



중 화 인 민 공 화 국 국 가 표 준

GB 4789.44-2020

식품안전국가표준
식품 미생물학 검사
비브리오 불니피쿠스 검사

2020-09-11 발표

2021-03-11 실시

중화인민공화국 국가위생건강위원회
국가시장감독관리총국 발표

식품안전국가표준

식품 미생물학 검사 - 비브리오 불니피쿠스 검사

1 범위

본 표준은 수산물 속 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*)의 검사 방법을 규정한다.
본 표준은 생선, 새우, 게, 조개류 등 수산물 속 *V. vulnificus* 검사에 적용된다.

2 설비 및 재료

미생물 실험실의 일반적인 멸균 및 배양 설비 외에 기타 설비 및 재료는 아래와 같다.

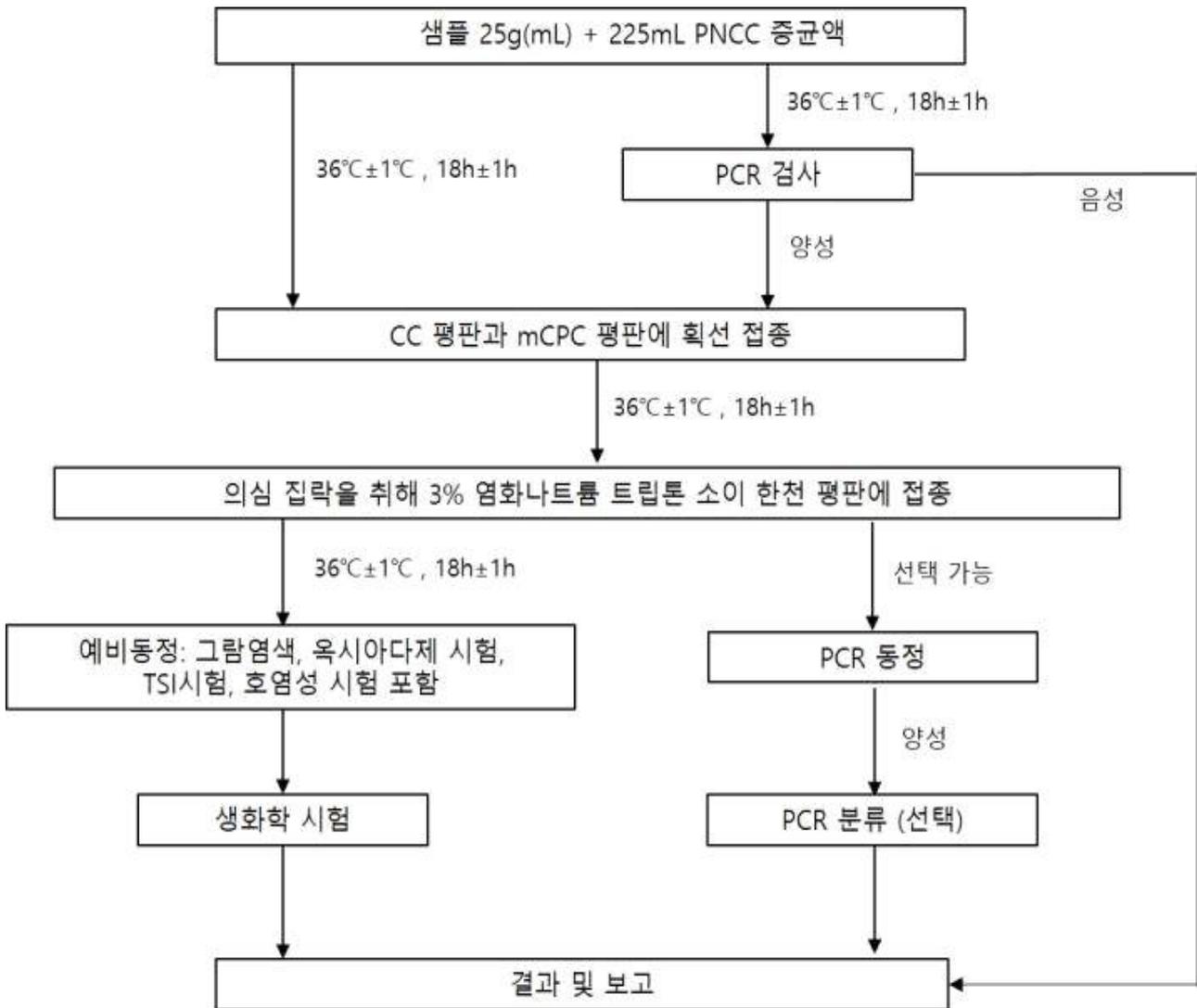
- 2.1 항온배양기: $36 \pm 1^\circ\text{C}$
- 2.2 냉장고: $2^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$, $7^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$
- 2.3 항온수조
- 2.4 균질기 혹은 멸균 막자사발
- 2.5 저울: 감량(感量) 0.1g
- 2.6 PCR 장치
- 2.7 전기영동 장치 혹은 모세관 전기영동 장치
- 2.8 겔 다큐멘테이션 시스템 혹은 자외선 검출기
- 2.9 생물안전작업대
- 2.10 고속원심분리기(최대 회전속도 15000r/min 이상)
- 2.11 블텍스 믹서
- 2.12 마이크로 피펫(용량 2.5uL, 10uL, 100uL, 1000uL) 및 피펫 팁
- 2.13 정밀pH시험지 혹은 pH미터
- 2.14 멸균 시험관: 규격 18mm X 180mm, 15mm X 100mm
- 2.15 멸균 스포이드: 규격 1mL(눈금단위 0.01mL), 10mL(눈금단위 0.1mL)
- 2.16 멸균 삼각 플라스크: 용량 250mL, 500mL, 1000mL
- 2.17 멸균 페트리 접시: 지름 90mm
- 2.18 멸균 수술용 가위, 트위저, 포셉 등
- 2.19 PCR 반응관

