

총대장균군 측정의 정도관리에 적합한 균주의 조제

김주영¹ · 서은영¹ · 김미리¹ · 전남희¹ · 정현미² · 김명운³ · 안태석^{1*}

¹강원대학교 환경학과, ²국립환경과학원, ³대진대학교 환경공학과

정도관리는 분석 결과의 신뢰성을 높이기 위해 필수적인 과정이며, 이를 위해서는 일정한 농도의 표준시료가 필요하다. 본 연구에서는 정도관리의 정량분석을 위해 실온에서도 일정시간 개체수가 유지되는 미생물 정도관리용 표준시료를 제작하였다. 대장균으로 조제한 미생물 시료에 세포 분열을 억제하기 위해 nalidixic acid (100 µg/ml)와 cephalixin (50 µg/ml)을 첨가하였다. 이후 12시간 간격으로 acridine orange로 염색 후 현미경으로 계수하는 방법과 한천 배지에 배양하여 집락을 계수하는 평판집락계수법으로 개체수 변화를 측정하였다. 현미경 계수 결과 초기값이 3.7×10^5 cells/ml이었을 때 대장균의 개체수는 48시간 동안 $3.5 \sim 4.2 \times 10^5$ cells/ml의 범위를 보였고, 평판 집락법 결과 초기값이 1.2×10^4 CFU/ml이었을 경우에는 $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml로 조사되어 냉장 및 냉동의 필요 없이 실온에서도 48시간 동안 개체수가 비교적 안정적으로 유지되는 미생물 표준시료를 제작할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제작된 표준시료는 현재 상업적으로 판매되고 있는 표준균주 제품과 함께 정도관리의 정량분석을 위해 사용될 수 있을 것이다.

Key words □ *Escherichia coli*, quality control (QC), standard sample, total coliform

안전한 물을 공급하는 것은 중앙정부 및 지방정부의 주요한 사업이다. 안전한 물이란 물리, 화학, 생물학적으로 안전하다는 것을 의미하며, 사용목적에 따라 수질 기준을 제시하고 있다. 수질기준 뿐 아니라 모든 분석항목의 기준값은 측정된 값이 정확하다는 전제에서 의미가 있다. 1980년대 후반 카드늄 중독 환자의 요 중 카드늄 농도를 측정된 결과 분석기관마다 서로 다른 결과를 보여, 분석기관의 신뢰성 결여로 외국 분석기관에 시료를 의뢰한 사례(1) 및 1998년 호주의 시드니에서 잘못된 수질검사 결과로 불필요한 ‘끓여먹기 경고(Boiling water advisory)’가 9주간 내려져 시민들을 불안하게한 사례(2)들은 정확한 분석의 중요성을 시사한다.

따라서 분석기관마다 시험의 객관성과 신뢰성을 유지하도록 기술적, 제도적 보장이 뒷받침되어야 한다. 이를 위한 하나의 방안이 바로 정도관리(Quality Control; QC)이며 정도관리의 결과를 공인하기 위한 제도적 과정인 정정보증(Quality Assurance; QA) 프로그램이 역시 필요하다. 2007년 환경오염물질 측정에 관한 정도관리 시행 대상 분석기관은 지방 환경청과 시·도 보건환경연구원, 측정대행업소 등을 포함하여 약 1,200개기관이 선정되었다(4). 미국의 경우 독자적으로 이루어지는 연구사업마다 QA Project Plan (QAPP)를 수립하여 정도관리 및 정정보증을 평가하고 있으며(15), 실험실 및 기관에 대한 정도관리 평가를 국립 환경연구소 인증 협회(National Environmental Laboratory Accreditation Conference; NELAC)가 따로 담당하고 있다(24). 영국 역시 수행

도 평가(performance test)를 통해 정도관리가 이루어지고 있으며(14), 미생물의 정성 및 정량적 정도관리를 위해 70여 종의 동결 건조된 단일균주 및 혼합균주 세트를 표준균주로 제공하고 있다(2) 또한 호주와 뉴질랜드는 숙련도 평가를 담당하는 기관인 NATA (National Association of Testing Authorities)에 의해 정도관리 프로그램이 마련되어있다(23).

