



화장품 미생물한도 시험법 가이드라인(민원인 안내서)

2018. 4.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 미생물한도 시험법 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2018년 4월 25일		
담당자 확 인(부서장)		민 충 식, 최 용 규 손 경 훈

이 안내서는 화장품 미생물한도 시험법에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2018년 4월 25일 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

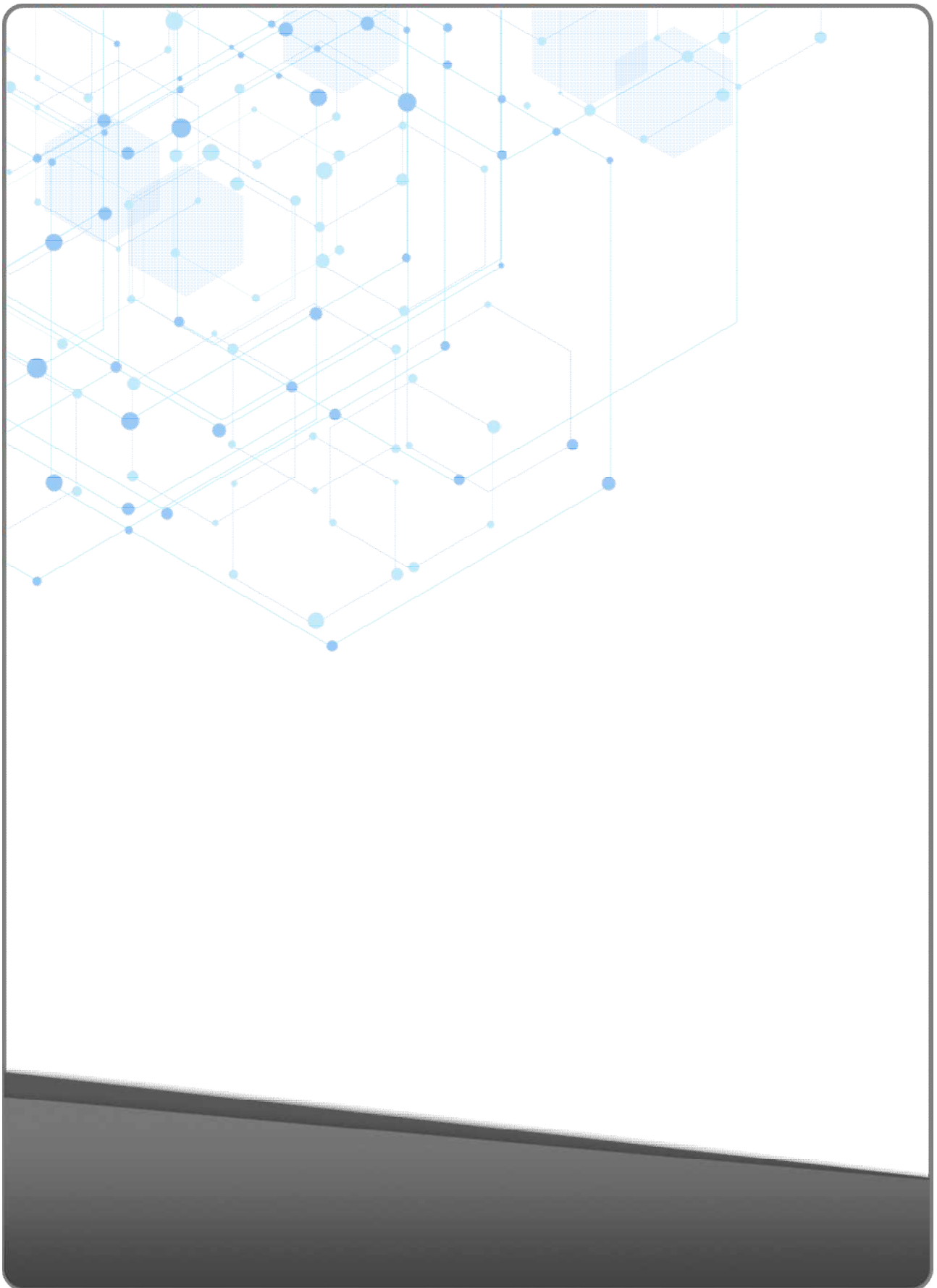
※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 화장품연구팀에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4853

팩스번호: 043-719-4850

목 차

I. 개요	6
II. 미생물 한도 시험법의 구성	7
III. 미생물 한도 시험법의 절차별 수행 가이드라인	8
1. 검체의 전처리(검액 제조)	10
1-1 개요	10
1-2 대표 제품군별 검액 제조 가이드라인	11
2. 배지성능 및 시험법 적합성시험	19
2-1. 총 호기성 생균수 시험법의 적합성시험	20
2-2. 특정미생물 시험법의 적합성시험	25
3. 본 시험(미생물 한도 시험)	28
3-1. 총 호기성 생균수 한도 시험	28
3-2. 특정미생물 시험	31





개요

화장품 미생물 한도 시험법이란?

화장품 미생물 한도 시험법이란



화장품 내 미생물 수를 측정하고 (총 호기성 생균수 시험)



특정미생물의 존재여부를 판단하여 (특정미생물 시험)

화장품이 허용한도기준에 적합한지 확인하기 위한 시험입니다

- 식품의약품안전처에서는 국내 화장품의 품질 및 안전성을 확보하고자 ‘화장품 안전기준 등에 관한 규정’을 운영하고 있으며, 동 규정 ‘[별표4] 유통화장품 안전관리 시험방법’을 통해 미생물 한도 시험법을 제시하고 있습니다.
- 본 가이드라인¹⁾은 화장품 미생물 한도 시험에 쓰이는 용어 정의, 각 시험 단계의 목적 및 주의사항, 실제 실험 방법 사례 또는 결과 해석 방법 사례 등을 제시하고 있습니다.
- 특히 화장품 제형에 따른 미생물 한도 시험 방법 사례를 마련하여 실무자들의 시험 수행에 도움이 될 수 있도록 자세히 설명하였습니다.

1) 본 가이드라인은 국내 시험법(식품의약품안전처 고시 제 2017-114호) 및 국제 시험법(FDA의 BAM for cosmetics, PCPC microbiology guidelines M-1/M-2, USP 61/62, 1111 및 ISO 18416, 21150, 22717, 22718, 18415, 21148, 21149)을 근거로 제작하였습니다.



미생물 한도 시험법의 구성

미생물 한도 시험은 어떻게 시험하나요?



검체(화장품)에 희석액·분산제 등을 넣어 **검액을 제조**합니다.



