

4. 미생물의 배지 제조

가. 실습 목표

- 1) 배지의 역할과 종류에 대해 설명할 수 있다.
- 2) 미생물의 종류에 따라 배양에 필요한 배지를 선택할 수 있다.
- 3) 각종 배지를 만들어낼 수 있다.

나. 실습 재료

숨(탈지하지 않은 것), 쇠고기 추출물(beef extract), 펩톤(peptone), 염화나트륨(NaCl), 한천(agar), 염산(1N-HCl), 수산화나트륨(1N-NaOH), 알루미늄 호일(aluminum foil)

다. 기기 및 기구

피펫, 시험관, 페트리 접시, 2L용 삼각 플라스크, 항온수조, 건열 멸균기, 고압 증기멸균기, 중탕냄비, 냉장고, 알코올램프, pH 미터

라. 관계 이론

1) 숨마개

멸균한 배지 또는 미생물이 들어 있는 시험관이나 삼각 플라스크의 입구는, 공기 중에 떠도는 미생물로부터의 오염을 막기 위해 숨마개를 한다. 숨마개는 미생물이 자라는데 필요한 공기와 수분은 자유로이 통과시키나, 그 외의 미생물, 미생물 포자 및 먼지와 같은 작은 물질은 통과시키지 않는 여과기의 역

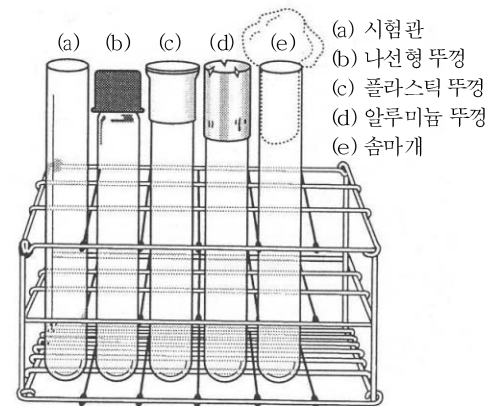


그림 V-11 각종 시험관 마개

할을 한다.

탈지한 숨은 물을 잘 흡수하여 쉽게 젖은 상태로 되어 오염의 원인이 될 수 있으며, 공기의 유통도 좋지 않으므로 탈지하지 않은 숨을 사용해야 한다.

근래에는 숨마개 외에 나선형 플라스틱 뚜껑, 금속제(알루미늄) 뚜껑 및 실리콘 마개 등도 사용되고 있다. <그림 V-11>에 널리 사용되고 있는 시험관 마개를 나타내었다.

2) 배지

미생물이 자라고 증식하는데 필요한 여러가지 영양분이 들어 있는 혼합물을 배지라 하며, 배지를 사용하여 미생물을 키우는 것을 배양이라 한다.

배지의 성분은 미생물의 종류 및 배양 목적에 따라 각각 다르지만 기본적으로 배지의 성분은 탄소원, 질소원, 무기 염류, 아미노산 및 성장인자로 이루어져 있다. 이들 성분의 농도 및 배지의 수소 이온 농도(pH)도 미생물이 자라는데 영향을 미치므로, 필요에 따라 조절해야 한다.

배지는 만드는 재료 및 배지의 물리적 상태에 따라 다음과 같이 나눌 수 있다.

가) 재료에 따른 배지의 종류

- (1) 천연 배지 : 여러가지 성분이 복합적으로 포함된 천연물을 재료로 사용한 배지이다. 재료로는 육즙, 펩톤, 효모 추출액, 엿기름즙 등이 많이 쓰이며, 미생물이 빨리 잘 자라는 반면, 배지의 정확한 화학적 성분은 알 수 없다. 일반적으로 미생물의 단순한 배양이나 미생물의 보존에 많이 쓰인다.



그림 V-12 합성배지 사진

- (2) 합성 배지 : 화학적 조성을 정확하게 알 수 있는 물질(예 : 탄소원으로 글루코스, 질소원으로 암모늄염 등)을 재료로 사용한 배지이다. 일반적으로 세균의 생화학적 성상검사, 균체 성분, 세균의 대사 연구 등에 많이 쓰인다.

