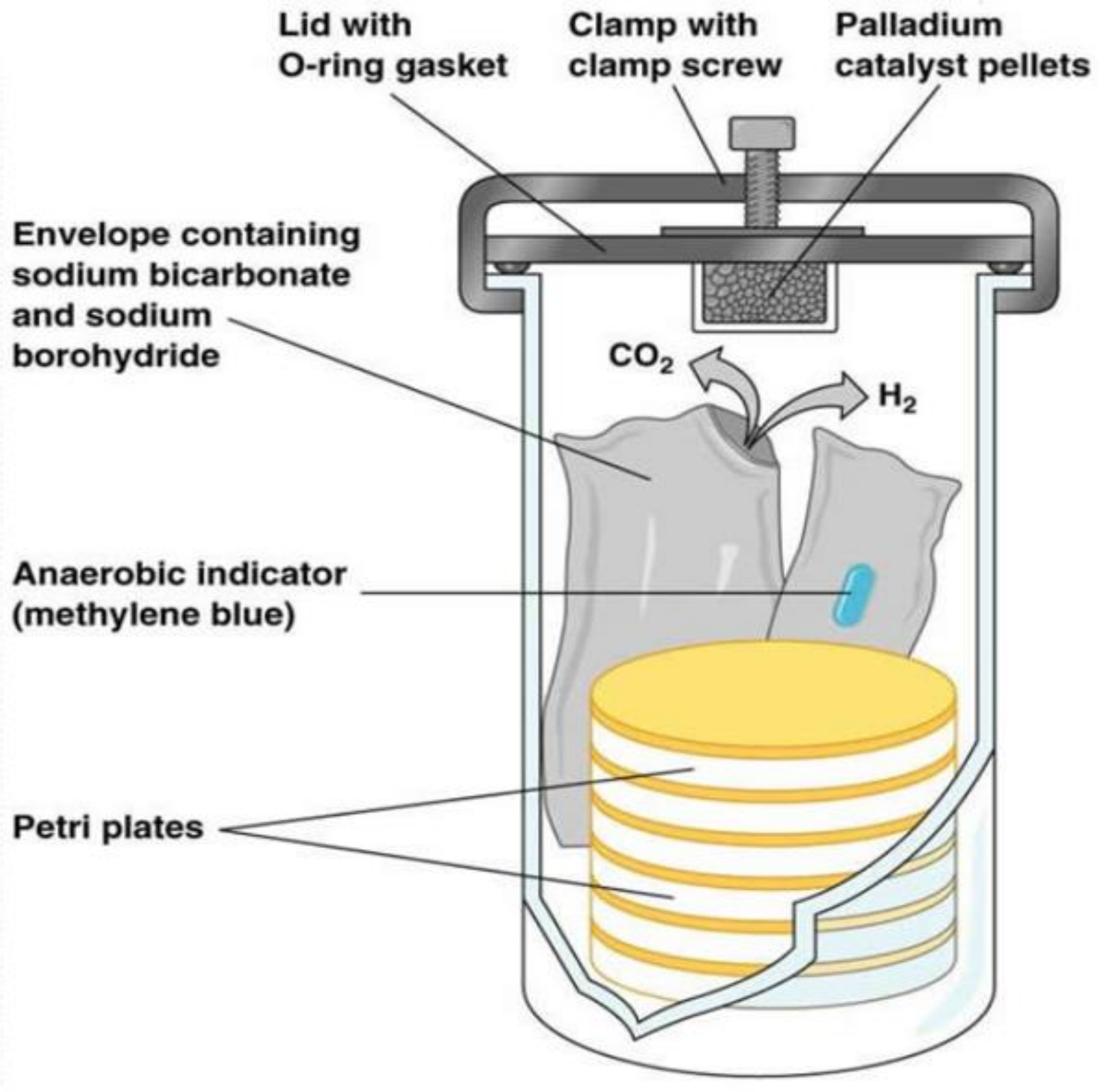
미호기성균 : ***Campylobacter* spp.** ***Borrlia* spp.** ***Helicobacter* spp.**

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

3. 혐기성 배양법(Anaerobic culture method)

편성혐기성 세균의 배양에 이용되는 방법으로는 **Gas-pak 법, 혐기성 Chamber법** 및 **질소Gas 유입법** 등이 있으며, 가장 일반적으로 사용되는 것은 **Gas-pak법**이다. 또한 **탄산가스 배양법**은 5~10%의 CO_2를 포함하는 환경에서 배양하는 방법으로 통성혐기성 배양법의 일종이다. 탄산가스 배양법은 상품화된 **CO_2 배양기**를 이용하거나 **촛불 배양법(Candle jar)**을 이용한다.

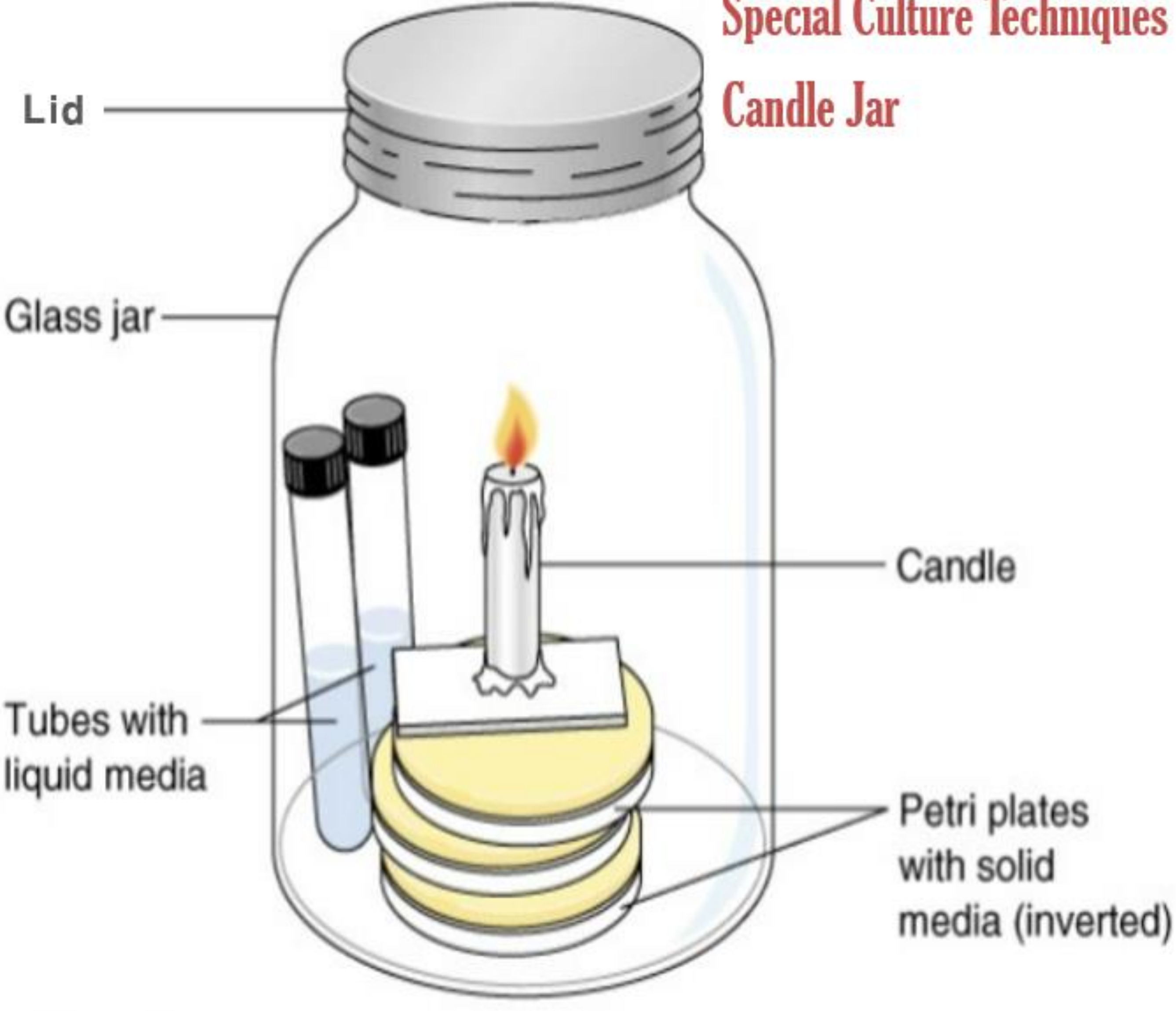
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

Special Culture Techniques

Candle Jar



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

◈ 개인 위생 미생물 배양 – [일반세균 – 호기성 배양법]

Hand Plate Dish 이용, 손바닥 오염 검사

개인의 주위 환경 중, 자신의 **신체의 표면**으로 부터 시료를 채취하여 배양한 후 **평판배지**에 형성되는 미생물의 특징을 관찰한다.