정도관리에 필요한 표준시료 가운데, 물리화학적 표준시료는 대부분 빠른 시간에 농도가 변하지 않는다. 반면에 미생물 항목 특히 세균학적 항목들은 미생물의 빠른 분열 특성을 갖고 있다. 또한 검출 및 판정 과정에서 발생하는 환경적인 스트레스나 영양물질의 고갈, 삼투압, 산화 스트레스 등이 작용하여 실제 개체수를 정확히 분석하기 어렵다(11, 25). 즉, 미생물은 수중에서 불균일하게 분포하고 시간에 따른 증식 또는 사멸이 측정 편차를 크게 만들며, 숙련된 계수 및 판정을 요구하는 어려움이 따른다. 또한 실험 결과를 분석할 때 시험자가 주관적으로 해석할 가능성이 있으므로, 시험자간의 편차가 크기 때문에 미생물학적 정도관리는 이화학적 항목에 비해 상대적으로 어렵다(8).

병원성 미생물은 수인성 질병의 발생을 유발하기 때문에 미생물 기준 항목에 대한 빠르고 정확한 판단이 매우 중요하다(22, 27). 따라서 국내의 경우 ‘측정분석기관 정도관리의 방법 등에 관한 규정’(3)이 2005년 12월에 개정되면서 미생물 항목이 새롭게 추가되었고 영국과 호주, 뉴질랜드처럼 정량분석이 가능하도록 제조하여 상업적으로 판매되고 있는 것을 표준시료로 이용하고 있다. 표준시료는 정확한 정도관리를 위해서 시험자가 알 수 없는 농도로 제조되어야 하며, 이는 시험자에게 전달하는 시간까지 일정한 신뢰범위의 개체수를 유지해야 한다. 이러한 표준시료에 대해 아직까지는 국내에서 직접 제조하는 방법에 관한 연구

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8574, Fax: 82-33-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

사례가 보도된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 시료 내에 존재하는 정확한 생균수를 재현성 있게 측정하기 위하여 세포분열억제제(bacteriostatic agents)를 사용하여 상온 조건에서도 운반할 수 있는 표준시료를 제작하는 방법을 제시하였고, 상업용으로 판매되는 표준시료와 비교하여 정도관리에 사용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

상업적 제품의 배양

시험에 이용되는 회석수 및 분석과정이 개체수 측정에 영향을 주는지 확인하기 위하여 상업적으로 정량 분석이 가능하도록 제작, 판매되는 제품(bioball, BTF, Australia)을 이용하였으며 *Escherichia coli* (참값은 30 cells/bioball)를 대상으로 하였다. 상업 제품에 대한 평가는 제품 균주를 회석수에 녹여 준비하였으며, 사용된 회석수는 1× PBS (Phosphate buffered saline), 0.9% saline buffer 및 3차 DW였다. 각 회석수 100, 20, 1 ml마다 제품을 녹여서 준비하였다. *E. coli* 개체수 측정은 현행 수질 오염 공정시험법 상의 방법(7)에 따라 최적확수 시험법(Most Probable Number; MPN), 막여과법, 주입평판법을 적용하였다. MPN법은 다람발효관을 넣어 멸균한 lactose 액체 배지(Difco, USA) 10 ml에 회석액을 10, 1, 0.1 ml씩 각각 접종하여 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 다람발효관에 기포가 생성되어 양성으로 판정된 시험관으로부터 10 µl를 취하여 다람발효관을 넣어 멸균한 BGLB (Brilliant Green Lactose Bile, Difco, USA) 액체 배지에 옮겨 35°C에서 재배양 하였다. 배양 결과 기포가 생성된 것을 대장균 양성으로 판정하고 수질오염공정시험법에 제시되어 있는 MPN 표를 이용하여 개체수를 추정하였다. 막여과법은 회석액을 cellulose nitrate 여과지(공극 0.2 µm, 직경 45 mm, Whatman, England)에 여과한 뒤, M-Endo 한천배지(Difco, USA)에 올려 35°C에서 배양 한 후 생성된 붉은색의 금속성 광택을 나타내는 집락을 계수하였으며, 평판집락법은 1 ml 회석액을 멸균된 plate에 접종한 후 멸균된 Desoxy cholate 한천 배지(Difco, USA)를 부어 배지와 접종액이 골고루 섞이도록 흔들어준 후 35°C에서 배양, 붉은색 대장균 집락수를 측정하였다.

