

◆ 6주차 : 미생물 순수분리법

식품 중에는 다양한 미생물들이 함께 섞여서 존재하고 있으므로, 원하는 미생물을 동정하거나 형태학적, 생화학적 특성을 파악하기 위하여, 목적하는 미생물만을 순수 분리하여 순수 배양하는 기술이 필요하다.

보통 시료를 그대로 사용하거나 적당히 희석하여 고체배지의 표면에 독립된 집락 (Colony)를 형성시켜서 순수하게 분리한다.

그러나 목적의 미생물이 대단히 적거나, 목적 이외의 미생물이 압도적으로 많아서, 시료로부터 직접 분리하기가 어려울 때에는, 목적의 미생물이 증식하는 데, 가장 적합한 배지에서 배양하여, 다른 미생물 보다도 더 우선적으로 생육시켜 집식배양 (Enrichment culture) 시킨다.

이 방법으로 목적하는 미생물을 우세하게 번식시킬 수 있으나, 다른 잡균들이 잔존하고 있으므로, 순수분리 및 순수배양(Pure culture)하여 한 종류만의 미생물을 얻을 수 있게 된다.

1. 순수분리법

목적하는 미생물만을 순수하게 얻기 위한 방법에는, **평판배지 분리방법**으로 아래 3가지 방법이 있다.

1.1 획선 평판법 (**Streak** plate method)

▪ **Streak** : 줄무늬. 바탕을 이루는 부분과 색깔이 다른 기다란 줄 모양의 것

평판배지에 **백금이**를 사용하며, 계속 **획선으로 도말하여**, 미생물이 **분리**되도록 하는 것으로 **가장 많이 사용**되는 방법이다.

1.2 확산 평판법 (**Spread** plate method)

소량의 **희석 균액**을 평판배지에 떨어뜨린 후, **Conradi봉(스프레다)**을 사용하여 배지의 표면 위에 **넓게 퍼는** 방법이다.

1.3 주입 평판법 (**Pour** plate method)

시료 균액을 45~50℃로 식힌 **액상 한천배지**로 몇 차례 **희석**한 후, **패트리디쉬**에 **주입하고 혼합**하여 **평판**을 **만드는** 방법이다.

2. 순수배양법

순수배양(Pure culture)은, 단지 **한 종류만**의 **미생물을 배양**하는 것으로 미생물을 보존하거나 **증식특성, 병원성, 대사, 항생제 감수성** 등을 **검사**하기 위하여 필요한 것이다.

2.1 고체배양법

순수하게 분리된 미생물의 **보존, 형태 및 생리** 등의 관찰에 이용하며 **사면배양법**과 **천자배양법**이 있다.

1) 사면배양 (Slant culture)

호기성균의 순수배양에 이용된다. **백금이**로 **종균을 취**하여 사면배지 표면을 **아래쪽에서 위쪽**으로 가볍게, **직선 또는 지그재그로 선**을 긋는다. **세균**은 **백금이**, **효모**의 경우에는 **백금이** 또는 백금선을 사용하고, **곰팡이나 버섯** 같은 경우에는 **백금구**를 사용하는 것이 편리하다.

2) 천자배양 (Stab culture)

혐기성균의 배양에 이용하며, 백금선의 끝에 종균을 묻혀서 고층배지의 시험관 입구를 꺼꾸로 하여, 배지의 표면 중앙에서 내부로 향하여 수직으로 찌른다.

2.2 액체배양법

미생물의 생태 및 생리의 관찰, 발효 생산물의 시험, 균체를 대량으로 얻고자 하는 경우, 배양액 중에 통기를 할 필요가 있을 경우 등에 보통 액체배양을 한다.

1) 정지배양 (Stationary culture)

호기성균은 생육에 산소를 요구하므로 배양용기의 크기에 비하여 내부의 배지량은 적게 하고, 액층을 얇게 하여 산소공급이 잘 되도록 하여야 한다.

