

## 대장균-시험관법

2025

(*Escherichia coli*-Multiple Tube Fermentation 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( $\beta$ -glucuronidase)의 활성이 있는 모든 호기성 또는 통성 혐기성균을 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 또는 항온수조

배양 온도를  $(44.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

### 3.6 자외선 램프

365 nm ~ 366 nm(6 와트) 범위로 파장 조사를 할 수 있어야 한다.

## 4.0 시약 및 표준용액

### 4.1 확정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 배지를 표 1의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH를  $(6.9 \pm 0.2)$ 가 되도록 조정한다. 다음 다람 시험관이 들어 있는 시험관에 10 mL씩 나누어 넣고,  $121^\circ\text{C}$ 에서 15분간 고압증기 멸

균한다.

[주 1] 멸균 후 다람시험관에 기포가 있으면 배지를 사용할 수 없다.

표 1. 시험관법 확정시험용 배지(EC-MUG) 조성

| 성 분                                                                              | 조 성    |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 트립톤(tryptone)                                                                    | 20.0 g |
| 락토오스(lactose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> , 분자량 : 342.30)    | 5.0 g  |
| 바일솔트 3번(bile salts No.3)                                                         | 1.5 g  |
| 인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 분자량 : 174.18)   | 4.0 g  |
| 인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 분자량 : 136.09) | 1.5 g  |
| 염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.44)                                        | 5.0 g  |
| MUG(4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)                                        | 0.05 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 04701.2 총대장균군-시험관법에 따르며 추정시험 양성 시험관은 확정시험을 수행한다.

### 7.2 확정시험

추정시험 양성 시험관의 시료를 확정시험용 배지(EC-MUG 배지)가 들어 있는 시험관에서 접종루프를 사용하여 무균적으로 이식하고  $(44.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 에서  $(24 \pm 2)$ 시간 배양한다. 배양 후 시험관에 자외선 램프(365 nm ~ 366 nm, 6와트)를 조사하여 MUG에 따른 형광을 나타낸 시료를 양성으로 판정하고 형광을 나타내지 않는 시료는 음성으로 판정한다. 확정시험까지의 양성 시험관 수를 최적확수표에서 찾아 대장균 수를 결정한다. 최적확수표는 시료량이 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

대장균 시험관법 시험결과는 확률적 수치인 최적확수로 나타나지만, 결과는 ‘대장균 수 / 100 mL’로 표기하며, 반올림하여 유효숫자 2 자리로 나타낸다. 결과값의 유효숫자가 2 미만이 될 경우에는 1 자리로 표기한다. 다만, 결과값이 소수점을 포함하면 반올림하여 정수로 표기한다. 또한 양성 시험관 수가 0-0-0 이면 ‘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”, 23<sup>rd</sup> 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 2. 대장균 시험관법 최적확수표

| 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>100mL | 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>100mL | 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>100mL | 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>100mL | 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>100mL | 양성시험관수<br>10, 1, 0.1 | MPN/<br>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        |