

대장균-막여과법

2025

(*Escherichia coli*-Membrane Filtration Method)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 물속에 존재하는 대장균을 분석할 때 검사결과의 정확성과 통일성을 제공하는 데 필요한 제반 사항을 규정함을 목적으로 한다.

1.2 적용범위

이 시험방법은 하천수, 호소수, 지하수, 물놀이형 수경시설 등에 적용할 수 있다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 대장균

그람음성·무아포성 간균으로서 베타-글루쿠론산 분해효소(β -glucuronidase)의 활성이 있는 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

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 뾰족하고 넓으며 여과막을 집어 올릴 때 여과막을 손상하지 않는 형태인 것으로서 화염멸균할 수 있는 것을 사용한다.

3.8 자외선 램프

365 nm ~ 366 nm(6와트) 범위에서 파장 조사할 수 있어야 한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 확정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 다음 방법을 따른다. 정제수 1 L에 표 1의 막여과법 확정시험용 배지 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH (6.8 ± 0.2)가 되도록 조정한다. 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다. 페트리접시에 있는 조제된 배지는 플라스틱백이나 단단히 밀폐된 용기 안에 넣어 냉장 상태로 보관하고 2주 내에 사용해야 한다. 사용 전에 냉장 보관된 배지는 실온에서 12시간 배양하고 미생물이 생장한 평판배지는 버린다.

표 1. 막여과법 확정시험용 배지(nutrient agar-MUG) 조성

성 분	조 성
소고기 추출물(beef extract)	3.0 g
펩톤(peptone)	5.0 g
한천[agar, (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n]	15.0 g
MUG(4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)	0.1 g

4.2 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 시험방법을 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

ES 04701.1 총대장균군-막여과법에 따르며 추정시험 양성 집락을 확정시험을 수행한다.

7.2 확정시험

7.2.1 총대장균군 양성인 여과막에서 금속성 광택을 띠는 각각의 집락을 표시하고 여과막을 막여과법 확정시험용 배지의 표면으로 옮겨 $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 4시간 배양한다.

7.2.2 배양 후 암실에서 자외선램프(365 nm ~ 366 nm, 6와트)를 사용하여 형광 유무를 관찰한다. 광택 집락 주위의 무리에서 형광을 나타내는 집락을 계수하며, 다음 식으로 계산한다.

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

여기서 C = 생성된 집락 수

V = 여과한 시료량(mL)

[주 1] 필요시, 집락계수기(colony counter) 또는 자동화된 집락계수기(automated colony counter)를 사용할 수 있다.

7.3 배지 표면에 대장균 이외에 다른 세균이 너무 많이 자라면 대장균 수와 함께 이 같은 내용을 비고에 기록하고 다시 같은 지점의 시료를 채취하여 검사한다.

[주 2] 재검사 시에는 시료의 여과량을 줄이고, 여과막의 수를 늘려 다른 세균에 의한 간섭현상을 줄인다.

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

8.0 결과보고

8.1 ‘대장균 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 융합되면 ‘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 양호할 때 검출되는 대장균 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 2. 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					○	○	○	○