3 배지 및 시약

- 3.1 PNCC 증균액: A.1 참고
- 3.2 CC 한천배지: A.2 참고
- 3.3 mCPC 한천배지: A.3 참고
- 3.4 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천배지: A.4 참고
- 3.5 인산완충식염수(PBS): A.5 참고
- 3.6 3% 염화나트륨 TSI 사면배지: A.6 참고
- 3.7 호염성 시험 배지: A.7 참고
- 3.8 3% 염화나트륨 라이신 디카르복실라제 시험 배지: A.8 참고
- 3.9 3% 염화나트륨 MR-VP 배지: A.9 참고
- 3.10 3% 염화나트륨 용액: A.10 참고
- 3.11 옥시다아제 시약: A.11 참고
- 3.12 그람염색액: A.12 참고
- 3.13 ONPG 시약: A.13 참고
- 3.14 Voges-Proskauer(V-P) 시약: A.14 참고
- 3.15 세균 DNA 추출 키트
- 3.16 생화학적 동정 키트
- 3.17 PCR 반응 시약 세트
- 3.18 아가로오스 겔 전기영동 시약 세트
- 3.19 균종 보관 능력을 갖춘 기관에서 제공한 *V. vulnificus* 표준균주

4 검사 절차

V. vulnificus 검사 절차는 <그림1>을 참고한다.



<그림1> *V. vulnificus* 검사 절차

5 조작 순서

5.1 샘플의 제조

5.1.1 신선 샘플은 채취 후 3시간 이내에 검사를 완료해야 한다. 규정 시간 안에 완료할 수 없는 경우, 7~10°C (*V. vulnificus*는 4°C에서 쉽게 살아나 배양이 불가능한 상태가 된다. 따라서 샘플을 4°C에 두어서는 안 된다)에서 보관하고, 가능한 24시간 이내에 검사를 완료한다. 냉동 샘플은 45°C 미만의 온열 조건에서 해동해야 한다. 해동 시간은 15분을 넘지 않는다.

5.1.2 샘플의 채취: 어류와 두족류는 표면 조직과 내장, 아가미를 채취한다. 패류는 내

용물 전체(살과 체액 포함)를 채취한다. 갑각류는 동물 전체 혹은 중심 부분(내장과 아가미 포함)을 채취한다. 예를 들어 껍질이 있는 패류나 단단한 껍질을 가진 갑각류는 먼저 흐르는 물에 겉껍질을 씻고 여과지로 표면의 수분을 빨아들인 다음, 무균조작으로 겉껍질을 열고 위의 요구에 따라 상응하는 부분을 채취한다.