시험에 들어가기 전, 시험법이 제품에 적용하기에 적합한지 확인하기 위하여 **시험법 적합성 시험**을 수행합니다.



시험법이 적합하다고 판단되면, 검체 내 미생물 오염수준을 확인하기 위한 **총 호기성 생균수 시험**과 **특정미생물 시험**을 수행합니다.



총 호기성 생균수 시험이란?

화장품 안에 있는 호기성 세균과 진균의 수를 확인하는 시험입니다.

특정미생물 시험이란?

화장품 안에 특정미생물(대장균, 녹농균, 황색포도상구균)이 존재하는지 확인하는 시험입니다.

	총 호기성 생균수 시험	특정미생물 시험	내용
STEP 1	검체 전처리(검액 제조)	검체 전처리(검액 제조)+배양	9페이지
STEP 2	시험법 적합성 시험	시험법 적합성 시험	18페이지
STEP 3	본시험 (세균수, 진균수 확인)	본 시험 (특정 미생물 검출여부 확인)	27페이지



미생물 한도 시험법의 구성 절차 별 수행 가이드라인



시험을 수행하기 전 이것만을 꼭 기억하세요!

아래 내용은 미생물 시험결과의 정확성 확보를 위하여
검체 취급 시 꼭 기억해야하는 주의사항입니다.



모든 시험과정에서 미생물 오염에 주의합니다.

- 무균 조작을 위하여 클린벤치를 사용합니다.
- 검체 이외에 모든 재료는 멸균하여 사용합니다.
- 실험자와 검체, 외부환경 간의 미생물 오염에 주의합니다.



〈클린벤치 사용 모습〉



온도 관리에 주의합니다!

- 온도는 시료 내 미생물의 증식 및 사멸에 영향을 미칠 수 있습니다.
- 시료 보관이 필요할 때는 ‘실온 보관’을 기본 원칙으로 합니다.
- 특정 보관 온도가 별도로 제시되는 화장품이 아닐 경우 냉동·냉장 보관하는 것을 권장하지 않습니다.

☒ 제품 취급 시 미생물 오염을 방지하기 위해 반드시 소독 후 수행합니다!

- 제품 개봉 전, 70% 에탄올 등을 묻힌 멸균 거즈로 제품 입구 주위를 잘 닦아줍니다.



〈70% 에탄올을 묻힌 멸균 거즈〉



〈시료 입구를 소독하는 모습〉

☒ 검체 채취 시 정확한 용량을 소분해야합니다!

- 일부 점도가 높은 액상 제품의 경우, 정확한 소분을 위하여 바늘을 제거한 1회용 멸균 주사기를 사용 할 수 있습니다. (단, 주사기 재사용 금지)
- 이때, 정확한 양을 채취하기 위하여 주사기 내 기포가 생기지 않도록 주의해야 합니다.



〈올바른 주사기 사용 예시〉

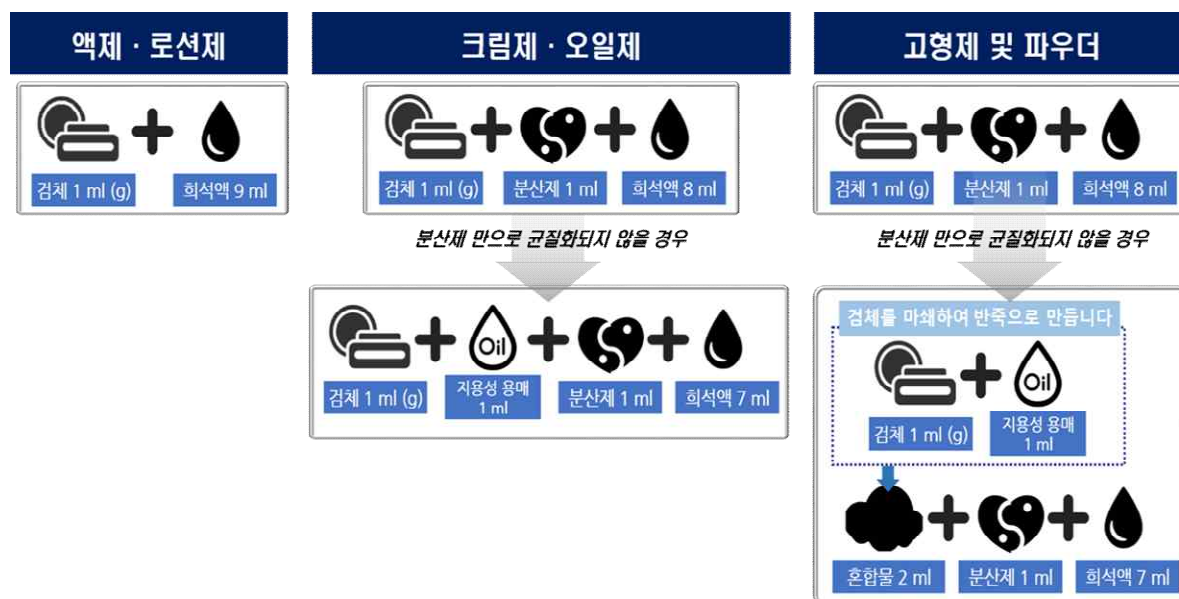


〈잘못된 주사기 사용 예시 - 기포 발생〉

1-1. 개요

검체의 전처리는 왜 중요할까요?

검체에 희석액·분산제·용매 등을 첨가하고 검체를 충분히 분산시키는 과정을 통해 방부제 등 항균활성물질을 중화시키거나 제거하여 실험의 정확도를 향상시킬 수 있기 때문입니다



참고하세요!



- 지용성 용매의 첨가량은 대상 검체 특성에 맞게 설정할 수 있습니다.
- 희석이 더 필요한 경우 동일한 희석액을 사용합니다.
- 검액의 균질화를 위하여 1) 가온(약 40℃, 30분)하거나
2) 멸균한 유리구슬 첨가 후 교반할 수 있습니다.

주의하세요!



검체 전처리 과정에 사용되는 재료(희석배지, 분산제, 지용성 용매 등)는 미생물 생육에 영향이 없는 것 또는 영향이 없는 농도이어야 합니다.

1-2. 대표 제품군별 검액 제조 가이드라인

- 다양한 제형의 화장품에 대한 검액 제조 방법을 쉽게 이해할 수 있도록 대표 제품군 별 수행 사례를 아래에 정리하였습니다.

