

발 간 등 록 번 호
11-1380644-000018-14

원유검사 표준화 요령

농 림 부
국립수의과학검역원



머리말

축산물의 안전한 생산과 공급이 국가적인 차원에서 다루어지고 있는 국제적인 여건을 고려해 볼 때 낙농제품의 수입개방에 적극 대처하고 지속적인 성장을 유지하기 위해서는 낙농가의 생산성 향상을 통한 경제력 제고의 필요성이 급격하게 대두되고 있습니다. 특히, 우유에는 모든 사람들의 건강에 필요한 영양분이 골고루 포함되어 있어 “신이 인간에게 주신 가장 완전한 식품”으로 평가되고 있으며, 우리나라에서도 국민의 주요한 식품으로 일컬어지고 있는 시점에 우유의 위생관리시스템은 국민건강에 매우 중요합니다.

우유는 이처럼 사람의 건강유지를 위하여 매우 중요한 식품인 반면 미생물에게도 좋은 영양공급원이기 때문에 대부분의 국가에서는 우유의 품질 향상을 위하여 세균수, 체세포수, 유성분 중 지방, 단백질 또는 무지고형분, 항생물질, 가수, 집유온도 등에 따라 장려금, 벌과금, 폐기처분 등의 조치를 취하는 철저한 원유검사제도를 수행하고 있습니다. 우유의 품질은 지방, 단백질, 탄수화물, 비타민, 무기물 등의 영양소 함량이 많을수록 높아 평가되지만 복장별로 그 차이는 미미하고, 세균수, 체세포수, 세균억제물질의 함유 정도가 최종 제품의 품질을 결정하기 때문에 최근에는 영양적 측면보다는 위생적 측면이 더욱 중요하게 평가되고 있습니다.

위생적 측면의 유질 향상은 목장 관리에서부터 출발되기 때문에 낙농선진국에서는 오래 전부터 낙농가로 하여금 원유의 위생적인 처리를 목적으로 위생등급에 따라 원유가를 다르게 적용하는 차등지급제를 실시해 왔습니다. 국내에서도 1993년 6월 1일부터 세균수 5단계, 체세포수 4단계 등급으로 설정하여 유대차등지급제를 실시하였습니다. 하지만 높아진 소비자의 위생수준에 부응하기 위해서 모든 유제품의 원료가 되는 원유의 품질이 지속적으로 향상되지 않으면 안 되기 때문에 국내에서도 국제적인 원유위생등급 수준을 고려하여 체세포수와 세균수에 의한 유대 차등지급제를 더욱 강화하였으며, 낙농진흥법을 개정하여 집유일원화와 검사공영화를 실시하였습니다. 그 결과 세균

수는 크게 감소하여 2001년 현재 전체 농가의 90% 정도가 세균수 10만 미만의 1등급 원유를 생산하고 있습니다. 체세포의 경우도 위생등급제 실시 이후 지속적으로 향상되고 있지만 여전히 전체 농가의 30% 이상이 50만 이상의 3등급 원유를 생산하고 있어 유질 개선에 대한 필요성은 계속해서 대두되고 있습니다. 특히 최근에는 젖소 농가의 전업화와 대규모화 경향으로 농가별 평균 사육두수가 증가하면서 개체별 관리의 한계를 보이며, 또한 적극적인 유방염 방제프로그램 적용 없이 체세포수가 높으면 단순히 항생제로 치료해 보고 치료에 반응이 없으면 도태를 시키는 방향으로 대처하다보니 젖소 평균 수명이 2.5살 이하를 나타내는 등 목장 전체의 생산성에 많은 문제점을 초래하고 있습니다.

그러므로 유질 향상을 위한 좀 더 적극적이고 다양한 방법들이 개발되어야 할 것입니다. 특히 목장의 생산성과 매우 밀접한 관련이 있는 유방염 및 번식 관리는 하루아침에 해결되지 않고, 낙농전반의 기술수준 향상에 의해서 이루 어지기 때문에 유방염 및 유질 관리를 위해서는 좀 더 체계적이며 효과적인 관리프로그램 개발이 절실한 실정입니다.

따라서 국립수의과학검역원에서는 유방염 검사를 비롯하여 다양한 원유검사 결과들을 토대로 종합적이고 체계적인 유질 향상 대책을 수립하기 위하여 “젖소 유성분 분석 · 관리프로그램(Milk Analyzer)”을 개발하게 되었습니다. 즉 과거에는 원유검사를 통한 유질의 평가수준에서 만족했다면 이제는 그러한 원유검사 결과들을 토대로 젖소의 영양 및 건강상태를 평가하여, 목장의 착유시설 및 사료급여 방법 등의 사양관리 문제점을 분석하고 해결하는데 중점을 두어야 할 것으로 생각되어 국립수의과학검역원에서는 그동안의 국내 연구결과와 외국의 기초자료들을 토대로 “젖소 유성분 분석 · 관리 프로그램”을 개발하게 되었습니다.

한편, 이러한 프로그램을 보다 효과적으로 활용하고, 원유검사에 대한 전반적인 표준화 작업을 위해서 “원유검사장비 표준화 요령”, “유방염 원인균 분리 및 항생제 감수성 검사”, 그리고 “원유 및 유제품에서의 세균학적 검사 요령” 등 원유검사에 대한 표준서를 작성하였습니다.

앞으로 이러한 원유검사 표준서가 목장의 유질 향상 업무에 적극 활용될 수 있도록 많은 관심과 격려를 부탁드리며, 축산물 수입 전면개방시대에 낙농인이 살아남을 수 있는 유일한 길은 소비자들에게 안전하고 위생적인 원유를 생산하는 것이라는 것을 다시 한번 생각하면서 작게는 나의 가족, 크게는 5천만 국민의 먹거리를 책임진다는 사명으로 우리 모두 다시 한번 새로운 각으로 전력을 다해봅시다.

2001. 7.

국립수의과학검역원
원장 김옥경



목 차

머 리 말

제1장 원유검사	1
1. 관능검사	1
2. 비중검사	1
3. 진액검사	2
4. 알코올검사	2
5. 산도검사	4
6. 자비시험	4
7. 가수시험	4
8. 유성분 검사	5
9. 세균수 검사	6
10. 체세포수 검사	8
11. 항균물질 검사	10
제2장 원유검사장비 표준화 요령	13
1. 유성분 검사법	13
2. 세균수 검사법	24
3. 체세포수 검사법	32
4. 가수유 감별 시험법	45
5. 원유검사시 보존제 사용	48

제3장 유방염 원인균 분리 및 동정	53
1. 가검유즙 채취 및 운반	53
2. 유방염 원인균 분리	55
3. 균의 특성 및 동정	59
제4장 항생제 감수성 검사	71
1. 재료 및 배지 준비	71
2. 균 접종	73
3. 항생제 디스크 접종 및 판독	73
제5장 원유 및 유제품의 세균학적 검사	79
1. 대장균군수	79
2. 대장균수	82
3. 유산균수	83
4. 저온세균수	85
5. 내열성 세균수	85
6. 바실러스	86
7. 진균수	89
제6장 우유중 주요 병원성 세균 검사	91
1. 브루셀라균	91
2. 결핵균	92
3. 대장균 O157:H7	93
4. 리스테리아균	95

5. 살모넬라균	96
6. 캠필로박터균	97
7. 황색포도상구균	100
8. 클로스트리디움	102
부록 : 실험용 시약 및 배지	105
참고문헌	135

제1장 원유검사

원유검사는 수유검사와 실험실 검사로 나눌 수 있다. 수유검사는 관능검사, 비중검사, 진액검사, 알코올검사 등이 있으며, 실험실 검사로는 산도검사, 유성분검사, 세균수검사, 체세포수검사, 세균발육억제물질검사 등이 있다.

1. 관능검사

우유에 대한 지식과 경험에 의하여 이상유를 감별하는 방법으로써 원유를 청결한 시험관에 10ml 정도 취하여 우유의 색, 맛, 향, 응고물의 유무 등을 확인한다. 즉, 원유 냉각기의 뚜껑을 열고 냄새를 맡아 이취유무를 검사하는 취각검사와 유백색, 균일한 조직, 이물 혼입여부 등을 관찰하는 시각검사 등을 실시해야 한다.

2. 비중검사

생유나 우유 중 가수 및 탈지여부를 추정하는데 사용되며, 홀스타인 젖소의 우유 비중은 15°C에서 1.027~1.035이며, 국내 축산물 가공처리법의 기준은 1.028~1.034이다. 측정방법은 시료전체를 충분히 혼합시킨 다음 200ml 정도의 우유를 실린더에 넣고, 비중계를 실린더 중앙부에 넣어 1~3분 동안 방치한 후 메니스커스 상단의 눈금을 읽은 다음 15°C 온도에서 비중을 측정하거나 그렇지 않은 경우 15°C의 비중으로 환산하여 표시한다.

① 검사기구

- 비중계(1.015~1.045의 비중을 측정할 수 있는 것)
- 온도계(100°C까지 측정 가능한 막대형)

- 실린더(200~250ml 용량의 것)

② 검사방법

- 잘 혼합된 원유를 거품이 생기지 않도록 실린더 벽에 따라 주입한다.
- 비중계를 실린더 중앙에 넣어 비중계가 정지된 상태에서 상단의 눈금을 읽는다. 이때 시간이 지체되지 않도록 주의하여야 한다.
- 비중계의 눈금을 읽은 다음 온도계를 넣어 온도를 측정한다.
- 비중계는 15°C에서 측정하도록 되어 있으므로 우유 온도가 높거나 낮은 경우에는 우유 비중 보정표에 따라 측정한 비중을 산출한다.

3. 진애검사

원유에 함유된 오물 즉, 쇠똥, 피모, 흙, 곤충 등의 혼입 여부를 검사하는 방법으로써 우유를 진애검사용 필터(filter)에 통과시켜 우유 중 걸리는 진애의 양과 종류를 관찰하는 품질검사 방법으로 검사결과는 mg 단위로 표시한다. 국내에서는 진애검사 2.0mg 이하이어야 한다.

- ① 검사기구 : 침전물검사기, 표준판, 여과지(filter disc)
- ② 검사방법 : 진애검사기(sediment tester)에 소정의 진애시험용 여과지를 부착하여 시료 500ml 여과한 후 농림부장관이 지정한 표준판(농림부고시 제1998-34호 관련)과 비교한다.

4. 알코올 검사

원유의 신선도를 검사하는 가장 일반적인 방법으로서 집유장 또는 유가공장에서 널리 이용되고 있다. 원유 시료 2ml과 70%(V/V)의 에탄올 동량을 시험판 또는 알코올 검사판에 혼합한 후 응집여부를 검사하게 되며, 시료 및 시약의 온도(15°C)를 일정하게 유지시키도록 함으로써 가양성 반응 및 가음성 반응을 억제시킨다. 알코올 검사시 산패된 우유, 초유, 비유말기 우유, 응유효소가 존재하는 우유, 유방염 우유 등을 응집반응을 나타낸다.

① 검사기구 : 시험관 또는 알코올 검사판, 시료채취기구, 70% 에틸알코올 및 기구보관상자

② 검사방법 : 깨끗하고 수분이 제거된 시험관 또는 알코올 검사판에 피펫으로 일정량의 알코올과 동량의 원유를 첨가한 후 혼들어 용액 전체가 완전히 혼합 되도록 한다. 혼합 후 5초 이내에 우유의 응고 유무를 판정해야 한다.

③ 주의사항

- 시험관 및 알코올 검사판은 건조된 것을 사용하여야 한다.
- 알코올과 원유는 반드시 동량을 사용하여야 한다.
- 검사시 검사기구의 온도는 10~15°C를 유지하여야 한다.
- 알코올 농도는 정확히 15°C에서 알코올 비중계로 측정하며, 온도에 따른 알코올 농도 변화는 <표 1-1>의 환산표로 산출한다.

<표 1-1> 알코올 농도(%) 환산표

온도(°C)	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
알코올비중계 눈금	67.6	68.6	69.6	70.6	71.6	72.6	73.5	74.5	75.5	76.5
10	67.3	68.3	69.3	70.3	71.3	72.3	73.2	74.2	75.2	76.2
11	67.0	68.0	69.0	70.0	71.0	72.0	72.9	73.9	74.9	75.9
12	66.7	67.7	68.7	69.6	70.6	71.6	72.6	73.6	71.6	75.6
13	66.3	67.3	68.3	69.3	70.3	71.3	72.3	73.3	74.3	75.3
14	66.0	67.0	68.0	69.0	70.0	71.0	72.0	73.0	74.0	75.0
15	65.7	66.7	67.7	68.7	69.7	70.7	71.7	72.7	73.7	74.7
16	65.3	66.3	67.3	68.3	69.3	70.3	71.3	72.3	73.3	74.3
17	65.0	66.0	67.0	68.0	69.0	70.0	71.0	72.0	73.0	74.0
18	64.7	65.7	66.7	67.7	68.7	69.7	70.7	71.7	72.7	73.7
19	64.3	65.4	66.4	67.4	68.4	69.4	70.4	71.4	72.4	73.4

5. 산도검사

우유가 신선하지 않을 때 산을 생성하기 때문에 신선도를 확인하기 위하여 산도를 측정함으로써 알아내는 방법으로 중화시키는데 소요되는 알칼리량을 검사하게 된다. 샘플 10ml를 비이커에 넣고 10ml의 중류수로 혼합한 후 1% 페놀프탈레인 용액(페놀프탈레인 1g+에틸 알콜 100ml) 0.5ml를 가한 후 0.1N NaOH 용액으로 짙은 홍색이 30초 이상 지속할 때까지 계속 적정한다. 여기에 소비된 NaOH량을 다음 공식에 의하여 계산하고 그 산도를 절산 %로 표시한다. 정상적인 우유의 산도는 0.135~0.175%이며, 국내에서는 0.18% 이상인 경우에는 부적합 우유로 규정하고 있다.

$$\text{산도 (유산 \% 중량)} = \frac{(0.1\text{N}-\text{NaOH 적정량}) \times 0.009}{\text{시료 우유 (ml)} \times \text{우유의 비중}} \times 100$$

6. 자비시험

원유의 산도가 0.25% 이상인 경우 가열하면 카제인이 응고하는 성질을 이용하여 원유가 가열처리에 적합한가를 검사하는 방법이다. 충분히 혼합된 가검 우유 10ml를 시험판에 넣고 알코올 램프로 서서히 가열하여 끓인 후 응고여부를 육안으로 검사하는 방법으로 응고되면 살균처리에 부적합한 것으로 판정한다.

7. 가수 시험

비중검사, 테트라 유청비중 측정법, 유청의 굴절률 측정법, 빙점 검사법을 이용하여 인위적인 물 첨가를 확인함으로써 가수여부를 결정한다. 아세트산 유청법은 우유 100ml를 비이커에 취하여 25% 아세트산 용액 2ml를 가하여 교반한 다음 비이커 위에 시계접시를 올려놓고 70°C의 수조에서 20분간 가온한 후 냉수에서 10분간 냉각시킨다. 소형여과지로 여과하여 얻은 유청을 굴절계를 사용하여

정확하게 20°C에서 굴절율을 측정한다. 굴절계의 눈금이 39 이하이면 가수가 확실하며, 39~40인 경우에는 가수 가능성이 있다. 40 이하이면 유청 중의 회분을 다음과 같이 정량하여 가수여부를 판정한다. 즉, 유청 25ml를 칭량한 증발접시 또는 대형 도가니에 취하여 탕욕상에서 증발·건조시킨 다음 작은 불꽃으로 가열 탄화시켜 칭량하여 100ml당 g수로 환산하여 그 값이 0.715g 이하인 경우에 가수 된 것으로 판정한다. 동유청법은 황산동 용액을 가하여 교반 여과하여 20°C에서 굴절율을 측정하여 36 이하이면 가수한 것으로 판정한다.

우유의 어는점에는 주로 염류 및 유당의 함량이 관계하며, 단백질과 지방은 별로 영향을 미치지 않는다. 물을 가하면 빙점이 높아지므로 우유 빙점 측정은 가수검사에 응용되며, 1%의 가수에 의해서 어는점은 0.0055°C가 높아지므로 정밀한 우유 빙점검사기(Cryoscope)를 사용하면 3%의 가수 부정유의 검출이 가능하다. 빙점을 측정하는 검사법으로는 Hortvet Cryoscope법과 Thermistor Cryoscope법이 있다. 이 기기를 표준화하기 위해서는 증류수, 7% 및 10% Sucrose의 3종에 대한 빙점을 보정한 후 사용해야 한다. 최근에는 Sucrose 대신에 NaCl을 이용하여 보정하기도 한다. 빙점에 영향을 주는 요소로는 계절, 젖소의 연령, 건강상태, 품종, 사료, 날씨, 온도, 착유시간, 우유의 보관상태 등이 있으나 이러한 결과는 미미하며, 정상우유의 빙점이 -0.50~-0.61°C이며, 평균 빙점이 -0.530~-0.550°C인 점을 고려하여 국내에서는 -0.508°C 이상시 가수한 것으로 판정하고 있다.

8. 유성분 검사

원유의 조성은 지방, 단백질, 유당, 무기물, 비타민으로 이루어져 있으며, 이 중에서 유지방 이외의 모든 것을 무지고형분이라 한다. 우유의 조성은 축종별로 차이가 있으나, 일반적으로 국내의 경우 지방은 3.8%, 단백질은 3.2%, 유당은 4.6%, 회분은 0.72% 함유되어 있다. 이상과 같이 지방, 단백질, 유당, 무기물, 칼슘, 비타민 등의 유고형분이 얼마나 많이 함유되어 있는가가 우유의 영양학적인 가치를 좌우한다.

원유의 지방을 측정하는 방법에는 Rose-Gottlieb법, Gerber법, Babcock 법 등이 있으나, 국내에서는 Gerber법이 많이 사용되고 있으며, 단백질, 기타 성분도 축산물 가공기준 및 성분규격의 원유의 시험법에 고시되어 있다. 최근에는 지방분자의 에스테르 결합에 있어서 카르복실기군(Fat A 5.53μ filter, Fat B 3.48μ filter), 단백질 분자의 아미노산에 있어서 펩타이드 결합(6.46μ filter), 유당 분자에 있어서 하이드록시(9.53μ filter)에 의하여 특정 파장의 적외선 에너지를 흡수하는 것에 기초를 둔 적외선우유분석기(Infrared milk analyzer)가 원유검사에 널리 이용되고 있다. 이 기기는 시료의 교반에서부터 결과표시까지 모든 과정이 자동화로 이루어지며, 지방, 단백질, 유당을 공인된 표준방법으로 보정한 후 사용해야 한다. 최근에는 적외선우유분석기의 한단계 발달된 FTIR 원리의 기기검사법이 사용되기도 한다.

9. 세균수 검사

미생물에 의한 원유의 오염과 그 방지는 우유 및 유제품의 처리가공과 그 품질 관리면에서 매우 중요하며, 원유의 미생물 오염정도는 최종제품의 품질을 근본적으로 좌우하게 된다. 원유의 미생물 오염은 젖소의 유방내에 침입된 미생물 또는 착유과정 및 집유과정에서의 오염이 주요한 것들이다. 원유내의 미생물은 주로 그람양성세균과 그람음성세균이고, 그 외에도 효모, 곰팡이 등이 존재할 수 있으며, 이들 균은 유제품에 나쁜 영향을 미치게 되므로 위생적인 측면과 유제품의 품질보장을 위해서도 원유 중 세균수를 엄격히 규제해야 한다. 따라서 원유의 세균수 검사는 우유의 생산과 저장과정 중의 위생상태를 평가하고, 살균 후 생존하는 미생물이 유제품의 품질에 미칠 영향을 판단하기 위해서 반드시 수행되어야 한다. 세균수 검사법에는 세균 집락을 측정하는 방법과 세균을 직접 계수하는 방법, 세균의 활성도를 측정하는 방법 등이 있다.

가. 세균 집락을 측정하는 방법

(1) 표준한천평판배양법(standard agar plate count method)

표준한천평판배양법에 의한 세균수 측정은 전 세계적으로 가장 널리 이용되고 있으며, 일정한 배수로 희석된 우유를 배지에 접종하여 30℃에서 72시간 배양했을 때 집락형성단위(colony forming unit)를 계산함으로써 우유 중의 생균수를 측정하는 방법으로서 국내 세균수 검사법의 표준검사법이다. 따라서 국내에 도입되는 세균수 검사장비는 표준한천평판배양법에 기초하여 세균수 측정용 표준곡선 및 보정계수를 설정하여 사용하여야 한다.

나. 세균을 직접 계수하는 방법

(1) 직접현미경법(direct microscopic count method)

직접 현미경을 통하여 원유 중의 미생물 수를 측정하는 방법으로 Breed에 의해 개발되었고(Breed법), 슬라이드의 1cm² 내에 우유 0.01ml를 도말·건조시켜 염색한 후 직접 세균수를 세고, 현미경 계수를 곱하여 원유 1ml 중의 세균수를 산정하는 검사법이다.

(2) 직접현미경법의 원리를 이용한 기기검사법

원유 중의 미생물을 형광염색 물질로 염색하여 형광현미경을 통해 연속적으로 세균을 세는 자동화된 미생물 계수장치로서 박토스캔 등이 있다. 40℃ 되게 처리한 원유를 lysing 용액으로 카제인과 체세포 등을 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의해 분해시키고, 미생물은 acridine orange 용액으로 염색된 후 continuous flow epifluorescent 현미경에 의해 감지되어 박토스캔에 의해 계수된다. 이 기기는 시간당 40개 이상의 시료를 처리할 수 있다.

(3) 세균의 활성도를 측정하는 방법

(가) Impedance method

Impedance란 전도물질에 흐르는 교류전류에 대한 저항을 말한다. Impedance method는 이 원리를 기초로 하여 배지에 접종된 미생물의 대사산물들로 인한 전기적인 impedance의 변화량을 측정하는 방법이다. Conductance는 저항의 역치이다. 이 원리를 이용한 기기로는 박토미터(Bactometer)와 멜더스(Malthus)가 있다. 표준평판배양법의 결과를 이 기기의 감지시간(detection time)과 관계시켜 두 방법간의 상관관계가 0.95 이상 되도록 보정(calibration)하여 사용하여야 한다.

(나) ATP method

모든 생균에 존재하는 ATP를 추출하여 생물발광성(bioluminescence)에 ATP가 소모되는 원리를 이용하여 미생물 수를 측정하는 방법이다. 전제 조건으로는 세포내 ATP 함량이 모든 종류의 미생물에서 동일해야만 평가할 수 있는 방법이다.

10. 체세포수 검사

젖소의 유방내로 병원성 미생물이 침입하여 감염되면 유선조직의 염증으로 인하여 원유 중에는 '체세포'가 증가하게 된다. 이에 따라 체세포 수를 측정하면서 유방염을 진단하는 기술은 전 세계적으로 가장 널리 이용되고 있다. 이와 같이 선진낙농국가에서는 오래 전부터 체세포 수에 의한 유방염진단 및 등급제를 실시하여 우유의 위생적인 측면에 높은 관심을 기울이고 있는 실정이다.

가. 체세포(Somatic Cell) 란?

우유 중에 존재하는 체세포의 종류는 매우 다양하나, 일반적으로 상피세포(epithelial cell), 중성구(neutrophils), 임파구(lymphocytes), 단핵구(monocytes)와 그 외의 세포 등을 들 수 있다. 건강한 유선으로부터 분비되는 우유 중에는 60~70% 정도가 상피세포이지만 유방에 손상을 받게되면 중성구의 숫자가 전체 체세포 수의 90~95% 정도를 차지할 만큼 급증하게 된다. 따라서 체세포 수의 측정은 유선의 염증상태를 알아내는데 매우 중요한 역할을 한다.

나. 체세포수 검사법

(1) 직접현미경 검사법

슬라이드 글라스의 1cm^2 내에 가검 우유 0.01ml 를 도말·건조시켜 염색 후 현미경하에서 체세포 수를 직접 검사하고 현미경계수를 곱하여 원유 1ml 중 체세포 수를 계산한다. 이러한 방법은 많은 시간과 노동력이 필요하기 때문에 대량의 시료를 처리하기에는 부적합하다. 하지만 전 세계적으로 직접 현미경법이 표준 검사법이기 때문에 체세포 검사장비는 이 방법에 의해서 보정된 후 사용되어야 한다.

(2) Rolling Ball Viscometer(RBV)법

계면활성제의 작용으로 체세포 중 길게 얹힌 DNA 분자가 풀려 나와 우유 중의 단백질과 결합함으로써 섬유성 기질을 형성시켜 점도를 나타내며, 점도 정도를 세포수로 환산하여 측정하는 방법이다. glycerol 28%(w/w)로서 점도를 고정시킨 후 시험코자하는 우유 시료와 계면활성제(Viscol 610)를 섞어 이로 인한 점도를 구슬(ball)이 움직이면서 체세포 수를 가리키는 점도측정 장치이다.

(3) 자동화 검사장비

우유 중의 체세포를 형광물질인 ethidium bromide로 코팅시켜 일정량을 디스크에 도포시켜 순간적으로 통과되는 체세포를 할로겐 램프 또는 레이저 빔으로 측정하는 검사법으로서 포소매틱(Fossomatic), 소마카운터(Somacount), 소마스코프(Somascope) 등이 있다. 가장 신속하게 우유 중의 체세포 수를 측정할 수 있는 방법으로서 시간당 200개 이상의 시료를 측정할 수 있다. 세계 각국의 유방염 진단연구소나 유업체에서는 이미 오래전부터 이 장치를 설치 운용하고 있어 목장의 집합유(bulk milk)와 젖소 개체별 우유에 대한 검사를 실시하고 있다.

11. 항균물질 검사

우유 중 잔류약물을 검사하는 방법으로는 항균물질의 경우 일차 스크리닝 목적으로 이용되는 미생물학적 방법 또는 효소면역학적 방법에서부터 약물별 최종 확인 정량에 이용되는 액체크로마토그라프(HPLC), 가스크로마토그라프(GC)에 이르기까지 매우 다양한 검사방법들이 이용되고 있다.

가. 미생물학적 방법

여러 종류의 다양한 미생물학적 방법이 우유 중 항균물질 혹은 세균발육 억제물질 검사에 응용되고 있으며 우유에 항균물질 등 세균발육 억제물질이 존재할 때 시험균주를 억제하는 특징을 이용한 방법으로 페니실린 등 베타-락탐계 항생물질에 대해서는 비교적 높은 검출감도를 갖고 있으나 살파제 등 기타 합성항균제에 대해서는 검출감도가 낮다. 그러나 검사비용이 매우 저렴하고 특별한 검사장비가 없는 일반 실험실에서도 쉽게 수행할 수 있다는 장점 때문에 미국, 유럽연합 등 대부분의 낙농선진국에서도 아직까지 공정법으로 사용하고 있다.

우리나라에서도 원유 중 방부제 및 세균발육 억제물질 검사를 위하여 1976년

부터 TTC법을 공정분석법으로 채택한 후 TTC법을 개량(TTC-II)하여 현재까지 사용되고 있다. 외국의 경우 미생물학적 방법을 이용한 공정검사법의 원리와 동일한 잔류검사 킷트들이 개발되어 집유장 또는 목장에서도 널리 이용되고 있다. 이러한 미생물학적 잔류검사 킷트들은 일정한 품질관리하에서 생산되기 때문에 일반 실험실에서 제조하여 사용한 방법보다 더욱 높은 정확도를 기대할 수 있다. 최근에 많이 사용되고 있는 미생물학적 잔류검사 킷트들은 <표 1-2>와 같다.

<표 1-2> 미생물 억제능을 이용한 우유 중 잔류항균물질 검사키트

검사방법	제조회사
BsDA	Difco Lab.
BSDA	Charm Sci. Inc.
BR-Test	Idetek Inc.
Charm Test	Charm Sci. Inc.
Delvo test	Gist-brocades Inc.

나. 면역화학적 방법

면역화학적 원리를 이용한 우유 중 항균물질 검사법은 검출하고자 하는 항균물질과 경쟁적으로 항체와 결합하는 항원에 표식하는 물질에 따라 효소면역학적 방법(EIA), 방사능 면역측정법(RIA) 및 화학발광체 면역측정법(CIA) 등으로 대별할 수 있다. 이들 검사방법은 검체가 되는 시료 중 잔류약물인 항원과 특이항체 사이의 면역학적 특이 결합반응을 이용하여 표준항원물질에 표식되어 있는 효소, 동위원소 또는 화학발광체가 발생하는 발색정도나 방사능을 측정하여 정량 및 정성분석에 이용된다. 면역화학적 방법은 검출감도, 재현성 및 특이성이 우수하여 우유 중 잔류항균물질을 검사하는데 널리 이용되고 있다. 최근에는 상품화되어 우수한 제품들이 많이 소개되고 있어 집유장이나 목장에서도 손쉽게 사용할 수 있다. 이러한 검사키트를 소개하면 <표 1-3>과 같다.

〈표 1-3〉 면역화학적 원리를 이용한 우유 중 잔류항균물질 검사킷트

검사방법	제조회사	원리
Agri-Screen Test	Neogen corp.	ELISA wells
Charm II Test	Charm Sci. Inc.	Receptor
Cite Probe Test	IDEXX Corp	ELISA probe
EZ-screen	EDITEK	ELISA card
Lac Tek	Idetek In.	ELISA tube test
Penzyme	Smithkline Beecham	Enzyme
Signal Foresite	Smithkline Beecham	ELISA wells
Spot Test	Combridge Biotech	Latex Agglutination

다. 기기분석법

미생물학적 검사방법이나 면역화학적 검사방법은 우유 중의 잔류약물을 신속하게 대량으로 검사할 수 있는 장점을 지니고 있으나 최소잔류허용기준이 설정되어 있는 약물별로 정량분석을 하기 위해서는 HPLC, GC 혹은 LC/GC/MS 등의 정밀분석장치가 이용된다.

