

총대장균군-막여과법

2024

(Total Coliform-Membrane Filtration Method)

1.0 개요

1.1 목적

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

1.2 적용범위

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

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 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 유리섬유여과막으로 지름 47 mm 크기의 원형패드를 멸균하여 사용한다.

3.4 필터깔때기

10 mL ~ 250 mL의 시료를 담을 수 있는 부피로 미리 멸균처리한 것을 사용한다.

3.5 피펫 또는 자동피펫

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

3.6 펄트리접시

지름 60 mm와 높이 15 mm, 지름 50 mm와 높이 12 mm 또는 적절한 크기의 멸균된 것을 사용한다.

3.7 핀셋

끝이 뭉툭하고 넓으며 여과막을 집어 올릴 때 여과막을 손상하지 않는 형태의 것으로서 화염멸균할 수 있는 것을 사용한다.

3.8 배양기

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

3.9 마개 달린 유리시험관 또는 유리용기

고압증기멸균이 가능하며 투명한 재질의 마개가 달린 약 15 mL 부피의 유리시험관이나 유리병 또는 이에 상응하는 용기를 사용한다.

3.10 다람(Durham)시험관

중시험관용 다람시험관(안지름 6 mm, 높이 30 mm)을 사용한다. 고압증기멸균할 수 있어야 하며 기체 포집 위해 거꾸로 집어넣는다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 막여과법 추정시험용 고체배지(m-Endo agar LES)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 1의 조성대로 넣고 95 % 에탄올 20 mL를 첨가해 가열하면서 완전히 녹인 후 $45 ^\circ\text{C} \sim 50 ^\circ\text{C}$ 까지 식혀 5 mL ~ 7 mL를 페트리접시에 넣어 굳힌다. 가열할 때는 끓어 넘치지 않도록 주의하며, pH는 (7.2 ± 0.2) 가 되도록 한다. 조제된 배지는 $4 ^\circ\text{C} \sim 8 ^\circ\text{C}$ 의 냉장소에서 2주간 보관할 수 있다.

표 1. 막여과법 추정시험용 고체배지(m-Endo agar LES) 조성

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	1.2 g
트립토오스(tryptose)	7.5 g
카지톤 혹은 트립티케이스(casiton or trypticase)	3.7 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	9.4 g
치오펩톤 혹은 치오톤(thiopeptone or thiotone)	3.7 g
데옥시콜린산나트륨(sodium desoxycholate)	0.1 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	3.7 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량 : 174.18)	3.3 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량 : 136.09)	1.0 g
라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate)	0.05 g
아황산나트륨(sodium sulfite, Na_2SO_3 , 분자량 : 126.10)	1.6 g
염기성폭신(basic fuchsin)	0.8 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 g

4.1.2 막여과법 추정시험용 액체배지(m-Endo)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 2의 조성대로 넣고 95 % 에탄올 20 mL를 첨가해 가열하면서 완전히 녹인 후 바로 방냉하여 실온으로 식힌 다음 멸균된 흡수패드에 무균적으로 2 mL씩 흡수시킨다. 가열할 때 끓어 넘치지 않도록 주의하며, 배지의 pH는 (7.2 ± 0.2) 가 되도록 한다. 배지는 시험할 때마다 만들어 사용하고 필요하면 2 °C ~ 8 °C의 냉장소에서 96시간 동안 보관할 수 있다.

표 2. 막여과법 추정시험용 액체배지(m-Endo) 조성

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	1.5 g
트립토오스(tryptose) 혹은 폴리펩톤(polypeptone)	10.0 g
카지톤 혹은 트립티케이스(casiton or trypticase)	5.0 g
락토오스(lactose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , 분자량 : 342.30)	12.5 g
치오펩톤 혹은 치오톤(thiopeptone or thiotone)	5.0 g
데옥시콜린산나트륨(sodium desoxycholate)	0.1 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K ₂ HPO ₄ , 분자량 : 174.18)	4.375 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH ₂ PO ₄ , 분자량 : 136.09)	1.375 g
라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate)	0.05 g
아황산나트륨(sodium sulfite, Na ₂ SO ₃ , 분자량 : 126.10)	2.1 g
염기성폭신(basic fuchsin)	1.05 g

4.1.3 막여과법 확정시험용 배지(lactose broth 또는 BGLB, brilliant green lactose bile 2 %)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 확정시험용 배지는 정제수 1 L에 표 3의 조성대로 넣고 가열해 녹인 후 pH가 (6.9 ± 0.2)가 되도록 조정하고, BGLB 배지는 정제수 1 L에 표 4의 조성대로 넣고 가열해 녹인 후 pH가 (7.2 ± 0.2)가 되도록 조정하여 각 배지를 다람시험관이 들어 있는 시험관에 10 mL씩 나누어 넣고 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

표 3. 막여과법 확정시험용 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 4. 막여과법 확정시험용 배지(BGLB) 조성

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

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 $1\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 냉장 보관 상태에서 30시간 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 수도물을 2분 ~ 3분간 흘려버린 후 채취한다. 수도꼭지에 연결된 부착물은 제거하고 깨끗한 헝겊이나 휴지로 이물질 을 닦아낸 후 시료를 채취한다. 필요하면 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.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 이 시험기준을 처음 실시하거나 사용하던 배지, 시약 등이 바뀔 때마다 양성대조군과 음성대조군 시험을 동시에 실시해야 한다. 양성대조군 시험결과는 양성, 음성대조

균 시험결과가 음성으로 나왔을 때만 유효한 결과값으로 판정한다.