□ 액제 · 로션제

제품 종류 ▶ 화장수, 샴푸, 폼 클렌저, 로션, 린스 등

예시 1 로션

검체 1 ml(g)에 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 9 ml를 넣어 10배 희석액을 만들어줍니다.

STEP 1. 샘플 채취



피펫이나 주사기(점도가 높은 경우)를 이용하여 샘플을 채취하여 검액 제조용 용기에 넣어줍니다

STEP 2. 희석배지 첨가 및 균질화



희석배지 첨가 후, 기계식 교반기를 이용하여 검체를 균질화시켜 줍니다

□ 크림 · 오일제

제품 종류 ▶

크림, 오일, 립글로스, 헤어젤, 포마드 등

예시 2 크림

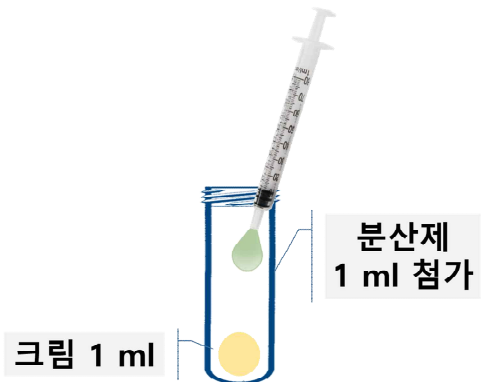
검체 1 ml(g)에 적당한 분산제 1 ml를 넣어 균질화 시키고 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 ml를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

STEP 1. 샘플 채취



파렛이나 주사기(점도가 높은 경우)를 이용하여 샘플을 채취하여 검액 제조용 용기에 넣어줍니다

STEP 2. 분산제 첨가



분산제(Tween 80 등) 1 ml를 첨가합니다

STEP 3. 균질화



기계식 교반기 등으로 검체를 균질화시켜줍니다

STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화

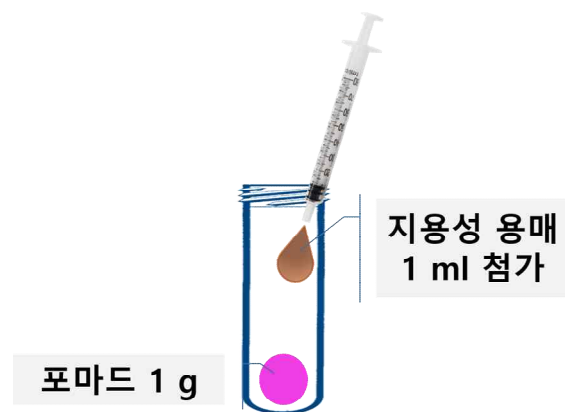


희석배지 8 ml를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화시켜 줍니다

예시 3 포마드

포마드와 같이 분산제만으로 균질화되지 않는 높은 오일 함량의 제품은 검체 1 ml(g)에 적당량의 지용성 용매를 첨가하여 검체를 용해시킨 뒤 적당량의 분산제 및 희석액을 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

STEP 1. 지용성 용매 첨가



적당량의 지용성 용매(Mineral oil 등)을 첨가합니다

STEP 2. 검체 용해



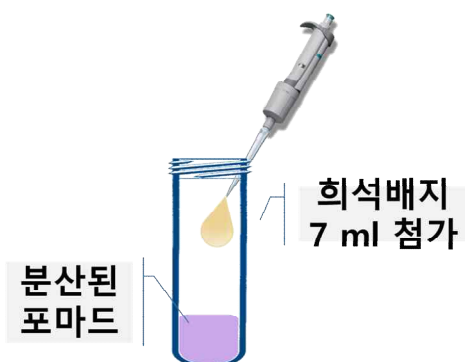
기계식 교반기 등으로 충분히 용해시켜 줍니다

STEP 3. 분산제 첨가 및 균질화



검액 내 지용성 용매에 의한 상분리 방지를 위해 적당량의 분산제(Tween 80 등)를 첨가 후 균질화합니다

STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화



희석배지 7 ml를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화시켜 줍니다

□ 파우더 · 고형제

제품 종류 ▶ 파우더케이크, 아이섀도, 립스틱, 아이브로펜슬 등

예시 4 파우더

검체 1 ml(g)에 적당한 분산제 1 ml를 넣어 균질화 시킨 후 희석액 8 ml를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

STEP 1. 샘플 채취



멸균한 스페툴라 및 저울을 이용하여
정확히 소분합니다

STEP 2. 분산제 첨가 및 균질화



분산제(Tween 80 등) 1 ml를 첨가 후 균질화합니다.

STEP 3. 희석배지 첨가



희석배지 8 ml를 첨가 후 균질화합니다

STEP 4. 균질화



기계식 교반기 등으로 충분히 균질화시켜줍니다

예시 5 립스틱

- 립스틱, 립밤 등 비수용성 고형제는 분산제만으로 균질화되지 않을 수 있습니다.
- 검체 1 g에 적당량의 지용성 용매를 첨가한 후 스페툴라, 조직마쇄기 (tissue-grinder) 등을 이용하여 검체를 반죽형태로 만듭니다.
- 또는 지용성 용매 없이 분산제만으로 반죽형태로 만들 수 있습니다
- 그 다음, 분산제 및 희석배지를 첨가하여 검액을 만듭니다.

STEP 1. 샘플 채취



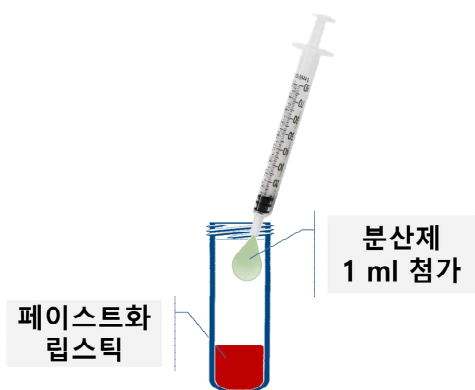
멸균한 스페툴라 및 저울을 이용하여 정확히 소분합니다

STEP 2. 반죽화



적당량의 지용성 용매(Mineral oil 등)를 넣고 멸균한 조직마쇄기 등으로 반죽형태로 만듭니다

STEP 3. 분산제 첨가 및 균질화



검액 내 지용성 용매에 의한 상분리 방지를 위해 적당량의 분산제(Tween 80 등)를 첨가 후 균질화합니다

STEP 4. 희석배지 첨가 및 균질화



희석배지 6 ml를 첨가한 후 기계식 교반기 등으로 충분히 균질화시켜 줍니다

※ 추가적으로 검액을 만든 뒤 가온처리(약 40℃, 30분)를 하거나 교반 시 멸균한 유리구슬 (5 mm: 5-7개, 3 mm: 10-15개) 넣어 균질화시킬 수 있습니다

□ 그 외 - 에어로졸류

예시 6 웨이빙 폼

- 웨이빙 폼과 같은 폼 형(거품이 분사되는 형태)등 밀도가 매우 낮은 검체의 경우 멸균된 비커 등 부피가 큰 용기를 이용하여 소분할 수 있습니다.
- 멸균된 비커 안에 있는 검체 1 ml(g)에 적당한 분산제 1 ml 및 희석액 8 ml를 넣어 10배 희석액을 만들어 줍니다.

