

효소발색법을 이용한 대장균 및 총대장균군 신속 검사

이근현 · 김훈수 · 김병렬 · 이승희* · 인치경** · 박경량***†

(주)휴마스 부설연구소

*한국생명공학연구원 바이오산업화 공정개발센터

**충남보건환경연구원 폐기물분석과

***한남대학교 생명공학과

Fluorogenic and Chromogenic Assay for Rapid Detection of *Escherichia coli* and Total Coliform Bacteria

Keun-Heon Lee · Hun-Soo Kim · Byong-Ryol Kim · Seung-Hui Lee* · Chi-Kyung In** · Kyeong-Ryang Park***†

Research Center, Humas Co., Ltd.

*Biotechnology processs engineering center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

**Waste Analysis Section, Chung-Nam Institute of Health and Environment

***Department of Biotechnology, Hannam University

(Received 28 November 2008, Revised 20 January 2009, Accepted 29 January 2009)

Abstract

We developed the Eco medium for *Escherichia coli* and total coliforms, which was modified by Violet Red Bile (VRB) medium, and derived the standard curve of exponential phase at OD₄₁₀ by using type strains such as *E. coli* ATCC11303, *Enterobacter cloacae* KCTC2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC2241, and *Citrobacter freundii* KCTC2359. Also, we used total 93 samples of spring and stream water to compare the detection ability of total coliforms between the method using Eco medium and such as most probable number (MPN), and plate count methods. As a result, the qualitative analysis of *E. coli* and total coliforms using Eco medium contained ortho-nitrophenyl-β-galactoside (ONPG) and 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) was same as those of Korean standard methods (Colilert kit). And the colony forming unit (CFU) detected in Eco medium was similar to those of result from MPN and plate count methods. Moreover, the agreement, sensitivity, and specificity of the developed kit was more than 97.5% in comparison with Colilert kit for 350 samples. Thus, the Eco medium can be used both qualitative and quantitative analysis of *E. coli* and total coliforms.

keywords : Assay, Chromogenic, *E. coli*, Fluorogenic, Kit, Total coliforms

1. 서론

우리나라 먹는물 수질공정시험법에는 총 대장균군과 대장균을 검사하는 방법으로 효소발색법이 등재되어 있으며 이 검사법에 의하면 “배지는 검사의 정확도와 재현성을 위하여 상품화된 배지[Colilert(Idexx Laboratory) 또는 이와 동일하게 입증된 상품]을 사용한다”고 적시되어 있다. 효소 발색법은 대장균과 총대장균군에 특이적으로 존재하는 효소와 반응하는 기질을 이용하여, 이 기질이 가수분해되는 과정에서 발생하는 색깔이나 형광 변화를 측정함으로써 검출하는 방법이다. 여기서 총대장균군은 β-D-galactosidase 효소를 발현하는 세균으로 정의되고, 대장균은 β-D-glucuronidase 효소를 발현하는 세균으로 정의된다. 따라서 이들 효소에 특이적으로 반응하는 기질을 선별하고, 특히 반응 결과를 쉽게 판독하기 위하여 반응 후 산물이 색깔이나 형

광 변화를 일으키는 기질을 선별하여 이용한다. 최근의 대장균 및 총 대장균군 검출을 위한 방법 개발에 대한 연구는 이러한 기질의 개발에 초점이 모아지고 있다. 일반적으로 총 대장균군은 β-galactosidase의 발색/형광기질로 알려진 5-bromo-4-chloro-3-indolylbeta-D-galactopyranoside(X-gal, 녹색), ortho-nitrophenyl-β-galactoside(ONPG, 노란색), 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside(MUGal, 형광), 3,4-cyclohexenoesculetin-β-D-galactopyranoside(S-Gal, 흑색)을 이용하고(Edberg et al., 1989; Kilian and Bulow, 1976; Le Minor, 1979; Venkateswaran et al., 1996), 대장균의 경우 β-glucuronidase라는 구성효소를 가지고 있으므로 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide(MUG, 형광), 5-brom-4-chloro-3-indol-β-D-glucuronide cyclohexylammonium salt (XGlcA, 녹색)을 이용할 수 있다(Clark et al., 1991; Edberg and Kontnick, 1986; Feng and Hartman, 1982; Koburger and Miller, 1985; Moberg et al., 1988; Poelma et al., 1987; Rice et al., 1991). 그리고 먹는물 수질공정시험법에 등재된 Colilert 키트의 경우 MUG와 ONPG를 기질로 하는 배

† To whom correspondence should be addressed.

krpark@hnu.kr

지를 이용한다. 즉 β -galactosidase를 생산하는 총대장균군이 시료내에 존재할 경우 기질로 ONPG를 첨가하면 O-nitrophenol로 분해되어 노란색을 나타내고, β -glucuronidase를 생산하는 대장균은 MUG를 4-methylumbelliforone으로 분해하며 형광을 나타낸다. 따라서 이런 효소발색을 이용한 Colilert는 시험 방법이 간단하고 검사시간이 짧은 장점으로 널리 이용되고 있다.

