

5장. 배지 및 기구의 살균

1절. 배지의 살균

· Autoclave

- 121℃, 1.2기압의 고압 하에서 증기를 이용하여 15-20분간 멸균. 멸균시간이 길면 agar가 굳지 않는다. 또한 멸균 시 성분변화를 일으키는 것들로는 항생제, 효소, sucrose, colchicine, zeatin, 지베렐린산 등이 있다. 쉽고 저렴하며 비교적 큰 용기도 가능하다. 짧은 시간에 대량으로 살균이 가능하며 살균 능력 또한 좋다. 이당류인 sucrose는 단당류가 되고 비타민, 항생제, 호르몬이 파괴 된다. pH가 변할 수 있고 침전이 일어날 수도 있다.

※ 주의사항 - 배지 pH가 0.3~0.5정도 떨어지고 고온에서 당은 caramel화 된다. 장시간 가동 시 배지에서 염 침전이 일어날 수 있고 한천은 호물호물 해질 수 있다. 물속의 무기물이 배지의 pH를 변화 시킬 수 있으므로 autoclave 사용 시 배지에 물은 증류수를 사용해야한다. 용기는 pyrex 용기를 사용해야하는데 이는 다른 저질 용기에서 나오는 중금속을 피하기 위함이다.



· Filtration

- 열에 불안정하여 autoclave 할 수 없는 물질을 membrane filter로 거르는 방법이다.
- membrane filter는 박테리아나 포자를 거를 수 있는 0.22 μ m의 molecular sieve이다.
- 즉시 사용이 가능하며 굉장히 짧은 시간 안에 여과할 수 있다는 장점이 있지만 membrane filter가 비싸고 plastic으로 되어 있기 때문에 autoclave가 불가능 하여 1회용이라는 단점이 있다.

· 방사선 살균

- 배지에 γ -선을 조사하여 살균하는 것으로 autoclave가 안 되는 플라스틱 제품 등을 살균하는 방법이다. γ -선을 조사하여 살균하기 때문에 공장과 같은 대규모의 살균에서 주로 쓰이며 실험실과 같은 소규모에서는 특수한 장비가 필요하기 때문에 잘 쓰이지 않는다.

· 전자레인지 살균

- 배지를 녹이거나 용액을 가열할 때 주로 사용되지만 배지의 살균에도 이용이 가능하다. autoclave보다 내용이 적게 들어 가고 시간이 절약되며 pH변화나 침전 같은 autoclave의 단점이 없다. 하지만 장시간 가동 시 수분 증발이 많아지고 autoclave보다 살균력이 떨어진다는 단점이 있다.

2절. 기구의 살균

오염원은 배양식물이나 배지, 배양병 및 조직을 절단하거나 취급하는데 사용되는 기구에 부착되어 있는 경우가 많다. 이러한 오염은 미생물의 생존에 미치는 열처리 온도나 시간에 대해서는 체계적인 연구가 없는 실정이다. 따라서 일반적으로 조직배양 시 미생물을 죽이는데 필요한 온도나 시간은 가능한 한도 내에서 최대한 해주는 것이 좋다. 또한 미생물도 속이나 종에 따라 열에 대한 저항성이 다르다. 특히 포자형태로 존재할 경우에는 열에 대한 저항성이 매우 높다. 일반적으로 초자기구나 금속기기류는 건열건조기(dry oven)로 살균하는데, 보통 160℃에서 1~2시간 건열 살균하는 것은 증기멸균기(autoclave)로 121℃에서 10~15분간 살균한 것과 같다.

(1) 건열건조기(dry oven)

초자기구나 금속기기류를 살균할 때 주로 사용한다. 일반적으로 160℃에서 1~2시간 살균하는데 이것은 고압증기살균기로 10~15분 살균한 것과 같다.

(2) 미생물을 제거하는데 쓰이는 화학약품

① Alcohol

보통 에틸알콜(C_2H_5OH)을 의미하며, 에탄올(ethanol)이라고도 부른다. 알콜은 강한 탈수작용으로 원형질 분리를 일으켜 세포를 죽게 함으로 특히 세균의 살균에 효과가 있으나 반면에 침투성이 강하여 식물세포에도 해가 있기 때문에 장시간의 처리는 좋지 않다.

