

# 화장품의 미생물한도 기준 및 시험방법 가이드라인

*Guideline for Microbial limit Tests for Cosmetics*

2011. 02

## < 차례 >

I. 서론 .....	1
II. 미생물시험 .....	1
1. 용어정의 .....	1
2. 미생물시험에 사용되는 기구 및 기기 .....	2
3. 미생물성장에 영향을 주는 요인 .....	2
4. 화장품의 미생물한도 시험시 검체 채취방법 .....	5
5. 멸균법 .....	5
III. 화장품의 미생물한도 기준 및 시험방법 .....	6
IV. 참고문헌 .....	15

## I. 서론

1. 일반적으로 화장품에는 오염된 미생물이 증식할 가능성이 있다. 오염된 미생물은 화장품의 품질을 떨어뜨리고 소비자의 건강에 나쁜 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 화장품 제조자는 화장품의 품질, 안전성, 유효성을 확보하기 위하여 화장품 원료, 화장품과 직접 접촉하는 용기나 포장 및 최종제품의 미생물 오염을 최대한 낮게 억제하여야 한다.
2. 화장품법 제13조에서는 전부 또는 일부가 변질되거나 변패된 물질로 된 화장품(제3호)과 병원미생물에 오염되었거나 오염된 것이라고 인정되는 화장품(제4호)은 판매하거나 판매의 목적으로 제조·수입·보관 또는 진열해서는 안 된다고 규정하고 있어 이에 대한 기준과 시험법이 필요하다.
3. 미생물한도시험은 화장품에 존재하는 살아있는 세균과 진균의 수를 측정하여 그 한도 기준을 정하고, 특정세균의 검출여부를 정한 것으로 화장품이 미생물에 오염되었는지 여부를 확인할 수 있다.
4. 이 가이드라인은化妆품을 제조하는데 있어 위생과 안전에 대한 개념을 강조하고, 화장품에 미생물한도기준을 적용하도록 함으로서 화장품 제조자가 미생물에 대한 품질관리 프로그램을 설정하고 유지하도록 도움을 주고 소비자에게 안전한化妆품을 공급하기 위한 것이다.

## II. 미생물시험

### 1. 용어정의

- 세균 : 단세포생물이며 원핵생물로서 일반적으로 최적성장온도는 30~35 ℃이다. 그람양성 및 음성으로 구별되며 그람양성에는 식중독을 일으키는 포도상구균이, 그람음성에는 심내막염·폐렴·수막염·폐혈증을 일으키는 녹농균, 장내설사, 복통을 일으키는 살모넬라균 등이 이에 속한다.
- 진균 : 포자를 형성하면서 증식하는 곰팡이, 효모가 이에 속하며, 최적성장온도는 20~25 ℃이다. 곰팡이는 병원 내 공기감염을 일으키는 것이 있으며 페니실린 등을 생산하는 것도 있다. 효모는

빵, 맥주의 발효 시 사용된다.

- 콜로니 : 고체배지에서 균을 배양할 때 육안으로 관찰되는 동일한 균의 세포덩어리
- 멸균 : 물질 중에서 모든 미생물을 죽이든가 또는 없애는 것을 말한다. 멸균법은 일반적으로 미생물의 종류, 오염상태, 멸균하고자 하는 물질의 성질 및 상태에 따라 정한다.

## 2. 미생물시험에 사용되는 기구 및 기기

1) 기구 : 멸균피펫, 멸균핀셋, 멸균가위, 멸균약수저(spatula), 멸균시험관, 멸균병, 멸균페트리디쉬, 멸균유리봉

### 2) 기기

- 클린벤치(clean bench) : 헤파필터(Hepa filter)가 붙은 라미나 플로우 후드(laminar flow hood)로 미생물시험에 이용하는 무균장치. 챔버 내부의 양압으로 외부 공기의 직접적인 흡입이 방지되도록 유지한다.
- 고압증기멸균기 : 배지 및 기구의 멸균에 사용한다.
- 건열기 : 기구의 건조 또는 멸균에 사용한다.
- 배양기 : 30~35 °C 범위에서 일정온도를 유지하는 항온 세균배양기와 20~25 °C 범위에서 일정온도를 유지하는 항온 진균배양기를 사용한다.
- 알코올 램프 및 가스버너

