

필요한 시액 및 배지 (자세한 사항은 제7.4.4 배지 및 시액 참조)

희석액

멸균인산완충희석액 (시액 1) : R112520

멸균생리식염수 (시액 2) : BR0053G

Ringer Solution Tablets, 100tabs (BR0052G)

Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A (BR0014G)

배지

유당배지(배지 2): CM0137B

BGLG배지(배지 3): CM0031B

Endo 한천배지(배지 5): CM0479B + BR0050A

EMB 한천배지(배지 6): CM0069B

보통한천배지(배지 8): CM0017B

데스옥시콜레이트유당한천배지(배지 9): CM1081B

VRBA 평판배지(배지 96) : CM0107B

MacConkey한천배지(배지 30) : CM0115B

그람염색시약:

Gram Stain Kit, Enhanced, 250ml x 5bottles (R40240): 고전방법(2분40초~3분) 대비 염색시간 단축(43초~1분8초); 배경 적색을 감소시켜 작은 그람음성 미생물의 대조를 향상; 긴 기본 유효기간 (460일)

대장균군은 Gram음성, 무아포성 간균으로서 유당을 분해하여 가스를 발생하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성세균을 말한다. 대장균군 시험에는 대장균군의 유무를 검사하는 정성시험과 대장균군의 수를 산출하는 정량시험이 있다.

4.7.1 정성시험

가. 유당배지법

유당배지를 이용한 대장균군의 정성시험은 추정시험, 확정시험, 완전시험의 3단계로 나눈다.

- ① 4.3 제조법에 따라 시험용액을 준비하고 발효관을 준비한다.
- ② 시험용액 10 mL를 2배 농도의 유당배지(배지 2)에, 시험용액 1 mL 및 0.1 mL를 유당배지(배지 2)에 각각 3개 이상씩 가한다.

1) 추정시험

- ③ 시험용액을 접종한 유당배지를 35~37°C에서 24±2시간 배양한다.
- ④ 발효관내에 가스 발생 유무를 확인한다.
 - 가스가 발생하면 추정시험 양성이다.
- ⑤ 가스가 발생하지 않은 경우, 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다
 - 가스발생이 있을 때에는 추정시험 양성이며 다음의 확정시험을 실시한다.
 - 가스가 발생하지 않았을 때에는 추정시험 음성이다.

2) 확정시험

- ⑤ 추정시험에서 가스 발생한 유당배지발효관으로부터 다음 배지에 접종한다.
 - BGLB 배지(배지 3)
- ⑥ 35~37°C에서 24±2시간 동안 배양한 후 가스발생 여부를 확인한다.
 - 가스가 발생하지 아니하였을 때에는 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다.
 - * BGLB배지에서 35~37°C로 48±3시간 동안 배양하였을 때 배지의 색이 갈색으로 되었을 때에는 반드시 완전시험을 실시한다.
- ⑦ 가스발생을 보인 BGLB 배지로부터 다음 배지 중 하나에 접종 및 배양한 후, 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	의심집락 성상		
				유당분해균 (대장균)	유당분해균 (대장균군)	유당 비분해균
선택 1	Endo 한천배지 (배지5)	35~37°C	24±2시간	금색 금속성 광택의 짙은 붉은 색 집락	붉은색/분홍색 집락	무색 반투명 집락
	EMB 한천배지 (배지6)			녹색의 금속성 광택의 보라색 집락	보라색 점액성 집락	무색 반투명 집락

3) 완전시험

대장균군의 존재를 완전히 증명하기 위하여 위의 평판상의 집락이 그람음성, 무아포성의 간균임을 확인하고, 유당을 분해하여 가스의 발생 여부를 재확인한다.

- ⑧ 확정시험의 Endo 한천배지나 EMB한천배지에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 보통한천배지(배지 8)에 접종한다.
- ⑨ 35~37°C에서 48±3시간동안 배양한다.
- ⑩ 그람 염색 → 그람 음성, 무아포성 간균 → 완전시험 양성 → 대장균군 양성

나. BGLB법

- ① 4.3 제조법에 따라 시험용액을 준비하고 발효관을 준비한다.
 대량의 시험용액을 가할 필요가 있을 때에는 대량의 배지를 넣은 발효관을 사용한다.
- ② 시험용액 1~0.1 mL를 2개씩 BGLB 배지(배지 3)발효관에 가한다.
- ③ 시험용액을 접종한 BGLB 배지발효관을 35~37°C에서 48±3시간 배양한다.
- ④ 발효관내에 가스 발생 유무를 확인한다.
 - 가스가 발생하면 양성이며 확정시험을 실시한다.
 - * 배지를 흔들 때 거품 모양의 가스의 존재도 인정한다.
 - 가스가 발생하지 않았을 때에는 음성이다.