5.1.3 무균조작으로 위의 처리를 마친 샘플 25g을 채취해 PNCC 증균액 225mL를 가한다. 회전 칼날 타입의 균질기(homogenizer)를 이용해 8000r/min로 1분간 균질화하거나 패들 타입의 균질기(stomacher)를 이용해 2분간 균질화한 다음 충분히 혼합해 1:10의 샘플혼합액을 만든다. 균질기가 없는 경우, 샘플을 멸균 막자사발에 넣고 충분히 분쇄한다. 분쇄한 샘플 25g을 500mL 멸균 삼각 플라스크에 넣고 PNCC 증균액 225mL를 가해 충분히 흔들어 섞어 1:10의 샘플혼합액을 만든다.

5.2 증균

5.1.3에서 제조한 1:10의 샘플혼합액을 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18±1시간 배양한다.

5.3 PCR 검사

PCR 실험 환경 조건과 과정 통제는 GB/T 27403 <실험실 품질 관리 규범 - 식품 분자생물학 검사> 규정을 참조해 진행하며, 그 내용은 아래와 같다.

5.3.1 DNA 템플릿의 제조

PNCC 증균액의 액면과 1cm 떨어진 곳에서 1mL를 취해 1.5mL EP Tube에 넣고 9000r/min로 3분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 침전물에 1mL PBS를 가해 부유시키고 충분히 세척한 다음 9000r/min로 3분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 이 순서에 따라 침전물을 2~3차례 반복 세척한 다음 마지막 상층액을 제거한다. 1mL 멸균 초순수를 가해 100°C 에서 10분간 끓인 다음 12000r/min로 5분간 원심분리해 상층액을 PCR 분석에 사용한다. 바로 분석이 불가능한 경우 -20°C 에 보관한다.

또는 시중에 판매되는 DNA 추출 키트를 이용해 설명서에 따라 DNA 템플릿을 제조할 수 있다.

5.3.2 PCR 증폭

5.3.2.1 Primer

데이터는 <표1>을 참고한다.

<표1> *V. vulnificus* PCR 검사용 Primer 데이터

Primer	서열	크기/bp
<i>vvh</i> A-785F	5' CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA 3'	519
<i>vvh</i> A-1303R	5' CGC CAC CCA CTT TCG GGC C 3'	

5.3.2.2 대조 설정

매 PCR 반응 시 *V. vulnificus* 표준균주를 양성대조로 사용한다. 또한, *V. vulnificus* 외 기타 비브리오의 표준균주를 음성대조로 사용하고, 멸균 탈이온수를 공백대조로 사

용한다.

5.3.2.3 PCR 반응체계

<표2>를 참고한다.

<표2> *V. vulnificus* PCR 검사 반응체계 구성

시약	reaction volume / μL
멸균 초순수	13.7
10×PCR 완충용액	2.5
25mmol/L MgCl_2	2.5
2.5mmol/L dNTP	2.0
정방향 프라이머 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
정방향 프라이머 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA 템플릿	2.0
5U/ μL <i>Taq</i> 중합효소	0.3
총 volume	25.0

5.3.2.4 PCR 반응 단계

Initial denaturation: 94°C, 5분

Denaturation: 94°C, 1분

Annealing: 62°C, 1분

Extension: 72°C, 1분

Cycle 수: 30

Final extension: 72°C, 10분

전기영동 검사

바로 검사를 할 수 없는 경우 4°C에서 보존한다.

5.3.3 전기영동

겔 전기영동으로 PCR 증폭 산물을 확인한다. 0.5× TBE 완충용액으로 1.5%의 아가로스 겔(EB 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 Goldview 5 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ 또는 Gelred 5 $\mu\text{L}/50\text{mL}$ 등 DNA 염료 함유)을 만든다. 5 μL PCR 증폭 산물을 취해 1 μL 6× 핵산 전기영동 로딩 완충용액과 혼합한 후 로딩한다. 동시에 한쪽 홈(well)에는 DNA marker(범위 100bp~1000bp)를 로딩한다. ‘전기영동 챔버의 음극과 양극 간 거리(cm) × 5V/cm’ 공식에 따라 전압을 계산하고 설정한다. 0.5× TBE 완충용액을 사용해 정전압으로 전기영동을 수행한다. 브로모페놀 블루의 이동 위치에 따라 전기영동 시간을 확정한다. 겔 다큐멘테이션 시스템이나 자외선 검출기를 이용해 결과를 관찰하고 기록한다.

