

미생물 균주보존에 관한 연구

국립의료원 세균과

박 승 함*

= Abstract =

A study on the preservation of microorganisms

Seung Hahm Park M.D.

*Dept. of Clinical Microbiology, National Medical Center
Seoul, Korea*

H. influenzae is one of the most fastidious organism in growth. Ordinary freezing stock method keeps bacteria vitality in different period. *Pneumococcus* maintains about 8 weeks.

Beta-haemolytic *Streptococcus* several months and *Staphylococcus* & some strain of *Enterococcus* keep over one year to a few years. However, *H. influenzae* only keeps a few weeks by the ordinary -20°C freezing preservation method. Author intends to prolong the vitality of *H. influenzae* and devised following method.

Basic stock culture broth consists of nutrient broth 8.5ml and glycerine 1.5ml ratio.

The yeast hydrolysate is produced 20g of commercial dry yeast with 100ml of distilled water which treated with freezing and thawing three times, then centrifuged.

After centrifugation the supernatant filtrates with Seitz filter.

The methods of preservation for *H. influenzae* were observed which may be applicable in small laboratories.

Compared with regard to its simplicity, inexpensive and also easily available materials in any locality were discussed.

The most recommendable procedure is the use of special preservation media to which 10% yeast hydrolysate was added.

미생물을 연구하는데 있어서 균주보존이라는 것처럼 중요한 것도 드물 것이다. 미생물의 종류에 따라서 그 보존하는 방법도 다르고, 또 그 방법에 따라 보존되는 기간도 일정하지 못하다. 보존방법에 따라서는 미생물의 변이(變異, variation)를 가져올 수도 있으므로 그 원균주가 가지고 있는 성상을 그대로 유지하면서 장기간 보존되는 방법이 강구되어 왔다.¹⁻⁴⁾

저자는 미생물 보존을 위한 좋은 근대식시설이 없는 병원 또는 연구실에서 간편한 방법으로 비교적 균주보존이 어려운 '인플루엔자'균(*H. influenzae*)을 장기간 보존하는 방법을 개발하였기에 여기 보고하는 바이다.

본 임상연구비는 국립의료원에서 지급 받았음.

실험재료와 실험 방법

1. 배 지

보존용 기본배지 (Basic Stock Culture Broth: BSCB)로서는 nutrient broth 8.5ml, glycerine 1.5 ml의 비율로 함유된 액체배지를 각 시험관에 1 ml씩 분주(分注)하여 사용하였다. 이 BSCB에 casamino acid 0.1%, 0.15%, 0.2%; tryptone 0.1%, 0.15%, 0.2%; proteose peptone 1%, 2%, 3%, 4%; L-glutamic acid 0.25%, 0.5%, 1%; yeast hydrolysate 5%, 10%, 15%, 20%, 를 첨가(添加)하여 사용하였다.

yeast hydrolysate (YH)는 시판(市販)되는 분말 건조 효모 20 g에 증류수 100 ml를 첨가한 후 동결 및 해빙 (Freezing & thawing)을 세번 반복한 후 2500R.P.M.

으로 40 분간 원심분리한 후 그 상등액(上澄液)을 Seitz 여과기로 여과한 것을 사용하였다.

예비시험에서는 상기 배지중 *L*-glutamic acid를 넣은 배지를 제외하고 모든 배지를 사용하였으며 본 시험에서는 *L*-glutamic acid를 넣은 배지와 10% yeast hydrolysate 배지 및 BSCB 만을 사용하였다.

균의 생존을 확인하는데 사용한 배지로서는 예비 시험에서는 혈액천천배지(血液寒天培地, blood agar plate: BAP)를 사용하였으며 본 시험에서는 균수를 계산하기 위하여 GC 배지를 사용하였다.

2. 균 주

예비시험에서는 당과에서 분리한 *H. influenzae* 818, 7132, 1967 및 1432 등 4 주를 사용하였으며, 또 이때 BAP 상에서 공생(共生, symbiosis)을 확인키 위하여 당과에서 분리된 포도구균 (*Staphylococcus aureus*)을 사용하였다.

본시험에서는 당과에서 분리한 *H. influenzae* 2704/71 및 2732/71 2 주를 사용하였다.

3. 시험방법

예비시험에서는 각 배지에 분주된 *H. influenzae*를 넣은 시험관을 -20°C deep freezer에 보관하면서 제 3 주 부터 제 12 주까지 매주 계속 deep freezer의 것을 BAP 상에 심은 후 포도구균으로 공생시켜서 *H. influenzae* 생존 여부를 확인하였다.