나) 물리적 상태에 따른 배지의 종류

- (1) 액체 배지 : 한천이나 젤라틴 같은 고형화 물질을 넣지 않은 액체 상태의 배지로, 미생물의 대량 배양, 당분해 시험 및 미생물이 생산하는 각종 유용 물질의 검출과 연구에 많이 사용된다.
- (2) 고체 배지 : 액체 배지에 한천 또는 젤라틴을 1.5% 정도 섞어 고형화한 것과 밀기울, 찌쌀과 같이 재료 자체가 고체인 것이 있다. 주로 미생물의 분리, 보존, 형태 관찰 및 고체 배양에 사용된다. 일반적으로 한천이 가장 많이 사용되며, 실습목적에 따라 <그림 V-13>과 같이 사면 배지, 고층 배지, 반사면 배지, 그리고 평판 배지로 만들 수 있다. 사면 배지는 시험관에 배지가 약 45° 경사가 되도록 굳힌 것으로 호기성 미생물의 배양 및 보존에 많이 쓰인다. 만들 때 배지의 양이 너무 많거나 너무 비스듬히 놓아서 배지가 시험관의 입구 가까이 가면 오염의 원인이 될 수 있으므로 주의한다. 보통 시험관 길이의 $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$ 이 되도록 하는 것이 적당하다. 고층 배지는 시험관을 세운 채로 배지를 굳힌 것으로, 혐기성 미생물의 배양 및 보존에 많이 쓰인다. 반사면 배지는 고층 배지의 윗부분 $\frac{1}{3}$ 정도를 경사지게 만든 것으로 세균의 생물학적 성상 검사, 당분해 검사에 많이 쓰인다. 평판 배지는 페트리 접시에 두께가 4mm 정도 되게 배지를 넣어 굳힌 것으로 미생물의 순수 분리 및 형태 관찰에 많이 쓰인다. 이는 표면에 물기가 남아 있으면 배양 중에 미생물이 흘러 배지 표면 전체에 퍼지므로, 미생물을 분리할 수 없을 뿐 아니라 집락을 형성시킬 수가 없다. 이 배지는 솜마개를 한 시험관의 배지에 비하여 쉽게 오염이 되므로 실습하기 1~2일 전에 만들어 쓰는 것이 좋다.

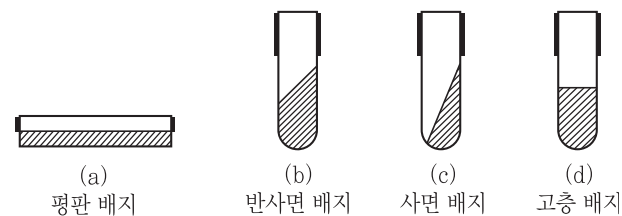


그림 V-13 고체 배지의 종류

마. 주의 사항

- 1) 미생물에 의한 오염을 방지하기 위하여 실습실과 실습대 및 실습 도구를 항상 청결히 한다.
- 2) 미생물이 손에 묻거나 배양액을 흘렸을 때에는 반드시 소독액 (70% 에틸알코올 용액 등)으로 씻어 내고, 실습이 끝난 후에도 비누 또는 소독액으로 손을 씻는다.
- 3) 실습에 사용한 미생물 및 배지는 반드시 멸균하여 버리도록 하며, 특히 한천 배지는 멸균한 다음, 뜨거운 물로 희석하여 버림으로써 하수구가 막히는 일이 없도록 한다.
- 4) 고압 증기멸균기, 건열 멸균기, 배양기 등 실습 기구는 올바르게 사용하여 화재, 폭발 등의 사고를 미연에 방지하도록 한다.
- 5) 배지가 녹을 때 거품이 일어 넘칠 수가 있으므로 제조 용량보다 2배 이상 큰 플라스크를 사용하여 녹인다.