확정시험

- ⑤ 가스발생을 보인 BGLB 배지로부터 다음 배지 중 하나에 접종 및 배양한 후 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	의심집락 성상		
				유당분해균 (대장균)	유당분해균 (대장균군)	유당 비분해균
선택 1	Endo 한천배지 (배지5)	35~37°C	24±2시간	금색 금속성 광택의 짙은 붉은 색 집락	붉은색/분홍색 집락	무색 반투명 집락
	EMB 한천배지 (배지6)			녹색의 금속성 광택의 보라색 집락	보라색 점액성 집락	무색 반투명 집락

완전시험

대장균군의 존재를 완전히 증명하기 위하여 위의 평판상의 집락이 그람음성, 무아포성의 간균임을 확인하고, 유당을 분해하여 가스의 발생 여부를 재확인한다.

- ⑥ 확정시험의 Endo 한천배지나 EMB한천배지에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 각각 유당배지(배지 2)발효관과 보통한천배지(배지 8)에 동시에 접종한다.
- ⑦ 35~37°C에서 48±3시간동안 배양한다.
- ⑧ 가스 발생이 일어난 유당배지발효관에 해당되는 한천배지의 집락에 대해서 다음 시험을 한다.

그람 염색 → 그람 음성, 무아포성 간균 → 완전시험 양성 → 대장균군 양성

다. 데스옥시콜레이트 유당한천 배지법

- ① 4.3 제조법에 따라 시험용액을 준비하고 일련의 10배 단계 희석액을 준비한다.
- ② 시험용액 1 mL와 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취한다.
- ③ 약 43~45°C로 유지한 데스옥시콜레이트 유당한천배지(DCLA, 배지 9) 또는 VRBA 평판배지(배지 96) 약 15 mL를 무균적으로 분주한다.
페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 회전하여 검체와 배지를 잘 혼합한 후 응고 시킨다.
- ④ 그 표면에 동일한 배지 또는 보통한천배지를 3~5 mL를 가하여 중첩 및 응고 시킨 후 배양하여 전형적인 암적색 집락 및 의심집락에 대해서 확정시험을 실시한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	의심집락 성상		
				유당분해균 (대장균)	유당분해균 (대장균군)	유당 비분해균
선택 1	DCLA(배지9)	35~37°C	24±2시간	Bile 침전이 있는 암적색 집락	Bile 침전이 있는 암적색 집락	무색 집락
	VRBA(배지96)			Bile 침전이 있는 붉은 색 집락	Bile 침전이 약간 있거나 혹은 없는 붉은 색 집락	무색 집락

확정시험

- ⑤ 전형적인 암적색의 집락을 인정하였을 때에는 1개 이상의 집락을, 의심스러운 집락 일 경우에는 2개 이상을 분리 배양을 위해 다음의 배지들 중 하나에 접종 및 배양하여, 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	의심집락 성상		
				유당분해균 (대장균)	유당분해균 (대장균군)	유당 비분해균
선택 1	Endo 한천배지 (배지5)	35~37°C	24±2시간	금색 금속성 광택의 짙은 붉은 색 집락	붉은색/분홍색 집락	무색 반투명 집락
	EMB 한천배지 (배지6)			녹색의 금속성 광택의 보라색 집락	보라색 점액성 집락	무색 반투명 집락
	MacConkey 배지(배지30)			Bile 침전이 있는 붉은 색 집락	Bile 침전이 있는 붉은 색 집락	담황색 집락

완전시험

대장균군의 존재를 완전히 증명하기 위하여 위의 평판상의 집락이 그람음성, 무아 포성의 간균임을 확인하고, 유당을 분해하여 가스의 발생 여부를 재확인한다.

- ⑥ 확정시험의 Endo 한천배지, EMB한천배지, 또는 MacConkey배지에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 각각 유당배지(배지 2)발효관과 보통한천배지(배지 8)에 동시에 접종한다.
- ⑦ 35~37°C에서 48±3시간동안 배양한다.
- ⑧ 가스 발생이 일어난 유당배지발효관에 해당되는 한천배지의 집락에 대해서 다음 시험을 한다.