최근의 국제적인 동향은 원유 중 잔류약물에 대해 안전수준인 최소잔류허용기준을 설정하는 방향으로 가고 있으며, 따라서 기기분석에 의한 원유 중 잔류약물의 확인정량법의 개발이 활발히 진행되고 있다. 과거에는 기기분석법에서 가장 어려운 문제로 남아 있었던 시료 전처리 방법을 크게 개선하여 신속·정확하게 분석할 수 있는 고체상추출법(SPE)을 비롯한 고체상시료분산처리법(MSPD) 등이 개발되어 시료의 전처리에 많이 소요되었던 시간을 대폭 단축하였다. 아울러 분석기기의 자동화도 많은 발전을 거듭하여 기기분석에 의해서도 신속히 대량 시료를 분석할 수 있을 것으로 전망된다.

제 2 장 원유검사장비 표준화 요령

1. 유성분 검사법

가. 우유의 조성

우유를 끓여 수분을 증발시켜 버리면 대략 12%의 고형분을 얻을 수 있으며, 우유의 고형분에는 지방, 단백질, 유당, 무기물, 비타민으로 나누어진다. 이 중에서 유지방 이외의 모든 것을 무지고형분이라 정의한다. 유지방과 지용성 비타민을 포함하는 지방은 축종별로 차이가 있으나, 일반적으로 홀스타인의 경우 3.7% 정도 함유하고 있다. 단백질의 주요 구성물은 카제인이며, 카제인은 우유 속에서 칼슘과 결합하여 끈끈한 상태로 되어 있으며 사람의 건강에 필요한 필수 아미노산을 균형 있게 포함하고 있어 우유의 영양적인 근본이라고 말할 수 있다. 유단백질은 카제인을 포함해서 평균 3.2% 정도 함유되어 있다. 유당은 우유를 달콤하게 느끼게 하는 성분으로 우유를 매일 마시면 정장작용을 촉진시키는데 이것은 유당의 작용 때문이며, 함유량은 평균 4.6% 정도이다(표 2-1). 그 밖에 우유에는 무기물과 비타민도 풍부하게 함유되어 있는데, 무기물은 유아에 있어 영양학적으로 중요한 칼슘, 인, 철분이 균형 있게 들어 있으며, 또한 비타민은 거의 다 포함되어 있다. 이상과 같이 지방, 단백질, 유당, 무기물, 칼슘, 비타민 등의 유고형분이 얼마나 많이 함유되어 있는가가 우유의 영양학적인 가치를 좌우 한다.

(표 2-1) 모유와 우유의 조성 비교

영 양 소	우 유	모 유
수 분 (%)	88.0	87.5
지 방 (%)	3.7	4.4
단백질 (%)	3.2	1.6
유 당 (%)	4.6	6.9
회 분 (%)	0.72	0.20

나. 유지방 정량법

원유의 지방을 측정하는 방법에는 Rose-Gottlieb법, Gerber법, Babcock 법 등이 있으나, 국내에서는 Gerber법이 많이 사용되고 있다.

겔벨법(Gerber's Method)

1) 기구

- ① 유지계
- ② 피펫 : 1㎖, 10㎖, 11㎖ 정량용
- ③ 항온수조
- ④ 겔벨용 원심분리기
- ⑤ 화학 천평

2) 시약

- ① 황산 : 20℃에서 비중 1.820~1.825
- ② 이소아밀알코올 : 20℃에서 비중 0.815~0.818

3) 시험 방법

- ① 젤벨 유지계에 황산 10mℓ를 넣는다.
- ② 충분히 교반된 우유 시료 11mℓ를 유지계의 벽면에 대고 서서히 주입하고, 아밀 알코올 1mℓ를 첨가한 다음 소량의 증류수로 입구에 묻은 시료 및 시약을 씻어 병 목까지 채운다.
- ③ 고무마개를 꼭 끼우고, 유지계를 격렬하게 흔들어 시료와 황산을 충분히 혼합시킨 후 60~65°C 항온수조에 15분 방치한 다음 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리한다.
- ④ 다시 60~65°C 항온수조에서 5분동안 방치한 후 지방층을 깨끗이 분리시킨 후 지방층의 상·하부에 나타난 유지계의 눈금의 양, 즉 메니스커스 최하단에서 메니스커스 최상단 사이를 지방의 양으로 읽는다.
- ⑤ 이때 유지계의 내부에 기포가 발생하지 않도록 주의하면서 고무마개를 움직여서 지방층의 판독이 용이하게 조절하며, 항온수조에서 지방층 분리시 지방층이 유지계의 최상단 눈금부를 초과하지 않도록 주의한다.

* Gerber 검사법시 가능한 동일한 시료를 2회 이상 검사하여 평균값으로 판독한다.

다. 단백질 정량법

세미마이크로 킬달법(Kjeldahl 법)

1) 기구 및 시약

축산물가공기준 및 성분규격에 표시된 장치를 쓴다. 즉, 전체가 경질유리를 사용하여야 하며, 접속부위는 길이 맞춘 것으로 하여도 좋다. 장치에 쓰는 고무는 수산화나트륨 시액속에서 10~30분간 끓이고, 다음에 물에서 30~60분간 끓인 다음 물로 충분히 씻어서 쓴다(단, 동 시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다).

2) 시험 방법

〈검사시료의 분해〉

① 통상적으로 질소(N) 함량이 2~3mg에 해당하는 양의 검사시료를 정밀히 취하여 킬달 플라스크에 넣고 여기에 분해촉진제 약 0.5g을 넣은 후 플라스크 내벽을 따라 황산 3~5ml를 넣은 다음 플라스크를 흔들어 주면서 30% 과산화수소 1ml를 조금씩 조심하여 넣는다. 플라스크를 금망상에서 천천히 가열하고 검사시료의 탄화물이 보이지 않을 때까지 온도를 높여 끓이고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1~2시간 가열을 계속한다. 분해액을 냉각시킨 후 물 20ml를 주의하여 가한 후 이 플라스크를 증류장치에 연결한다.

② 비교적 많은 검사시료를 취할 필요가 있는 경우에는 질소(N)함량이 약 20~30mg에 해당하는 양의 검사시료를 정밀히 취하여 250~300ml의 킬달 분해 플라스크에 넣은 다음 이에 분해촉진제 1~2g 및 황산 20~30ml를 가하여 가열 분해 시킨다. 분해액을 냉각시킨 후 물 약 100ml를 가하고 200ml 메스플라스크에 옮겨서 냉각 후 물을 가하여 전량을 200ml로 채워 그 20ml를 세미마이크로 킬달 분해 플라스크에 취하여 증류장치에 연결한다.

③ 질소(N)함량이 적어서 다량의 검사시료를 취할 필요가 있는 경우에는 질소(N)함량 2~3mg에 해당되는 검사시료를 정밀히 취하여 상기 2)의 조작과 같이 가열 분해하고 냉각 후 물 20ml를 주의하여 가하고 킬달 분해 플라스크를 증류장치에 연결한다.

〈증류 및 적정〉

① 증류장치의 흡수플라스크에 0.05N 황산 10.0ml를 취하여 이에 부린스위크 시액 2~3방울을 떨어뜨려서 냉각기의 끝 부분을 액면 밑에 담그고 작은 깔대기로부터 30% 수산화나트륨용액 25ml를 가한다.

② 수증기 발생기로부터 수증기증류를 하여 증류액 약 100ml를 받은 후 냉각기의 끝을 액면에서 조금 떼어 다시 유액수 ml를 유취하여 다시 냉각기의 끝을 소량의 물로 수기내에 씻어 넣는다.

③ 수기내에 들어 있는 유액을 0.05N 수산화나트륨액으로 부런스워크 시액이 녹색으로 변할 때까지 적정한다. 따로 같은 방법으로 공 시험을 한다.

$$0.05\text{N 황산 } 1\text{ml} = 0.7003\text{mg N}$$

3) 계 산

$$\text{질소}(\%) = \frac{100}{0.7003 \times (a-b) \times \text{검사시료의 채취량(mg)}}$$

a : 공 시험에서 중화에 소요된 0.05N 수산화나트륨액의 ml수

b : 본 시험에서 중화에 소요된 0.05N 수산화나트륨액의 ml수

* 계산식은 검사시료의 분해액을 전부 사용해서 적정했을 때의 식이므로 분해액의 일부를 사용할 때는 그 계수를 곱한다. 여기서 얻은 질소량에 질소 계수(원유·유가공품 : 6.38)를 곱하여 조단백질의 양으로 한다.

라. 적외선 우유 분석기(Infrared milk analyzer)

지방분자의 에스테르 결합에 있어서 카르복실기군(Fat A $5.53\mu\text{filter}$, Fat B $3.48\mu\text{filter}$), 단백질 분자의 아미노산에 있어서 펩타이드 결합($6.46\mu\text{filter}$), 유당 분자에 있어서 하이드록시($9.53\mu\text{filter}$)에 의하여 특정 파장의 적외선 에너지를 흡수하는 것에 기초를 둔 자동화기기이다. 이 기기는 시료의 교반에서부터 결과표시까지 모든 과정이 자동화로 이루어지며, 이 기기는 지방, 단백질, 유당의 공인된 표준방법으로 보정한 후 사용해야 한다. 최근에는 IR(적외선 우유분석) 방법의 한 단계 발달된 FTIR 방법을 이용한 기기가 사용되어지기도 한다.

1) 기기 사용시 주의사항

- ① 기기 사용 전 영점과 파일럿(pilot) 샘플을 이용하여 기기상태를 점검한다.

* 영점검사 : 5회 측정한 Zero 값이 0에 근접해야 하며 표준편차는 0.02% 이내이어야 하며, 이 범위를 벗어나면 시약 및 기기를 점검하고 보정을 한다.

* 재현성검사 : 일반적으로 3~5%의 신선한 원유 시료를 11회 또는 12회 반복 측정한 후 첫 번째 결과는 삭제하고 나머지 10개의 결과를 가지고 재현성 값을 구한다.

* 파일롯 샘플 : 표준용액으로 장비를 정확히 보정한 후 결과를 알고 있는 임의의 샘플, 일반적으로 전날 검사한 우유에 보존제(Potassium dichromate)를 첨가하여 다음날 기기 사용시 측정하여 재현성을 유지시키기 위해 제작한 시료이며, 파일롯 샘플을 이용한 기기 관리는 원유검사 관리적인 측면에서 매우 중요하다.

② 시료내의 지방구가 고르게 분포되도록 측정 전 항온수조를 이용하여 원유의 온도가 40°C가 되도록 한다(40°C 항온수조에 5~10분 정도 가온). 하지만 20분 이상 가온하면 지방구의 파괴현상이 일어나므로 주의해야 한다.

* 겨울철에는 외부온도가 낮기 때문에 기기 워밍업 및 우유시료의 온도가 검사 결과에 영향을 준다. 따라서 기기 워밍업 후 20회 정도 시료측정을 통해서 기기상태를 가온시킨 후 실제 검사를 수행해야 한다.

→ 기기작동 후 최초검사 결과와 20회 정도 검사를 수행했을 때 유지방 검사치를 비교해 보면 최초검사의 결과가 일반적으로 0.05%정도 낮음

③ 일과작업 후 Non-forming액에 의해 세척을 행한 후에는 펄히 0.1% Triton X-100액으로 재세척 해야 한다.

④ 기기 내부의 온도 안정을 위하여 전원 스위치는 켜 놓는 것을 권장한다.

2) 기기 유지 및 점검사항

① 표준샘플 보정 또는 확인 : 주 1회

② 재현성 검사 : 월 1회

③ Pump Stroke량 검사 : 필요시

④ Transfer Error : 월 1회

⑤ 균질기 검사 : 편차가 0.05%이상 차이 발생시 교체 또는 수리

⑥ Accumulator Membrane : 6개월

⑦ Valve Membrane의 교체 : 6개월

⑧ 큐벳 : 오염이 되었을 때 교체

마. 유성분 검사장비의 표준화 요령

원유검사장비 표준화의 목적은 검사기기별 표준화를 실시하여 원유검사 결과의 공정성을 확보하는데 있다. 국내의 경우 유대지불 검사항목은 국립수의과학검역원에서 생산되는 표준용액에 의거하여 원유검사장비를 표준화하고 있으며, 보정방법 및 보정주기는 <표 2-2>와 같고, 원유검사장비 표준화 방법의 장·단점은 <표 2-3>과 같다.

<표 2-2> 원유검사장비의 표준검사법 및 보정방법

구분	표준 검사법	보정 방법	비교검사 및 보정주기
유성분 분석기	- 유지방: Gerber법 등 - 단백질: Kjeldahl법 등 - 유당: HPLC 등	각각의 표준검사법 또는 표준용액에 의해서 보정 실시	주 1회 이상
세균 검사기	- 표준평판배양법(SPC)	표준평판배양법에 기초한 세균수 표준곡선 및 보정 계수에 의거 보정*	15일에 1회이상 비교검사 실시
체세포 검사기	- 직접현미경법(DMSS)	표준검사법 또는 표준 용액에 의해서 보정실시	주 1회 이상

*세균수 표준곡선 및 보정계수는 유질 및 유대등급 기준개정 등 필요시 작성

1) 검사장비별 표준화 실시방법

① 원유시험법의 지방, 단백질, 유당, 회분, 총고형분 정량법에 준해서 최소 3개 이상의 원유를 검사한 후 그 결과치를 기기에 보정하여 사용하여야 한다.

② 유대에 반영되는 지방의 범위인 3.0%~5.0% 사이의 원유 3개 이상으로 최소한 주 1회 이상 국내 유지방 검사의 표준법인 Gerber법에 의해서 보정을 한 다음 사용해야 하며, 단백질, 기타 성분도 축산물 가공기준 및 성분규격의 원유의 시험 법에 준해서 기기를 보정하거나, 표준용액에 의해 기기를 보정해야 한다.

③ 검사기기의 관리상태가 적절하게 유지되는지를 확인하기 위하여 원유검사 기관 별로 비교검사(cross check)를 실시하는 것을 원칙으로 한다.

〈표 2-3〉 원유검사장비 표준화 방법의 장·단점

구분	장 점	단 점	종 합
표 준 검사법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 검사기관에서 표준화 필요시 수시 가능 (표준용액 공급여부와 관계없이 수시로 보정할 수 있음) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 검사기관별 분석능력 및 방법에 따라 편차 발생우려로 생산자의 검사 결과에 대한 불신 초래할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자체적으로 표준화를 실시하되 원유검사 기관 등 표준화 점검 대상기관에 대해서 중앙기관에서 blind test를 정기적으로 실시
표 준 용 액	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장비의 적정 상태를 확일할 때 기준으로 삼을 수 있으며, 검사기관별 검사오차를 최소화하여 전국적인 표준화 실시 ○ 검사기관의 표준화로 검사결과의 신뢰성 및 공신력 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 표준용액의 정확성이 잘못 제작되었을 경우 전국적으로 잘못된 검사 결과를 초래할 수 있음 ○ 표준용액 미 구입 기관의 보정의 어려움 초래 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공신력 있는 표준용액 생산 및 지속적이며 정기적인 표준용액 공급 ○ 표준용액을 이용한 검사장비 표준화 내용에 대한 세부지침 시행으로 검사 결과의 신뢰성 확보

2) 검사장비 사용시 주의할 점

- ① 검사장비 보관장소는 적정온도와 적정습도를 유지할 것
- ② 시약 제조시 권장농도 및 유효기간을 철저히 준수할 것
- ③ 사용자는 사용 전 영점 조정 상태 및 재현성을 확인하고 검사 실시

- ④ 제조회사에서 권장하는 기기점검요령에 따라 매일, 매월, 6개월 점검내용을 정기적으로 확인할 것
- ⑤ 기타 내용은 제조회사에서 권장하는 방법대로 적절히 관리할 것

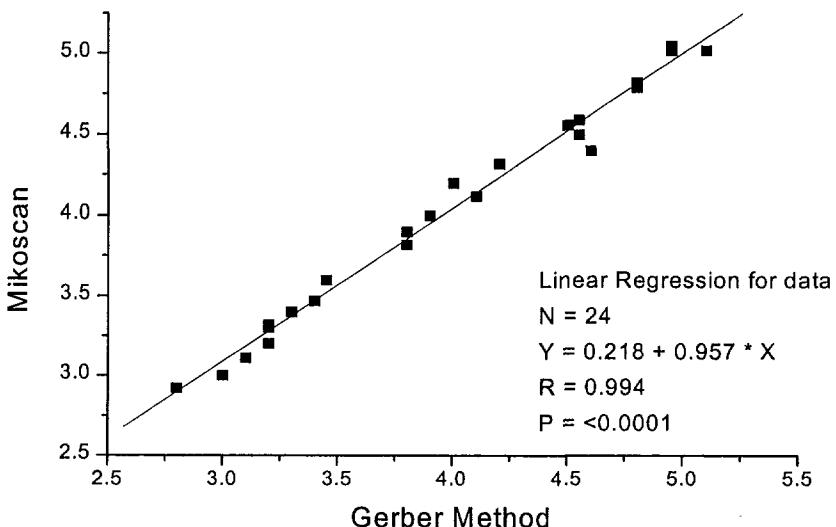
3) 유성분 표준용액 제조방법

원유 검사장비를 최적의 상태로 운용함으로써 원유검사 결과의 정확성을 확보하고 낙농가와 수요자간의 신뢰도를 높이기 위하여 유성분 검사장비를 표준화 할 때의 기본 수칙은 첫째, 검사장비의 적정 상태를 우선적으로 확인하고, 둘째, 그 나라의 유질 수준에 맞는 원유를 선별하여 각각의 표준검사법에 준해서 그 원유를 측정한 다음 그 결과 값을 기기에 보정하여 사용하는 것이다.

국내의 경우 유성분 중 유지방에 의해서 유대가 적용되며 있으며, 그 기준치는 3.0%에서 5.0%까지 적용되므로 기기의 정확한 측정 범위는 유대지급 기준에 초점을 맞추어야 한다[그림 2-1]. 이러한 점에 기초하여 국립수의과학검역원에서는 여러 목장에서 수집되어 저장되어 있는 유가공장의 청정원유(사일로 보관 우유)를 이용하여 평균값으로 사용하고(Medium), 10% 정도의 가수로 낮은 수준의 유성분 표준용액을 사용하고(Low), 높은 수준의 표준용액은 목장 집유 차량 원유를 24시간 방치한 후 크림 층을 이용하여 지방으로, 탈지유를 이용하여 단백질과, 유당으로 사용하여(High) 국내 농가의 유성분 함량 분포도를 고려하여 Low, Medium, High 수준의 표준용액을 각각 제조한다. 제조되어진 3종의 표준용액은 국내 유성분 검사법의 표준방법으로 측정하고, 기존에 생산되어진 국내 표준품과 외국 수입 표준품의 성적 등을 고려하여 최종 결과 값을 설정하여 원유검사기관에 공급되어진다.

한편, 유성분 표준용액을 제조할 때는 목장 원유를 사용할 경우 보존제를 사용하더라도 원유의 품질 상태와 보관방법 등에 의해서 보존성의 차이를 나타내어 적정 유효기간 유지(30일)에 있어서 문제가 있을 수 있으나, 시유의 경우에는 균질화 및 살균 처리로 인하여 유성분 검사시 재현성과 보존성이 우수하기 때문에 원유검사시 시유에 보존제를 첨가한 시료(pilot sample)는 검사장비의 적정

상태를 판단하는데 널리 이용되고 있다.



(그림 2-1) 유성분검사장비(Milkoscan 4000)와 Gerber법과 상관관계 비교

시유는 균질화에 의해서 지방구의 형태가 일정하지만 원유의 경우는 목장 사양관리에 의하여 지방구의 크기가 다르고, 적외선우유분석기의 경우는 분자 구조의 차이에 의해서 유성분 함량을 측정하기 때문에 시유와 원유의 유지방 측정값은 약간의 차이를 나타낼 수 있다. 그러므로 원유검사용 유성분 검사장비는 원유를 이용하여 측정된 값을 보정하여 사용하여야 한다. 따라서 시유를 이용한 기기 적정 상태 검사와 원유를 이용한 기기 보정 방법을 병행해서 사용하면 유성분 검사장비의 상태를 최고의 수준으로 유지하면서 원유검사 업무를 효과적으로 수행 할 수 있다.

유성분 표준화 작업결과 보고서

원유검사기관 :

보유장비 기종 (구입년도) :

〈 표준화 결과 〉

◆ 유지방

★ 표준용액값 Low : Medium : High :

★ 기기 측정값 Low : Medium : High :

★ 보정후 측정값 Low : Medium : High :

◆ 유단백질

★ 표준용액값 Low : Medium : High :

★ 기기 측정값 Low : Medium : High :

★ 보정후 측정값 Low : Medium : High :

◆ 유당

★ 표준용액값 Low : Medium : High :

★ 기기 측정값 Low : Medium : High :

★ 보정후 측정값 Low : Medium : High :

검사일 :

검사원 :

확인자 :

4) 유성분 표준용액에 의한 보정 방법

- ① 검역원에서 정기적으로 공급되는 표준용액(3종)을 항온수조에서 40℃에서 10분 정도 가온 한 다음 각각 3회씩 지방, 단백질, 유당을 측정한다.
- ② 측정한 결과의 평균값과 표준용액 값과의 차이가 0.05% 이상 있을 경우에는 기기 보정하는 방법에 의해서 기기를 보정한다.
- ③ 보정을 실시한 다음 표준용액으로 재검사한 후 결과치를 확인해 본다.

2. 세균수 검사법

미생물에 의한 원유의 오염과 그 방지는 우유 및 유제품의 처리가공과 그 품질관리면에서 매우 중요하며, 원유의 미생물 오염정도는 최종제품의 품질을 근본적으로 좌우하게 된다. 원유의 미생물 오염은 젖소의 유방내에 침입된 미생물 또는 착유과정 및 집유과정에서의 오염이 대부분이다. 더구나 우유 자체가 미생물의 좋은 배지가 되기 때문에 오염된 미생물은 집유과정에서 증식을 계속한다. 원유 내의 미생물은 주로 그람양성세균과 그람음성세균이며, 그 외에도 효모, 곰팡이 등이 존재할 수 있는데, 이들 균은 유제품에 나쁜 영향을 미치게 되므로 위생적인 측면과 유제품의 품질보장을 위해서도 원유 중의 세균수를 엄격히 규제해야 한다.

건강한 유방에서 착유된 우유의 총 세균수는 보통 ℓ당 2,000개 이하이다. 높은 총 세균수는 농가에 두 가지 방법으로 영향을 미친다. 직접적으로는 유방염의 증가 가능성이 있으므로 경제적인 별파금 형태이고, 간접적으로는 질이 나빠지므로 우유 자체의 보관기간이 짧아져 소비자와 가공자들에게 사용이 거부되는 것이다. 우유의 세균오염은 두가지 방법으로 일어난다. 직접적으로는 유방염균이 유방내 우유중에 있는 소에서이고 간접적으로는 착유된 우유가 착유기구를 통해서 오염되거나 불완전한 냉각효과에 의한 것이다. 따라서 원유의 세균수 검사는 우유의 생산과 저장과정 중의 위생상태를 평가하고 살균 후 생존하는 미생물이 유제품의 품질에 미칠 영향을 판단하기 위해서 반드시 수행되어야 한다.

가. 표준검사법 : 표준평판배양법 (Standard Plate Count)

원유 중의 일반세균수는 $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 약 72시간 배양한 후 계수한다. 세균수 검사는 표준평판배양법(Standard Plate Count)으로 실시함을 원칙으로 한다. 일반세균수는 시료 중에 존재하는 세균 중 표준한천배지내에서 발육할 수 있는 종 은균의 수를 말한다. 이 방법은 표준한천평판배지에 시료를 혼합 응고시켜 배양 후 형성한 세균의 집락수를 계수하여 시료 중의 생균수를 산출하는 방법이다.

1) 시료채취 및 방법

멸균 교반 용기로서 거품이 생기지 않게 주의하면서 시료를 충분히 교반하고, 멸균 시료 채취관(15mL)을 삽입하여 밑바닥까지 도달하게 하여 표면까지 끌 어올린다. 이 조작을 2~3회 반복하여 시료(25mL 이상)를 멸균 시료 병에 옮겨 4°C 이하로 유지하면서 실험실로 운반한다.

2) 시험용액의 준비

채취된 시료를 강하게 진탕하여 혼합한 것을 시험용액으로 하며, 멸균 생리식 염수 등의 희석액을 이용하여 필요에 따라 10배, 100배, 1000배… 등 희석액을 만들어 사용한다.

3) 세균수 시험법

(1) 일반세균수

(가) 기구 및 재료

- ① 멸균기(건열 및 고압증기)
- ② 인큐베이터(부란기)
- ③ 항온수조($40\sim80^{\circ}\text{C}$ 로 자동온도 조절 가능한 것)
- ④ 냉동 및 냉장고
- ⑤ 집락계산기(tally register)
- ⑥ 수소이온농도측정기(pH meter)

- ⑦ 균질기 : 스토마커(stomacher) 및 stomacher bag
- ⑧ 피펫 : 1㎖, 5㎖, 10㎖
- ⑨ 시험관 및 희석병
- ⑩ 색례 (직경 85mm, 깊이 15mm 이상)

(나) 배지 및 시액

- ① Standard Plate Count Agar(표준한천평판배지)

Tryptone 5.0g

Yeast extract 2.5g

Dextrose 1.0g

Agar 15.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000㎖되게 제조하고 멸균한 후 pH 7.0이 되도록 조정한 다음 15파운드 (121℃)로 15분간 고압증기 멸균한다.

② 희석액 : Butterfield's phosphate buffered dilution water(BPD)
인산제2수소칼륨(KH₂PO) 34g을 중류수 500㎖에 용해하고 1N수산화나트륨(NaOH) 175㎖를 가하여 pH 7.2로 조정하고 여기에 중류수를 가하여 1,000㎖로 하여 인산완충액(보관용)으로 한다. 이것을 121℃에서 20분간 멸균한 다음 냉장고에 보존하면서 사용할 때에는 이 원액 1㎖를 취하여 멸균중류수 800㎖에 가하여 희석하고 이것을 인산염완충희석액으로 한다.

(다) 시험방법

- ① 배양 : 채취한 시료액 1㎖와 희석액(BPD 또는 멸균생리식염수) 9㎖를 혼합하여 10진 희석법으로 희석하여 각 단계 희석액(10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) 1㎖씩을 멸균 색례(2매 이상)에 무균적으로 취한다. 약 45℃로 유지한 표준한천평판배지(plate count agar) 약 15㎖를 무균적으로 분주하고 조심스럽게 회전하여 좌우로 기울이면서 시료와 배지를 잘 섞고 응고시킨다. 확산 집락의 발생을 억제하기 위하여 다시 표준한천배지 3~5㎖를 가하여 중첩시킨다. 응고시킨 색례는 거꾸로 하여 30℃에서 약 72시간 배양한다.

② 집락수 산정 : 배양 후 즉시 집락 계산기를 사용하여 생성된 집락수를 계산한다. 부득이 할 경우에는 5°C에 보존시켜 24시간 이내에 산정한다. 집락수의 계산은 확산 집락이 없고 1개의 평판당 25~250(또는 30~300)개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하는 것을 원칙으로 한다. 전체 평판에 250개 이상 집락이 발생한 경우 250에 가까운 평판에 대하여 밀집평판 측정법에 따라 계산하며, 전체 평판에 25개 이하의 집락만을 얻었을 경우에는 가장 희석배수가 낮은 것을 측정한다.

③ 기록 : 평판배양법에서 산정된 균수의 기록은 둘째 자리 이하는 “0”으로 처리한다. 만약 3번째 자리의 숫자가 6이상과 4이하인 경우는 반올림하고, 5일 경우는 2번째 자리수가 홀수일 때는 위로 반올림하고, 짝수일 경우는 “0”으로 처리한다. 예를 들면 15,500인 경우는 16,000으로 기록하고, 14,500인 경우는 14,000으로 표기한다.

나. 자동화 검사장비를 이용한 세균수 검사법

1) 직접현미경법 원리를 이용한 박토스캔(Bactoscan) 측정법

원유 중의 미생물을 형광염색 물질로 염색하여 형광현미경을 통해 연속적으로 세균을 세는 자동화된 미생물 계수장치이다. 40°C 되게 처리한 원유를 lysing 용액으로 카제인과 체세포 등을 용해시켜 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의해 분해시키고, 미생물은 acridine orange용액으로 염색 후 continuous flow epifluorescent 현미경에 의해 감지되어 박토스캔에 의해 계수된다. 이 기기는 시간당 80개 시료를 처리할 수 있고, 시료 1개의 검사시간은 약 15분이 소요된다(시료의 예열처리 10분+Bactoscan 측정시간 5분). 최근에는 flow cytometry법을 이용한 최신의 장비가 보급되고 있으며, 이 장비는 blank 값 관리가 용이한 장점이 있다. 박토스캔 사용시 주기별 점검사항은 <표 2-4>와 같다.

〈표 2-4〉 주기별 기기 점검사항

구분	점검사항	세부내용
일일 점검	<ul style="list-style-type: none"> - 대물렌즈 청소 - Lamp Fan 작동 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 면봉 또는 증류수, Xylene 등을 묻혀서 닦음 ◇ Stand-by 혹은 Auto상태에서 항상 돌고 있어야 함 (뚜껑은 닫은 상태에서 점검)
매주 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Filtration Unit 안전밸브점검 - Microsyringe Unit의 Water Reservoir와의 증류수 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Filtration Unit가 비워진 상태에서 두개의 안전밸브를 당겨 봄 ◇ 증류수가 항상 채워져 있어야 하며 혼탁해지면 교체
격주 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Roation Disc Cleaning Unit의 나일론 스판지 교환 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Allen Screw를 풀어 오염된 스팬지를 빼내고 새로운 스팬지로 교체
매달 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Fan Filter(5개) 세척 - Silicagel Cartridge 점검 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 전원을 완전히 내린 후 Filter를 꺼내어 세제(퐁퐁, 비누)로 세척하여 완전히 건조시킨 후 재위치에 조립 ◇ 파란색에서 분홍색으로 바뀌게 되면 교체 해야 함
매년 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Liquid Sensor Unit에 있는 Air Filter 교체 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 년 1회 혹은 이물질로 인해 막히거나 파손시 교체

2) 세균의 활성도를 측정하는 방법

① Impedance method

Impedance란 전도물질에 흐르는 교류전류에 대한 저항을 말한다.