## 3. 미생물성장에 영향을 주는 요인

### 1) 영양분

미생물의 생존과 발육에는 물을 비롯하여 영양물질이 필요하며, 이러한 영양물질로서 무기 또는 유기화합물을 배양액에서 공급해주어야 한다. 독립영양, 종속영양 등 영양형태에 따라 필요로 하는 영양원은 여러 가지인데 보통 탄소원, 질소원, 무기염류, 발육인자 등으로 나누어서 생각한다.

미생물이나 동식물의 조직을 배양하기 위하여 배양체가 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 한 것을 배지라고 한다. 특히 발육인자와 관련하여 생물체 내에서 추출한 비교적 복잡한 조성을 가진 것을 천연배지라고 하며 세균은 육즙, 혈청 등을, 진균은 맥아엑스 등이 흔히 이용된다. 이에 비하여 무기염류 또는 맥아엑스 등이 아닌 탄소원, 질소원을 따로 가한 조성이 명확한

경우를 합성배지라 한다. 대량 배양에는 액체배지가 적절하고, 균주의 보존이나 분리에는 한천·젤라틴 등을 가한 고형배지가 많이 사용된다. 많은 종류의 세균을 포함하는 재료로부터 특정 목적균을 추출하기 위한 배지를 선택 배지라고 한다. 배지는 완전히 멸균한 후에 목적균을 심지 않으면 잡균이 증식될 염려가 있기 때문에 배지를 보존하기 위해서는 반드시 멸균을 하여야 한다.

## 2) 배지의 물리적인 상태

미생물시험배지는 액체상태, 반고체상태, 고체상태가 있다. 액체배지는 배지를 이루고 있는 성분을 녹여 놓은 액체상태의 배지이며 여기에 한천 1.5%나 젤라틴 12%를 첨가하면 배지는 반고체상태가 되고 한천 15~20%를 첨가하게 되면 고체상태가 된다. 끓는점 부근까지 가열하면 다시 액체로 되고 45℃보다 낮아지면 한천은 굳어지며, 젤라틴은 20℃보다 낮아지면 굳어진다.

## 3) 온도

미생물은 광범위한 온도에서 자란다. 냉온성균주(psychrophile, cryophile)는 -4 ~ 15℃에서 자라고, 중온성균주(mesophile)는 15℃ ~ 45℃에서 자라며 대다수의 미생물은 이 그룹에 속한다. 내열성균주(thermophile)는 50~80℃에서 자라며, 몇몇 미생물은 90℃보다 높은 온도에서 자라는 경우도 있다.

냉온성균주는 대부분 효소활성이 저해되는 온도에서도 기능을 할 수 있는 효소체계를 가지고 있기 때문에 낮은 온도에서도 자랄 수 있다. 음식에 존재하는 저온성균은 냄새나 성상을 변하게 한다. 냉장고에 보관해 둔 햄버거가 며칠 후 오염 되거나 냉장고에 보관해 둔 과일에 곰팡이가 생기는 것 등은 저온성균주가 성장하여 나타나는 것이다. 중온성균주는 10~30℃에서 자라는 것과 15~45℃에서 자라는 것의 두 개 그룹으로 나뉘는데, 특히 37℃의 생체내 온도에서 자라는 것이 있는데 이 균들은 인체서식균주이며 사람이나 따뜻한 피가 흐르는 동물들은 중온성균주의 숙주가 된다.

## 4) 산소

미생물에 따라 미생물의 성장시 산소에 대한 요구도 다양하다. 산소가 있을 때만 자라는 균주는 편성호기성균이라고 하고 액체 배지표면에서 층을 형성하면서 자란다. 산소가 없을 때만 자라는 균주는 편성혐기성균이라고 하며, 산소의 유무와 무관하게 자라는 균주는 통성혐기성균이라고 한다. 또한 공기압보다 낮은 분압의 산소를 요구하는 균주는 미호기성균(microaerophile)이라고 하며, 이것은 산소를 감소시키기보다 오히려 이산화탄소의 비율을 증

가시하여야 한다.