1. 재료 및 기구

1.1 재료 : **Standard Methods Agar (Plate Count Agar)**

1.2 기구 : 핸드플레이트(Hand Plate), 삼각 Flask, Autoclave, Incubator

2. 실험방법

2.1 증류수 250ml을 삼각 플라스크에 부어 줍니다

2.2 증류수 250ml 있는 삼각 플라스크에 배지 5.88g을 넣어 줍니다

2.3 스테인레스 스푼으로 증류수와 배지를 잘 섞어 줍니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

2.4 삼각 플라스크를 오토클레브 121'C, 15분, 15PSI에서 멸균을 실시 합니다

2.5 잘 녹은 배지를 기포가 생기지 않게 천천히 핸드플레이트 디쉬에 주입한다

2.6 오염이 생기지 않도록 핸드플레이트 뚜껑 닫고 응고시킨다.(5~8분 정도 소요)

2.7 잘 굳은 배지에 손바닥을 눌러 찍어 줍니다.

(너무 세게 누르면 배지가 깨질 수 있으니 주의)

2.8 손바닥을 찍은 배지는 뚜껑을 닫고 뒤집어서 36'C에서 24~48시간 배양한다

(온도가 너무 낮거나 높으면 세균증식에 문제 발생하므로 온도관리 유의)

2.9 배양한 배지에 세균이 얼마나 증식하였는지 판독한다.

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

일반세균

Plate Count Agar (A.P.H.A.)

(Standard Methods Agar, Tryptone Glucose Yeast Agar)

NCM0010A / 500g

Formula	Liter
Tryptone	5.0g
Yeast Extract	2.5g
Glucose	1.0g
Agar No.1	15.0g

Description

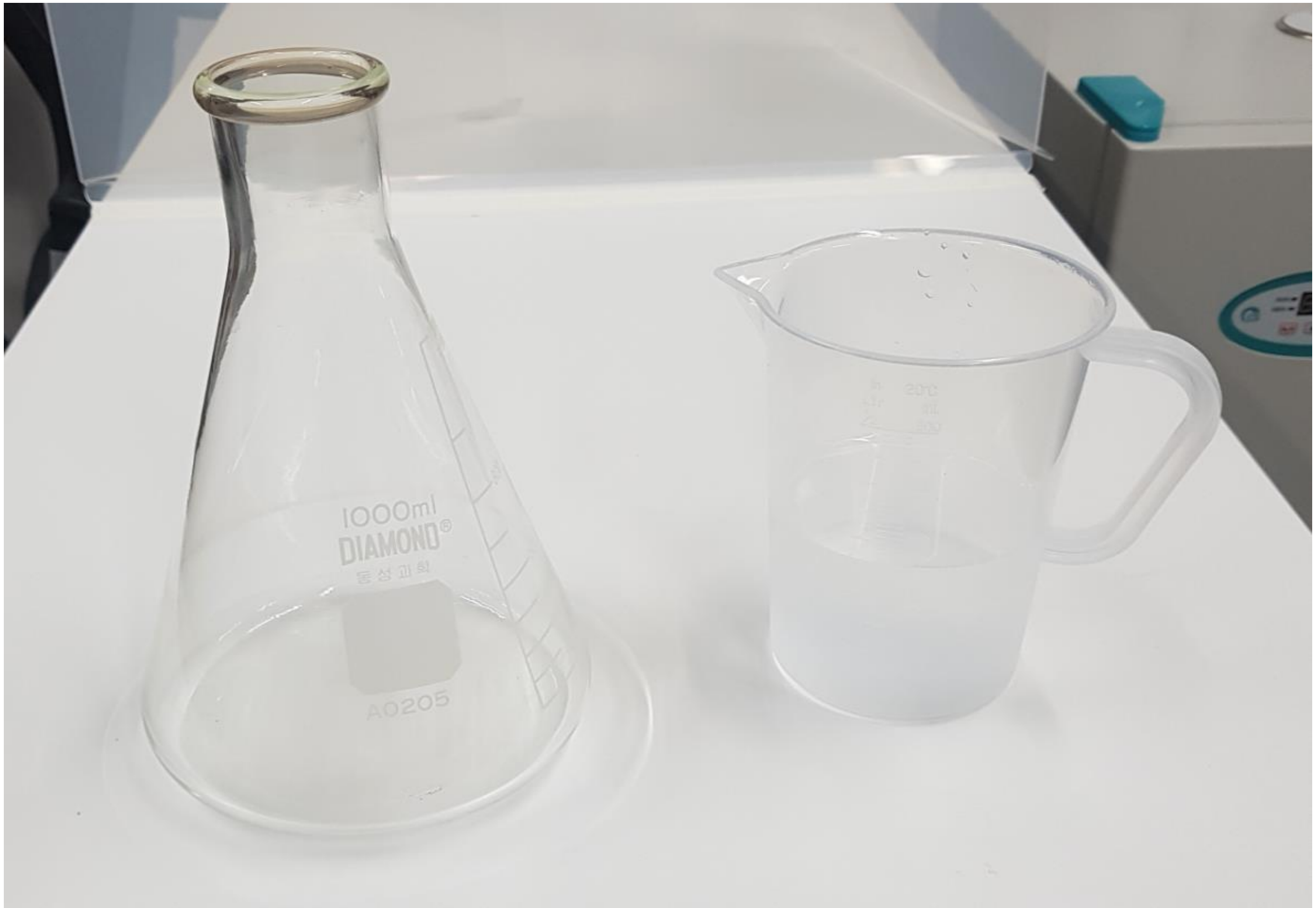
Formulated to A.P.H.A. specifications, this medium is used for establishing total viable counts for aerobes in food, dairy and waterbacteriology.
The product uses agar of very high gel strength in order that it can be used in pour-plate as well as surface inoculationtechniques.
The product can be remelted prior to use although it should not be held for a prolonged period in the molten stage.

Method for reconstitution

Weigh 23.5 grams of powder, disperse in 1 litre of deionised water.
Bring to the boil with frequent stirring to dissolve. Dispense into tubesand sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Cool to 44-46°C for not more than 3 hours prior to use. ROLL-TUBES. Add anadditional 10g/litre Agar No. 1 prior to reconstitution of the medium.

