

식품 및 동물사료에서 *Escherichia coli*의 검출 및 계수를 위한 선택적 발색성 배지이며 ISO16649^{1,2,3} 및 ISO 11133:2014⁴에 명시된 조성 및 성능을 충족한다.

건조 분말 배지: 짙색의 유동성 분말
조제 배지: 짙색의 용액

조성 Typical Formula*

성분	gm/litre
Tryptone	20.0
Bile Salts No.3	1.5
Agar	15.0
X-glucuronide	0.075
pH 7.2 +/- 0.2 @ 25°C	
* 성능 표준에 적합하도록 조절됨	

조제법 Directions

1리터의 정제수에 36.6g을 현탁하고, 121°C, 15분간 고압증기멸균한다. 50°C로 식힌 후 멸균 페트리 디쉬에 붓는다.

설명 Description

TBX 배지는 Tryptone Bile Agar(CM0595)에 기반한다. Tryptone Bile Agar는 식품에서 *Escherichia coli*를 검출하는데 사용되는 이전의 방법들을 개선하기 위해 원래 개발되었으며^{5,6}, 속도, 신뢰성, 냉동 검체에서의 회복 향상, 그리고 약한 유당 발효균의 검출 면에서 개선되었다.

TBX 배지는 이러한 장점에 더해서 발색성 시약인 X-glucuronide를 첨가하여 glucuronidase 활성을 검출할 수 있게 개발되었다. 이 효소는 MUG 시약으로 검출되는 효소와 같은 효소이며 *E.coli*에 대해 아주 특이적인 것으로 나타났다⁸. 그러나, *E. coli* 중 약 3~4%는 glucuronidase 음성이며 *E. coli* O157 균주들이 여기에 속한다⁹.

대부분의 *E. coli* 균주들은 glucuronidase 효소가 존재하므로 다른 대장균군(coliform)과는 구별될 수 있다. TBX 배지의 발색원은 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide (X-glucuronide, BCIG)이며 이 효소의 기질이 된다. *E. coli* 세포는 이 복합체 기질을 흡수하고 세포내에 존재하는 glucuronidase가 발색단(chromophore)과 glucuronide사이의 결합을 절단한다. 유리된 발색단은 색상을 나타내며 세포내에 축적되어 *E. coli* 집락이 청색/녹색을 띠게 해준다.

코코아 제품의 경우, 전-중균 배지에 casein을 포함시켜 코코아에 존재하는 살균물질을 억제할 필요가 있다⁶. 공동 비교 연구에 의하면 *Salmonella*에 대해서 코코아 콩 가루 및 초코렛을 시험할 때 Buffered Peptone Water에 casein과 malachite green을 첨가하는 가치가 있음이 확인되었다⁷. Buffered Peptone Water CM0509의 품질관리에는 ISO 6579 및 ISO 11133:2014⁴에 부합되는 시험이 포함되어 있다.

사용 방법 Technique

조제된 배지의 표면을 건조된 상태로 유지한다. 식품 검체를 적절한 방법으로 배지/희석액, 예를 들면 Maximum Recovery Diluent (CM0733)에 1/10,에 희석한다. 실험용 균질기(stomacher, blender)로 균질화한다. 필요하면 추가 희석을 한다.

다음의 배양 방법을 사용할 수 있다 (전체 방법에 대해서는 관련 표준방법을 참조한다.)

1. 균질액 0.1ml을 평판에 넣고 멸균 스프레더로 표면을 스프레딩한다. 평판을 37°C, 24시간동안 배양한다¹⁰.
2. 균질액 0.5ml을 평판에 넣고 멸균 스프레더로 표면을 스프레딩한다. 평판을 30°C, 4시간동안 배양한 후 44°C에서 18~24시간 배양한다¹¹.
3. Minerals Glutamate Agar 평판 표면에 셀룰로스막을 놓는다. 균질액 1ml을 막위에 놓고, 37°C, 4시간 배양한다. 막을 TBX 평판으로 옮기고 44°C, 18~24시간 배양한다¹.
4. 균질액 1ml을 멸균 페트리디쉬에 놓는다. 45°C로 식힌 TBX 배지 용액을 첨가하고 잘 혼합한 후 균한다. 44°C, 18~24시간동안 배양한다. 스트레스 받은 세포가 존재하는 것으로 의심되면 37°C에서 4시간 평판을 전-배양한다(pre-incubate)².
5. 한국 식품공전의 “대장균 시험법” 또는 “장출혈성 대장균 시험법”을 참조할 수 있다.

청색/녹색 집락을 계수하고 희석비를 곱해준 후, 식품 gram당 *E. coli* 수의 형태로 결과를 표시한다.

보관 조건 및 유효 기간 Storage conditions and Shelf life

건조 분말 배지: 10~30°C 보관, 라벨에 표시된 유효기간까지.
조제 배지: 2~8°C에 보관

성상 Appearance

품질 관리

양성 대조균	예상 결과
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922* WDCM 00013	좋은 성장; 청색/녹색의 집락
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 13216 WDCM 00202	좋은 성장; 청색/녹색의 집락
음성 대조균	예상 결과
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC® 43864 WDCM 0006	성장; 흰색~초록 베이지색 집락
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212* WDCM 00087	성장 없음
* Culti-Loop®제품으로 구매가능	



Escherichia coli

참고 문헌 References

1. ISO 16649-1:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide
2. ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide
3. ISO 16649-3:2015 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide
4. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media
5. Gross R.J. and Rowe B. (1985) J. Hyg. Lond. 95. 531-550.
6. Anderson J.M. and Baird-Parker A.C. (1975) J. Appl. Bact. 39. 111-117.
7. Feng P.C.S. and Hartman P.A. (1982) Appl. Environ. Microbiol. 43. 1320-1329.
8. Hansen W. and Yourassowsky E. (1984) J. Clin. Microbiol. 20. 1177-1179.
9. Ratnam S., March S.B., Almed R., Bezanson G.S. and Kasatiya S. (1988) J. Clin. Microbiol. 26. 2006-2012.
10. Donovan T.J. et al (1998) Communicable Disease and Public Health 1 : 188-196.
11. PHLS Standard Methods for Microbiological Examination of Food, Dairy and Water Samples. F20: Direct Enumeration of *Escherichia coli*.

CM0945_IFUKor, Rev.0(2017.11.25.)