Impedance method는 이 원리를 기초로 하여 배지에 접종된 미생물의 대사산물들로 인한 전기적인 impedance의 변화량을 측정하는 방법이다.

Conductance는 저항의 역치이다. 이 원리를 이용한 기기로는 박토미터(Bactometer)와 멜더스(Malthus)가 있다. 표준평판배양법의 결과를 이 기기

의 감지시간(detection time)과 관계시켜 두 방법간의 상관관계가 0.95 이상 되도록 보정(calibration)하여 사용해야 한다.

② ATP method

모든 생균에 존재하는 ATP를 추출하여 생물발광성(bioluminescence)에 ATP가 소모되는 원리를 이용하여 미생물 수를 측정하는 방법이다. 전제 조건으로는 세포내 ATP 함량이 모든 종류의 미생물에서 동일해야만 품질 평가 방법으로 사용될 수 있다.

다. 세균수 검사장비의 표준화

세균 집락을 측정하는 방법인 표준평판배양법은 전 세계적인 표준방법으로 가장 널리 이용되고 있지만 이 검사법은 검사시작 후 72시간이 경과한 후에 결과를 알 수 있고 많은 노동력을 필요로 하여 다량의 시료를 검사하는데는 한계가 있다. 또한 세균을 직접 계수하는 방법인 직접현미경법은 15분 정도이면 검사결과를 얻을 수 있으므로 표준평판배양법에 비하면 훨씬 신속하지만 생균수와 사균수를 모두 계수한 결과를 얻고, 아주 작은 양의 시료를 취해야 하므로 실험 결과의 반복성이 좋지 않기 때문에 원유의 미생물 수를 측정하기 위한 일반적인 방법으로서는 부적당한 것으로 알려져 있다.

이와 같은 원리를 이용한 박토스캔(Bactoscan)은 원유중의 미생물을 형광염색 물질로 염색하여 형광현미경을 통해 연속적으로 세균을 계수하는 자동화된 미생물 계수장치로서 이 검사법은 검사 시작 후 신속하게 검사결과를 알 수 있으므로 선진국에서 다량의 시료를 검사하는데 많이 사용된다. 그러나 이 기기는 장비가 비싸고 생균과 사균이 동시에 측정되므로 세균수 수준에 따라 표준평판배양법과의 상관관계를 고려하여 보정한 다음 사용해야 한다.

세균수를 검사하는 또 다른 방법으로는 세균의 활성도를 측정하는 Impedance method가 있으며, 이 원리를 이용한 기기로는 박토미터(Bactometer)와 맬더스(Malthus)가 있다. 이 방법도 표준평판배양법의 결과

를 이 기기의 감지시간(detection time)에 기록하여 두 방법간의 상관관계가 0.95 이상 되게 보정(calibration)하여 사용한다. 이 검사법은 표준평판배양법과 유사하여 배지에 시료를 접종하고 배양한 다음 2~12시간 후에 결과를 알 수 있으며 한번에 검사할 수 있는 시료수가 제한되어 있다. 그러나 이 방법은 시료 중 미생물을 종류별로 검사할 수 있어 유가공 공장에서 품질관리용 또는 원유의 세균분포 파악 용도로 활용이 가능하여 세균수 검사에도 사용되고 있다. 이 기기도 박토스캔처럼 표준검사법인 표준평판배양법과의 상관관계를 고려하여 보정곡선을 작성한 다음 사용해야 한다.

국내에서도 1993년 6월 1일부터 세균수에 의한 유대 지불제도가 시행된 이래 이러한 자동화 기기가 많이 도입되었으며, 세균수 위생등급 실태에 맞는 표준곡선 및 보정계수를 작성하여 사용되고 있다.

1) 검사장비별 표준화 실시 방법

“축산물의 가공기준 및 성분규격”의 원유 중 세균학적 시험법의 일반세균수 검사법에 준해서 실시한다.

- ① 유대결정에 사용되는 세균수 측정용 표준곡선 및 보정계수는 검역원으로부터 공급받아 필요시 표준화를 실시하는 것을 원칙으로 한다.
- ② 세균수 측정용 보정계수 및 표준곡선을 작성하기 위한 가검 재료는 농장 원유를 무균적으로 채취한 후 냉장 상태로 잘 운반된 것이어야 한다.
- ③ 동일한 원유를 가지고 세균수 검사법의 표준방법인 표준평판배양법과 자동화 기기법(박토스캔, 박토미터, 맬더스 등)으로 측정한다.
 - 이때 표준평판배양법은 “축산물의 가공기준 및 성분규격”의 원유 중 세균학적 시험법의 일반세균수 검사법에 준해서 실시한다.
 - 자동화기기법은 제조회사에서 권장하는 방법대로 기기별 사용상의 주의사항을 철저하게 준수하여 무균적으로 세균수 검사를 실시한다.
- ④ 세균수 측정용 보정계수 및 표준곡선은 국내 유질 수준에 맞는 최소 200 개 이상의 샘플로 작성된 것이어야 하며, 표준평판배양법과의 상관계수는 95% 이상이어야 한다

⑤ 세균수 측정용 자동화 검사기기의 관리상태가 적절하게 유지되는지를 확인하기 위하여 원유검사기관은 표준샘플을 이용하여 15일에 1회 이상 기기상태를 확인한 후 검사를 실시하고 기기별 비교검사(cross check)를 실시하는 것을 원칙으로 한다.

2) 검사장비 사용시 주의할 점

- ① 검사하고자 하는 시료는 냉장상태에서 보관
- ② 검사장비 보관장소는 적정온도(20~35°C)와 적정습도(30~50%)를 유지할 것
- ③ 박토스캔의 경우 시약은 적정온도에서 보관하고, 시약 제조시 권장농도 및 유효기간을 철저히 준수하고, 사용자는 사용 전 BZ 샘플을 이용하여 DL을 조정하고 기기의 압력상태를 점검하고 검사를 실시할 것
- ④ 박토미터와 멜더스의 경우 모듈 또는 셀 등 측정용기들이 적절하게 멀균 처리된 것이어야 하며, 시료 접종시 정확한 피펫으로 무균적으로 정확한 용량을 접종할 것.
- ⑤ 제조회사에서 권장하는 기기점검요령에 의해서 매일, 매월, 6개월마다 점검내용에 대해서 정기적으로 확인할 것.
- ⑥ 기타 내용은 제조회사에서 권장하는 방법대로 적절히 관리할 것.

라. 세균수 검사장비 비교검사(cross check)를 위한 표준용액 사용

세균수 검사장비는 세균수 검사법의 표준방법인 표준평판배양법에 의해서 보정한 후 사용해야 한다. 하지만 기기별 검사 결과치는 장비의 관리 및 기기상태 그리고 사용방법 등에 따라 다양한 차이를 나타낼 수 있다. 따라서 원유검사기관별 검사결과 수치를 비교·점검할 필요성이 있다. 실제 국립수의과학검역원에서 원유에 정균제를 처리한 후 검사기관별 검사결과를 비교해 본 결과 검사기관별 결과치가 약간의 차이가 있는 것으로 조사되었다. 그리하여 국립수의과학검역원에서는 검사장비 보유기관간 비교검사를 실시하기 위한 표준샘플을 개발하였다.

세균수 표준샘플은 정상 원유에 존재하는 *lactobacilli* 군주를 탈지유로 동결 건조 처리하여 군을 장기간 보존하도록 유지한 다음, 사용시 증류수로 적절하게 희석하여 세균수 검사법으로 측정하여 기기별 비교시험을 실시하기 위하여 개발된 것이다. 그동안 박토스캔, 박토미터, 멜더스 등을 이용하여 재현성 및 보존성을 조사한 결과, 기기가 허용하는 오차범위 내에 들어 기기간 비교시험(cross check)를 실시하는데 매우 유용한 것으로 나타났다. 그리하여 1999년 검사공영화 실시 이후 매월 원유검사기관에 세균수 검사장비 비교 검사용 표준용액을 생산하여 공급하고 있다. 원유검사기관은 비교샘플을 이용하여 기기의 정확성을 점검하고 유대지불 검사를 실시하도록 되어 있다.

3. 체세포수 검사법

가. 체세포(Somatic Cell) 란 ?

체세포란 우유를 생산하는 유선상피세포와 외부로부터 들어오는 미생물을 제거하여 젖소의 몸을 건강하게 유지해 주는 면역세포, 즉 백혈구를 합한 것이다. 건강한 유선으로부터 분비되는 원유에는 체세포수가 mL^{-1} 당 25만 이하이다.

체세포의 종류는 매우 다양하나 일반적으로 상피세포, 호중구, 임파구, 단핵구와 그 외의 세포 등을 들 수 있다. 건강한 유선으로부터 분비되는 원유에는 60~70% 정도의 상피세포와 대식구와 림프구가 관찰되지만 젖소의 유방내로 병원성 미생물이 침입하여 감염되면 유선조직의 염증상태로 인하여 체세포 수의 증가와 체세포 구성양상에도 변화가 생긴다. 즉 원유 mL^{-1} 당 50만 이상의 체세포 수를 나타내며 그 중 95%가 호중구로 구성되어 있다.

이에 따라 체세포 수를 측정함으로써 유방염을 진단하는 기술은 전 세계적으로 가장 널리 이용되고 있다. 그리하여 선진 낙농국에서도 오래 전부터 체세포 수에 의한 유방염 진단 및 등급제를 실시하고 있어 우유의 위생적인 측면에 높은 관심을 기울이고 있는 실정이다.

나. 체세포수 검사법

체세포 수를 측정하는 방법으로는 직접염색에 의한 현미경 검사법, 우유의 점도를 이용하여 측정하는 Rolling Ball Viscometer(RBV)법, 체세포를 형광 물질인 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색시켜 계수하는 포소매틱(Fossomatic) 및 소마카운터(Somacount)법 등이 있다.

1) 표준 검사법 : 직접 현미경법

직접현미경 검사법은 슬라이드 글라스의 1cm²내에 샘플우유 0.01mℓ를 도말, 건조시켜 염색 후 현미경하에서 체세포 수를 직접 검사하고 현미경 계수를 곱하여 원유 1mℓ 중 체세포 수를 산정하는 것으로 이 검사법이 현재 체세포수 검사법의 표준법으로 널리 이용되고 있다. 하지만 이 방법은 많은 시간과 노력이 들어서 다수의 샘플을 처리하기에는 부적합하다.

(1) 원유채취 및 보존

원유 채취시에는 충분히 혼합한 후 채취하고 저장 온도가 6°C를 초과해서는 안되며 6시간 이내에 검사를 수행하여야 한다. Orthoboric acid(0.6%이내)를 보존제로 첨가시에는 6°C에서 24시간 보존할 수 있다. 체세포 수는 최초 2~3일 정도는 증가한 뒤 시간이 길어질수록 감소하므로 정확한 검사를 얻기 위해서는 신속한 검사가 필요하다.

(2) 염색액(Newman-Lampert stain solution)

Methylene blue	0.6g
Ethyl alcohol 95%	54mℓ
Tetrachlorethane	40mℓ
Glacial acetic acid	6mℓ

Ethyl alcohol과 tetrachloroethane을 혼합하여 60~70°C 항온수조에서 처리한 후 methylene blue를 주의깊게 가한다. 4°C로 식힌 후 glacial acetic acid를 가하여 10~12 micron 이하의 구멍 사이즈(pore size)의 필터(filter)를 이용하여 여과한 다음 사용한다.

(3) 염색 방법

슬라이드 글라스는 사전에 깨끗이 닦고, 알코올로 쟈처리후 건조시켜 사용하며, 슬라이드 글라스 위의 1cm²격자는 메니큐어 등으로 정확히 표시한다. 원유를 30~40°C로 열처리한 후 슬라이드 위(1cm²)에 고르게 도말하여 고정시키고, 10분간 염색을 실시하고 증류수로 3회 수세 후 건조시켜 현미경으로 관찰한다.

(4) 체세포수 산정

- 현미경계수(Microscopic factor:MF)

$$MF = \frac{100(\text{우유희석배수}) \times 100(\text{mm}^2 \text{을 cm}^2 \text{로 환산})}{r^2 \text{ (반지름)} \times 3.1416}$$

$$= \frac{10,000}{0.08^2 \times 3.1416} = 500,000$$

(한시야 면적은 $r^2 \times 3.1416$ 이며, 1cm²를 현미경 시야 면적으로 나누면 1cm² 내의 현미경시야수가 되며, 이 수치에 우유희석 배수를 곱하면 1ml 우유중의 현미경 계수를 구할 수 있음)

체세포수 측정시 핵을 가진 모든 세포를 계산하고 핵이 없는 원형질(cytoplasmic) 덩어리 및 작은 핵을 가진 작은 세포의 분해물(small cell fragment)은 계산하지 않는다. 체세포 수의 산정은 다음 공식에서와 같이

working factor를 곱하여 산정한다. 예를 들면 50시야를 임의로 측정했을 때 체세포수가 30이었다면 우유 1ml 중의 체세포 수는 working factor (10,000) × 측정수 (30) = 300,000 이 된다(표 2-5).

〈표 2-5〉 시야 수와 working factor와의 관계

측정한 시야 수	Working factor
1	500,000
10	50,000
25	20,000
50	10,000
100	5,000
200	2,500

2) 기기검사법

포소매틱 (Fossmatic)

가) 원리

우유 중 체세포에 형광물질인 ethidium bromide로 염색시켜 일정량을 디스크(disk)에 도포시켜 순간적으로 통과되는 체세포를 할로겐 램프로 측정하는 자동형광현미경법이다. 최근에는 일정한 속도로 흐르는 관에 빛을 비추어 염색된 세포의 수를 측정하는 flowcytometry method를 이용한다.

나) 준비물

- 우유 약 10ml
- 시약준비

① Dye buffer Basic solution (14,500 샘플 측정용)

- 40~50°C로 가열된 중류수 1ℓ에 ethidium bromide 2.5g을 완전히 녹인다.

- Triton X-100 50mℓ과 Fossomatic buffer powder 415g을 4ℓ 증류수로 완전히 녹인 후 총 5ℓ가 되게 한다(햇빛과 공기가 통하지 않게 보존하면 유효기간은 90일 정도이다).

② 1% Triton X-100 Solution

- Triton X-100 10mℓ를 1ℓ 증류수에 넣은 후 60℃에 가온하여 녹인다.
(햇빛과 공기가 통하지 않게 보관하면 유효기간은 60일 정도이다).

③ Working solution(유효기간은 2-3주)

- Dye buffer basic solution을 증류수로 10배 희석하여 사용한다.
- Cleaning solution : 1% Triton X-100 10mℓ과 암모니아수 5mℓ를 10ℓ 증류수에 넣어 사용한다.
- Zero solution : NaCl 4g을 증류수 1ℓ에 녹인 후 Triton X-100 1mℓ을 가하여 사용한다(밀봉하여 건조한 곳에서 보관)

다) 방법

① Fossomatic을 15분간 stand by 한 다음 zero solution으로 영점을 잡아준다.

② Prog 및 enter key를 사용하여 batch 및 sample number 값을 정해 준다.

③ Sample의 체세포수 측정은 Auto measure를 사용하여 자동으로 측정 한다.

④ 원유가 혼합된 다음 2.6mℓ이 주입되고 ethidium bromide dye solution에 의해 체세포가 염색되어 디스크(disk)에 도포 되어서 할로겐 램프를 이용 측정하게 된다.

라) 특징

① 분석 속도 : 300 sample/1시간 (Fossomatic 300)

② 측정범위 : > 10,000,000 cell/mℓ

③ 정확도 : < 10%

- ④ 직접현미경법과 상관성 : 0.96~0.99
- ⑤ 오차(반복성) : 4~7%
- ⑥ 우유소비량 : 2.6ml
- ⑦ 샘플온도 : 30~40°C
- ⑧ 염색액 소비량 : 2,700 sample/10 ℓ
- ⑨ 세척액 소비량 : 500 sample/10 ℓ

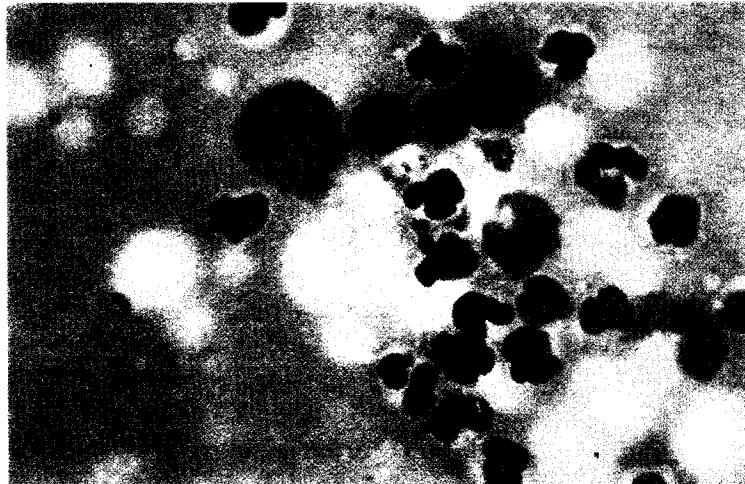
마) 주기별 기기 점검사항

구분	점 검 사 항	세 부 내 용
일일 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Zero 확인 - 시약상태 - 세척상태 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Zero액 측정시 5이하, 평균값은 3이하가 되어야 한다 ◇ 시약량이 적당한지 확인 ◇ pipette과 stirrer의 외벽을 데워진 0.1%의 Triton X-100액으로 닦아준다
매주 점검	<ul style="list-style-type: none"> - 재현성 검사 - Carry Over 검사 - Electronic 검사 - Internal Liquid 저장기 점검 - 대물렌즈세척 및 검사 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 10회 검사시 채세포수 30만 범위에서 5% 표준편차 유지 ◇ 다음샘플 검사결과에 영향을 미치지 않도록 보정실시 ◇ 전자회로 부분의 상태 확인 ◇ Ball에 중류수 상태 확인 (1/3정도 채워져야 함) : 피스톤 외부의 실린즈의 윤활작용을 위해서 ◇ 대물렌즈 오염을 예방(면봉으로 렌즈를 닦아줌)
매달 점검	<ul style="list-style-type: none"> - Buffer container 	<ul style="list-style-type: none"> ◇ Buffer container는 cleaning액으로 세척하고 중류수로 행군다. ◇ cleaning solution container는 중류수에 의해 세척한다. ◇ 2개의 container에 있는 filter는 공기압으로 세척하여 사용한다.

□ Somacount

가) 원리

우유 중의 세포를 형광물질인 ethidium bromide로 염색시켜 일정량을 레이저 빔으로 체세포를 측정하는 flow cytometric method를 이용한 장치이며 [그림 2-2], Foss Electric의 FM 500/SYS 6000 등이 이 방법을 이용한다.



[그림 2-2] 형광물질로 염색되어 있는 우유 중 체세포

나) 준비물

- ① 우유
- ② Dye stock solution : 50°C로 데운 증류수 100㎖에 ethidium bromide 2.5g을 완전히 녹여 사용한다(햇빛과 공기가 통하지 않게 냉장고에 보관하면 유효기간은 60일이다).
- ③ Buffer stock solution : 50°C로 데운 증류수 950㎖에 완충분말 1팩을 완전히 용해시킨 후 Triton X-100 10㎖를 첨가하여 햇빛이 차단된 진공용기에 냉장고에서 60일 정도 보관한다.
- ④ Working solution : 증류수 8900㎖에 Dye stock solution 100㎖를

첨가하고 여기에 Buffer stock solution 1ℓ를 섞어서 완전히 용해시킨다.

⑤ Carrier fluid (RBS 2% solution)

* 상기 시약은 상온에서 제조일로부터 약 3주를 넘지 않도록 해야 한다.

다) 방법

가검 우유 약 4mℓ의 형광 염색액 4mℓ과 자동으로 기계에 의하여 혼합 염색된다. 염색된 체세포는 레이저빔에 의해 자동으로 판독된다.

라) 특징

- ① 분석 속도 : 300 sample/1시간 (Somacount 300)
- ② 측정범위 : 0~20,000,000 cell/mℓ
- ③ 정확도 : < 10%
- ④ 직접현미경법과 상관성: > 0.96
- ⑤ 오차(반복성) : < 5%
- ⑥ 우유소비량 : 4mℓ
- ⑦ 샘플온도 : 실온
- ⑧ 염색액 소비량 : 3mℓ/1 sample
- ⑨ 세척액 소비량 : 200mℓ/1 sample

마) 기기 사용시 주의사항

- ① 각 밸브 사이에 끼워져 있는 튜브 호스의 앞쪽과 뒤쪽의 위치가 도면과 같은가를 확인하고 완전히 끼워져 있는가를 확인한다.
- ② 제조된 시약이 충분하게 준비되어 있는지 확인하고, 연결된 튜브호스가 막히지 않았는지를 확인한다.
- ③ 기기 사용시 증류수를 이용하여 영점을 확인하고 이미 체세포 수를 알고 있는 원유에 방부제를 넣은 샘플을 이용하여 재현성을 검사한다.
- ④ 증류수, 원유검사시 화면상에 원하는 형태의 그래프가 나오지 않을 경우에는 RBS 세제를 5% 정도 진하게 만들어서 세척 실시한다.

- ⑤ 프로그램이 멈추거나 기기의 작동이 멈추었을 때는 모든 전원을 끄고 컴퓨터와 기기간에 연결된 각종 케이블이 빠져 있는가를 확인하고 프린터가 켜져 있는지를 확인해 본다.
- ⑥ 원유나 중류수가 잘 빨리지 않아서 심한 공기나 공간이 생길 때에는 튜브가 막히거나 밸브사이에 정확히 끼워져 있는가를 확인하고, 피펫을 꺼내서 막힌 곳이 있으면 가는 철사로 피펫입구를 뚫어주거나, 또는 강한 초산에 피펫을 넣고 찌꺼기를 녹여서 세척 후 사용한다.

다. 체세포수 검사장비의 표준화

체세포수 측정의 표준이 되는 검사법은 원유를 슬라이드에 직접 도말하여 검사하는 직접현미경법이다. 그러나 이 방법은 각각의 원유를 사람이 직접 도밀하고 염색하여 현미경으로 검사해야 하므로 번거로울 뿐 아니라 많은 시간과 노력이 요구되어서 등급별 유대를 지불하는 현행 제도하에서 대량의 샘플을 검사하기에는 거의 불가능하며 비효율적이다. 따라서 현재 여러 낙농선진국가들에서는 표준용액을 사용하여 직접현미경법을 기초로 보정을 한 자동화된 체세포 측정기기를 사용하고 있는 실정이다. 이 기기들은 개발 당시의 조사결과 직접현미경법에 의한 체세포 수와 비교했을 때 95%이상의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있기는 하나, 현실적으로 여러 가지 요인에 의해 변할 수 있기 때문에 체세포수 표준용액을 이용하여 정기적으로 이 기기들을 표준화해야 할 필요성이 있다.

이러한 필요성에 따라 선진 외국에서는 표준용액으로서 원유가 아닌 화학물질(chemical bead류)을 이용하거나 원유에 보존제(Bronopol, Potassium dichromate, sodium azide 등)만을 첨가하여 만든 표준용액을 사용하기도 하는데 그 유효기간이 7~14일 정도 밖에 되지 않아 자주 만들어 써야만 하는 단점이 있다. 따라서 국립수의과학검역원에서는 장기간 보존이 가능하며 체세포 수 측정기에 활용될 수 있는 원유의 체세포수 측정용 표준용액을 제공하고자 광범위한 연구를 실시한 결과, 원유 중의 체세포를 특수하게 고정처리하고 특정의 보존제를 첨가함으로써 상기 목적을 달성할 수 있었다. 즉 포르말린

(formalin) 10%(V/V) 및 중류수 90%(V/V)로 이루어진 고정 처리액을 원유 중에서 최종 농도가 0.25~0.40%되게 처리하여 체세포를 고정시켰으며, 티머로 살(thimerosal, 1%) 5~15ml, 디메틸суլ포시드(DMSO) 10~20ml, 글리세린(glycerin) 10~20ml 및 젠타마이신(gentamicin, 80mg/ml) 0.5~2ml로 이루어진 보존제 용액을 약 3%(V/V) 이상 함유하는 원유 중의 체세포수 측정용 표준용액을 제조하였다. 이렇게 생산된 표준용액은 냉장상태에서 6개월 이상까지 안정성이 확인되었다(표 2-6).

위와 같이 생산된 체세포 표준용액을 이용한 장비 표준화 과정을 기술하면 다음과 같다. 먼저 제조된 표준용액의 체세포 수를 혈구계산법(Hematocytometer)과 직접현미경법으로 측정한 후 체세포 수의 평균값과 표준편차를 구한 뒤 표준편차가 5%이내에 있으면 이를 표준용액으로 사용하여 각 체세포 측정기기의 표준화 또는 보정(calibration)을 실시한다. 기기별 보정 방법은 먼저 각 기기별로 영점을 확인한 다음 자동 보정(automatic calibration) 프로그램에 들어가서 Low, Medium, High의 3종의 표준용액을 40°C에서 5분간 가온한 후 체세포수를 측정하고 각 기기별 프로그램에 맞게 보정을 실시하면 된다.

〈표 2-6〉 국내에서 생산된 체세포 표준용액의 냉장보관에서의 보존성 조사

표준용액	체세포수 (× 1,000)		상관관계 (%)
	1998년 3월 생산	1999년 4월 검사	
Low	224	217	96.9
Medium	353	347	98.3
High	565	560	99.1

제조된 Low, Medium, High 3종의 표준용액에 대한 체세포 검사장비별 체세포 수를 측정한 결과치의 모든 검사 기기별 상관관계가 95%~105% 이내인 값을 최종 체세포수 값으로 정한다. 최종 조정된 3종의 표준용액과 실제 원유

검사 결과와의 상관관계를 조사하기 위하여 먼저 체세포 검사기기별로 표준화를 실시한 다음 냉각기 원유에 대한 체세포수 값을 비교 조사하였다. 그 결과 원유 위생등급과 관련이 있는 범위에서는 기기별로 대부분이 90~110%의 상관성을 나타내었다.

표준용액에 비하여 원유검사시의 편차가 약간 더 큰 이유는 원유 자체가 여러 가지 조건에 따라 쉽게 변할 수 있기 때문이다. 하지만 체세포수 등급, 즉 1등급 20만 미만, 2등급 20~50만, 50만 이상의 등급 결정에는 5% 미만의 낮은 영향을 미치는 것으로 나타나서 크게 문제가 되지 않는 것으로 생각된다. 위와 같이 국립수의과학검역원에서 제조된 3종의 표준용액은 체세포수 검사장비에 대한 검증을 확인한 후 전국 각 시도 시험소 및 유업체 원유검사기관으로 운송된다. 그리고 각 유업체 및 집유장 자체검사원과 관할 가축위생시험소 원유검사 담당자 입회하에 기기를 표준용액으로 보정한다. 그 결과 포소매트 90과 300, 그리고 소마카운터 기기간에 모두 95~105% 전후의 높은 상관관계를 나타내었다.

따라서 이렇게 제조된 표준용액으로 보정한 결과치는 외국의 체세포 표준용액의 검사결과와 매우 유사한 결과를 나타내어(표 2-7), 체세포수 측정기기 표준화를 이루는데 중요한 지침이 될 뿐 아니라 원유의 품질향상과 더불어 유대지불 일원화에도 막대한 기여를 할 수 있을 것이다.

〈표 2-7〉 외국의 체세포수 표준용액과의 검사결과 비교

구 분	검사결과 ($\times 1,000$, 오차범위)		비 고 (상관관계)
	독일 Kiel 연구소	국립수의과학검역원	
Low	176 (172~180)	181 (167~197)	97%
Medium	433 (423~442)	439 (431~454)	98%

* 체세포 표준용액 값, ** 포소매트 검사결과의 6회 기기값

1) 검사장비별 표준화 실시방법

- “축산물의 가공기준 및 성분규격”의 원유 중 체세포수 검사법에 준해서 실시한다.
- ① 체세포수 측정의 표준이 되는 직접현미경법과 자동화기기의 검사결과는 95%이상의 상관관계가 있어야 한다.
 - ② 검사기기별 표준화 작업은 국립수의과학검역원에서 생산된 3종의 체세포 측정용 표준용액을 이용하여 주 1회 이상 정기적으로 보정을 실시하여 사용하는 것을 원칙으로 한다.
 - ③ 기기별 보정 방법은 먼저 각 기기별로 멸균 증류수를 이용하여 영점을 확인한다.
 - ④ Low, Medium, High 3종의 표준용액을 40℃로 조절된 항온수조에서 5분 정도 가온시킨다.
 - ⑤ 3종의 표준용액에 대하여 자동화 검사기기로 5회 정도 측정한 결과치가 표준용액의 수치와 오차범위 $\pm 5\%$ 이내가 되도록 자동보정(automatic calibration) 프로그램에 들어가서 기기를 보정하여 사용한다.
 - ⑥ 검사장비의 관리상태가 적절하게 유지되는지를 확인하기 위하여 원유검사 기관과의 기기별 비교검사를 실시하는 것을 원칙으로 한다.

2) 검사장비 사용시 주의할 점

- ① 검사장비 보관장소는 적정온도와 적정습도를 유지할 것
- ② 시약제조시 권장농도 및 유효기간을 철저히 준수할 것
- ③ 사용자는 사용전 영점 조정 상태 및 재현성을 확인하고 검사 실시 : 보준제가 참가된 파일롯(pilot) 샘플 이용
- ④ 제조회사에서 권장하는 기기점검요령에 의해서 매일, 매월, 6개월 점검 내용에 대해서 정기적으로 확인할 것
- ⑤ 기타 내용은 제조회사에서 권장하는 방법대로 적절히 관리할 것.

