

## 중온일반세균-평판집락법

2025

(Total Colony Counts in 35 °C-Pour Plate Method)

### 1.0 개요

#### 1.1 목적

이 시험방법은 먹는물, 샘물·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수, 먹는물공동시설 등에 존재하는 중온일반세균을 분석할 때 검사결과의 정확성과 통일성을 제공하는 데 필요한 제반사항을 규정함을 목적으로 한다.

#### 1.2 적용범위

이 시험방법은 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 제2조의 규정에 따른 먹는물, 샘물·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수, 먹는물공동시설 등의 수질 검사에 적용한다.

#### 1.3 “내용 없음”

### 2.0 용어정의

#### 2.1 중온일반세균

(35.0 ± 0.5) °C에서 표준한천배지 또는 트립톤 포도당 추출물 한천배지에 집락을 형성하는 모든 세균을 말한다.

### 3.0 분석기기 및 기구

### 3.1 피펫 또는 자동피펫

부피 1 mL ~ 5 mL의 메스피펫이나 자동피펫(플라스틱팁 포함)으로 멸균된 것을 사용한다.

### 3.2 페트리접시

지름 약 9 cm, 높이 1.5 cm의 유리제품( $65\text{ cm}^2$ ) 또는 1회용 플라스틱( $57\text{ cm}^2$ )으로 멸균된 것을 사용한다.

### 3.3 항온수조

수온을  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  ~  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

### 3.4 배양기

배양온도를  $(35.0 \pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

## 4.0 시약 및 표준용액

### 4.1 시약

#### 4.1.1 중온일반세균 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 한천을 제외한 표 1 또는 표 2의 조성대로 넣어 녹인 후 pH가  $(7.0 \pm 0.2)$ 가 되도록 조정한다. 다음 한천을 넣어 가열용해하고  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 고압증기멸균한다.

표 1. 표준한천배지(Plate count agar) 조성

| 성 분                                          | 조 성    |
|----------------------------------------------|--------|
| 트립톤(tryptone)                                | 5.0 g  |
| 효모 추출물(yeast extract)                        | 2.5 g  |
| 포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$ , 분자량 : 180.16) | 1.0 g  |
| 한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$ )             | 15.0 g |

표 2. 트립톤 포도당 추출물 한천배지(Tryptone dextrose extract agar) 조성

| 성 분                                          | 조 성    |
|----------------------------------------------|--------|
| 소고기 추출물(beef extract)                        | 3.0 g  |
| 트립톤(tryptone)                                | 5.0 g  |
| 포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$ , 분자량 : 180.16) | 1.0 g  |
| 한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$ )             | 15.0 g |

#### 4.1.2 희석액(diluent)

##### 4.1.2.1 인산완충희석액(phosphate buffered diluent)

인산이수소칼륨(monopotassium phosphate,  $KH_2PO_4$ , 분자량 : 136.09) 34 g을 정제수 500 mL에 녹인 후 0.5 M 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH, 분자량: 40.00) 용액으로 실온에서 pH를  $(7.2 \pm 0.2)$ 로 조정한다. 다음 정제수를 넣어 1 L가 되도록 만든 뒤 이를 보존용 원액으로 한다. 염화마그네슘 육수화물(magnesium chloride,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 분자량 : 203.30)(0.25 mol/L) 81.1 g을 정제수 1 L에 녹여 염화마그네슘용액으로 한다. 인산완충희석액은 보존용 원액 1.25 mL와 염화마그네슘용액 5.0 mL를 넣은 다음 정제수로 최종 1 L가 되도록 만든 후  $(99 \pm 2)$  mL 또는  $(9.0 \pm 0.2)$  mL가 되도록 나선식 마개가 있는 희석병이나 시험관에 나누어 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

##### 4.1.2.2 펩톤희석액(peptone diluent)

정제수에 10 % 펩톤(peptone) 용액을 넣어 펩톤의 최종농도가 0.1 %가 되도록 희석하고, 실온에서 pH가  $(6.8 \pm 0.2)$ 가 되도록 조정한다. 다음  $(99 \pm 2)$  mL 또는  $(9.0 \pm 0.2)$  mL가

되도록 나선식 마개가 있는 희석병이나 시험관에 나누어 121 °C에서 15분간 고압증기 멸균한다.

#### 4.1.2.3 멸균생리식염수

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

#### 4.2 “내용 없음”

### 5.0 시료채취 및 관리

5.1 멸균된 시료용기를 사용하여 무균적으로 시료를 채취하고 즉시 시험해야 한다. 즉시 시험할 수 없으면 빛이 차단된 1 °C ~ 5 °C 냉장 보관 상태에서 24시간 이내에 시험해야 한다.

