

## 3. 멸균 소독

### 가. 실습 목표

- 1) 미생물 실습에 필요한 멸균과 소독에 대해 설명할 수 있다.
- 2) 여러 가지 멸균 방법을 정확히 할 수 있다.
- 3) 미생물 실습에 쓰이는 기구를 깨끗이 세척할 수 있다.

### 나. 실습 재료

신문지, 멸균 테이프, 폴, 알루미늄 호일, 솜 (탈지하지 않은 것), 합성 세제, 거즈, 솔

### 다. 기기 및 기구

시험관, 피펫, 페트리 접시, 삼각플라스크, 비커 등 멸균할 유리 기구, 막자사발, 핀셋, 고압 증기멸균기(autoclave), 건열 멸균기, 건조기, 사이폰식 피펫 세척장치

### 라. 관계 이론

#### 1) 멸균

멸균(sterilization)은 대상 물체에 존재하는 모든 미생물을 완전히 사멸시키거나 제거하는 조작을 말한다. 멸균 방법에는 불꽃에 직접 태우는 방법, 건열(dry heat) 또는 습열(moist heat)을 이용하는 방법, 자외선이나 방사선 조사에 의한 방법과 여과기(filter)를 이용하는 방법 등이 있다.

#### 가) 화염 멸균

핀셋이나 미생물의 접종, 이식에 사용되는 백금이 등과 같이 불꽃에 직접 닿아도 타지 않는 도구의 멸균에 이용한다. 예를 들어, 시험관의 미생물을 이식 또는 접종할 때 시험관의 솜마개를 뽑은 다음이나 끼우기 전에 시험관의 입구를 불꽃에 가볍게 3~4회 통과시키면서 멸균하는 방법 등이 이에 속한다.

## 나) 건열 멸균(dry heat sterilization)

건열(dry heat)로 미생물을 산화 또는 탄화시켜 미생물 및 포자(spore)를 완전히 살균하는 방법으로 200℃ 정도까지 온도를 올릴 수 있는 건열 멸균기(dry heat sterilizer)를 이용한다.

시험관, 페트리 접시, 피펫 등과 같이 고열에 견딜 수 있는 유리 기구나 자기 기구를 멸균하는 데 주로 이용한다.

플라스틱나 시험관은 솜으로 막고, 피펫이나 페트리 접시는 종으로 잘 싸서 금속제의 용기에 넣어 <그림 V-7>과 같은 전기용 건열멸균기에서 온도를 높여 160℃가 되면 열원을 고정시켜 30분간 가열을 계속하는 방법 또는 180℃까지 온도를 높힌 다음 곧 열원을 끄는 방법이 있다. 종이나 솜이 약간 누렇게 변하면 멸균이 거의 된 것이다.

멸균이 끝난 다음 멸균기의 문을 열어 급히 냉각시키면 유리 기구가 깨질 염려가 있으므로, 멸균기 내의 온도가 100℃이하로 떨어질 때까지 기다렸다가 내용물을 꺼낸다.



그림 V-7 건열 멸균기

## 다) 습열 멸균

습열 멸균은 건열 멸균에 비해 낮은 온도와 짧은 시간으로 멸균이 가능하며, 자비소독법(煮沸消毒法)과 증기멸균법이 있다.

## (1) 자비 소독(boiling)

끓는 물로 소독하는 방법으로, 끓는 물이 들어 있는 소독기에 주사기, 가위, 피펫, 막자사발 등을 15~20분간 넣어두면 소독이 된다. 소독기 내의 물에 1~2% 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 용액을 넣어주면 소독 효과가 높아질 뿐 아니라 녹스는 것을 방지할 수 있다. 이 방법은 포자가 죽지 않고 살아남아 있을 수 있기 때문에 멸균이 아닌 소독이다.

## (2) 고압 증기멸균(autoclaving)

물은 1기압의 조건에서 가열했을 때 100℃를 넘지 못하지만, 압력을 높이면 100℃ 이상으로 온도를 올릴 수 있다.