체세포 표준화 작업결과 보고서

- 원유검사기관 :
 - 보유장비 기종 (구입년도) :

〈 표준화 결과 〉

1. 보정전 수치

Fosomatic 300/90 Somacount 300

슬로프값 : **보정치값 :**

바이오스값 :

★ 표준용액수치 Low : Medium : High :

★ 기기 측정값 Low : Medium : High :

2. 보정후 수치

Fos somatic 300/90 Somacount 300

슬로프값 : 보정치값 :

바이오스값

★ 표준용액수치 Low : Medium : High :

★ 기기 측정값 Low : Medium : High :

- 검사일 :
 검사원 :
 확인자 :

4. 가수유 감별 시험법

가. 가수유 검사법

1) 유청의 비중에 의한 방법

300㎖의 공전 삼각 플라스크에 시료 200㎖를 취하고 사염화탄소 20㎖를 가하여 잘 혼합한 후 20% 초산 4㎖를 가하여 잘 혼합하고 원심 분리하여 유청을 취하고 그 비중을 측정한다(시료의 양이 적을 때는 비중 천평을 이용한다). 이때 유청의 비중이 1.026이하이면 가수한 것으로 의심한다.

2) 유청의 굴절율 측정에 의한 방법(Ackermann 법)

50㎖의 공전 시험관에 시료 30㎖를 취하고 염화칼슘(CaCl_2)액 0.25㎖를 가하여 잘 혼합한 후 마개를 닫고 끓는 수욕 중에서 15분간 가열한 다음 냉수로 17.5°C되게 냉각하여 상층에 분리된 유청의 굴절계수를 소�数점 이하 첫째자리까지 측정한다. 정상 우유의 굴절율은 38.0~40.0의 범위이나 산도가 높거나 유청이 혼탁되어 있는 것은 측정할 수 없다. 이때 CaCl_2 액은 비중이 1.1375되게 중류수에 녹이고 그 10배 희석액의 액침 굴절계수가 26인 용액을 사용하여야 한다.

3) 빙점측정에 의한 방법

빙점은 우유에 원래 존재하지 않은 외부로부터 첨가된 물의 비율을 계산하는 데 이용된다. 멸균공정, 또는 진공멸균공정이 우유의 빙점에 영향을 미칠 수 있으므로 우유의 산도가 0.18%이상인 우유는 원래 시료의 빙점 측정용으로 가치가 없으므로 유의하여야 한다.

가) 서미스트빙점측정기법(Thermistor cryoscope method)

① 기기사용법, 점검, 보정 등은 사용설명서에 따른다.

② 가수여부 판정

빙점이 -0.508°C (-0.525°H)보다 높은 온도는 가수된 것으로 추정하며, 가수여부는 아래의 방법에 따라 확인한다. 즉 가수를 알아보기 위해서는 집합원

유 또는 우유에 대한 하루 종 빙점의 최대차를 확인해둔다. 집합원유의 가수여부를 확인하기 위해서는 72시간이 경과하기 전의 동일 우군의 집합유에 대한 빙점을 측정한다. 이때의 시료는 감시하에(오전이나 오후를 택하여, 앞서의 착유시작 시점을 기준으로 11시간 경과 전이나 13시간 후에 착유한 집합원유는 제외) 착유 시스템으로부터 완전히 모은(착유 시스템의 헹굼이나 세척 전까지) 벌크탱크로부터 채취한다. 이 시료와 앞서 빙점을 측정한 가수의심 시료간에 빙점의 차이가 0.010°C 이하면 가수하지 않은 것으로 판정한다. 우유의 경우는 가공공장에서 수유한 모든 집합원유들에서 채취한 시료들의 빙점을 측정하고 그 가중평균을 구해 가수확인을 요하는 우유의 빙점과 비교하여 그 차이가 0.010°C 이하면 가공 중에 가수되지 않은 것으로 판정한다. 진공저온살균법으로 처리한 우유는 빙점이 0.005°C 상승한다.

나) 하트벨빙점측정기법(Hortvet cryoscope method)

- ① 기기사용법, 점검, 보정 등은 사용설명서에 따른다.
- ② 가수여부 판정

이 방법에 의해 얻어진 빙점($^{\circ}\text{H}$)은 아래의 공식에 따라 보정하여 서미스트 빙점측정기법(Thermistor cryoscope method)의 가수여부 판정에 따른다.

$$^{\circ}\text{C} = \{[0.1915 \times (-^{\circ}\text{H})] - 0.0004785\} / 0.199$$

$$^{\circ}\text{H} = \{[0.199 \times (-^{\circ}\text{C})] + 0.0004785\} / 0.1915$$

$^{\circ}\text{C}$: 섭씨빙점, $^{\circ}\text{H}$: Hortvet 도수빙점

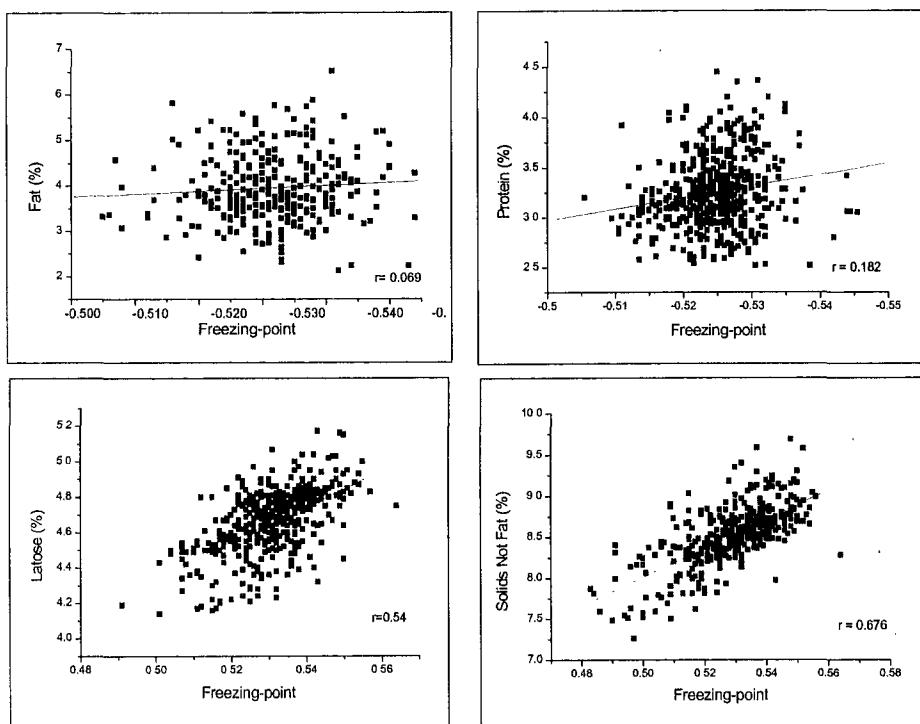
다) Cryoscope 검사장비의 표준화 실시 방법

- ① 보정액 사용

빙점 측정기는 표준화를 위해서 증류수, 7% sucrose (-0.408°C) 및 10% sucrose(-0.600°C)의 3종에 대한 빙점을 보정한 후 사용해야 한다.

② 검사장비 사용시 주의할 점

- setup시 빙점단위 확인(우리나라는 m°C로 사용)
- 사용자는 검사 전 정확성 확인(Reference 샘플 이용)
- 사용자는 사용 전 냉매 상태를 확인하고 1개월에 한번씩 공기필터를 청소한다.
- 기타 내용은 제조회사에서 권장하는 방법대로 적절히 관리할 것.



(그림 2-3) 빙점과 유성분과의 상관관계

나. 빙점과 유성분과의 상관관계

국립수의과학검역원에서 1997년 8월부터 1998년 7월까지 경기, 충남, 호남 지역의 목장 및 개체별 우유를 대상으로 지방, 단백질, 유당의 함량과 빙점과의 상관관계를 비교 분석하였다(그림 2-3). 빙점은 유성분 중 유당과 매우 밀접한

상관계수($r=0.54$)를 나타내었다. 기준 빙점(-0.530°C)을 중심으로 3%와 5% 가수했을 때 평균 빙점은 -0.514°C 와 -0.504°C 이었다. 또한 유당과 무지고형분 함량이 각각 4.4%와 8.0% 일 때 평균 빙점이 -0.514°C 를 나타내어, 검사시료 478개 중 기준 빙점(-0.530°C)을 중심으로 3% 가수 함량 수치인 -0.512°C 에 해당되는 경우가 하나도 없는 것으로 조사되어 유성분 중 유당과 무지고형분이 가수와 매우 밀접한 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

한편 원유 중 빙점측정에 의한 가수검사는 자동화장비를 이용하더라도 시료당 2분 정도 소요되므로 모든 목장을 대상으로 대량의 샘플을 검사하는데는 한계가 있다. 그리하여 유성분 검사결과를 참고로 하여 빙점검사를 실시하면 가수에 대한 원유검사를 더욱더 효율적으로 실시할 수 있을 것이다. 그러므로 무지고형분은 8.0% 이상, 유당은 4.4% 이상에서 평균 빙점이 -0.514°C 로 조사되어 가수 검사시 유성분의 함량, 특히 무지고형분과 유당의 함량을 연계하여 확정하는 것이 매우 바람직할 것이다.

5. 원유검사시 보존제 사용

원유검사시 자동화 검사장비에 의한 유성분 검사는 신속하게 대량의 시료를 분석할 수 있지만 시료의 운반거리가 멀면 시료자체의 신선도가 떨어지는 단점을 가지고 있기 때문에 보존제 사용을 필요로 한다. 원유검사시 보존제 사용유무는 국가별로 차이가 있으나, 많은 국가에서 원유검사시 보존제를 첨가하여 사용하고 있다. 보존제로는 Bronopol이 가장 많이 사용되고 있으며, 카나다와 이스라엘에서는 Potassium dichromate를 사용하고 있다.

한편, 방부제를 첨가하지 않고 냉장 보관한 경우 유성분의 변화에 있어서 지방은 산화에 의해서 감소되지만 단백질과 유당은 최초 검사결과와 비슷한 결과를 나타낸다. 하지만, 체세포의 경우는 시간이 경과됨에 따라 일시적으로 유선상피 세포의 파괴에 의해서 약간 증가하는 경향을 나타내다가 장기간 경과되었을 때에는 체세포의 파괴에 의해서 감소된다. 따라서 검사시간이 하루이상 소요될 경우에는 시료채취시 방부제를 사용하는 것이 권장되고 있다.

외국의 연구자료에 의하면 방부제 처리 후 경시별 체세포 수의 재현성 및 안

정성을 조사한 결과 가장 좋은 방부제로는 Bronopol과 Potassium dichromate였으며, Sodium azide의 경우는 40만 이상의 높은 체세포 수 일 때 재현성에 있어서 매우 큰 차이를 나타낸 것으로 알려져 있다(표 2-8)。

〈표 2-8〉 보존제 처리에 따른 경시별 체세포 수의 변화

보존제	검사 시기	체세포수(Mean×1,000 ± S.D)			
		100 level	200 level	400 level	800 level
무첨가	0h	101±3.4	229±5.1	354±10.8	765±22.3
	24h	101±3.9	217±6.8	368±9.3	806±19.3
	48h	107±4.0	229±7.6	395±7.2	868±14.8
Sodium azide (0.024%)	0h	95±4.6	193±5.9	301±20.0	660±21.3
	24h	91±2.4	196±6.5	273±11.3	730±14.3
	48h	96±4.2	202±4.8	336±9.0	719±17.2
Potassium Dichromate (0.2%)	0h	105±2.8	236±4.8	401±5.4	914±11.0
	24h	106±3.3	230±5.4	405±11.8	905±21.6
	48h	106±4.4	229±7.4	410±7.7	876±34.1
Bronopol (0.05%)	0h	110±4.6	241±4.2	421±7.5	933±10.9
	24h	107±3.6	233±5.4	414±9.3	905±12.1
	48h	108±3.1	234±7.6	422±6.3	919±11.8

* 검사횟수 : 20회, 보관온도 : 냉장(6°C),

또한 국제낙농기구협회(International Dairy Federation)에서는 유성분 검사시 보존제 종류별 보관온도에 따른 권장 보존기간을 설정하여 권장하고 있으며(표 2-9), 유대지불을 위하여 체세포 및 유성분에 대한 원유 검사시, 그리고 검사장비의 효율적인 관리적인 차원에서 보존제 사용을 적극 추천하고 있다. 국내에서도 현행 축산물가공처리법에 장시간 보관시 원유에 중크롬산칼륨 등의 보존제를 처리하도록 하고 있다.

〈표 2-9〉 유성분 검사시 보존제 종류별 보관온도에 따른 보존기간 (IDF 자료)

보존제	시료보관온도별 유효기간	
	냉장 (5°C)	실온 (20°C)
Bronopol (0.02%)	5일	5일
Bronopol (0.05%)		
Azidiol*	5일	2일
Potassium dichromate (0.2%)	12일	3일
Sodium azide (0.02%)	2일	
Ortobor acid (0.6%)	2일	

* 100㎖ 제조시

- 1) 150mg chloramphenicol in 1㎖ ethanol
- 2) 60㎖ D.W(pH 6.0)
- 3) 3.6g sodium azide(NaN₃)
- 4) 4.5g Tris-sodium-citrate 5, 5-hydrate

위의 시약을 모든 혼합한 후 50°C 항온수조에 넣고 충분히 용해시켜 총량을 중류수 100㎖로 조정하여 제조한 다음, 원유 검사시 정균제로 사용할 때는 원유 30㎖에 Azidiol 0.1㎖를 첨가해야 함.

한편, 낙농진흥법 개정시행(1999. 1. 1)에 따라 원유의 집유선 일원화와 병행하여 원유 중 유대지불 검사는 각 도의 원유검사기관(각도 가축위생시험소)에서 실시함으로써 검사결과의 공정성을 기하고자 하였다. 하지만 유대지불을 위한 채취시료가 원유검사기관으로 이송되어야 함에 따라 원유의 보관시간 증가와 검사물량 증가에 따른 검사시간 지연이 예상됨으로 인하여 신뢰성 있는 검사를 위해서 유성분 및 체세포 수를 검사하고자 하는 시료에는 보존제로 Potassium dichromate을, 세균수는 Azidiol을 사용하게 되었다.

MUN의 결과에 있어서도 보존제 종류로 검사결과치에 영향을 주기 때문에

외국에서는 원유를 냉동상태에서 보관하던지, 또는 보존제 Bronopol을 첨가하여 보관하여 유성분 검사에 활용하고 있다. 하지만 냉동보관시에는 체세포수 결과치에 영향을 주므로 원유검사 항목별로 적절한 원유보관 방법을 설정하여 관리해야 하고, 보존제 사용시에는 원유검사 항목별 적절한 보존제를 선별한 후 적정 농도의 함량을 첨가해서 사용해야 한다.

여 백

제 3 장 유방염 원인균 분리 및 동정

1. 가검유즙 채취 및 운반

유방염 원인균을 우유에서 검출하기 위해서는 우선 우유 시료의 채취부터 세심한 주의가 요구된다. 왜냐하면 공기 중이나 젖소의 피부, 유두, 채취자의 손 등에 흔히 존재하고 있는 여러 가지 세균의 오염에 의한 가양성 반응(false positive)을 줄이기 위하여 다음 사항들을 철저히 지켜야 한다.

가. 유즙 채취 기구 준비

- 멀균된 용기 : 50ml 용량의 입구 내경이 2cm 이상인 용기
- 분방 또는 개체 종합 우유 시료를 표시할 수 있는 유성펜 또는 라벨 테이프
- 채취된 우유를 냉장상태에서 운반할 수 있는 수송용 아이스박스
- 70% 알코올 탈지면, 시험관 랙, 일회용 마른 수건,
- 기록용 현장카드 및 필기도구 등

나. 유방과 유두의 세척 및 소독

평상시 유방 주위는 외부로부터 흙이나 분변 등에 항상 노출되어 있기 때문에 세균에 오염 될 가능성이 매우 높다. 따라서 유방염 검사를 위해 우유를 채취할 때에는 먼저 젖소의 유방과 유두를 깨끗한 물이나 소독된 수건을 사용하여 유두 주변을 철저히 세척한 다음에 준비된 70% 알코올로 유두와 유두주위를 3~4회 문질러 잘 소독한다.



[그림 3-1] 젖소 유두로부터 가검용 유즙 채취 방법

유방염 원인균 분리를 위한 유즙 채취는 착유 전에 실시하여야 하며, 유방안에 들어있는 전착유 우유(foremilk)는 대부분 균이 많이 존재하므로 2~3회 정도 짜버린 후 유즙 채취를 실시한다. 방법은 원손으로 마개를 연 다음 동일한 손으로 병을 잡고 가능한 수평을 유지하면서 유두에 접촉되지 않도록 하여 채취한다[그림 3-1]. 임상적으로 이상이 없이 나타난 분방도 반드시 각각 개별적으로 채취하여 검사할 필요가 있다.

다. 가검유즙의 보관과 운반

채취된 유즙은 더운 여름이나, 채취 후 시간이 경과할 경우에는 아이스박스에 얼음을 채워서 냉장상태를 유지하면서 실험실로 운반해야 한다. 실험실 도착 즉시 냉장고에 보관하면서 가급적 빠른 시간내에 유방염 검사를 실시해야 한다.

대부분의 유방염 원인균은 냉장상태에서 1주일까지는 큰 영향을 받지 않지만 장거리 운반시 또는 검사가 즉시 이루어지지 않는 가검 재료는 냉동시키는 것이

바람직하다. 그러나 *Mycoplasma*와 같은 특수 세균, *Clostridium* 속과 같은 협기성 세균은 가검 유즙을 일반 냉장상태에서 하루 이상 보관시 사멸할 가능성 있으므로 이들 원인균을 검출하기 위해서는 가검 유즙을 1시간 이내에 곧바로 세균배양을 해야 한다.

2. 유방염 원인균 분리

가. 장비 및 재료

1) 장비

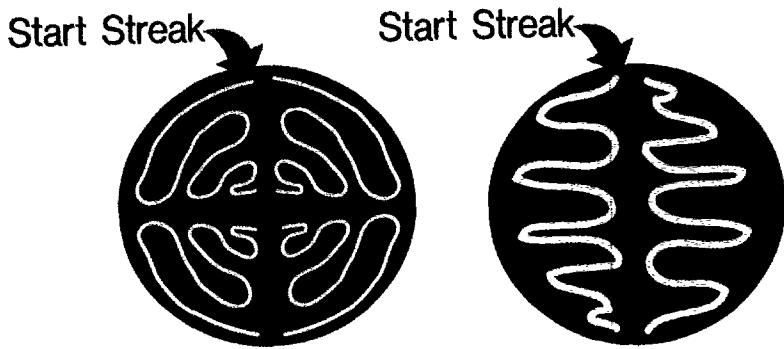
- 세균 배양기 : 35~37°C 항온기
- 광학현미경 : 100~1000배 배율
- 냉장고
- 알콜랩프

2) 재료

- 백금이 또는 멸균된 면봉(유즙을 접종할 수 있는 기구)
- 배양용 배지 : 혈액배지(유방염 원인균의 증식에 가장 적합한 배지)
- 샤크, 시험관, 생리식염수, 슬라이드 글라스, 염색액
- 기타 유방염 원인균 분리동정 배지 및 시약

나. 배양 접종방법

- 혈액배지에 2등분 또는 4등분으로 구획한 다음, 시료에 대한 번호와 분방위치를 표시한다.
- 백금이를 통하여 구획된 범위에서 유즙을 문지른다(그림 3-2).
- 접종 배지의 배양조건은 균 종에 의해서 약간씩 차이가 있지만 일반적으로 35~37°C 항온기에서 24~48시간 배양한다(표 3-1).



(그림 3-2) 배지에 균 접종하는 요령
(4등분 : 분방우유, 2등분 : 분방 또는 개체우유)

〈표 3-1〉 유방염 원인균 검사를 위한 배양시간 및 온도

유방염 원인균	배양 시간	배양 온도(°C)
<i>Staphylococci</i>	24-48hr	35-37
<i>Streptococci</i>	24-48hr	35-37
<i>Corynebacterium</i> spp	1-4 days	35-37
Gram-positive bacilli	24-48hr	35-37
Gram-negative bacteria	24-48hr	35-37
<i>Mycobacterium</i> spp	3-5 days	23-37
Yeast, mold, fungi	24-72hr	23-37
<i>Norcadia</i> spp	2-5 days	35-37
<i>Mycoplasma</i> spp	2-10 days	35-37

다. 분리세균의 동정

항온기에서 배양된 후 혈액배지 상에 나타난 균 집락 형태, 크기, 색깔, 용혈성 등을 관찰하고, 균 집락별로 그람염색을 실시하여 현미경으로 검경하여 그람 음성 및 양성여부, 균의 형태 등을 관찰하여 균 종을 결정하며(그림 3-3), 생화학검사 등을 통하여 세부적인 동정을 실시한다(표 3-2)。

〈표 3-2〉 유방염 원인균 동정을 위한 검사 내용

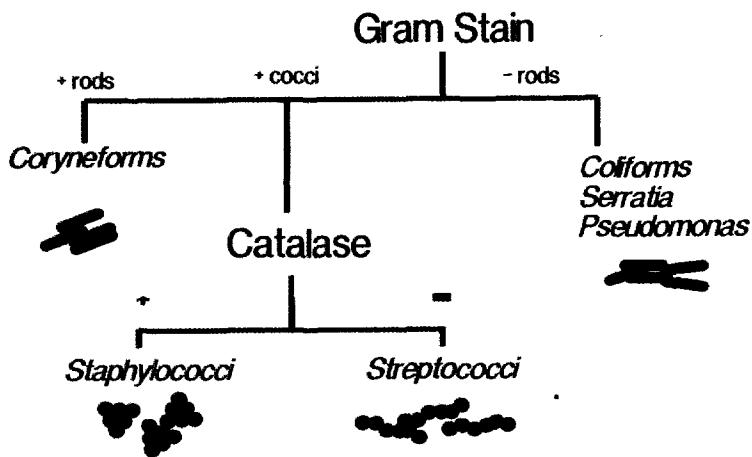
구 분	검 사 내 용
일반검사	Gram stain, KOH, Catalase, Oxidase test
포도상구균 동정	Coagulase test
연쇄상구균 동정	CAMP test, Carbohydrate fermentation, Esculin hydrolysis, Sodium hippurate test
장내세균류 동정	MacConkey agar, Triple sugar iron Simmons citrate, Motility test

1) 세균의 형태

- 구균 : 세균의 형태가 구형인 것으로 포도상구균, 연쇄상구균 등이 있다.
- 간균 : 세균의 형태가 막대기 모양인 것으로 장내세균 등이 있다.

2) 그람염색

- 정의 : 세균을 분류할 때 일반적으로 가장 널리 사용되는 방법으로는 그람 염색시 세균의 세포벽 구조가 다르다는 것을 기초로 하여 균체 성분과 반응한 크리스탈 바이올렛(crystal violet)의 에탄올(ethanol)에 의한 탈색여부에 따라 그람양성과 그람음성 세균으로 구분한다.



(그림 3-3) 그람염색 방법에 의한 형태학적 균 분류

○ 방 법

- 슬라이드 글라스 위에 생리식염수 한 방울을 떨어뜨린 다음, 배양된 균을 백금이로 옮겨서 도말하여 공기 중에서 건조시킨 후 화염 · 고정한다.
- Crystal violet 용액을 가하고 1분간 반응시킨 후 흐르는 물에 세척한다.
- Iodine 용액을 떨어뜨리고 1분간 반응시킨다
(모든 세포는 보라색으로 염색되어 있다).
- 탈색제로서 알코올에 10초 정도 반응시킨 후 흐르는 물에 세척한다.
- Safranin 용액으로 1분간 대조 염색한다
(그람 음성균 : 붉은색, 그람 양성균 : 보라색).

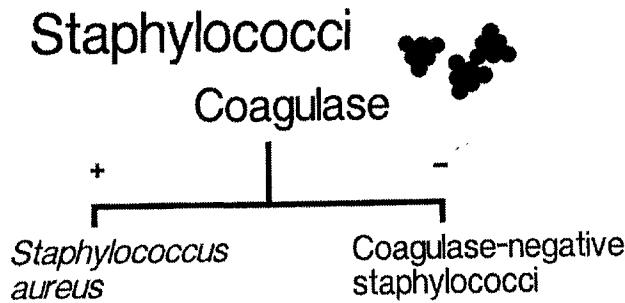
○ 분 류

- 그람양성균 : *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* 등
- 그람음성균 : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 등

3. 균의 특성 및 동정

가. *Staphylococcus aureus*(황색포도상 구균)

(1) 특 성 : *Staphylococcus aureus*는 혈액배지에서 발육하면서 집락이 황금색 색소를 형성하기 때문에 붙여진 이름으로서 coagulase에 양성반응을 나타내고(그림 3-4), mannitol을 분해하는 특징이 있다.

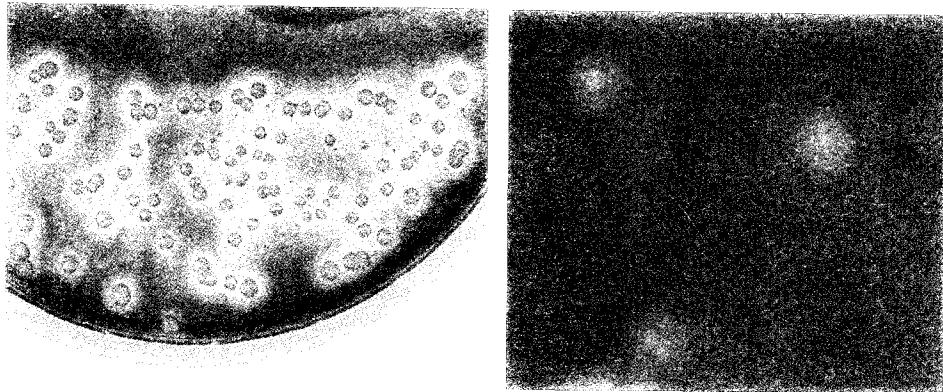


(그림 3-4) Coagulase 검사에 의한 포도상구균의 분류

(2) 형 태 : 포도상 구균은 직경이 $0.8\sim1.0\mu\text{m}$ 정도의 구균으로서, 혈액배지에 배양된 균은 그림염색시에 그람 양성의 포도송이 모양을 하고 있다.

(3) 배 양 : 보통 한천배지에 접종하여 호기성 또는 통성 혐기성 상태의 조건에서 잘 발육하고, 발육 적정 온도는 $35\sim37^\circ\text{C}$ 가 적합하나, $15\sim40^\circ\text{C}$ 범위에서도 비교적 잘 발육된다. 최적 pH는 $7.0\sim7.4$ 사이에서 잘 자란다. 보통 혈액한천배지(blood agar)에 24시간 배양하면 집락의 모양은 원형의 평활하고 광택이 있는 반구상의 집락으로 직경은 $1\sim2\text{mm}$ 정도이다(그림 3-5). 집락의 색소는 황색, 백색, 흰색이며, 색소생성은 공기가 있는 실온 배양에서 뚜렷이 잘 생성하고, 액체배지에서는 색소를 형성하지 않는다. 사람, 토끼, 양의 혈액 중 한

가지를 5~7% 되게 첨가하여 만든 혈액한천평판배지에서 β -용혈소(beta haemolysis)를 생성하며, 어떤 집락은 용혈소를 생성하지 않는 것도 있다.



(그림 3-5) 혈액배지상에서 황색포도상구균의 용혈상(왼쪽)과 확대된 용혈 집락(오른쪽)

(4) 감별시험(Differential test)

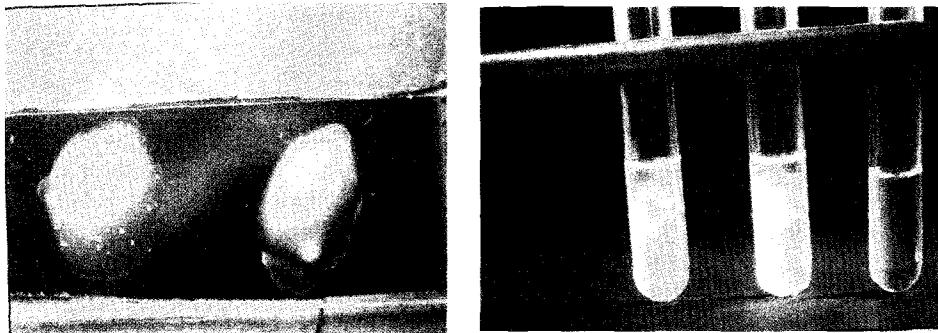
* Catalase test

○ 정 의 : 형태학적으로 그람양성 구균인 포도상구균과 연쇄상구균의 감별을 위한 간단한 검사법으로서 3% H_2O_2 (과산화수소)에 대한 반응을 관찰하는 것이다. 즉, 세균과 3% H_2O_2 를 혼합하여 기품과 가스가 발생되는지를 알아보는 실험이다. catalase 양성은 *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp.^{o]}며, 음성은 *Streptococcus* spp. 이다.

○ 방 법 : 배지에서 자란 집락이나 액체배지 배양액 한 루프를 따서 금방 제조한 3% H_2O_2 한 방울과 섞어서 즉시 거품이 생기면 catalase 양성이다.

* Coagulase test

- 정의 : 이 검사법은 병원성인 *S. aureus* 균을 동정하는데 이용되는 가장 중요한 시험으로 coagulase라는 효소를 생성하는 포도상구균 중 oxalate나 citric acid가 첨가된 혈장(plasma)과 균이 혼합되면 응고가 일어나는 것으로 사람이나 토끼의 혈장이 사용된다.



(그림 3-6) Coagulase test : 슬라이드응집반응(왼쪽) 시험관응집반응(오른쪽)

- 방법 : 슬라이드와 시험관 응집반응 두 가지 방법이 가장 널리 쓰이고 있다 (그림 3-6). 슬라이드 응집반응은 슬라이드 한 면을 두 부분으로 구분하여 양쪽에 생리 식염수를 한 방울씩 떨어뜨린다. *Staphylococci* 접락을 한 루프 떠서 슬라이드 양쪽에 풀어서 신선한 토끼 또는 사람 혈장을 한 방울씩 떨어뜨리고 루프로 서서히 섞으면서 응집을 관찰한다. 10~15초 사이에 응집되면 양성 (positive)이라고 하고, 반응 후 2분 이내에 응집하지 않으면 음성(negative)이라 한다. 시험관응집반응은 슬라이드 검사에서 응집이 서서히 일어나거나, 확인검사가 필요한 경우에 실시한다. 신선한 토끼 또는 사람 혈장 1 용적과 식염수 4 용적을 희석한 용액 0.5mℓ와 배양된 포도상구균 접락 한 루프 또는 배양액 0.1mℓ를 넣어 풀어서 혼합하여 37°C 항온기에 넣어 30분 간격을 두고 4시간까지 관찰하면 완전 응고 또는 부분 응고한 것을 관찰할 수 있으며 응고되었으면

양성이라고 한다. 6~24시간까지 응고가 안 되었으면 음성이다. 반드시 양성, 음성 대조시험을 함께 실시해야 한다.