바. 실습 순서

1) 솜마개 만들기

- 가) 솜마개를 하려고 하는 시험관 입구의 크기에 따라 솜을 적당한 크기의 사각형으로 자른다. 보통 크기의 시험관(15mm×170mm)인 경우 솜의 두께 1~2cm, 길이 8~10cm가 적당하다.
- 나) 사각형 솜의 가장자리를 조금씩 뜯어 가운데로 모아서 지름 2cm 정도의 단단한 심을 만든다.
- 다) 왼손으로 시험관의 입구를 잡고 오른손의 솜 끝 부분이 둥글게 되도록 하면서 시험관에 넣어, 시계 방향으로 가볍게 돌리면서 밀어 넣는다. 보통 크기의 시험관인 경우 안쪽으로 3~5cm, 바깥쪽으로 1.5~2cm 나오게 한다. 플라스크의 경우는 안쪽으로 3~5cm, 바깥쪽으로 2~3cm 나오게 한다.
- 라) 잘 만들어진 솜마개를 시험관에 끼운 채 건열 멸균기에 넣어 160℃에서 30분간 건열 멸균한다. 솜마개가 너무 단단하거나 헐거워도 좋지 않으며, 안쪽에 들어간 부분의 솜 층이 고르지 않거나 주름이 있으면 오염의 원인이 될 수 있다. 건열 멸균한 다음에는 솜마개의 모양이 고정되어, 솜마개를 빼도 흐트러지지 않는다.

2) 배지 만들기

가) 사면 배지

- (1) 솜마개를 끼운 시험관을 준비한다.
- (2) 증류수 1L에 쇠고기 추출물 3g, 펩톤 5g, 한천 15g, 염화나트륨 5g의 비율로 삼각 플라스크에 넣는다. 이 때, 배지를 만들 양의 반 정도의 증류수를 먼저 삼각 플라스크에 넣고 위 조성에 따라 필요한 내용물을 신속히 저울로 달아 넣어준 후, 나머지 양의 증류수로 기벽에 묻은 내용물을 씻어내는 식으로 플라스크에 넣는다.
- (3) 플라스크를 잘 흔들어 분말이 완전히 풀어지면, 끓는 물로 증탕 가열하여 내용물을 완전히 녹인다. 이 때, 가열하는 동안 유리봉으로 계속하여 저어준다.
- (4) 위의 용액을 50~60℃로 식혀 pH를 측정하여 1N-HCl이나 1N-NaOH로 pH를 조절하여 6.8로 한다.
- (5) 물증탕하여 녹인 배지를 시험관에 7~10mL씩 나누어 넣는다. 시험관에 넣을 때, 배지가 시험관의 입구 또는 솜마개에 묻으면 나중에 오염의 원인이 될 수 있으므로 주의하여 넣는다.
- (6) 배지를 넣고 솜마개를 한 다음, 솜마개의 겉을 알루미늄박으로 싸고, 고압 증기멸균기로 121℃(1.05kg/cm²)에서 15분간 멸균한다.
- (7) 멸균이 끝나고 고압 증기멸균기의 측정 압력이 완전히 0이 된 것을 확인한 다음 꺼내어, 한천이 굳기 전에 유리 막대나 나무 막대로 시험관을 받쳐 비스듬히 놓아 응고시킨다.

나) 평판 배지

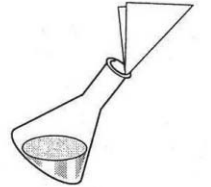
- (1) 건열 멸균기를 사용하여 160℃에서 30~60분간 멸균한 페트리 접시를 준비한다.
- (2) 가)의 (2), (3), (4)의 요령으로 배지 성분을 완전히 녹이고, pH를 6.8로 조절한다.
- (3) 알루미늄 호일이나 거즈망치로 삼각 플라스크의 뚜껑을 막고 고압 증기멸균기로 121℃(1.05kg/cm²)에서 15분간 멸균한다.
- (4) 삼각 플라스크 채로 멸균한 배지를 항온수조에 넣어 50~55℃ 정도로 식힌다.

- (5) 멸균한 배지를 페트리 접시의 뚜껑을 한쪽만 조금 열고 붓는다. 페트리 접시에 붓는 배지의 양은 15~20mL가 적당하다.
- (6) 배지를 부은 페트리 접시는 즉시 뚜껑을 덮고 배지가 굳을 때까지 그대로 둔다.
- (7) 배지의 표면이 어느 정도 건조된 다음 가능한 한 빨리 실습에 사용하거나, 한천이 완전히 응고된 페트리 접시는 오염을 방지하기 위하여 뒤집은 상태로 4℃ 냉장고에 보관한다.

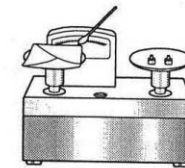
(a) 플라스크에 만들 양의 반 정도의 증류수를 넣는다.