5.3.4 결과 판정

질 관리 시스템(Quality control system): 음성대조과 공백대조에서 증폭 밴드가 나타나지 않고, 양성대조에서 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타났다면 검사 시스템은 정상이다. 만약 어떠한 대조에서도 위와 같은 정상 결과가 나타나지 않았다면 다시 실

험을 진행해야 하며, 오염원도 제거해야 한다.

양성 결과: 질 관리 시스템이 정상인 상황에서 검사 대상 샘플에 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타났다면 PCR 결과를 양성으로 판정한다.

음성 결과: 질 관리 시스템이 정상인 상황에서 검사 대상 샘플에 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타나지 않았다면 PCR 결과를 음성으로 판정한다.

5.4 분리

10 μ L 백금이를 이용해 PNCC 증균액의 액면과 1cm 떨어진 곳에서 증균액 1백금이를 취한다. CC 평판과 mCPC 평판에 각각 획선 접종하고 36 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 18 \pm 1시간 배양한다. 전형적인 *V. vulnificus*는 CC 평판과 mCPC 평판에서 지름 1~2mm의 편평한 원형이면서 빛에 비추었을 때 투명하거나 중심부가 투명하지 않아도 가장자리가 투명한 황색 내지는 주황색인 집락을 형성한다. 집락 주위에 황색 후광(diffusion halo)이 나타날 수(혹은 나타나지 않을 수도) 있다.

5.5 순수분리 배양

CC 평판과 mCPC 평판에서 각각 최소 5개(5개 미만인 경우 전부 선택)의 *V. vulnificus* 의심집락을 취해 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에 접종한다. 36 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 18 \pm 1시간 배양한 후 후속 동정에 사용한다. *V. vulnificus*는 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 유백색의 습윤(moist)하고 용기된 지름 1~2mm의 원형 집락을 형성한다.

5.6 동정

*V. vulnificus*는 집락 특징과 생화학적 특성을 결합한 방법이나 PCR로 동정을 진행할 수 있다.

5.6.1 집락 특징 및 생화학적 특성

5.6.1.1 예비동정

이 단계는 *V. vulnificus*의 예비 동정에 사용된다. 아래 4개의 동정 실험을 진행할 때는 반드시 순수분리 후의 동일한 단일 집락에서 고른 집락을 사용해야 한다.

- a) 그람염색 현미경 검사: 5.5의 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 *V. vulnificus* 의심집락을 취해 그람염색을 진행하고 현미경 검사를 한다. *V. vulnificus*는 그람음성균으로, 현미경 아래서 균체는 막대형, C자형, 난원형 등 다양한 형태를 띠며 무포자 형성이다.
- b) 옥시다아제 시험: 백금이로 5.5의 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 *V. vulnificus* 의심집락을 적당량 취해 옥시다아제 시약을 적셨거나(예: 멸균 여과지) 떨어뜨린 흰색 또는 무색의 매질에 도말한다. 만약 균을 도말한 부분이 10초 이내에 보라색(간혹 푸른 보라색)으로 변하면 옥시다아제 시험 양성이다. 색이 변하지 않으면 옥시다아제 시험 음성이다. *V. vulnificus*는 옥시다아제 시험 양성이다.

- c) TSI 시험: 백금이로 5.5의 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 *V. vulnificus* 의심집락을 적당량 취해 3% 염화나트륨 TSI 사면배지 밑 부분에 천자(백금이 시험관 바닥에 닿지 않게 주의)한다. $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하고 결과를 관찰한다. *V. vulnificus*가 3% 염화나트륨 TSI 사면배지에서 성장하면 밑둥(butt)이 황색으로 변하고, 기포가 없으며, 사면(slope)은 황색으로 변하지 않는다.(간혹 사면 색이 황색으로 변하는 현상이 있기도 함)
- d) 호염성 시험: 백금이로 5.5의 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 *V. vulnificus* 의심집락을 취해 각각 0%, 3%, 6%, 8%, 10% 염화나트륨이 함유된 트립톤수에 접종한다. $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양해 액체의 혼탁 정도를 관찰한다. *V. vulnificus*는 0%, 8%, 10% 염화나트륨이 함유된 트립톤수에서 성장하지 않거나 미약하게 성장해 트립톤수가 맑고 투명하거나 살짝 혼탁하다. 반면 3%와 6% 염화나트륨이 함유된 트립톤수에서는 왕성하게 성장해 트립톤수가 혼탁하다.

