

## ◆ 4주차 : 배지제조법 - 보통배지, 표준한천배지

미생물은 이름에서도 알 수 있듯이, 크기가 매우 작기 때문에 현미경적 관찰 만으로  
는 그 성상을 확실히 파악할 수 없으므로, 미생물 연구를 위해서는 미생물의 배양이  
필수적이다.

따라서 적당량 영양성분을 혼합해서 미생물을 생존시키고 지속적으로 증식시키기  
위해서 인공적인 증식환경을 만들어 주게 되는데, 이것이 바로 배지(medium)이다.

배지에는 미생물 성장에 필요한 탄소원, 질소원, 무기 이온, 아미노산, 비타민, 생육  
인자 등 영양소가 적당히 함유되어 있으므로, 이것에 미생물을 접종하면, 증식하기  
시작한다.

배지는 미생물의 종류, 생리적 조건 또는 실험 목적에 따라서, 그 조성을 달리한다.

# 1. 배지 분류

## 1.1. 성분에 따른 분류

### 1) 천연배지(Natural medium)

배지의 주요 성분으로서 Peptone, 육즙 추출물 또는 맥아 추출물 등 천연물질을 사용하여 만든 배지로, 충분한 영양분은 함유하고 있으나, 각 성분의 양 및 종류 등을 정확하게 표시할 수 없는 것으로서 미생물 증식 및 분리 배양 등에 쓰인다.

### 2) 합성배지(Synthetic medium)

화학적 성분이 분명한 순수한 물질을 일정량 혼합하여 만든 것으로 구성성분의 화학적 조성 및 양을 정확하게 알 수 있다. 미생물의 생화학적 성상, 균체 성분, 미생물의 대사 및 유전 연구 등에 쓰이며 최소 영양배지라 한다.

## 1.2. 물리적 성상에 따른 분류

### 1) 액체배지(Liquid medium, Broth)

배지 내에 Agar를 첨가하지 않은, 액체 상태의 배지로 미생물의 증식, 당 분해 시험, 미생물의 생화학적 성상 검사, 대사산물 검출 등에 사용된다.

### 2) 고체배지(Solid medium)

액체배지에 배지 고형화를 위하여 Agar를 첨가한 배지로 고체상태이며 콜로니 형태 관찰, Pure culture 분리 또는 장기 보관에 이용된다.      형태로 구분하여,

-평판배지 : Petri dish에 고체배지를 약 4mm두께(15~20ml) 정도, 굳힌 것으로  
(Plate medium)      미생물 분리배양, 집락 관찰, 항생제 감수성 검사 등에 사용.

-사면배지 : 시험관에 고체배지를 약 30° 경사가 되도록 굳힌 것으로, 호기성인  
(Slant medium)      미생물 증식 및 보존, 세균의 생화학적 검사에 등에 사용.

-**고층배지** : 시험관에 **고체배지**를 **수직으로** 세운 상태로 굳힌 것으로, **미호기성균** (Stab medium) 이나 **혐기성균 배양**, 균주의 보존, **세균 운동성** 시험 등 사용.

### 3) **반고체배지**(Semisolid medium)

젤리 같은 **반고형상 배지**로 적은 양(0.3~0.5%)의 Agar가 함유되며, 세균의 설탕 이용성이나 **운동성**을 관찰하는 데 이용.



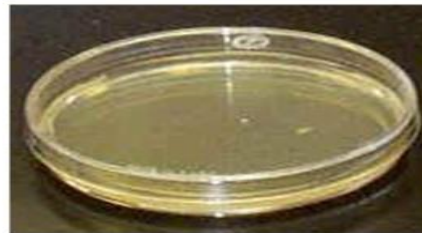
Broth

**액체배지**



Slant

**사면**



Petri plate

**평판**



Tall/ deep

**고층**



**반고체**

**고체배지**

### 1.3. 사용목적에 따른 분류

#### 1) 증식배지(Growth medium)

여러 종류의 영양소를 적당량 함유한 배지로 미생물의 증식, 순수배양, 보존 등 일반적인 배양에 쓰인다.

#### 2) 증균배지(Enrichment medium)

많은 미생물이 혼합된 경우 특정한 균종 만을 다른 균종 보다 빨리 증식시켜 분리 배양이 쉽게 되도록 한 배지이다. 배지 내에 원하는 미생물의 증식을 촉진하는 물질과 원하지 않는 미생물을 억제시키는 물질이 포함되어 있다.

#### 3) 선택배지(Selective medium)

두 종류 이상의 미생물이 혼합되어 있는 검체에서 원하는 미생물만을 선택적으로 분리 배양하는 데 사용하는 배지로, 색소, 중금속, 화학 약품, 항균제 등 원하지 않는 미생물의 증식을 억제하는 물질을 함유하고 있다.

#### 4) 감별배지(Differential medium)

순수 배양된 미생물의 **특정한 효소 반응**을 정성적으로 **확인**하여 **균종의 감별과 동정**을 하기 위한 배지로, **감별이 용이**하도록 **지시약** 등 **화학물질**을 **첨가**한다.

#### 5) 수송배지(Transport medium) 또는 보존배지(Preservative medium)

분리 배양하기 전까지 시간이 늦어져 **보존**하거나, **검사 재료**를 **수송**할 때 사용하는 배지로, **검사 재료 중의 미생물이 너무 많이 증식**하거나 또는 **사멸되지 않도록** 만든 배지이다.

## 2. 배지 주요성분

### 2.1. 펩톤(Peptide)

탄소원 및 질소원으로 가장 많이 사용되며, 거의 모든 배지에 함유되어 있다. 동물의 근육, 간, 혈액이나 Casein, Gelatin, 대두 등의 단백질을 Pepsin, Trysin, Pancreatin 등의 단백질 가수분해 효소로 분해하여, 건조 분말로 만든 것으로 원료 및 제법에 따라 약간에 조성의 차이가 있지만, 아미노산과 Peptide 등의 가용성 질소화합물이 주성분이다.