STEP 1. 샘플 채취



밀도가 매우 낮은 검체(폼 형 등)는 멸균된 비커 등 부피가 큰 용기를 이용하여 소분할 수 있습니다.

STEP 2. 분산제 첨가 및 균질화



분산제(Tween 80 등) 1 ml를 첨가 후 균질화합니다.

STEP 3 희석배지 첨가 및 균질화



희석배지 8 ml를 첨가 후 균질화합니다
(멸균한 교반자석 등이 사용될 수 있습니다)



비수용성 고형제의 전처리법 예시 1

- ❖ 분산제 및 희석배지 첨가 이전에 지용성 용매를 첨가한 다음 스페툴라, 조직마쇄기 등을 이용하여 검체를 반죽형태로 만드는 작업을 수행하면 충분히 균질화된 검액을 만들 수 있습니다.

예시) 립스틱



검체 1 g에 분산제 1 ml와
지용성 용매 2 ml 첨가한 모습



조직마쇄기를 이용하여
반죽형태로 만드는 모습



희석배지를 첨가하여
균질화된 검액



분산제 및 희석배지 첨가만으로 검액을
제조할 때 충분히 균질화되지 않은 검액 예시



적당량 이상의 지용성 용매를 첨가하거나
분산제를 첨가하지 않았을 때 상분리 예시



비수용성 고형제의 전처리법 예시 2

- ❖ 지용성 용매 없이 분산제만 첨가한 다음 스페툴라 등을 이용하여 검체를 반죽형태로 만든 후 희석배지를 첨가하여 충분히 균질화된 검액을 만들 수 있습니다.