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

1. 증류수 250ml와 삼각 플라스크를 준비합니다

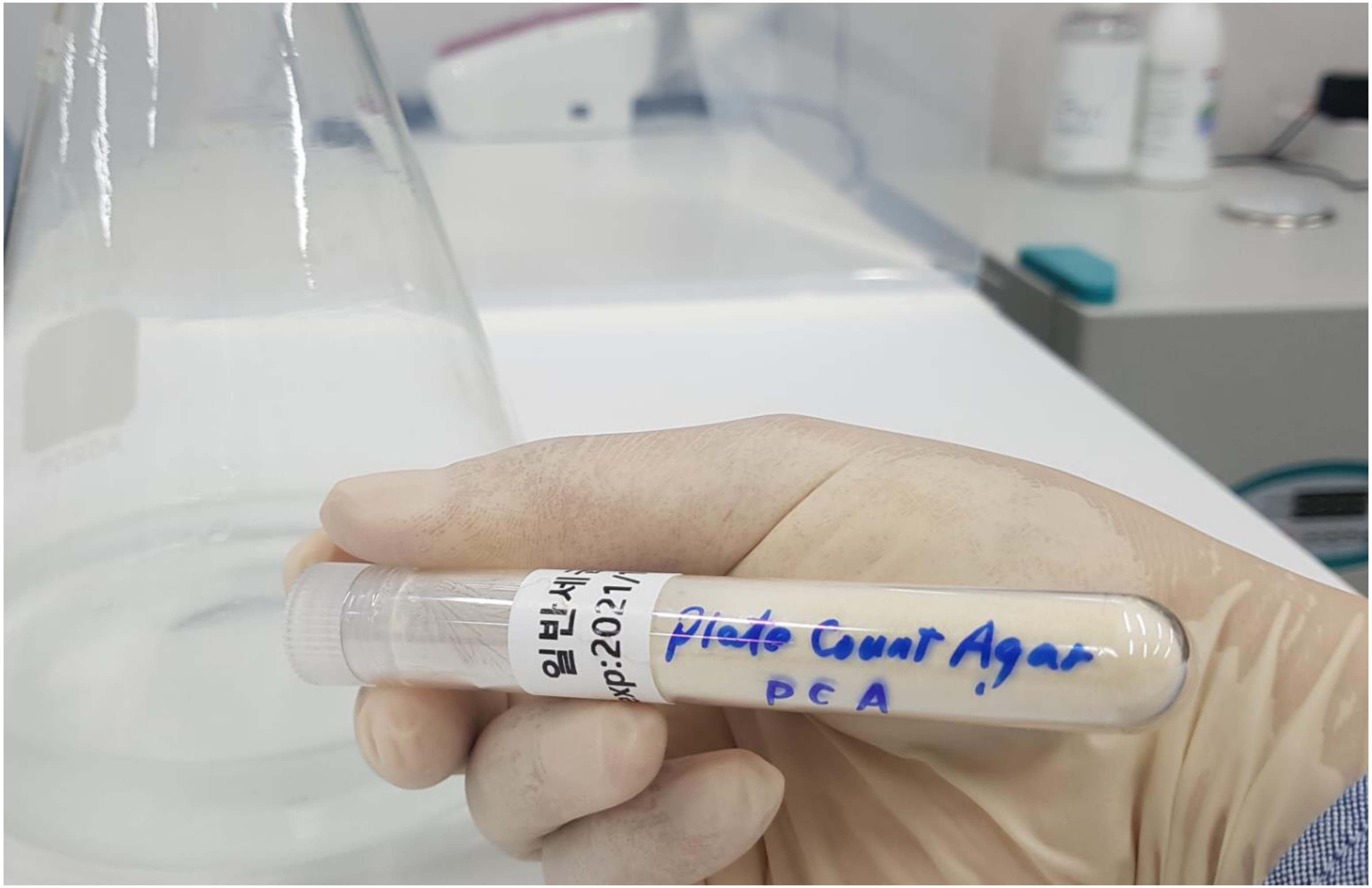


KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

2. 증류수 250ml을 삼각 플라스크에 투입합니다

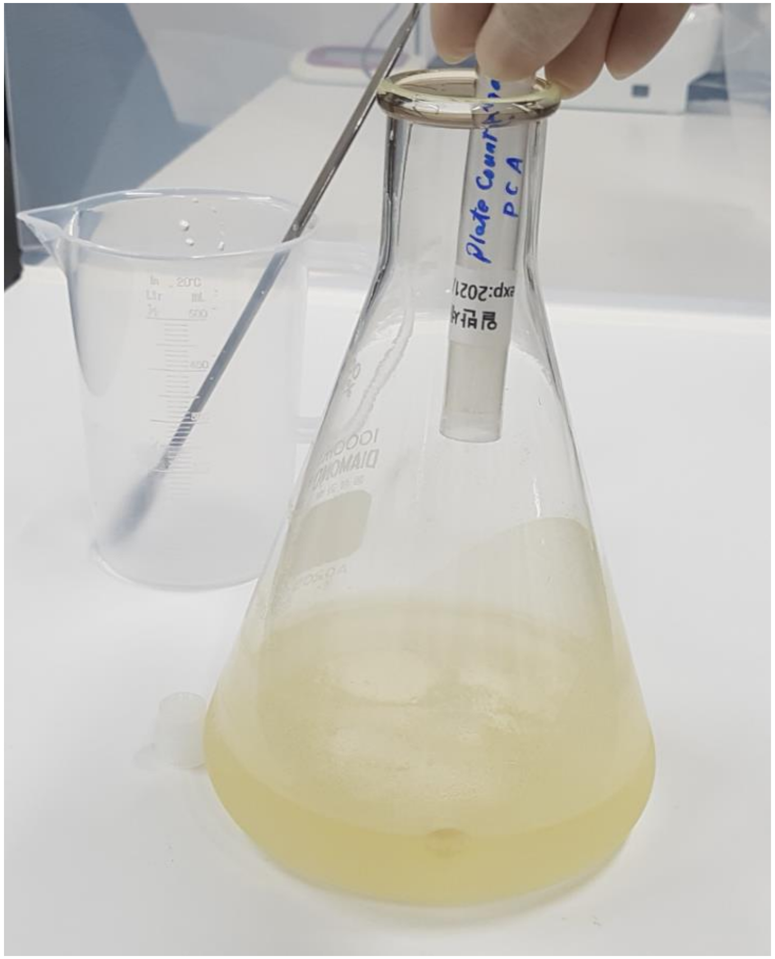
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

3. 사용할 Plate Count Agar 배지를 준비합니다



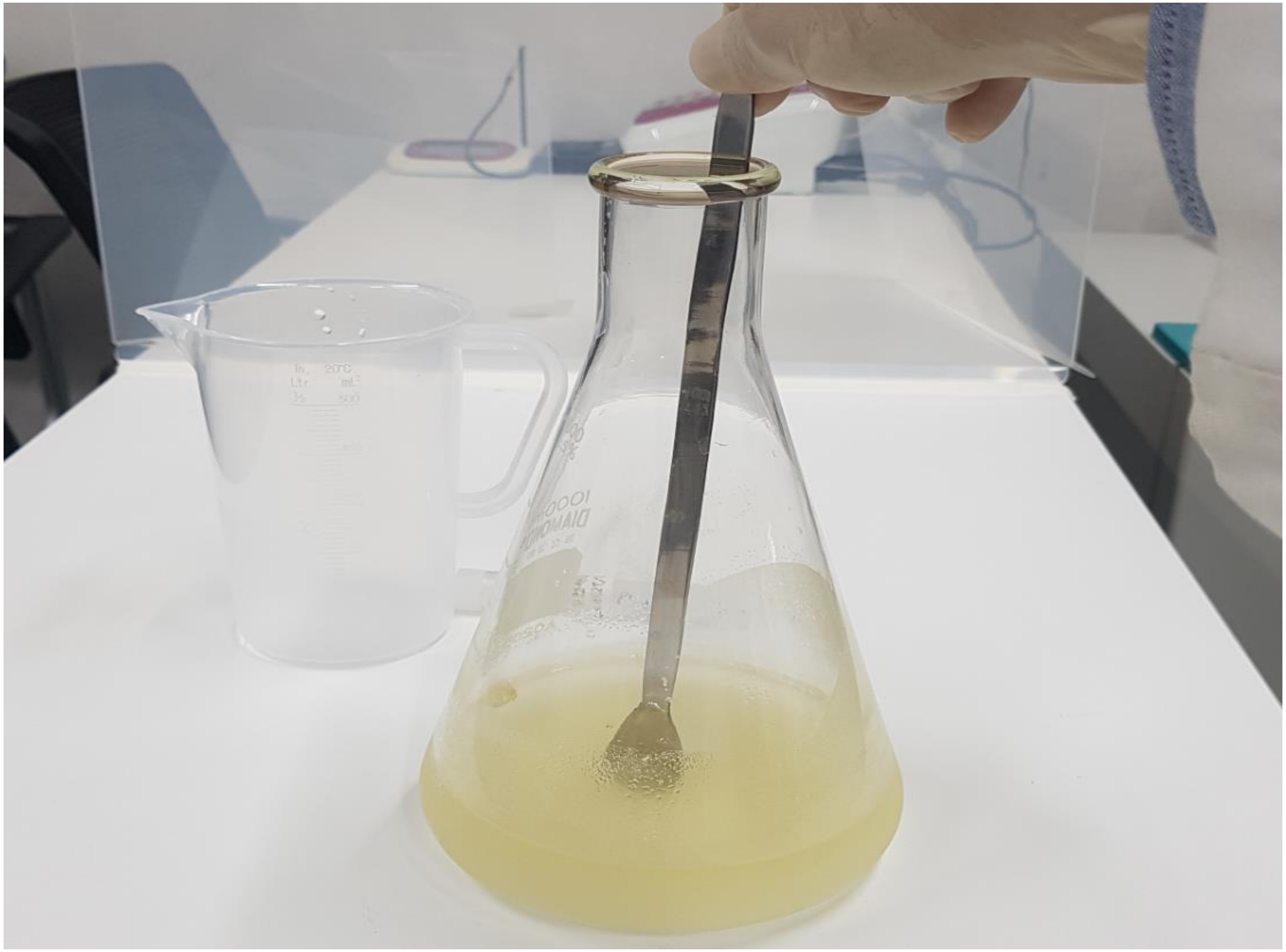
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