5.2 잔류염소가 존재하는 경우, 잔류염소 제거를 위한 시약은 잔류염소 4 mg/L 이하인 시료 1 L 기준으로 멸균한 티오황산나트륨 용액 (80 g/L) 1 mL에 준하는 양을 첨가하며, 잔류염소의 농도에 따라 첨가량을 조절한다.

5.3 수도꼭지에서 시료를 채취할 때는 수도꼭지를 틀어 수돗물을 2 분 ~ 3분간 흘려버린 후 시료를 채취한다. 수도꼭지에 연결된 부착물은 제거하고, 깨끗한 형짚이나 휴지로 이물질들을 닦아낸 후 시료를 채취한다. 필요하다면 가스버너 등으로 수도꼭지 입구를 충분히 소독한다.

5.4 먹는샘물, 먹는해양심층수, 먹는염지하수 제품수는 병의 마개를 열지 않은 상태의 제품을 말하며, 병의 마개가 열린 것은 시료로 사용할 수 없다. 병에 넣은 후 12시간 안에 4 °C를 유지한 상태에서 검사한다.

#### 6.0 “내용 없음”

## 7.0 분석절차

### 7.1 “내용 없음”

### 7.2 시험방법

**7.2.1** 4.1.2에 명시한 희석액을 사용하여 희석하고 각 단계의 희석액을 1 mL씩 멸균된 페트리접시 2매에 접종한다. 생성된 평판의 집락수가 30 개 ~ 300개일 때 유효한 결과로 계수한다.

**7.2.2** 미리 멸균해서 44 °C ~ 46 °C로 유지한 중온일반세균 배지 10 mL ~ 12 mL씩을 각각 시료가 들어 있는 페트리접시에 무균 상태로 나누어 넣고 배지와 시료가 잘 혼합되도록 좌우로 회전시킨다.

**7.2.3** 배지가 응고되면 (35 ± 0.5) °C에서 먹는샘물, 먹는해양심층수, 먹는염지하수, 샘물과 염지하수는 (24 ± 2)시간, 그 외 수돗물을 포함한 먹는물은 (48 ± 2)시간 배양하여 형성된 집락수를 계산한다.

**7.2.4** 음성대조군 시험으로 멸균된 희석액을 상기 방법과 동일하게 실험하여 음성대조군으로 하며, 음성대조군 시험결과는 음성으로 나왔을 때만 유효한 결과값으로 판정한다.

**7.2.5** 시료의 희석 조작부터 평판용 배지를 페트리접시에 나누어 넣을 때까지 조작시간은 20분을 초과하지 않아야 한다.

**7.2.6** 계수할 때는 확산집락이 없고 평판당 30개 ~ 300개의 집락을 형성한 평판을 선택하여 집락을 계수하는 것을 원칙으로 하며, 평판마다 집락이 300개 이상 형성되었을 때는 가장 대표적인 평판을 택하여 밀집평판측정법에 따라 집락수를 계산한다. 계산방법은 안지름이 9 cm인 유리 페트리접시를 사용한 경우에는 1 cm<sup>2</sup> 내의 집락수를 13군데에서 계수하여 평균한 집락수에 65를 곱하고, 1회용 플라스틱 페트리접시를 사용한 경우에는 57을 곱한다. 평판마다 30개 이하의 집락이 형성되었을 때는 원액을 접종한 평판의 집락을 계수하여 평균값을 기재한다. 집락이 30개 ~ 300개인 평판이 없고 300개 이상인 평판이 1개 이상 존재하면 300개에 가장 가까운 평판의 집락을 계수한다.

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

## 8.0 결과보고

### 8.1 결과 표기

해당 희석배수에 사용된 각 평판 내의 집락수를 측정하여 합한 다음 사용한 평판수로 나누어 평판당 평균집락수를 구한다. 여기에 해당 희석배수를 곱한 수치를 중온일반세균수(CFU)로 하며, ‘중온일반세균수(CFU)/mL’로 표기한다. 중온일반세균수가 100 이상일 때는 높은 단위 숫자로부터 3단계 이하는 반올림하여 유효숫자를 2단계로 끊어 그 이하를 0으로 한 수치를 mL 중 중온일반세균수로 하고, 중온일반세균수가 100 미만일 때 소수점을 포함하면 반올림하여 정수로 표기한다.

## 9.0 참고자료

9.1 Standard Method 9215, 23<sup>rd</sup> edition, Heterotrophic plate count(2017).

9.2 HPA National Standard Method, W4, Colony count by the pour plate method(2004).

9.3 일본 상수시험방법 8.1.1.2, 일반세균-표준한천배지법(2001).

## 10.0 “내용 없음”