본 연구는 효소 발색법을 이용하여 수중의 대장균과 총대장균군을 신속하게 검사할 수 있는 검사 키트를 개발하는 것에 목적이 있다. 이를 위하여 대장균과 총대장균군의 성장이 우수한 Eco 배지를 개발하여 그 성능을 우리나라의 수질 공정시험법인 최확수(most probable number, MPN)와 평판배양법과 비교하였다. 또한 개발된 Eco배지에 ONPG와 MUG를 첨가하여 검사키트를 양산한 후 공정시험법상의 Colilert 키트와 비교 시험하여 대장균 및 총 대장균군 검사키트로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1. 배지 선정

그람 양성세균인 *Bacillus subtilis* ATCC168과 대장균인 *Escherichia coli* ATCC11303, 총 대장균군인 *Enterobacter cloacae* KCTC2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC2241, *Citrobacter freundii* KCTC2359, 그리고 그람음성세균인 *Acinetobacter calcoaceticus* KCTC2357를 공시균주로 하여 35°C에서 배양하며 실험에 이용하였다. 배지는 예비실험을 통하여 Yeast Trypton Sodium chloride(YTS), Eosine Methylene Blue Agar(EMB) 및 Violet Red Bile Agar(VRB)의 3종으로 실험하였고(Atlas, 2004), 이들 배지들을 개량하여 최종적으로 Eco 배지를 개발하였다. 발색 정도는 육안과 410 nm와 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 OD측정은 UV-Visible spectrophotometer(UV-3300, Humas, Korea)로, 형광은 형광분석기(DyNA Quant 200, Amersham, USA)를 이용하여 측정하였다(Park et al., 1995).

2.2. 검사키트 제조 및 감도 조사

개발된 Eco 배지에 일정량의 ONPG와 MUG를 첨가하여 대장균검사키트를 제조하였다. 검사키트는 배지를 동결건조(Freezon 4.5, Labconco, USA)하여 제조하였으며 플라스틱 병에 담아 키트화 하였다. 이때 첨가되는 ONPG와 MUG는 막자 사발에 갈아 매우 소량을 첨가하였기 때문에 물에서도 잘 용해되었고, 키트의 감도는 공시균주를 35°C에서 18시간 배양한 후 멸균 생리식염수에서 단계적으로 희석하여 반응성을 조사하였다. 또한 93개의 물 시료를 이용하여 개발키트와 공정시험법인 Colilert 키트와의 정성 검사와 Eco 배지에서 배양한 균수와 MPN과 평판배양법으로 정량 검사한 결과를 비교하였다.

2.3. 양산 검사키트의 공정시험법(Colilert 키트)과의 정성 결과 비교

개발된 Eco배지에 ONPG와 MUG를 첨가하여 대량으로 키트를 제조하였다. 1회 제조 시 건조중량 기준 약 30 kg의 배지로 검사키트를 제조하고, 이 키트를 최대한 다양하게 준비한 350개의 물 시료를 사용하여 공정시험법인 Colilert 키트와 비교시험을 수행하였다. 개발된 키트와 공정시험법의 Colilert 키트를 이용하여 검사한 후 대장균과 총대장균군 2종에 대해 비교실험을 실시하며 agreement와 sensitivity 그리고 specificity를 %로 구하였다. 이때 Agreement는 Colilert와 동일하게 판별되는 일치도를 의미하며, 개발된 키트와 Colilert 키트가 모두 양성인 시료수를 a로, 개발된 키트는 양성이지만 Colilert 키트는 음성인 시료수를 b로, 개발된 키트는 음성이지만 Colilert 키트는 양성인 시료수를 c로, 개발된 키트와 Colilert 키트가 모두 음성인 시료수를 d로 표시할 때, Agreement는 $(a+d)/(a+b+c+d)*100$ 으로, Sensitivity는 $a/(a+c)*100$ 으로, Specificity는 $d/(b+d)*100$ 으로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 배지 선정