본시험에는 보존용 기본배지인 BSCB, *L*-glutamic acid

배지 (LGCB) 및 10% yeast hydrolysate 배지 (YHCB)에 균을 일정량을 심은 후 -20°C deep freezer에 보관하면서 제 3 주부터 제13주 까지 (제 9 주 및 10 주 제외) micropipette를 사용하여 일정량을 덜어내어서 생리식염수로 4~5 단계로 희석하여 GC 배지에 심은 후 48 시간 37°C 에 배양 후 colony 수를 계산하였다.

실 험 성 적

1. 예비시험

제 1 표에서 보는 바와 같이 제 3 주에 tryptone 0.15% 및 0.2%에서 보관한 균주 818 은 자라지 못하였으며, 또 tryptone에 심은 7132 주는 모두 자라지 못하였다.

제 4 주에서는 제 2 표에서 보는 바와 같이 casamino acid 0.1%와 tryptone 및 proteose peptone에 심은 균주 818 는 모두 자라지 않았다. 또 균주 7132 는 casamino acid 0.15%, 0.2% 및 tryptone, proteose peptone 1%와 대조균인 BSCB에서 자라지 않았으며 균주 1967 은 대조균에서만 자라지 않았다.

제 5 주에서는 제 3 표에서 보는 바와 같이 균주 818 은 casamino acid 0.2%와 yeast hydrolysate를 제외하고는 하나도 자라지 않았으며 균주 7132 는 yeast hydrolysate에서만 자랐다. 균주 1967 는 대조균에서만 안자랐고 균주 1432 는 casamino acid 0.1%, 0.15%, 및 tryptone 0.1%, 0.15%에서만 안 자랐다.

제 6 주에서는 제 4 표에서 보는 바와 같이 균주 818

Table 1. 3 Weeks After Preservation

Strain	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818	G	G	G	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G
7132	G	G	G				G	G	G	G	G	G	G	G	G
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1432	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

G: Growth of bacteria

Table 2. 4 Weeks After Preservation

Strain	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818		G	G								G	G	G	G	G
7132	G							G	G	G	G	G	G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

G: Growth of bacteria

Table 3. 5 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818			G								G	G	G	G	
7132											G	G	G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432			G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

G: Growth of bacteria

Table 4. 6 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818											G	G	G	G	
7132											G	G	G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432			G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

G: Growth of bacteria

Table 5. 7 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818											G	G	G	G	
7132											G	G	G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432							G	G	G	G	G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

Table 6. 8 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818												G	G	G	
7132												G	G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432							G	G	G	G	G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

Table 7. 9 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818												G	G	G	
7132													G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1432							G	G	G	G	G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

Table 8. 10 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818												G	G	G	
7132													G	G	
1967	G	G	G	G	G	G	G				G	G	G	G	
1432							G	G	G	G	G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

Table 9. 11 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818												G	G	G	
7132													G	G	
1967											G	G	G	G	
1432							G	G			G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

Table 10. 12 Weeks After Preservation

Media Strain %	Casamino acid			Tryptone			Proteose peptone				Yeast hydrolysate				Control
	0.1	0.15	0.2	0.1	0.15	0.2	1	2	3	4	5	10	15	20	
818												G	G	G	
7132															
1967											G	G	G	G	
1432											G	G	G	G	

G: Growth of bacteria

과 균주 7132는 yeast hydrolysate에서만 자라고 균주 1967는 대조군에서만 안 자라고 균주 1432는 casamino acid 0.1%, 0.15% 및 tryptone 0.1%, 0.15%에서만 자라지 않았다.

제 7주에서는 제 5표에서 보는 바와 같이 균주 818, 7132, 1967는 제 6주의 성적과 하등 변화가 없고, 균주 1432는 proteose peptone 및 yeast hydrolysate에서만 전부 자랐다. 제 7주에 이르러 모든 대조군에서 자라지 않은 것을 알 수 있다.

제 8주에서는 제 6표에서 보는 바와 같이 균주 818 및 7132가 5% YHCB에서 각각 자라지 못한 것을 제외하고는 제 7주의 성적과 별 차이가 없다.

제 9주에서는 제 7표에서 보는 바와 같이 균주 7132가 10% YHCB에서 자라지 못하였으며, 균주 1967가 proteose peptone 3% 및 4%에서 자라지 못한 것이 제 8주와의 차이점이다.

제 10주에서는 제 8표에서 보는바와 같이 균주 1967

이 2% proteose peptone에서 자라지 못한 것을 제외하고는 제 9주와 하등 변동이 없다.

제 11주에서는 제 9표에서 보는 바와 같이 균주 818이 10%, 15%, 20%, YHCB에서 자랐고, 균주 7132가 15%, 20%, YHCB에 각각 자라고, 균주 1967은 YHCB에서 모두 자랐으며, 균주 1432는 proteose peptone 1%, 2% 및 YHCB에서 모두 자랐다.