식물 살균에는 70% 알콜을 사용하는데 그 이유는 높은 농도에서는 식물세포에 탈수작용이 일어나기 때문이며, 기구나 무균대의 살균에서는 95% 이상의 것을 사용하는데, 그 이유는 알콜이 증발한 후 물기를 남기지 않도록 하기 위해서 이다.

알콜은 조직의 미세한 구멍까지 스며들기 때문에 다른 살균액을 처리하기 전에 수 초간 담가두면 공기가 제거되어 다음의 다른 살균액에 담갔을 때 기포가 생기지 않고, 식물체 표면의 wax층을 제거하기 때문에 식물체의 모든 표면이 살균액과 접촉하게 된다. 그러나 표면이 단단한 종자나 과실의 살균은 95% 알콜에 담그고 화염으로 살균하는 방법도 있다. 알콜 소독의 단점은 식물조직에 해를 주는 것 뿐만 아니라 균류, 특히 포자는 잘 제거하지 못하는 점도 있다.

② Sodium hypochlorite($NaOCl$)

이것은 흔히 가정에서 이용하는 표백제로서 유한락스, Clorox, Purex 등으로 시판되고 있다. 이러한 상품은 유효성분($NaOCl$)의 함량이 4%정도이어서 시약급(10%)을 많이 이용한다. 수용액은 저장 중 분해되어 염소가스를 발생하므로 장기간 보관하게 되면 살균제로서 효력이 없어진다. 살균력은 pH와 유효염소량에 영향을 받는데, 비해리 상태이며, pH가 낮을수록 살균력이 강하며, 아미노산, 단백질, 당분 등에 의해 살균력이 감소한다. 살균력은

100ppm농도로 희석한 것을 pH 8~9로 조정한 것이 살균력이 가장 크다. 이 약제는 염소기에 의하여 살균이 되는 것으로 염소기는 공기중에서 쉽게 분해되어 버리기 때문에 배양절편에 미치는 약해가 적다.

③ Calcium hypochlorite(Ca(ClO)₂)

이것은 분말형태로서 물에 풀어 안정시킨 다음 상층액을 여과해서 사용한다. 일반적으로 10%의 농도에서 여과해서 5~30분간 살균한다. 이것은 NaOCl보다 천천히 조직 속에 침투되어 배양재료 절편에 미치는 해가 적다. 또한 이것은 염소의함량이 24~37% 정도이며 공기 중에서 수분을 흡수하면 빨리 분해되기 때문에 건조한 곳에 밀봉하여 보관한다.

④ 승홍(mercuric chloride, HgCl₂)

물에 용해하여 사용하는 것으로 살균효과가 있지만 수은은 살균수로 여러 번 세척하지 않으면 잘 제거되지 않아 식물에 독성을 유발할 위험성이 크고 중금속이어서 근래에는 거의 이용하지 않는다.

⑤ 이 외에도 과산화수소(hydrogen peroxide), 브로민수(bromine water), silver nitrate, antibody 등이 있다.

이런 소독액들의 농도와 효과 살균시간을 비교한 것은 표3에 나타나있다.

그리고 살균 시 살균용액에 전착제(wetting agent)를 넣어 살균하면 표면장력을 낮게 하여 약제가 식물 전체에 고르게 퍼져 약제가 잘 묻고 흡수가 잘 되어 살균효과가 커진다.

※살균 전처리

채취된 식물체가 미생물로 많이 오염되어 있을 것으로 판단되면 살균 전에 미생물의 밀도를 줄이기 위한 처리가 필요하다.

<소독액들의 비교>

구분	사용농도	미생물의 제거정도	살균시간(분)
Calaium hypochlorite	9 ~ 10%	+++	5 ~ 30
Sodium hypochlorite	2%	+++	5 ~ 30
Hydragen peroxide	10 ~ 20%	+++++	5 ~ 15
Bromine water	1 ~ 2%	+++	2 ~ 10
Silver nitrate	1%	+	5 ~ 30
Mercuric chlorite	0.1 ~ 1%	+	2 ~ 10
Antibody	4 ~ 50mg/l	++	30 ~ 60

* + : 보통, ++ : 우수, +++ : 양호, ++++ : 비교적 양호, +++++ : 매우 양호