4. 증류수 250ml 있는 삼각 플라스크에 배지 5.88g을 투입합니다



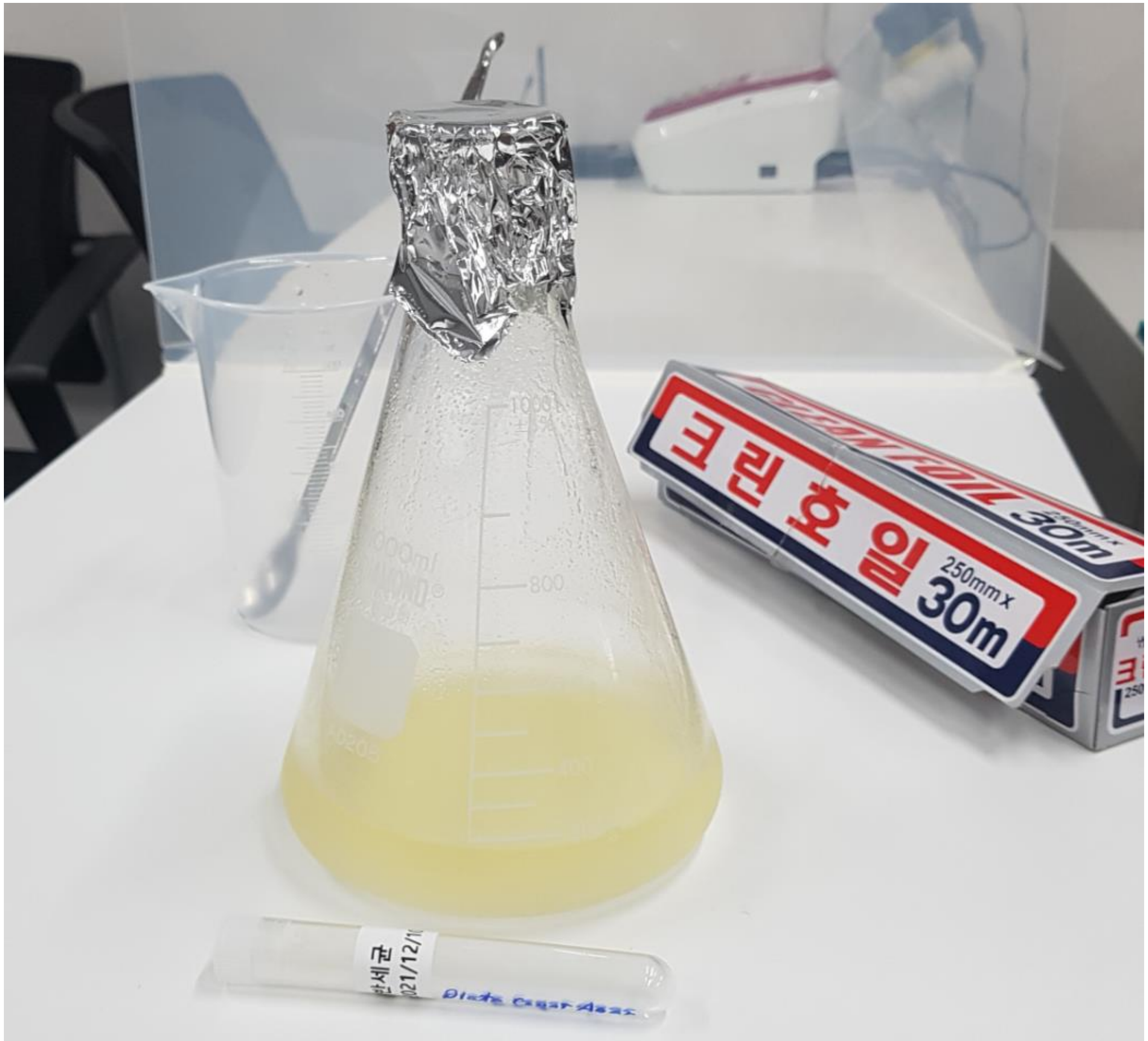
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

5. 스테인레스 스푼으로 증류수와 배지를 잘 혼합합니다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

6. 알루미늄 호일로 삼각 플라스크 입구를 막아 면전합니다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

7. 알루미늄 호일로 막은 삼각 플라스크를 스트로바, 가열식 자력교반기로 균일 혼합합니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

8. 삼각 플라스크를 오토클레이브 121’C, 15분, 15PSI에서 멸균을 실시합니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

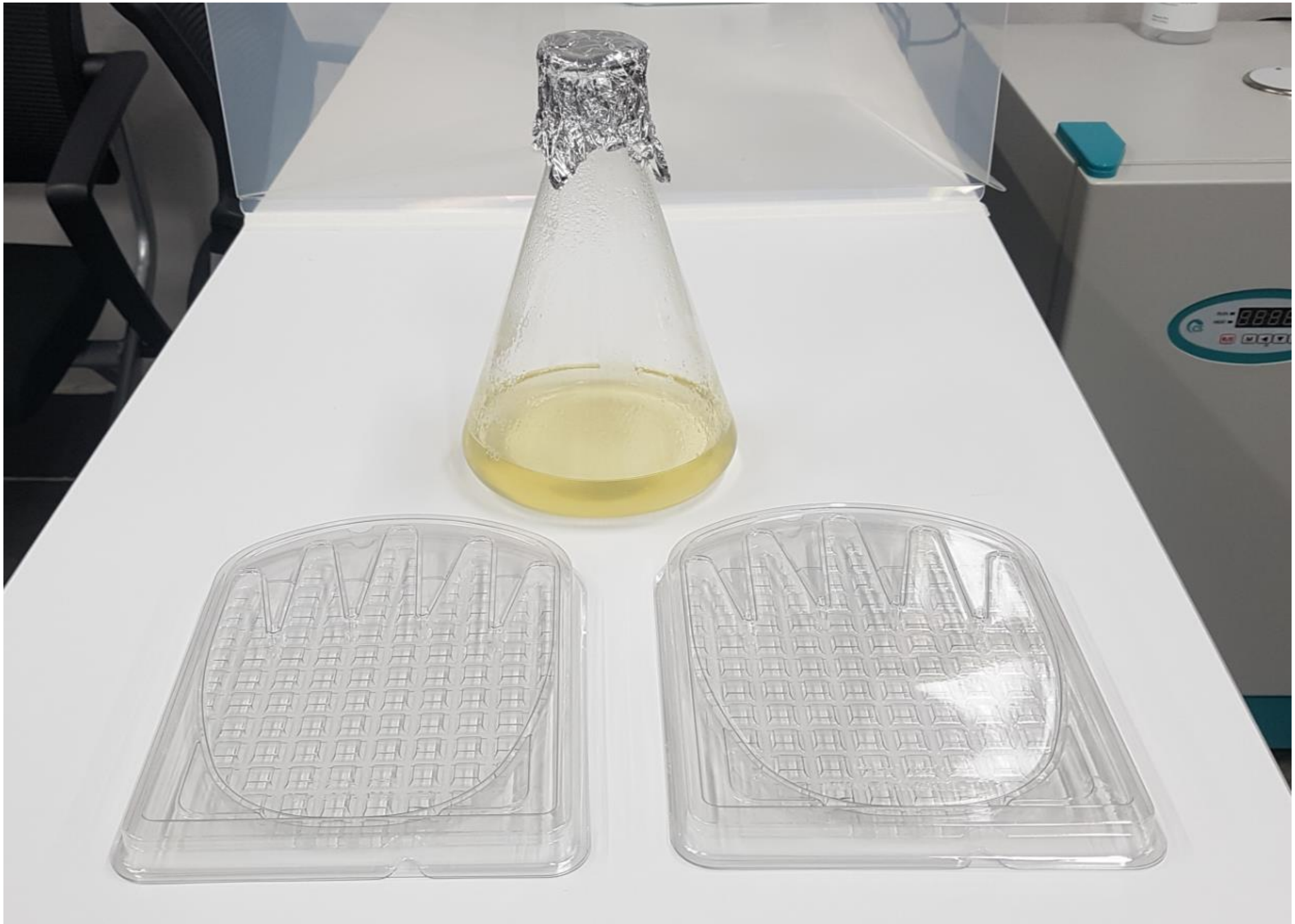
9. 멸균된 삼각 플라스크 내의 배지를 55’C 정도까지 준비합니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