미생물 표준시료의 제작 및 배양

정도관리를 위한 표준균주로서 대장균은 서울여자대학교 항생제 내성 균주 은행에서 *E. coli*를 분양받아 사용하였으며, Luria-Bertani (Difco, USA) 액체배지에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 것을 표준시료로 사용하였다.

시간에 따른 개체수 변화 측정

제조된 대장균 표준시료 내 초기 생균수를 유지시키기 위하여 대장균의 증식을 효과적으로 방해하는 세포분열억제제(21)인 nalidixic acid (Sigma, USA) (18, 20)와 cephalixin (Sigma, USA) (20, 29)을 동시에 첨가한 실험구와 아무 처리도 하지 않은 대조구를 비교하였다. 첨가한 nalidixic acid 및 cephalixin의 최종 농

도는 각각 100 µg/ml, 50 µg/ml로 하였다. 농도는 세포 증가 억제 효과를 48시간까지 지속시키기 위해 예비 실험을 거쳐 Joux 등(20) 및 Yokomaku 등(28)의 연구에서 사용된 농도보다 5배 높게 정하였다. 실험구는 분열억제제의 첨가 직후 배양액을 취해 acridine orange (C₁₇H₂₀Cl₃N₃Zn, Merck; 최종농도 0.1%)로 3분간 염색한 뒤 black polycarbonate 막 여과지(Milipore, 공극 0.2 µm, 직경 25 mm)에 여과하여 형광현미경(Olympus BX60, Exciting filter B)으로 계수하는 AODC (Acridine Orange Direct Count)법(19)으로 개체수를 확인하였으며, 이를 초기 개체수(t₀값)로 정하였다. 이후 48시간 동안 실온에 방치 하면서 12시간 단위로 배양액을 취하여 시간의 경과에 따른 개체수 변화를 측정하였다. 개체수 측정은 AODC법과 배양액을 EC 한천배지에서 재배양하여 형성된 콜로니를 계수하는 평판집락법을 이용하였다. 한편, 아무런 처리도 하지 않은 대조구 역시 동일한 방법으로 개체수를 확인하였다. 모든 실험은 3회씩 반복하여 실시하였다.

결과 및 고찰

상업적 제품에 대한 평가

대장균 공시균주의 상업적 제품(30 cells/bioball)에 대해 최적확수 시험법(MPN)법을 적용한 결과 회석수에 따라 22±4~50±20 MPN/bioball로 신뢰성 있는 결과를 얻지 못하였으며, 막여과법의 경우 회석수마다 오차가 크지 않은 27±1, 30±1 CFU/bioball로 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 박 등(6)의 연구에서도 유사하게 나타났다. 즉, 막여과법으로 실험했을 때 측정된 값이 참값의 93~95.1% 범위이었으나, 최적확수 시험법의 경우 160~180%의 범위로 크게 벗어나서 위양성이 높은 것으로 나타났다. Edberg 등(13) 역시 최적확수 시험법의 경우, 시료 내에 개체수가 많을 경우 유효범위 내의 결과가 나올 때까지 여러 단계의 회석과정을 거쳐야 하기 때문에 종종 위양성 및 위음성에 의한 변칙적인 결과가 발생한다고 주장하였다.

