

분원성대장균군-막여과법
(Fecal Coliform-Membrane Filtration Method)

2025

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 물속에 존재하는 분원성대장균군을 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 분원성대장균군

온혈동물의 배설물에서 발견되는 그람음성·무아포성 간균으로서 44.5 °C에서 락토오스를 분해하여 가스 또는 산을 생성하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성균을 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 또는 항온수조

배양온도를 (44.5 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

3.5 펌프리젝시

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 뾰족하고 넓으며 여과막을 집어 올릴 때 여과막을 손상하지 않는 형태로서 화염 멸균할 수 있는 것을 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 배지를 표 1의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 수산화나트륨(0.2 M)에 용해된 1 % 로졸린산(rosolic acid) 용액 10 mL를 첨가한 다음, pH를 (7.4 ± 0.2)로 맞춘다. 이때 고압증기멸균하지 않는다. 고체배지(m-FC agar)는 2주간, 액체배지(m-FC)는 96시간까지 보관할 수 있다.

[주 1] 단, 다른 세균에 의한 간섭이 없다면 m-FC 배지는 1 % 로졸린산(rosolic acid) 첨가 없이 사용할 수 있다.

표 1. 막여과법 고체배지(m-FC agar) 또는 막여과법 액체배지(m-FC) 조성

성 분	조 성
트립토오스(tryptose)	10.0 g
프로테우스 펩톤 또는 폴리펩톤(proteose peptone or polypeptone)	5.0 g
효모추출물(yeast extract)	3.0 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량: 58.50)	5.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량: 342.30)	12.5 g
담즙염(bile salts or bile salts mixture)	1.5 g
아닐린블루(aniline blue, $C_{32}H_{25}N_3O_9S_3Na_2$, 분자량: 843.00)	0.1 g
한천[agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$] (액체배지에서는 첨가하지 않음)	15.0 g

4.2 희석액

ES 04701.1 총대장균균-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 시험방법을 처음 실시하거나 사용하던 배지, 시약 등의 제조사가 바뀔 때마다 양성대조군과 음성대조군 시험을 동시에 실시해야 하며, 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 집락 20개 ~ 60개를 형성하도록 시료(표 2 참조)를 여과관 상부에 주입하면서 흡입여과하고 멸균수 20 mL ~ 30 mL로 씻어준다.

[주 2] 여과해야 할 예상 시료량이 10 mL보다 적으면 멸균된 희석액으로 희석하여 여과해야 한다.

[주 3] 분원성대장균군 수를 예측할 수 없을 때는 여과량을 달리하여 여러 개 시료를 분석하고, 한 여과막 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 페트리 접시의 배지 위에 기포가 생기지 않도록 올려놓은 다음 페트리접시를 거꾸로 놓고 $(44.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 동안 배지가 마르지 않는 조건을 유지하면서 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 $(44.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 동안 배지가 마르지 않는 조건을 유지하면서 배양한다.

[주 4] 항온수조에서 배양 시 페트리접시를 방수성 플라스틱 백에 넣은 후 항온수조에 잠기도록 하여 배양한다.

7.4 배양 후 여러 가지 색조를 띠는 청색 집락을 계수하며, 집락 수가 20개 ~ 60개 범위인 것을 선정하여 다음의 식에 따라 계산한다.

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

여기서 C = 생성된 집락 수

V = 여과한 시료량(mL)

[주 5] 필요시, 집락계수기(colony counter) 또는 자동화된 집락계수기(automated colony counter)를 사용할 수 있다.

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

[주 6] 재검사 시에는 시료 여과량을 줄이고 여과막의 수를 늘려 다른 세균에 의한 간섭현상을 줄인다.

8.0 결과보고

8.1 ‘분원성대장균균 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 분원성대장균균 수가 일반적으로 낮으므로 모든 집락을 계수하여 표기한다.

9.0 참고자료

9.1 Standard Method 9222, “Membrane filter technique for members of the coliform

group”, 23rd edition, (2017)

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

9.3 일본 상수시험방법 8.2.3, “분변성대장균군 M-FC 한천배지법”, (2001)

9.4 먹는물공정시험기준 ES 05705.2, “대장균-막여과법”, 환경부, (2010)

9.5 KS I ISO 9308-1, “수질-대장균체, 내열성 대장균체 및 *E.coli*로 추정되는 균체의 검출 및 계산-제1부: 막여과법”, 한국표준협회, (2005)

9.6 KS I ISO 5667-2, “수질-시료채취-제2부: 시료 채취 방법에 관한 지침”, 한국표준협회, (2006)

9.7 KS I ISO 5667-3, “수질-시료채취-제3부: 시료의 보존 및 취급에 대한 지침”, 한국표준협회, (2007)

10.0 부록

표 2. 시료 종류별 예상 시료량

시료의 종류	여과해야 할 예상시료량(○, mL)						
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001
호소수, 저수지수	○	○	○				
상수원수		○	○	○			
위락용수		○	○	○			
하수처리장 방류수			○	○	○		
하천수				○	○	○	
생활하수					○	○	○
축산폐수					○	○	○