예시) 아이라이너



검체 0.2 g에 분산제 0.2 ml를
첨가한 모습



스페툴라를 이용하여
반죽형태로 만드는 모습



희석배지를 첨가하여
균질화된 검액



분산제 및 희석배지 첨가만으로 검액을
제조할 때 충분히 균질화되지 않은 검액 예시

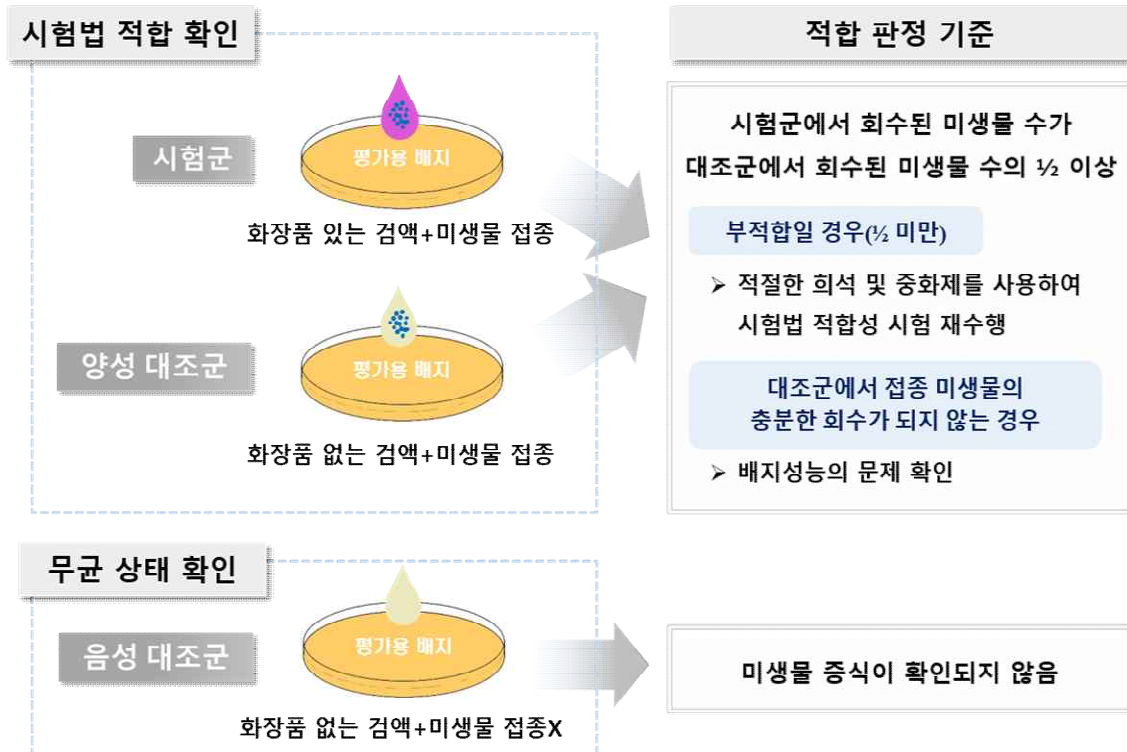


적당량 이상의 지용성 용매를 첨가하거나
분산제를 첨가하지 않았을 때 상분리 예시

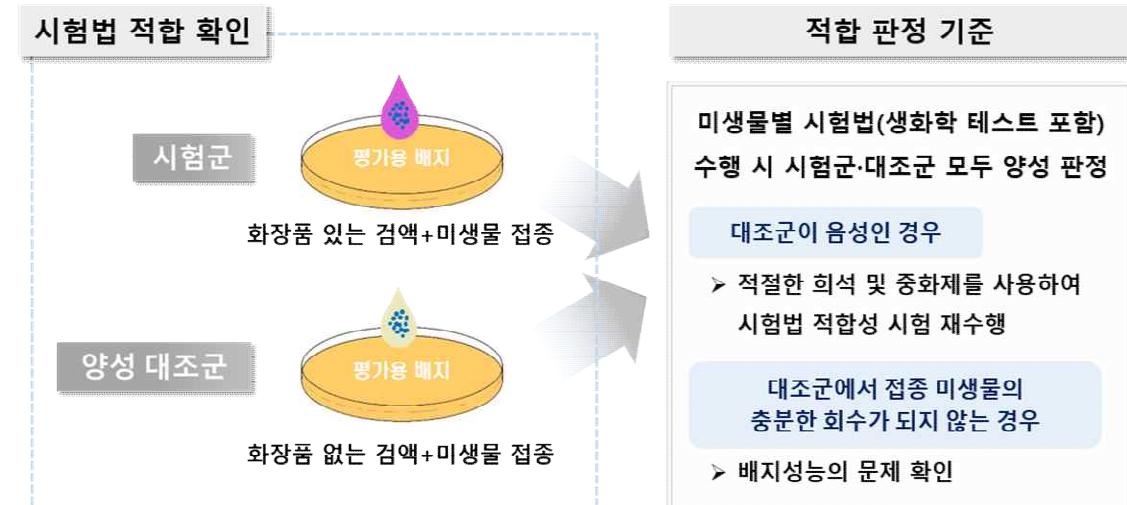


배지성능 및 시험법 적합성시험은 본 시험에 들어가기 전
시험 재료 및 방법을 신뢰할 수 있는지 미리 검증하는 과정입니다

총 생균수 시험법의 적합성시험 개요도



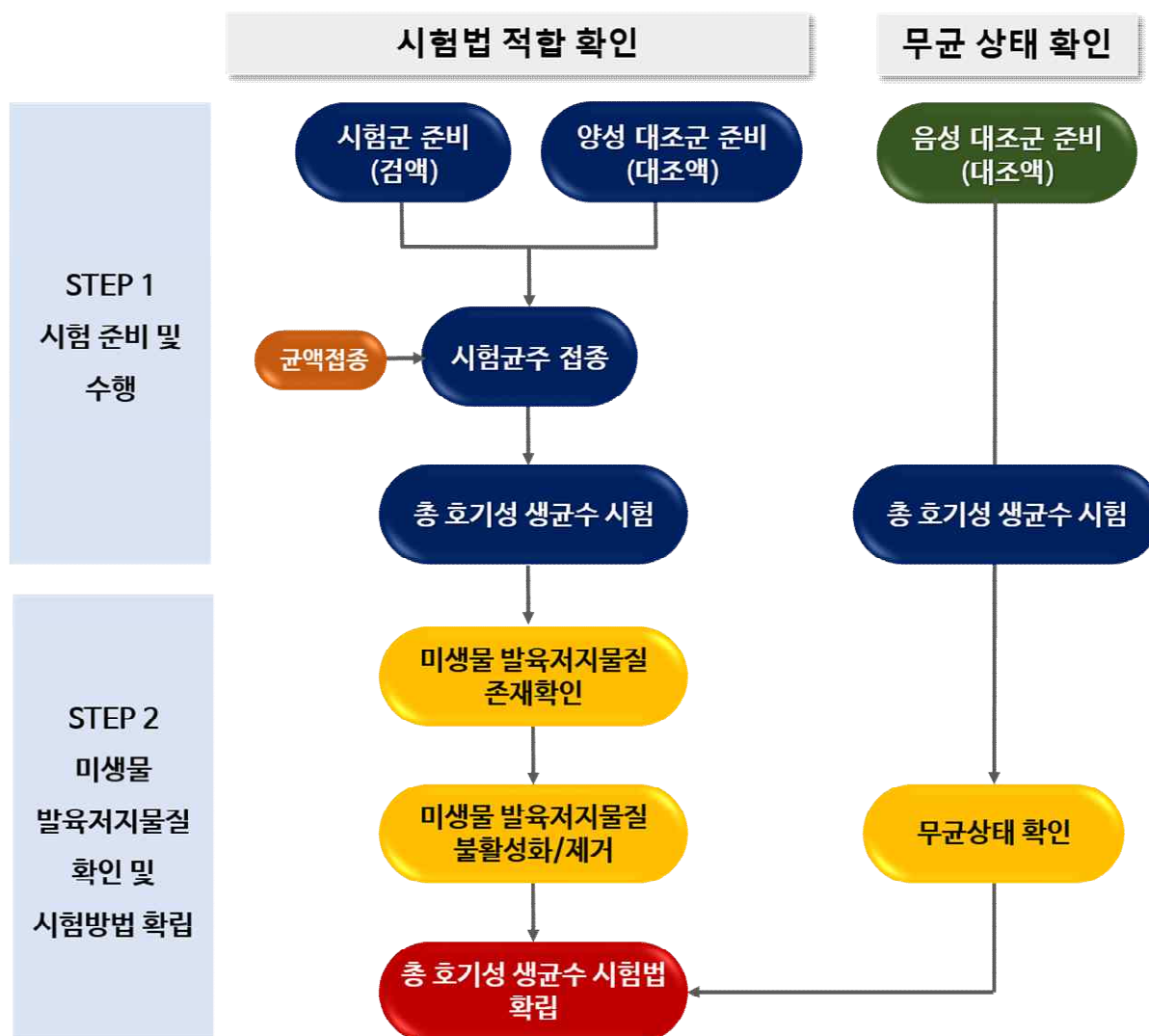
특정 미생물 시험법의 적합성시험 개요도



2-1. 총 호기성 생균수 시험법의 적합성시험

- 검체 내 항균활성물질이 전처리 과정에서 충분히 중화되지 않는 경우, 시험재료가 오염되어 있는 경우 정확하게 미생물 수를 측정하기 어렵습니다.
- 따라서 화장품 성분에 의해 접종균이 사멸하지 않는지 확인하는 시험법 적합 확인과 희석액과 배지가 오염되지 않았는지 확인하는 무균상태 확인 시험을 수행해야 합니다.

총 호기성 생균수 시험의 적합성 시험 개요도



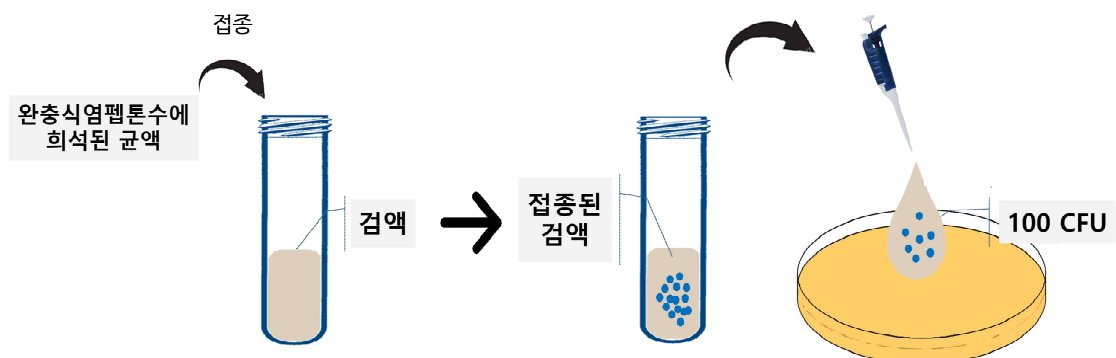
STEP 1. 시험 준비 및 수행

[STEP 1.1] 균액 제조

- 아래 표에 제시된 세균 및 진균을 대상으로 균액을 제조합니다.