6.2 양성대조균은 *Escherichia coli* 표준균주를 사용하고, 음성대조균은 멸균 희석액을 사용한다.

7.0 분석절차

7.1 “내용 없음”

7.2 시험방법

7.2.1 추정시험

7.2.1.1 시험에 사용되는 모든 장치는 멸균가능한 종이나 알루미늄 호일로 감싸 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

7.2.1.2 여과장치의 막 지지대 위에 여과막의 격자가 그려진 면을 위로 향하게 놓고 필터깔때기를 고정한 다음, 멸균한 정제수를 소량 가하고 서서히 여과해 여과막을 막 지지대에 완전히 밀착한 후 시료 100 mL(샘물, 먹는샘물, 먹는해양심층수, 염지하수, 먹는염지하수는 250 mL)를 필터깔때기에 넣어 여과한다. 여과한 멸균수를 약 30 mL 씩 2회 ~ 3회 필터깔때기에 가하여 세정여과를 마친다. 여러 시료를 한 장치에 여과할 경우, 일련의 시료를 여과하기 전과 마지막에 멸균수를 30 mL 여과해 배지에 배양한다. 세균이 자라면 모든 결과를 무효로 한다. 시료 여과 사이에 30분 이상이 지나면 새로운 여과장치를 사용한다.

7.2.1.3 세정여과 후 여과장치를 분리하여 여과한 여과막을 멸균한 핀셋으로 집어내어 추정시험용 고체배지를 사용할 때는 여과막의 눈금을 위로 하여 페트리접시 내의 배지 위에 기포가 형성되지 않도록 올려놓고 페트리접시를 뒤집어서 (35.0 ± 0.5) °C로 20시간 ~ 22시간 동안 배지가 마르지 않는 조건을 유지하면서 배양한다. 추정시험용 액체배지를 사용할 때는 배지 약 2 mL로 흡수패드를 적신 다음 페트리접시 내의 배지 위에 놓고 그 위에 여과막을 올려놓은 뒤 (35.0 ± 0.5) °C로 20시간 ~ 22시간 동안 배지가 마르지 않는 조건을 유지하면서 배양한다. 핀셋은 화염 멸균하여 실온에서 식힌 후 여과막을 집

는 데 사용한다.

7.2.1.4 배양 후 금속성 광택을 띠는 분홍이나 진홍색 계통 또는 광택이 없더라도 짙은 적색의 집락이 관찰되면 추정시험을 양성으로 판정하고 확정시험을 실시한다. 융합성장(CG, confluent growth)이나 계수불능(TNTC, too numerous to count)성장이 나타난 시료는 총대장균군이 검출되지 않으면 무효로 하고 다시 채수하여 실험한다.

7.2.2 확정시험

7.2.2.1 추정시험에서 금속성 광택을 띠는 분홍이나 진홍색 계통 또는 광택이 없더라도 검붉은색의 집락이 관찰되었을 때는 이들 집락(금속성 광택을 띠는 집락과 광택이 없는 검붉은색의 집락을 각각 최대 5개까지 판다)을 멸균된 접종루프나 면봉 등으로 확정시험용 배지(락토오스 배지 또는 BGLB 배지)가 10 mL씩 들어 있는 시험관(다람시험관이 들어 있는 시험관)에 접종시켜 $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (48 ± 3) 시간 배양한다.

7.2.2.2 이때 기체가 발생하지 않으면 총대장균군 음성으로 판정하고 기체가 발생하면 총대장균군 양성으로 판정한다.

7.2.3 모든 시험은 음성대조군 시험을 동시에 실시하여 음성대조군 시험결과는 음성으로 나왔을 때만 유효한 결과값으로 판정한다.

8.0 결과보고

8.1 결과 표기

수돗물, 먹는물공동시설을 시험한 결과 총대장균군이 검출되지 않으면 ‘불검출/100 mL’로, 검출되면 ‘검출/100 mL’로 표기하고 샘플, 먹는샘물, 먹는해양심층수, 염지하수와 먹는염지하수에 대한 시험결과는 총대장균군이 검출되지 않으면 ‘불검출/250 mL’로, 검출되면 ‘검출/250 mL’로 표기한다.

9.0 참고자료

9.1 US EPA Method 9132, Total coliform: Membrane filter technique(1986).

9.2 Standard Method 9222, 23rd edition, Membrane filter technique for members of the coliform group(2017).

9.3 일본 상수시험방법 8.2.3, 총대장균군 MF 엔도배지법(2001).

10.0 “내용 없음”