

여시니아균-막여과법

2024

(*Yersinia enterocolitica*-Membrane Filtration Method)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 먹는물공동시설 등에 존재하는 여시니아균을 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 먹는물공동시설 등의 수질검사에 적용한다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 여시니아균

그람 음성의 락토오스를 분해하지 않는 호기성 간균으로, 여시니아 선택 한천배지와 메콩키배지에서 특징적인 집락을 형성하고 TSI배지에서 특징적인 반응을, 요소배지에서 양성반응을 나타낸다. 37 ℃에서 운동성이 없으며 25 ℃에서 운동성을 나타내는 세균으로 4 ℃에서도 발육하는 저온 세균을 말한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 피펫 또는 자동피펫

부피 1 mL와 10 mL인 메스피펫이나 자동피펫(플라스틱피펫팁 포함)으로서 눈금이 0.1 mL로 표시되었으며 입구가 넓고 멸균된 것을 사용한다.

3.2 필터깔때기

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

3.3 여과장치

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

3.4 여과막

공경 0.45 μm , 지름 47 mm 크기 또는 90 mm 크기의 미생물 분석용 여과막으로 막의 한 면에 격자가 그려지고 멸균된 것을 사용한다.

3.5 핀셋

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

3.6 페트리접시

지름 약 5.5 cm, 높이 약 1.2 cm의 소형제품(24 cm^2) 또는 지름 약 9 cm, 높이 1.5 cm의 제품(57 cm^2)으로 멸균된 것을 사용한다.

3.7 접종루프 또는 접종니들 (Inoculation loop or needle)

루프의 안지름이 약 3 mm인 접종루프 또는 접종니들을 사용한다.

3.8 마개 달린 유리시험관 또는 유리용기

15 mL ~ 100 mL 부피의 고압증기멸균이 가능하고 투명한 붕규산 재질로 마개 달린 유리시험관이나 유리병 또는 이에 상응하는 멸균용기를 사용한다.

3.9 배양기

배양온도를 25 °C ~ 28 °C와 37 °C로 유지할 수 있는 것을 사용한다.

3.10 광학현미경

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 여시니아 선택 한천배지

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 1의 조성대로 넣고 pH가 (7.4 ± 0.2)가 되도록 조정해 다음 121 °C에서 15분간 고압멸균하고 45 °C ~ 50 °C로 식혀 표 2의 CN여시니아 향미생물 보충액(제조하여 사용할 때는 여과 멸균한다)을 첨가한다.

표 1. 여시니아 선택 한천배지 조성

성 분	조 성
효모 추출물(yeast extract)	2 g
펩톤(peptone)	17 g
프로테오스 펩톤(proteose peptone)	3 g
만니톨(mannitol, C ₆ H ₁₄ O ₆ , 분자량 : 182.2)	20 g
데스옥시콜산나트륨(sodium desoxycholate, C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄ , 분자량 : 414.6)	0.5 g
콜산나트륨(sodium cholate, C ₂₄ H ₃₉ NaO ₅ , 분자량 : 430.56)	0.5 g

(표 계속)

성 분	조 성
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.5)	1 g
피루브산나트륨(sodium pyruvate, C ₃ H ₃ O ₃ Na, 분자량 : 110.00)	2 g
황산마그네슘칠수화물(magnesium sulfate heptahydrate, MgSO ₄ ·7H ₂ O, 분자량 : 246.47)	10 mg
한천(agar, (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n)	13.5 g
뉴트럴 레드(neutral red)	30 mg
크리스탈 바이올렛(crystal violet)	1 mg
이르가산(irgasan)	4 mg

표 2. CN여시니아 향미생물 보충액

성 분	조 성
세프설로이딘(cefsulodin)	4 mg
노보비오신(novobiocin)	2.5 mg
정제수(dH ₂ O)	10 mL

4.1.2 메콩키 한천배지(MacConkey agar)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 3의 조성대로 넣고 가열용해한 다음 pH가 (7.1 ± 0.2)가 되도록 조정하고 121 °C에서 15분 간 고압증기멸균한다.