제 12주에서는 제 10표에서 보는바와 같이 균주 818은 10%, 15% 및 20%, YHCB에 자랐고, 균주 1967 및 1432는 YHCB에서 모두 자랐다.

2. 분 시험

처음 BSCB에 심은 균주는 균주 2704가 3.7×10^7 이였으며 균주 2732는 1.7×10^6 이였다. 제 11표에서 보는 바와 같이 매주 생존 균수는 서서히 감소되었으며, 균을 심은 처음과 13주 후를 비교하여 보면 균주 2704에 있어서 BSCB에서는 3.7×10^7 에서 2.7×10^6 으로 또 YHCB에서는 3.7×10^7 에서 3.6×10^6 으로 각각 감소된

Table 11. Surviving No. of *H. influenzae* Strain 2704 in BSCB & YHCB 3 Weeks to 13 Weeks in -20°C (Inoculum: 3.7×10^7)

Weeks	3	4	5	6	7	8	11	12	13
Media									
BSCB	3.6×10^7	6.8×10^6	5.9×10^6	5.2×10^6	4×10^6	2.1×10^6	1.9×10^6	1.2×10^6	2.7×10^5
YHCB	3.7×10^7	3.5×10^7	2.7×10^7	2.3×10^7	1.6×10^7	1.6×10^7	1.1×10^7	9×10^6	3.6×10^6

BSCB: Basic stock culture broth YHCB: Yeast hydrolysate culture broth

Table 12. Surviving No. of *H. influenzae* Strain 2732 in BSCB & YHCB 3 Weeks to 13 Weeks in -20°C (Inoculum: 1.7×10^6)

Weeks	3	4	5	6	7	8	11	12	13
Media									
BSCB	7.3×10^5	3.3×10^5	3×10^5	1.6×10^5	1.3×10^5	8.5×10^4	7.4×10^4	2.2×10^4	9×10^3
YHCB	1.6×10^6	1.5×10^6	1.4×10^6	1×10^6	1×10^6	9.3×10^5	3×10^5	9.4×10^4	9.4×10^4

BSCB: Basic stock culture broth YHCB: Yeast hydrolysate culture broth

것을 볼 수 있다.

균주 2732에 있어서는 제 12 표에서 보는 바와 같이 역시 매주 생존균수는 서서히 감소되었으며, 최초 심은 균수와 13 주 후를 비교하여 보면 BSCB에서는 1.7×10^6 에서 9×10^3 으로, 또 YHCB에서는 1.7×10^6 에서 9.4×10^4 으로 각각 감소된 것을 볼 수 있다.

LSCB에 심은 균수는 균주 2704에 있어서는 0.25% LSCB에 있어서 제 3주에 4.5×10^5 , 제 4주에 7.8×10^3 이 생존되어 있음을 보여 주었음을 뿐이고 0.5% 및 1% LSCB에 심은데 있어서는 생존균수를 전혀 볼 수 없었다.

고 안

미생물을 보존하는 데는 몇 가지 방법이 있다. 고형 배지에 계대배양하는 방법, 고형배지에 혈구와 함께 심어 동결하는 방법, 진균 등은 고형배지 tube에 심은후 광물성 기름을 가지고 밀폐(密閉, sealing)하는 방법, 동결 보존하는 방법, 냉동건조하는 방법 등이다. 그러나 모든 방법이 일장일단이 있어서 동일하게 논의하기에는 어려운 점이 많다.

균을 보존하는데 있어서 냉동건조(冷凍乾燥, freeze-drying or lyophilization)방법이 시설이 구비된 기관에서는 용이하게 사용되고 있다. 그러나 이 냉동건조 방법도 모든 종류의 미생물을 보존하는데 반드시 이상적인 것은 아니다.

대부분의 진균(真菌, fungus) 조류(藻類, algae), 원충(原虫, protozoa) 동물세포계열(動物細胞系列, animal cell lines) 등은 보통 냉동건조 방법으로는 보존이 비교적 잘 안되지만 액체질소(液體窒素, liquid nitrogen)를 사용하여 -196°C 의 온도를 이용하면 일부의 진균, 조

류, 원충 등의 보존에 효과적이라는 것이 알려졌다.⁵⁾

냉동건조시에는 기초배지로서 skim milk를 사용하나 해수세균(海水細菌, marine bacteria) 보존시에는 skim milk에 해수를 같이 혼합한 것이 좋다고 하며 폐염구균 및 '디푸테리아'균을 냉동건조시에는 30%의 복수(腹水, ascitic fluid)를 혼합하는 것이 결과가 좋다고 한다. 또 페스트균을 냉동건조시에는 원심분리(遠心分離, centrifugation) 조작을 하지 않고 그대로 냉동건조하여야 한다고 한다.⁶⁾