한편, 미생물의 영양 세포는 100℃ 정도에서 10~20분 가열하면 죽지만, 내열성이 강한 미생물의 포자는 죽지 않고 나중에 싹이 터서 영양 세포로 계속 자라게 된다.

이와 같은 성질에 따라서 100℃ 이상의 고온, 고압 수증기로 미생물의 영양 세포는 물론 포자마저 완전히 죽이는 것이 고압 증기멸균이다.

이 방법은 고압 증기멸균기(autoclave)를 이용하여 보통 121℃에서 15분 또는 110℃에서 30분 동안 멸균한다.

고압 증기멸균기는 가압 장치에 속하므로 취급하는 데 세심한 주의가 필요하다.



(a) 고압 증기멸균기



(b) 멸균 바구니

그림 V-8 고압 증기 멸균기

## (3) 자외선에 의한 멸균

자외선을 이용하여 공기나 물속의 균을 살균하는 방법이다. 주로 무균상자, 무균실 등의 살균에 이용되며, 200~280nm의 복사선을 발생하는 자외선 조사기를 사용하며, 특히 250~260nm의 자외선이 살균 효과가 높다.

살균등(殺菌燈)에 의한 살균은 자외선의 물체 투과력이 약하기 때문에 직접 닿는 면의 살균만이 가능하여 주로 무균조작에 이용된다.

자외선은 눈에 해로우므로, 직접 눈에 비치지 않도록 주의해야 한다.

## (4) 여과 멸균

열에 의하여 쉽게 변질 또는 파괴되는 액상 물질을 여과기에 통과시켜 미생물을 분리 제거하는 멸균 방법이다.

여과기의 종류에는 구조토로 만든 버케펠드(Berkefeld) 여과기, 고령토(kaolin) 및 규사로 만든 챔버랜드(Chamberland) 여과기, 석면으로 만든 여과판을 이용하는 사이츠(Seitz) 여과기, 막 여과기(membrane filter)가 널리 이용되고 있다.

막 여과기는 셀룰로스 아세테이트(cellulose acetate) 또는 셀룰로스 나이트레이트(cellulose nitrate)로 만든 여과막을 이용하며, 조작이 간편하고 사용 목적에 따라 여과 공극(pore)의 크기를 선택하여 사용할 수 있다. 일반적으로 공극의 크기가  $0.22\mu\text{m}$  또는  $0.45\mu\text{m}$ 가 많이 쓰인다.

<그림 V-9>에 각종 여과 멸균장치를 나타내었다.

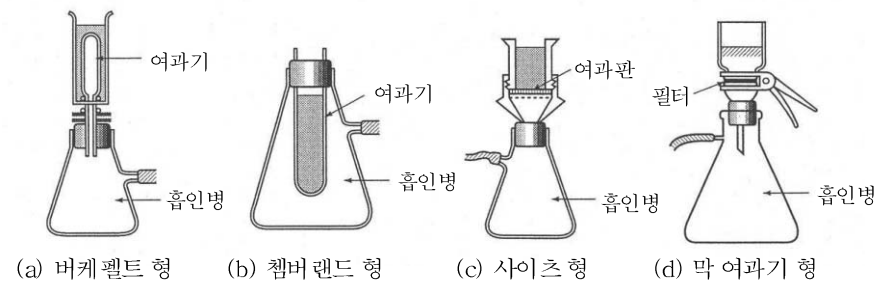


그림 V-9 여과 멸균장치

## 2) 소독

소독(disinfection)은 유해 미생물의 생활력을 빼앗아 사멸시키거나 또는 증식력을 잃게 하는 것으로, 주로 화학약품을 써서 특히 병원균을 대상으로 하는 경우를 말한다.

소독약으로는 70% 에탄올( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), 2.5~3.5% 과산화수소수( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 3~5% 페놀( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ), 1~2% 크레졸(cresol :  $\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ), 0.1% 과망간산칼륨( $\text{KMnO}_4$ ) 용액, 0.1% 염화제이수은용액(승홍수 :  $\text{HgCl}_2$ ), 0.5~1% 포르말린용액, 계면 활성제의 일종인 역성 비누용액(invert soap) 등이 일반적으로 사용되고 있다.