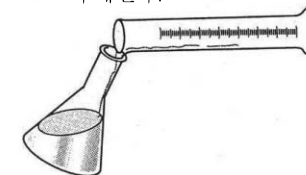
(c) 혼합 배지를 플라스크에 넣고 잘 섞어준다.



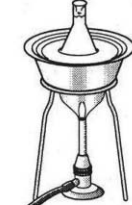
(b) 건조 혼합 배지는 흡습성이 매우 강하기 때문에 신속히 칭량한다.



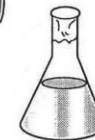
(d) 내벽에 붙어있는 배지도 남은 증류수로 완전히 씻어 내린다.



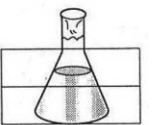
(f) 끓는 물로 증탕가열하여 혼합 배지를 완전히 용해시킨다.



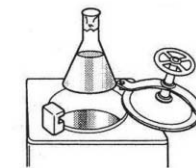
(e) 알루미늄 호일이나 솜뭉치를 거즈로 싸서 것으로 마개를 한다.



(g) 50~60℃가 되도록 배지를 식혀 pH를 확인하여 필요에 따라 조절한다.



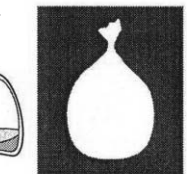
(h) 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.



(j) 페트리 접시에 뚜껑을 약간만 열고 15~20mL씩 분주한다.



(i) 항온수조에서 55~55℃가 되도록 배지를 식힌다.



(k) 한천이 완전히 응고된 후 봉지에 넣어 냉장고에 뒤집어서 보관한다.

그림 V-14 한천 평판배지의 제조 방법

사. 실습 보고서

실 습 일	200 년 월 일 요일 날씨: 기온: ℃
실습단원	미생물의 배지 제조
실습제목	
실 습 자	과 학년 반 번 이름: 조

1) 솜마개 만들기

사용 재료 및 기구는?	
건열 멸균기의 가열온도와 시간은?	
솜마개를 끼워 멸균한 시험관의 사진	

2) 배지 만들기

가) 사면 배지

사용 재료 및 기구는?	
1N-HCl 조제 방법	
1N-NaOH 조제 방법	
고압 증기멸균기의 가열온도와 시간은?	
만든 사면배지의 사진	

나) 평판 배지

사용 재료 및 기구는?	
고압 증기멸균기의 가열온도와 시간은?	
만든 평판배지의 사진	

아. 수행 평가

실습명	항목	번호	항목별 채점 방법	배 점
미생물의 배지 제조	실험수행 전반	1	－ 실험복, 보고서철, 교과서, 실험 워크북, 계산기, 필기구, 자 등 실험에 필요한 준비물을 제대로 갖추었는가? － 기구 파손이 없고 실험 태도가 성실한가? － 실험기구를 용도에 적합하게 사용하는가? － 실습 후 배지와 미생물은 멸균하여 버리고, 실습기구의 정리·정돈은 잘 하였는가?	10
			매우 우수: 10점, 우수: 8점, 양호: 6점, 보통: 4점, 불량: 2점, 매우 불량: 0점	
	솜마개 만들기	2	솜을 적당한 크기로 잘라 시험관에 끼울 솜마개를 제대로 만들었으면 5점, 그 외는 0점	5
		3	솜마개를 시험관 입구에 제대로 끼웠으면 5점, 그 외는 0점	5
		4	솜마개를 한 시험관을 건열 멸균기에서 제대로 멸균하였으면 10점, 그 외는 0점	10
	사면 배지 만들기	5	액체 배지를 만들 내용물을 빠짐없이 정량으로 넣어 주었으면 5점, 그 외는 0점	5
		6	액체 배지의 pH를 맞게 조정하였으면 5점, 그 외는 0점	5
		7	고압 증기멸균 후 주의사항을 지켜 배지를 꺼내고, 사면 배지가 제대로 완성되었으면 10점, 그 외는 0점	10
	평판 배지	8	페트리 접시를 건열 멸균하여 준비하였으면 5점, 그 외는 0점	5
		9	액체 배지를 삼각 플라스크에 넣고 고압 증기멸균하여 준비하였으면 5점, 그 외는 0점	5
		10	페트리 접시에 멸균한 액체 배지를 부어 평판 배지가 제대로 완성되었으면 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 말을 차례대로 나열한 것은?