대장균 배양에 일반적으로 사용되는 YTS, EMB 및 VRB 배지에 그람 양성균인 *B. subtilis* ATCC168과 대장균인 *E. coli* ATCC11303와 총 대장균군인 *E. cloacae* KCTC2361, *K. pneumoniae* KCTC2241, *Citrobacter freundii* KCTC2359 그리고 그람음성세균인 *A. calcoaceticus* KCTC2357를 접종하여 35±2°C에서 18시간동안 배양한 결과, 3종류 배지 모두에서 대장균과 총 대장균군 만이 잘 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 ONPG 및 MUG와의 반응성을 확인하기 위하여 대장균인 *E. coli* ATCC11303와 총 대장균군인 *E. cloacae* KCTC2361, *K. pneumoniae* KCTC2241, *C. freundii* KCTC2359를 35°C에서 배양한 후, 배양액(OD₄₁₀≈1.2)을 멸균 생리 식염수에 단계적으로 10배, 100배, 1,000배 10,000배 희석하여 균체의 양을 변화시키고 배지에 ONPG 단독, MUG 단독, 그리고 ONPG와 MUG혼합의 3종류 시약을 첨가한 후 18시간 배양한 결과, 희석배율에 따라 OD₄₁₀이 급격히 낮아지고 노란색 발색이 일어나는 것을 확인하였다. 그러나 VRB 및 EMB배지에서는 배지에 함유되어 있는 색소 성분 때문에 균체량이 비교적 많은 10배 희석시료에서도 육안으로는 구별이 어려웠고, EMB 배지 경우 색소를 제거하면 그람 양성균을 효과적으로 성장 억제할 수 없어 EMB 배지는 대장균 및 총 대장균군 검사에 부적합한 것으로 판단되었다. 그 반면 crystal violet과 neutral red가 제거된 VRB 배지의 경우 그람양성균의 영향을 크게 받지 않아 색소를 제거한 VRB배지는 대장균과 총 대장균군 검출 배지로 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 VRB 배지에서 색소를 제거하고, 일부 성분을 첨가, 조정하여, 변형된 VRB배지인 Eco 배지를 개발하였다. 그 결과 원래의 VRB 배지를 사용하여 18시간 배양할 경우 10배 희석한 배양액의 OD₄₁₀값이 0.3~0.7 정도였으나, Eco 배지의 경우 약 0.7~1.0을 나타내어, Colilert-18을 이용했을

매(Fricker et al., 1997)의 결과와 동일한 결과를 나타냄을 확인하였다.

또 YTS배지와 Eco배지를 비교하기 위하여 균주 배양액을 최대 10⁻¹⁵배까지 희석하여, MUG 및 ONPG가 첨가된 YTS배지와 Eco배지에 접종한 후 최대 24시간 까지 배양하면서 OD₄₁₀과 OD₆₀₀을 측정하였다. 그 결과 12시간 배양한 경우 Eco배지는 대장균이 10⁻¹¹, 총대장균군은 10⁻¹⁰까지 그리고 YTS배지는 대장균이 10⁻⁹, 총대장균군은 10⁻⁸까지 희석한 배지에서 유의하였고 24시간 배양 후에는 Eco는 대장균과 총 대장균군 모두 10⁻¹¹, YTS는 모두 10⁻¹⁰까지 희석한 배지에서 유의하여 YTS배지 보다 Eco 배지가 이들 세균의 발색반응 감도가 우수한 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

3.2. 키트 제조

Eco배지에 MUG와 ONPG를 첨가시킨 후 약 5시간 동안 충분히 용해시키고, 이 용액을 동결건조기에 넣고 약 24시간 동안 건조하였다. 건조된 분말은 과립형태의 다공성으로 동결건조 전보다 물에 쉽게 용해되었다(Fig. 1(a)). 그러나

건조된 배지 분말은 냉장보관하거나 통에 넣어 보관하지 않으면 수분과 반응하여 수일 내에 변색되는 문제점이 있어, 건조된 분말은 기밀성 있는 투명 플라스틱 병에 넣어 보관하며(Fig. 1(b)), 이 병에 직접 검사할 시료를 부어 사용할 수 있도록 하였다. 키트의 정성적 이용방법은 배지 선정 시 결정된 시료와 배지의 비율을 기준으로 플라스틱 병에 100 mL의 물 시료를 넣고 흔들어서 용해하고, 35°C에서 24시간동안 배양한 후 노란색 발색(대장균)이나 365 nm의 자외선을 시료에 조사하였을 때 형광(대장균)이 나타나는 것을 육안으로 확인하는 방법으로 결정하였다. 검사 시료 주입 후 배양 전의 키트, 총 대장균군이 양성으로 판별된 시료 및 음성 판별된 시료, 그리고 대장균이 양성으로 판별된 시료의 예를 Fig. 2에 나타내었다.

개발된 키트의 반응성을 확인하기 위하여 공시균주를 배양하여 멸균 생리 식염수로 10⁻⁹~10⁻¹³배로 희석한 시료를 ONPG와 MUG가 첨가된 개발 키트에 100 mL씩 주입하고 흔들어서 용해시킨 후 35°C에서 24시간동안 배양하며 OD₆₀₀을 측정하고, 배양 시간에 따른 흡광도 측정결과를 Fig. 3

Table 1. Absorbance measured after 12 and 21 hours incubation for Eco and YTS media