나. 연쇄상구균 속(Genus *Streptococci*)

(1) 형태 : 연쇄상구균은 그람양성 구균으로 한 개의 구형 또는 타원형으로 보이며 크기는 직경이 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ 이다. 고형배지에서 3~4개의 짧은 연쇄 배열이고, 액체 배지에서 자란 균은 7~8개의 긴 연쇄를 이룬다.

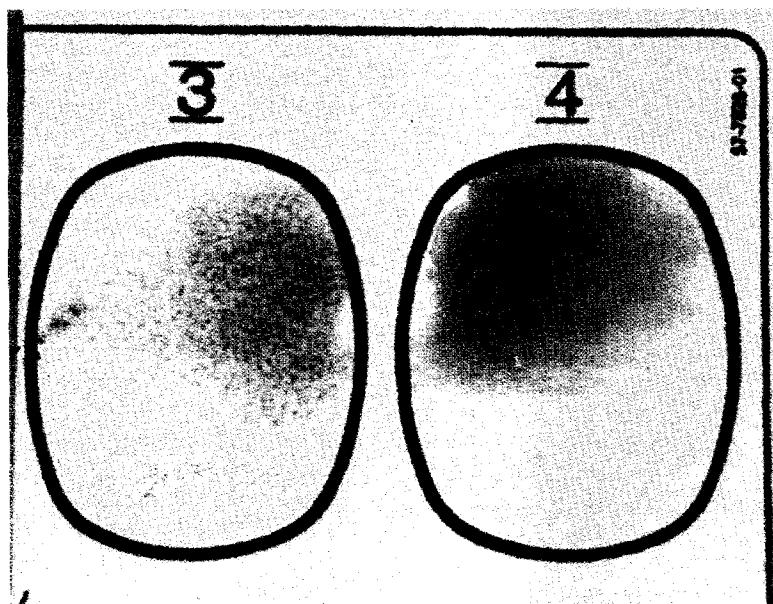
(2) 배양 : 집락의 크기는 1㎟ 정도로 작고 투명하거나 약간 반투명한 원형의 집락이다. 습기 있는 한천배지 표면에서 일반적으로 융기형이고 습윤한 집락이다. 건조한 배지표면에서는 약간 습윤하거나 거의 불투명하고 거칠다. 연쇄상구균과 폐렴구균을 비교하면 폐렴구균의 집락은 납작하고 투명한 집락이다. 특히 혈액배지에서 α , β , γ 용혈이 일어나는 것이 특징이다. 중균배지에서 잘 증식되며 균에 따라 산소와 발육관계가 있으며 통성 및 편성 상태의 조건에서 자라는 균 종도 있다. 5~10% 정도의 이산화탄소 조건이 갖추어지면 더욱 잘 자란다.

〈표 3-3〉 연쇄상구균의 감별을 위한 주요 생화학적 검사결과

균 종	Lancefield serotype	CAMP	Inulin	Hipurate	Esculin	NaCl
<i>S. agalactiae</i>	B	+	-/+	+	-	-
<i>S. dysgalactiae</i>	C	-	-/+	-	-/+	-
<i>S. uberis</i>	none	-/+	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	D	-	+/-	+	+	+
<i>E. faecium</i>	D	-	-	+/-	+	+

+ : 평균적으로 균 종의 90%가 양성, - : 평균적으로 균 종의 90%가 음성,
+/- : 평균적으로 양성이 음성보다 많음, -/+ : 평균적으로 음성이 양성보다 많음,

(3) 균 동정 : 배지에서 자란 접락을 catalase test하면 음성이고, oxidase test하면 또한 음성이다. 그람염색에서 그람양성구균이면 우선 연쇄상구균으로 생각하고 이에 대한 동정시험을 한다. catalase 양성은 포도상구균과 쌍구균 (*Micrococcus*)이고 catalase 음성은 연쇄상구균이다. 연쇄상구균 중 전염성 유방염 원인균인 *Streptococcus agalactiae*를 동정하기 위해서는 〈표 3-3〉과 같은 생화학적 검사를 수행해야 하며, [그림 3-7]은 연쇄상구균 감별을 위해 Lancefield Serotype 검사결과를 나타낸 것이다.



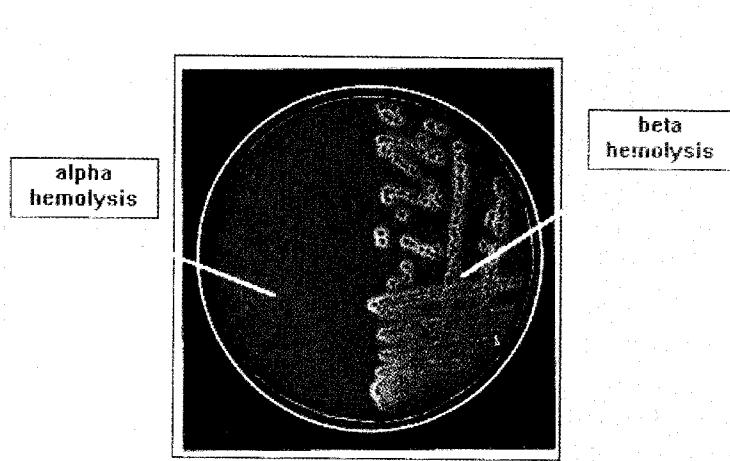
(그림 3-7) 연쇄상구균의 감별을 위한 Lancefield serotype 검사 결과
왼쪽(양성), 오른쪽(음성)

* 용혈성 검사

연쇄상구균 동정에는 용혈성의 검사가 특히 중요하다. 용혈성은 혈액한천배지 상에 균을 접종하여 접락 주위에 형성된 용혈 환의 종류에 따라 α 형, β 형으로 구분한다[그림 3-8]. 또한 용혈성이 전혀 없는 경우에는 비용혈(γ 형)이라 부르고 있다. α 용혈은 접락 주위에 녹색환이 생성되며, β 용혈은 접락 주위가 완전

히 투명하게 녹은 용혈환이 나타난다.

혈액을 배지에 넣는 이유는 발육조건이 까다로운 균에 체내조건과 같은 영양소를 공급하기 위한 것이며, 여러 가지 종류의 용혈소 생성능력 감별에 이용하기 위한 것이다. 혈액배지를 제조할 때는 5~10% 정도의 전혈을 가하는 것이 가장 이상적이다. 배지의 두께는 가급적이면 직경 100mm 평판에 배지량은 10~15ml 정도면 무난하다.



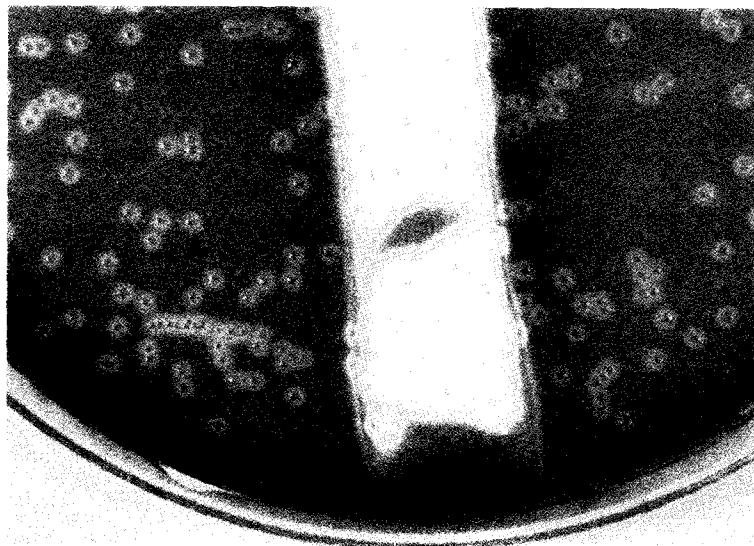
(그림 3-8) 혈액배지에서 연쇄상구균의 용혈 양상

* Sodium hippulates test

Gram-positive, catalase-negative cocci 집락을 선발하여 Sodium hippulates medium에 접종한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양한다. 배액을 1000×g에서 10분 동안 원심처리한 후 상층액 0.8ml를 시험관에 취하여 ferric chloride 0.2ml를 반응시킨다. 그 결과 reddish-brown의 침전물이 형성되면 양성반응을 나타내며, 주로 연쇄상구균을 동정을 위해서 실시하는 검사법이다.

* CAMP test

용혈성 연쇄상구균의 동정에 쓰인다. 혈액배지상에서 용혈성 연쇄상구균을 막대모양으로 직선 도말하여 심고 여기에 직각으로 β 독소가 생성된 황색포도상구균을 직선 도말하여 배양하면 2개의 접종선의 교차부위에 투명한 용혈 환이 관찰되는 현상이다(그림 3-9).



(그림 3-9) 혈액배지상에서 CAMP 검사시 투명한 용혈환을 나타내는 *S. agalactiae* 접락

다. 코리네박테리움 속(Genus *Corynebacterium*)

코리네박테리움 속은 그람양성의 구간균으로서 주요한 유방염 원인균으로 *Corynebacterium pyogenes*, *bovis*, *ulcerans* 등이 있다. 이들 원인균 중 *Corynebacterium pyogenes*는 젖소 유방의 상재균으로서 착유시 감염된 젖소에서 다른 젖소로 전파되는 전염성 유방염 원인균이다. 여름철에 주로 문제시

되며 유방 표피에 누관이 형성된 농양 물질을 분비하며, 감염시에는 예후가 불량하다.

코리네박테리움 속의 혈액배지상 특징은 24시간 배양에서는 거의 성장하지 않고, 48시간 배양 후 매우 작고, 회색의 점상의 접락을 나타내며, 0.5~1.0mm의 용혈상을 나타낸다. 그람염색시 형태학적으로 그람양성의 구간균(coccobacilli)으로서 양단이 곤봉형으로서 부풀어져 있다. *Corynebacterium pyogenes*의 경우 포도상구균과 연쇄상구균, *Corynebacterium bovis*와는 달리 catalase 음성을 나타내어 구별된다.

라. 바실러스 속(Genus *Bacillus*)

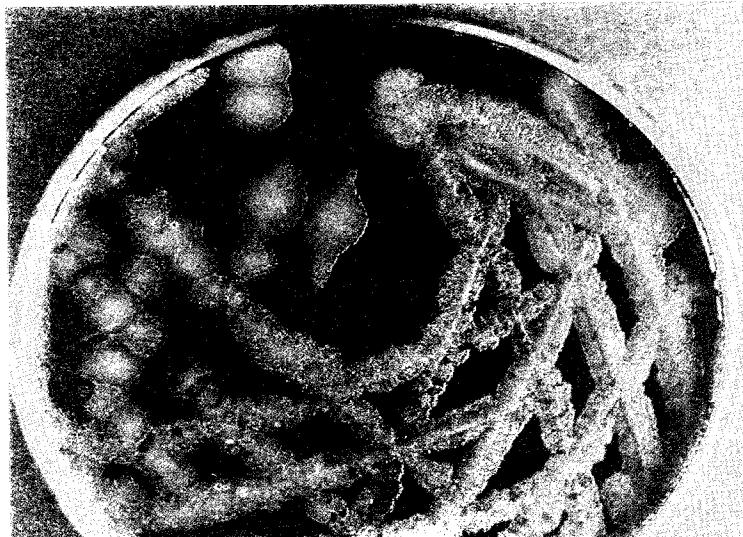
전형적 세균의 크기는 $1\sim1.2\times3\sim10.0\mu\text{m}$ 으로서 병원성 세균 중에서 매우 큰 간균으로서 긴 연쇄상 모양을 하면서 발육하며, 말단이 직각으로 대나부 마디 모양으로 연결되어 있다(그림 3-10).



(그림 3-10) 그람 염색시 *Bacillus cereus*의 형태학적 소견

발육조건과 환경이 나쁘면 균체 중앙에 아포를 만들고, 생체내에서는 아포를 형성하지 않으며, 균체에 협막을 지니고 있으나 편모가 없어 운동성이 없다. Catalase 양성이며, Indole, V-P 반응은 양성이나 황화수소는 생성하지 않는다. 탄수화물을 분해하지만 가스는 생성하지 않는다.

혈액배지상에서 용혈성이 있으며, 넓게 퍼져 나가는 형태의 집락을 형성하고, 집락은 흰색, 갈색, 녹색을 나타내며, 표면은 과립상이고(그림 3-11), MacConKey, EMB 배지에서는 자라지 않는다.



(그림 3-11). 혈액배지상에서의 *Bacillus cereus*의 집락 소견

마. 그람음성 간균(장내세균류)

그람음성 간균의 대부분이 장내세균으로서 호기성 또는 통성 혐기성 조건의 인공배지에 잘 증식하며, 편모가 있어 운동성을 가지는 것도 있다. 일반적으로 유방염을 일으키는 대표적인 균주로는 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., 등이 있다.

혈액배지에서의 그람음성 간균의 소견은 매우 다양하다. 일반적으로 *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp.의 경우는 회색조의 직경 3-5mm의 집락을 나타내며, 배지에서 분변 냄새가 나고, *E. coli* 등 일부 균 종은 용혈성을 가지고 있어 투명한 용혈대를 보일 수도 있다. *Pseudomonas* 속 균은 혈액배지에서 녹색, 갈색을 띠며, 화농의 특이한 냄새를 나타내며, *Proteus* 속 균은 혈액배지상에서 퍼져나가는 특성이 있으며, 특이한 부패취를 나타낸다. 이러한 균들을 세부적으로 동정하기 위해서는 혈액배지상에서의 소견들을 토대로 Triple sugar iron agar(TSI), Oxidase, Indole 등 여러 가지 생화학적 검사를 실시해야 한다 <표 3-4>.

<표 3-4> 그람음성 간균의 감별진단을 위한 주요 생화학적 검사결과

균 종	Lactose	Citrate	Motility	Oxidase	TSI
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	A/A, G
<i>Klebsiella</i> spp.	+	+	-	-	A/A, G
<i>Enterobacter</i> spp.	+	+	+	-	A/A, G
<i>Serratia</i> spp.	-	+	+	-	K/A
<i>Pseudomonas</i> spp	-	+/-	+	+	K/K
<i>Proteus</i> spp	-	-/+	+	-	K/AS

+ : 평균적으로 균종의 90%가 양성, - : 평균적으로 균종의 90%가 음성,

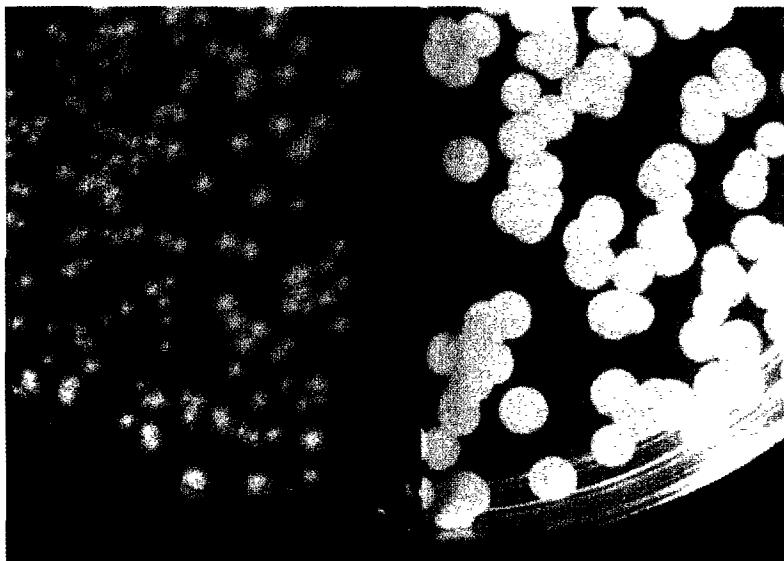
+/- : 평균적으로 양성이 음성보다 많음, -/+ : 평균적으로 음성이 양성보다 많음,

A : Acid, K : Alkaline, G : Gas production, S : Hydrogen sulfide production

바. 효모균(Yeast), 사상균(Mold), 곰팡이(Fungi)

효모균, 사상균, 곰팡이는 수 많은 종류가 있으나, 유방염을 일으키는 균은 많지 않다. 주요 원인균으로는 캔디다, 트리코스포론, 아스퍼자일러스, 크립토코코스 등이 있다. 혈액배지상에서 이러한 균들은 아주 넓게 퍼져 있으며, 이들 균을 진단하는 가장 일반적인 방법으로는 가검물을 슬라이드 위에 놓고 10~20% 수

산화칼륨을 떨어뜨리고 커버글라스를 덮고, 약간 가온한 후 15~30분 후에 현미경으로 관찰하여 확인하는 방법이다. 효모균의 특징은 보통 둥글고 난원형의 단세포성으로서 5-9 μm 의 직경을 나타내며, 밟아되는 형태를 자주 관찰할 수 있으며, 간혹 균사가 관찰된다. 사상균의 경우는 두꺼운 균사와 포자낭이 있는 솜털양 세균 집락을 형성하며, 곰팡이는 길고, 얇은 머리카락 모양의 균사를 나타낸다.

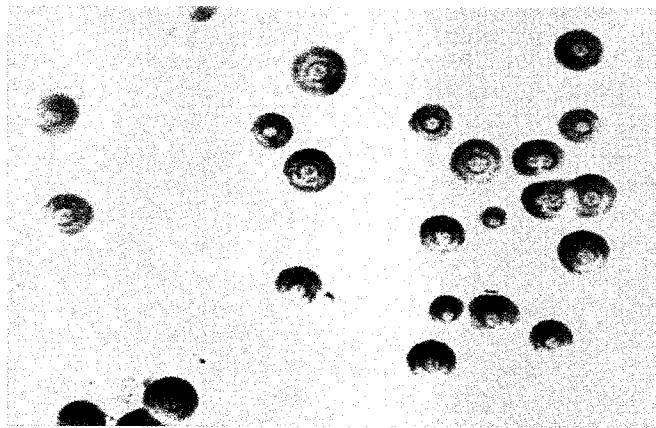


(그림 3-12) 혈액배지(왼쪽)와 사브로덱스트로한천배지(오른쪽)에서의 효모균의 집락 소견

또한 진균을 유즙 가검물로 분리할 때는 사브로덱스트로한천배지, 진균용 CT 배지, 혈액한천배지 등에 클로람페니콜 등의 항생제를 첨가하여 잡균류의 혼입을 막는다(그림 3-12). 배양온도는 대개 실온 25°C 전후가 좋으며, 곰팡이 균을 동정하기 위해서는 고도의 전문지식을 필요로 하므로 전문서적을 참고로 하여 균에 대한 지견을 높이는 것이 바람직하다. 또한 자동미생물동정기구를 이용하여 정확히 동정된 균에 대한 육안적, 현미경적 소견과 밀호시험 등을 통하여 균주와 익숙해지는 것이 중요하다.

사. 마이코플라스마 속(Genus *Mycoplasma*)

유방염에 감염된 개체에 대해서 항생제로 치료할 때 임상증상의 개선이 보이지 않고 동시에 1개 이상 또는 4개 분방이 모두 감염될 때, 유방염에 호흡기 증상이 수반되면서 3~6주 지속될 때, 그리고 세균 배양시에 음성을 나타낼 때에는 마이코플라스마 감염을 의심해 볼 수 있다.



(그림 3-13) 마이코플라스마 선택배지에서의 균 집락 소견("fried egg"모양)

마이코플라스마 원인균을 실험실에서 분리할 때는 *Mycoplasma* 선택배지를 이용한 특수 분리 과정을 필요로 한다. 일반적으로 가장 널리 사용되고 있는 선택배지로는 Glucose-serum broth medium과 Hayflick modified agar medium이다. 분리과정은 우선 가검 유즙 2ml를 취해 동량의 중균배지에 분주하고, 이를 37°C에서 48시간 배양한다. 배양물을 다시 선택배지에 접종하고 37°C, 10% CO₂ 조건하에서 1주일간 배양하면서 배양 3일부터 20-50배의 현미경하에서 균집락 유무를 관찰한다. 대부분의 세균 집락은 "fried egg" 모양이며, 중앙부는 두텁고 주변부는 평활하다(그림 3-13). 균집락을 Dienes stain으로 염색하면 균 형태를 관찰할 수 있다.

제 4 장 항생제 감수성 검사

유방염 치료율이 높은 항생제를 선별하는 방법에는 Broth dilution(액체배지), Agar dilution(한천배지 희석법)과 Disk diffusion법(디스크 확산법) 등이 있다. 3가지 방법 중에서 디스크 확산법은 시간과 노력이 가장 적게 들면서 상당히 좋은 결과를 기대할 수 있어 일반적으로 유방염 감수성 약제를 선별하는데 많이 사용되고 있다. 이 방법은 발육억제대의 크기가 최소발육억제농도와 상관관계가 있다는 원리를 이용하고 또한 임상적으로 알려진 특성 및 감수성 균에 대한 반응을 검사함으로써 약제감수성능을 검토할 수 있다. 특히 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 검사에 있어서 일관성 있고 믿을만한 결과를 얻기 위하여서는 검사방법과 기술이 표준화되어야 하며 엄격한 품질관리가 수행되어져야 한다.

1. 재료 및 배지 준비

가. 재료 준비

가) 배지

- ① Mueller-Hinton Agar
- ② Mueller-Hinton Broth 또는 Trypticase Soy Broth

나) 디스크

다) 표준탁도액

라) 면봉(cotton swab or applicator)

마) 샤례, 시험판, 백금이, 핀셋, 자

나. 배지 준비

디스크 확산법에 의한 감수성 배지로는 Mueller-Hinton Agar가 가장 적

합한 것으로 추천되고 있으며, 여기에 인용된 시험방법 및 결과 해석 표준치도 Mueller-Hinton Agar를 사용하여 표준화된 것이기 때문에 반드시 지정된 배지를 사용해야 한다. 만약 다른 배지를 사용할 경우에는 새로이 많은 실험을 통하여 많은 자료를 얻어야 하며 밸육억제대 표준치도 새로 정해져야만 한다.

1) Mueller-Hinton Agar

- ① 제조회사가 제시한 방법에 따라 중류수에 녹여 증기압 15파운드에서 15분간 멸균한다.
- ② 멸균 후 즉시 45~50°C 항온수조에 넣어 식힌다.
- ③ 45~50°C로 식은 배지를 샤레에 배지 두께가 4~5mm 되도록 분주한다(직경 90mm 샤레에는 약 25ml의 배지가 소요되며 직경 150ml인 샤레에는 약 60ml의 배지가 소요된다).
- ④ 연쇄상구균과 같은 배양이 까다로운 균을 시험할 때에는 샤레에 분주하기 전에 피브린이 제거된 양, 토키 또는 말의 혈액을 최종 농도가 5%되게 가하여 잘 혼합한 다음 샤레에 분주한다.
- ⑤ 평판에 부은 배지는 실온에서 표면이 수평하고, 두께가 일정하도록 굳히고, 과다한 습기를 증발시켜 배지표면이나 샤레 뚜껑에 물방울이 없도록 한다. 필요에 따라서는 37°C 항온기에 넣어서 약 30분 정도 말린다. 굳은 배지의 pH는 7.2~7.4이어야 한다.
- ⑥ 만들어진 한천평판배지는 즉시 사용되지 않을 경우에는 냉장고(2~8°C)에 보관하고, 7일 이내에 사용하여야 하며, 배지가 마르지 않도록 비닐 주머니에 넣어 밀폐시켜 보관하는 것이 좋다.

2) 중균용 배지

Mueller-Hinton Broth 또는 Trypticase Soy Broth를 4~5ml씩 시험판에 분주하여 15파운드에서 15분간 증기 멸균한다.

2. 균 접종

가. 균 접종액의 준비

- 1) 순수 배양된 평판에서 잘 분리된 접락을 4~5개 선택하여 백금이로 중앙 부분을 찍어 중균용 배지에 접종한다.
- 2) 35~37°C 항온기에 균의 농도가 표준 탁도액의 농도(15. 표준탁도액 참조) 이상으로 발육될 때까지 배양한다(약 2~8시간 배양이 적합하다).
- 3) 배양액을 표준 탁도액의 농도와 같도록 멸균된 생리식염수나 액체배지로 희석한다. 표준탁도관과 비교할 때 균 부유액을 넣은 시험판은 반드시 표준 탁도액 시험판과 그 규격이 동등하여야 한다.

나. 균의 접종

- 1) 균 배양액의 농도를 맞춘 후 15분 이내에 멸균된 면봉을 균 배양액에 충분히 적시고 시험판 내벽에 접촉시켜 돌리면서 눌러 짜서 과다한 균 액을 제거한다.
- 2) 표면이 마른 한천평판 위에 균 액이 적셔진 면봉을 문질러 고루 접종한다. 이때 처음에는 전 표면에 한 방향으로 문질러 접종하고 다시 되풀이하여 두 번 더 같은 방향으로 평판을 60도 방향으로 돌려서 고르게 접종한다.
- 3) 샤레 뚜껑을 닫고 3~5분 동안 방치하여 표면의 습기가 흡수되도록 한다.

3. 항생제 디스크 접종 및 판독

가. 항생제 디스크 접종

- 1) 멸균된 펀셋(forcep)이나 디스크 분주기(dispenser)를 이용하여 필요한 디스크를 균이 접종된 한천평판 위에 놓고 디스크 중앙을 가볍게 눌러 한천에 완전히 밀착시킨다. 펀셋을 사용할 때에는 다른 종류의 디스크를 집을 때마다 불에 쪼이고 식혀서 사용한다. 디스크간의 거리는 충분히 멀어져야 한다. 각 디스크 중심간의 거리는 24mm 이상이어야 하며, 평판 가장자리로부터 15mm 이하 멀어져야 한다. 직경 90mm인 평판에는 4개의 디스크를 놓을 수 있고, 직경 150mm인 평

판에는 중앙에 3개, 변두리에 9개의 디스크를 놓을 수 있다. 확산이 잘 되는 항생제 디스크는 평판의 변두리 부분에 놓고, 작은 발육 억제대를 나타내는 디스크 (vancomycin, colistin, polymyxin-B 등)는 평판의 중앙 부위에 놓는다.

2) 디스크를 놓은 샤레는 즉시 또는 30분 이내에 35~37°C 항온기에 샤레 뚜껑이 밑쪽으로 가도록 뒤집어 놓아 배양한다. Candle Jar 등 이산화탄소가 있는 곳에서 배양해서는 안 된다.

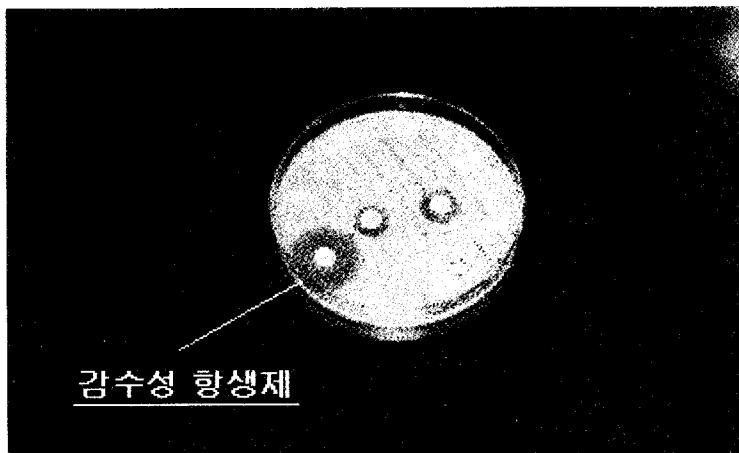
나. 판독

1) 샤레를 16~18시간 배양 후 육안으로 관찰한다. 반사광선 밑에서 샤레의 뚜껑을 열지 않고, 투명 플라스틱 jar나 caliper 또는 zone reader 등을 사용하여 디스크 직경 6mm를 포함한 발육억제대를 측정하여 기록한다. 혈액배지인 경우는 샤레의 뚜껑을 열고 한천표면에서 직경을 측정한다. 육안으로 보아서 발육이 완전히 억제된 곳을 발육저지대의 한계선으로 본다(그림 4-1). 발육억제대 주변에 미약한 발육이나 작은 집락의 형성은 발육이 억제된 것으로 간주하고 발육억제대 안에 큰 집락이 생겼을 경우에는 계대 배양하여 다시 동정해서 재시험해야 한다.

2) *Proteus mirabilis*와 *Proteus vulgaris*는 어떤 항생제 디스크 주위의 발육억제 부분으로 퍼져 자라는 수가 있는데 이때 발육억제대는 일반적으로 잘 구분되며, 그 위에 퍼져 자란 것은 무시하고 판독한다.

3) Sulfonamides 디스크를 사용할 경우 어떤 세균은 약효가 발효되기 전에 몇 세대를 거쳐 발육하기 때문에 발육저지대안에 약간의 발육(80% 이상의 발육 억제)이 있을 수 있으나 이런 발육은 무시하고 정상 발육 한계선까지를 억제대로 판독한다.

4) 만약 판독결과가 급히 요구될 때는 배양 후 6~8시간만에 판독할 수 있으나, 반드시 16~18시간 배양 후의 결과를 참조하여야 한다.



(그림 4-1) 항생제 감수성 약제 선발

다. 발육억제대 크기의 해석

시험된 세균과 항생제 디스크와의 반응에서 나타난 발육억제대의 크기에 따라 감수성 또는 내성을 결정할 수 있다. 발육억제대 크기의 해석은 <표 4-1>에 의해서 결정한다.