한편, 평판집락법으로 배양한 경우, 제품을 3차 DW로 용해시켜 사용했을 때는 29±2 CFU로 비교적 정확하게 조사된 반면 0.9% saline buffer와 1× PBS에 용해한 경우에는 각각 21±4, 14±10 CFU로 상당히 낮은 값을 나타냈다(Table 1). 실험 결과 3차 증류수를 사용했을 때 대체로 참값에 근사한 결과를 얻을 수 있었으나 실험 방법 간에 차이를 보여 회석수 자체의 영향은 크지

Table 1. Comparison of measured values of *E. coli* cell numbers that dissolved commercial standard microbial sample^a in each solution by three methods. n=3^b.

Methods	Solution		
	0.9% Saline buffer	1× PBS	3 DW
MPN method (MPN)	22±4	50±10	50±20
Membrane filtration method (CFU)	27±1	30±1	27±1
Pour plate method (CFU)	21±4	14±7	29±2

^a Standard sample: *Escherichia coli* true value=30 cells, BTF.

^b n=3: Each sample was triple repeat measured.

않은 것으로 판단되었다. 한편 세 가지 배양법 중 막여과법을 적용했을 때 가장 정확한 결과를 얻을 수 있었다.

공시균주 *Escherichia coli*의 관찰

이 연구에서는 표준시료의 운반과 조작과정동안 실온에서도 안정적인 생균 개체수를 유지할 수 있는가를 확인하기 위하여 세포분열억제제를 첨가하였다. 이는 환경 시료 중 활성세균을 측정하는 DVC (direct viable count)법에서 살아있는 세균의 세포분열을 저해하기 위해 항생물질을 첨가한 방법을 이용한 것이다. 사용된 세포분열억제제의 종류는 DVC 시험을 위해 Joux 등(20)이 제안한 antibiotic cocktail 가운데 대장균에 대한 억제효과가 높은 nalidixic acid와 cephalexin을 선정하였다. Nalidixic acid는 그람음성 세균의 DNA 합성을 방해하는 물질로(17), 특히 *E. coli*에 대해 99%의 억제능을 가지며, *Klebsiella*, *Enterobacter aerogenosa* 등 coliform 세균에 대해서도 높은 억제효과가 있다(18). 또한 cephalexin은 세포질막(cytoplasmic membrane)의 분해를 저해함으로써 세포의 분열을 막는 것으로 알려져 있다(20).

세포분열억제제 첨가 후 최초의 집종량은 AODC법 기준으로 6.6×10^4 , 3.7×10^5 , 4.5×10^6 cells/ml이었으며, 평판도말법 기준으로는 5.3×10^2 , 3.4×10^3 , 1.2×10^4 CFU/ml이었다. 아무것도 처리하지 않은 대조구와 세포분열억제제를 첨가한 실험구를 동일한 조건에서 배양하여 현미경으로 관찰했을 때 대조구는 개체수가 크게 증가한 반면, 분열억제제를 첨가한 시료에서는 세포의 크기만 증가되었을 뿐 세포분열은 일어나지 않았음이 확인되었다(Fig. 1). 또한 acridine orange로 염색한 결과 대조구는 초록색으로, 실험구는 주황색으로 염색이 되었는데, Hobbie 등(19)의 연구에서 RNA 함량이 많아 활성이 높은 세포는 붉은색으로, 활성이 낮은 세포는 녹색으로 보인다고 보고하여, 세포분열억제제를 첨가하는 방법은 세포의 활성은 그대로 유지시키면서 증식만을 차단할 수 있는 방법임을 알 수 있었다. 개체수 변화는 대조구의 경우 시간에 따라 크게 증가하였으나, 실험구의 경우 초기에 3.7×10^5 cells/ml이던 것이 48시간이 경과 후 까지 $3.5 \sim 4.2 \times 10^5$ cells/ml로 큰 차이를 보이지 않았다. 평판배양법에 의한 결과 역시 접종시료 1 ml 당 개체수가 1.2×10^4 cells였을 때 배양시간에 따른 변화는 $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml로 대장균의 증가가 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