Media	<i>E. coli</i>					Total coliforms				
	Dilution Rate	410 nm		600 nm		Dilution Rate	410 nm		600 nm	
		12hrs	21hrs	12hrs	21hrs		12hrs	21hrs	12hrs	21hrs
Eco	10 ⁻⁹	3.024	3.012	2.955	2.823	10 ⁻⁹	2.48	3.012	2.478	2.823
	10 ⁻¹⁰	3.024	3.313	2.83	2.948	10 ⁻¹⁰	2.07	2.836	2.201	2.726
	10 ⁻¹¹	2.003	2.711	1.969	2.647	10 ⁻¹¹	0.216	2.836	0.138	2.384
	10 ⁻¹²	0.555	0.058	0.472	0.045	10 ⁻¹²	0.101	0.083	0.058	0.055
	10 ⁻¹³	0.046	0.069	0.031	0.046	10 ⁻¹³	0.074	0.07	0.049	0.048
	10 ⁻¹⁴	0.043	0.064	0.03	0.045	10 ⁻¹⁴	0.067	0.073	0.053	0.049
	10 ⁻¹⁵	0.03	0.055	0.022	0.037	10 ⁻¹⁵	0.048	0.06	0.033	0.044
YTS	10 ⁻⁹	1.677	3.321	0.969	2.952	10 ⁻⁹	0.851	3.32	0.521	2.952
	10 ⁻¹⁰	0.222	3.321	0.151	3.128	10 ⁻¹⁰	0.32	3.321	0.172	3.128
	10 ⁻¹¹	0.009	0.018	0.012	0.008	10 ⁻¹¹	0.006	0	0.001	0
	10 ⁻¹²	0.003	0.002	0.01	0	10 ⁻¹²	0.009	0.002	0.002	0
	10 ⁻¹³	0.013	0.293	0.007	0.241	10 ⁻¹³	0.91	0	0.978	0
	10 ⁻¹⁴	0.003	0.009	0.004	0.005	10 ⁻¹⁴	0.009	0.003	0	0
	10 ⁻¹⁵	0.012	0.005	0.004	0	10 ⁻¹⁵	0	0	0	0



(a)



(b)

Fig. 1. Photography of the developed kit and freeze dried medium. (a) freeze dried medium, (b) developed kit

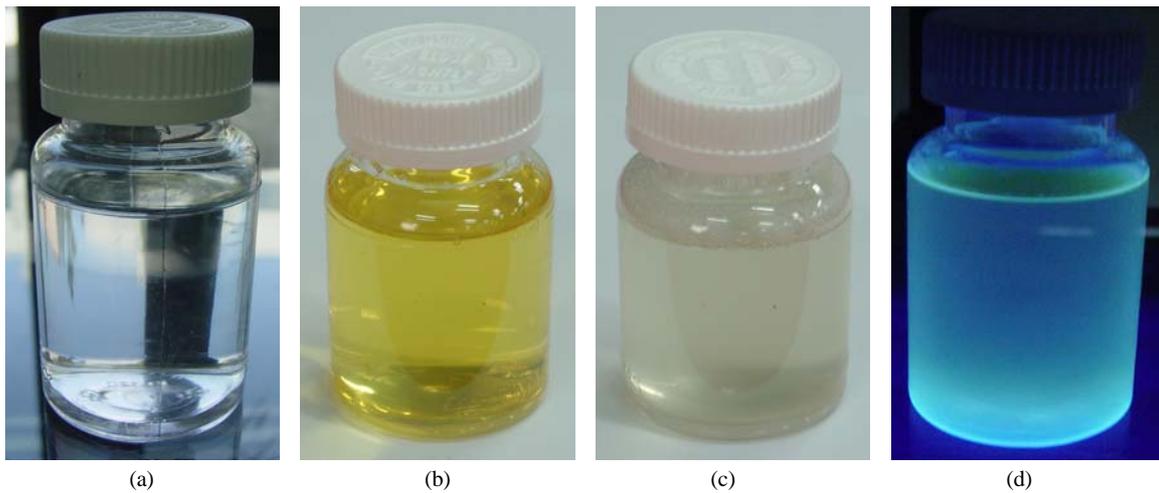


Fig. 2. Photography of the developed kit. (a) before incubation, (b) total coliforms positive after incubation, (c) total coliforms negative after incubation, (d) *E. coli* positive after incubation.

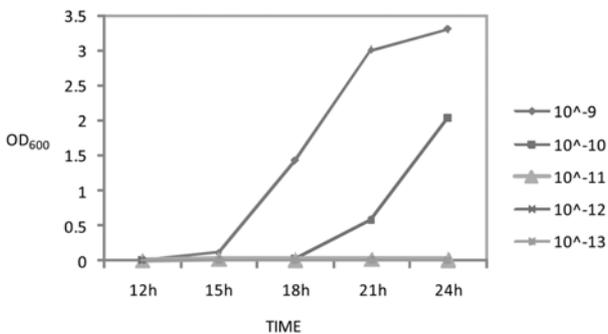


Fig. 3. Absorbance (600 nm) of *E. coli* by incubation time.