대상별 시험균주		
세균	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP53.126, NBRC 3972 또는 KCTC 2571
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134 또는 KCTC 1021
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NRRC 13276 또는 KCTC 3881
진균	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP48.72, NBRC 1594 또는 KCTC 7965

- ☑ 균주를 배양하여 사용할 경우 세균은 대두카제인소화액체배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하여 30-35°C, 18-24시간 배양하는 것을 권장합니다.
- ☑ 균주를 배양하여 사용할 경우 진균은 사부로포도당액체배지 또는 사부로포도당한천배지를 사용하여 20-25°C, 48시간 이상 배양하는 것을 권장합니다.
- 균주를 완충식염펩톤수(pH 7.0)로 희석하며, 최종적으로 배지에 접종되는 균수가 약 100 CFU가 되도록 균액을 제조합니다.



[STEP 1.2] 시험군[검액], 양성 대조군[대조액] 준비

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 검액(시험군)을 제조합니다.
- 양성 대조군은 검체 대신 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 사용하여 검액 준비 방법에 따라 제조하여 대조액으로 사용합니다.

예시 1 액제 · 로션제의 경우	
검액	대조액
예시 2 비수용성 고형제(립스틱 등의 경우	
검액	대조액

[STEP 1.3] 균액 접종

- 제조된 검액과 대조액에 균액을 최종적으로 100 CFU가 되도록 적당량을 각각 접종합니다.



검체 내 항균활성물질 불활성화/제거하기 위한 권고사항!

검체 내 항균물질을 충분히 중화하기 위하여 검액 및 대조액 제조 후 일정시간(약 20분) 대기한 후 균액을 접종할 수 있습니다.

[STEP 1.4] 총 호기성 생균수 시험 수행

- 한천평판도말법에 따라, 검액 · 대조액 · 음성대조액은 최소 2개의 평판배지에 0.1 ml 이상 도말합니다.
- 또는 한천평판희석법에 따라, 검액 · 대조액 · 음성대조액 1 ml를 최소 2개의 페트리접시에 넣고 그 위에 멸균 후 45°C로 식힌 시험용 배지 15 ml를 넣어 잘 혼합합니다.
- 배지는 세균의 경우 30-35°C에서 적어도 48시간, 진균의 경우 20-25°C에서 적어도 5일간 배양합니다.

STEP 2. 미생물발육저지물질 확인 및 시험법 확립

- 시험군에서 회수한 균수가 대조군에서 회수한 균수의 50% 이상일 경우, 총 호기성 생균수 시험법이 적절하다고 판정합니다.



시험법 적합/부적합 판정 예시

시험법 적합 예시	
검액에서 회수한 균수	대조액에서 회수한 균수
75 CFU	90 CFU
회수율: $(75 \div 90) \times 100 = 83\%$	

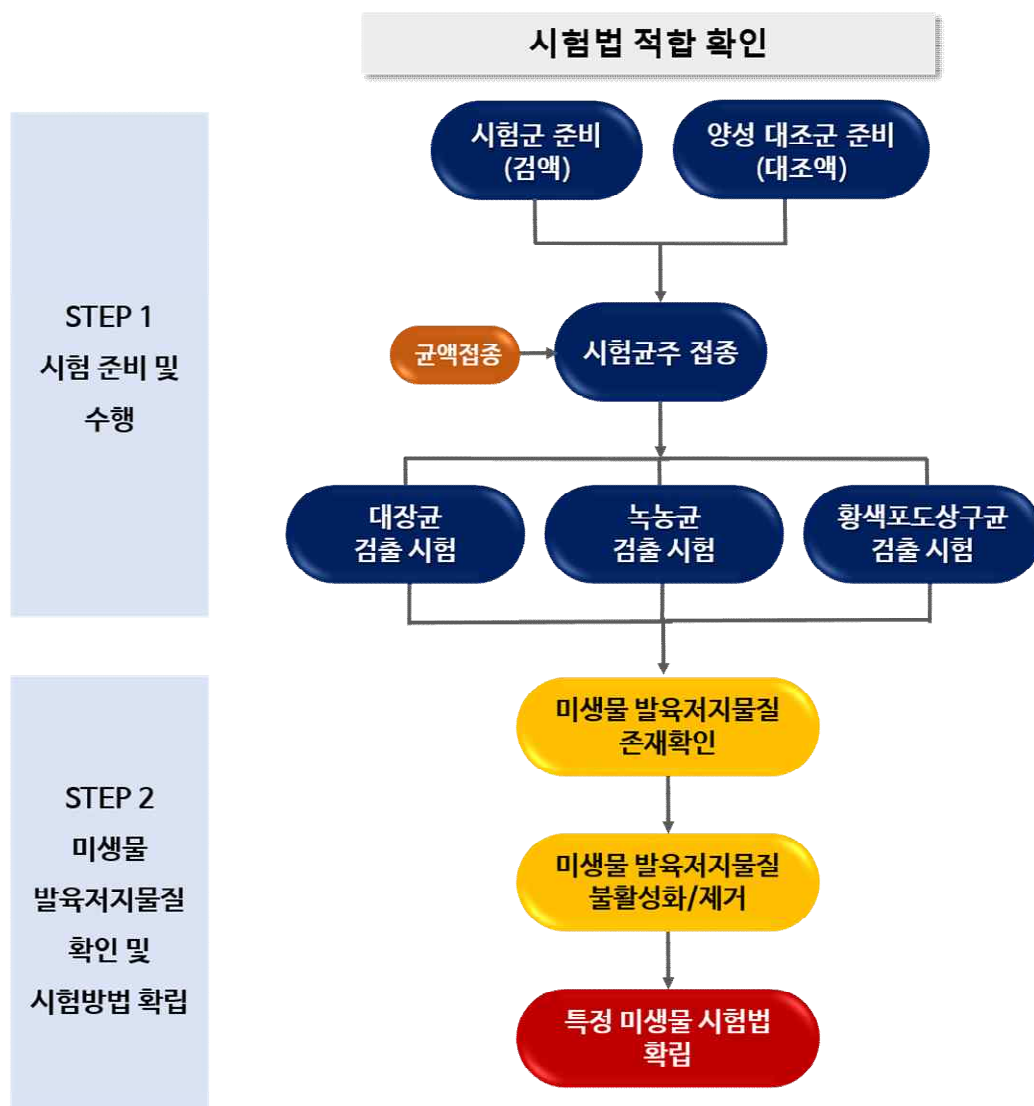
시험법 부적합 예시	
검액에서 회수한 균수	대조액에서 회수한 균수
21 CFU	90 CFU
회수율: $(21 \div 90) \times 100 = 23\%$	