10. 배지를 분주할 핸드 플레이트를 준비합니다

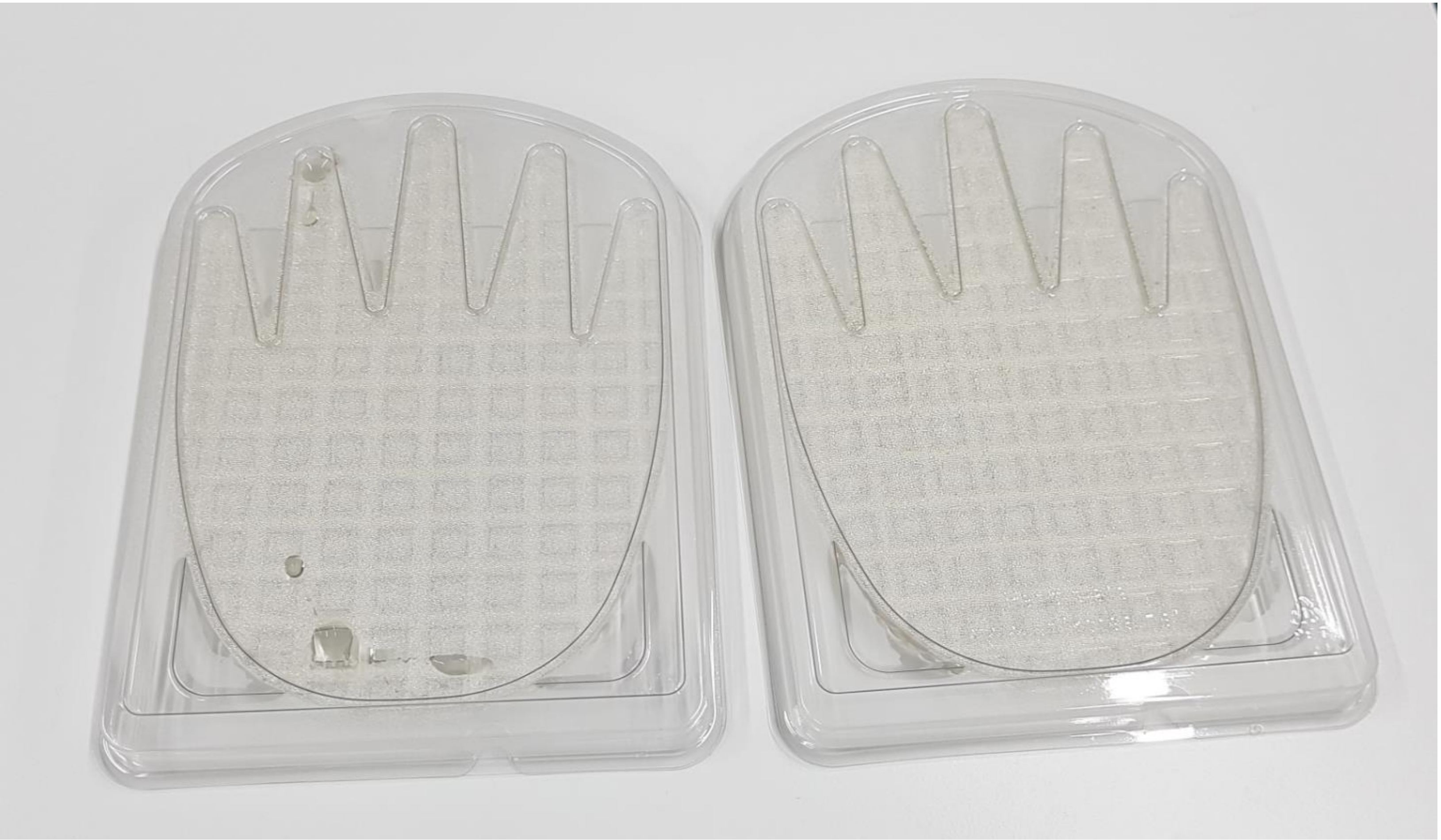
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

11. 적정 온도로 준비된 분주할 배지와 핸드 플레이트를 클린벤치 내에 준비합니다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

12. 2개의 핸드 플레이트에 각 125ml씩 분주를 실시하고 오염이 생기지 않도록 핸드 플레이트 뚜껑을 닫고 냉각하면서 응고시킨다. (5~8분 정도 소요)



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

13. 잘 굳은 배지에 왼손 손바닥을 눌러 표면을 접촉합니다. (너무 세게 누르면 배지가 깨질 수 있으니 주의 필요합니다)

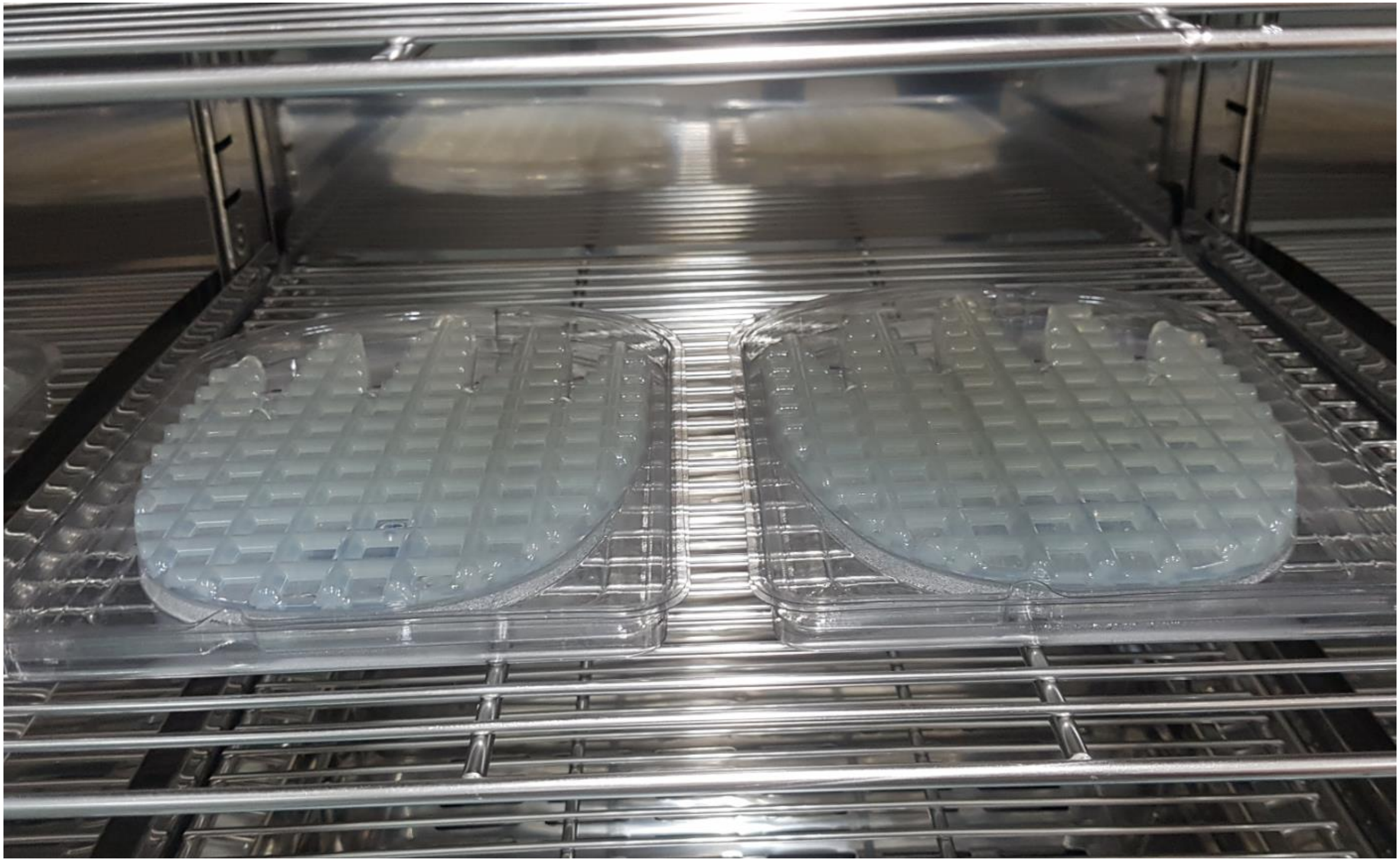
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

14. 왼손은 일반적인 손 상태를 점검하고, 오른손은 70% 알코올로 소독을 실시한 후 접종하여 양손 상태를 비교 점검합니다.

15. 손바닥을 접촉시킨 배지는 뚜껑을 닫고 왼손, 오른손 구분하여 핸드 플레이트에 표기합니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

16. 인큐베이터에 넣을 때 뒤집어서 배양 (배지 위에 응결수가 떨어지는 것 방지 목적)



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

17. 인큐베이터는 36′C의 온도에서 24~48시간 동안 배양해 줍니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

18. 배양한 배지에 세균이 얼마나 증식하였는지 판독해 줍니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

◈ 개인 위생 미생물 배양 – [일반세균 – 호기성 배양법]

SWAB TEST KIT 이용, 핸드폰 오염 검사

개인의 주위 환경 중, 자신의 **소지품 표면**으로 부터 시료를 채취하여 배양한 후 **평판배지**에 형성되는 미생물의 특징을 관찰한다.