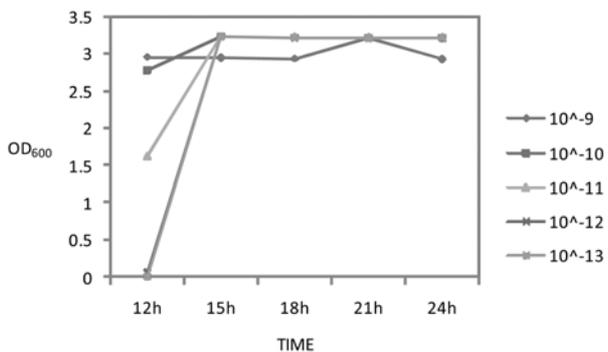


Fig. 4. Absorbance (600 nm) of total coliforms by incubation time.

과 4에 나타내었다. 그리고 대조실험으로 Colilert 키트를 이용하여 실험하였다. 육안 관찰 결과 본 키트나 Colilert 키트나 모두 10⁻¹¹배 이상 희석되면 음성으로 판별되었으며 그 이하의 희석배율에서는 모두 노란색으로 발색되어 양성으로 판별되었다. 그리고 개발 키트에서 10⁻¹⁰배로 희석된 시료의 경우 15시간만 배양하여도 높은 흡광도 값을 나타내고, 10⁻⁹배로 희석된 경우는 11시간 배양하여도 유의한 흡광도 값을 측정할 수 있었다. 즉 개발된 키트와 Colilert 키트의 양성 및 음성의 판별, 정성적인 면에 있어서는 동일하였으나, 희석된 시료를 3회 반복하여 실험하여 흡광도

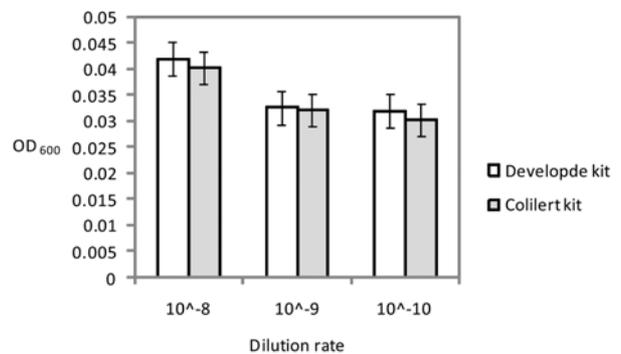


Fig. 5. Sensitivity of the developed and Colilert kit by spectrophotometer (OD₆₀₀).

를 비교할 때 개발키트의 흡광도가 더 높아 Colilert 키트보다 감도가 좋은 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 일반적으로 키트의 경우 동결건조 후 보관 상태에 따라 다소 감도가 낮아지는 경우가 있으므로 개발된 키트가 Colilert 키트보다 감도가 높다고 단정 지을 수는 없으나 Colilert 키트와 동등이상의 감도를 가지고 있는 것으로 판단된다.

3.3. 흡광도와 균체수와의 상관성

대장균 및 총 대장균군을 Eco 배지로 배양한 후 측정된 흡광도와 균체수의 상관관계를 확인하여 배양 후 흡광도를 측정함으로써 대장균 및 총 대장균군을 정량 분석할 수 있는지 가능성을 조사하고자 하였다.

대장균과 총 대장균군을 Eco배지로 배양한 후 흡광도를 측정하고 또 동일 시료에 대해 공정시험법의 여러 가지 분석법으로 대장균 및 총 대장균군을 검사하여 비교하였다. 균주의 초기 접종량을 1,000 CFU/mL 범위에 들어오게 조정하여 접종한 후 24시간동안 35°C 배양기에서 배양하여 410 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하고, 같은 희석배율의 시료를 MPN 및 평판배양법에 의해 시료 100 mL당 대장균 및 대장균군의 개체수를 파악하여 공정시험법상의 정량 분석결과와 흡광도 값의 상관관계를 도출하고자 하였다. 희석

배수에 따른 MPN법으로 개체수를 확인한 결과(Table 2), 대장균은 10^{-10} 배 희석시료가 1600 MPN/100 mL, 10^{-11} 배 희석시료는 300 MPN/100 mL, 10^{-12} 배는 22 MPN/100 mL, 10^{-13} 배는 2 MPN/100 mL이었고, 평판배양법은 10^{-10} 배가 200 CFU/100 mL로 유사한 결과를 나타내었다. 반복실험을 통하여 CFU와 OD₄₁₀값간의 상관관계를 구하고 표준 직선식을 계산하였다(Fig. 6). 그 결과 담수에서의 대장균과 총대장균군을 defined substrate 방법(Edberg et al., 1988; Ed

berg et al., 1990)으로 검출하여 Colilert 키트와 비교했을 때 일관된 결과를 얻은 것과 같이, Eco배지에서 검출된 대장균과 총 대장균수가 MPN 방법과 평판 배양법으로 검출된 결과와 일치하여, Eco 배지에서 물 시료를 일정시간 배양한 후 확인된 OD₄₁₀ 값을 표 준직선식으로 환산하면 시료 내 세균의 CFU를 추정할 수 있을 것으로 생각되었다.