### 2.2. 육즙 추출물(Beef extract, Meat extract)

소 또는 말의 근육 부분의 수용성 추출물을 농축, 건조하여 분말 상태로 만든 것으로 아미노산, Peptide 외에 유기산류, 인산, 비타민류 등을 함유하고 있어 많은 미생물의 발육에 적당하다.

### 2.3. 효모 추출물(Yeast extract)

효모에서 추출한 수용성 침출 물질들을 농축시킨, 담황색 분말로서, 아미노산, Peptide, Glycogen, Trehalose, 핵산류, 비타민류를 다량 함유하여 세균 발육에 좋다.

### 2.4. 맥아 추출물(Malt extract)

맥아를 당화, 여과시킨 것으로 Maltose 등의 당을 많이 함유하고 있어 곰팡이 및 효모 배양에 적합하다.

### 2.5. 감자즙(Potato extract)

감자의 수용성 추출물에 Glucose를 첨가한 것으로 곰팡이, 효모 배양에 좋다.



## 2.6. 혈액 및 혈청(Blood & Serum)

혈액은 단백질 이외에도 많은 영양 성분을 함유하고 있는 중요 배지 재료이다.

## 2.7. 담즙 및 담즙산염(Bile & Bile salt)

신선한 담즙, 담즙 분말 또는 담즙산염을 배지에 첨가하여, 균의 증식을 억제하거나 촉진하는 증균 배지나 감별 배지 조제에 쓰인다.

## 2.8. 한천(Agar)

해조류에서 추출한 다당체(Agarose, Agaropectin)로 고도의 Gel화 능력을 갖고 있으며, 냉수에는 녹지 않고, 90~95°C 로 가열하면 녹지만, 용해 후에 40~45°C 에서 응고된다.

Agar는 영양분을 함유하지 않을 뿐만 아니라, 미생물에 의해서 가수 분해되지 않기 때문에, 배지 고형화제로 매우 적합한 성분으로 배지 중의 첨가량은 1.5~2.0%가 일반적이다.

## 2.9. 젤라틴(Gelatin)

동물의 뼈, 피부, 인대 등을 물로 가열 추출하여 건조시킨 황갈색의 입자 또는 분말로 일명 아교라고도 한다.

세균학 발달 초기에는 고체 배지에 이용하였으나, 용해온도가 37°C 이하이고, Gelatin을 소화시키는 세균이 있으므로

현재는 고형화제로 사용하지 않고, 단백질 분해 시험중 의 하나인 Gelatin 시험에만 사용한다.

### 3. 배지 제조

배양하고자 하는 **미생물의 종류**에 따라 **가장 적합한 배지**를 선택하여 사용하여야 하며, **미생물 종류와 배지의 구성성분**에 따라 **배지제조법**이 달라질 수 있다.

일반적으로 **배지**를 제조할 때 기본적인 **주의사항**은 다음과 같다.

- 1) 배지를 담을 **유리용기**는 **깨끗**해야 한다.
- 2) **특별히 언급한** 경우가 아니면 **증류수**를 사용한다.
- 3) 배지 내용물은 **정확히 무게**를 달아 **언급된 순서**대로 첨가한다.
- 4) **상품화된 배지**는 신뢰할 수 있는 제조회사의 제품을 사용하고, **보관방법, 보관기간, 제조방법** 및 **멸균방법** 등을 지켜야 한다.
- 5) 배지를 만들 때는 **너무 장시간 가열**하거나, **필요 이상의 온도나 압력**을 가하면 **배지성분이 파괴**된다
- 6) pH meter로 배지의 **적정 pH**를 맞춰야 한다.

- 7) 중탕 또는 가열하여 녹인 배지는 투명해야 하며, 필요한 경우 여과지로 여과하여 사용한다.
- 8) 한천배지의 제조시에는 미리 중탕하여 녹인 다음 고압증기 멸균을 실시한다.  
배지가 녹을 때 거품이 일어 넘칠 수 있으므로, 배지 용량 보다 2배 이상 큰 Flask를 사용하여야 한다.
- 9) 시험관에 배지를 부을 때는, 시험관 벽 위 부분에 배지가 묻지 않도록 한다.
- 10) 시험관을 막은 면전은, 멸균 시 수증기의 압력으로 빠지지 않도록 단단하게 막는다.

## ◆ 보통배지(Nutrient Broth) = 육즙배지, [액체배지 제조]

### 1. 재료 및 기구

1.1 재료 : Nutrient broth, 증류수, 1N HCl, 1N NaOH

1.2 기구 : 약수저, 저울, 매스실린더, 비이커, 삼각 Flask, pH meter, Autoclave

### 2. 실험방법

2.1 Nutrient broth 8~13g(배지통 확인)을 2L 삼각flask에 넣고 1L 증류수 가한다.

2.2 가열식 자력 교반기 100'C에서 배지 용해시킨다.

2.3 1N HCl 또는 1N NaOH를 이용 pH 7.0~7.4로 조절한다.

2.4 삼각 Flask 또는 시험관에 분주 및 면전을 한다.

2.5 Autoclave에서 121'C, 15분간 멸균한다.

2.6 액체배지로 온탕조 50~55'C 보관한다.

## ◆ 젖산균 MRS 배지(Lactobacilli MRS Broth) [액체배지 제조]

### 1. 재료 및 기구

1.1 재료 : Lactobacilli MRS Broth, 증류수, 알루미늄 호일

1.2 기구 : 약수저, 저울, 비이커, 삼각 Flask, Stir-bar, 가열 자력교반기, Autoclave

### 2. 실험방법

2.1 Lactobacilli MRS Broth 27.5g(배지통 확인)을 1L 삼각flask에 넣고 0.5L 증류수가한다.

2.2 가열식 자력 교반기 위에서 배지를 가열시키면서 용해시킨다.

