

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)

0.1% Peptone solution(시액 9): LP0034B 또는 LP0037B

#### 배지

EC 배지(배지 10): CM0853B

EMB 한천배지 (배지 6): CM0069B

유당배지 (배지 2): CM0137B

보통한천배지 (배지 8): CM0017B

BCIG 한천배지 (배지 73): CM0945B 또는 <생배지> PO5109A

MMGM 배지(배지 72) : CM0607G + ammonium chloride

EC-MUG배지(배지 94) : CM0979B (또는 CM0853B + BR0071E)

BGLB-MUG배지 (배지 3 + MUG) : CM0031B + BR0071E

LST-MUG배지 (배지 95 + MUG) : CM0980B (또는 CM0451B + BR0071E)

MacConeky한천배지 (배지 30): CM0115B

#### 그람염색

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)

#### 생화학적 동정키트:

RapID ONE System, 20panels/kit (R8311006)

+ RapID Inoculation Fluid, 2mlx20tubes (R8325106)

+ RapID Spot Indole Reagent, 15mlx1vial (R8309002)

#### 생화학 단일 시험:

##### Indole 시험

Microbact Spot Indole (DMAC), 10ml (MB1448A)

또는 Indole Reagent, Kovac's, 25ml/bottle (R21227)

또는 BactiDrop Indole, Kovac's, 0.75mlx50ampules (R21522)

##### Methyl Red 시험

MRVP Medium, 500g (CM0043B)

Methyl Red Reagent, 25ml/bottle (R21236)

##### VP 시험

MRVP Medium, 500g (CM0043B)

Voges-Proskauer A reagent, 12ml (R21200) + Voges-Proskauer B reagent, 25ml (R21281)

또는 BactiDrop Voges-Proskauer A, 0.75mlx50ampules (R21560)

+ BactiDrop Voges-Proskauer B, 0.75mlx50ampules (R21562)

##### Citrate 시험

Simmons Citrate Agar, 500g (CM0155B)

대장균의 시험법에는 최확수법 및 건조필름법에 의한 정량시험과 일정한 한도까지 균수를 정성으로 측정하는 한도시험법이 있다.

### 4.8.1 정성시험

#### 가. 한도시험

- ① 4.3 제조법에 따른 시험용액을 준비한다.
- ② 시험용액 1mL을 3개의 EC 배지(배지 10)발효관에 접종한다.
- ③ 44±1°C에서 24±2시간 배양 후 가스발생을 관찰한다.  
가스발생 발효관은 추정시험 양성. 가스발생 인정되지 않으면 음성.
- ④ 추정시험 양성의 발효관으로부터 다음 배지에 접종 및 배양한 후 전형적인 집락을 관찰한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	의심집락 성상		
				유당분해균 (대장균)	유당분해균 (대장균군)	유당 비분해균
필수	EMB한천배지 (배지6)	35~37°C	24±2시간	녹색의 금속성 광택 의 보라색 집락	보라색 점액성 집락	무색 반투명 집락

- ⑤ 전형적인 집락을 보통한천배지에 접종한다.
- ⑥ 35~37°C에서 24±2시간 배양한다.
- ⑦ 보통한천배지에서 배양된 집락을 취하여,  
그람 염색 : 그람 음성, 무아포성 간균을 확인  
생화학시험 (Rapid ONE System 등) 실시하여 대장균 양성으로 판정

## 4.8.2 정량시험

## 가. 최확수법

## 1) 제1법

- ① 4.3 제조법에 따른 시험용액을 연속한 3단계 이상의 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 준비한다.
- ② 희석시료를 각각 5개 또는 3개의 EC 배지(배지 10) 발효관에 접종한다.  
\* 시험용액 10 mL를 첨가할 경우 2배농도의 배지 10 mL를 이용한다.
- ③ 44.5±0.2°C 항온수조에서 24±2시간 배양한다.
- ④ 가스발생을 인정한 발효관을 대장균(*E. coli*) 양성이라고 판정하고 별표 1 또는 별표 2 최확수표에 따라 검체 1 mL 또는 1 g 중의 대장균수를 산출한다.