## 마. 주의 사항

- 1) 멸균할 내용물의 내·외부를 깨끗이 세척한 후에 멸균을 하도록 한다.
- 2) 고압 증기멸균기를 사용하기 전에 먼저 멸균기 속에 물이 충분히 있는지 확인하고, 적을 때는 보충해 준다.
- 3) 고압 증기멸균기의 뚜껑을 확실히 닫아 증기가 새지 않도록 한다.
- 4) 고압 증기 멸균기의 전원스위치를 넣은 후 처음에는 반드시 배기시키고 수증기 온도가  $100^\circ\text{C}$  부근에 도달한 후에 배기구를 닫아서 멸균기 내부압력을 상승시킨다.

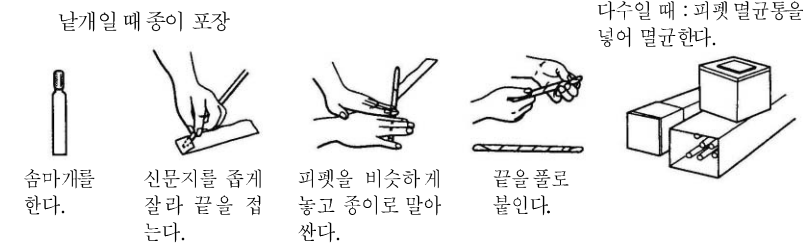
- 5) 멸균이 끝난 다음 건열 멸균기를 열어 급히 냉각시키면 유리 기구가 깨질 염려가 있으므로 서서히 냉각시킨다.
- 6) 고압 증기멸균기의 내용물을 꺼낼 때에는 먼저 온도가  $100^\circ\text{C}$  이하임을 확인하고 배기구를 열어서 멸균기 내의 수증기를 완전히 배출시킨 다음 뚜껑을 연다.
- 7) 증기멸균기 내의 물은 자주 갈아주고, 가압 장치이므로 폭발의 위험성에 주의한다.

## 바. 실습 순서

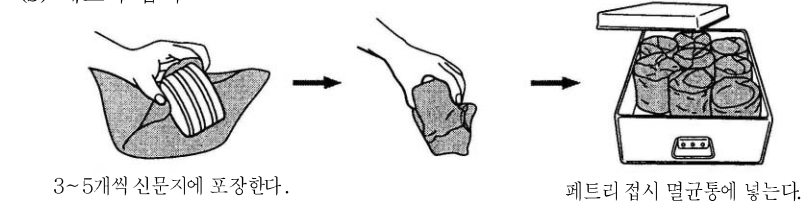
### 1) 기구 세척 및 멸균을 위한 준비

- 가) 새로운 시험관, 비이커, 페트리 접시(petri dish) 등은 거즈, 솔 등에 합성세제를 묻혀 닦고 충분히 물로 씻어 낸 후 건조기에 서 건조한다.
- 나) 피펫 세척시 합성세제를 따뜻한 물에 풀고 여기에 피펫을 잠기게 넣는다. 하루정도 지난 후 사이폰식 피펫 세척장치에서 충분히 물로 씻어내고 건조기에서 건조한다.
- 다) 핀셋, 가위 등의 금속제 기구는 불로 소독한 후 세제와 솔로 오물을 닦아내고 물로 충분히 씻어 건조기에서 건조한다.
- 라) 건조한 시험관이나 삼각 플라스크 등은 <그림 V-10>과 같이 적당한 크기의 솜으로 마개를 한다. 솜마개는 적당한 길이로 관 내부와 외부에 들어가고 나와 있어야 하며, 관외 부분을 잡아 시험관이 떨어지지 않을 정도로 꼭 막는다.
- 마) 페트리 접시는 적당한 매수를 포개어 신문지로 싼 후 페트리 접시 멸균통에 넣는다.
- 바) 피펫은 스테인레스강으로 만든 피펫 멸균통에 넣든가, 아니면 약 2cm 폭으로 자른 종이로 피펫 외부가 노출되지 않도록 말고 끝을 풀이나 멸균 테이프로 붙인다.
- 사) 자기 기구는 신문지 등으로 각각 포장한 후 테이프로 붙인다.