2.3 가열시 배지를 스트로 바를 이용하여 교반하여, 균일하게 용해한다.

2.4 삼각 Flask 또는 시험관에 분주 및 알루미늄 호일(면전)로 입구를 막는다.

2.5 Autoclave에서 121'C, 15분간, 15PSI에서 멸균한다.

2.6 액체배지로 온탕조 50~55'C 보관한다.

◆ **표준한천배지(Plate Count Agar) = 최대영양배지, [고체배지 제조]**  
(=Standard Methods Agar)

1. 재료 및 기구

1.1 재료 : Standard Method Agar, 증류수, 알미늄 호일

1.2 기구 : 약수저, 저울, 비이커, 시험관, 패트리디쉬, 알코올램프, 삼각Flask,  
Magnetic Stir-bar, 가열식 자력교반기, Autoclave

2. 실험방법

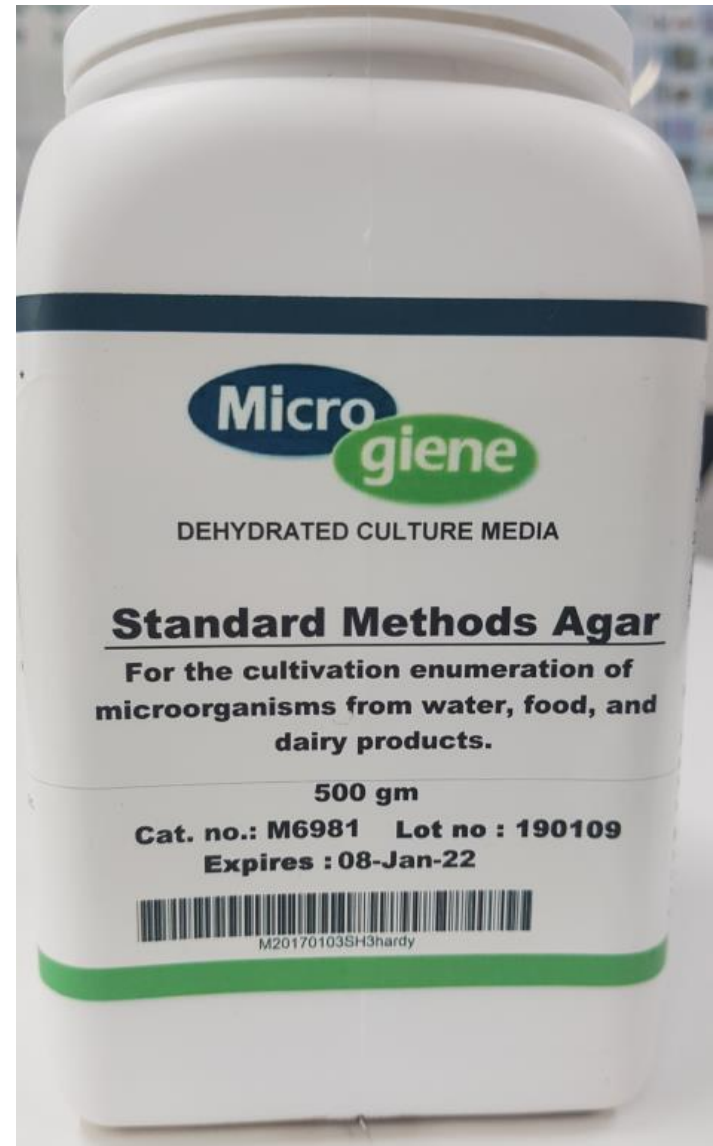
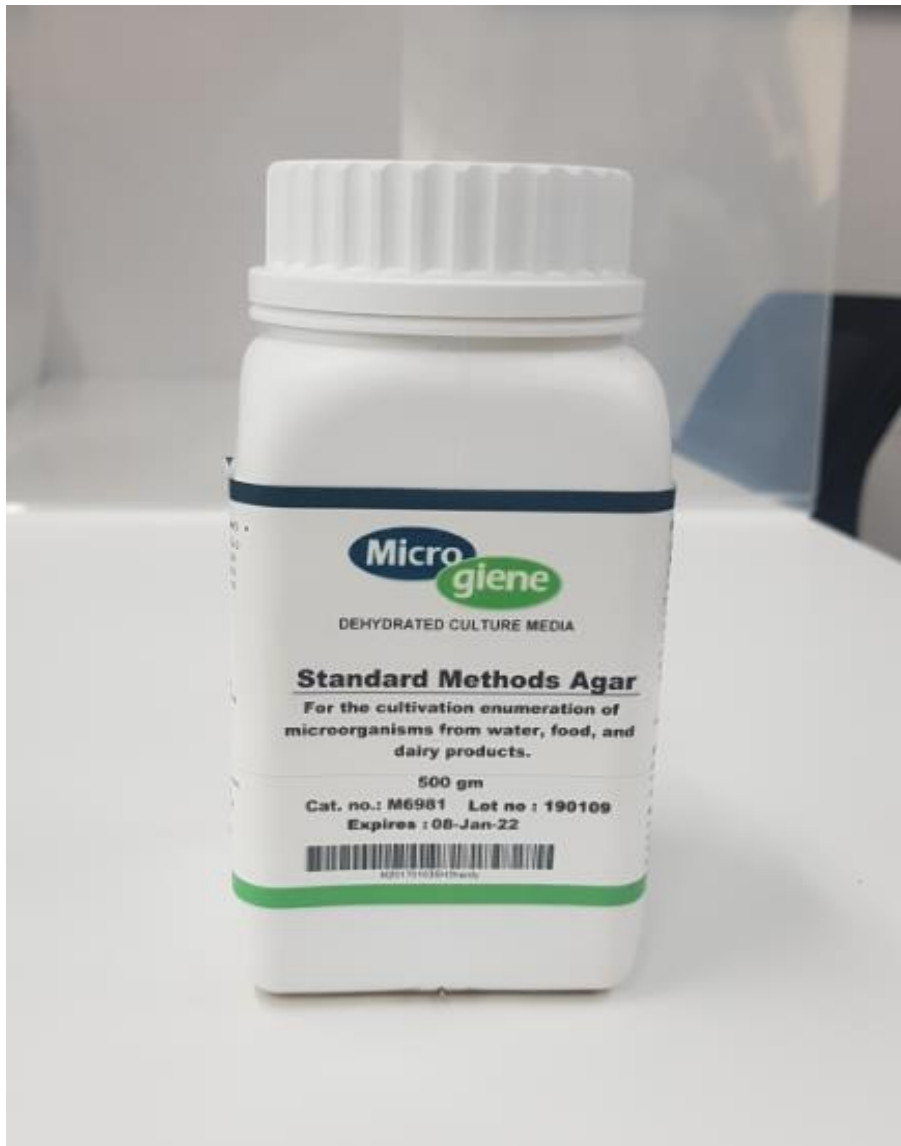
2.1 Standard Method Agar 23.5g을 2L 삼각flask에 넣고 1L 증류수 가한다.