- 1) Cephalothin 디스크는 모든 Cephalosporin계 항생제에 대한 감수성을 검사하는데에 사용된다. 여기엔 Cephalexin, Cephalexin 및 Cephaloglycin 등이 속한다. Cephaloglycin에 대한 감수성을 보고할 때엔 발육억제대의 크기가 14mm 이하이면 내성, 15mm 이상이면 감수성인 것으로 보고해야 한다. Methicillin disc에 내성을 나타내는 *Staphylococci*는 발육억제대 크기에 관계없이 Cephalosporin계 항생제에 내성을 나타내는 것으로 보고해야 한다.
- 2) Clindamycin disc는 lincomycin에 대한 감수성을 검사하는 데에도 사용된다.
- 3) Colistin과 Polymyxin-B는 agar에 잘 확산되지 못하므로 다른 항생제에 비해 확산방법에 의한 결과가 정확하지 못하다. 내성반응은 항상 유의성이 있으나, 감수성 균에 의한 전신감염의 치료를 고려해 볼 때 확산시험의 결과를 회석방법으로 확인하는 것이 좋다.

- 4) Penicillinase에 저항성이 있는 Penicillin 들 중에서 methicillin에 대한 결과는 cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, nafcillin 등에도 적용할 수 있으므로 이에 대한 감수성만을 검사한다.
- 5) Novobiocin에 대한 결과는 혈액을 함유한 배지에 적용한다.

〈표 4-1〉 항생제에 대한 발육억제대 크기의 해석

항생제 또는 기타 화학치료제	디스크 역가	발육억제대 직경(mm)		
		내 성	중등도 감수성	감 수 성
Amikacin	30mcg	14 이하	15 ~ 16	17 이상
Ampicillin(그람음성균)	10mcg	11 "	12 ~ 13	14 "
Ampicillin(<i>Staphylococci</i>)	10mcg	20 "	21 ~ 28	29 "
Ampicillin(<i>Haemophilus</i>)	10mcg	19 "		20 "
Bacitracin	10U	8 "	9 ~ 12	13 "
Carbenicillin(<i>Proteus, E.coli</i>)	50mcg	17 "	18 ~ 22	23 "
Carbenicillin(<i>Pseudomonas</i>)	50mcg	12 "	13 ~ 14	15 "
Cephalothin	30mcg	14 "	15 ~ 17	18 "
Cefoxitin	30mcg	14 "	15 ~ 17	18 "
Chloramphenicol	30mcg	12 "	13 ~ 17	18 "
Clindamycin	2mcg	11 "	12 ~ 15	16 "
Colistin	10mcg	8 "	9 ~ 10	11 "
Erythromycin	15mcg	13 "	14 ~ 17	18 "
Gentamicin	10mcg	12 "	13 ~ 14	15 "
Kanamycin	30mcg	13 "	14 ~ 17	18 "
Methicillin(<i>Staphylococci</i>)	5mcg	9 "	10 ~ 13	14 "
Nalidixic acid	30mcg	13 "	14 ~ 18	19 "
Neomycin	30mcg	12 "	13 ~ 16	17 "
Novobiocin	30mcg	17 "	18 ~ 21	22 "
Nitrofurantoin(Furadantin)	300mcg	14 "	15 ~ 18	19 "
Oxacillin or Nafcillin	300mcg	14 "	15 ~ 16	17 "
Oleandomycin	15mcg	11 "	12 ~ 16	17 "
Penicillin G(<i>Staphylococci</i>)	10U	20 "	21 ~ 28	29 "
Penicillin G(기타 세균)	10U	11 "	12 ~ 21	22 "
Polymyxin B	300U	8 "	9 ~ 11	12 "
Streptomycin	10mcg	11 "	12 ~ 14	15 "
Sulfonamides	300mcg	12 "	13 ~ 16	17 "
Tetracycline	30mcg	14 "	15 ~ 18	19 "
Tobramycin	10mcg	12 "	13 ~ 14	15 "
Vancomycin	30mcg	9 "	10 ~ 11	12 "

여 백

제 5 장 원유 및 유제품의 세균학적 검사

1. 대장균군수(Total coliforms)

대장균군이라 함은 그람음성, 무아포성 간균으로서 유당을 분해하여 가스를 발생하는 모든 호기성, 또는 통성 혐기성 세균을 말한다. 대장균군 시험에는 대장균의 유무를 검사하는 정성시험과 대장균군의 수를 검사하는 정량시험이 있다. 대장균군수는 3개 또는 5개 시험관을 이용한 최확수(MPN : most probable number)법으로 검사함을 원칙으로 하며, 선택배지를 이용한 평판배양법으로 검사할 수 있다.

가. 배지 및 시약

- 1) Lactose Broth(유당부이온배지)
- 2) Brilliant Green Lactose Bile Broth(BGLB배지)
- 3) Lauryl Sulfate Tryptose(LST) Broth
- 4) Endo Agar(Endo배지)
- 5) EMB Agar(EMB 배지)
- 6) MacConkey Agar
- 7) Desoxycholate Lactose Agar(DCLA:데스옥시콜레이트 유당한천배지)
- 8) Violet Red Bile Agar(VRBA)
- 9) 희석액 : BPD 등

나. 시험방법

- 1) 정성시험
 - (1) 유당(Lactose)첨가 액체배지 이용법

대장균군의 정성시험은 추정시험, 확정시험, 완전시험의 3단계로 나눈다. 시험관의 수는 각 희석액에 따라 3개(또는 5개씩)를 사용한다.

(가) 추정시험

희석 시험용액 1mℓ, 0.1mℓ 및 0.01mℓ를 각각 3개 또는 5개의 BGLB배지(또는 LST broth, Lactose broth배지)에 접종한다. 시료를 접종한 배지를 35±1℃에서 24±2시간 배양하여 발효관 내에 가스가 발생하면 추정시험 양성이고, 만약 24±2시간 내에 가스가 발생하지 아니하였을 때에는 더 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다. 이 때까지 가스가 발생하지 않았을 때에는 추정시험 음성이고 가스발생이 있을 때에는 추정시험 양성이며 다음의 확정시험을 실시한다.

(나) 확정시험

추정시험에서 가스발생이 있는 발효관으로부터 BGLB배지 등에 이식하여 35±1℃에서 48±3시간동안 배양하였을 때에 가스발생 양성이거나 가스를 발생한 BGLB배지로부터 EMB배지(또는 MacConkey agar, Endo배지)에 이식하여 35±1℃에서 24±2시간 배양 후 전형적인 대장균군 집락이 확인될 경우에는 확정시험 양성으로 하고 비전형적인 집락의 경우에는 완전시험을 실시한다.

(다) 완전시험

대장균군의 존재를 완전히 증명하기 위하여 위의 평판상의 집락이 그람음성, 무아포성 간균임을 확인하고, 유당을 분해하여 가스발생을 재확인한다. 확정시험 때 EMB배지(또는 MacConkey agar, Endo배지)에서 전형적인 집락을 인정하였을 때에는 1개 또는 비전형적인 집락일 경우에는 2개 이상을 따서 각각 BGLB배지와 EMB배지에 이식하여 35±1℃서 48±3시간 동안 배양한다. 가스를 발생한 발효관에 해당되는 EMB배지의 집락에 대하여 그람염색을 실시하였을 때에 그람음성, 무아포성 간균이 증명되면 완전시험은 양성이며 대장균군 양성으로 판정한다.

(2) 평판한천배지 이용법

평판한천배지는 VRBA배지(또는 DCLA배지)를 사용한다. 각 단계 희석액

1㎖씩을 2배 이상의 색액에 취하고 미리 가온 용해하여 약 50°C에 보존한 VRBA평판배지 약 15㎖를 무균적으로 분주하고 배지가 색액 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 조용히 회전하여 좌우로 기울이면서 시료와 배지를 잘 혼합한 후 냉각용고 시킨다. 응고후 배지 표면에 동일한 배지를 3~5㎖ 가하여 중첩시킨다(중첩과정은 생략할 수도 있다). 이것을 35±1°C에서 20±2시간동안 배양하여 전형적인 암적색의 집락을 인정하였을 때에는 1개 이상의 집락을, 의심스러운 집락일 경우에는 2개 이상을 EMB배지(또는 MacConkey agar, Endo배지)에 확선 분리 배양한다. 이것을 35±1°C에서 24±2시간 배양 후 전형적인 대장균군 집락이 확인될 경우에는 확정시험 양성으로 하고 비전형적인 집락의 경우에는 완전시험을 실시한다.

2) 정량시험

(1) 최확수법(MPN)

최확수법이란 수 단계의 연속한 동일희석배수의 시료를 3개(또는 5개)씩 BGLB배지(또는 LST배지)에 접종하여 대장균군의 존재 여부를 시험하고 그 결과로부터 확률론적인 대장균군의 수치를 산출하여 이것을 최확수(MPN)로 표시하는 방법이다. 최확수는 이론상 가장 가능한 수치를 말하며, 10진 희석한 시료를 각각 3개 또는 5개씩의 발효관에 대하여 배양 후 얻은 결과를 최확수 표에 의하여 시료 ㎖중에 존재하는 대장균군수를 표시하는 것이다.

시험방법은 시료액을 10진 희석하여 3단계 이상 희석시료에 대하여 3개 또는 5개의 BGLB(또는 LST배지) 발효관에 접종하여 35±1°C에서 48±3시간 배양 한다. 가스발생 발효관 각각에 대하여 추정, 확정, 완전시험을 행하고 대장균군의 유무를 확인한 다음 최확수 표로부터 시료 ㎖중의 최확수를 구한다.

(2) 평판배양법

VRBA 또는 DCLA배지를 사용하여 시료원액 및 희석액(10^{-1} , 10^{-2}) 각 1㎖에 대하여 일반세균수의 평판배양법에서와 같은 조작으로 35±1°C에서 24±2시간 배양한 후 전형적인 대장균군 집락(직경 0.5mm 이상의 암적색 집락)을 산

출한다. 생성된 집락 중 전형적인 집락 또는 의심스러운 집락에 대하여 정성시험 때와 같은 조작으로 대장균군의 유무를 검사한다.

2. 대장균수(*E. coli*)

축산물의 종류에 따라 대장균의 검출이 대장균군보다 정확한 지표가 되는 경우가 있다. EC-MUG(4-methylumbelliferyl- β -d-glucuronide), 또는 LST-MUG assay는 24시간 이내에 대장균의 존재를 추정할 수 있는 방법으로서 대장균이 산생하는 β -glucuronidase 효소 존재하에서는 MUG substrate 가 분해되어 4-methylumbelliferon(MU)을 방출하므로 장파장의 자외선(UV 365nm) 조사하에 MU는 푸른 형광을 나타내므로 대장균이 존재함을 알 수 있다. 대장균군은 유당으로부터 가스를 산생하며, 대장균은 MUG를 분해하여 자외선 조사에서 형광을 확인함으로써 대장균수를 추정할 수 있다.

가. 배지 및 시약

- 1) EC broth(EC 배지)
- 2) EC-MUG 배지
- 3) BGLB 배지
- 4) LST-MUG 배지
- 5) EMB agar
- 6) MacConkey agar
- 7) 희석액 : BPD

나. 시험방법

1) 최확수법

최확수법(3개 또는 5개 시험판을 이용한 MPN법)으로 대장균군수 검사에서 사용한 BGLB배지에서 가스 산생 양성인 시험판으로부터 EC-MUG배지(또는 BGLB-MUG, LST-MUG)에 접종하여 44.5°C에서 24시간 배양한 후 자외선

조사하에 푸른 형광이 관찰되는 시험판을 대장균 양성으로 판정하고 최학수 표에 근거하여 대장균 수를 산출한다.

2) 대장균 확인시험

최학수법에서 가스를 생성하고, 형광이 관찰된 것은 대장균 추정시험 양성으로 판정하고 대장균의 확인시험은 추정시험 양성으로 판정된 시험판으로부터 EMB 배지(또는 MacConkey agar)에 이식하여 37℃에서 24시간 배양하여 전형적인 집락을 관찰하고 그람염색, MUG시험, IMViC시험, 유당으로부터 가스생성 시험 등을 검사하여 최종 확인한다. 대장균은 MUG시험에서 형광이 관찰되며, 가스산생, 그람음성의 무아포 간균이며, IMViC시험에서 “ + + - - ”의 결과를 나타내는 것은 대장균(*E. coli*) biotype 1로 규정한다.

3. 유산균수

발효유, 또는 유산균 음료 중의 유산균 수를 측정하기 위하여 실시한다.

가. 배지 및 시약

- 1) Plate Count Agar with Brom Cresol Purple (BCP첨가 평판측정용배지)
- 2) BL Agar(BL한천배지)
- 3) BS 배지
- 4) 희석액 : BPD 등

나. 시험방법

1) 유산간균 및 구균

유산균수의 측정방법은 일반세균수의 표준평판배양법에 준하여 시험하고 검체의 희석액은 멸균생리식염수를 사용한다. 다만, 배지는 BCP첨가 평판측정용 배지를 사용하여 35~37℃에서 72±3시간 호기, 또는 혐기배양한 후 발생한 황색의 집락을 유산균수의 집락으로 계측한다.

2) 비피더스균(*Bifidobacterium*)

(1) 검체 10mℓ에 희석액을 가하여 100mℓ이 되게 하고 균질화한다(10^{-1} 용액).

(2) 검액(10^{-1} 용액) 1mℓ에 희석액을 가하여 10mℓ되게 하고 10^{-2} 검액을 만든 후 동일하게 조작하여 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 검액을 조제한다.

(3) 각 희석검액 0.05mℓ씩을 각각 BL한천배지상에 접종하여 멸균 초자봉으로 도포한다.

(4) 시료가 접종된 색례를 협기성 상자에 넣고 37℃에서 48~72시간 배양한다. 배양 후 균 집락수를 측정하고 희석배수를 곱하여 검체 g당 생균수를 산출한다(접종량도 희석배수에 고려해야한다). 단, 1평판 당 30~300개 집락의 희석 검체만 측정한다. 또 집락수가 1개 평판당 30~300개의 범위에 있는 희석 검체가 없는 경우에는 희석배수를 변경하여 재측정한다.

(5) 배양 후 BL한천평판상의 균 성장

(가) *Bifidobacterium longum*

유갈색~황갈색의 반구상으로 융기된 중심부가 적갈색인 직경 약 1.0~2.0mm의 집락을 형성한다.

(나) *Bifidobacterium bifidum*

유갈색~회색으로 융기된 중심부가 적갈색인 직경 0.5~1.5mm정도의 원형 집락을 형성한다.

(다) *Bifidobacterium breve*

유백색~유갈색의 반구형으로 중심부가 융기된 직경 1.0~2.0mm의 원형 집락을 형성한다.

3) 유산균과 비피더스균의 혼합제품

1)의 유산균, 2)의 비피더스균의 시험방법에 따라 시험한 후 유산균 수와 비피더스균 수를 합하여 산출한다. 단, 이때에 비피더스균의 시험시에는 BS배지를 사용한다.

4. 저온세균수

저온세균은 보통 20~25°C의 저온에서 비교적 신속하게 발육하는 세균으로 특히 *Pseudomonas*, *Alcaligenes* 및 *Achromobacter*에 의한 원유의 부패가 중요하다. 대부분의 *Pseudomonas*는 냉장 중에 지방분해를 일으켜 지방 분해취를 주며, *Alcaligenes*은 단백분해성 균 종이 많아 원유를 액화, 또는 펩톤화하고 때로는 점질화와 고미를 생성시킨다.

가. 배지 및 시약

표준평판법과 동일하다.

나. 시험방법

표준평판법과 동일하며 배양온도는 25±1°C에서 72±3시간 배양하여 발육한 집락의 수를 저온세균수로 한다.

5. 내열성 세균수(세균아포수)

원유 중 내열성 세균으로는 *Microbacterium lacticum*, 내열성 *Streptococcus* 및 내열성 *Micrococcus*가 있으며, 이들 균들은 자연계 도처에 분포하며 대부분 우유 취급기구로부터 오염된다. 내열성 세균수는 다음의 처리 및 배양조건에서 발생한 호기성 아포형성 균의 집락수로부터 산출된 수를 말한다.

가. 배지 및 시약

표준평판법과 동일하다.

나. 시험방법

시험원액 20mℓ를 시험판에 넣고 끓는 물 속에 10분간 넣어 가열한 후 표준평판법에 준한다. 그러나 배양은 35±1°C에서 48±3시간 배양하여 발육한 집락의

수를 측정하여 내열성 세균수로 한다.

6. 바실러스(*Bacillus*)

적정 온도에서 냉장 보관하지 않을 경우 생성되는 균으로 외적 조건이 나빠지면 포자를 형성하며 이 포자는 열과 전조에 대하여 저항성이 강하며 휴면상태로 오래 생존한다. 보통은 땅속이나 공기 중의 먼지와 함께 존재하고 영양분, 수분, 및 온도가 적당할 때 발아 증식한다. 우유에서는 주로 *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*가 중요하며, 불결하게 우유를 취급할 때, 공중 낙하 세균에 의해 오염된다.

가. 배지 및 시약

- 1) Mannitol-egg-yolk-polymyxin(MYP) agar
- 2) Egg Yolk emulsion
- 3) Phenol red glucose broth
- 4) Tyrosin agar
- 5) Lysozyme broth
- 6) Voges-proskauer medium
- 7) Nitrate broth
- 8) Brain Heart Infusion Broth(BHI)
- 9) Glucose
- 10) Gel diffusion agar
- 11) Nutrient agar
- 12) No 1 McFarland standard
- 13) enterotoxin에 대한 항혈청
- 14) 희석액 :Butterfield's phosphate-buffered dilution water

나. 시험용액 준비

시료 50mℓ을 stomacher bag에 무균적으로 취하여 Butterfield's phosphate-buffered dilution water 450mℓ을 넣고 균질화 한 후 10배 희석하여 시험에 사용한다.

다. 시험방법

1) *B. cereus* 균수

- (1) 검액(10^{-1}) 10mℓ에 희석액 90mℓ를 가하여 10^{-2} 검액을 만든 후 동일하게 조작하여 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 검액을 조제한다.
- (2) 각 희석 검액 0.1mℓ를 각각 MYP 한천배지에 접종하여 멸균 초자봉으로 도포한다.
- (3) 시료가 접종된 색례를 항온기에 넣고 30℃에서 24시간 배양한다.
- (4) *B. cereus* 집락은 핑크색으로 나타나며 15-150개 집락의 희석 검체만 측정한다.

2) *B. cereus*의 최획수법(MPN)

시료 1mℓ 중에 *B. cereus*가 10개 미만일 때 실시하는 시험법이다. 시료액을 10진 희석하여 3단계 이상 희석시료에 대하여 3개의 soy-polymix broth에 접종하여 30℃에서 48±2시간 배양하여 발육이 인정되면 양성 시험관에 대하여 확인시험을 행하고 최획수 표로부터 시료 1mℓ중의 최획수를 구한다.

3) *B. cereus* 확인시험

MYP한천배지에서 lecithinase 양성인 핑크색 집락을 선택하여 그람염색을 실시하여 그람양성 간균의 연쇄상 배열을 확인하고 다음의 생화학적 검사를 실시한다.

(1) Glucose 이용능 시험

phenol red glucose broth에 접종한 후 혼기상태로 35℃에서 24시간 배양한다. 양성은 포도당에서 산이 생성되므로 빨간색에서 노란색으로 변하지만

*B. cereus*는 glucose를 분해하지 않는다

(2) Nitrate 환원시험

Nitrate broth에 접종하여 24시간 배양한 후 0.5% α -naphthylamine과 0.8% sulfanilic acid를 각각 0.1mℓ씩 첨가하면 nitrate가 nitrite로 환원되면서 빨간색으로 변한다.

(3) Acetyl methyl-carbinol 생성 시험

VP medium에 접종하여 35℃에서 48±2시간 배양한 후 5% α -naphthol 용액과 40% potassium hydroxide을 넣어서 1시간후까지 관찰한다. 이 균은 핑크색이나 보라색으로 나타난다

(4) Tyrosine 분해시험

Tyrosine 배지에 접종하여 35℃에서 48시간 배양한다. tyrosine이 분해되면서 균의 발육 주위가 투명해지며 7일까지 관찰한다.

(5) Lysozyme 억제시험

0.001%의 lysozyme이 함유된 nutrient 배지에 접종하여 35℃에서 24시간 배양하여 균의 발육유무를 관찰한다.

4) *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin

B. cereus 균 중 enterotoxin을 분비하는 균으로 공중보건학적으로 문제가 될 수 있으며 enterotoxin은 항혈청을 이용하여 면역화산법으로 검사한다. *B. cereus*로 확인된 접락을 0.1% glucose가 함유된 BHI 배지에 No. 1 McFarland의 탁도로 접종한 후 진탕 배양기에서 12시간 배양한다. 배양액은 32,800g에서 10분간 원심하여 그 상층액을 특신 검사용 시료로 사용한다. 슬라이드는 95% ethanol로 깨끗이 닦은 후 중류수에 NaCl 0.85%, sodium barbital 0.8%, merthiolate 1:10,000l Noble agar 1.2%되게 녹인 후 슬라이드에 부어 굳힌다. 일정 간격으로 구멍을 뚫어 중앙 well에는 항혈청을, 그리고 주위에는 검사시료를 접종한 후 humid chamber에 넣어 37℃에서 24시간 배양한다. 시료 중에 enterotoxin이 있을 경우 침강선이 관찰된다.

7. 진균수(효모 및 사상균수)

유제품과 관련이 있는 효모는 *Saccharomycetidae* 아과로 알콜 발효성이 높은 것이 많으며 발효주의 스타터(starter)로 이용되는 균 종도 있지만 유제품을 변폐시키는 유해균이나 유방염의 원인균이다. 곰팡이 종류로는 대부분 조균류, 자낭균류 및 불완전균류에 속한다.

가. 배지 및 시약

- 1) Potato Dextrose Agar(PDA)
- 2) Sabouraud's Dextrose Agar(SDA)
- 3) 희석액 : BPD 등

나. 시험방법

진균수의 측정방법은 일반세균수의 표준평판배양법에 준하여 시험한다. 다만, 배지는 PDA배지(또는 SDA배지)를 사용하여 22~25°C에서 5~7일간 배양한 후 발생한 집락수를 계산하고, 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 진균 수로 한다. 집락수는 평판 당 10~150개 사이가 계수하기 적당하다.

여 백

제 6 장 우유중 주요 병원성 세균 검사

1. 브루셀라균(*Brucella* spp.)

우유의 경우는 25㎖를 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 유지부와 침전물을 직접도말 배양하고 2마리 이상의 guinea pig(250~300g 체중)에 3~5㎖씩을 복강내에, 3마리 이상의 마우스(12~15g)의 피하에 0.25~0.5㎖씩을 주사한다.

고체시료는 시료 25g에 희석액 225㎖를 가한 후 유제액을 조제하여 직접도말 배양하고, 또한 유제액을 멸균 가아제로 여과한 후 그 여과액 또는 1,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 실험동물에 접종한다. 실험동물 접종 3주 후에 채취한 혈청에 대해 브루셀라 항체가 형성되었는지 여부를 검사하고 비장에서 브루셀라 균을 분리 배양한다.

브루셀라 균의 분리용 배지는 Serum dextrose agar(또는 Liver agar)배지를 사용하며 10% 탄산가스 조건하에 37℃에서 3~5일간 배양한다. 이때 형성된 접락은 소원형으로서 다소 용기되어 있고 투명한 빛깔이 있으며 착색되어 있지 않으나 시일이 경과된 접락은 약간 불투명하고 갈색을 띤 회백색을 보인다. 염색하여 검경하면 그람음성의 단간균으로서 구균처럼 보인다.

액체배지에서 37℃로 24시간 배양하면 균이 혼탁하게 발육하고 10일 이상 경과하면 더욱 혼탁하여지면서 적조한 균괴가 균막과 같이 표면으로부터 관 벽에 엉긴다. 이 균은 운동성이 없으며 당류도 거의 분해하지 않고, 혈액배지에서 용혈성이 없다. MacConkey agar에서 성장하지 않으며, urease 음성, citrate 음성이다. 또한 최종확인을 위하여 표준항혈청으로 응집반응을 실시하여 확인한다.

2. 결핵균

우유와 같은 액상의 시료는 그대로 사용하고, 림프절 등 가검 시료 25g에 희석액 225㎖를 가한 후 유제액을 제조하여 사용한다. 시료 25㎖를 3,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층부를 시험관에 취하고 침전물에서 백금이를 취하여 도말 표본을 만들고 Ziehl-Neelsen법으로 항산성 염색을 실시하여 항산성 균을 검정으로 확인한다.

상청부에는 동량의 8% NaOH액을, 침전물에는 그의 약 10배량의 4% NaOH액을 가하여 잘 혼합한 후 각각 0.1㎖씩을 3% Okawa 배지에 적하하고 37℃의 부란기내에서 배지를 옆으로 눕혀 놓고 대부분의 검액이 흡수되기를 기다렸다가 배지의 시험관을 밀봉하여 2개월간 배양을 계속하면서 때때로 균 집락의 발생을 관찰한다. 또한 시료 5㎖에 1% HPC용액 15㎖를 가하여 실온에서 1일간 방치한 다음 상층액을 4,000g에서 10분간 원심 침전시켜 결핵균을 분리하는 방법을 사용할 수 있다.

배양하고 남은 시료는 bromothymol blue(0.2%)를 가한 염산수용액을 적하하여 중화시킨 후 1~2㎖씩을 기니피 피내에 접종한다. 기니피는 tuberculin 피내반응 음성인 것으로서 체중 300g 이상인 것을 사용하며 접종 후 2주간부터 가끔 tuberculin 반응과 체중을 조사한다. 결핵균에 감염되었을 경우 2~5주간 부터 피내반응 양성으로 나타나고 체중은 점차로 감소하며 접종한 국소에 경결 또는 피양이 생기며 국소 임파절이 종장한다. 4~8주 후에 죽은 기니피를 부검하여 임파절 및 각 장기의 결핵성 변화를 관찰한다. 병변 부위의 장기를 무균적으로 채취하여 1% NaOH로 유제를 만들고, 그 유제액 0.1㎖를 1% Okawa배지에 배양하여 결핵균을 확인한다. 결핵균의 항산성 염색 방법은 다음과 같다.

- 가) 도말 표본을 가열하여 고정한다.
- 나) Ziehl's carbol fuchsin으로 가열하면서 3분간 염색하고 증류수로 수세한다.
- 다) Acid alcohol로 2분간 탈색한 다음 수세한다.
- 라) Alkaline brilliant green으로 3분간 염색한 다음 세척한다.
- 마) 현미경으로 항산성 균을 관찰한다.

3. 대장균 O157:H7

대장균 O157:H7 검출은 분리 동정법을 원칙으로 하고, 신속하게 검출하기 위하여 공인된 검사 키트를 이용한 EIA, PCR법 등을 병행할 수도 있다.

가. 증균배양

채취한 시료액 25mℓ를 mEC broth(novobiocin 20µg/mℓ), 또는 mTSB배지(novobiocin 20µg/mℓ) 225mℓ에 37℃, 24시간 증균 배양한다. 균 검출 효율을 증진시키기 위하여 동일한 배지를 사용하여 2회 연속 증균 배양을 실시할 수 있다.

나. 분리배양

증균 배양액을 Cefixime(0.05µg/mℓ) 및 Potassium tellurite(2.5µg/mℓ)가 첨가된 MacConkey sorbitol agar 및 Fluorocult *E. coli* O157 medium에 직접, 또는 적절히 희석($10^2\sim 10^3$)한 다음 도말하여 37℃에서 24시간 배양한다. 배양 후 sorbitol을 분해하지 않는 집락 즉, SMAC에서는 무색, Fluorocult *E. coli* O157 배지에서 녹색인 집락에 대해 각 평판 당 5개 이상 씩 MacConkey agar 및 EMB agar에 흐선하여 24시간 배양한다.

다. 확인시험

MacConkey agar에서 lactose를 분해하고, EMB agar에서 녹색성의 금속광택을 나타내는 집락에 대해 O157 항혈청을 이용한 응집반응을 실시한다. 응집이 일어나는 균에 대해서는 TSI, IMViC 시험으로 대장균임을 확인한다. TSI에서 A/A(노란색/노란색)의 형성 균을 대상으로 Indol(+), MR(+), VP(-), Citrate(-), Urease(-), Arabinose(+), Lysine(+), MUG(-), KCN(-), cellobiose 분해능(-) 등의 시험으로 대장균임을 확인한다(표 1).

생화학성상시험은 API 키트 또는 Vitek 등의 미생물 동정기를 이용할 수 있다. 대장균으로 확인 동정된 것은 O157 등의 O 항혈청과 H7의 H 항혈청을 이

용하여 혈청학적검사를 실시하여 혈청형을 확인한다. 대장균의 Verotoxin 산생능 검사는 Vero cell를 이용한 cytotoxicity assay이나 PCR 법으로 실시할 수 있다.

〈표 6-1〉 *E. coli* O157:H7의 생물학적 특징

구 분	<i>E. coli</i> O157:H7	일반 대장균
TSI	A/A	A/A
Oxidase test	-	-
Lactose	+	+
Indole	+	+
Citrate	-	-
VP	-	-
MR	+	+
Urease	-	-
Arabinose	+	+
Sorbitol 분해능	-	+
MUG test	-	+
44.5°C 성장능	-	+
Enterohemolysin	+	-
KCN	-	-
Cellobiose	-	-
Glucose, gas	+	+
Lysine decarboxylase	+	+

* 전체 대장균의 80%가 양성임

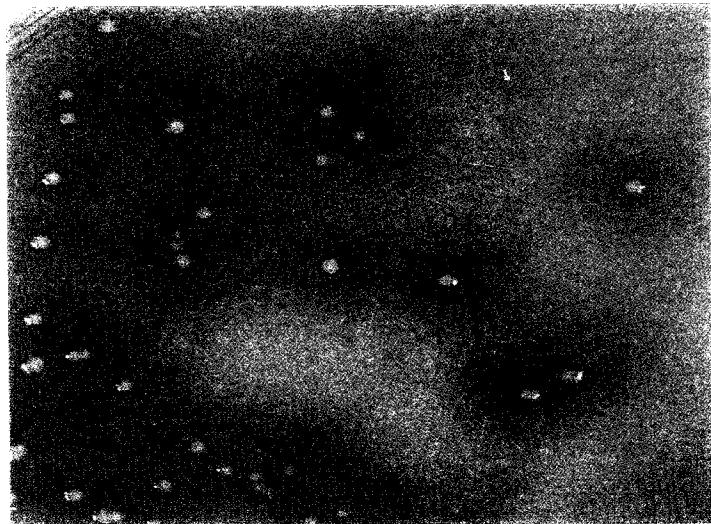
4. 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*)

가. 증균배양

채취한 시료액 25㎖를 LEB(Listeria Enrichment Broth, 또는 PALCAM broth, Fraser broth) 225㎖에 접종시켜 $35\pm1^{\circ}\text{C}$ (또는 30°C)에서 24~48시간 동안 증균 배양한다.