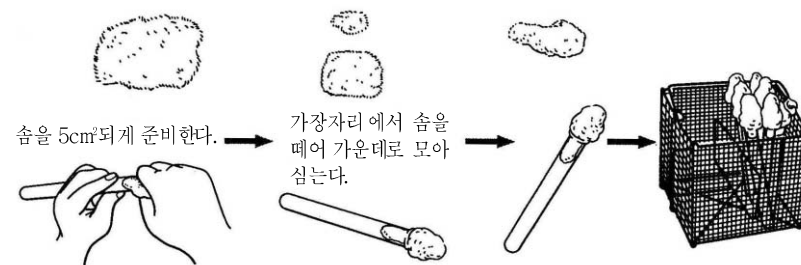
## (a) 피펫



## (b) 페트리 접시



## (c) 시험관



## (d) 자기 기구

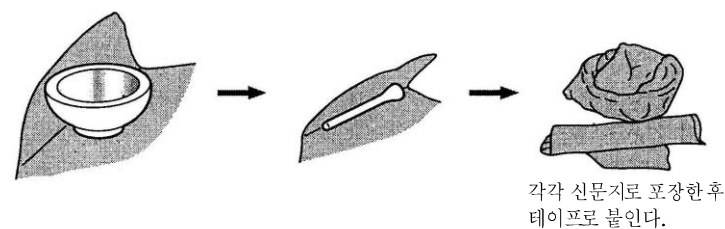


그림 V-10 멸균을 위한 포장

## 2) 건열 멸균

- 가) 멸균하려고 하는 기구(주로 유리 기구)를 내벽에 접촉하지 않도록 하여 전기용 건열 멸균기에 넣는다. 이 때, 종이나 솜마개 등은 벽에 접촉하면 멸균조작 중에 연소하는 수가 있으므로 조심스럽게 넣는다.
- 나) 전원을 넣어 멸균기의 온도를 높인다.

- 다) 온도가 160℃가 되면 열원을 고정시켜 30분간 가열을 계속하든지 또는 180℃까지 온도를 높여 곧 열원을 끈다. 이때, 멸균기 내의 온도는 200℃ 이상 상승시켜서는 안된다.
- 라) 멸균기 내의 온도가 100℃ 이하로 떨어질 때까지 기다려 멸균기의 문을 열어 내용물을 꺼낸다. 멸균 테이프 등을 이용하면 멸균 효과의 판정은 용이하다. 솜마개나 유리기구를 쓴 종이의 색이 약간 누렇게 되면 멸균된 것으로 판정한다.

## 3) 고압 증기멸균

- 가) 실습 전에 먼저 멸균기 속에 물이 충분히 있는지 확인하고, 적을 때는 보충해 준다.
- 나) 멸균하려고 하는 기구를 스테인레스강으로 만든 바구니에 가지런히 담아 고압 증기멸균기 (autoclave)에 넣는다. 이 때, 종이마개 또는 솜마개를 한 용기에 들어 있는 것을 멸균할 때에는 수증기의 의해 젖으면 잡균이 부착하기 쉬우므로 알루미늄 호일 등으로 마개부분을 덮어서 넣는다.
- 다) 뚜껑을 확실히 닫아 증기가 새지 않도록 하며, 고압에도 안전하게 견디도록 한다.
- 라) 가열 온도와 시간(일반적으로 121℃, 15~20분간)을 설정한 후, 전원스위치를 넣어 멸균기 내의 온도와 압력을 높인다. 이 때, 전원스위치를 넣은 후 처음에는 반드시 배기시키며 수증기 온도가 100℃부근에 도달한 후에 배기구를 닫아서 압력을 상승시킨다. 이는 처음에 기화된 수증기는 100℃에 도달해 있지 않은 경우가 많으므로, 멸균기 내의 압력은 상승하나 온도 상승이 여기에 수반되지 않아서 완전한 멸균이 되지 않기 때문이다.
- 마) 멸균시간을 정확히 유지한다.
- 바) 온도계의 눈금이 100℃ 이하임을 확인한 후에 내용물을 꺼낸다. 이 때에는 먼저 배기구를 열어 멸균기 내의 수증기를 완전히 배출시킨 다음에 뚜껑을 열고 내용물을 꺼낸다. 온도가 100℃ 이상일 때 배기구를 열면 압력의 급격한 저하로 인해 내용물이 액체일 때는 비등하여 용기 밖으로 새어나오는 경우가 있다. 또 알루미늄 호일과 같은 간단한 마개는 열리는 수가 있다.
- 사) 멸균기 내의 물은 자주 갈아서 깨끗하게 한다.