5.6.1.2 확정실험

예비동정에서 *V. vulnificus* 의심집락으로 판정된 것을 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에 접종한다. $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18 ± 1 시간 배양한 후 순배양물을 취해 3% 염화나트륨이 함유된 라이신 디카르복실라제 시험 배지와 MR-VP 배지에 각각 접종한다. $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24~48시간 배양 후 결과를 관찰한다. 별도로 약간의 순배양물을 취해 3% 염화나트륨 TSI 사면배지에 접종해 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 배양한 후 ONPG 시험에 사용한다. 또한, 생화학 동정 시약 키트를 사용해 동정을 진행할 수도 있다.

*V. vulnificus*의 생화학적 특성은 <표3>을 참고한다. 기타 *Vibrio*와의 감별은 <표4>를 참고한다.

<표3> *V. vulnificus*의 생화학적 특성

시험 항목	결과
그람염색 현미경 검사	음성, 무포자
옥시다아제	+
운동성	+
D-셀로비오스	+
자당	-
포도당	+
포도당 분해 가스 발생	-
유당	+/-
황화수소	-
라이신 디카르복실라제	+
V-P	-
ONPG	+

주: +는 양성, -는 음성, +/-는 양성 경향을 뜻함

<표4> *V. vulnificus*의 주요 생화학적 특성과 기타 *Vibrio*의 비교 감별

명칭	옥시다아제	라이신	아르기닌	오르니틴	젤라틴	요산	V/P	42℃	자당	D-셀로비오스	유당	아라비노스	D-마노스	D-만니톨	ONPG	호염성 시험 NaCl 함량/%				
																0	3	6	8	10
<i>V. vulnificus</i>	+	+	-	V	+	-	-	+	-	+	+ / -	-	+	V	+	-	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	V	-	+	-	V	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>V. mimicus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	+	-	+	-	+	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	-
<i>V. furnissii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>V. metschnikovii</i>	-	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	V	-

주: +는 양성, -는 음성, +/-는 양성 경향, V는 가변을 뜻함

5.6.2 PCR 동정

본 부분의 시험은 5.6.1을 대체해 *V. vulnificus*의 신속 동정에 사용할 수 있다.

5.6.2.1 DNA 템플릿의 제조

5.5의 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천 평판에서 *V. vulnificus* 의심집락을 취해 500μL 멸균 초순수로 옮긴다. 충분히 혼합 후 육안으로 확인 가능한 혼탁한 세균현탁액을 제조해 10분간 끓인다. 12000r/min로 5분간 원심분리 후 상층액을 취해 PCR 분석에 사용한다. 바로 분석이 불가능한 경우 -20℃에서 보관한다.

또는 시중에 판매되는 DNA 추출 키트를 이용해 설명서에 따라 DNA 템플릿을 제조할 수 있다.

5.6.2.2 PCR 증폭 및 전기영동

5.3.2, 5.3.3과 동일하다.

5.6.2.3 결과 판정

질 관리 시스템(Quality control system): 음성대조와 공백대조에서 증폭 밴드가 나타나지 않고, 양성대조에서 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타났다면 검사 시스템은 정상이다. 만약 어떠한 대조에서도 위와 같은 정상 결과가 나타나지 않았다면 다시 실험을 진행해야 하며, 오염원도 제거해야 한다.

양성 결과: 질 관리 시스템이 정상인 상황에서 검사 대상 샘플에 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타났다면 PCR 결과를 양성으로 판정한다. 해당 균주는 *V. vulnificus*다.

음성 결과: 질 관리 시스템이 정상인 상황에서 검사 대상 샘플에 예상 크기(519bp)의 증폭 밴드가 나타나지 않았다면 PCR 결과를 음성으로 판정한다. 해당 균주는 *V. vulnificus*가 아니다.

5.7 *V. vulnificus* 분류(선택)

5.7.1 DNA 템플릿의 제조

동정 결과가 *V. vulnificus*인 균주를 취해 DNA 템플릿을 제조한다. 제조 방법은 5.6.2.1과 동일하다.

5.7.2 PCR 증폭

5.7.2.1 Primer

PCR 분류용 Primer 데이터는 <표5>를 참고한다.