표 3. 메콩키 한천배지(MacConkey agar) 조성

성 분	조 성
펩톤(peptone)	17 g
프로테오스 펩톤(proteose peptone No. 3)	3 g
락토오스(lactose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , 분자량 : 342.30)	10 g
담즙염 No. 3 (bile salts No.3)	1.5 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5 g
한천(agar, (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n)	13.5 g
뉴트럴 레드(neutral red)	0.03 g
크리스탈 바이올렛(crystal violet)	0.001 g

4.1.3 mMCH배지

메콩키 한천배지에 D-솔비톨 10 g/L, 이르가산 4.0 mg/L, 노보비오신 2.5 mg/L를 첨가하여 사용한다.

4.1.4 혼화물 한천배지(brain heart infusion agar)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 4의 조성대로 넣고 가열용해한 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다.

표 4. 혼화물 한천배지(brain heart infusion agar) 조성

성 분	조 성
소 태아 뇌 혼화물(calf brains, infusion from 200 g)	7.7 g
소 심장 혼화물(beef heart, infusion from 250 g)	9.8 g
프로테오스 펩톤(proteose peptone)	10.0 g
포도당(dextrose, C ₆ H ₁₂ O ₆ , 분자량 : 180.16)	2.0 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.4)	5.0 g
인산일수소나트륨(sodium phosphate, dibasic, Na ₂ HPO ₄ , 분자량 : 141.95)	2.5 g
한천(agar, (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n)	15.0 g

4.1.5 TSI 배지(triple sugar iron agar)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 5의 조성대로 넣고 가열용해한 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한다. 멸균튜브에 사면이 형성되도록 분주하여 응고시킨다.

표 5. TSI 배지(triple sugar iron agar) 조성

성 분	조 성
소고기 추출물(beef extract)	3.0 g
효모 추출물(yeast extract)	3.0 g
카제인의 췌장효소 분해물(pancreatic digest of casein)	15.0 g

프로테오스 펩톤(proteose peptone No. 3)	5.0 g
(표 계속)	
성 분	조 성
포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16)	1.0 g
락토오스(lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	10.0 g
수크로오스(sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 분자량 : 342.30)	10.0 g
황산철(ferrous sulfate, $FeSO_4$, 분자량 : 151.90)	0.2 g
염화나트륨(sodium chloride, $NaCl$, 분자량 : 58.50)	5.0 g
티오 황산소듐(sodium thiosulfate, $Na_2S_2O_3$, 분자량 : 158.10)	0.3 g
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	12.0 g
페놀레드(phenol red)	24.0 mg

4.1.6 요소배지(urea agar)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 표 6 배지조성 중 한천을 제외한 성분을 정제수 100 mL에 녹여 여과 멸균한다. 별도로 정제수 900 mL에 한천을 녹여 121 °C에서 15분간 고압멸균한 후 50 °C로 식혀 여과 멸균한 배지 성분 100 mL와 잘 섞어준다. 멸균튜브에 사면이 형성되도록 분주하여 응고시킨다.

표 6. 요소배지(urea agar) 조성

성 분	조 성
젤라틴(pancreatic digest of gelatin)	1 g
포도당(dextrose, $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16)	1 g
염화나트륨(sodium chloride, $NaCl$, 분자량 : 58.50)	5 g
인산이수소칼륨(monopotassium phosphate, KH_2PO_4 , 분자량 : 136.09)	2 g
요소(urea)	20.0 g
페놀레드(phenol red)	12.0 mg
한천(agar, $(C_{12}H_{18}O_9)_n$)	15 g

4.1.7 운동성 배지(motility test medium)

상용화된 완성제품을 사용할 수 있으며, 제조하여 사용할 때는 정제수 1 L에 표 7의 조성대로 넣고 가열용해하여 튜브에 분주한 다음 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한

다.

표 7. 운동성 배지(motility test medium) 조성

성 분	조 성
소고기 추출물(beef extract)	3.0 g
젤라틴의 췌장효소 분해물(pancreatic digest of gelatin)	10.0 g
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	5.0 g
한천(agar, (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n)	4.0 g

4.1.8 0.288 % 수산화칼륨(potassium hydroxide solution) 용액

정제수 1 L에 표 8의 조성대로 넣어 용해하고 여과 멸균한다.

