

총대장균군-막여과법

2025

(Total Coliform-Membrane Filtration Method)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 물속에 존재하는 총대장균군을 분석할 때 검사결과의 정확성과 통일성을 제공하는 데 필요한 제반사항을 규정함을 목적으로 한다.

1.2 적용범위

이 시험방법은 하천수, 호소수, 지하수, 하·폐수 등에 적용할 수 있다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 총대장균군

그람음성·무아포성 간균으로서 락토오스를 분해하여 기체 또는 산을 생성하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성균 혹은 베타-갈락토오스 분해효소(β -galactosidase)의 활성이 있는 세균을 말한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 여과막

공경 (0.45 ± 0.02) μm , 지름 47 mm 이상 크기의 미생물 분석용 여과막으로서 막의 한 면에 격자가 그려진 멸균된 것을 사용한다.

3.2 여과장치

여과막을 끼워서 여과할 수 있게 하는 장치로서 무균조작할 수 있어야 하며, 멸균하여 사용한다.

3.3 멸균흡수패드

두꺼운 여과지나 스펀지 또는 유리섬유여과막으로서 지름 47 mm 크기의 원형패드를 멸균하여 사용한다.

3.4 배양기

배양온도를 (35 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

3.5 페트리접시

지름 50 mm, 높이 9 mm와 지름 60 mm, 높이 15 mm 또는 적절한 크기의 유리제품이나 1회용 플라스틱 제품으로서 멸균된 것을 사용한다.

3.6 피펫 또는 자동피펫

부피 1 mL ~ 25 mL인 눈금피펫이나 자동피펫(플라스틱 피펫 팁 포함)으로서 멸균된 것을 사용한다.

3.7 핀셋

끝이 뭉툭하고 넓으며 여과막을 집어 올릴 때 여과막을 손상하지 않는 형태의 것으로서 화염멸균할 수 있는 것을 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 배지

4.1.1 상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 에탄올(95 %) 20 mL를 포함한 정제수 1 L에 배지를 표 1의 막여과법 고체배지 조성대로 넣고 pH (7.2 ± 0.2)를 확인한 다음 완전히 녹을 때까지 저어주면서 끓인 후 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 식힌 다음 5 mL ~ 7 mL를 페트리접시에 부어 굳힌다. 이때 고압증기멸균하지 않는다.

4.1.2 조제된 배지는 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 냉장소에서 2주간 보관할 수 있다.

표 1. 막여과법 고체배지(m-Endo agar LES) 조성

성 분	조성
효모 추출물(yeast extract)	1.2 g
트립토오스(tryptose)	7.5 g
카지톤(casiton) 또는 트리프티케이스(trypticase) 또는 트립톤(tryptone)	3.7 g
락토오스(lactose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 분자량: 342.30)	9.4 g
티오펩톤(thiopeptone) 또는 티오톤(thiotone) 또는 펩톤 P(peptone P)	3.7 g
데옥시콜린산나트륨(sodium desoxycholate)	0.1 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량: 58.50)	3.7 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량: 174.18)	3.3 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량: 136.09)	1.0 g
라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate)	0.05 g
아황산나트륨(sodium sulfite, Na_2SO_3 , 분자량: 126.10)	1.6 g
염기성폭신(basic fuchsin)	0.8 g
한천[agar, $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9)_n$]	10.0 g ~ 15.0 g

4.1.3 막여과법 액체배지는, 고체배지와 마찬가지로 에탄올(95 %) 20 mL를 포함한 정제수 1 L에 표 2의 막여과법 액체배지 조성대로 넣고 pH (7.2 ± 0.2)를 확인한 다음 완전히 녹을 때까지 저어주면서 끓인 후 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 식혀서 사용한다. 이때 고압증기 멸균하지 않는다.

표 2. 막여과법 액체배지(m-Endo) 조성

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	1.5 g
트립토오스(tryptose) 또는 폴리펩톤(polypeptone)	10.0 g
카지톤(casiton) 또는 트리프티케이스(trypticase)	5.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량: 342.30)	12.5 g
티오펩톤(thiopeptone) 또는 티오톤(thiotone)	5.0 g
데옥시콜린산나트륨(sodium desoxycholate)	0.1 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량: 58.50)	5.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량: 174.18)	4.375 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량: 136.09)	1.375 g
라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate)	0.05 g
아황산나트륨(sodium sulfite, Na_2SO_3 , 분자량: 126.10)	2.1 g
염기성 폭신(basic fuchsin)	1.05 g

4.1.4 조제된 액체배지는 2 °C ~ 8 °C 냉장소에서 96시간 보관할 수 있다.

4.1.5 고체배지로 사용할 때는 표 2의 조성에서 한천(agar) 15.0 g을 추가로 넣어준 뒤 4.1.1의 방법대로 제조하여 사용할 수 있다.

4.2 희석액

4.2.1 인산완충희석액

인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량: 136.09) 34 g을 500 mL 정제수에 녹인 후 수산화나트륨용액(0.5 M)으로 실온에서 pH (7.2 ± 0.2)를 맞춘 다음 정제수를 넣어 1 L가 되도록 만들어 이를 보존용 원액으로 하고, 염화마그네슘·6수화물(magnesium chloride, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 분자량: 203.30) 81.1 g을 정제수 1 L에 녹여 이를 염화마그네슘용액으로 한다. 인산완충희석액은 보존용 원액 1.25 mL와 염화마그네슘용액 5.0 mL를 넣고, 정제수로 최종 1 L가 되도록 만든 후 121 °C에서 15분간 고압증기멸균하여 사용한다.

