

녹농균-시험관법

2024

(*Pseudomonas aeruginosa*-Multiple Tube Method)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 샘물·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수 등에 존재하는 녹농균을 분석 할 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 녹농균

슈도모나스(*Pseudomonas*)과의 운동성을 지니는 그람음성 호기성 간균으로서 단일 혹은 쌍으로 존재한다. 짧은 사슬을 형성하기도 하고 산화효소에 양성을 나타내며, 자외선(365 nm ~ 366 nm 범위, 6와트) 조사 시 형광을 띠고 아세트아미드(acetamide)로부터 암모니아를 생성하는 세균을 말한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 피펫 또는 자동피펫

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

3.2 마개달린 유리시험관

대시험관(안지름 32 mm, 높이 200 mm)과 소시험관(안지름 16 mm, 높이 150 mm)으로 플라스틱이나 금속 등과 같은 재질의 마개를 적용할 수 있고, 고압증기멸균할 수 있어야 한다.

3.3 페트리접시

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

3.4 자외선 램프

365 nm ~ 366 nm(6와트) 범위의 파장 조사가 가능해야 한다.

3.5 접종루프(Inoculation loop)

루프의 안지름이 약 3 mm인 접종루프를 사용한다.

3.6 배양기

배양온도를 (36.0 ± 1.0) °C 와 (41.0 ± 1.0) °C로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

3.7 광학현미경

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 추정시험용 배지(3배 농후 아스파라진 배지, 3 × Asparagine broth)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 1의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH가 (7.0 ± 0.2)가 되도록 조정한 다음 대시험관에 25 mL씩 나누어 넣고 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

표 1. 추정시험용 배지(3배 농후 아스파라진 배지, 3×Asparagine enrichment broth) 조성

성 분	조 성
아스파라진 DL(asparagine DL, $C_4H_8O_3N_2$, 분자량 : 132.12)	9.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량 : 174.18)	3.0 g
황산마그네슘칠수화물(magnesium sulfate heptahydrate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 분자량 : 246.50)	1.5 g

4.1.2 확정시험용 배지(Acetamide broth)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 2의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH가 (7.0 ± 0.2)가 되도록 조정한 다음 소시험관에 10 mL씩 나누어 넣고 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다. 또는 표 3의 조성대로 넣고 가열하여 녹인 후 pH가 (7.0 ± 0.2)가 되도록 조정한 다음 시험관에 약 8 mL씩 분주하고, 121 °C에서 15분간 고압증기멸균하여 사면이 형성되게 응고시킨다.

표 2. 확정시험용 배지(아세트아미드 배지, Acetamide broth) 조성

성 분	조 성
아세트아미드(acetamide, C_2H_5NO , 분자량 : 59.07)	10.0 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량 : 174.18)	1.39 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량 : 136.10)	0.73 g
황산마그네슘칠수화물(magnesium sulfate heptahydrate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 분자량 : 246.50)	0.5 g
페놀레드(phenol red)	0.012 g

표 3. 확정시험용 배지(아세트아미드 한천 사면배지, Acetamide agar) 조성

성 분	조 성
아세트아미드(acetamide, C_2H_5NO , 분자량 : 59.07)	10.0 g
염화나트륨(sodium chloride, $NaCl$, 58.50)	5.0 g
인산일수소칼륨(dipotassium phosphate, K_2HPO_4 , 분자량 : 174.18)	1.39 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량 : 136.10)	0.73 g
황산마그네슘칠수화물(magnesium sulfate heptahydrate, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 분자량 : 246.50)	0.5 g
페놀레드(phenol red)	0.012 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 g

4.1.3 확인시험용 배지(트리픽 소이 배지, Tryptic soy agar)

가급적 상용화된 완성제품을 사용하고, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 4의 조성대로 넣고 완전히 녹인 후 121 °C에서 15분간 고압증기멸균하여 미리 멸균된 페트리접시에 약 15 mL씩 무균 상태로 분주한 후 굳힌다.