2) 진탕배양 (Shaking culture)

호기성균을 보다 활발하게 증식시키기 위하여, 배양용기를 연속적으로 진탕하여 통기와 교반효과를 얻어 액내에 대량의 공기가 용해될 수 있는 방법으로 소량의 배양에는 진탕 배양법이 흔히 사용된다.

3) 통기배양 (Submerged culture)

실험실에 있어서 대량의 배지를 배양하려면, Jar Fermenter를 이용하여 액체배지 중에 직접 무균공기를 주입하여 통기 교반 배양을 한다.

Jar Fermenter는 배양 중에 통기량, 교반속도, 온도, pH 등을 조정할 수 있게 설계 되어 있어서, 미생물의 배양 조건을 연구 검토하는데 적합한 장치이다.

또한 공업용 발효조와 구조, 통기 및 교반 방법이 거의 같으므로 산업적인 생산을 위한 기술적인 자료를 얻는 데도 이용된다.

◆ 획선 평판법 (Streak plate method)

1. 재료 및 기구

1.1 균주 : 혼합 균주 액체배양액 (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*)

1.2 배지 : Tryptic soy agar

1.3 기구 : 알코올램프, 백금이, Test tube, Petri dish, Autoclave, Incubator

2. 실험방법

2.1 혼합균주 배양액 및 Tryptic soy agar 한천배지를 준비한다

2.2 혼합균주 배양액 1 백금을 평판배지에 아래 순서로 획선 도말한다

2.3 최초 획선 접종한 후 (a), 평판을 돌려서 획선으로 펼치고 (b)

2.4 평판을 돌려서 추가 획선으로 펼치며 (c)

2.5 평판을 돌려 마무리 획선을 내려 긋는다 (d)

2.6 Petri dish를 도치하여 30~35°C에서 24시간 배양 후 Colony를 관찰한다



1번째 접종
Streaks

a



2번째 접종
Streaks

b



3번째 접종
Streaks

c



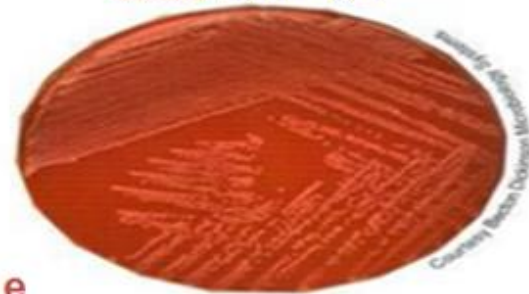
4번째 접종
Streaks

d

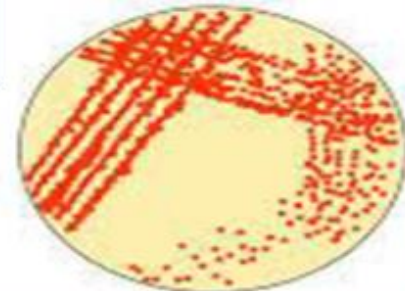
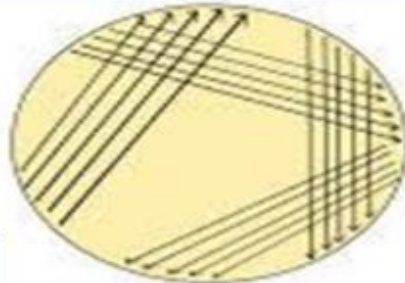