표 8. 0.288 % 수산화칼륨(potassium hydroxide solution) 용액 조성

성 분	조 성
염화나트륨(sodium chloride, NaCl, 분자량 : 58.50)	8.5 g
수산화칼륨(potassium hydroxide, KOH, 분자량 : 56.10)	2.88 g

4.1.9 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 ℃ ~ 5 ℃ 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 이물질을 닦아낸 후 시료를 채취한다. 필요하다면 가스버너 등으로 수도꼭지 입구를 충분히 소독한다.

6.0 “내용 없음”

7.0 분석절차

7.1 “내용 없음”

7.2 시험방법

7.2.1 추정시험

7.2.1.1 시료 1 L를 무균조작이 가능한 여과장치를 이용하여 멸균상태의 여과지(membrane filter, 0.45 μ m pore size)로 여과한 후 연속하여 0.288 % 수산화칼륨용액 20 mL ~ 30 mL를 20초 내에 완전히 여과시킨다. 동일한 과정을 반복 수행하여 여과한 여과지를 총 2매로 한다.

7.2.1.2 여과한 여과지를 하나는 여시니아 선택 한천배지 위에, 다른 하나는 메콩키배지(혹은 mMC 배지) 위에 올려놓고 25 $^{\circ}$ C ~ 28 $^{\circ}$ C에서 48시간 각각 배양한다.

7.2.1.3 여시니아 선택 한천배지에서는 점액성이 없고 무색의 윤곽이 뚜렷한 가장자리를 가지며 중심부가 짙은 적색을 띠는 작은 집락(지름 1 mm ~ 2 mm)을, 메콩키 한천배지(혹은 mMC)에서는 적색 또는 점액성 집락은 피하고 작고(지름 1 mm ~ 2 mm) 편평한 무색 또는 옅은 핑크색의 집락을 취하여 혼화물 한천배지(Brain heart infusion agar)에 옮긴 후 25 $^{\circ}$ C ~ 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한다.

7.2.2 예비동정시험

7.2.2.1 TSI 배지, 요소배지, 운동성배지에 접종하여 예비동정시험을 한다. 예비동정시험에서 여시니아균의 특성을 나타내지 않는 집락은 여시니아균 음성으로 판정하고 여시니아균의 특성을 지닌 분리 집락은 그람염색을 하여 음성임을 확인한다.

7.2.2.1.1 TSI 배지에서 예비동정시험

배지에 접종한 후 37 °C에서 24시간 배양한다. 양성인 경우 *Y. enterocolitica*는 수크로오스를 분해하여 밀면과 사면이 황색으로 변하고 *Y. pseudotuberculosis*는 포도당만 분해하여 사면은 적색으로 남아 있고 밀면은 황색으로 변한다. 기체와 황화수소는 발생하지 않는다.

7.2.2.1.2 요소배지에서 예비동정시험

배지에 접종한 후 25 °C에서 24시간 배양한다. 양성이면 붉은색을 나타낸다.

7.2.2.1.3 운동성배지

운동성 배지 2매에 접종하여 각각 37 °C와 25 °C에 따로 배양한다. 37 °C에서는 운동성이 없고, 25 °C에서는 운동성을 나타낸다.

7.2.3 확인동정시험

상용화된 세균동정키트 또는 세균동정기 등을 사용한다.

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

8.0 결과보고

8.1 결과 표기

여시니아균이 검출되지 않으면 ‘불검출/2 L’로, 검출되면 ‘검출/2 L’로 표기한다.

9.0 참고자료

9.1 KS J ISO 10273 “식품 및 동물사료의 미생물학 — 추정 병원성 여시니아 엔테로콜리티카 검출을 위한 평판법”(2012).

9.2 Standard Method 9260 K, 23rd edition, *Yersinia enterocolitica*(2017).

10.0 “내용 없음”