#### 5) 배지의 삼투압

세균의 세포는 osmotic machine으로 세포의 형태와 관계없이 여과기 형태를 가진 수많은 구멍을 가진 세포벽을 가지고 있다. 세포벽안에는 반투과성 막이 있으며 그 막은 세포의 세포질(cytoplasm), 염색체(chromosome) 및 그 밖의 세포기관(organelle)으로 이루어져 있다. 영양브로스(Nutrient broth)에서 자란 세균을 15 % 당이 함유된 용액에 넣으면, 당에 의해 삼투압의 차이가 나게 되어 세포안의 물이 세포막을 통해 빠져 나와 세포벽안의 압력을 낮추게 되므로 세포벽이 쭉그러들게 된다. 반대로, 당을 함유하는 용액에서 자란 세균을 증류수로 넣게 되면, 삼투압차에 의해 세포가 터지게 된다. 이러한 삼투압의 영향은 배지에 사용되는 영양소원들의 농도에 따른다. 보통 미생물은 염화나트륨 12%보다 높은 농도를 지탱할 수가 없으며, 잼이나 젤리가 잘 오염되지 않는 것은 바로 높은 당 농도 때문이다. 생화학적 분석을 위해 세포를 증류수에 넣으면 세포가 터져서 세포내의 물질이 방출된다.

#### 6) 배지의 액성(pH)

미생물 성장의 중요한 요소 중 하나는 수소이온( $H^+$ )과 알칼리이온( $OH^-$ ) 농도이다. 정제수에는 수소이온과 알칼리이온이 매우 낮은 농도로 존재한다. 물에 산이 첨가되면 이온화가 이루어진다. 염산과 같은 강산에서는 실제로 대부분의 분자가 이온화되는 반면, 약산에서는 약 1 %만이 이온화한다. 실제적으로 이온화되는 정도는 온도와 농도에 따라 다르게 된다. pH 1~5에서 자라는 균을 호산성균(acidophile)이라고 하며, pH 5.5 나 6~8에서 자라는 균주를 호중성균(neutrophile)이라고 하며, pH 7.5~10에서 자라는 균주를 호염기성균(basophile)이라고 한다. 일반적으로 대부분의 세균은 pH 6~8의 범위에서 자라며, 대부분의 곰팡이와 효소는 pH 2.5~5.5의 범위에서 자란다. 예를 들면 비브리오 콜레라균은 pH 9의 배지에서 분리되며, 이러한 성질을 이용하여 선택배지로 균을 분리하기도 한다.

#### 7) 완충제(buffers)

당을 발효시켜 산을 생성함으로써 배지가 산성을 띄게 되거나 아미노산의 탈아미노반응에 따라 배지에 알칼리를 방출함으로써 알칼리성을 띄게 되는 경우 세균의 성장은 멈추거나 자라지 못하게 된다. 이렇게 산이나 염기가 생성될 때 배지의 pH가 쉽게 변하는 것을 방지하기 위하여 완충제를 사용한다. 가장 일반적으로 이용되는 것에는 인산일수소칼륨과 인산이수소칼륨이 있으며 탄산칼슘과 그 이외의 물질을 이용하기도 한다. 펩톤은 영양공급원으로 첨가되지만 완충작용을 나타내기도 한다.

#### 8) 부유, 분리, 선택배지

많은 병원성세균은 일반적인 영양한천배지(nutrient agar)에서 잘 자라지 않는다. 부유배지는 전체의 혈액, 혈청, 혈장, 복수(ascitic acid), 효모추출물 등이 첨가되어 배양조건이 까다로운 균주도 잘 성장하도록 한다.