- 시험법이 적합하지 않은 경우(검액에서 회수한 균수가 대조군에서 회수한 균수의 50% 미만), 미생물발육저지물질이 존재하는 것으로 판단되므로, 총 호기성 생균수 시험법을 변경해야합니다.
- 항균활성의 중화를 위하여 희석제 및 중화제(화장품 안전기준 등에 관한 규정, 유통화장품 안전기준 시험방법, 미생물한도, 표 2)를 사용할 수 있습니다.

2-2. 특정미생물 시험법의 적합성시험

- 검체 내 항균활성물질이 전처리 과정에서 충분히 중화되지 않는 경우 대상 미생물의 검출이 어려울 수 있습니다.
- 따라서 인위적으로 대상 미생물을 접종하여 검액을 제조한 뒤 배양단계부터 최종 판정 단계까지 단계별로 규정된 감별 특성을 나타내는지 평가해야 합니다.

특정 미생물 시험의 적합성 시험 개요도



STEP 1. 시험 준비 및 수행

[STEP 1.1] 균액 제조

- 아래 표에 제시된 세균을 대상으로 시험을 수행합니다.

☑ 대두카제인소화액체배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하여 30-35°C, 18-24시간 배양하는 것을 권장합니다.

대상 별 시험균주	
특정 미생물	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP53.126, NBRC 3972 또는 KCTC 2571
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 13275 또는 KCTC 2513
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NRRC 13276 또는 KCTC 3881

- 배양된 균을 완충식염펩톤수(pH 7.0)로 희석하여 검액 0.1 ml 당 약 100 CFU를 개별적으로 접종할 수 있도록 균액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 시험균(검액), 양성 대조균(대조액) 준비

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 각 특정미생물 검출 시험법에 제시된 액체배지를 희석배지로 이용하여 시험균(검액)을 제조합니다.
- 시험균 제조법에 따라, 검체 대신 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 첨가하여 대조액을 제조합니다.

[STEP 1.3] 균액 접종

- 제조된 검액/대조액에 균액 0.1 ml를 접종합니다.



검체 내 항균활성물질 불활성화/제거하기 위한 권고사항!
검체 내 항균활성물질의 충분한 중화를 위하여 검액 및 대조액 제조 후 일정 시간(약 20분) 대기한 다음 균액을 접종할 수 있습니다.

[STEP 1.4] 특정미생물 시험 수행, 배양

- 각 특정미생물별 조건(본 가이드라인 30-38페이지)에 맞게 시험을 수행합니다.

STEP 2. 미생물발육저지물질 확인 및 시험법 확립

- 각 특정미생물 시험법의 단계별 양성반응을 확인하여 미생물 발육저지물질 존재유무를 확인합니다.
- 시험법이 적합하지 않은 경우(음성반응이 나올 경우), 미생물발육저지 물질이 존재하는 것으로 판단되므로, 특정미생물 시험법을 변경해야 합니다.
- 항균활성을 중화하기 위하여 희석제 및 중화제(화장품 안전기준 등에 관한 규정, 유통화장품 안전기준 시험방법, 미생물한도, 표 2)를 사용할 수 있습니다.



시험법 적합성 시험을 통해 적합성이 검증된 방법을 사용합니다.

3-1. 총 호기성 생균수 한도 시험

STEP 1. 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 검액을 제조합니다.

STEP 2. 배지 도말 및 배양

세균수 시험

- 한천평판도말법에 따라, 검액은 최소 2개의 총 호기성 세균용 배양 평판배지에 0.1 ml 이상 도말합니다. 검출 한계를 낮추기 위하여 검액 1 ml을 3개의 평판배지에 나누어 분주한 뒤 도말할 수 있습니다.
- 또는 한천평판희석법을 수행할 수 있습니다(본 가이드라인 22페이지).
- 배지는 30-35°C에서 적어도 48시간 배양합니다.

진균수 시험

- 상기 세균수 시험법과 같이 한천평판도말법 또는 한천평판희석법을 수행합니다.
- 배지는 20-25°C에서 적어도 5일간 배양합니다.



총 호기성 생균수 계수 방법 및 예시 (평판희석법)

(검체에 존재하는 세균 및 진균 수, CFU/g 또는 ml)

검액 1 ml 를 각 배지에 접종한 경우

$$\{(X_1 + X_2 + \dots + X_n) \div n\} \times d$$

$\uparrow$
 n: 배지(평판)의 개수
 $\downarrow$
 X: 각 배지(평판)에서 검출된 집락 수
 $\downarrow$
 d: 검액의 희석배수

[예시 1] 10배 희석 검액 1 ml 씩 2반복

	각 배지에서 검출된 집락수	
	평판 1	평판 2
세균용 배지	66	58
진균용 배지	28	24
세균수 (CFU/g (ml))	$\{(66+58) \div 2\} \times 10 = 620$	
진균수 (CFU/g (ml))	$\{(28+24) \div 2\} \times 10 = 260$	
총 호기성 생균수 (CFU/g (ml))	$620 + 260 = 880$	

[예시 2] 100배 희석 검액 1 ml 씩 2반복

	각 배지에서 검출된 집락수	
	평판 1	평판 2
세균용 배지	8	11
진균용 배지	5	7
세균수 (CFU/g (ml))	$\{(8+11) \div 2\} \times 100 = 950$	
진균수 (CFU/g (ml))	$\{(5+7) \div 2\} \times 100 = 600$	
총 호기성 생균수 (CFU/g (ml))	$950 + 600 = 1550$	

3-2. 특정미생물 시험



특정미생물 시험법은 제시된 시험 단계에 따라 수행하며, 양성반응이 확인되면 다음 단계 시험을 진행하는 체계입니다.

□ 대장균 (*Escherichia coli*)

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 유당액체배지를 희석배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 [1]

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 취하여 맥콘키한천배지 위에 도말하고 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 2.2] 성상확인

- 주위에 적색의 침강선 띠를 갖는 적갈색의 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다(검출되지 않은 경우 대장균 음성 판정).