이러한 분열억제제의 첨가 방법은 조작이 간편하고 시료를 실온에서도 보관이 가능하다는 장점이 있다. 이렇게 제작된 시료의 개체수를 시간에 따라 측정된 결과, 대장균의 경우 nalidixic acid와 cephalexin을 각각 $100 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ 로 주입했을 때 실온에서 48시간동안 개체수의 변화가 평균적으로 92~111%의 정확도를 보여 비교적 일정하게 유지되는 것으로 확인되어 정도관리에 적합한 시료를 제작할 수 있었다. 이는 세포분열억제제를 첨가함으로써 실온에서도 개체수가 비교적 안정적인 미생물 표준 시료를 제작할 수 있게 되었다는 것에 본 연구의 의의가 있다. 또한 본 연구에서 제조한 표준시료는 제조하는 자가 세포분열억제제를 첨가하기 전 배양 시간을 조절함으로써 표준시료 내 미생물의 밀도를 조절 할 수 있다. 따라서 실제 환경에서 많은 양이

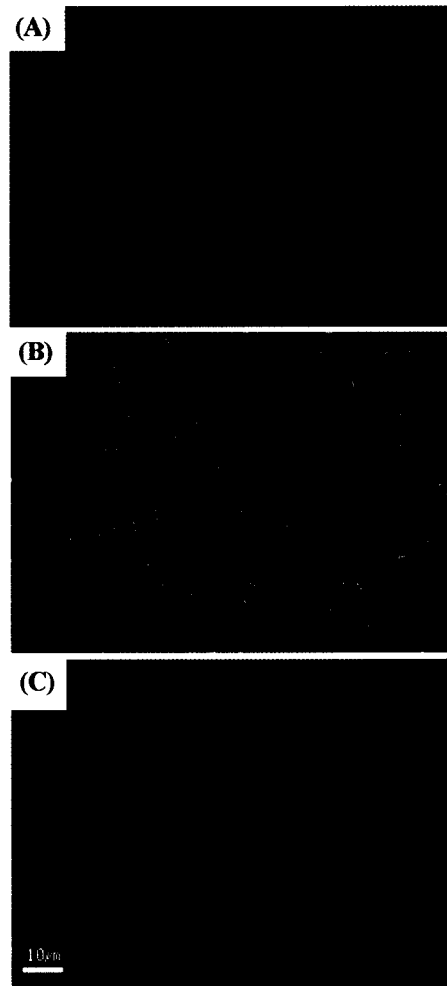


Fig. 1. The images of AODC-stained *E. coli* before incubation at room temperature (A), after 48 hr incubation without bacteriostatic agent (B) and with bacteriostatic agent (nalidixic acid $100 \mu\text{g/ml}$ and cephalexin $50 \mu\text{g/ml}$) (C). Fluorescent microscope: Olympus BX60, Exciting filter B, bar= $10 \mu\text{m}$

존재하는 총대장균군의 정도관리에 더욱 적합할 것이라고 판단된다. 즉, 홍천강, 가평천 등의 유원지 주변에서 여름철 총대장균군 수는 $2.1 \times 10^3 \sim 3.1 \times 10^4$ cells/100 ml의 수준으로 매우 높게 조사되었는데(9), 이는 정확한 정도관리를 위해서는 일정수준의 고농도 표준시료가 필요함을 의미하므로 총대장균군 정도관리에 유용하게 사용될 수 있다.