표 4. 확인시험용 배지(트리픽 소이 배지, Tryptic soy agar) 조성

성 분	조 성
카제인 췌장효소 소화물(pancreatic digest of casein)	15.0 g
콩의 파파인소화물(papaic digest of soybean meal)	5.0 g
염화나트륨(sodium chloride, $NaCl$, 분자량 : 58.50)	5.0 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 g

4.1.4 그람염색시약(gram' s stain solution)

가급적 상용화된 키트를 이용한다.

4.1.4.1 용액 A

크리스탈바이올렛(crystal violet) 2.0 g + 95 % 에탄올(95 % ethanol) 20 mL

4.1.4.2 용액 B

암모늄 옥살레이트(ammonium oxalate) 0.8 g + 정제수 80 mL

4.1.4.3 착색제(요오드용액)

요오드(iodine) 1.0 g + 요오드화칼륨(KI) 2.0 g + 정제수 300 mL

4.1.4.4 탈색제

에탄올(ethanol) 95 mL + 정제수 5 mL

4.1.4.5 대조염색제

사프란인 O(safranin O) 0.25 g + 95 % 에탄올(95 % ethanol) 10 mL

4.1.5 세균동정키트 또는 세균동정기

장내세균 이외의 그람 음성 간균을 동정하려면 상용화된 세균동정키트 또는 세균동정기를 사용한다.

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 2분 ~ 3분간 흘려버린 후 채취한다. 수도꼭지에 연결된 부착물은 제거하고 깨끗한 형겅이나 휴지로 이물질 을 닦아낸 후 시료를 채취한다. 필요하면 가스버너 등으로 수도꼭지 입구를 충분히 소독 한다.

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 3배 농후 녹농균 추정시험용 배지가 25 mL씩 들어 있는 시험관 5개에 각각 접종한 후 $(36.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 에서 (24 ± 2) 시간 배양한다.

7.2.1.2 암실에서 자외선램프로 장파장의 자외선(365 nm ~ 366 nm)을 조사하여 녹색을 띠는 형광의 유무를 관찰하여 형광이 발생하면 추정시험 양성으로 한다. 다만, 명확한 형광이 확인되지 않으면 배양을 더 지속해서 (48 ± 3) 시간까지 관찰한다. 이때 시험관에서 녹색 형광이 확인되지 않는 것은 녹농균 음성으로 판정한다. 시험관에서 녹색 형광이 인지되면 추정시험 양성으로, 녹농균의 존재 여부를 확인하고자 다음의 확정시험을 계속 한다.

7.2.2 확정시험

7.2.2.1 추정시험에서 녹색을 띠는 형광을 확인한 모든 시험관에서 바로 접종루프

를 이용하여 추정시험 양성 배지의 윗부분을 약 0.1 mL 취하여 녹농균 확정배지에 접종하고 $(36.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 로 24시간에서 36시간까지 배양한다.

7.2.2.2 배양한 후 배지에 현저한 색깔 변화가 없으면 녹농균 음성으로 한다. 그러나 시험관이 1개라도 적자색을 나타내면 확정시험 양성으로 판정한다.

7.2.3 확인시험

7.2.3.1 확정시험 양성 집락을 순수분리한 후 확인시험용 배지에서 $(41.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 로 48시간 배양하여 성장 여부를 관찰한다. 성장하지 않은 집락은 녹농균 음성으로 판정하고 성장한 집락은 그람염색 후 현미경으로 관찰하여 그람 음성 간균임을 확인하고 상용화된 세균동정키트 또는 세균동정기를 사용하여 동정한다.

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

8.0 결과보고

8.1 결과 표기

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

9.0 참고자료

9.1 일본, 상수시험방법, 5.5, 녹농균(2001).

9.2 Standard Method 9213 F, 23rd edition, Multiple-Tube Technique for *Pseudomonas aeruginosa*(2017).

10.0 “내용 없음”