나. 분리배양

선택배지 LPM(Lithium chloride Phenylethanol-Moxalactam) agar, Oxford agar, 또는 PALCAM agar에 증균 배양액을 회선 접종시켜 $35\pm1^{\circ}\text{C}$ (또는 30°C)에서 48±2시간 배양 후 리스테리아 균의 전형적인 집락 모양인 진한갈색, 또는 검은색 환으로 둘러싸인 집락을 선택한다(그림 6-1).



[그림 6-1] PALCAM agar에서 리스테리아 균의 전형적인 집락 모양

다. 확인시험

유사한 집락에 대해서는 그람염색으로 그람양성 간균을 확인하고, 생화학 성상 시험을 실시한다. catalase 양성, β -용혈성을 나타내며, 운동성이 있고, CAMP 시험 결과 *Staphylococcus aureus*에서 양성, *Rhodococcus equi*에서 음성으로 나타나고(표 6-2), 당분해 시험에서 mannitol 비분해, rhamnose 분해, xylose 비분해의 결과를 보일 경우 *L. monocytogenes* 양성으로 판정하고, 혈청학적 검사(O 및 H)를 추가적으로 실시한다.

〈표 6-2〉 *Listeria* spp의 CAMP 검사 반응 결과

균 종	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+

5. 살모넬라균(*Salmonella* spp.)

가. 증균배양

시료액 25㎖에 225㎖(또는 90㎖)의 Buffered Pepton Water를 첨가하여 $36\pm1^\circ\text{C}$ 에서 18~24시간 배양한 후 이 배양액을 두 종류의 증균배지, 즉 10㎖의 tetrathionate broth 또는 selenite broth에 1㎖를 첨가함과 동시에 10㎖의 Rappaport Vassiliadis broth에 0.1㎖를 첨가하여 각각 $36\pm1^\circ\text{C}$ 및 $42\pm0.5^\circ\text{C}$ 에서 20~24시간 동안 증균 배양한다.

나. 분리배양

각각의 증균 배양액을 Bismuth Sulfite agar 및 Xylose Lysine Desoxycholate agar(또는 Desoxycholate Citrate agar, Hekton

enteric agar) 배지에 도말한 후 $36\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 20~24시간 배양한다. 평판별로 의심되는 집락(유당 비분해(무색) 및 황화수소(H_2S) 산생으로 검은색)을 선택하여 집락 표면의 중심부로부터 3개 이상을 취하여 특성검사를 실시한다.

다. 확인시험

의심스러운 집락에 대해 Triple Sugar Iron agar 또는 Lysine Iron agar 사면배지에 천자하여 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 20~24시간 배양한다. TSI 및 LIA 검사결과 살모넬라균으로 추정되는 균에 대해서는 그람음성의 간균임을 확인하고, Indol(-), MR(+), VP(-), Citrate(+), Urease(-), Lysine(+), KCN(-), malonate(-) 시험 등의 생화학적 검사를 실시한다.

생화학적으로 확인 된 살모넬라균은 혈청학적 검사(O항원 및 H 항원 응집반응)를 실시한다. 살모넬라 진단용 항혈청을 사용한 응집반응 결과에 따라 균 종을 결정한다. 먼저 살모넬라 O혼합 혈청시험으로서 다가 O항혈청을 사용하여 슬라이드 응집반응검사를 실시한 후 살모넬라 O인자 혈청시험 즉 A, B, C, D, E군의 항혈청을 사용하여 슬라이드 응집반응을 실시하여 O혈청형을 결정한다. H인자 혈청시험은 편모(H)항혈청 즉 a, b, c, d, e, h, g, k, l, r, y, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6 등에 대한 시험관 법으로 응집반응을 실시하여 결정한다.

6. 캠필로박터균 (*Campylobacter jejuni*)

캠필로박터 균의 모든 배양은 미호기성으로 산소를 적게하고 CO_2 를 증가시키거나, 또는 혐기성 jar에 CO_2 가스팩, 또는 Campy Pack을 넣어 CO_2 상태를 유지하는 미호기적 배양을 실시한다.

가. 증균배양

시료 25㎖을 stomacher bag에 무균적으로 취하여 *Campylobacter* supplement(B)가 첨가된 *Campylobaceter* Enrichment broth 225㎖을

넣고 균질화 한 후 4~5시간 동안 37°C에서 미호기적 조건으로 전 배양한다. 전 배양 후 항생제 중 cefoperzone(4ml/l)을 더 첨가하고, 유제품일 경우는 rifampicin(4ml/l)을 첨가하여 42°C에서 24~48시간 미호기적으로 배양한다.

나. 분리배양

배양액을 CBFA(Campylobacter Blood Free Agar), 또는 Campy Cefex, Blaser's Campylobacter agar(BCA)에 희선 도말하여 42°C에서 24~48시간 미호기적으로 암소에서 배양한다. 분리배양용 배지는 무균적으로 건조시켜 사용한다.

다. 확인시험

캡필로박터 군의 집락은 원형이거나 불규칙적이며 가장자리는 완만하다. 또한 두꺼운 반투명의 흰색 집락으로 자라거나 분산되어 필름모양의 투명한 집락으로 보이기도 한다. 의심스러운 집락에 대해서는 항생제를 넣지 않은 CBFA(또는 BCA)배지에 신속히 배양하여 다음의 확인시험을 실시한다. 염색은 대비염색(contrast stain)을 실시하는데, 한 집락을 취하여 식염수에 혼탁한 후 1방울의 contrast stain(10ml 식염수에 2방울의 crystal violet을 혼합한 것)으로 염색하여 cover slide를 덮고 현미경으로 검정한다. 대비염색(counter stain)으로는 carbol fuchsin을 사용한다. 모든 캡필로박터는 그람음성으로 구부러진 지그재그형의 사슬모양이며 길이는 $1.5\sim 5\mu\text{m}$ 로 관찰된다. 배지에서 배양된 집락을 이용하여 catalase와 oxidase시험을 실시하여, catalase, oxidase 시험 양성을 확인한다. 기타 생화학적 성상시험을 아래와 같이 확인한다. 모든 시험은 *C. jejuni*(hippurate와 그 이외의 실험)와 *C. lari*(항생제 내성실험)를 대조군으로 사용한다.

1) Hippurate 분해시험

Nonselective, 또는 antibiotic inhibition plate에 배양한 집락을 1% hippurate수용액 0.4ml에 접종한 후 37°C 항온수조에서 2시간 배양 후 nihydrin용액 0.2ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 10분간 더 배양한다. *C. jejuni*

는 양성(violet 또는 pale purple)을 보인다.

2) TSI 반응시험

혈액배지에서 배양한 접락을 TSI 사면배지에 접종하여 35~37°C에서 5일간 미호기적으로 배양한다. 모든 *Campylobacter*는 alkaline/alkaline 반응을 보이며, *C. jejuni*는 H₂S를 생산하지 않는다.

3) Glucose 이용능 시험

혈액배지에 배양한 접락을 glucose가 포함된 O-F media와 glucose가 들어 있지 않은 O-F media 시험판에 각각 접종 후 35~37°C에서 4일간 미호기적으로 배양한다. *Campylobacter*는 glucose 또는 그 외의 당을 분해하지 않는다. 다음의 생화학 시험은 0.1% peptone water 5㎖에 시험 접락을 McFarland No. 1의 농도로 혼탁한 후 혼탁액을 이용하여 실험을 실시한다.

4) 항생제 억제시험

항생제를 넣지 않은 CBFA에 혼탁액을 도말하여 nalidixic acid와 cephalothin disc를 놓은 후 37°C에서 24~48시간 미호기적으로 배양한다. 크기에 상관없이 저지환이 나타나므로 감수성이 있음을 의미한다.

5) 온도에 의한 생장시험

3개의 CBFA에 혼탁액을 획선 도말하여 각각 25°C, 35~37°C, 42°C에서 미호기적으로 3일간 배양하여 25°C에서는 비생장, 35~37°C와 42°C에서는 생장되는 것을 확인한다.

6) MacConkey agar에서의 생장시험

MacConkey agar 배지에 획선하여 미호기적 조건으로 35~37°C에서 3일간 배양하여 생장되는 것을 확인한다.

7) *Brucella semisolid agar*에서의 생장시험

*Brucella semisolid media*에 접종하여 35~37°C에서 3일간 배양하여 media의 윗 표면에 narrow band가 형성된 것을 확인한다.

8) 1% glycine, 3.5% NaCl에서 생장을 확인하고, H₂S 생성, Nitrate 환원(reduction)을 확인한다.

7. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

가. 균수시험

황색포도상구균 균수 시험은 일반세균수 시험과 동일하게 실시하되, 배지를 Baird-Parker 배지를 사용하고, 배양조건은 35~37°C에서 48시간 실시한 것이 다르다. 균 배양 후 직경 1.0~1.5mm 크기의 black, shiny, convex한 집락 주위에 약 2~5mm의 불투명대(opaque region)가 관찰되는 것을 계수한다. 집락수는 평판 당 20~200개가 적정하다.

나. 균분리 시험

1) 증균배양

증균배양이 필요하다고 인정될 경우에는 시료 10㎖를 90㎖의 10% NaCl을 첨가한 Tryptic Soy Broth에 접종하여 35~37°C에서 18시간 증균 배양한다.



[그림 6-2] Baird-Parker 배지에서의 황색포도상구균의 전형적인 집락 모양

2) 분리배양

시료를 직접, 또는 중균 배양액을 Baird-Parker 배지 또는 난황첨가 만니 틀 식염한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한다. Baird-Parker 배지에서 집락 형태는 직경 1.0~1.5mm, black, shiny, convex 하며, 주위에 약 2~5mm의 불투명대(opaque region)가 관찰되는 것이 특징이다[그림 6-2]. 난 황첨가 만니틀 식염한천배지에서는 황색 불투명 집락(만니틀 분해)을 나타내고 집락 주변에 혼탁한 백색환(난황반응 양성)을 나타낸다.

3) 확인시험

분리 배양된 집락을 보통한천배지에 옮겨 37°C에서 18~24시간 배양한 후 그 람염색을 실시하여 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균을 확인하고, 혈액배지에 서 용혈성을 검사한다. 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균이 확인된 것은 coagulase test를 실시한다. 토끼혈청(신선 혈청은 5%, 건조 혈청의 용액은 10%)을 가한 멸균생리식염수를 멸균한 시험관에 0.5~1mL씩 무균적으로 분주한다. 여기에 분리배지상의 집락에서 직접 또는 보통한천배지에서 순수 배양시킨 균을 백금이로 접종하여 37°C에서 배양한다. 배양 후 3, 6, 24시간에 응고 유무를 판정하여 어느 시간 후에든 응고 또는 섬유소(fibrin)가 석출된 것은 모두 coagulase 양성으로 하며 이상과 같이 확인된 것은 황색포도상구균 양성으로 판정한다. 혈장은 멸균된 5% 구연산나트륨용액 1용량에 건강한 토끼에서 채혈 한 혈액 4용량의 비율로 혼합하고, 즉시 1,500 rpm에서 10분간 원심하여 무균 적으로 분리시킨 것, 또는 시판하는 건조혈장을 이용한다. 토끼혈장을 이용하는 것이 좋지만 부득이한 경우는 사람의 혈장을 대용할 수도 있다. 이외의 생화학적 검사로 lysostaphin sensitivity 양성, thermostable nuclease production test 양성 등을 실시하며, enterotoxin 산생능은 microslide gel double diffusion 방법, 또는 PCR 법으로 검사할 수 있다.

8. 크로스트리디움 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*)

가. 균수 측정

시료 중 크로스트리디움 퍼프린겐스(*Cl. perfringens*)의 균수를 측정하고자 할 경우는 시료를 70°C에서 20분간 처리한 다음 Clostridium perfringens Agar에서 35°C에서 48시간 배양하여 균수를 측정한다. 무균적으로 시료를 0.1% Peptone Water를 사용하여 10^{-1} 부터 10^{-5} 까지 공기유압이 적게 잘 희석한다. Clostridium perfringens Agar 6~7mℓ씩을 샤레에 봇고 굳힌 후 희석한 시료 1mℓ를 배지 표면에 골고루 분산되게 한다. 이때 한 희석 배율에 대해 2개의 평판을 사용한다. 다시 15mℓ의 Clostridium perfringens Agar(45~46°C)를 중층한다. 배지가 굳은 후 샤레를 뒤집지 않은 채 혐기배양기 내에 넣는다. gas pack을 사용할 때는 밀봉 후 37°C 항온기에서 24시간 배양하며, 이 때 혐기배양기 내의 혐기 상태를 알기 위해 methylene blue 용액을 넣어 털색이 되는지를 확인한다.

배양 후 집락을 계산하고, 이 중 5~10개의 집락을 확인검사(confirmatory test)를 하기 위해 Fluid Thioglycollate Medium에 각각 접종하여 일반 항온기에서 37°C, 20시간 배양한 다음 그람양성 간균임을 확인한다〈그림 6-3〉.

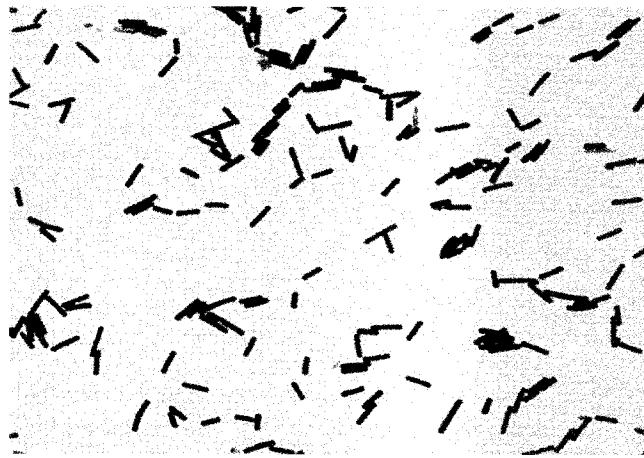
나. 균 분리시험

1) 중균배양

검사시료액 25mℓ를 225mℓ의 Cooked Meat Medium의 배지 아래 부분에 접종하여 35°C에서 18~24시간 혐기상태에서 배양한다.

2) 분리배양

증균된 균액을 Clostridium perfringens Agar에 도말하여 37°C에서 18~24시간 혐기상태에서 배양한다.



[그림 6-3] *Clostridium perfringens*의 그람염색시 형태학적 소견

3) 확인시험

의심되는 접락에 대해 그람염색, Lecithinase test, Lactose 이용능 등을 검사하고 칫트를 이용하여 toxin type을 확인한다(표 6-3). *Cl. perfringens*는 EY(egg yolk)-free TSC Agar에서 H₂S를 생성하여 흑색을 나타내며(그림 6-3), 유당으로부터 가스와 산을 생성하고, 짙고 굵은 아포 형성의 그람양성 간균이다. 이러한 균에 대해 Lactose Gelatine Medium, Motility-Nitrate(MN) Agar 등의 배지에 접종하여 37°C 일반 항온기에서 20시간 배양한다. *Cl. perfringens*는 비운동성 균으로 접종한 곳에만 자라며, gelatin의 액화는 44시간내에 일어나며, nitrate 환원 능력이 있다.

〈표 6-3〉 *Clostridium perfringens*의 toxin type

Type	ALPHA	BETA	EPSILON	IOTA
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

여 백

부록 : 실험용 시약 및 배지

I. 염색액

1. Acid-Fast stain : Ziehl-Neelsen's Method

1) 성 분

① Carbol-fuchsin stain

Basic fuchsin	0.3 g
95% Ethanol	10ml

② This solution is mixed with

Phenol(melted crystals)	5ml
Distilled water	95ml

③ Acid Alcohol

Hydrochloric acid(concentrated)	3ml
95% Ethanol	97ml

④ Counter stain

Methylene blue(certified)	0.3g
Distilled water	100ml

2) 염색방법

- ① 시료를 슬라이드 글라스 위에 도말한 후 열처리에 의해서 고정한다.
- ② 도말된 부위에 filter paper를 놓고, Carbol-fuchsin stain으로 염색하고, 염색 부위에서 증기가 발생할 때까지 열처리한다.
- ③ 증기 발생 후 5분 정도 기다린 다음 filter paper를 제거하고, 미지근하고 흐르는 물에 철저히 슬라이드 글라스를 세척한다.
- ④ 빨강 색의 흔적이 사라질 때까지 Acid Alcohol로 탈색시킨다.
* 주의사항 : 한번에 모두 탈색시키려하지 말고, 증류수로 간헐적으로 세척한 후 Acid Alcohol 적용하여 탈색시켜야 한다.
- ⑤ 탈색이 완전히 이루어 졌을 때 물로 잘 세척한다.
- ⑥ Methylene blue로 대조염색을 대략적으로 30초 정도 염색한다.
- ⑦ 세척하고, 세척액이 건조할 때까지 기다린다.

2. Dienes Stain

1) 성분

Methylene blue	2.4g
Maltose	10g
Azure II	1.25g
Sodium chloride	0.25g
Distilled water	100mℓ

2) 염색방법

- ① 커버슬라이드에 면봉으로 염색하고자 하는 시료를 매우 얇게 도말한다.
- ② 도말 된 커버슬라이드가 건조될 때까지 기다린다.
- ③ *Mycoplasma spp*로 의심되는 배지 접락 1cm' 정도를 자른 다음 microscope slide에 옮겨 놓는다.
- ④ 준비된 커버슬라이드에 배지 접락과 염색액을 처리한다.
- ⑤ 2-3분 정도 염색을 실시한다.

3) 해석

마이코플라스마 균 뿐만 아니라 세균의 접락도 염색이 이루어진다. 하지만 L-forms의 세균을 제외한 모든 세균 접락은 Methylene blue 염색실시 후 15분 정도 되면 색깔이 사라지게 되고, 마이코플라스마 균은 염색액의 색깔이 계속 유지한다. 그리고 이러한 염색액은 현미경 20~40배 사이에서 관찰되어져야 한다.

3. Gram Stain

1) 염색방법

- ① 슬라이드글라스에 식염수 한 방울을 떨어뜨린 다음, 배양된 균을 백금이로 옮겨서 도말하여 공기 중에서 건조시킨 후 화염 · 고정한다.
- ② Crystal violet 용액을 염색부위에 가하고 30~60초 정도 반응시킨 후 흐르는 물에 세척한다.
- ③ Iodine 용액을 떨어뜨리고, 30~60초 정도 반응시키고 흐르는 물에 세척하라.

- ④ 95% 알코올로 10초 정도 반응시킨 후 흐르는 물에 세척한다.
(너무 오랜 시간 동안 반응시키면 그람양성균의 색깔이 탈색되어진다)
- ⑤ Safranin 용액으로 1분간 대조 염색한다.
- ⑥ 정지된 물에 넣었다 빼었다하면서 세척한 후 건조시킨다.

4. Methylene blue stain

1) 성 분

(1) Methylene blue	0.3g
(2) Ethyl alcohol 95%	30ml
(3) 녹을 때 증류수를 첨가하라	100ml

2) 염색방법

- ① 염색하고자 하는 시료를 슬라이드에 도말하고 화염 · 고정한다..
② 염색 부위에 10초 동안 염색액으로 염색한다.
③ 미지근한 물에 슬라이드를 넣었다 빼었다하면서 헹군다.
④ 염색액을 건조시킨다.

5. Newman-Lampert Stain

1) 성 분

Methylene blue	0.6g
Ethyl alcohol 95%	54ml
Tetrachlorethane	40ml
Glacial acetic acid	6ml

Ethyl alcohol과 tetrachloroethane을 혼합하여 60~70°C 항온수조에서 처리한 후 methylene blue를 주의 깊게 가한다. 4°C로 식힌 후 glacial acetic acid를 가하여 10~12 μm 이하의 구멍 사이즈(pore size)의 필터(filter)를 이용하여 여과한 다음 냉암 소에서 밀봉 저장한다. 염색액을 제조하여 시일이 경과한 것이나 또는 침전물이 생성된 것은 사용해서는 안 된다.

2) 염색 방법

- ① 슬라이드 글라스를 알코올로 깨끗이 닦은 후 건조시켜 사용하며, 슬라이드 글라스 위의 1cm² 격자는 메니큐어 등으로 정확히 표시한다.
- ② 시료를 슬라이드 위(1cm²)에 고르게 도말하여 고정시킨다.
- ③ 염색액으로 10분간 염색을 실시하고 증류수로 3회 수세 후 건조시킨다.

II. 배지 및 관련 시약

1. Baird-Parker Medium

Tryptone	10g
Beef extract	5g
Yeast extract	1g
Sodium pyruvate	10g
Glycine	12g
Lithium chloride. 6H ₂ O	5g
Agar	20g

위의 성분에 증류수 950mL를 가하여 녹이고 pH를 7.8로 조정한 다음 121°C, 15분간 고압증기 멸균하여 48~50°C로 유지한다. Bacto EY tellurite enrichment 50mL를 무균적으로 배지에 첨가한다. 거품이 나지 않도록 잘 섞은 뒤 샤템에 15~18mL씩 분주한다. 이 배지는 불투명해야 한다.

2. Bismuth Sulfite(BS) Agar

Beef Extract	5.0g
Peptone	10.0g
Dextrose	5.0g
Bismuth sulfite	8.0g
Na ₂ HPO ₄	4.0g
FeSO ₄	0.3g
Brilliant green	0.025g
Agar	20.0g

위 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 1분간 끓여 녹인 후 pH 7.6으로 조정하여 사용한다.

3. BL 한천배지(BL Agar)

Beef extract	3g
Liver extract	5g
Yeast extract	5g
Proteose peptone	10g
Tryptone	5g
Soypeptone	3g
Soluble starch	0.5g
Glucose	10g
Dipotassium phosphate	1g
Monopotassium phosphate	1g
Magnesium sulfate	0.2g
Sodium chloride	0.01g
Manganese sulfate	0.0067g
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	0.5g
Ferrous sulfate	0.01g
Polysorbate 80(Tween 80)	1g
Agar	15g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 pH 7.2이 되도록 조정한 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 고압 멸균시킨 BL한천 배지를 약 50℃로 냉각시킨 후 소, 말, 양 또는 사람의 탈섬유소 혈액을 5%되도록 첨가시켜 멸균 샤래에 20ml씩 분주하여 응고시켜 사용한다.

4. BS배지

Sodium propionate	15g
Paromomycin sulfate	50mg
Neomycin	100mg
Lithium chloride	3g

BL배지 1,000㎖에 위의 성분을 첨가하여 조제한 후 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다.

5. Blood Agar

Tryptone	15.0g
Agar	15.0g
NaCl	5.0g
Soytone	5.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 950㎖로 만들고 가열 용해한 후 pH 7.3이 되도록 맞춘 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 고압 멸균시킨 배지를 약 50℃로 냉각시킨 후 양의 탈섬유소 혈액을 5%(50㎖)가 되도록 첨가한 다음 멸균 샤레에 약 20㎖씩 분주하여 응고시켜 사용한다.

6. Blood-Esclulin agar

Trypticase or Tryptic soy agar power	40g
Esclulin	1g
Distilled water	1000㎖

위의 성분에 중류수 1000㎖를 넣은 다음 용해시키기 위하여 가열하고, 250㎖ 플라스크 용기에 200㎖씩 분주한 후 알루미늄 호일로 덮는 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 멸균된 배지를 45~50℃ 항온수조에 1시간 동안 보관하면서 탈섬유화된 소의 혈액(defrinated bovine blood)을 최종 농도의 5%되게 첨가한 다음 멸균 샤레에 약 20㎖씩 분주하여 응고시켜 사용한다.

7. Blaser's Campylobacter Agar(BCA)

Yeast extract	5.0g
Peptone	15.0g
NaCl	5.0g
Agar	12.0g
Liver digest	2.5g

위의 성분에 중류수를 가하여 950㎖되게 용해하여 pH 7.0로 조정한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 식히고, 용혈 된 말 혈구 50㎖과 Campylobacter Supplement(A)

(유제품의 경우 사용가능)를 권장량이 되게 첨가한다.

8. Brilliant Green Lactose Bile Broth(BGLB배지)

Peptone	10.0g
Lactose	10.0g
Oxgall	20.0g
Brilliant green	0.0133g

위의 성분에 증류수를 가하여 1000ml가 되도록 하고 pH 7.2로 조정한 다음 여과
멸균하여 발력관을 넣은 시험관에 분주하여 고압증기 멸균한다. 필요에 따라서
MUG 50mg을 첨가하여 사용한다(BGLB-MUG)

9. CAMP-Esculin

Tryptic soy agar power	40g
Esculin	1g
1% ferric citrate solution	10ml
Sterile bovine or ovine blood	50ml
Distilled water	950ml

Tryptic soy agar power와 Esculin 성분을 증류수 950ml에 혼합하여 용해시킨
다음, 1% ferric citrate solution 10ml를 첨가한다. 121℃로 15분간 고압증기 멸균한
후 멸균된 배지를 47~50℃ 항온수조에 1시간 동안 보관하면서 혈액 50ml를 첨가한
다음 멸균 샤례에 약 12~15ml씩 분주하여 응고시켜 사용한다.

10. Campylobacter Enrichment Broth(CEB)

(1) Campylobacter enrichment broth base

Beef extract	10g
Peptone	10g
NaCl	5g
Yeast extract	6g

위의 성분에 증류수를 가하여 950ml되게 용해하여 pH 7.5로 조정한 후 121℃에
서 15분간 멸균하여 보관한다.

(2) CEB (Campylobacter enrichment broth)

950mℓ의 CEB base를 멸균하여 식하고 Lysed horse blood 50mℓ, Antibiotic Campylobacter Supplement(A) 또는 Campylobacter Supplement(B)(유제품의 경우 사용가능) 16mℓ, FBP 4mℓ를 혼합하여 제조한다.

11. Campylobacter Blood Free Selective Agar(CBFA)

Agar	12.0g
Peptone	10.0g
Beef extract	10.0g
Charcoal	4.0g
Casein hydrolysate	3.0g
Sodium deoxycholate	1.0g
Fe ₂ SO ₄ H ₂ O	0.25g
Sodium pyruvate	0.25g

위의 성분을 증류수로 990mℓ되게 용해하고 121℃에서 15분간 멸균하여 식하고 Cefoperazone 10mℓ을 첨가한다.

12. Campy Cefex Agar(CCA)

Brucella Agar(Difco)	44.0g
Ferrous sulfate	0.5g
Sodium pyruvate	0.5g
Sodium bisulfite	0.25g

위의 성분을 증류수로 990mℓ되게 용해하고 121℃에서 15분간 멸균하여 식하고 Cefoperazone 10mℓ 및 Cycloheximide(200mg/ ℥)을 첨가한다.

13. Carbohydrate fermentation media

Phenol red broth base	16g
Carbohydrate	10g
inulin, lactose, raffinose, mannitol, xylose, etc	
Distilled water	1000mℓ

위의 성분을 증류수로 1000mℓ되게 용해하고, 시험관에 4mℓ씩 분주하고, 121℃에서

15분간 멸균하여 식힌 다음 사용한다.

14. *Clostridium perfringens* Agar

Pancreatic digest of casein	15.0g
Liver extract	7.0g
Yeast extract	5.0g
Papaic digest of soybean meal	5.0g
Tris aminomethane buffer	1.5g
Ferric ammonium citrate	1.0g
Na ₂ S ₂ O ₅	1.0g
Agar	10g

위의 성분에 증류수를 가하여 990mℓ로 만들고 pH 7.3으로 조정한 후 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다. 멸균 후 배지를 50℃정도로 식혀 제조된 항생제 10mℓ (sodium sulfadixine 0.1g, oleandomycin phosphate 0.5mg, polymyxin B 10,000IU)를 무균적으로 가해 잘 혼합한 후 평판배지를 제조한다.

15. Cooked Meat Medium

Beef heart	500g
Peptone	10g
Glucose	2g
Sodium chloride	5g

위 성분에 증류수를 가하여 1,000mℓ로 만들고 끓여 녹인 후 121℃로 15분간 고압증기멸균하고 pH 7.2로 조정한다.

16. Christensen's Urea Agar

Peptone	1g
NaCl	5g
Dextrose	1g
KH ₂ PO ₄	2g
Phenol red (6mℓ of 1:500 solution)	0.012g
Agar	15g

위의 성분을 900ml의 멸균증류수에 녹이고 pH 6.8로 조정한 다음 121℃, 15분 고압증기멸균을 실시하고 배지를 50±2℃되게 항온수조에 보관한다. Urea 20g을 증류수로 100ml되게 용해하여 여과 멸균한 다음 배지에 첨가하여 잘 섞은 후 16×125 mm의 멸균된 시험관에 분주하고 사면으로 굳힌다.

17. Christensen's Citrate Agar

Sodium citrate	3g
Glucose	0.2g
Yeast extract	0.5g
Cysteine monohydrochloride	0.1g
Ferric ammonium citrate	0.4g
KH ₂ PO ₄	1g
NaCl	5g
Sodium thiosulfate	0.08g
Phenol red	0.012g
Agar	15g

위의 성분을 증류수 1,000ml를 가하여 약 1분 동안 가열 용해한 다음 16×150mm 시험관의 1/3정도 채운 뒤 뚜껑 또는 마개로 호기상태를 유지하여 121℃, 15분 고압증기 멸균을 실시한다. 멸균 후 4~5cm의 사면과 2~3cm의 깊이를 얻기 위해 시험관을 사면으로 유지한 채 굳힌다.

