

총대장균군-시험관법

2024

(Total Coliform-Multiple Tube Fermentation Method)

1.0 개요

1.1 목적

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

1.2 적용범위

이 시험기준은 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 피펫 또는 자동피펫

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

3.2 마개 달린 유리시험관

소시험관(안지름 16 mm, 높이 150 mm)과 중시험관(안지름 18 mm, 높이 180 mm)으로 플라스틱이나 금속 등과 같은 재질의 마개를 적용할 수 있고, 고압증기멸균을 할 수 있어야 한다.

3.3 다람(Durham)시험관

소시험관과 중시험관용 다람시험관(안지름 9 mm, 높이 30 mm)을 사용한다. 고압증기 멸균할 수 있어야 하며 기체포집을 위해 거꾸로 집어넣는다.

3.4 접종루프(Inoculation loop)

루프의 안지름이 약 3 mm인 접종루프를 사용한다.

3.5 배양기

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

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시험관법 추정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 배지를 표 1 또는 표 2의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH를 (6.9 ± 0.2) 가 되도록 조정한다. 다음 배지를 다람시험관이 들어 있는 시험관에 10 mL씩 나누어 넣고 121°C 에서 15 분간 고압증기멸균한다.

[주 1] 시료를 10 mL로 할 때는 배지의 농도를 2배로 하여 사용해야 한다.

[주 2] 멸균 후 다람시험관에 기포가 있으면 배지를 사용할 수 없다.

표 1. 시험관법 추정시험용 배지(lactose broth) 조성

성 분	조 성
소고기 추출물(beef extract)	3.0 g
펩톤(peptone)	5.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량: 342.30)	5.0 g

표 2. 시험관법 추정시험용 배지(lauryl tryptose broth) 조성

성 분	조 성
황산라우린산나트륨(sodium lauryl sulfate, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, 분자량: 288.00)	0.1 g
트립토오스(tryptose)	20.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량: 342.30)	5.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량: 174.18)	2.75 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량: 136.09)	2.75 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량: 58.50)	5.0 g

4.2 시험관법 확정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 배지를 표 3의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH를 (7.2 ± 0.2)가 되도록 조정한 다음 다람 시험관이 들어 있는 시험관에 10 mL씩 나누어 넣고, 121 °C에서 15분간 고압증기멸균 한다.

[주 3] 멸균 후 다람시험관에 기포가 있으면 배지를 사용할 수 없다.

표 3. 시험관법 확정시험용 배지(BGLB) 조성

성 분	조 성
소담즙(oxgall)	20.0 g
펩톤(peptone)	10.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량: 342.30)	10.0 g
브릴리언트 그린(brilliantgreen, $C_{27}H_{34}N_2O_4S$, 분자량: 484.00)	0.0133 g

4.3 희석액

ES 04701.1 총대장균군-막여과법의 4.2 희석액에 따른다.

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 시험기준을 처음 실시하거나 사용하던 배지, 시약 등의 제조사가 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 추정시험

7.1.1 시료를 10, 1, 0.1 mL 등과 같이 10배 연속 희석법(10-fold serial dilution)에 따라 희석하여 사용하며, 시료의 오염 정도에 따라 희석배수를 다르게 할 수 있다. 각 희석 단계마다 시험관을 5개 사용하며, 시료의 희석은 시료에 최대량을 이식한 5개 시험관에서 전부 또는 대다수가 양성이고, 최소량을 이식한 5개 시험관에서 전부 또는 대다수가 음성이 되도록 희석해야 한다.

7.1.2 시료 또는 희석된 시료를 다람시험관이 들어 있는 추정시험용 배지(락토오스 또는 라우릴트립토오스 배지)에 10, 1, 0.1 mL씩 접종하여 $(35 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양하고 각 시험관을 흔들어 확인한 후 기포가 형성되지 않았으면 총 (48 ± 3) 시간까지 연장하여 배양한다. 기포가 발생하지 않은 시험관은 총대장균군 음성으로 판정하고, 양성시험관은 기포발생을 확인한 즉시 확정시험을 수행한다.

7.2 확정시험

추정시험 양성 시험관의 시료를 확정시험용 배지(BGLB 배지)가 들어 있는 시험관에 접종루프를 사용하여 무균적으로 이식하고 $(35 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서, (48 ± 3) 시간 배양한다. 이때 기체가 발생한 시료는 총대장균군 양성으로 판정하고, 기체가 발생하지 않은 시료는 총대장균군 음성으로 판정한다. 확정시험까지 양성 시험관 수를 최적확수표에서 찾아 총대장균군 수를 결정한다. 최적확수표는 시료량 10 mL, 1 mL, 0.1 mL 희석 단계의 최적확수가 최적확수 / 100 mL로 표시되어 있어, 그 이상 희석한 시료는 희석배수를 곱해야 한다.

8.0 결과보고

총대장균군 시험관법 시험결과는 확률적인 수치인 최적확수로 나타나지만, 결과는 ‘총대장균군 수 / 100 mL’로 표기하며, 반올림하여 유효숫자 2자리로 나타낸다. 결과값의 유효숫자가 2미만이 될 경우에는 1자리로 표기한다. 다만, 결과값이 소수점을 포함하면 반올림하여 정수로 표기한다. 또 양성 시험관 수가 0-0-0이면 ‘불검출’로 표기하거나 ‘< 2’로 표기할 수 있다.