BSCB 같은 glycerine을 넣은 액체배지에균을 심어 동결보존하는 방법은 그 방법이 간편하고 비교적 균주 보존기간이 길기는 하나 폐염구균은 약 8주내의 용연균(溶連菌, Str. pyogenes)은 수개월, 포도구균 및 장구균(enterococcus) 등은 수년간 보존할 수 있다. 한편 '인푸렌자'균은 보존과 성장이 비교적 까다로운 균으로서 이 BSCB에서 보존하여도 약 수주간 정도 보존하는데 불과하다. 예비시험 성적에서 보는 바와 같이 대조군(對照群, control group) 즉 BSCB에 심은 '인푸렌자'균은 제 7주에는 모두 그 생존을 확인할 수가 없었다. 예비시험의 제 12 주 결과에서 보는바와 같이 균주 7132를 제외하고는 나머지 세 균주의 '인푸렌자'균이 다른 배지에 심은 군에서는 모두 사멸하였으나 YHCB에 심은 군에서는 모두 생존하고 있음을 보여 준다.

그러나 본 시험에서는 대조군인 BSCB에서도 제 13 주 까지 '인푸렌자'균이 생존되어 있음을 알 수 있다. 이 예비시험과 본시험의 대조군의 균 생존기간의 차이는 균주가 다르다는 사실과 또 균의 생존을 확인하는데 사용한 배지와 방법의 차이로 사료된다.

한편 본시험 성적을 보면 제 13주까지 '인푸렌자'균이 BSCB에 생존하고 있으나 그 균수는 YHCB에 보존

한 것 보다는 현저히 감소된 것을 알 수 있다. 즉 균주 2704에 있어서는 YHCB에 보존한 것이 3.6×10^6 인데 비하여 BSCB에 보존한 것은 2.7×10^5 인 것을 알 수 있으며 균주 2732에 있어서는 YHCB에 보존한 것이 9.4×10^4 인데 비하여 BSCB에 보존한 것은 9×10^3 인 것을 알 수 있다.

본 실험을 통하여 고찰하건대 같은 '인푸렌자' 균이라고 할지라도 균주에 따라서 BSCB에 보존하였을 때 그 보존기간이 다르며 BSCB 보다는 10% yeast hydrolysate를 첨가한 YHCB가 보존능력이 우수하다는 것이 입증되었다. 냉동건조장치 같은 좋은 시설이 없는 기관에서도 YHCB에 균을 심어 -20°C 에 동결보존함으로써 '인푸렌자' 균과 같은 보존하기 어려운 균도 비교적 용이하게 보존할 수 있다는 것이 확실해졌으며, yeast hydrolysate의 작용기전에 관하여서는 yeast hydrolysate 내에 함유된 glutamate에 의한 것으로 추정되나 본 실험의 범위내에서는 밝힐 수가 없었다.

총 괄

1. '인푸렌자' 균을 YHCB에 심어서 -20°C 에 보존하면 BSCB에 보존한 것 보다는 그 생존기간이 길다.
2. '인푸렌자' 균에 있어서 균주에 따라서 보존 기간이 다르다.
3. 대체로 casamino acid, tryptone, proteose peptone을 넣은 배지가 BSCB 보다는 균의 보존성적이 우수하

였으나 l-glutamic acid를 넣은 배지는 BSCB 보다는 못하였다.

4. 10% yeast hydrolysate를 넣은 YHCB 배지에 균을 심어서 동결보존하는 방법이 시설과 장비가 마땅치 않은 소규모 시험실에서 균을 보존하는데 추천할만한 방법이다.

참 고 문 헌

- 1) Heckly, R.J., et al. (1970): *Studies on Survival of Bacteria: Rhythmic Response of Microorganisms to Freeze Drying Additives*, *Appl. Microbiol.*, 15: 1235-1239.
- 2) Davies, J.D., et al. (1969): *The Preservation of Bacteriophage H₁ of Corynebacterium ulcerans U 103 by Freeze-Drying*, *J. Hyg.*, 67: 573-583.
- 3) Suzuki, M. (1970): *Effect of Suspending Media on Freeze Drying and Preservation of Vaccinia Virus*, *J. Hyg. Camb.*, 68: 29-41.
- 4) Wasly, G.D. (1970): *Preservation of Trichomonas vaginalis in Liquid Nitrogen*, *Brit. J. Vener. Dis.*, 46: 323-325.
- 5) International Conference on Culture Collections Abstracts Symposia 7-12 Oct. 1968, Tokyo.
- 6) International Conference on Culture Collections Abstracts Plenary Special 7-12 Oct. 1968, Tokyo.