<표5> *V. vulnificus* PCR 분류용 Primer 데이터

대상 유전자	Primer 서열	크기/bp	비고	
<i>vcgC</i>	F:5' AGC TGC CGA TAG CGA TCT 3'	97	독성 연관 유전자 <i>vcg</i> 분류	
	R:5' TGA GCT AAC GCG AGT AGT GAG 3'			
<i>vcgE</i>	F:5' CTC AGA AAG GCT CAA TTG AC 3'	199		
	R:5' GAT TAA CGC TGT AAG GCC G 3'			
16S rRNA A	F:5' CAT GAT AGC TTC GGC TCA A 3'	285		16S rRNA 유전자 분류
	R:5' CAC TAC CAC CTT CCT CAC GAC 3'			
16S rRNA B	F:5' GCC TAC GGG CCA AAG AGG 3'	839		
	R:5' CCT GCG TCT CCG CTG GCT 3'			
<i>SerE</i>	F:5' TGT TGT TCTTGC CCA CTC TC 3'	665	혈청 E형 및 생물 II형 검사	
	R:5' CGC GCT TAG ATT TCT CTC ACC 3'			
<i>Bt2</i>	F:5' AGA GAT GGA AGA AAC AGG CG 3'	344		
	R:5' GGA CAG ATA TAA GGG CAA ATG G 3'			

5.7.2.2 대조 설정

매 PCR 반응 시 대상 유전자를 함유하는 *V. vulnificus* 표준균주를 양성대조로 사용한다. 또한, *V. vulnificus* 외 기타 그람음성균 표준균주를 음성대조로 사용하고, 멸균 탈이온수를 공백대조로 사용한다.

5.7.2.3 PCR 반응체계

<표2>와 동일하다.

5.7.2.4 PCR 반응 단계

Initial denaturation: 94°C, 5분

Denaturation: 94°C, 1분

Annealing: 55°C (*vcg* gene), 58°C (16S rRNA gene), 64°C (*Bt2* gene 및 *SerE* gene) 1분

Extension: 72°C, 1분

Cycle 수: 30(*vcg* gene 및 16S rRNA gene), 35(*Bt2* gene 및 *SerE* gene)

Final extension: 72°C, 5분

전기영동 검사

바로 전기영동 검사를 할 수 없는 경우 증폭 산물을 4°C에서 단기간(1~2일) 보관한다.

5.7.3 전기영동

5.3.3과 동일하다.

5.7.4 결과 판정

질 관리 시스템(Quality control system): 음성대조와 공백대조에서 증폭 밴드가 나타나지 않고, 양성대조에서 예상 크기의 증폭 밴드가 나타났다면 검사 시스템은 정상이다. 만약 어떠한 대조에서도 위와 같은 정상 결과가 나타나지 않았다면 다시 실험을 진행해야 하며, 오염원도 제거해야 한다.

질 관리 시스템이 정상인 상황에서 검사 대상 균주에 97bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*을 *vcg* C형으로 판정한다. 만약 199bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 *vcg* E형으로 판정한다.

만약 검사 대상 균주에 285bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 16S rRNA A형으로 판정한다. 839bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 16S rRNA B형으로 판정한다. 만약 285bp와 839bp 밴드가 동시에 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 16S rRNA A/B형으로 판정한다.

만약 검사 대상 균주에 665bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 혈청 E형으로 판정한다. 344bp의 밴드가 나타났다면 해당 *V. vulnificus*를 생물 II형으로 판정한다.

6 결과 및 보고

집락 특성과 생화학적 특성 혹은 PCR 동정 결과에 근거해 25g 샘플 중 *V. vulnificus*가 검출 혹은 검출되지 않았다고 보고한다.

부록A

배지 및 시약

A.1 PNCC 증균액

A.1.1 용액1

A.1.1.1 성분

펩톤	50.0g
염화나트륨	10.0g
증류수	900.0mL

A.1.1.2 제조 방법

A.1.1.1의 각 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 8.5 ± 0.2 로 조절하고 121°C에서 10분간 고압 멸균한다.

A.1.2 용액2

A.1.2.1 성분

셀로비오스	0.8g
폴리믹신 E	1000U
증류수	100.0mL

A.1.2.2 제조 방법

셀로비오스를 증류수에 넣고 살짝 열을 가해 완전히 용해한다. 식힌 후에는 항생물질을 넣고 0.22 μ m 밀리포어 필터로 여과 제균해 준비한다.

용액1과 용액2를 혼합하면 PNCC 증균액이 된다.