2.2 가열식 자력 교반기 위에서 가열시키면서 배지를 용해시킨다.

2.3 시험관에 분주 및 호일로 입구를 막는다.(필요시 pH 6.8~7.2 로 조절)

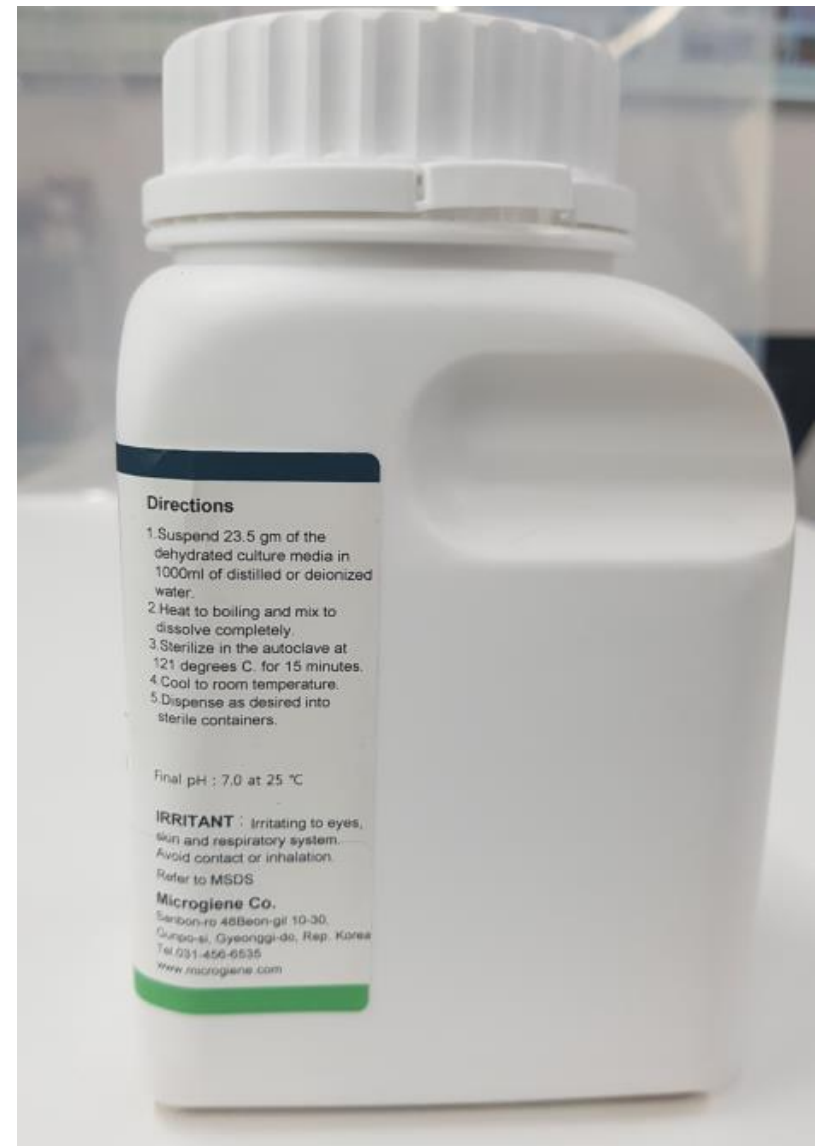
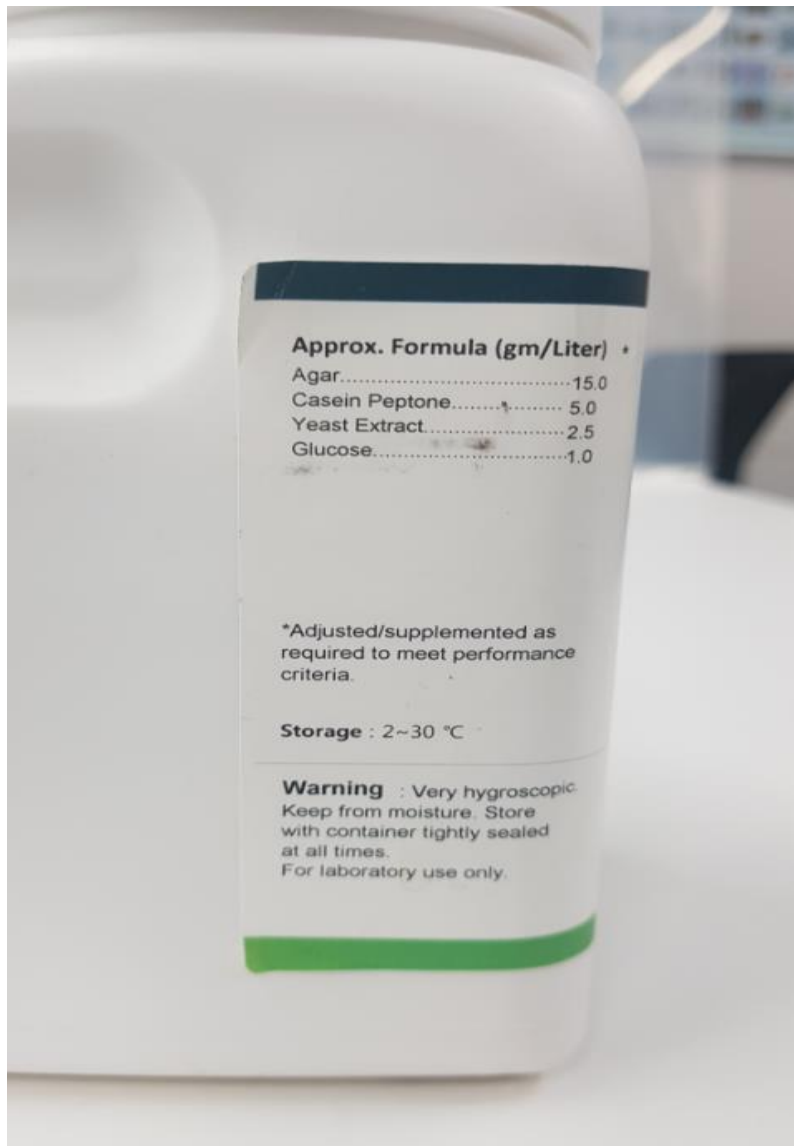
2.4 Autoclave에서 121°C, 15분간, 15PSI 멸균한다.