분리배지는 균 배양시 빠른 성장과 함께 분명하고 쉽게 분리되는 집락 모양을 갖도록 함으로서 2종이상의 세균을 가진 검체에서 그 중 하나의 균을 검출하는 배지를 말한다. 한 예로 levine의 EMB배지는 *E. coli*의 분리배지로서 1% 유당을 첨가하여 빠르게 자라게 하며, 염색약인 에오신과 메틸렌블루를 첨가하여 녹색금속광택을 띤 검정색 집락을 형성하게 된다. *Enterobacter aerogenes*균 같이 *E. coli*와 유사한 균은 EMB배지에서 잘 자라지는 않지만, 집락 모양이 크고 갈색 점액성의 집락을 갖게 되기 때문에 구별이 가능하다.

선택배지는 주로 한천배지이며, 상재균의 발육으로 병원균의 발육이 곤란한 경우 목적이외의 균발육을 억제시키는 배지이다(예 : 살모넬라 시겔라 배지, 맥콘키 배지, 스타필로코쿠스 110 배지 등). S-S(Salmonella-Shigella) 배지는 *salmonella*와 *shigella*의 선택배지로 담즙산염과 염색약을 억제제로 사용하는데 분변 현탁액이나 분변을 배지에 발라주게 되면 *salmonella*와 *shigella*는 무색의 집락을 형성하게 되나, 분변의 주요 균종인 *E. coli*는 이 배지에서 성장하지 못하게 된다.

#### 4. 화장품의 미생물한도 시험 시 검체 채취방법

검체는 실험실에 도착하자마자 분석한다. 분석전이나 후에 검체를 배양, 냉장 또는 냉동하지 않아야 하며, 개봉 전에 주의 깊게 검체를 관찰한다. 검체를 냉장시키는 것은 미생물에 cold shock(미생물에 대한 상해)을 일으킬 수 있고 실제로 존재하는 것보다 더 적은 수가 나타날 수 있기 때문에 바람직하지 않다.

일단 검체의 용기 표면을 1%염산·70%에탄올액, 4%요오드·70%에탄올액 및 2%글루타르알데히드 용액등의 적당한 소독제로 소독하고 내용물이 가열되지 않도록 조심하면서 용기 입구를 불꽃으로 처리한 다음 무균적으로 연다. 검체의 용기를 열고 검체 일정량을 취한다.

#### 5. 멸균법

##### 1) 고압증기멸균법

포화수증기에 의해 멸균하는 방법으로 고압증기멸균기를 이용한다. 배지 등 고압수증기에 견딜 수 있는 것에 대하여 널리 이용한다. 보통 121℃, 15lb/inch<sup>2</sup> 에서 15 - 20분간 멸균한다. 멸균이 되었다는 것을 확인하기 위하여 인디케이터를 사용할 수도 있다.

## 2) 건열멸균법

건열멸균기를 이용하여 건조공기 중에서 가열하여 미생물을 죽이는 방법이다. 이 방법은 유리기구 등 건조고온에 견딜 수 있는 물품의 멸균에 이용된다. 가스 또는 전기를 써서 직접 가열하든가 가열한 공기를 순환시켜 건조고온상태로 유지하는 방법 등이 있다. 직접 가열할 때는 135~145℃ 3~5시간, 160~170℃ 2~4시간, 180~200℃ 0.5~1시간 실시한다.

## 3) 약액법

약액을 써서 미생물을 죽이는 방법으로 약액에 의하여 변질하지 않는 것에 대하여 이용한다. 보통 소독용에탄올, 0.02~0.1 w/v% 염화벤잘코늄용액, 크레솔수, 석탄산수 또는 포르말린수 등이 사용된다.

# III. 화장품의 미생물한도 기준 및 시험방법

## 1. 기준

총 호기성생균수는 눈화장용제품류 및 어린이용제품류의 경우 500 개/g(mL) 이하, 기타 화장품의 경우 1000 개/g(mL) 이하이고, 대장균(*Escherichia Coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 검출되지 않는다.

## 2. 시험방법

- 일반적으로 다음의 시험법을 사용한다. 다만, 본 시험법 외에도 미생물 검출을 위한 자동화 장비와 미생물 동정기기 및 키트 등을 사용할 수도 있다.
- 총 호기성 생균(세균과 진균)수를 측정하고, 특정 세균인 대장균·녹농균 및 황색포도상구균의 유무를 시험한다.