콜로니 형성된 상태

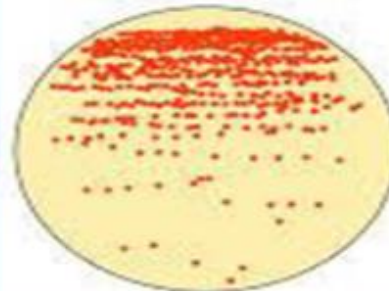
e



평판을 돌리면서
접종

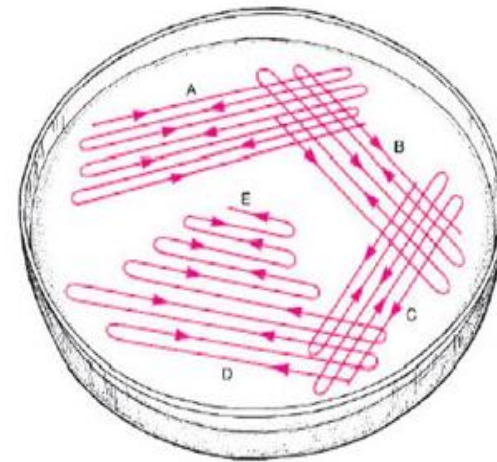


평판의 위~아래로
접종

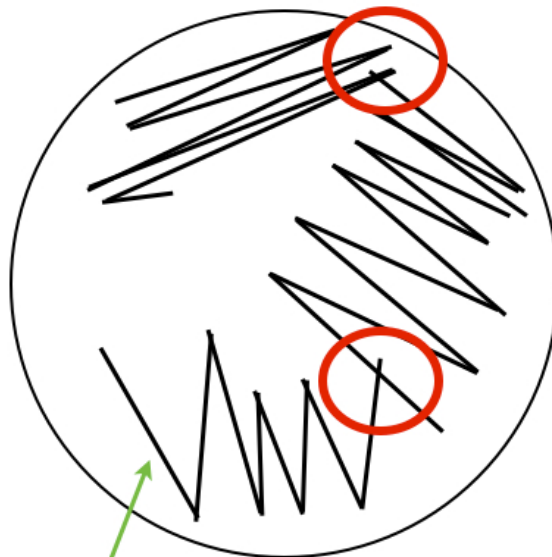




Old-School

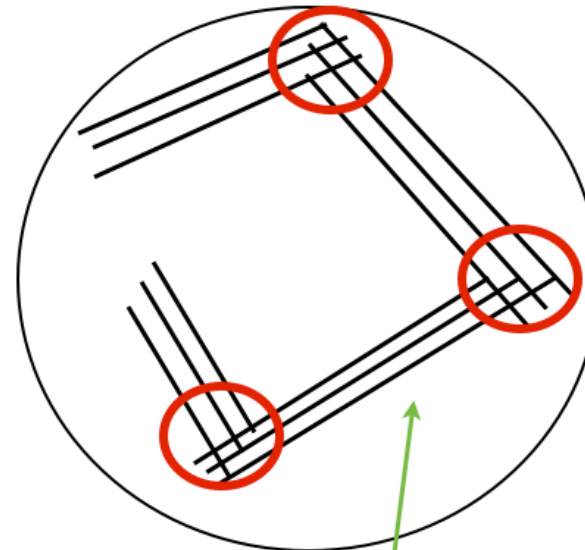


New-School



Single colonies
expected here

70% Efficiency



Single colonies
expected here

90+% Efficiency

◆ 확산 평판법 (Spread plate method)

1. 재료 및 기구

- 1.1 균주 : 혼합 균주 액체배양액(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*)
- 1.2 배지 : Tryptic soy agar
- 1.3 재료 : Ethanol
- 1.4 기구 : 알코올램프, 스프레다, 피펫, Test tube, Petri dish, Autoclave, Incubator

2. 실험방법

- 2.1 혼합균주 배양액 및 Tryptic soy agar 한천배지를 준비한다
- 2.2 배양액을 1ml 피펫으로 0.1~0.5ml 취하여 평판배지 뚜껑을 조금 열고 가한다
- 2.3 95% Ethanol 비이커에 담가둔 스프레다를 화염 멸균을 실시한다
- 2.4 스프레다로 분산 도말한다
- 2.5 Petri dish를 도치하여 30~35°C에서 24시간 배양 후 Colony를 관찰한다

확산 평판법 (Spread Plate Method) – 실험 순서



◆ 주입 평판법 (Pore plate method)