1. Swab Test 란?

1.1 표면 오염균 측정법으로서, 크린룸 공간, 물체 표면, 작업대 표면 등은 수 많은 미생물에 의하여 오염되어 있다. 이것을 정량적 측정하는 방법은 다수 있으나, 포집효율, 재현성 등으로 기술적 문제점이 많다. 따라서 측정해야 하는 장소나 물체의 상태에 따른 채취 방법을 선택하여 수행 할 필요가 있다.

1.2 **닦아 내기 방법**인 **Swab 시험방법**은, 검사하고자 하는 물체의 표면에 부착된 미생물을 액체 중에 분리 추출하는 방법으로서

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

1.3 측정 대상물 표면의 일정 면적(25cm^2 혹은 100cm^2)을, 먼저 멸균해 놓은 생리식염수, 펩톤 수 등을 무친 면봉으로 닦아 병에 넣는다.

1.4 10~50ml의 멸균수로 강하게 용액에 추출한 다음 배양하여 세균수를 구한다

1.5 굴곡된 불규칙한 표면의 계측에 적절하다. 미국, 영국, 캐나다 등지에서 공적 방법으로 또는 학회 등에서 널리 이용되고 있는 방법이다

2. 재료 및 기구

2.1 재료 : **Standard Methods Agar(=PCA)**

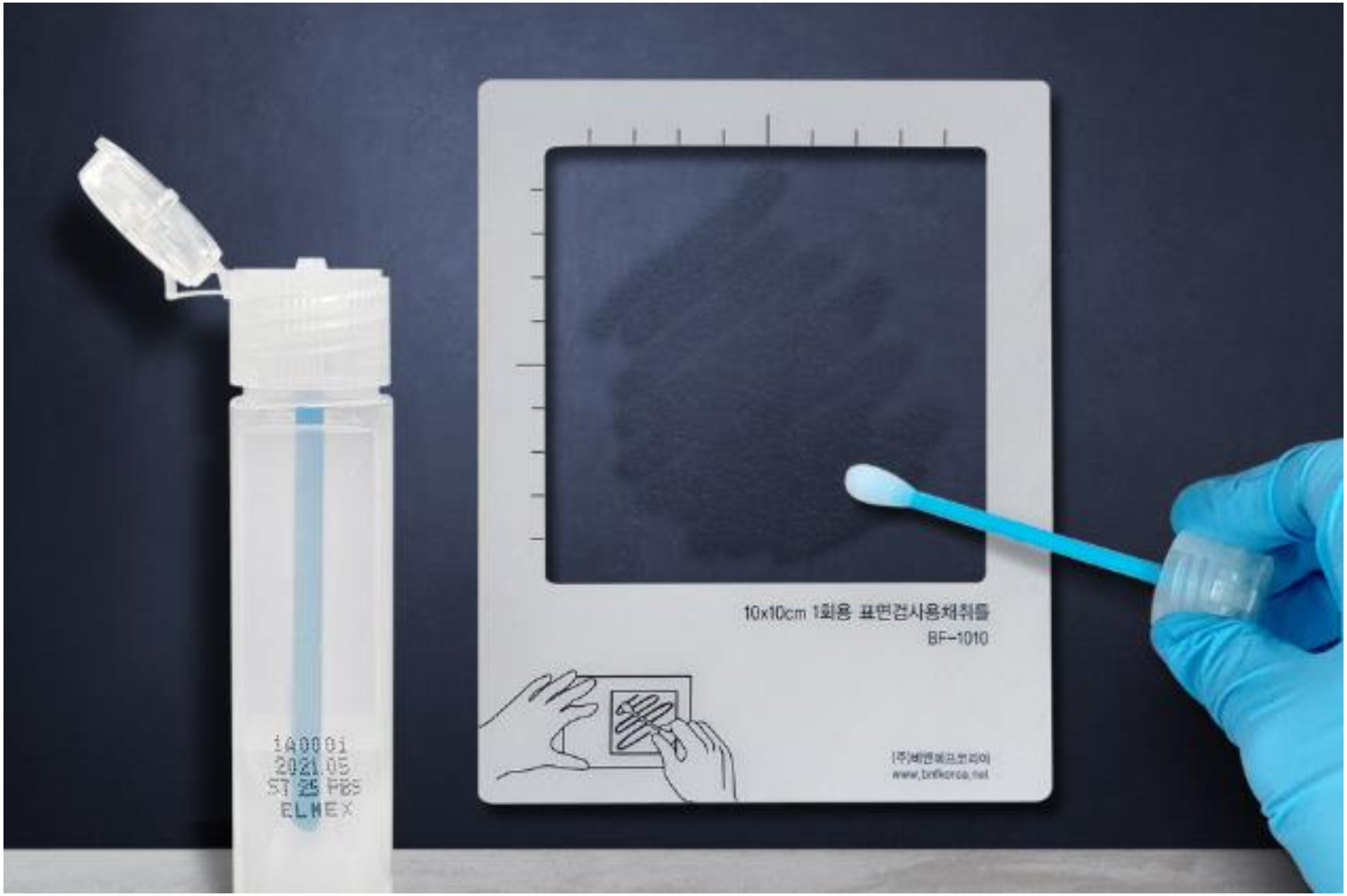
2.2 기구 : 스왑 테스트 킷트(Swab Test Kits), 핸드폰 케이스, 패트리디시, 인큐베이터

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

용액 : 0.85% NaCl 10ml(Saline)

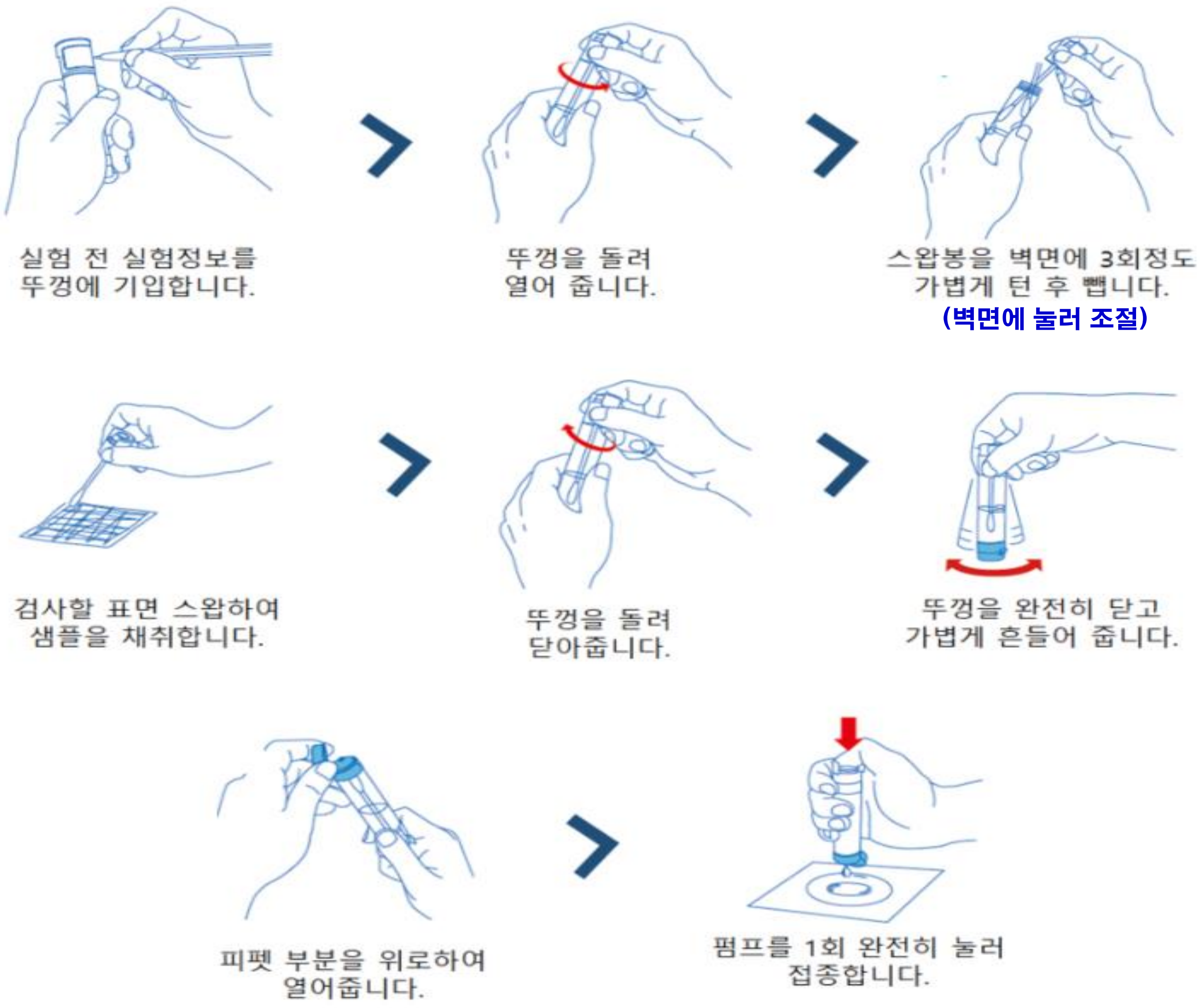
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전재.복제 금지합니다