이 가정을 확인하기 위해 총 대장균군으로 오염된 것으로 추정되는 대전근교 약수 물과 시냇물, 한남대학교 연못 등 총 93개소의 물 시료를 공정시험법인 MPN방법과 TOP agar와 LB(Luria Broth)배지를 이용한 평판배양법으로 균을 분리하고 본 실험에서 개발된 Eco 배지에서 균을 배양하여 비교하였다(Table 3). 이때 Eco 배지에서 총 대장균군 검출은 35°C에서 11시간을 배양한 후 발색 정도를 알기 위해 410 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정된 OD₄₁₀값은 Fig. 6에서 계산된 표준 직선식에 대입하여 초기균수를 추정하였다. 그 결과 공정시험법의 각 방법으로 얻은 균체수가 각 방법에 따라 크게 차이가 나서 비교하기 어려웠고, 또 Eco 배지로 확인된 초기 균수와 공정시험법으로 확인된 균수와의 상관관계는 비교적 낮은 것으로 나타났다. 따라서 표준 직선식을 이용한 균수를 바로 확인하는 것은 어렵지만 OD₄₁₀값을 측정하여 균체수를 추정하면 시료간의 균체수의 많고 적음은 비교가 가능할 것으로 판단된다.

그러나 Eco 배지에 ONPG를 첨가하여 배양한 총 대장균군 정성검사에서는 전체 93개 시료 중 Eco 배지에서 67개, MPN이 66개, Top agar가 69개, LB배지가 76개가 양성으로 검출되어 공정시험방법과 거의 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 membrane filtration 방법을 이용하여 Colilert과 유의성을 확인한 것(Eckner, 1998; Pope et al., 2003)과 거의 동일하게 본 배지는 대장균의 정성검사에 매우 유효하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2. Quantitative results of total coliforms obtained by various methods

<i>E. coli</i>			
Dilution rate	MPN method		Plate colony count (CFU / 100 mL)
	Combination of positive (Volume 10, 1, 0.1 mL)	MPN / 100 mL	
10^{-9}	5-5-5	> 1600	2260
10^{-10}	5-5-4	1600	200
10^{-11}	5-5-1	300	0
10^{-12}	4-2-0	22	0
10^{-13}	2-0-0	4	0

Total coliforms			
Dilution rate	MPN method		Plate colony count (CFU / 100 mL)
	Combination of positive (Volume 10, 1, 0.1 mL)	MPN / 100 mL	
10^{-9}	5-5-5	> 1600	1800
10^{-10}	5-5-4	1600	100
10^{-11}	4-1-1	21	0
10^{-12}	4-0-0	13	0
10^{-13}	0-0-0	2	0

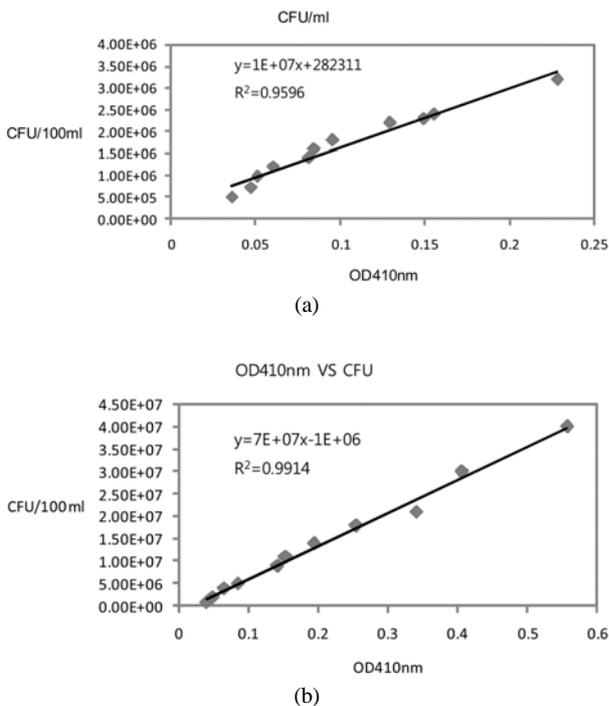


Fig. 6. Standard curve from absorbance (410 nm) value versus colony forming unit using type strains. (a) total coliforms, (b) *E. coli*

3.4. Colilert 키트와의 정성시험 비교

공정시험법의 Colilert 키트와 본 키트 모두 배지를 날개로 포장하고 있으며 배지의 색은 옅은 미색으로 큰 차이가 없었고 물에 용해되기 쉬운 과립형의 다공성으로, 1회 측정분의 배지 중량도 약 2 g으로 비슷하였다. 검사방법도 플라스틱 병에 시료 100 mL를 주입하여 배지를 용해시킨 후 35°C의 배양기에서 24시간동안 배양시키는 것으로 동일하였다. 배양 후 육안으로 노란색 발색이 확인되면 총 대장균군 양성, 365 nm의 자외선을 조사하여 형광이 확인되면 대장균 양성으로 판별하는 방법도 동일하다.