한편, 배양법에 의한 결과는 현미경 계수 값에 비해 매우 낮게 측정되었는데 이러한 결과는 세균에게 알맞은 배지 조성이 어렵고, 배양환경이 자연환경을 정확하게 재현하지 못하기 때문에 발생할 수 있다(10). 이러한 배양법의 한계는 미생물의 정량분석의 한계점이 되므로 정도관리 자체에 문제점으로 작용할 가능성이 있으며 정량적 정도관리과정에서 참값에 대한 오차를 크게 하는 원인이 될 수 있다고 사료된다.

물 분야에서 미생물 검사는 이용자의 안전을 위한 가장 기초적인 관리단계이며 세균에 의한 질병은 단기간에 일어날 수 있

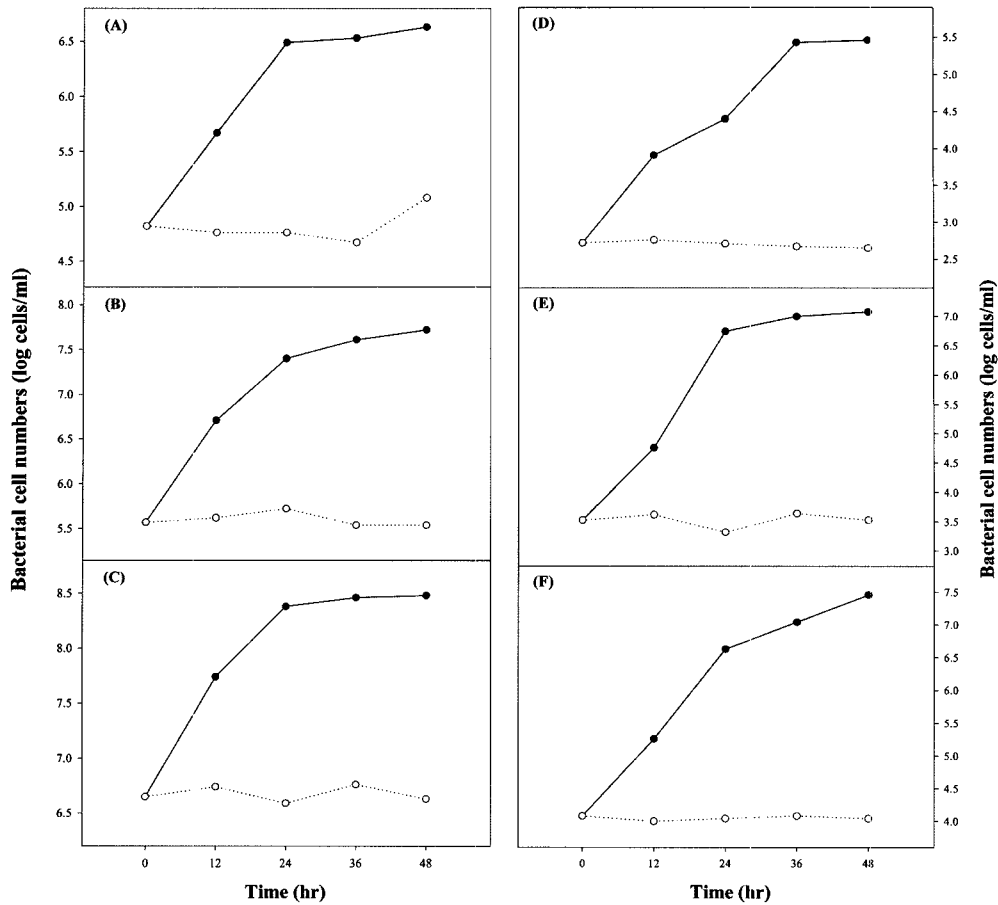


Fig. 2. Effects of inhibition of cell division by bacteriostatic agents. The number of *E. coli* by acridine orange direct counting (AODC) method (A~C) and plate count method (D~F). Initial concentration of (A) 6.6×10^4 cells/ml, (B) 3.7×10^5 cells/ml, (C) 4.5×10^6 cells/ml, (D) 5.3×10^2 CFU/ml, (E) 3.4×10^3 CFU/ml, (F) 1.2×10^4 CFU/ml. Symbol (●) Incubation without bacteriostatic agents (control), (○) Incubation with bacteriostatic agents.