표면검사용 채취틀 (10 x 10 cm)



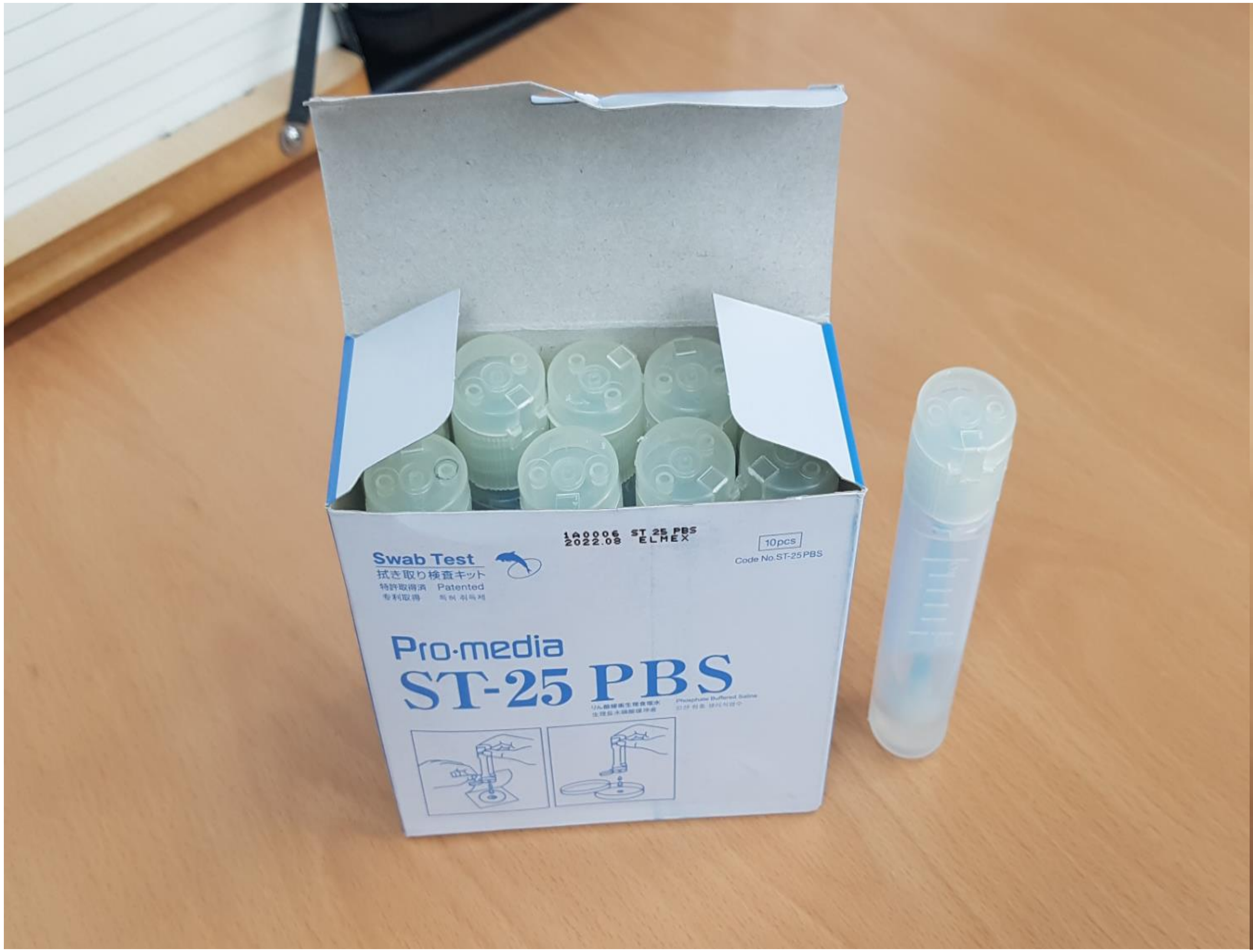
KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

3. 실험방법



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

1. **Swab Test Kit 는 용기+희석액(식염수)+면봉이 멸균된 상태로 한번에 들어 있다.**



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

2. **핸드폰 케이스의 표면 오염상태 검사를 위해 준비한다.** (작업자 손바닥, 벽면이나 테이블, 주방도구, 기구 틈새 등 표면 미생물을 편리하게 채취)

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

3.   실험정보를 스왑 샘플병에 기록하고 뚜껑을 돌려 열어준다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

4. 용기를 눌러 스왑 봉의 용액량이 적당하게 조절한다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

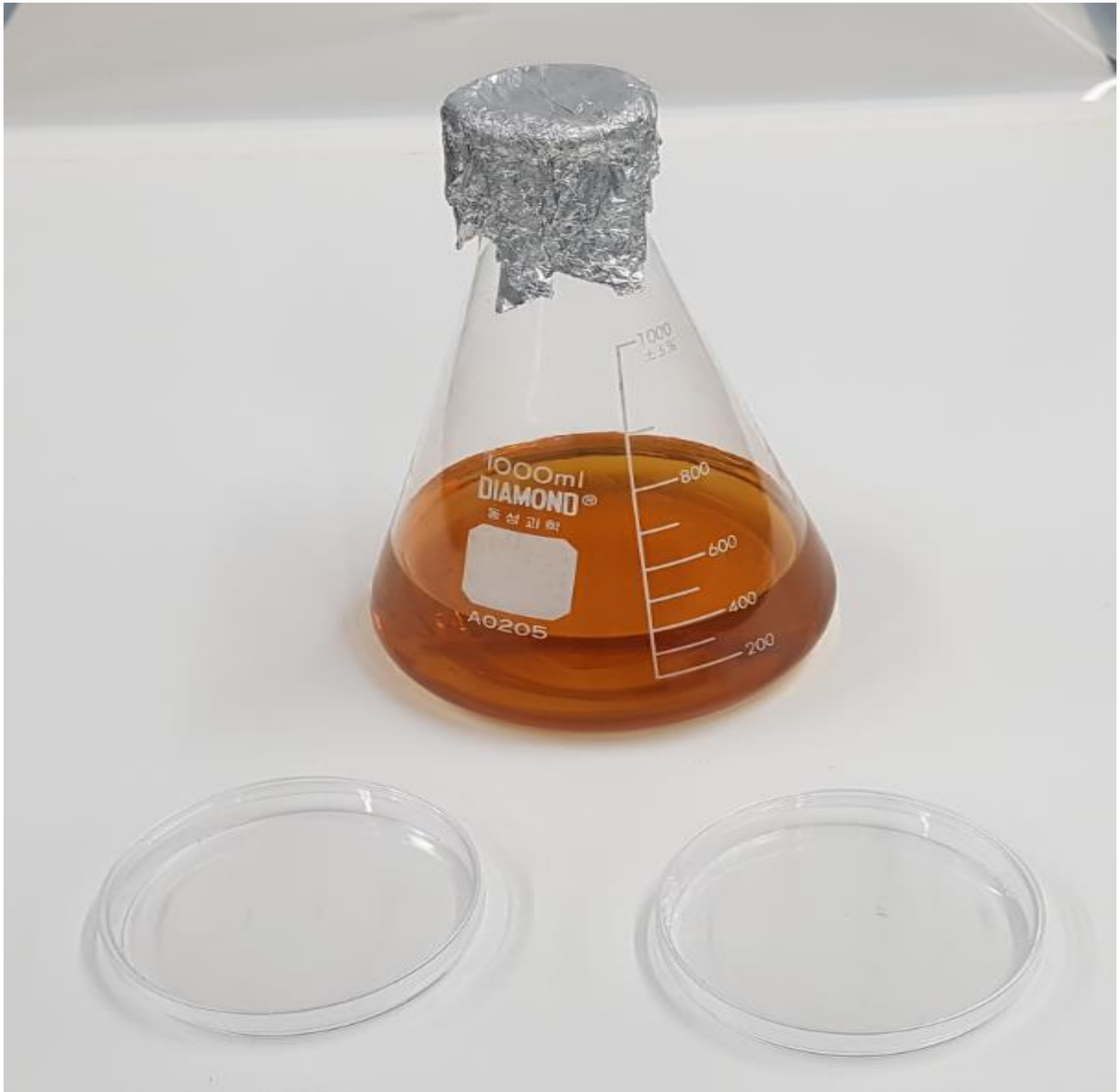
5. 스왑 봉을 꺼내 핸드폰 케이스 표면 10cm x 10cm 표면을 균일하게 샘플링한다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