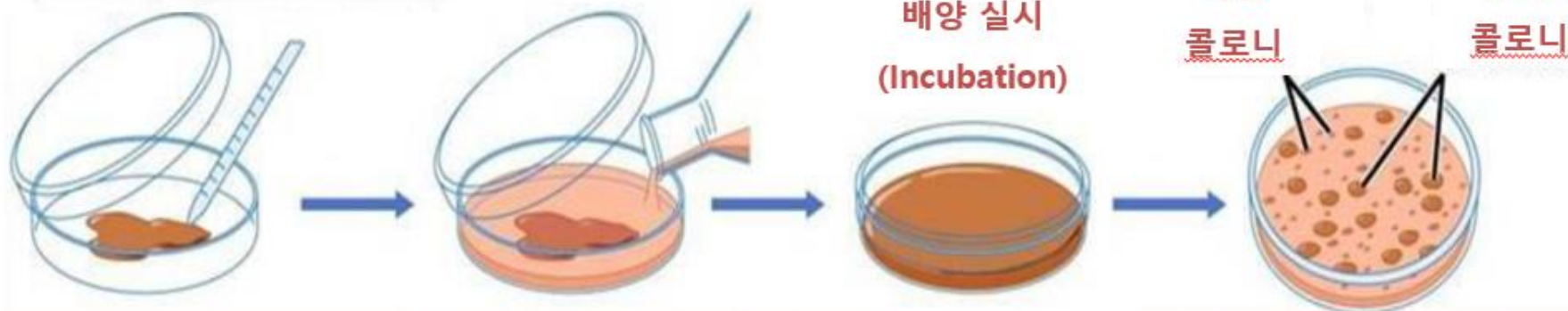
1. 재료 및 기구

- 1.1 균주 : 혼합 균주 액체배양액(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*)
- 1.2 배지 : Tryptic soy agar
- 1.3 재료 : Ethanol
- 1.4 기구 : 알코올램프, 스프레다, 피펫, Test tube, Petri dish, Autoclave, Incubator

2. 실험방법

- 2.1 혼합균주 배양액 및 Tryptic soy agar 한천배지를 준비한다
- 2.2 배양액을 1ml 피펫으로 0.1 or 1.0ml 취하여 빈 평판 뚜껑을 조금 열고 가한다
- 2.3 샘플이 있는 빈 평판 위에 배지를 추가로 가하여 준 후
- 2.4 평판을 둥그렇게 회전해 주면서 샘플과 배지를 균일하게 혼합 및 펼쳐준다
- 2.5 Petri dish를 도치하여 30~35°C에서 24시간 배양 후 Colony를 관찰한다

주입 평판법 (Pore Plate Method) – 실험 순서



- 접종할 샘플 피펫팅 후
- 멸균 빈 패트리디쉬 투입
- 샘플량 0.1 or 1ml 정도

- 멸균된 배지를 부어 준 후
- 접종된 샘플과 배지가
- 전체적 균일하게 혼합 실시

- 전형적인 주입 평판법에 의한 콜로니 형성 상태

참고 : 시험관 희석하여 접종하는 주입 평판법

1. 재료 및 기구

1.1 재료 : 혼합 균주 액체배양액(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*)

1.2 배지 : Tryptic soy agar

1.3 기구 : 알코올램프, 백금이, Test tube, Petri dish, Autoclave, Incubator

2. 실험방법

2.1 혼합균주 배양액 및 Tryptic soy agar 액화 한천배지를 준비한다

2.2 혼합균주 배양액 1백금이를 시험관(1)의 액화 한천배지 20ml 에 접종한다

2.3 빈 멸균 Petri dish에 부어 잘 펼쳐지도록 둥글게 흔들어 주면서 응고시킨다

2.4 Petri dish를 도치하여 30~35'C에서 24시간 배양 후 Colony를 관찰한다

2.5 콜로니 형성이 너무 많아 관찰이 어려울 경우는 다음 순서도 추가 실시한다

2.6 시험관(1)에서 2백금이를 시험관(2) 액화 한천배지 20ml에 접종한다.