개발된 키트의 유의성 검사를 위한 시료는 의뢰시료, 공시균주를 배양하여 제조한 시료, 멸균 증류수, 수돗물, 먹는 샘물, 샘물 등 다양하게 준비하여, 총 대장균군의 경우 350개, 대장균의 경우 250개의 시료를 준비하였다. 실험 결과 총 대장균군 양성으로 판별된 시료의 노란색 발색이 서로 비슷하여 발색 형태에 큰 차이가 없었고, 대장균 양성 시료에서 자외선을 조사하였을 때 나타나는 형광도 육안으로 보아 차이가 없었다. 총 350개 시료 중 개발된 키트에서 155개가 양성으로 Colilert 키트는 153개가 총 대장균군

Table 3. Results for total coliforms test by various methods

Sample No.	OD 410 ^{b)}	Calculated total coliforms ^{a)} (100 mL)	MPN ^{c)} (100 mL)	Plate count ^{c)}	
				Top agar (CFU/100 mL)	LB (CFU/100 mL)
1	2.914	22749	≥ 1600	20300	16000
2	0.066	406	8	5300	0
3	0.079	508	13	1600	670
4	0.268	1990	900	5800	13370
5	2.613	20387	≥ 1600	30000	46900
6	0.436	3308	≥ 1600	2000	6770
7	0.182	1316	≥ 1600	3500	7300
8	2.914	22749	≥ 1600	40000	≥ 3000
9	0.433	3285	900	3800	10570
12	0.283	2108	300	2000	5800
13	2.537	19791	≥ 1600	10500	30630
14	0.100	672	130	200	670
15	0.344	2587	240	1500	2470
16	0.496	3779	≥ 1600	8200	17200
19	0.343	2579	900	3000	5030
20	1.782	13868	≥ 1600	21600	15870
21	0.344	2587	1600	8100	4330
22	2.862	22341	<2	17500	23430
23	0.350	2634	<2	6700	9670
24	0.927	7160	<2	58600	27830
25	2.862	22341	<2	≥ 1000	73970
27	0.173	1245	900	2200	2933
46	0.082	531	2	21200	35733
64	0.061	366	13	41100	43067
66	0.117	806	0	0	133
67	0.226	1661	0	200	2267
68	0.238	1755	0	100	33
69	0.141	994	0	0	0
70	0.157	1120	0	100	0
71	0.223	1637	0	0	4600
72	0.165	1182	0	0	33
73	0.124	861	0	300	733
74	0.155	1104	0	0	0
75	0.217	1590	0	0	133
76	0.178	1284	0	2000	233
77	0.129	900	0	1000	167
78	0.229	1684	2	900	100
79	0.202	1473	0	400	567
80	0.162	1159	0	4200	267
81	2.761	21548	23	700	5467
82	0.430	3261	30	0	2833
83	0.304	2273	0	100	4900
84	2.874	22435	≥ 1600	≥ 200000	≥ 500000
85	2.874	22435	≥ 1600	≥ 350000	≥ 500000
86	2.874	22435	≥ 1600	≥ 500000	≥ 500000
87	0.651	4995	4	≥ 500000	≥ 500000
91	2.874	22435	≥ 1600	0	≥ 500000
92	1.476	11467	2	35500	≥ 366600
93	0.531	4054	0	0	≥ 350000

a) Calculated by using standard curve

b) After 11 hours incubation at 37°C

c) After 24 hours incubation at 37°C

양성으로 판별되고(Table 4), 또 대장균의 경우 개발 키트 및 Colilert 키트가 동일하게 250개 시료 중 64개가 양성으로 판별되어(Table 5), 개발된 키트가 Colilert-18을 이용한 결과(Chao et al., 2004) 보다 우수함을 확인하였다. 그리고 검사 결과를 이용하여 agreement와 sensitivity 그리고 specificity를 확인한 결과, 3 항목 모두 97.5% 이상의 일치도를 보여 본 실험에서 개발된 키트는 Colilert 키트와 동일한 성능을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

Table 4. Congruity of the developed and Colilert kit for total coliforms

Total coliforms	Colilert kit	
	Positive	Negative
Developed kit	153 (a)	2 (b)
	4 (c)	191 (d)
Agreement(%) ^{*)}		
98.3		
Sensitivity(% ^{**)}		
97.5		
Specificity(% ^{***)}		
99.0		