6. 스왑 봉을 스왑 샘플병에 다시 투입하고, 뚜껑을 닫고 가볍게 좌우로 흔들어 준다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

7. 멸균된 배지를 패트리디시에 분주한다

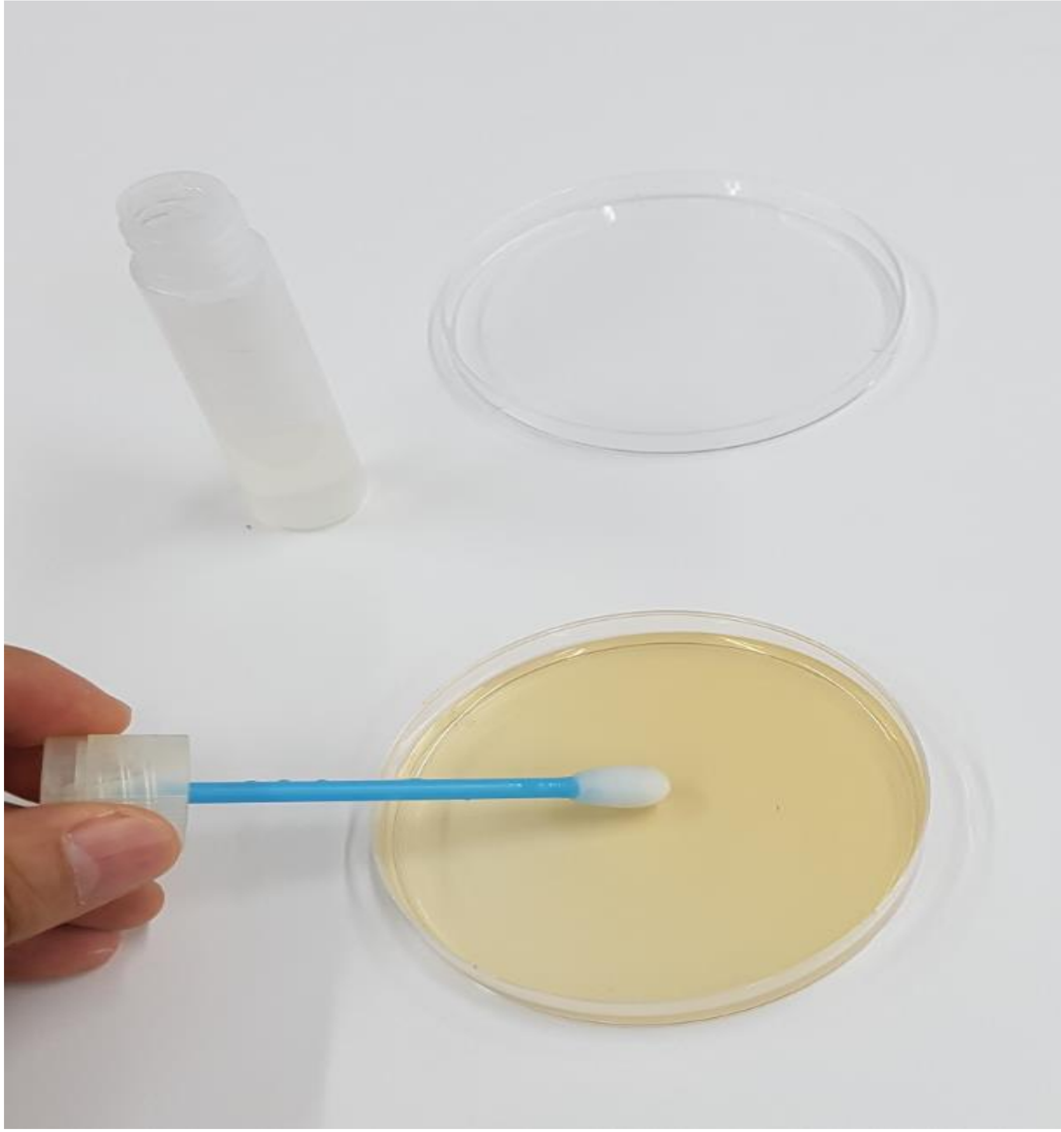


KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

8. 뚜껑에 캡을 열고 패트리디시(PCA) 배지에 1ml 씩 접종 후 스프레딩 한다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

9. 뚜껑에 캡을 열고 패트리디시(PCA) 배지에 면봉을 이용 스트리킹한다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

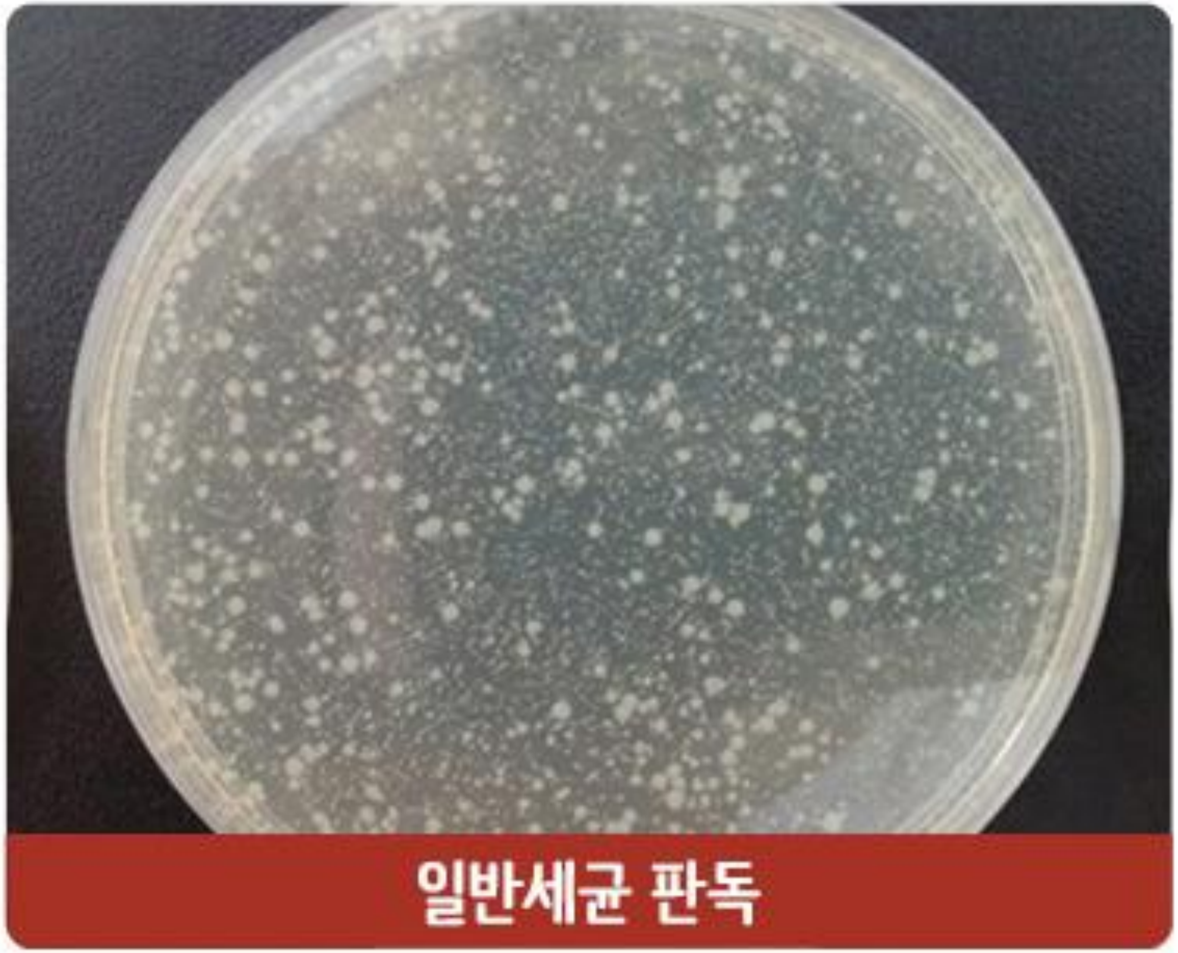
10. 패트리디시를 배양기 뒤집어 넣고, 인큐베이터에서 배양한다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

11. 인큐베이터는 36′C의 온도에서 24~48시간 동안 배양해 줍니다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

12. 배양한 배지에 세균이 얼마나 증식하였는지 판독해 줍니다



KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다

감사합니다 !

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다