2.5 온탕조 50~55°C 보관하면서 평판, 사면, 고층 배지별 접종 준비한다.



- Standard Method Agar 배지를 준비한다





## ▪ Standard Method Agar 사용법을 확인한다



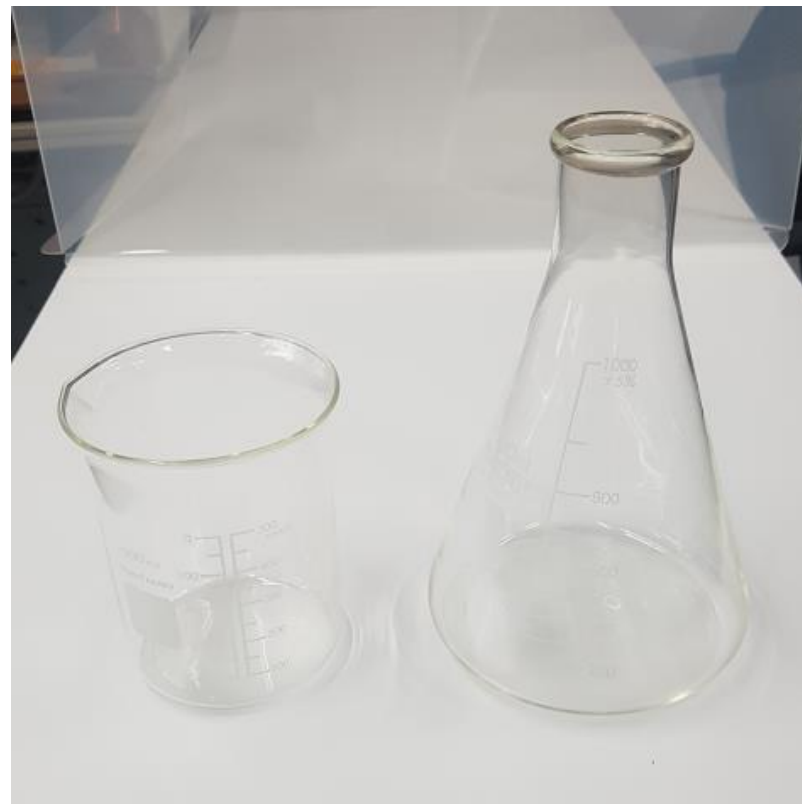
- 증류수를 준비한다



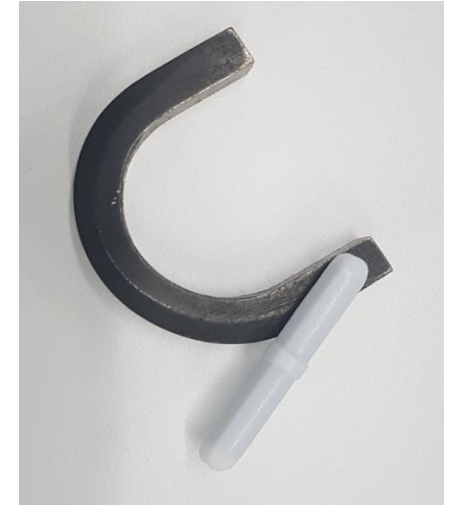
- 저울을 준비한다



- 가열식 자력교반기를 준비한다



- 삼각 플라스크, 비이커를 준비한다



- 약수저, 마그네틱, 스트로바, 알루미늄 호일을 준비한다



- 시험관, 패트리디시, 알코올 램프를 준비한다