A.2 CC 한천배지

A.2.1 용액1

A.2.1.1 성분

펩톤	10.0g
육추출물 분말	5.0g
염화나트륨	20.0g
BTB	0.04g
크레졸 레드	0.04g
한천	15.0g
증류수	900.0mL

A.2.1.2 제조 방법

A.2.1.1의 각 성분을 증류수에 넣고 끓여 완전히 용해한다. 1mol/L 염산 용액과

1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 7.6 ± 0.2 로 조절하고, 48°C~55°C 까지 식혀 준비한다.

A.2.2 용액2

A.2.2.1 성분

셀로비오스	10.0g
폴리믹신 E	400000U
증류수	100.0mL

A.2.2.2 제조 방법

셀로비오스를 증류수 100.0mL에 넣고 살짝 열을 가해 완전히 용해한다. 식힌 후에는 항생물질을 넣고 0.22 μ m 밀리포어 필터로 여과 제균해 준비한다.

용액1과 용액2를 혼합한 후 평판에 붓는다.

A.3 mCPC 한천배지

A.3.1 용액1

A.3.1.1 성분

펄톤	10.0g
육추출물 분말	5.0g
염화나트륨	20.0g
BTB	0.04g
크레졸 레드	0.04g
한천	15.0g
증류수	900.0mL

A.3.1.2 제조 방법

A.3.1.1의 각 성분을 증류수에 넣고 끓여 완전히 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 7.6 ± 0.2 로 조절하고, 48°C~55°C 까지 식혀 준비한다.

A.3.2 용액2

A.3.2.1 성분

셀로비오스	10.0g
폴리믹신 B	100000U
폴리믹신 E	400000U
증류수	100.0mL

A.3.2.2 제조 방법

셀로비오스를 증류수 100.0mL에 넣고 살짝 열을 가해 완전히 용해한다. 식힌 후에는 항생물질을 넣고 0.22 μ m 밀리포어 필터로 여과 제균해 준비한다.

용액1과 용액2를 혼합한 후 평판에 붓는다.

A.4 3% 염화나트륨 트립톤 소이 한천배지

A.4.1 성분

트립톤	15.0g
소이펩톤	5.0g
염화나트륨	30.0g
한천	15.0g
증류수	1000.0mL

A.4.2 제조 방법

A.4.1의 각 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 7.3 ± 0.2 로 조절한 다음 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.

A.5 인산완충식염수(PBS)

A.5.1 성분

제1인산칼륨(KH_2PO_4)	34.0g
증류수	500.0mL

A.5.2 제조 방법

저장액: 제1인산칼륨 34.0g을 취해 증류수 500.0mL에 용해한다. 1mol/L 수산화나트륨 용액(약 175mL)을 이용해 pH를 7.2로 조절한다. 증류수로 1000.0mL까지 희석한 다음 냉장고에 보관해 준비한다.

희석액: 저장액 1.25mL를 취해 증류수로 1000.0mL까지 희석한다. 적당한 용기에 분주한 다음 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.

A.6 3% 염화나트륨 TSI 사면배지

A.6.1 성분

펩톤	15.0g
트립톤	5.0g
육추출물 분말	3.0g
효모추출물 분말	3.0g
염화나트륨	30.0g
유당	10.0g
자당	10.0g
포도당	1.0g
황산제일철(FeSO_4)	0.2g
페놀 레드	0.024g
싸이오황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3g
한천	12.0g
증류수	1000.0mL

A.6.2 제조 방법

A.6.1의 각 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 7.4 ± 0.2 로 조절한다. 121°C에서 15분간 고압 멸균 후 시험관에 분주해 길이 4~5cm, 깊이 2~3cm의 고층 사면 배지를 만들어 준비한다.

A.7 호염성 시험 배지

A.7.1 성분

트립톤	10.0g
염화나트륨	농도에 따라 상응하는 양을 넣는다
증류수	1000.0mL

A.7.2 제조 방법

A.7.1의 각 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 7.2 ± 0.2 로 조절한다. 5개의 300mL 삼각 플라스크에 100mL씩 분주하고, 각각에 염화나트륨을 0g, 3g, 6g, 8g, 10g씩 넣는다. 각 농도의 염화나트륨 용액을 적당한 용량의 시험관에 10mL씩 분주하고 121°C에서 15분간 고압 멸균해 준비한다.

