

필요한 시액 및 배지 (자세한 사항은 제7.4.4 배지 및 시액 참조)

희석액

멸균인산완충희석액 (시액 1) : R112520

멸균생리식염수 (시액 2) : BR0053G

Ringer Solution Tablets, 100tabs (BR0052G)

Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A (BR0014G)

표준한천배지(배지 1) : CM0463B

세균수 측정법은 일반세균수를 측정하는 표준평판법, 건조필름법 또는 자동화된 최확수법(Automated MPN)을 사용할 수 있다.

4.5.1 일반세균수

가. 표준평판법

표준한천배지에 검체를 혼합 응고시켜 배양 후 발생한 세균 집락수를 계수하여 검체 중의 생균수를 산출하는 방법이다.

1) 시험조작

- ① 4.3. 제조법에 따라 시험용액을 준비하고, 10배 단계 희석법으로 희석한 각 단계 희석액을 준비한다.

검액을 가하지 아니한 동일 희석액(대조시험액)은 시험조작의 무균여부를 확인한다.

- ② 시험 용액 및 단계별 희석액 1ml씩을 멸균 페트리 접시 (시험용액당 2매 이상)에 첨가한다.

- ③ 제조하여 약 43~45°C로 유지한 표준한천평판 배지(배지 1) 약 15 mL를 무균적으로 분주한다.

페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 조용히 회전하여 좌우로 기울이면서 검체 배지를 잘 혼합하여 응고시킨다.

- ④ 배지 3~5 mL를 가하여 중첩시키고 응고시킨다. (확산집락 발생 억제)

검체를 취하여 배지를 가할 때까지의 시간은 20분 이상 경과하여서는 아니 된다.

- ⑤ 응고시킨 페트리접시는 뒤집어 35±1°C에서 48±2시간(시료에 따라서 30±1°C 또는 35±1°C에서 72±3시간) 배양한다.

집락수의 계산은 확산집락이 없고 1개의 평판당 15~300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하는 것을 원칙으로 한다. 검액을 가하지 아니한 동일 희석액 1ml를 대조시험액으로 하여 시험 조작의 무균 여부를 확인한다.

2) 집락수 산정

배양 후 생성된 집락수를 신속히 계산한다. 부득이할 경우에는 5°C에 보존시켜 24시간 이내에 산정한다. 집락수의 계산은 확산집락이 없고(전면의 1/2이하 일 때에는 지장이 없음) 1개의 평판당 15~300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하는 것을 원칙으로 한다. 전 평판에 300개 초과 집락이 발생한 경우 300에 가까운 평판에 대하여 밀집평판 측정법에 따라 계산한다. 전 평판에 15개 미만의 집락만을 얻었을 경우에는 가장 희석배수가 낮은 것을 측정한다.

3) 세균수의 기재보고

표준평판법에 있어서 검체 1 mL 중의 세균수를 기재 또는 보고할 경우에 그것이 어떤 제한된 것에서 발육한 집락을 측정할 수치인 것을 명확히 하기 위하여 1평판에 있어서의 집락수는 상당 희석배수로 곱하고 그 수치가 표준평판법에 있어서 1 mL 중(1 g 중)의 세균수 몇 개라고 기재보고하며 동시에 배양온도를 기록한다. 숫자는 높은 단위로부터 3단계에서 반올림하여 유효숫자를 2단계로 끊어 이하를 0으로 한다.

1) 15~300CFU/plate인 경우			2) 15CFU/plate 미만인 경우				
구분	희석배수		CFU/g(mL)	구분	희석배수		CFU/g(mL)
	1:100	1:1,000			1:10	1:100	
집락수	232	33	24,000	집락수	14	2	120
	244	28			10	1	
$N = (232+244+33+28) / \{((1 \times 2) + (0.1 \times 2)) \times 10^{-2}\}$ $= 537 / 0.022 = 24,409 = 24,000$			$N = (14+10) / ((1 \times 2) \times 10^{-1})$ $= 24 / 0.2 = 120$				
$N = \frac{\sum C}{(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times d}$							
<p>N= 검체 g 또는 mL 당 세균 집락수 ΣC = 모든 평판에 계산된 집락수의 합 n1 = 첫 번째 희석배수에서 계산된 평판수 n2 = 두 번째 희석배수에서 계산된 평판수 d = 첫 번째 희석배수에서 계산된 평판의 희석배수</p>							

4) 식육의 세균수 산출 방법

- 소 및 돼지 도체의 경우 균수는 도체 표면적당 집락수(CFU/cm²)로서 환산되어야 한다. 희석배수 × 10(배지 접종량이 0.1 mL일 경우) × 집락수 × 25(재료 채취 용량)/10 cm × 10 cm(1개부위 채취인 경우, 단 3개 부위를 채취할 경우는 300 cm²로 나누어 준다)로 산출한다.
- 닭의 경우는 mL당으로 집락수를 환산한다.
- 기타 시료는 집락수 × 희석배수로 mL당 또는 g당 세균수를 산출한다.

나. 건조필름법 : 공전 참고

다. 자동화된 최확수법(Automated MPN)

우유류, 유당분해우유, 가공유(무지유고형분 5.5% 미만인 제품 제외), 조제유류, 분유류, 소 도체, 돼지 도체, 닭 도체, 오리 도체에 한한다.

4.5.2 총균수

주로 원유 중 오염된 세균을 측정하기 위하여 일정량의 원유를 슬라이드그라스위에 일정면적으로 도말하고 건조시켜 염색한 후 현미경으로 검경하고 염색된 세균수를 측정한다. 측정된 세균수를 현미경 시야 면적과의 관계에 따라 검체 중에 존재하는 세균수를 측정하는 방법(직접현미경법: Breed method)이다. 자세한 사항은 공전 참고