- 배지 11.75g을 증류수 500ml에 용해하기 위해서 저울로 계량한다



- 배지 11.75g를 증류수 500ml에 용해를 준비한다



- 준비된 배지를 삼각 플라스크에 투입한다





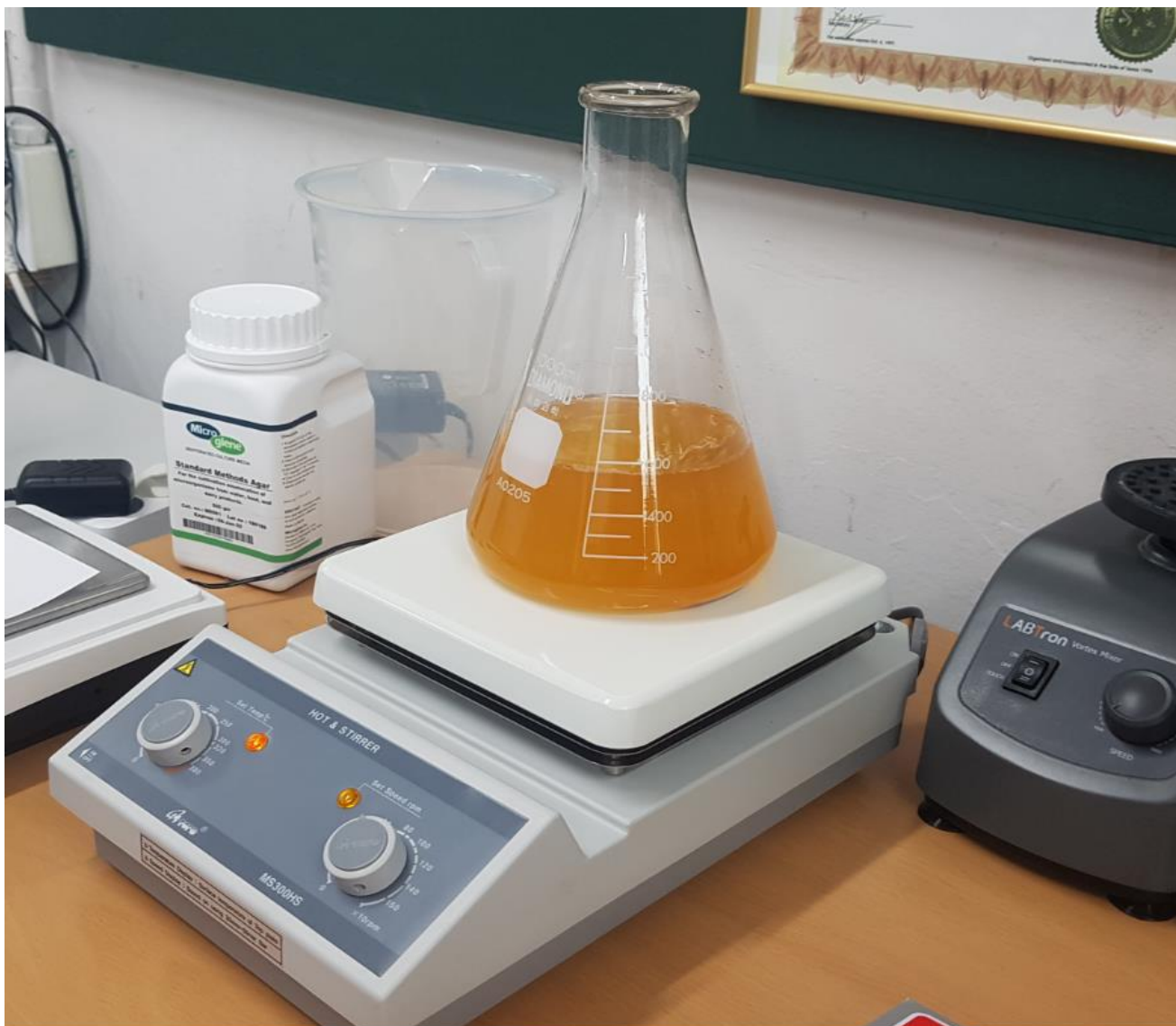
- 증류수 500ml을 준비한다



- 증류수 500ml를 삼각 플라스크에 투입한다



- 스크로바를 삼각 플라스크에 투입하고 가열식 자력교반기에 올려 균일하게 용해한다



- 스크로바를 적정 속도로 맞추고 가열식 자력교반기는 100°C 수준에서 용해한다





- 용해가 완료되면 마그네틱트를 이용하여 스크로바를 제거한다