### 1) 검체의 전처리

검체조작은 무균조건하에서 실시하여야 하며, 검체는 충분히 무작위로 선별하여 그 내용물을 혼합하고 검체의 특성에 따라 다음의 각 방법으로 검체를 희석, 용해, 부유 또는 현탁시킨다.

가. 수분산 검체 : 검체 1 mL에 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액 9mL를 넣어 10 배 희석액을 만들고 필요시 희석한다.

나. 비수분산 검체 : 검체 1 g(mL)에 적당한 분산제(예 : 멸균한 폴리소르베이트 80)을 1 mL를 넣어 균질화 시키고 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액 8mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다. 균질화 되지 않을 경우 5 mm 유리구슬 5~7개(3 mm 유리구슬 10~15개)를 넣어 균질화시키고 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액을 넣어 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다. (단, 사용하는 분산제는 미생물의 생육에 대하여 영향이 없는 것 또는 영향이 없는 농도에서 사용한다.)

## 2) 총 호기성 생균수 시험법

총 호기성 생균수 시험법은 화장품 중 총 호기성 생균(세균, 진균)수를 측정하는 시험방법이다.

### 가. 한천평판 희석법

#### (1) 검액의 조제

변형레틴액체배지(Modified letheen broth) 또는 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액을 사용하여 1)항에 따라 검액을 조제한다.

#### (2) 배지

총 호기성 세균수시험은 변형레틴한천배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하고 진균수시험은 항생물질 첨가 포테이토 텍스트로즈 한천배지 또는 항생물질 첨가 사브로포도당한천배지를 사용한다. 위의 배지 이외에 배지의 적합성 및 시험결과의 타당성 시험을 통

하여 검증된 다른 미생물 검출용 배지도 사용할 수 있고, 세균의 혼입이 없다고 예상된 때나 세균의 혼입이 있어도 눈으로 판별이 가능하면 항생물질을 첨가하지 않을 수 있다.

㉠ 변형레틴액체배지(Modified letheen broth)

육제웍톤	20.0 g
카제인의 판크레아틴 소화물	5.0 g
효모엑스	2.0 g
육엑스	5.0 g
염화나트륨	5.0 g
폴리소르베이트 80	5.0 g
레시틴	0.7 g
아황산수소나트륨	0.1 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1 L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.2가 되도록 조정하고 121 °C에서 15분간 고압멸균 한다.

㉡ 변형레틴한천배지(Modified letheen agar)

프로테오즈 웍톤	10.0 g
카제인의 판크레아틱소화물	10.0 g
효모엑스	2.0 g
육엑스	3.0 g
염화나트륨	5.0 g
포도당	1.0 g
폴리소르베이트 80	7.0 g
레시틴	1.0 g
아황산수소나트륨	0.1 g
한천	20.0 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1 L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.2가 되도록 조정하고 121 °C에서 15분간 고압멸균 한다.

㉢ 대두카제인소화한천배지(Tryptic soy agar)

카제인제 웍톤	15.0g
대두제 웍톤	5.0g
염화나트륨	5.0g
한천	15.0g

정제수 1000mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.1이 되도록 조정하고 121 °C에서 15분간 고압멸균 한다.

㉔ 항생물질첨가 포테이토덱스트로즈한천배지(Potato dextrose agar)

감자침출물 200.0 g

포도당 20.0 g

한천 15.0 g

정제수 1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1 L로 하고 121 °C에서 15분간 고압멸균 한다. 사용하기 전에 1 L당 40 mg의 염산테트라사이클린을 멸균배지에 첨가하고 10 % 주석산용액을 넣어 pH가 3.5 ±0.1로 조정한다.

㉕ 항생물질첨가사부로포도당한천배지 (Sabouraud dextrose agar)

육제 또는 카제인제 펩톤 10.0g

포도당 20.0g

한천 15.0g

정제수 1000mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 121 °C에서 15분간 고압멸균한 다음의 pH가 5.6±0.2이 되도록 조정한다. 쓸 때 배지 1000mL당 벤질페니실린칼륨 0.10g과 테트라사이클린 0.10g을 멸균용액으로서 넣거나 배지 1000mL당 클로람페니콜 50mg을 넣는다.