18. Desoxycholate Lactose Agar(DCLA)

Peptone	10.0g
Lactose	10.0g
Sodium chloride	5.0g
Sodium citrate	2.0g
Sodium desoxycholate	0.5g
Agar	15.0g
Neutral Red	0.03g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 pH 7.3~7.5가 되도록 맞춘 다음 1분간 끓여서 용해시켜 멸균하지 않고 즉시 사용할 수 있다(고압증기 멸균하면 배지

의 pH가 떨어져 테스옥시콜산나트륨이 침전할 수 있으므로 피하는 것이 좋다).

19. Desoxycholate Citrate Agar(DCA)

Beef extract	5.0g
Peptone	5.0g
Lactose	10.0g
Sodium citrate	8.5g
Sodium thiosulfate	5.4g
Ferric ammonium citrate	1.0g
Sodium desoxycholate	5.0g
Neutral red	0.02g
Agar	12.0g

위 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 pH 7.5가 되도록 한다.

20. EC broth

Peptone	20.0g
Lactose	5.0g
Bile salt No. 3	1.5g
Dipotassium phosphate(K_2HPO_4)	4.0g
Monopotassium phosphate(KH_2PO_4)	1.5g
Sodium chloride	5.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 멸균한 후 pH가 6.9~7.1이 되도록 맞추고 발효관에 분주하여 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

21. EC - MUG 배지

EC 배지 1,000ml에 MUG(4-methylumbelliferyl-β-d-glucuronide) 50mg을 첨가하여 시험관에 분주하여 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

22. Endo Agar

Dipotassium Phosphate(K_2HPO_4)	3.5g
Peptone	10.0g

Lactose	10.0g
Sodium sulfate	2.5g
Basic fuchsin	0.5g
Agar	15.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml되게 만들고 멸균한 후 pH 7.4가 되도록 조정한 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

23. EMB Agar

Peptone	10.0g
Lactose	5.0g
Sucrose	5.0g
Dipotassium phosphate	2.0g
Eosin Y	0.4g
Methylene blue	0.0065g
Agar	13.5g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 멸균한 후 pH 7.2되도록 조정한 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

24. Ferric chloride solution

Ferric chloride	12g
Concentrated HCl	2.5ml
Distilled water	97.5ml

위의 성분에 증류수를 가하여 용해시킨 후 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

25. Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agar

Peptone	20.0g
Meat extract	2.0g
Yeast extract	1.0g
Sorbitol	10.0g
Ammonium iron(III) citrate	0.5g

MUG(4-methylumbelliferyl-β-d-glucuronide)	0.1g
Sodium chloride	5.0g
Bromothymol blue	0.025g
Sodium thiosulfate	2.0g
Sodium deoxycholate	1.12g
Agar	13.0g

위 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 121℃로 20분간 고압증기 멸균하여 pH 7.0~7.2가 되도록 한다. 대장균 O157:H7을 선택배양하기 위한 항생제로서 Cefixime(0.05μg/ml) 및 Potassium tellurite(2.5μg/ml)를 첨가할 수 있다.

26. Fluid Thioglycollate Medium

Yeast extract	5.0g
Casitone	15.0g
Dextrose	5.0g
Sodium chloride	2.5g
L-cystine	0.75g
Thioglycollic acid	0.5g
Agar	0.75g
Resazurin	0.001g

위의 성분을 1,000ml 중류수에 용해시켜 시험판에 분주하고 121℃로 15분간 고압증기 멸균한 후 급냉하여 레자즈린 총이 나타나게 한다.

27. Fraser Broth

Tryptose	10g
Beef extract	5g
Yeast extract	5g
Sodium chloride	20g
Sodium phosphate, dibasic	9.6g
Potassium phosphate, monobasic	1.35g
Esculin	1g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 121℃에서 15분간

멸균한다. 이를 50°C 정도로 식힌 후 Nalidixic acid 0.02g, Acreflavin HCl 0.021g, Lithium chloride 3g을 여과 멸균하여 가한다.

28. Hektoen Enteric (HE) Agar

Peptone	12g
Yeast extract	3g
Bile salts No. 3	9g
Lactose	12g
Sucrose	12g
Salicin	2g
NaCl	5g
Sodium thiosulfate	5g
Ferric ammonium citrate	1.5g
Bromthymol blue	0.065g
Acid fuchsin	0.1g
Agar	14.0g
Distilled water	1L

가끔 교반시키면서 약 1분 동안 가열한 뒤 항온수조에서 냉각시킨다. 멸균된 15 ×100mm 샤례에 20㎖씩 분주하고 뚜껑을 열고 2시간 정도 굳힌다. 최종 pH는 7.6±0.2로 하고, 1일 이상 보관해서는 안 된다.

29. Lactose Broth

Peptone	5.0g
Beef extract	3.0g
Lactose	5.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000㎖로 제조하고 멸균한 후 pH 6.9가 되도록 조정하여 발효관을 넣은 시험관에 분주하여 121°C로 15분간 고압증기 멸균한다.

30. Lauryl Sulfate Tryptose(LST) Broth

Tryptose or trypticase	20g
------------------------	-----

Lactose	5g
K ₂ HPO ₄	2.75g
NaCl	5g
Sodium lauryl sulfate	0.1g

위의 성분을 증류수로 1,000ml 되게 제조하여 pH 6.8로 조정한 다음 발효관(Duram tube)을 넣은 시험관에 10ml씩 분주하고, 고압증기 멸균한다. 필요에 따라 MUG 50mg을 첨가하여 사용한다(LST-MUG).

31. Liver Agar

Beef liver	500g
Proteose peptone	10g
Sodium chloride	5g
Agar	20g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다. 일반 세균의 증식을 억제하기 위하여 배지에 Bactracin(25units/ml), Vancomycin(20μg/ml), Polymyxin B(5units/ml), Nalidixic acid(5μg/ml)과 Cloheximide(100μg/ml)을 첨가한다.

32. Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam(LPM) Agar

Thyptose	10g
Beef extract	3g
Sodium chloride	5g
Lithium chloride	5g
Glycine anhydride	10g
Phenylethanol	2.5g
Agar	15g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 121°C에서 15분간 멸균한다. 이를 50°C로 식힌 후 Moxalactam 20mg을 여과 멸균하여 가한다.

33. LIM 배지

Peptone	10g
---------	-----

Yeast extract	3g
Dextrose	3g
Bromcresol purple	0.02g
L-lysine hydrochloride	10g
L-tryptophan	0.5g
Agar	3g

위의 성분에 종류수를 가하여 1,000㎖로 만들고 pH 6.7로 조정한 다음 시험관에 분주하여 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

34. Listeria Enrichment Broth(LEB)

Tryptone	17g
Soytone	3g
Glucose	2.5g
Sodium chloride	5g
Potassium phosphate, dibasic	2.5g
Yeast extract	6g
Cycloheximide	0.05g
Acriflavin HCl	0.015g
Nalidixic acid	0.04g

위의 성분에 종류수를 가하여 1,000㎖로 만들어 끓여 녹인 후 121℃에서 15분간 고압증기 멸균하고 pH 7.3으로 조정한다.

35. MacConkey Agar

Peptone	17.0g
Polypeptone	3.0g
Lactose	10.0g
Bile salts No. 3	1.5g
Sodium chloride	5.0g
Neutral red	0.03g
Crystal violet	0.001g

Agar	13.5g
위 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 121℃로 20분간 고 압증기 멸균하여 pH 7.0~7.2가 되도록 한다.	

36. mEC Broth

Peptone	20.0g
Lactose	5.0g
Bile salts No. 3	1.5g
Dipotassium phosphate(K_2HPO_4)	4.0g
Monopotassium phosphate(KH_2PO_4)	1.5g
Sodium chloride	5.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 멸균한 후 pH가 6.9~7.1이 되도록 맞추고 발효관에 분주하여 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 배지를 약 50℃로 식힌 후 여과 멸균한 Novobiocin(20 μ g/ml)을 첨가한다.

37. mTSB

Tryptose	17g
Soytone	3g
Glucose	2.5g
Sodium chloride	5g
Bile salts No. 3	1.5g
Dipotassium phosphate	5g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 121℃에서 15분간 멸균하고 pH 7.3으로 조정한다. 배지를 약 50℃로 식힌 후 여과 멸균한 Novobiocin(20 μ g/ml)을 첨가한다.

38. MacConkey Sorbitol Agar(SMAC)

Peptone	15.5g
Polypeptone	3.0g
Sorbitol	10.0g
Bile salts No.3	1.5g

Sodium chloride	5.0g
Neutral red	0.03g
Crystal violet	0.001g
Agar	15.0g

위 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 121℃로 20분간 고압증기 멸균하여 pH 7.0~7.2가 되도록 한다. 대장균 O157:H7을 선택배양하기 위한 항생제로서 Cefixime(0.05μg/ml) 및 Potassium tellurite(2.5μg/ml)을 첨가할 수 있다.

39. Mannitol Salt-Egg Yolk Agar

Beef extract	2.5g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Sodium chloride	75g
Phenol red	25mg
Agar	15g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 pH 7.2~7.6으로 맞추고 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 멸균시킨 배지를 50℃ 정도로 식혀 난황액(난황에 동량의 멸균생리식염수를 가한 것)을 10% 비율로 무균적으로 가해 잘 혼합한 후 멸균 샤레에 약 15ml씩 분주하여 굳혀서 평판을 조제한다.

40. Motility test medium

1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)	5ml
Motility Test Agar(MTA) power	20g

MTA 성분을 중류수 1,000ml를 가하여 용해하고, TTC 용액 5ml를 첨가한 다음 시험관에 5ml 씩 분주하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용한다.

41. Mycoplasma selective medium

1) Stock agar 성분

Mycoplasma agar base	36g
Distilled water	1000ml

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 후 pH 7.2~7.6으로 맞추고 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

2) Complete working agar

① Stock agar 250ml를 가열하여 녹인 후 50℃로 보관한다

② 37℃로 가열된 다음과 같은 시료를 ①에 넣는다.

Horse serum	55ml
Fresh yeast extract solution	35ml
Thalium acetate 1%(w/v) solution	7ml
DNA 0.2%(w/v) solution	5ml
Penicillin 200,000 IU/ml	2ml
Dextrose 50%(w/v) solution	5ml

3) Complete working agar를 15×100mm 멸균 샤레에 약 15ml씩 분주하여 냉장보관하면서 사용한다

※ ②의 시약 제조 방법

- Fresh yeast extract solution : 구매하거나 다음과 같이 준비하여 사용한다. 증류수 500ml를 80℃ hot plate에서 가열한 후 Fleischmann's dry yeast type 2040 125g을 넣으면서 20분 정도 가온한다. 혼합물을 냉각시킨 다음 1000×g에서 45분 원심처리하고 상층액은 제거하고, 침전액을 size가 큰 여과지에서부터 작은 여과지를 이용하여(1, 2, 0.8, 0.45μm) 여과한 후 115℃에서 5분간 멸균하거나 또는 0.22μm의 pore size로 여과하여 분주하여 -30℃에서부터 -70℃ 상태에서 보관한다.

- Thalium acetate 1%(w/v) solution : 증류수 100ml에 Thalium acetate 1g을 넣고, 멸균된 일회용 0.22μm의 pore size로 여과하여 10ml씩 분주하여 -30℃에서부터 -70℃ 상태에서 보관한다.

- DNA 0.2%(w/v) solution : 증류수 100ml에 DNA 0.2g을 녹인 후 5ml씩 분주한 후 121℃로 15분간 고압증기 멸균하여 -30℃에서부터 -70℃ 상태에서 보관한다.

- Penicillin : 증류수 20ml에 potassium Penicillin G 5 million IU를 녹인 다음 0.22μm의 pore size로 여과하여 2ml씩 분주한 후 30℃에서부터 -70℃ 상태

에서 보관한다.

42. Nutrient Broth

Peptone	5.0g
Beef extract	3.0g

증류수를 가하여 1,000㎖로 만들고 멸균한 후 pH 6.9~7.4가 되도록 조정한 다음 시험관에 분주하여 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 용도에 따라 Sodium chloride를 0.5% 되게 첨가하여 제조한다.

43. Nutrient Agar

Nutrient Broth 1,000㎖에 Agar 15g을 가하여 가열 용해하고, pH 7.0~7.4가 되도록 조정한 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다. 용도에 따라 Sodium chloride를 0.5% 되게 첨가하여 제조한다.

44. 3% Okawa 배지

Monopotassium phosphate	3g
Sodium glutamate	1g

위의 성분에 증류수를 가하여 100㎖로 만들고 100℃에서 30분간 끓인다. 이 기초 액에 전란액 20㎖, Glycerol 6㎖, 2% Malachite green 수용액 6㎖씩 취하여 충분히 혼합한 후 5~6㎖씩 멸균시험관 또는 시험병에 분주한 다음 85~90℃에서 60분간 가열 멸균한다.

45. Oxford Agar

Columbia blood agar base	39g
Esculin	1g
Ferric ammonium citrate	0.5g
Lithium chloride	15g
Agar	2g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000㎖로 만들고 끓여 녹인 후 121℃에서 15분간 멸균한다. 이를 50℃ 정도로 식힌 후 Cycloheximide 400㎎, Colistin Sulfate 20㎎, Acriflavin 5㎎, Cefotetan 2㎎, Fosfomycin 10㎎을 여과 멸균하여 가한다.

46. PALCAM(Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Esculin Mannitol) Agar

Peptone	23g
LiCl	15g
Agar	10g
Mannitol	10g
NaCl	5g
Yeast extract	3g
Starch	1g
Esculin	0.8g
Ferric ammonium citrate	0.5g
Glucose	0.5g
Phenol Red	0.08g
PALCAM selective supplement	10ml
Distilled water	1 ℥

위의 성분을 증류수로 용해시켜 25°C에서 pH 7.2±0.2로 조정하여 고압증기 멸균한다.

47. Plate Count Agar with Brom Cresol Purple

Yeast extract	2.5g
Peptone	5.0g
Dextrose	1.0g
Tween 80	1.0g
L-cysteine	0.1g
Agar	15.0g

위의 성분(다만, 종균에 따라 적정 peptone을 사용하여야 함)에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 가열 용해한 다음 pH 6.8~7.0으로 맞춘다. 여기에 BCP(Bromcresol purple)은 0.004~0.006%가 되도록 가하고 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

48. Potato Dextrose Agar(PDA)

Potato infusion	200.0g(ml)
Dextrose	20.0g

Agar

20.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 멸균한 후 pH 5.6±2가 되도록 맞추고 121℃로 15분간 멸균시킨 다음 사용 직전에 멸균된 10% Tartaric acid(주석산)를 무균적으로 가하여 pH 3.5±0.1로 맞추고 멸균 샤레에 약 15ml씩을 분주하여 굳혀서 평판을 조제한다.

49. Rappaport-Vassiliadine Medium

(1) Broth base

Tryptone	5g
NaCl	8g
KH ₂ PO ₄	1.6g
Distilled water	1 ℥

(2) Magnesium chloride solution

MgCl ₂ · 6H ₂ O	400g
Distilled water	1 ℥

(3) Malachite green oxalate solution

Malachite green oxalate	0.4g
Distilled water	100ml

완전한 배지를 준비하기 위해서 1,000ml의 Broth base와 100ml의 Magnesium chloride 용액과 10ml의 Malachite green oxalate 용액을 혼합한다(완전한 배지의 총량은 1,110ml이다). Broth base는 완전한 배지에 첨가되는 성분과 동일한 날에 준비하고 Magnesium chloride 용액은 1년 동안 실온에서 갈색 병에 보관이 가능하다.

50. Sabouraud's Dextrose Agar(SDA)

Polypeptone	10.0g
Dextrose	40.0g
Agar	20.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 제조하여 pH 5.6가 되도록 맞추고 121℃

로 15분간 멸균시킨다. 세균의 증식을 방지하기 위하여 적절한 항생제(Chlortetracycline-HCl 및 Chloramphenicol)를 40ppm(4mg/ml)되게 배지에 첨가한다.

51. Selenite Cystine Broth

Tryptone or polypeptone	5g
Lactose	4g
Sodium acid selenite (NaHSeO_3)	4g
Na_2HPO_4	10g
L-cystine	0.01g
Distilled water	1 l

완전히 녹이기 위해 가열한 뒤 $16 \times 150\text{mm}$ 의 멸균된 시험관에 10ml씩 분주하고, 고압증기 멸균은 금할 것이며 흐르는 증기에서 10분 동안 가열한다. 최종 pH는 7.0 ± 0.2 가 되도록 하며 사용직전에 제조한다.

52. Serum Dextrose Agar

Peptone	10.0g
Meat extract	5.0g
Sodium chloride	5.0g
Agar	20.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 950ml로 만들고 pH 7.4가 되도록 조정한 다음 시험관에 분주하여 121°C로 15분간 고압증기 멸균한 후 약 50°C의 항온수조에 보관한다. Fetal bovine serum 100ml내에 Dextrose 20g을 녹이고 여과하여 제조한 것 50ml를 배지에 첨가한다. 일반세균의 증식을 억제하기 위하여 배지에 Bacitracin(25units/ml), Vancomycin(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Polymyxin B(5units/ml), Nalidixic acid(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 Cycloheximide(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한다.

53. Simmon's citrates slants

Simmon's citrates agar power	24.2g
Distilled water	1000ml

위의 성분을 중류수에 열처리하여 녹인 후 5ml 시험관에 분주한 다음 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한 다음 경사지게 한 후 냉각시켜 냉장보관하면서 사용한다.

54. Standard Plate Count Agar

Tryptone	5.0g
Yeast extract	2.5g
Dextrose	1.0g
Agar	15.0g

위의 성분에 중류수를 가하여 1,000mℓ 되게 제조하고 멸균한 후 pH 7.0± 되도록 조정한 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

55. Sodium Hippurate medium

Infusion broth base	25g
Sodium hippurate	10g
위의 성분에 중류수 1000mℓ를 가하여 용해시킨 후 121℃로 15분간 고압증기 멸균한 후 냉장 보관한 후 사용한다.	

56. Tetrathionate Broth

(1) Tetrathionate broth base

Polypeptone	5g
Bile salts	1g
Calcium carbonate	10g
Sodium thiosulfate · 5H ₂ O	30g
Distilled water	1 ℥

1,000mℓ 멸균증류수에 배지성분을 부유시켜서 섞은 후 끓인다(배지성분이 침전되어 있으면 녹지 않는다). 최종 pH가 8.4±0.2가 되도록 한 뒤 45℃ 이하로 식혀서 5-8°에 보관한다.

(2) Iodine-potassium iodide(I-KI) solution

Potassium iodide	5g
Iodine, resublimed	6g
Distilled water, sterile	20mℓ

5mℓ의 멸균증류수에 Potassium iodide를 용해시킨 뒤 iodine을 첨가하고 완전히 녹인 후 증류수를 가하여 20mℓ로 한다.

(3) Brilliant green solution

Brilliant green dye, sterile	0.1g
Distilled water, sterile	100ml

사용하려고 하는 날, 20ml의 I-KI 용액과 10ml의 Brilliant green 용액을 Tetrathionate broth base에 첨가하고 서서히 교반하면서 배지 침전물을 재부유시킨 뒤 20×150mm 또는 16×150mm의 멸균된 시험관에 무균적으로 10ml씩 분주한다. 배지에 I-KI와 dye 용액을 첨가한 뒤에는 가열해서는 안 된다.

57. TSA(Tryptic Soy Agar)

Tryptose	17g
Soytone	3g
Glucose	2.5g
Sodium chloride	5g
Dipotassium phosphate	2.5g
Agar	15g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 121℃에서 15분간 멸균하고 pH 7.3으로 조정한다.

58. TSB 배지(Tryptic Soy Broth)

Tryptone	17g
Soytone	3g
Dextrose	2.5g
Sodium chloride	5g
Dipotassium phosphate	2.5g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 pH를 7.3±0.2로 맞춘 다음 121℃로 15분간 고압증기 멸균한다.

59. TSI(Triple Sugar Iron) Agar

Beef extract	3.0g
Yeast extract	3.0g
Peptone	20.0g

Lactose	10.0g
Sucrose	10.0g
Dextrose	1.0g
Ferrous sulfate	0.2g
Sodium chloride	5.0g
Sodium thiosulfate	0.3g
Phenol red	0.24g
Agar	13.0g

위 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 끓여 녹인 후 121℃로 15분간 멸균 한다.

60. Violet Red Bile Agar(VRBA)

Yeast extract	3.0g
Peptone	7.0g
Lactose	10.0g
Bile salts No.3	1.5g
Sodium chloride	5.0g
Neutral red	0.03g
Crystal violet	0.002g
Agar	15.0g

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들고 pH 7.3~7.5가 되도록 맞춘 다음 2분간 끓여서 용해시켜 사용한다. 멸균은 하지 않는다.

61. Xylose Lysin Desoxycholate(XLD) Agar

Yeast extract	3g
L-lysine	5g
Xylose	3.75g
Lactose	7.5g
Sucrose	7.5g
Sodium desoxycholate	2.5g
Ferric ammonium citrate	0.8g

Sodium thiosulfate	6.8g
NaCl	5g
Agar	15g
Phenol red	0.08g

위의 성분을 증류수 1,000ml에 녹여 pH 7.4로 조정하고 고압증기 멸균한 후 사용 한다.

III. 항생제(Antibiotics stock solution)

1. Amphotericin B

Amphotericin B 50mg을 증류수 100ml로 완전히 용해한 후 여과 멸균한다.
-20°C에서 1년간 보관 가능하다(최종 사용농도는 2mg/ l).

2. Cefoperazone

Sodium cefoperazone 0.4g을 증류수 100ml로 완전히 용해한 후 여과 멸균하여 사용하며, 보관용액은 4°C에서 5일, -20°C에서 14일, -70°C에서 1개월 보관 가능하다
(최종 사용농도는 32mg/ l).

3. Novobiocin

Novobiocin(sodium salt) 200mg을 증류수 10ml에 녹여 여과 멸균하여 사용하며, 4°C에서 1개월간 보관 가능하다(최종 사용농도는 20mg/ l).

4. Rifampicin

Rifampicin은 Vancomycin 대용으로 사용할 수 있다. Rifampicin 0.125g을 30ml의 알코올로 완전히 녹을 때까지 잘 저은 후, 증류수 100ml를 첨가한다. -20°C에서 1년간 보관 가능하다(최종 사용농도는 10mg/ l).

5. Trimethoprim lactate

Trimethoprim lactate 0.375g을 증류수 100ml로 완전히 용해한 후 여과 멸균한다. 침전물이 생기며, 4°C에서 1년간 보관 가능하다(최종 사용농도는 15mg/ l).

6. Vancomycin

Vancomycin 0.25g을 중류수 100ml로 완전히 용해한 후 여과 멸균한다. 4°C에서 2개월 보관 가능하다(최종 사용농도는 10mg/l).

IV. 희석액

1. BPD(Butterfield's phosphate buffered dilution water)

인산제2수소칼륨(KH_2PO_4) 34g을 중류수 500ml에 용해하고, 1N 수산화나트륨(NaOH) 175ml를 가하여 pH 7.2로 조정하고 여기에 중류수를 가하여 1,000ml로 하여 인산완충액(보관용)으로 한다. 이것을 121°C에서 20분간 멸균한 다음 냉장고에 보존하면서 사용할 때에는 이 원액 1ml을 취하여 멸균중류수 800ml에 가하여 희석하고 이것을 인산염 완충희석액으로 한다.

2. BPW(Buffered peptone water)

Peptone	10g
NaCl	5g
Na_2HPO_4	9g
KH_2PO_4	1.5g

위 성분에 중류수를 가하여 1,000ml로 용해한 후 pH 7.5가 되도록 한 다음 고압증기 멸균하여 사용한다.

3. Campylobacter supplement(A)

Cefoperazone, Trimethoprim lactate, Vancomycin, Amphotericin B의 stock solution를 각각 4ml씩 첨가하여 조제한다.

4. Campylobacter supplement(B)

Cefoperazone, Trimethoprim lactate, Vancomycin, Rifampicin의 stock solution 각 4ml씩 첨가하여 조제한다.

5. FBP

Ferrous sulfate	6.25g
-----------------	-------

Sodium metabisulfite	6.25g
Sodium pyruvate	6.25g
Distilled water	100ml
여과 멸균하여 15~25ml씩 분주한 후 밀봉하여 -20°C의 암소에서 보관한다. 약 1개월 동안 사용 가능하다.	

6. Listeria Supplement

Ceftriaxone	20mg
Polymyxin B	10mg
Acriflavine · HCl	5mg
여과 멸균 후 밀봉하여 -20°C의 암소에서 보관하며, 배지 1,000ml에 첨가하여 사용한다.	

7. Lysed horse blood

신선한 말 혈액을 구매한 상태 그대로 용혈시켜 사용한다. 즉시 사용하지 않을 때는 1~2일 이내에 동결 보관한다. 동결 보관시에는 멸균된 polypropylene bottle에 약 100ml씩 분주하여 -20°C에서 보관하면서 6개월 이내 사용한다. 용혈은 사용직전에 8°C에서 녹인 다음 다시 -20°C에 동결하였다가 다시 녹이는 방법으로 용혈하여 사용 한다.

8. Ninhydrin 용액

Ninhydrin 3.5g을 acetone과 butanol을 1:1로 혼합한 용액 100ml로 용해하여 사용하며, 냉장 보관한다.

9. Peptone Water(0.1%)

Peptone 1g을 증류수 1,000ml에 녹여 pH 7.0으로 조정하고 고압증기 멸균한다.

10. Sodium chloride (0.85%) solution (Saline)

Sodium chloride 8.5g에 증류수를 가하여 1,000ml되게 하여 용해 한 다음, 12 1°C로 15분간 고압증기 멸균한다.

여

백

참고문헌

1. Atherton HV. Chemistry and testing of dairy products. 4th ed Avi Pub. Co. Westport, 1977.
2. Bodoh GW, Batcista WJ and Schultz LH. Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk sample. J. Dairy Sci., 59:1119, 1976.
3. Booth JM. Control measures in England and Wales. How have they influenced incidence and aetiology ? Br. Vet. J., 144:316, 1988.
4. Bulletin of the IDF Milk : Determination of freezing point. No °108B, 1991.
5. Bulletin of the IDF Milk : Determination of lactose content. No °147A, 1994.
6. Bulletin of the IDF Milk : Determination of fat content. No °105, 1981.
7. Bulletin of the IDF Milk : Enumember of somatic cells. No °148A, 1995.
8. Bulletin of the IDF Milk : Payment systems for ex-farm milk. No °331, 1998.
9. Bulletin of the IDF Milk : Payment for milk on the basis of quality. No °192, 1985.
10. Bulletin of the IDF. Milk : Determination of nitrogen content. No °20B, 1993.
11. Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. pp. 45-50, Cambridge University press. London. 1974.
12. Eberhart RJ, Harmon RJ, Jasper DE, Natzke RP, Nickerson SC, Reneau JK, Row EH, Smith KL and Spencer SB. Current concepts of bovine mastitis. 3rd ed. Natl. Mastitis Counc., Ino., Arlington. 1987.
13. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8ed. 1995.
14. Fox LK, and Gay JM. Contagious mastitis. Vet. Clinical of North America, 9:475, 1993.
15. Harmon RJ and Langlois BE. Prevalence of minor pathogens and associated somatic cell count. page 11 in Proc. 25th Annu. Mtg. Natl. Mastitis counc., Columbus, OH. Natl. Mastitis Counc., Columbus, Oh. Natl. Mastitis Counc., Inc Arlington VA. 1986.
16. Hogan JS and Smith KL. A practical look at environmental mastitis. Comp. Countinuing Educ. Pract. Vet., 9:341, 1987.

17. Marcus E, Kehrli JR and Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 77:619, 1994.
18. Marshall RT. Standard method for the examination of dairy products. APHA. 1993.
19. National Committee for Clinical laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial dise susceptibility tests, 3rd ed., Villanova. 1984.
20. National mastitis council. Laboratory handbook on bovine mastitis. 1999.
21. Oz HH, Farnsworth RJ and Larson VL. Environmental mastitis. *Veterinary bulletin*, 55:829, 1985.
22. Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ and Pearson RE. Leukocyte : Second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci.*, 62:135, 1979.
23. Philpot WH and Nickerson SC. Mastitis attack. Babson BROS. Co. 1991.
24. Schalm OW, Carroll EJ and Jain NC. Bovine Mastitis. LEA & Febiger. Philadelphia. 1971.
25. Schutz MM. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States. *J. Dairy Sci.*, 77:2113, 1994.
26. Smith KLD, Todhunter DA and Schoenberger PS. Environmental mastitis : Cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.*, 68:1531, 1985.
27. 국립수의과학검역원. 원유검사원 교육 교재. 2001.
28. 국립수의과학검역원. 유방염 관리를 통한 고품질 우유 생산 기본 전략. 1998.
29. 농림부. 집유 및 원유검사 표준화 지침. 1999.
30. 농림부. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2001.
31. 농림부·축협중앙회. 젖소 유방염 관리 프로그램. 1998.
32. 농촌진흥청 수의과학연구소. 축산물중 미생물 검사방법. 1997.
33. 문진산, 주이석, 임숙경, 김종엽, 표수일, 사혁, 배현아, 김강섭, 강현갑. 국내 원유의 가수관련 빙점에 관한 연구. *한국수의공중보건학회지*. 22:345, 1998.
34. 문진산, 주이석, 임숙경, 장금찬, 표수일, 사혁, 배은아. 목장원유의 경시별 유질 변화 및 보존제 사용에 관한 연구. *대한수의사회지*. 35:186, 1999.
35. 손성완. 우유중 항균물질 잔류허용기준 및 검사방법. *한국유질유방염연구회*. 71, 1997.
36. 이재구. 우유 및 유제품 검사. 선진문화사. 1981.

원유검사 표준화 요령

2001년 7월 25일 인쇄

2001년 7월 31일 발행

발행처 : 농림부 국립수의과학검역원 세균과
경기도 안양시 만안6동 480번지
T.(031)467-1767 F.(031)467-1778

발행인 : 국립수의과학검역원장 김옥경
편집인 : 문진산, 주이석, 임숙경, 강현미,
장금찬, 이애리, 김종만, 안수환
인쇄처 : (주)정인사 T.(02)3486-6791~4