STEP 3. 선별 배양 [2]

[STEP 3.1] 획선도말 및 배양

- 에오신메칠렌블루한천배지에서 ‘STEP 2.2’에 검출된 집락을 각각 도말하고 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 3.2] 성상확인

- 금속광택을 나타내는 집락 또는 투과광선 하에서 흑청색을 나타내는 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다.

STEP 4. 가스 발생 확인

[STEP 4.1] 가스발생 확인 및 대장균 양성 판정

- ‘STEP 3.2’에서 확인된 집락을 백금이 등으로 취하여 발효시험관이 든 유당액체배지에 넣어 44.3-44.7°C의 항온수조 중에서 22-26시간 배양합니다.
- 가스발생이 나타나는 경우에는 대장균 양성으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다.

Escherichia coli 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. 검액 증균 배양

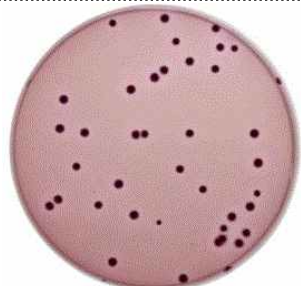


(출처: MBcell)

육안으로
균의 증식이
확인되는 경우

▶ STEP 2

STEP 2. 맥콘키한천배지 선별 배양



(출처: MBcell)

적색의 침강선 띠를 갖는
적갈색의 집락이
확인되는 경우

▶ STEP 3

STEP 3. 에오신메칠렌블루 한천배지 선별 배양



금속광택을 나타내는
집락 또는 투과광선
하에서 흑청색을
나타내는 집락이
확인되는 경우

▶ STEP 4

STEP 4. 가스발생 확인 및 양성 판정



가스가 발생한 경우

▶ 대장균 양성 의심,
동정시험 수행

□ 녹농균 [*Pseudomonas aeruginosa*]

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 카제인대두소화액체배지를 희석배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 [1]

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 취하여 세트리미드한천배지 위에 도말하고 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 2.2] 성상확인

- 녹색 형광물질을 나타내는 집락이 검출되는 경우 다음 단계를 수행합니다.
(검출되지 않은 경우 녹농균 음성 판정)

STEP 3. 선별 배양 [2]

[STEP 3.1] 획선도말 및 배양

- ‘STEP 2’의 선별 과정에서 의심 집락이 확인된 경우, STEP 1.2의 증균배양액을 녹농균 한천배지 P 및 F에 도말하여 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

[STEP 3.2] 성상확인

- 플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F의 집락을 자외선 하에서 관찰하여 황색으로 나타나거나 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P의 집락을 자외선 하에서 관찰하여 청색으로 나타나면 녹농균 양성으로 판정합니다.

STEP 4. 옥시다제 시험

[STEP 4.1] 옥시다제 시험 실시 및 양성판정

- ‘STEP 3.2’에서 판정된 녹농균 의심집락은 옥시다제 시험을 실시합니다.
- 5-10초 내 보라색이 나타날 경우 녹농균 양성으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다(10초 후에도 색의 변화가 없는 경우 녹농균 음성).

Pseudomonas aeruginosa 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. 검액 증균 배양



(출처: MBcell)

육안으로
균의 증식이
확인되는 경우

▶ STEP 2

STEP 2. 세트리미드 한천배지 배양

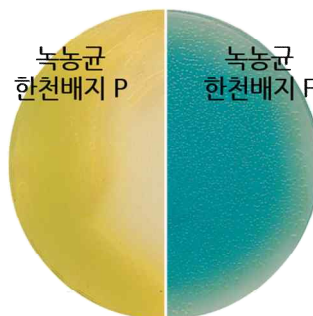


(출처: MBcell)

녹색 형광물질의 집락이
확인되는 경우

▶ STEP 3

STEP 3. 녹농균 한천배지 P, F 배양 및 자외선 하 관찰



플루오레세인 검출용
녹농균 한천배지 F
집락이 자외선 하
황색으로 확인되고,
피오시아닌 검출용
녹농균 한천배지 P의
집락이 자외선 하
청색으로 확인되는 경우

▶ STEP 4

STEP 4. 옥시다제 시험 및 양성 판정

(양성반응 예시1)



(양성반응 예시2)



(출처: CDC)

5-10초 이내에 보라색이
나타날 경우

▶ 녹농균 양성 의심,
동정시험 수행

□ 황색포도상구균 [*Staphylococcus aureus*]

STEP 1. 검액 제조 및 증균배양

[STEP 1.1] 검액 제조

- 제시된 전처리법(본 가이드라인 9-17페이지)에 따라 카제인대두소화액체배지를 희석배지로 사용하여 검액을 제조합니다.

[STEP 1.2] 증균배양

- 전처리된 검액은 30-35°C에서 18-24시간 배양합니다.

STEP 2. 선별 배양 [1]

[STEP 2.1] 획선도말 및 배양

- 배양한 검액을 가볍게 흔든 후, 백금이 등으로 취하여 베어드파카한천배지 위에 도말하고 30-35°C에서 18-24시간 배양

[STEP 2.2] 성상확인 및 그람염색

- 집락이 검정색이고 집락주위에 황색투명대가 형성되며, 그람염색법에 따라 염색하여 검경한 결과 그람양성균인 것을 확인한 경우 다음 단계 (STEP 3)를 수행합니다.

STEP 3. 응고효소시험

[STEP 3.1] 응고효소시험 실시 및 양성판정

- STEP 2.2의 의심집락에 대하여 응고효소시험 실시 결과 양성인 경우 황색포도상구균 양성으로 의심하고 동정시험으로 확인합니다.

Staphylococcus aureus 특정미생물 시험의 개요

STEP 1. 검액 증균 배양

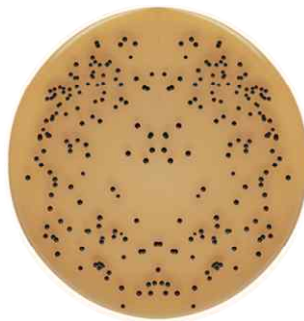


(출처: MBcell)

육안으로
균의 증식이
확인되는 경우

▶ STEP 2

STEP 2. 베어드파카 한천배지 선별 배양 및 그람염색



황색투명대를 가진
검정색의 집락이
검출되고 그람양성균이
확인되는 경우

▶ STEP 3

STEP 3. 응고효소시험 및 양성 판정

양성반응



음성반응



응고효소시험
양성인 경우

▶ 황색포도상구균
양성 의심,
동정시험 수행