(3) 조작

㉖ 세균수 시험 : 직경 9~10 cm 페트리 접시내에 미리 굳힌 변형레틴한천배지 표면에 전처리 검액 1 mL를 도말한다. 또는 검액 1 mL를 같은 크기의 페트리접시에 넣고 그 위에 멸균 후 45 °C로 식힌 15 mL의 배지를 넣어 잘 혼합한다. 검체당 최소 2개의 평판을 준비하고 30 ~ 35 °C에서 적어도 48시간 배양하는데 이때 최대 균집락수를 갖는 평판을 사용하되 평판당 300 개 이하의 균집락을 최대치로 하여 총 세균수를 측정한다.

㉗ 진균수 시험 : ㉖ 세균수 시험에 따라 시험을 실시하되 배지는 진균수 시험용 배지를 사용하여 배양온도 20 ~ 25 °C에서 적어도 5일간 배양한 후 100 개 이하의 균집락이 나타나는 평판을 세어 총 진균수를 측정한다.

나. 배지의 적합성 시험

표 1.의 준비배양조건에서 배양된 균주 또는 이와 동등하다고 생각되는 균주를 쓸 수 있다. 균액 1 mL당 약 100 개의 생균이 함유되도록 완충식염펩톤수(pH 7.0)에 희석하여 균액을 만든다. 시험에 쓰는 배지는 균액 1 mL를 접종하여 세균은 30~35 °C에서 적어도 48 시간, 진균은 20~25 °C에서 적어도 5일간 배양할 때 충분한 증식 또는 접종 균수의 회수가 확인되어야 한다.

또한, 시험에 사용된 배지 및 희석액 또는 시험 조작상의 무균상태를 확인하기 위하여 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 대조로 하여 총호기성 생균수시험을 실시할 때 미생물의 성장이 나타나서는 안 된다.

다. 미생물 발육저지물질의 확인시험

나.항에 따라 시험할 때 검액의 유·무 하에서 균수의 차이가 2배 이상되어서는 안 된다.

표 1. 배지성능시험용 균주

시험균주	준비배양조건
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC No. 6538 or 6538 P) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC No. 6633) <i>Escherichia coli</i> (ATCC No. 8739)	호기배양 30~35 °C 18~24 시간
<i>Candida albicans</i> (ATCC No. 2091 or 10231)	호기배양 20~25 °C 48시간

3) 특정세균시험법

가. 대장균 시험법

(1) 검액의 조제 및 조작 : 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 유당액체배지를 사용하여 10 mL로 하여 30~35 °C에서 24~72 시간 배양한다. 배양액을 가볍게 흔든 다음 백금이 등으로 취하여 맥콘키한천배지위에 도말하고 30~35 °C에서 18~24 시간 배양한다. 주위에 적색의 침강선띠를 갖는 적갈색의 그람음성균의 집락이 검출되지 않으면 대장균 음성으로 판정한다. 위의 특징을 나타내는 집락이 검출되는 경우에

는 에오신메칠렌블루한천배지에서 각각의 집락을 도말하고 30~35 °C에서 18~24 시간 배양한다. 에오신메칠렌블루한천배지에서 금속광택을 나타내는 집락 또는 투과광선하에서 흑청색을 나타내는 집락이 발견되면 백금이등으로 취하여 발효시험관이 든 유당액체배지에 넣어 44.3~44.7 °C의 항온수조 중에서 22~26 시간 배양한다. 가스발생이 나타나는 경우에는 대장균 양성으로 판정한다.

(2) 배지

㉠ 유당액체배지

육엑스	3.0 g
젤라틴의 판크레아틴 소화물	5.0 g
유당	5.0 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1 L로 하고 121°C에서 15~20 분간 고압증기멸균한다. 멸균 후의 pH가 6.9~7.1이 되도록 하고 가능한 빨리 식힌다.

