

살모넬라-막여과법

2024

(*Salmonella*-Membrane Filtration Method)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 샘플·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수 등에 존재하는 살모넬라를 분석함에 있어할 때 검사결과의 정확성과 통일성을 제공하는 데 필요한 제반사항을 규정함을 목적으로 한다.

1.2 적용범위

이 시험기준은 「먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 제2조의 규정에 따른 샘플·먹는샘물, 염지하수·먹는염지하수, 먹는해양심층수 등의 수질검사에 적용한다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 살모넬라

일반적으로 선택배지에서 지름 2 mm ~ 4 mm의 집락을 형성하는 그람 음성, 산화효소 음성, 통성 혐기성, 무아포성의 막대 모양 세균을 말한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 여과막

공경 0.45 μm , 지름 47 mm 크기의 미생물 분석용 여과막으로 막의 한 면에 격자가 그려지고 멸균된 것을 사용한다.

3.2 여과장치

여과막을 끼워서 여과할 수 있게 하는 장치로 무균조작이 가능한 것을 사용한다.

3.3 필터깔때기

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

3.4 피펫 또는 자동피펫

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

3.5 마개 달린 유리시험관 또는 유리용기

약 50 mL 부피의 고압증기멸균이 가능하고 투명한 붕규산 재질로 마개가 달린 유리 시험관이나 유리병 또는 이에 상응하는 멸균용기를 사용한다.

3.6 페트리접시

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

3.7 접종루프(Inoculation loop)

루프의 안지름이 약 3 mm인 접종루프를 사용한다.

3.8 핀셋

끝이 뾰족하고 넓으며 여과막을 집어 올릴 때 여과막을 물리적으로 손상하지 않는 것으로 화염멸균이 가능한 것을 사용한다.

3.9 가위

무균조작이 가능한 것을 사용한다.

3.10 배양기

배양온도를 $(36.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

3.11 광학현미경

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 증균 배지(셀레나이트 액체배지, Selenite broth)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 1의 조성대로 넣고 pH를 (7.0 ± 0.2) 로 조절한다. $60^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ 에서 가열용해한 후 멸균된 시험관에 7 mL ~ 10 mL씩 무균 상태로 넣고 식힌다. 이때 끓여서 녹이지 않게 주의한다. 조제된 배지는 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 에 보관한다.

표 1. 증균 배지(셀레나이트 액체배지, Selenite broth) 조성

성 분	조 성
트립톤(tryptone)	5.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	4.0 g
셀레나이트(selenite)	4.0 g
인산일수소나트륨(sodium phosphate, dibasic, Na_2HPO_4 , 분자량 : 141.95)	10.0 g

4.1.2 추정시험용 배지

상용화된 완성제품 및 동등 이상의 성능을 가진 제품을 사용할 수 있으며, 사용할 경우 각 제조사별 조제법을 따를 수 있다. 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 2 또는 표 3의 조성대로 넣고 완전용해될 때까지 가열하며, 이때 배지를 고압증기멸균해서는 안 된다. 50 °C ~ 55 °C까지 식힌 후 pH를 (7.6 ± 0.1)로 조절하고 멸균된 페트리접시에 약 20 mL씩 분주하여 굳힌다. 가열할 때 끓는 상태가 1분 ~ 2분 이상 지속되지 않도록 한다. 조제된 배지는 2 °C ~ 8 °C에 보관하며 4일 이상 저장하지 않는다.