4.2.2 펩톤희석액

정제수에 10 % 펩톤(peptone)용액을 넣어 펩톤의 최종 농도가 0.1 %가 되도록 희석하고, 실온에서 pH (6.8 ± 0.2)를 확인한 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균하여 사용한다.

4.2.3 멸균생리식염수

염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량: 58.44) 8.5 g을 증류수에 녹여 1 L가 되도록 만들고, 나선식 마개가 있는 희석병이나 시험관에 나누어 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 04130.1 시료의 채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 대조군 시험

6.1.1 이 시험방법을 처음 실시하거나 사용하던 배지, 시약 등이 바뀔 때마다 양성대조군과 음성대조군 시험을 동시에 실시해야 한다. 양성대조군 시험결과는 양성, 음성대조군 시험결과가 음성으로 나왔을 때만 유효한 결과값으로 판정한다.

6.1.2 양성대조군은 *Escherichia coli* 표준균주를 사용하고, 음성대조군은 멸균 희석액을 사용한다.

7.0 분석절차

7.1 멸균된 핀셋으로 여과막을 눈금이 위로 가게 하여 여과장치의 지지대 위에 올려놓은 후 막여과장치의 깔때기를 조심스럽게 부착한다.

7.2 페트리접시에 세균 집락을 20개 ~ 80개를 형성하도록 시료(표 3 참조)를 여과관 상부에 주입하면서 흡입여과하고 멸균수 20 mL ~ 30 mL로 3회 씻어준다.

[주 1] 여과해야 할 예상 시료량이 10 mL보다 적으면 멸균된 희석액으로 희석하여 여과해야 한다.

[주 2] 총대장균군 수를 예측할 수 없을 때는 여과량을 달리하여 여러 개 시료를 분석하고, 한 여과 표면 위 모든 형태의 집락 수가 200개 이상 집락이 형성되지 않도록 해야 한다.

7.3 막여과법 고체배지를 사용할 때는 여과한 여과막을 눈금이 위로 가게 하여 페트리접시의 배지 위에 기포가 생기지 않도록 올려놓은 다음 페트리접시를 거꾸로 놓고 $(35 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양한다. 막여과법 액체배지를 사용할 때는 약 2.0 mL 액체배지로 적신 멸균한 흡수패드를 페트리접시 위에 놓고 그 위에 여과한 여과막을 기포가 생기지 않도록 올려놓은 다음 $(35 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양한다.

[주 3] 배양 시 배지가 마르지 않도록 습도를 유지한다.

7.4 배양 후 금속성 광택을 띠는 적색이나 진한 적색 계통의 집락을 계수하며, 집락 수가 20개 ~ 80개 범위인 것을 선정하여 다음 식에 따라 계산한다.

$$\text{총대장균군 수} / 100 \text{ mL} = C / V \times 100 \quad (\text{식 1})$$

여기서 C = 생성된 집락 수

V = 여과한 시료량(mL)

[주 4] 필요시, 집락계수기(colony counter) 또는 자동화된 집락계수기(automated colony counter)를 사용할 수 있다.

7.5 배지 표면에 총대장균군 이외의 다른 세균이 너무 많이 자라면 총대장균군 수와 함께 이 같은 내용을 비교에 기록하고 다시 같은 지점의 시료를 채취하여 검사한다.

[주 5] 재검사 시에는 시료 여과량을 줄이고 여과막의 수를 늘려 다른 세균에 의한 간섭현상을 줄인다.

7.6 정확성을 기하기 위하여 실험할 때마다 1개 이상 음성대조군 시험을 상기 방법과 동일한 조건에서 같이 실시해야 하며, 이때 음성대조군 여과막에서는 전형적인 총대장균군의 집락이 없어야 한다.

8.0 결과보고

8.1 ‘총대장균군 수 / 100 mL’로 표기하며, 반올림하여 유효숫자 2자리로 표기한다. 결과값의 유효숫자가 2 미만이 될 경우에는 1자리로 표기한다. 다만 결과값이 소수점을 포함하면 반올림하여 정수로 표기한다.

8.2 집락들이 서로 융합된 경우에는 ‘CG(confluent growth)’로, 집락 수가 200 이상으로 계수할 수 없을 때는 ‘TNTC(too numerous to count)’로 표기하고 시료를 희석하거나 적게 취하여 다시 실험한다.

8.3 수질이 양호하면 검출되는 총대장균군 수가 일반적으로 낮으므로 모든 집락을 다 계수하여 표기한다.

9.0 참고자료

9.1 EPA Method 9132, “Total coliform: Membrane filter technique”, (1986)

9.2 Standard Method 9222, “Membrane filter technique for members of the coliform group”, 23rd edition, (2017)

9.3 HPA National standard method, W2, “Enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* by membrane filtration”, HPA, (2007)

9.4 일본 상수시험방법 8.2.3, “총대장균군 MF 엔도배지법”, (2001)

9.5 먹는물공정시험기준 ES 05703.2, “총대장균군-막여과법”, 환경부, (2020)

9.6 KS I ISO 9308, “수질 - *Escherichia coli*와 대장균군의 검출 및 계수”, 환경부, (2014)

10.0 부록

표 3. 시료 종류별 예상 시료량

시료의 종류	여과해야 할 예상 시료량(mL)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
호소수, 저수지수	○	○	○					
상수원수			○	○	○			
위락용수			○	○	○			
하천수				○	○	○	○	
염소 소독한 하수				○	○	○		
하수 원수					○	○	○	○