기 때문에 분석의 정확성이 매우 중요시된다. 유럽의 경우 위락 용수에 대해서 물리화학적 변수와 미생물학적 변수, 살충제나 중금속 등 오염지표로 중시되는 물질을 포함하여 총 19개 수질 기준 항목을 2006년 개정시 *E. coli*와 장구균(enterococci) 두 항목으로 축소한 것(16)은 미생물학적 분석이 얼마나 중요한가를 단적으로 말해주고 있다.

또한 국내에서는 2007년 9월에 ‘환경측정분석기관 정도관리 운영지침’(5)을 통해 수질분야에서는 총대장균군, 먹는물 분야에서는 분원성대장균, 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*)에 대한 정도관리 방안이 마련되어 미생물에 관한 정도관리는 이제 시작 단계에 있다. 이는 국민건강 상의 위해요소로서 병원성 미생물에 대한 관심이 증대되고 있을 뿐 아니라 세균 항목이 수질 환경의 기준 및 규제수단으로서 점차 중요성을 띠는 현실을 뒷받침한다. 따라서 시험자의 숙련도 검사를 통한 정성 및 정량분석이 뒷받침 되어야 한다.

한편, 이러한 정량적인 정도관리를 위해 Schijven 등(26)은 동결방지제를 넣어 -70°C로 급랭하여 보관했다가 시험 전에 37°C

로 온도를 빠르게 상승시키는 기술을 이용하여 미생물 개체수를 유지시킬 수 있는 방법을 제안하였다. 그러나 이 방법은 시료를 -70°C의 냉동상태로 보관하고 수송하여야 하는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 미생물 배양액에 분열억제제를 첨가하였으며, 표준시료의 개체수를 실온에서도 일정하게 유지시킬 수 있었다.

현재 숙련도 검사를 위한 정도관리 표준시료로 이용되고 있는 상업적 제품뿐 아니라 본 연구를 통해 제작된 표준시료를 이용한다면 다양한 개체수를 갖는 미지의 시료에 대한 참값을 검출할 수 있는가에 대한 정량적인 정도관리를 이행할 수 있을 것이다. 따라서 정도관리용 미생물 표준시료를 신속히 마련하여 국내 측정기관의 정도관리 및 정도보증에 활용하여야 한다. 한편, 분열억제제를 첨가하는 방법은 표준시료의 제조시에만 아니라, 환경시료의 변질을 최소화하고 보존 기간을 연장시켜 주는 방법으로도 활용 가능할 것으로 보인다. 즉, 분석 기관에서는 시료의 채취시 현장에서 세포분열 억제제를 첨가하는 간단한 조작만으로도 환경 시료 내 미생물 농도를 유지시킬 수 있으므로 시료의 보존

을 용이하게 하는 유용한 방법으로도 활용 될 수 있을 것으로 해석된다.

감사의 말

이 연구는 국립환경과학원의 2004년도 과제로 수행되었음.