표 2. 추정시험용 배지(비스무스 아황산염 선택배지, Bismuth sulfite agar) 조성

성 분	조 성
펩톤(peptone)	10.0 g
쇠고기 추출물(beef extract)	5.0 g
포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16)	5.0 g
인산일수소나트륨(sodium phosphate, dibasic, Na_2HPO_4 , 분자량 : 141.95)	4.0 g
황산제일철(ferrous sulfate, $FeSO_4$, 분자량 : 151.91)	0.3 g
비스무스 아황산염(bismuth sulfite, $Bi_2(SO_3)_3$, 분자량 : 657.80)	8.0 g
브릴리언트 그린(brilliant green, $C_{27}H_{34}N_2O_4S$, 분자량 : 482.64)	25 mg
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	20.0 g

표 3. 추정시험용 배지(자일로스 라이신 데스옥시콜레이트 한천 선택배지, XLD agar) 조성

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	3.0 g
L-라이신(L-lysine, $C_6H_{14}N_2O_2$, 분자량 : 146.19)	5.0 g
자일로스(xylose, $C_5H_{10}O_5$, 분자량 : 150.13)	3.75 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	7.5 g
수크로오스(sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	7.5 g
데스옥시콜린산나트륨(sodium desoxycholate)	2.5 g
시트르산제이철암모늄(ferric ammonium citrate, $FeSO(NH_4)SO_4$, 분자량 : 217.80)	0.8 g
티오황산나트륨(sodium thiosulfate, $Na_2S_2O_3$, 분자량 : 158.11)	6.8 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15.0 g
페놀레드(phenol-red)	0.08 g

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

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 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 g

4.1.4 그람염색시약(gram's stain solution)

상용화된 키트를 사용할 수 있다.

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

4.1.4.6 세균동정키트 또는 세균동정기

장내 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 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 헝겊이나 휴지로 이물질의 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 무균조작이 가능한 막여과장치에 250 mL의 시료를 여과한다.

7.2.1.2 여과막은 무균조작이 가능한 가위로 잘라서 증균배지(셀레나이트 액체배지)가 7 mL ~ 10 mL 들어 있는 시험관에 넣어 (36.0 ± 1.0) °C에서 24시간 배양한다.

7.2.1.3 접종루프를 이용하여 배양액을 취하여 추정시험용 배지(비스무스 아황산염 선택배지 또는 자일로스 라이신 데스옥시콜레이트 한천 선택배지)에 희석 접종한다. 35 °C에서 48시간까지 배양한 후 가장자리에 하얗고 얇은 테를 두른 검고 반짝이는 집락을 살모넬라 추정시험의 양성으로 판정한다. 전형적인 양성집락이 없고 녹색집락이 생성되었을 때도 집락을 취하여 확인시험한다.

7.2.2 확인시험

7.2.2.1 추정시험에서 양성으로 판정된 집락을 순수 분리하여 확인시험용 배지(트립티크 소이 배지)로 옮겨 심는다. 그람염색 후 현미경 관찰로 그람 음성, 간균임을 확인하고 상용화된 세균동정키트 또는 세균동정기로 동정한다. 병원성과 역학에 대한 정보를 얻기 위하여 더 자세한 종과 혈청형의 동정을 혈청학적 시험으로 확인할 수 있다.

7.2.2.2 혈청학적 시험은 다음과 같이 수행한다. 살모넬라로 동정된 균들은 살모넬라 O항혈청에 해당하는 A, B, C, D, E 그룹 항혈청반응을 보아 그룹을 결정하고 그 그룹에 속하는 단일 요소 항혈청으로 시험한다. Vi 항혈청에만 응집이 있으면 살모넬라 타이피가 아닌지 확인하고, 균 부유액을 100 °C에서 끓여 Vi 항원을 파괴한 후 O항혈청응집을 보아 그룹을 결정한다. H항혈청으로 편모항원 Phase I, II를 시험한 후 O항원, 편모항원을 종합하여 살모넬라 균종을 확정 짓는다.

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

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

9.0 참고자료

9.1 Standard Method 9260 B, 23rd edition, Detection of Pathogenic Bacteria-General Qualitative Isolation and Identification Procedures for *Salmonella*(2017).

9.2 KS I ISO 19250, “수질-살모넬라 검출 방법”, 환경부(2019).

10.0 “내용 없음”