

분원성연쇄상구균-시험관법
(Fecal Streptococcus-Multiple Tube Method)

2024

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 샘물·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수 등에 존재하는 분원성연쇄상구균을 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 샘물·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수 등의 수질검사에 적용한다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 분원성연쇄상구균

스트렙토코카세아(*Streptococaceae*)과에 속하는 연쇄상구균 속 중 장내에서 발견되는 세균으로 그람 양성 구균이며 과산화수소분해효소(catalase) 음성으로 45 ℃에서 40 % 담즙과 0.04 % 아지드화나트륨(sodium azide)에서 성장하는 균을 말한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 피펫 또는 자동피펫

부피 5 mL ~ 25 mL인 메스피펫이나 자동피펫(플라스틱피펫팁 포함)으로서 멸균된 것을 사용한다.

3.2 마개 달린 유리시험관

대시험관(안지름 32 mm, 높이 200 mm)으로 플라스틱이나 금속 등과 같은 재료의 마개를 적용할 수 있고, 고압증기멸균할 수 있어야 한다.

3.3 페트리접시

지름 약 9 cm, 높이 약 1.5 cm의 유리제품(65 cm²) 또는 1회용 플라스틱제품(57 cm²)으로 멸균된 것을 사용한다.

3.4 접종루프(Inoculation loop)

루프의 안지름이 약 3 mm인 접종루프를 사용한다.

3.5 배양기

배양온도를 (35.0 ± 0.5) °C로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 분원성연쇄상구균 추정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 1의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH가 (7.2 ± 0.2)가 되도록 조정하여 다음 대시험관에 25

mL씩 나누어 넣고 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

표 1. 분원성연쇄상구균 추정시험용 배지(3배 농후 아지드 포도당 배지, 3×azide dextrose broth) 조성

성 분	조 성
소고기 추출물(beef extract)	13.5 g
트립톤 또는 폴리펩톤(tryptone or polypeptone)	45.0 g
포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$, 180.16)	22.5 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	22.5 g
아지드화나트륨(sodium azide, NaN_3 , 분자량 : 65.01)	0.6 g

4.1.2 분원성연쇄상구균 확정시험용 배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 2 또는 표 3의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH가 (7.1 ± 0.2)가 되도록 조정한 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균하고 50 °C ~ 55 °C까지 식힌 후 멸균된 페트리접시에 약 15 mL씩 무균 상태로 나누어 넣고 굳혀서 평판배지를 조제한다.

표 2. 분원성연쇄상구균 확정시험용 배지(enterococcosel agar)

성 분	조 성
펩톤 C(peptone C)	17.0 g
펩톤 B(peptone B)	3.0 g
효모 추출물(yeast extract)	5.0 g
세균학적 담즙분말	10.0 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
시트르산나트륨(trisodium citrate, $Na_3C_6H_5O_7$, 분자량 : 258.07)	1.0 g
에스쿨린(esculin, $C_{15}H_{16}O_9$, 분자량 : 340.29)	1.0 g
시트르산제이철암모늄(ferric ammonium citrate, $FeSO(NH_4)SO_4$, 분자량 : 217.80)	0.5 g
아지드화나트륨(sodium azide, NaN_3 , 분자량 : 65.01)	0.25 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 g

표 3. 분원성연쇄상구균 확정시험용 배지(Bile esculin azide agar)

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	5.0 g
프로테오스 펩톤3(proteose peptone No.3)	3.0 g
트립톤(tryptone)	17.0 g
소담즙(oxgall)	10.0 g
에스쿨린(esculin, $C_{15}H_{16}O_9$, 분자량 : 340.29)	1.0 g
시트르산제이철암모늄(ferric ammonium citrate)	0.5 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
아지드화나트륨(sodium azide, NaN_3 , 분자량 : 65.01)	0.15 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 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 °C ~ 5 °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 수돗물을 2분 ~ 3분간 흘려버린 후 채취한다. 수도꼭지에 연결된 부착물은 제거하고 깨끗한 형겅이나 휴지로 이물질을 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 “내용 없음”

7.0 분석절차

7.1 “내용 없음”

7.2 시험방법

7.2.1 추정시험

7.2.1.1 시료 50 mL씩을 분원성연쇄상구균 추정시험용 배지(3배 농후 아지드 포도당 배지)가 25 mL씩 들어 있는 대시험관 5개에 접종한 다음 $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양하여 혼탁이 관찰되지 않으면 (48 ± 3) 시간까지 연장하여 배양한다.

7.2.1.2 배양한 후 배지의 혼탁 유무를 관찰한다. 어느 시험관에서도 배지가 흐려지지 않는 것은 추정시험 음성으로 하고, 하나 이상의 시험관에서 흐린 것이 확인되면 세균 증식, 시료 혼입 어느 것이든 관계없이 추정시험 양성으로 판정하고 다음의 확정시험을 실시한다.

7.2.2 확정시험

7.2.2.1 추정시험에서 흐림을 확인한 모든 시험관에서 1 점종루프씩을 취하여 각각 분원성연쇄상구균 확정시험용 배지(enterococcosel agar 또는 Bile esculin azide agar)에 획선 접종하여 $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양한다.

7.2.2.2 배양한 후 집락 주위는 갈색으로 변하고 집락은 흑갈색으로 변하면 확정시험 양성, 즉 분원성연쇄상구균 양성으로 판정한다. 전형적인 집락이 관찰되지 않으면 분원성연쇄상구균 음성으로 판정한다.

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

8.0 결과 보고

8.1 결과 표기

분원성연쇄상구균이 검출되지 않으면 ‘불검출/250 mL’로, 검출되면 ‘검출/250 mL’로 표기한다.

9.0 참고자료

9.1 Standard Method 9230 B, 23rd edition, Fecal *Streptococcus* and *Enterococcus* groups–Multiple Tube technique(2017).

9.2 일본 상수시험방법 5.4, 분원성연쇄구균(2001).

10.0 “내용 없음”