참고문헌

- 강성규, 양정선, 이미영, 박인정, 정호근. 2000. 5년간 특수건설강진단기관 분석정도관리 결과 분석. 대한산업의학 회지 12, 139-147.
- 국립환경과학원. 2004. 공정시험법 세균항목의 정도관리 방안.
- 국립환경과학원. 2005. 측정분석기관 정도관리의 방법 등에 관한 규정. 국립환경과학원 고시 제 2005-18호.
- 국립환경과학원. 2007. '07년 정도관리 실시계획.
- 국립환경과학원. 2007. 환경측정분석기관 정도관리 운영 지침.
- 박상정, 김종민, 양상용, 원성민, 정향희, 박상희. 2006. 수질오염공정시험법 중 총대장균군 분석방법인 시험관법 및 막여과법과 효소발색법과의 비교. 한국물환경학회. 대한상하수도학회 공동춘계학술발표회 논문집 428-435.
- 수질오염공정시험법. 제 37항 대장균군.
- 이목영, 조은주, 변승현, 이은숙, 최선영, 박부신. 2002. 수도관련 원생동물 및 지표세균 검사의 정도관리. 한국상하수도협회. 상수도 연구·검사기관 협의회 연구 발표회 논문집 245-261.
- 환경부. 2007. 안전한 물놀이 수질기준 및 관리방안 연구 보고서 111-112.
- Amann, R., I. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Boucher, S.N., E.R. Slater, A.H. Chamberlain, and M.R. Adams. 1994. Production and viability of coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 303-307.
- Clancy, J.L. 2000. Sydney's 1998 water quality crisis. *J. AWWA* 92, 55-66.
- Edberg, S.C., M.J. Allen, and D.B. Smith. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1595-1601.
- Environment agency. 2002. The microbiology of drinking water: Methods for examination of waters and associated materials.
- EPA. 1996. The volunteer monitor's guide to quality assurance project plans. EPA 841-B-96-003. 3-14.
- EU. 2006. Directive 2006/7/EC of the european parliament and of the council of 15 February 2006. Concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. 37-51.
- Goss, W.A., W.H. Deitz, and T.M. Cook. 1964. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 88, 1112-1118.
- Grover, G and S.G. Kini. 2006. Synthesis and evaluation of new quinazolone derivatives of nalidixic acid as potential antibacterial and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* 41, 256-262.
- Hobbie, J.E., R.F. Daley, and S. Japer. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- Joux, F. and P. LeBaron. 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3643-3647.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 415-420.
- Kramer, M.H., G. Quade, P. Hartemann, and M. Exner. 2001. Waterborne diseases in Europe-1986-96. *J. Am. Water Works Assoc.* 93, 48-53.
- NATA. 2004. Guide to NATA proficiency testing, Version 1. National association of testing authorities. ACN 004 379 748.
- NELAC. 2002. Program policy and structure. Revision 15. National environmental laboratory accreditation conference. July 12, 2002. Tampa. USA.
- Rollins, D.M. and R.R. Colwell. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 531-538.
- Schijven, J.F., A.H. Havelaar, and M. Bahar. 1994. A simple and widely applicable method for preparing homogeneous and stable quality control samples in water microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4160-4162.
- Theron, J. and T.E. Cloete. 2002. Emerging waterborne infections: Contributing factors, agents, and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 1-26.
- Yokomaku, D., N. Yamakuchi, and M. Nasu. 2000. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5544-5548.
- Wick, W.E. 1967. Cephalixin, a new orally absorbed cephalosporin antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* 15, 765-769.

(Received November 26, 2007/Accepted March 6, 2008)

ABSTRACT: Production of Standard Sample for Quality Control of Total Coliform

Ju-Young Kim¹, Eun-Young Seo¹, Mi-Ree Kim¹, Nam-Hui Jeon¹, Hyen-Mi Chung², Myeong-Woon Kim³, and Tea-Seok Ahn^{1*} (¹Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea. ²National Institute of Environmental Research, ³Department of Environmental Engineering, Daejin University Kyunggido 487-711, Republic of Korea)

Standard sample for quality control of total coliform measurement was procured by addition of nalidixic acid and cephalixin as bacteriostatic agents to *Escherichia coli* cultured broth. After making the standard sample, the number of *E. coli* was measured by fluorescence microscopic count method and plate count method by 12 hr interval. The numbers of *E. coli* remained unchanged for at least for 48 hr at room temperature which ranged from 3.5 to 4.2×10⁵ cells/ml and from 1.0 to 1.2×10⁴ CFU/ml by direct fluorescence microscopic count method and plate count method, respectively. This result suggests that microbial standard sample with bacteriostatic agents of nalidixic acid and cephalixin is usable for quantitative quality control.