사. 실습 보고서

|       |   |
|-------|---|
| 실 습 일 | 200    년    월    일    요일    날씨:    기온:    ℃ |
| 실습단원  | 멸균 소독                                       |
| 실습제목  |   |
| 실 습 자 | 과    학년    반    번 이름:    조                  |

1) 기구 세척 및 멸균을 위한 준비

|                 |  |
|-----------------|--|
| 합성 세제로 세척한 기구는? |  |
| 건조기에서 건조시킨 기구는? |  |
| 솜마개를 한 기구는?     |  |
| 신문지로 싼 기구는?     |  |
| 멸균통에 넣은 기구는?    |  |

2) 건열 멸균

|   |  |
|---|--|
| 건열 멸균기에 넣은 기구는?                             |  |
| 멸균기의 가열온도와 시간은?                             |  |
| 멸균기에서 꺼냈을 때 멸균 테이프, 솜마개, 유리 기구를 싼 종이 등의 색은? |  |

3) 고압 증기멸균

|                      |  |
|----------------------|--|
| 고압 증기멸균기에 넣은 기구는?    |  |
| 고압 증기멸균기의 가열온도와 시간은? |  |

아. 수행 평가

| 실습명   | 항목            | 번호 | 항목별 채점 방법   | 배 점 |
|-------|---------------|----|---|-----|
| 멸균 소독 | 실험수행 전반       | 1  | － 실험복, 보고서철, 교과서, 실험 워크북, 계산기, 필기구, 자 등 실험에 필요한 준비물을 제대로 갖추었는가?<br>－ 기구 파손이 없고 실험 태도가 성실한가?<br>－ 실험기구를 용도에 적합하게 사용하는가?<br>－ 실험 후 사용한 기구나 실습실을 정리정돈 하였는가?<br><br>매우 우수: 10점, 우수: 8점, 양호: 6점, 보통: 4점, 불량: 2점, 매우 불량: 0점 | 10  |
|       |               |    |   |     |
|       | 기구 세척 및 멸균 준비 | 2  | 합성세제를 사용하여 멸균할 기구를 깨끗이 세척하였으면 5점, 그 외는 0점   | 5   |
|       |               | 3  | 솜마개를 만들어 시험관 입구에 제대로 끼웠으면 5점, 그 외는 0점   | 5   |
|       |               | 4  | 피펫, 페트리 접시, 자기 기구 등의 멸균할 기구를 올바르게 포장하였으면 10점, 그 외는 0점   | 10  |
|       | 건열 멸균         | 5  | 건열 멸균기에 멸균하려는 기구를 올바르게 넣었으면 5점, 그 외는 0점   | 5   |
|       |               | 6  | 건열 멸균기의 온도와 시간을 바르게 설정하여 멸균하였으면 5점, 그 외는 0점   | 5   |
|       |               | 7  | 멸균 후 주의사항을 지켜 내용물을 꺼냈으며, 멸균이 제대로 되었으면 10점, 그 외는 0점  | 10  |
|       | 고압 증기멸균       | 8  | 멸균 전 멸균기 속에 물을 충분히 채우고, 멸균하려는 기구를 올바르게 넣었으면- 5점, 그 외는 0점  | 5   |
|       |               | 9  | 고압 증기멸균기의 온도와 시간을 바르게 설정하여 멸균하였으면 5점, 그 외는 0점   | 5   |
|       |               | 10 | 멸균 후 주의사항을 지켜 내용물을 꺼냈으며, 멸균이 제대로 되었으면 10점, 그 외는 0점  | 10  |

|       |                    |       |        |
|-------|--------------------|-------|--------|
| 실 습 일 | 200    년    월    일 | 평가 결과 | 총    평 |
| 실 습 자 |                    |       |        |
| 지도교사  | (인)                |       |        |