미생물이 자라고 증식하는데 필요한 여러 가지 영양분이 들어 있는 혼합물을 () (이)라 하며, 이를 사용하여 미생물을 키우는 것을 () (이)라 한다.

- ① 배지, 배양 ② 배양, 배지 ③ 먹이, 증식
④ 먹이, 배양 ⑤ 먹이, 번식

2) 솜마개에 대한 설명으로 틀린 것은?

- ① 솜마개는 탈지한 솜으로 만든다.
② 솜마개는 미생물이 자라는데 필요한 공기와 수분은 자유로이 통과시킨다.
③ 솜마개는 미생물, 미생물 포자 및 먼지와 같은 작은 물질은 통과시키지 않는다.
④ 멸균한 배지 또는 미생물이 들어 있는 시험관이나 삼각 플라스크의 입구는 솜마개를 한다.
⑤ 근래에는 솜마개 외에 나선형 플라스틱 뚜껑, 금속제(알루미늄) 뚜껑 및 실리콘 마개 등도 사용되고 있다.

3) 다음 중 고체 배지의 종류에 해당되지 않는 것은?

- ① 평판 배지 ② 고층 배지 ③ 사면 배지
④ 합성 배지 ⑤ 반사면 배지

4) 배지 내용물을 증류수에 녹이고 물로 중탕 가열하여 액체 배지를 만들어, pH를 6.8로 조절하는데 사용되는 용액은?

- ① 1N-NaOH, 1N-HCl ② 1N-NaOH, 1N-KOH
③ 1N-HCl, 1N-H₂SO₄ ④ 1N-NaCl, 1N-HCl
⑤ 1N-NaCl, 1N-NaOH

5) 배지의 기본 성분에는 어떤 것들이 있는가?

차. 쉬어가기

폐수 처리

폐수는 인간활동과 각종 산업활동을 통해 끊임없이 생성된 후, 여러 경로를 거쳐 인간이 용수원으로 사용하고 있는 하천이나 호수, 지하, 바다 등으로 유입된다. 이러한 폐수를 처리하지 않고 자연 생태계에 방류하면 각종 질병과 불쾌감을 유발하는 등 많은 악영향을 인간에게 미치게 된다.

폐수 처리방법은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 분류된다.

이 중 물리화학적 방법은 스크리닝(screening), 침전, 흡착, 부상, 여과, 이온교환, 응집, 중화, 산화, 환원, 역삼투 등이 있으며, 주로 폐수 중의 부유물질이나 무기물을 제거하는 데 응용되고 있다. 그런데, 이 방법은 비용이 많이 들고 처리 후의 생성물을 재처리해야 하는 단점이 있다.

생물학적 방법은 주로 미생물을 이용하여 폐수 내의 오염물질을 분해, 해독 및 분리시키는 것으로 관여하는 미생물로는 세균, 균류, 조류, 원생동물 등이 있으며 일부 하등동물도 포함된다.

이 방법은 폐수 중의 오염물을 미생물의 대사작용(metabolism)을 통하여 이산화탄소, 물, 암모니아, 질산염, 황화수소(H₂S), 메탄(CH₄), 질소, 수소 등으로 분해, 안정화시켜 제거함으로써 처리 후 생성물의 양이 비교적 적게 된다.

생물학적 처리법은 도시생활 하수의 2차처리, 유기물을 함유한 공장폐수 및 이로 부터 생성되는 슬러지의 처리에 주로 사용되며, 비교적 저렴한 경비와 다양한 공정 등으로 널리 사용되고 있다.

생물학적 처리방법에서 미생물들은 크게 두가지의 생활 유형을 보이는데, 폐수 내에 균일하게 혹은 플락(floc)을 형성하여 부유생활을 하거나 또는 적당한 표면에서 부착생활을 한다.

이 방법은 산소의 이용 유무에 따라 호기성 처리와 혐기성 처리로 나뉘며, 호기성 처리에는 활성슬러지법, 살수여상법, 회전원판법, 산화지법 등이 있으며, 혐기성 처리에는 혐기성소화법, 정화조법 등이 있다. 이 중 가장 널리 사용되고 있는 방법은 활성슬러지법이다.