## 2) 제2법

## 시험용액의 제조

- ① 패각을 제거한 검체 200 g에 0.1% peptone solution(시액 9) 200mL을 첨가하여 마쇄한다.
- ② 마쇄액 20 mL과 동일한 희석액(시액 9) 80 mL을 혼합하여 최종 10배 희석한 것을 시험용액으로 사용한다.  
\* 시험용액은 필요에 따라 100배, 1,000배 등으로 희석하여 사용할 수 있다.

## 추정시험

- ③ 시험용액 10 mL을 5개의 2배 농도 MMGM 배지(배지 72)가 들어있는 시험관에 접종하고,  
시험용액 1 mL 및 0.1 mL을 각각 5개의 MMGM 배지가 들어있는 시험관에 접종한다.
- ④ 37±1°C에서 24±2시간 배양하고, 시험관내의 배지의 색깔을 확인한다.  
노란색으로 되었을 때 추정시험 양성으로 하며 확정시험을 실시한다.

## 확정시험

- ⑤ 추정시험에서 양성으로 확인된 MMGM 시험관 배양액을 BCIG 한천배지(TBX)(배지 73)에 분리 배양을 위해 접종한다.
- ⑥ 44±1°C에서 24±2시간 배양한다.
- ⑦ 청녹색의(blue-green) 전형적인 집락이 발생되면 대장균(*E. coli*) 양성이라고 판정하고 별표 1 최확수표에 따라 검체 100 g중의 대장균수를 산출한다.

3) 유가공품·식육가공품·알가공품

가) 최확수법

- ① 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.
- ② 시험용액 5개 또는 3개씩을 BGLB배지(배지 3)발효관에 접종한다.  
단, 10mL을 접종할 때는 2배농도 유당 배지를 사용하고, 0.1mL 이하를 접종할 때는 10배 희석단계액을 각각 1mL 씩 사용한다.
- ③ 시험용액을 접종한 BGLB 배지발효관을 35~37°C에서 48±3시간 배양한다.
- ④ 발효관내에 가스 발생 유무를 확인한다.  
· 가스가 발생하면 양성이다.  
\* 배지를 흔들 때 거품 모양의 가스의 존재도 인정한다.  
· 가스가 발생하지 않았을 때에는 음성이다.
- ⑤ BGLB 가스생성 양성인 시험관으로부터 다음의 시험관 배지들 중 하나에 접종 및 배양하고 자외선 조사하에 결과를관찰한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	대장균 양성
선택 1	EC-MUG배지(배지94)	44.5°C	24시간	자외선 조사하에 푸른 형광
	BGLB-MUG배지(배지3+MUG)			
	LST-MUG배지 (배지95+MUG)			

- ⑥ 대장균 양성으로 판정된 것을 최확수표 (별표 1 또는 별표 2)에 근거하여 대장균수를 산출한다.

나) 대장균 확인시험

최확수법에서 가스생성과 형광이 관찰된 것을 대장균 추정시험 양성으로 판정하며 확인시험을 실시한다.

- ⑦ 추정시험 양성으로 판정된 시험관으로부터 다음 배지들 중 하나에 이식 및 배양한 후 전형적인 집락을 관찰한다.

사용	배지	배양온도	배양시간	대장균 양성
선택 1	EMB배지 (배지6)	37°C	24시간	녹색 금속성 광택을 가진 보라색 집락 Bile 침전이 있는 붉은 색 집락
	MacConkey Agar (배지30)			

- ⑧ 그람염색, MUG시험, IMViC시험, 유당으로부터 가스 생성시험 등을 검사하여 최종 확인한다.

대장균은 MUG시험에서 형광이 관찰되며, 가스생성, 그람음성의 무아포간균이며, IMViC시험에서 “++--”의 결과를 나타내는 것은 대장균(*E. coli*) biotype 1로 규정한다.

생화학적 동정키트: RapID ONE System

나. 건조필름법

식품공전 참고

다. 자동화된 최확수법(Automated MPN)

자연치즈, 식육추출가공품, 닭도체, 오리도체에 한한다.