㉡ 맥콘키한천배지

젤라틴의 판크레아틴 소화물	17.0 g
카제인의 판크레아틴 소화물	1.5 g
육제 펩톤	1.5 g
유당	10.0 g
데옥시콜레이트나트륨	1.5 g
염화나트륨	5.0 g
한천	13.5 g
뉴트럴렛	0.03 g
염화메칠로자닐린	1.0 mg
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수 1 L에 녹여 1 분간 끓인 다음 121 °C에서 15~20 분간 고압증기멸균한다. 멸균 후의 pH가 6.9~7.3이 되도록 한다.

㉢ 에오신메칠렌블루한천배지(EMB한천배지)

젤라틴의 판크레아틴 소화물	10.0 g
인산일수소칼륨	2.0 g
유당	10.0 g
한천	15.0 g

에오신	0.4 g
메칠렌블루	0.065 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수 1 L에 녹여 121 °C에서 15~20 분간 고압증기 멸균한다. 멸균 후의 pH가 6.9~7.3이 되도록 한다.

#### 나. 녹농균시험

(1) 검액의 조제 및 조작 : 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 카제인대두소 화액체배지를 사용하여 10 mL로 하고 30~35 °C에서 24~48시간 증균 배양한다. 증식이 나타나는 경우는 백금이 등으로 세트리미드한천배지 또는 엔에이씨한천배지에 도말하여 30~35 °C에서 24~48시간 배양한다. 미생물의 증식이 관찰되지 않는 경우 녹농균 음성으로 판정한다. 그람음성간균으로 녹색 형광물질을 나타내는 집락을 확인하는 경우에는 증균배양액을 녹농균 한천배지 P 및 F에 도말하여 30~35 °C에서 24 ~ 72 시간 배양한다. 그람음성간균으로 플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F의 집락을 자외선하에서 관찰하여 황색의 집락이 나타나고, 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P의 집락을 자외선하에서 관찰하여 청색의 집락이 나타나면 녹농균 양성으로 판정한다. 녹농균의 가능성이 높은 집락은 옥시다제시험을 실시한다. 집락을 N, N-디메틸 p-페닐렌디아민모늄이염산염이 묻은 여지에 옮겨 5~10 초 이내에 자색으로 변색하면 옥시다제반응 양성으로 판정한다. 옥시다제반응 음성인 경우에는 녹농균 음성으로 판정한다.

#### (2) 배지

##### ㉔ 카제인대두소화액체배지

카제인 판크레아틴 소화물	17.0 g
대두과파인소화물	3.0 g
염화나트륨	5.0 g
인산일수소칼륨	2.5 g
포도당일수화물	2.5 g

이상을 달아 정제수에 녹여 1 L로 하고 멸균후의 pH가 7.3±0.2가 되도록 조정하고 121 °C에서 15분간 고압멸균 한다.

##### ㉕ 세트리미드한천배지(Cetrimide agar)

젤라틴제 펩톤	20.0 g
염화마그네슘	3.0 g

황산칼륨	10.0 g
세트리미드	0.3 g
글리세린	10.0 mL
한천	13.6 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹이고 글리세린을 넣어 1 L로 한다. 121 °C에서 15 분간 고압증기멸균하고 pH가 7.2 ± 0.2가 되도록 조정한다.

㉔ 엔에이씨한천배지(NAC agar)

웍톤	20.0 g
인산수소이칼륨	0.3 g
황산마그네슘	0.2 g
세트리미드	0.2 g
날리딕산	15 mg
한천	15.0 g
정제수	1000 mL

최종 pH는 7.4 ± 0.2이며 멸균하지 않고 가온하여 녹인다.

㉕ 플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F

(Pseudomonas agar F for detection of fluorescein)

카제인제 웍톤	10.0 g
육제 웍톤	10.0 g
인산일수소칼륨	1.5 g
황산마그네슘	1.5 g
글리세린	10.0 mL
한천	15.0 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹이고 글리세린을 넣어 1 L로 한다. 121 °C에서 15 분간 고압증기멸균하고 pH가 7.2 ± 0.2가 되도록 조정한다.