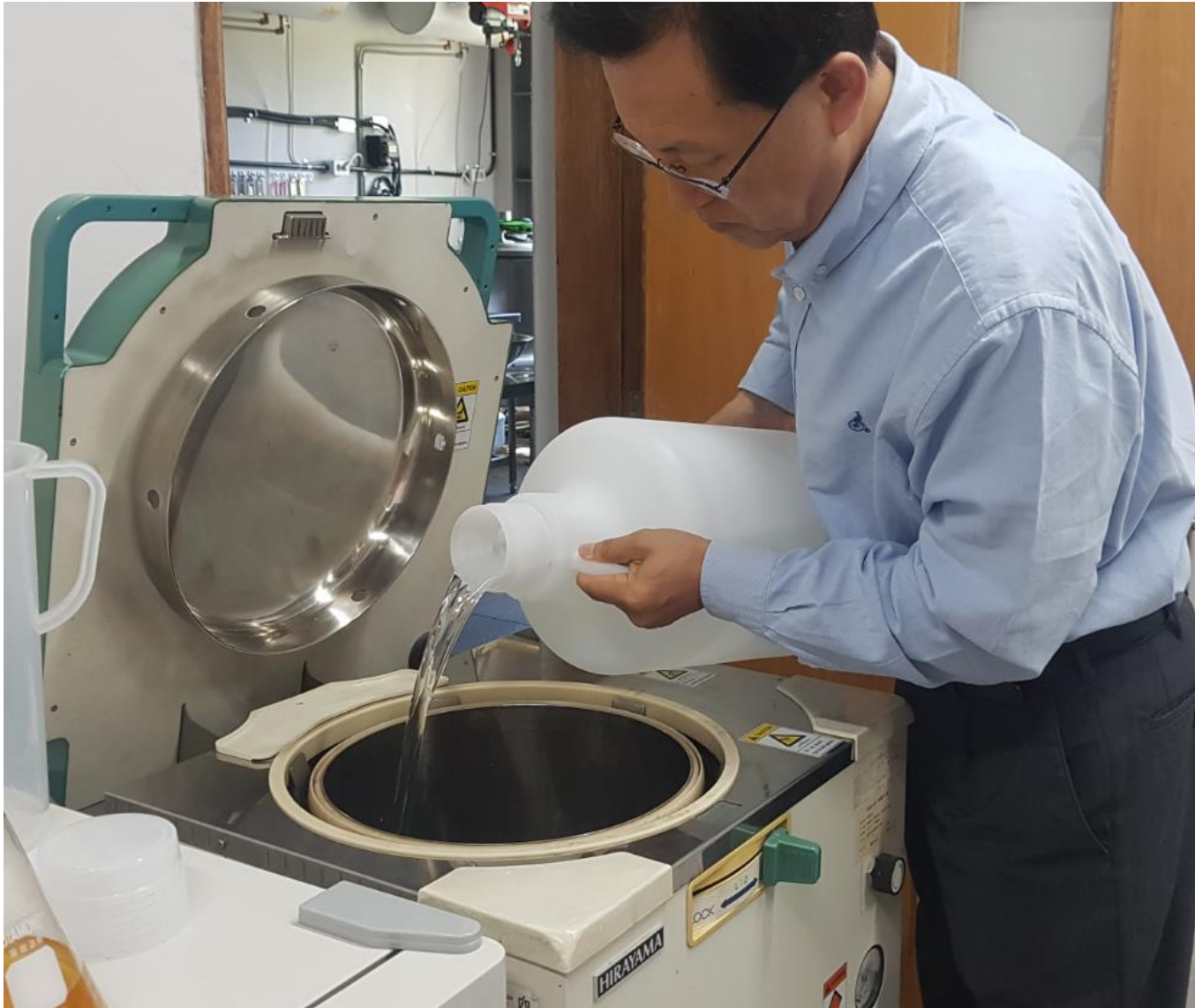


- 삼각 플라스크 입구를 알루미늄 호일로 막아 준다



- 배지 멸균을 위한 오토클레브를 준비한다

KWANBAE KIM의 허가.승인 없이 무단 전제.복제 금지합니다



- **오토클레브 내부에 증류수를 (약 4L, 기종마다 다름) 투입한다**

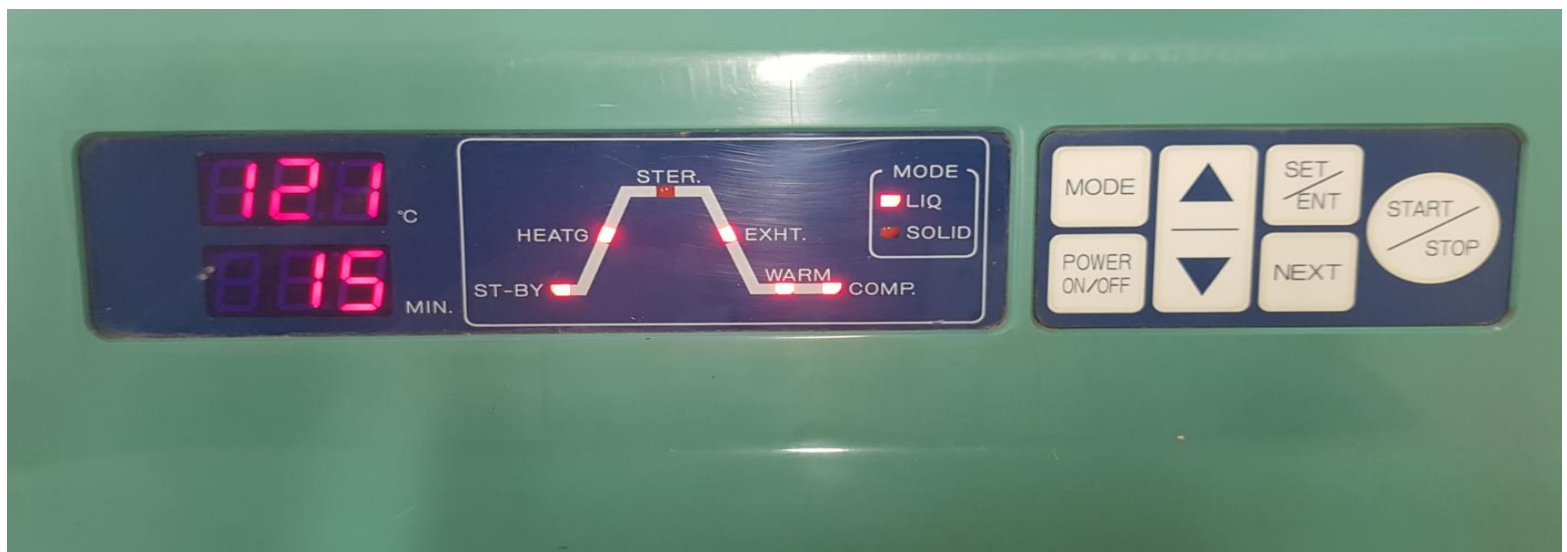




- 준비된 배지를 철망용기에 투입한다

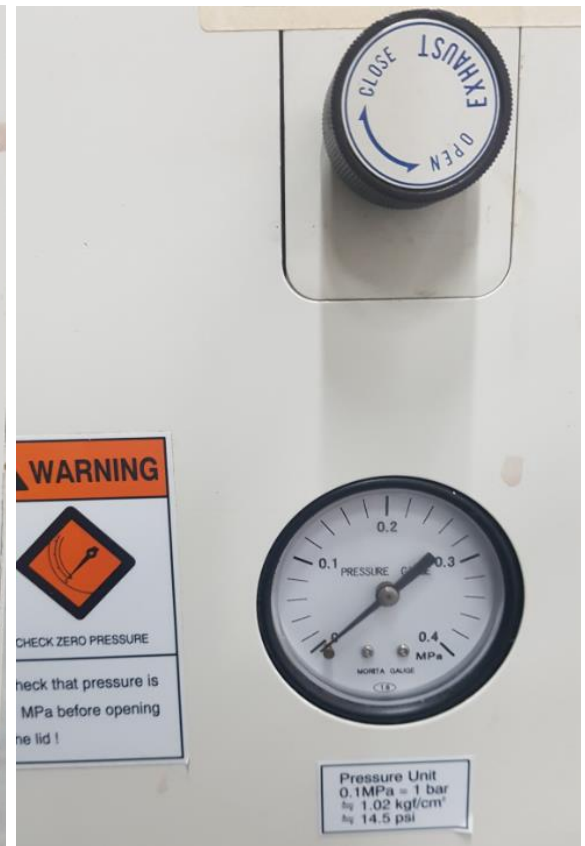


- 배지가 투입된 철망용기를 오토클레브에 투입한다



- 오토클레브에 밀폐한 후, 121°C, 15분, 15PSI를 셋팅한다