그람 염색 → 그람 음성, 무아포성 간균 → 완전시험 양성 → 대장균군 양성

4.7.2 정량시험

가. 최확수법

최확수란 이론상 가장 가능한 수치를 말하여 동일 희석배수의 시험용액을 배지에 접종하여 대장균군의 존재 여부를 시험하고 그 결과로부터 확률론적인 대장균군의 수치를 산출하여 이것을 최확수(MPN)로 표시하는 방법이다. 최확수는 연속한 3단계 이상의 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 각각 5개씩(별표 1) 또는 3개씩(별표 2) 발효관에 가하여 배양 후 얻은 결과에 의하여 검체 1 mL중 또는 1 g중에 존재하는 대장균군수를 표시하는 것이다.

예로 검체 또는 희석검체의 각각의 발효관을 5개씩 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다면 최확수표에 의하여 시험검체 1 mL중의 MPN은 70으로 된다. 이 때 접종량이 1, 0.1, 0.01 mL일 때에는 70/10=7로 한다. 10, 1, 0.1 mL일 때에는 70/100=0.7로 한다.

시험용액접종량	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	MPN
가스발생양성관수	5	2	1	70

시험용액 접종이 4단계 이상으로 행하여졌을 때에는 다음 표와 같이 취급한다.

예	가스발생 양성관수				유효숫자			
	1mL	0.1mL	0.01mL	0.001mL	1mL	0.1mL	0.01mL	0.001mL
I	5	5	2	0	-	5	2	0
II	5	4	3	0	5	4	3	-
III	0	1	0	0	0	1	0	-
IV	5	3	1	1	5	3	2	-

예 I, II : 5개 양성을 표시한 최소 접종량부터 시작한다.

예 III : 양성을 인정한 접종량을 중간으로 한다.

예 IV : 최소 유효 접종량 보다 1단계 적은 접종량에서 양성을 인정한 때에는 양성을 인정한 수를 최소유효 접종량의 양성관 수에 더한다(0.001 mL 단계의 양성관의 수를 0.01단계의 양성관의 수에 더함)

1) 유당배지법

- 4.3 제조법에 따른 시료액을 연속 10배 단계 희석하여 3단계이상 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 준비한다.
* 시험용액을 가한 배지의 전부 또는 대부분에서 가스발생이 인정되거나 또 최소량을 가한 배지의 전부 또는 대부분이 가스가 발생되지 않도록 접종량과 희석도를 고려하여야 한다.
- 시험용액 5개 또는 3개씩을 유당배지(배지 2)발효관에 접종한다.
단, 10mL을 접종할 때는 2배농도 유당 배지를 사용하고, 0.1mL 이하를 접종할 때는 10배 희석단계액을 각각 1mL 씩 사용한다.
- 가스발생 발효관 각각에 대하여 추정, 확정, 완전시험을 행하고 대장균군의 유무를 확인한 다음 최확수표로부터 검체 1 mL 또는 1 g중의 대장균군수를 구한다.

2) BGLB배지법

- 4.3 제조법에 따른 시료액을 연속 10배 단계 희석하여 3단계이상 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 준비한다.
* 시험용액을 가한 배지의 전부 또는 대부분에서 가스발생이 인정되거나 또 최소량을 가한 배지의 전부 또는 대부분이 가스가 발생되지 않도록 접종량과 희석도를 고려하여야 한다.
- 시험용액 5개 또는 3개씩을 BGLB배지(배지 3)발효관에 접종한다.
단, 10mL을 접종할 때는 두배농도 유당 배지를 사용하고, 0.1mL 이하를 접종할 때는 10배 희석단계액을 각각 1mL 씩 사용한다.
- 가스발생 각 발효관에 대하여 BGLB배지에 의한 정성시험법에 따라 행하고 대장균군의 유무를 확인한 다음 최확수표로부터 검체 1 mL 또는 1 g중의 대장균군수를 구한다.

나. 데스옥시콜레이트유당한천배지법

- ① 4.3 제조법에 따른 시험용액과 각 10배 단계 희석액을 준비한다.
- ② 시험용액 각 1mL에 대하여 데스옥시콜레이트유당한천배지법의 정성시험법을 따라 조작하고 35~37°C에서 24±2시간 배양한다.
- ③ 생성된 집락중 전형적인 집락 또는 의심스러운 집락에 대하여 정성시험법에 따라 대장균군의 유무를 결정한다.
- ④ 균수 산출은 제7.4.5.1 일반세균수에 따른다.

다. 건조필름법

공전 참조

라. 자동화된 최확수법(Automated MPN)

우유류, 유당분해우유, 가공유(무지유고형분 5.5%미만인 제품 제외), 발효유류, 가공치즈, 조제유류, 분유류, 건조저장육류, 식육추출가공품, 알가열제품 검사에 한한다.