## 자. 평가 문제

1) 다음 ( ) 안에 알맞은 말은?

( )은(는) 대상 물체에 존재하는 모든 미생물을 완전히 사멸시키거나 제거하는 조작을 말한다.

- ① 멸균                      ② 소독                      ③ 격리  
④ 폐쇄                      ⑤ 배양

2) 다음 중 미생물을 멸균할 때 사용하지 않는 방법은?

- ① 불꽃에 직접 태우기                      ② 건열(dry heat)로 가열하기  
③ 습열(moist heat)로 가열하기      ④ 자외선 쬔여주기  
⑤ 수돗물로 씻어주기

3) 건열 멸균 방법에 대한 설명으로 틀린 것은?

- ① 멸균하려고 하는 기구를 내벽에 접촉하지 않도록 하여 건열 멸균기에 넣는다.  
② 온도가 160℃가 되면 열원을 고정시켜 30분간 가열을 계속한다.  
③ 멸균기 내의 온도는 200℃ 이상 상승시켜서는 안된다.  
④ 멸균 후 즉시 멸균기의 문을 열어 자연 냉각시킨다.  
⑤ 솜마개나 유리기구를 싼 종이의 색이 약간 누렇게 되면 멸균된 것으로 판정한다.

4) 고압 증기멸균기를 이용하여 멸균할 때, 일반적으로 설정하는 멸균 온도와 시간은?

- ① 100℃, 1시간                      ② 100℃, 30분                      ③ 110℃, 1시간  
④ 121℃, 15분                      ⑤ 121℃, 1시간

5) 소독약의 종류를 5가지만 쓰시오.

## 차. 쉬어가기

### 미생물 염색의 원리

미생물은 대부분 무색투명하므로 광학현미경으로 이들의 형태와 배열상을 분별하기 위해서는 생물학적 염색과정을 거쳐야만 한다. 또한, 살아있는 미생물의 현미경적 관찰은 대단히 한정되어 있으므로 균을 사멸·고정시켜 염색 후에 관찰하는 것이 원칙이다.

미생물의 염색(staining of bacteria)은 일반적으로 세포의 모세관현상, 삼투압, 세포에의 부착과 흡수에 의한 물리적 작용과 세포 구성물과 염료 사이의 전기적, 화학적 친화력에 의해 염색된다.

미생물에 이용하는 대부분의 염색액은 벤젠( $C_6H_6$ )에서 유도된 아닐린(aniline)계 합성색소로 대부분 염(salt)으로 되어 있는 데, 색을 나타내는 이온은 크로모포어 그룹(발색군 : chromophore group)이다.

이 발색군이 메틸렌 블루(methylene blue)와 같이 양이온이면 염기성 색소라 하며, 에오신(eosin)과 같이 음이온이면 산성 색소라 한다.

염기성 색소는 해리되어 양(+)이온으로 하전되는 색소분자를 유리하며, 산성 색소는 그 반대로 음(-)이온으로 하전되는 색소분자를 유리한다.

세균의 균체에는 핵산이 다량 함유되어 있고, 그 인산기는 (-)하전이므로 (+)하전의 염기성 색소와 잘 결합하여 염색된다. 반면에 조직세포의 세포질은 (+)하전이므로 (-)하전의 산성 색소로 염색된다.

미생물 염색에 많이 사용되고 있는 색소로는 메틸렌 블루, 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 사프라닌(safranin), 푸신(fuchsin), 에오신 등이 있다.