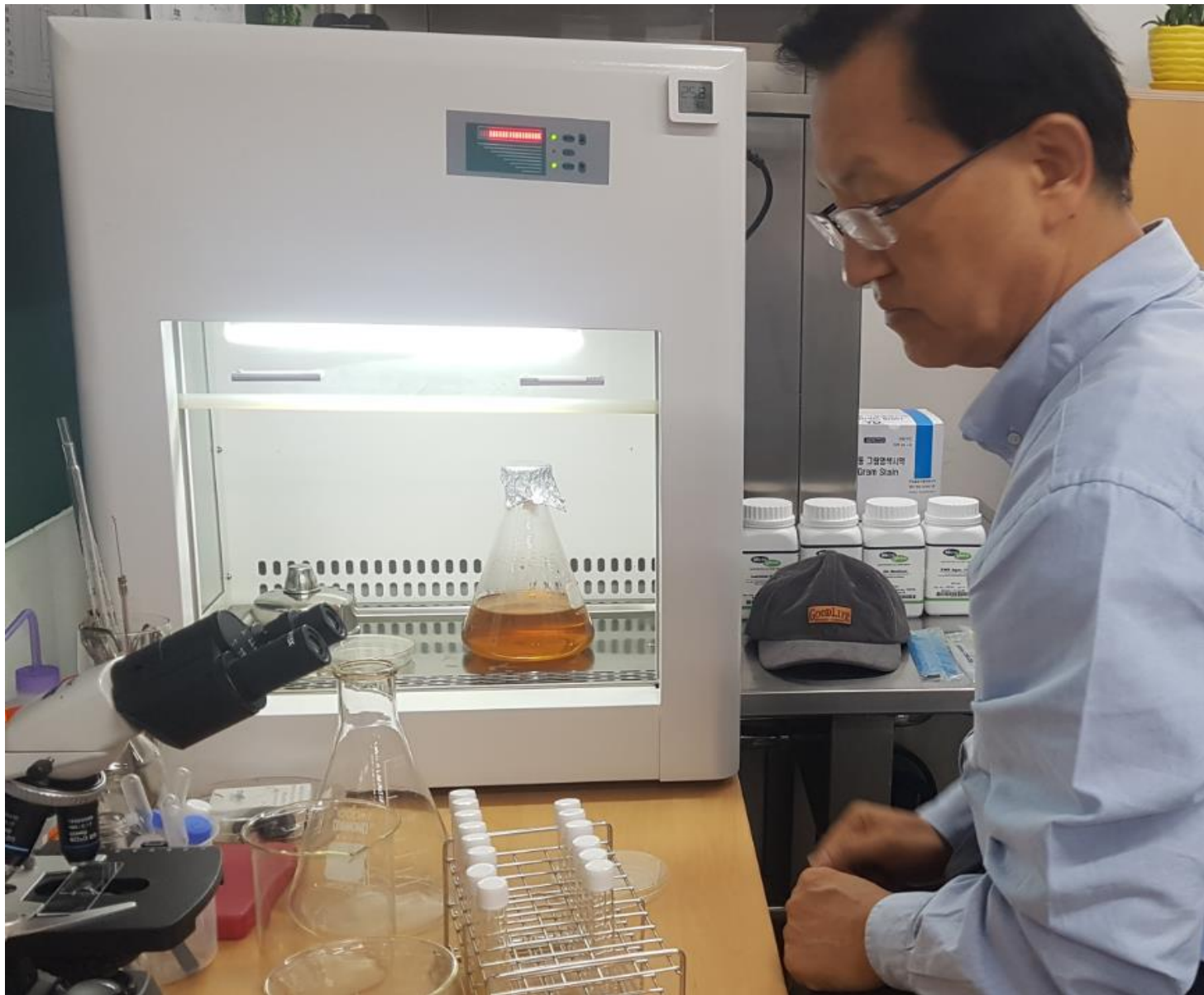




- 오토클레브 압력계는 멸균 전 0PSI, 멸균 중 15PSI, 오토클레브 오픈 전 0PSI를 반드시 확인한다



- 오토클레브를 열어 배지를 꺼낸다. 뜨거운 상태이므로 50°C 이하에서 실시한다.



- 멸균된 배지 삼각 플라스크는 클린벤치 내에서 분주를 준비한다.



- 고체배지 이므로 응고되기 전에 패트리디시와 시험관에 분주한다.





- 분주시 시험관 입구를 알코올 램프를 이용하여 화염 멸균을 실시한다





- 시험관을 30' 정도 경사로 응고시켜 사면배지를 만들고 클린벤치 내부 정리한다

**감사합니다 !**