A.8 3% 염화나트륨 라이신 디카르복실라제 시험 배지**A.8.1 성분**

펩톤	5.0g
효모추출물 분말	3.0g
포도당	1.0g
브로모크레졸 퍼플	0.02g
L-라이신	5.0g
염화나트륨	30.0g
증류수	1000.0mL
pH	6.8±0.2

A.8.2 제조 방법

A.8.1 중 라이신을 제외한 나머지 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 6.8±0.2로 조절한다. 라이신을 넣고 최종 농도가 0.5%(대조 배지에는 라이신을 넣지 않음)가 되게 한다. 소형 시험관에 0.5mL씩 분주하고 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.

A.9 3% 염화나트륨 MR-VP 배지**A.9.1 성분**

폴리펩톤	7.0g
포도당	5.0g
제2인산칼륨(K ₂ HPO ₄)	5.0g
염화나트륨	30.0g
증류수	1000.0mL

A.9.2 제조 방법

A.9.1의 각 성분을 증류수에 용해한다. 1mol/L 염산 용액과 1mol/L 수산화나트륨 용액을 이용해 pH를 6.9±0.2로 조절한다. 시험관에 분주해 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.

A.10 3% 염화나트륨 용액**A.10.1 성분**

염화나트륨	30.0g
증류수	1000.0mL

A.10.2 제조 방법

위의 염화나트륨을 증류수에 용해한다. 121℃에서 15분간 고압 멸균한다.

A.11 옥시다아제 시약

A.11.1 성분

N, N, N', N'-테트라메틸-p-페닐렌디아민-디수화염화물	1.0g
증류수	100.0mL

A.11.2 제조 방법

옥시다아제 시약은 소량 배합해야 한다. 배합 후에는 직사광선을 피해 2~5℃의 냉장고에 보관하고 7일 이내에 사용한다.

A.12 그람염색액

A.12.1 크리스탈 바이올렛 염색액

A.12.1.1 성분

크리스탈 바이올렛	1.0g
95% 에탄올	20.0mL
1% 옥살산암모늄 수용액	80.0mL

A.12.1.2 제조 방법

크리스탈 바이올렛을 에탄올에 완전히 용해한 후 옥살산암모늄 수용액과 혼합한다.

A.12.2 그람 아이오딘 용액

A.12.2.1 성분

아이오딘	1.0g
아이오딘화 칼륨	2.0g
증류수	300.0mL

A.12.2.2 제조 방법

아이오딘과 아이오딘화 칼륨을 먼저 혼합한 후 소량의 증류수를 넣고 충분히 흔든다. 완전히 용해되고 나면 증류수를 300.0mL까지 붓는다.

A.12.3 사프라닌 대조염색액

A.12.3.1 성분

사프라닌	0.25g
95% 에탄올	10.0mL
증류수	90.0mL

A.12.3.2 제조 방법

사프라닌을 에탄올에 용해한 후 증류수로 희석한다.

A.12.4 염색법

A.12.4.1 도말 표본을 알코올램프 불꽃에 고정한다. 크리스탈 바이올렛 염색액을 떨어

뜨려 1분간 염색하고 물로 세척한다.

A.12.4.2 그람 아이오딘 용액을 떨어뜨려 1분간 매염하고 물로 세척한다.

A.12.4.3 95% 에탄올을 떨어뜨려 약 15~30초간 탈색한다. 염색액이 씻겨나갈 때까지 진행하며 과하게 탈색하지 않는다. 탈색이 완료되면 물로 세척한다.

A.12.4.4 대조염색액을 떨어뜨려 1분간 대조염색한다. 물로 세척한 후 건조가 되면 현미경으로 관찰한다.

A.13 ONPG 시약

A.13.1 성분

ONPG	0.08g
증류수	15.0mL
완충용액	5.0mL

A.13.2 제조 방법

ONPG를 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 증류수에 충분히 용해한다. 완충용액을 넣고 섞은 다음 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 냉장고에 보관한다. 시험 전, 필요한 용량의 ONPG 용액을 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 가열 후 사용한다.

A.14 Voges-Proskauer(V-P) 시약

A.14.1 성분

A용액	
α -나프톨	5.0g
무수에탄올	100.0mL
B용액	
수산화칼륨	40.0g
증류수	100.0mL

A.14.2 제조 방법

A용액: α -나프톨 0.5g을 무수에탄올 100.0mL에 용해한다.

B용액: 수산화칼륨 40.0g을 적당량의 증류수에 넣고 충분히 용해한 후 100.0mL로 정용한다.

제조한 A용액과 B용액을 각각 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 냉장고에 보관한다.