9.0 참고자료

9.1 EPA Method 9131, “Total coliform: Multiple tube fermentation technique”, (1986)

9.2 Standard Method 9221, “Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group”, 23rd edition, (2017)

9.3 HPA National Standard Method, D5, “Enumeration of coliforms and presumptive *Escherichia coli* by the most probable number(MPN) technique”, HPA, (2005)

9.4 일본 상수시험방법 8.2.1.2, “총대장균군-유당부이온 브릴리언트 그린 유당담즙 부이온 배지법”, (2001)

9.5 먹는물공정시험기준 ES 05703.1, “총대장균군-시험관법”, 환경부, (2020)

9.6 KS J ISO 7251, “식품 및 동물사료의 미생물학-추정 대장균 수의 검출 및 계산을 위한 평판법-최확수법”, 농림축산식품부, (2012)

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

9.8 식품 공전, “제8 일반시험법 4장 미생물시험법”, 식품의약품안전처, (2022)

10.0 부록

표 4 총대장균군 시험관법 최적확수표

양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL	양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL	양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL	양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL	양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL	양성시험관수 10, 1, 0.1	MPN/ 100mL
0 0 0	<1.8	1 0 0	2	2 0 0	4.5	3 0 0	7.8	4 0 0	13	5 0 0	23
0 0 1	1.8	1 0 1	4	2 0 1	6.8	3 0 1	11	4 0 1	17	5 0 1	31
0 0 2	3.6	1 0 2	6	2 0 2	9.1	3 0 2	13	4 0 2	21	5 0 2	43
0 0 3	5.4	1 0 3	8	2 0 3	12	3 0 3	16	4 0 3	25	5 0 3	58
0 0 4	7.2	1 0 4	10	2 0 4	14	3 0 4	20	4 0 4	30	5 0 4	76
0 0 5	9	1 0 5	12	2 0 5	16	3 0 5	23	4 0 5	36	5 0 5	95
0 1 0	1.8	1 1 0	4	2 1 0	6.8	3 1 0	11	4 1 0	17	5 1 0	33
0 1 1	3.6	1 1 1	6.1	2 1 1	9.2	3 1 1	14	4 1 1	21	5 1 1	46
0 1 2	5.5	1 1 2	8.1	2 1 2	12	3 1 2	17	4 1 2	26	5 1 2	63
0 1 3	7.3	1 1 3	10	2 1 3	14	3 1 3	20	4 1 3	31	5 1 3	84
0 1 4	9.1	1 1 4	12	2 1 4	17	3 1 4	23	4 1 4	36	5 1 4	110
0 1 5	11	1 1 5	14	2 1 5	19	3 1 5	27	4 1 5	42	5 1 5	130
0 2 0	3.7	1 2 0	6.1	2 2 0	9.3	3 2 0	14	4 2 0	22	5 2 0	49
0 2 1	5.5	1 2 1	8.2	2 2 1	12	3 2 1	17	4 2 1	26	5 2 1	70
0 2 2	7.4	1 2 2	10	2 2 2	14	3 2 2	20	4 2 2	32	5 2 2	94
0 2 3	9.2	1 2 3	12	2 2 3	17	3 2 3	24	4 2 3	38	5 2 3	120
0 2 4	11	1 2 4	15	2 2 4	19	3 2 4	27	4 2 4	44	5 2 4	150
0 2 5	13	1 2 5	17	2 2 5	22	3 2 5	31	4 2 5	50	5 2 5	180
0 3 0	5.6	1 3 0	8.3	2 3 0	12	3 3 0	17	4 3 0	27	5 3 0	79
0 3 1	7.4	1 3 1	10	2 3 1	14	3 3 1	21	4 3 1	33	5 3 1	110
0 3 2	9.3	1 3 2	13	2 3 2	17	3 3 2	24	4 3 2	39	5 3 2	140
0 3 3	11	1 3 3	15	2 3 3	20	3 3 3	28	4 3 3	45	5 3 3	180
0 3 4	13	1 3 4	17	2 3 4	22	3 3 4	31	4 3 4	52	5 3 4	210
0 3 5	15	1 3 5	19	2 3 5	25	3 3 5	35	4 3 5	59	5 3 5	250
0 4 0	7.5	1 4 0	11	2 4 0	15	3 4 0	21	4 4 0	34	5 4 0	130
0 4 1	9.4	1 4 1	13	2 4 1	17	3 4 1	24	4 4 1	40	5 4 1	170
0 4 2	11	1 4 2	15	2 4 2	20	3 4 2	28	4 4 2	47	5 4 2	220
0 4 3	13	1 4 3	17	2 4 3	23	3 4 3	32	4 4 3	54	5 4 3	280
0 4 4	15	1 4 4	19	2 4 4	25	3 4 4	36	4 4 4	62	5 4 4	350
0 4 5	17	1 4 5	22	2 4 5	28	3 4 5	40	4 4 5	69	5 4 5	430
0 5 0	9.5	1 5 0	13	2 5 0	17	3 5 0	25	4 5 0	41	5 5 0	240
0 5 1	11	1 5 1	15	2 5 1	20	3 5 1	29	4 5 1	48	5 5 1	350
0 5 2	13	1 5 2	17	2 5 2	23	3 5 2	32	4 5 2	56	5 5 2	540
0 5 3	15	1 5 3	19	2 5 3	26	3 5 3	37	4 5 3	64	5 5 3	920
0 5 4	17	1 5 4	22	2 5 4	29	3 5 4	41	4 5 4	72	5 5 4	1,600
0 5 5	19	1 5 5	24	2 5 5	32	3 5 5	45	4 5 5	81	5 5 5	>1,600