㉖ 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P

(Pseudomonas agar P for detection of pyocyanin)

젤라틴의 판크레아틴 소화물	20.0 g
염화마그네슘	3.0 g
황산칼륨	10.0 g
글리세린	10.0 mL

한천	15.0 g
정제수	1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹이고 글리세린을 넣어 1 L로 한다. 121 °C에서 15 분간 고압증기멸균하고 pH가 7.2 ± 0.2가 되도록 조정한다.

다. 황색포도상구균 시험

(1) 검액의 조제 및 조작: 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 카제인대두소화액배지를 사용하여 10 mL로 하고 30~35 °C에서 24~48시간 증균배양한다. 증균배양액을 보겔존슨한천배지 또는 베어드파카한천배지에 이식하여 30~35 °C에서 24시간 배양하여 균의 집락이 검정색이고 집락주위에 황색투명대가 형성되며 그람염색법에 따라 염색하여 검경한 결과 그람양성균으로 나타나면 응고효소시험을 실시한다. 결과가 양성으로 나타나면 황색포도상구균 양성으로 판정한다.

(2) 배지

㉞ 보겔존슨한천배지(Vogel-Johnson agar)

카제인의 판크레아틴 소화물	10.0 g
효모엑스	5.0 g
만니톨	10.0 g
인산일수소칼륨	5.0 g
염화리튬	5.0 g
글리신	10.0 g
페놀렛	25.0 mg
한천	16.0 g
정제수	950 mL

이상을 달아 1 분동안 가열하여 자주 흔들어 준다. 121 °C에서 15 분간 고압멸균하고 45~50 °C로 냉각시킨다. 멸균 후 pH가 7.2 ± 0.2가 되도록 조정하고 멸균한 1 %(w/v) 텔루린산칼륨 20 mL를 넣는다.

㉟ 베어드파카한천배지(Baird-Parker agar)

카제인제 펩톤	10.0 g
육엑스	5.0 g
효모엑스	1.0 g
염화리튬	5.0 g

글리신	12.0 g
피루브산나트륨	10.0 g
한천	20.0 g
정제수	950 mL

이상을 섞어 때때로 세계 흔들며 섞으면서 가열하고 1분간 끓인다. 121 °C에서 15 분간 고압멸균하고 45~50 °C로 냉각시킨다. 멸균한 다음의 pH가  $6.8 \pm 0.2$ 이 되도록 조정한다. 여기에 멸균한 아텔루산칼륨용액 1 % (w/v) 10mL와 난황유탁액 50mL를 넣고 가만히 섞은 다음 페트리접시에 붓는다. 난황유탁액은 난황 약 30%, 생리식염액 약 70%의 비율로 섞어 만든다.

#### 라. 배지의 적합성 및 시험방법의 타당성 시험

황색포도상구균 ATCC 6538P 또는 ATCC 6538와 녹농균 ATCC 9027은 카제인대두소화액체배지를, 대장균 ATCC 8739은 유당액체배지를 사용한다. 각 배양액을 완충식염펩톤수에 1mL당 약 1,000개의 균주가 함유되도록 희석하고 각 균액을 동량으로 섞은 다음 0.4mL(각 균수가 약 100개)를 황색포도상구균시험, 녹농균시험, 대장균시험의 접종균으로 한다. 검액의 유·무 하에서 각각 특정세균시험법에 따라 시험할 때 접종균 각각에 대하여 양성으로 나타나야 한다.

## IV. 참고문헌

1. 대한약전 8개정 일반시험법 미생물한도시험법, 2002
2. N.F. Estrin, J.M.Akersen, Cosmetic regulation in a competitive environment, New York, Marcel Dekker, pp 349-366, 2000
3. D.K. Brannan, Cosmetic microbiology, New York, CRC Press LLC, 1997
4. USFDA CFSAN Bacteriological analytical manual online, Microbiological methods for cosmetics, pp 1-17, 2001
5. Colipa recommendation for microbial tests-Recommended microbial limits and methods for finished products, pp 4-12
6. European Pharmacopoeia 5th Edition, Microbiological examination of non-sterile products

7. 화장품의 미생물시험법, 대한화장품협회
8. 일본화장품미생물한도시험법, 일본화장품공업연합회