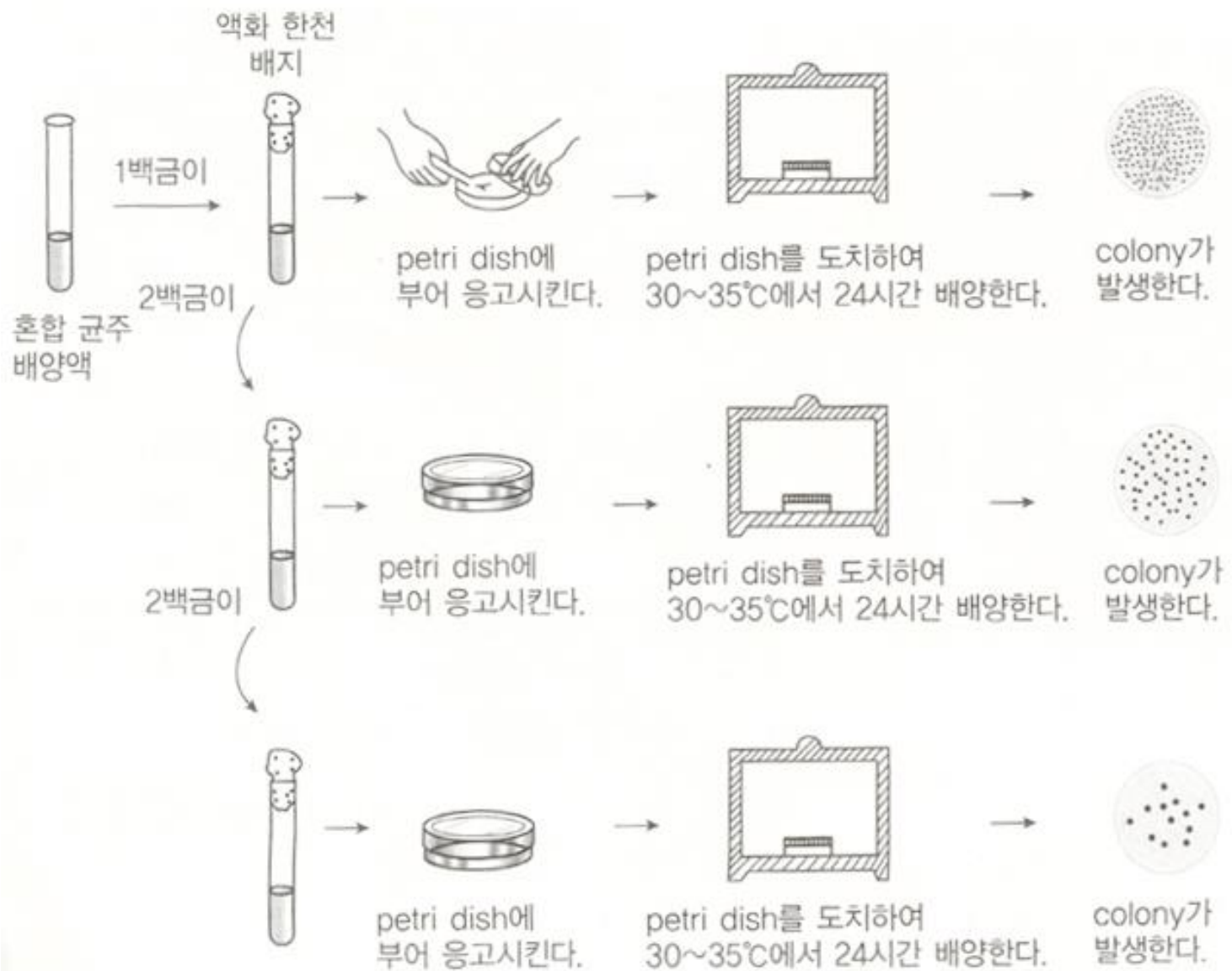
2.3과 같이 시행한 후

2.4를 진행하여 관찰한다

2.7 시험관(2)에서 2백금이를 시험관(3) 액화 한천배지 20ml에 접종한다.

2.3과 같이 시행한 후

2.4를 진행하여 관찰한다



감사합니다 !