*) : (a+d)/(a+b+c+d)*100

**) : a/(a+c)*100

***) : d/(b+d)*100

Table 5. Congruity of the developed and Colilert kit for *E. coli*

<i>E. coli</i>	Colilert kit	
	Positive	Negative
Developed kit	64 (a)	0 (b)
	0 (c)	186 (d)
Agreement(% ^{*)}		
100		
Sensitivity(% ^{**)}		
100		
Specificity(% ^{***)}		
100		

*) : (a+d)/(a+b+c+d)*100

**) : a/(a+c)*100

***) : d/(b+d)*100

4. 결론

Violet Red Bile (VRB)배지를 변형시켜 대장균 및 총 대장균을 신속하게 검출할 수 있는 Eco 배지를 개발하였고, 공시균주인 *E. coli* ATCC11303, *Enterobacter cloacae* KCTC2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC2241와 *Citrobacter freundii* KCTC2359를 접종한 후 OD₄₁₀에서의 표준 균체수를 구하였다. 또 총 93종의 시냇물과 약수 물에 존재하는 총대장균군 수를 개발된 Eco 배지와 표준검사법인 최확수(most probable number, MPN)법과 평판배양법으로 검사하여 비교한 결과 OD₄₁₀값을 측정하여 추정한 방법으로 구한 균체수와 거의 유사하였고, Eco 배지에 ONPG와 MUG를 첨가하여 이들 시료들의 대장균과 총 대장균군을 정성실험한 결과, 우리나라의 공인 시험법인 Colilert 키트와 동일한 효과가 있음을 확인하였다. 350개의 물시료를 이용한 Colilert 키트와의 비교실험에서 개발된 키트는 agreement, sensitivity 그리고 specificity가 모두 97.5% 이상으로, 공정시험법상의 Colilert 키트와 동등 이상의 성능을

가지고 있어 본 실험에서 개발된 배지는 대장균과 대장균군의 정성 및 정량 검사에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다.

참고문헌

- Atlas, R. M. (2004). Handbook of Microbiological Media (3rd ed.). CRC press.
- Chao, K. K., Chao, C. C., and Chao, W. L. (2004). Evaluation of Colilert-18 for Detection of Coliforms and *Escherichia coli* in Subtropical Freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(2), pp. 1242-1244.
- Clark, D. L., Milner, B. B., Stewart, M. H., Wolfe, R. L., and Olson, B. H. (1991). Comparative study of commercial 4-methyl- β -D-glucuronide preparations with the Standard Methods membrane filtration fecal coliform test for the detection of *Escherichia coli* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, pp. 1528-1534.
- Eckner, K. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterobacter methods for detection of waterborne coliforms bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, pp. 3079-3083.
- Edberg, S. C. and Kontnick, C. M. (1986). Comparison of β -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **24**, pp. 368-371.
- Edberg, S. C., Allen, M. J., and Smith, D. B. (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, pp. 1595-1601.
- Edberg, S. C., Allen, M. J., and Smith, D. B. (1989). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with presence-absence techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, pp. 1003-1008.
- Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B., and Kriz, N. J. (1990). Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, pp. 366-369.
- Feng, P. C. S. and Hartman, P. A. (1982). Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, pp. 1320-1329.
- Fricker, E. J., Illingworth, K. S., and Fricker, C. R. (1997). Use of two formulations of Colilert and Quantitry™ for assessment of the bacteriological quality of water. *Water Res.*, **31**, pp. 2495-2499.
- Kilian, M. and Bulow, P. (1976). Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.* **84**, pp. 245-251.
- Koburger, J. A. and Miller, M. L. (1985). Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. *J. Food Prot.*, **48**, pp. 244-245.
- Le Minor, L. (1979). Tetrathionate-reductase, β -glucuronidase and ONPG test in the genus *Salmonella*. *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr.*, **243**, pp. 321-325.
- Moberg, L. J., Wagner, M. K., and Kellen, L. A. (1988). Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli* in chilled and frozen food: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, pp. 589-602.
- Park, S. J., Lee, E., Lee, D., Lee, S., and Kim, S. (1995). Spectrofluorometric assay for rapid detection of total and fecal coliforms from surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, pp. 2027-2029.
- Poelma, P. L., Wilson, C. R., and Andrews, W. H. (1987). Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, pp. 991-993.
- Pope, M. L., Bussen, M., Feige, M. A., Shadix, L., Gonder, S., Rodgers, C., Chambers, Y., Pulz, J., Miller, K., Connell, K., and Standridge, J. (2003). Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on *Escherichia coli* Densities in Surface Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 6201-6207.
- Rice, E. W., Allen, M. J., Brenner, D. J., and Edberg, S. C. (1991). Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking water analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, pp. 592-593.
- Venkateswaran, K., Murakoshi, A., and Satake, M. (1996). Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of Coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, pp. 2236-2243.