

A Simple and Quantitative Method for the Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli*

오관석, 박태현

서울대학교 응용화학부, 세포 및 미생물공학 연구실
전화 (02) 887-6162, FAX (02) 875-9348

Abstract

Indicator organisms are frequently used to monitor bacterial contamination of water. The most common indicator organisms used in water quality monitoring are coliforms and *Escherichia coli*. To develop a rapid and quantitative method for detecting the coliforms and *E. coli* in water, cell growth kinetics and defined substrate technology were applied in this study.

서론

수계 미생물 중 특히 대장균이나 대장균군은 병원성 미생물에 대한 지표로서 오염성의 여부를 판단할 수 있는 잣대가 되고 있다. 대장균과 대장균군에 대한 기존의 검출법은 크게 두 가지로 분류할 수 있고, 이는 MFT (multiple tube fermentation) 과 MF (membrane filtration) 방법이다.⁽¹⁾

MFT는 시료를 액체 배지 (Lauryl tryptose broth)에서 24시간 배양 한 후, 기체 생성과 산성 성장을 하는 시료에 대해 추가적으로 brilliant green lactose bile (BGLB)배지에서 확인을 거친 후, Most Probable Number (MPN) table에 의거하여 대장균군의 수를 결정한다. MF 방법은 상기한 MTF 방법보다 큰 부피의 시료에 대해 검출이 가능하고, 보다 신속한 방법이다. 그러나 탁도가 높은 시료에 대해서는 문제점을 갖고 있다. 이 방법에서는 멸균된 여과막을 이용하여 시료를 여과한 후, agar plate 위에 올려 놓고 배양한 후 colony를 세어서 측정한다.

최근에는 DST (defined substrate technology) 방법이 대두되고 있는데 이 방법은 대장균과 대장균군에 특이적으로 존재하는 효소와 반응하는 기질을 이용하여, 이 기질이 가수분해되는 과정에서 발생하는 색깔이나 형광 변화를 측정함으로써 검출하는 방법이다. 여기서 대장균군은 β -D-galactosidase 효소를 발현하는 박테리아로 정의되고, 대장균은 β -glucuronidase 효소를 발현하는 박테리아로 정의된다. 따라서 이들 효소에 특이적으로 반응하는 기질을 선별하고, 특히 반응 결과를 쉽게 판독하기 위하여 반응 후 산물이 색깔이나 형광 변화를 일으키는 기질을 선별하여 이용한

다. DST방법은 대장균과 대장균군에 특이적으로 존재하는 효소와 반응하는 기질을 이용함으로써 false positive나 false negative의 확률을 줄이고 간편하고 빠른 시간 안에 미생물을 검출할 수 있는 개선된 방법이다.⁽²⁾

본 연구에서는 세포성장 속도론과 DST방법을 응용하여, 분석이 신속하고 정량적인 수계 미생물 검출 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

균주 β -D-galactosidase 와 β -D-glucuronidase를 함유하는 대장균군과 대장균인 *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*를 seed 배양하여 냉장 보관하였다.

배지 및 배양조건 세포는 Luria-Bertani 배지를 사용하여 37°C, pH 7.0에서 shaker flask(100 mL)에서 배양하였다. 세포농도는 낮은 농도의 경우 현미경하에서 세포수를 세어서 측정하였고, 높은 농도의 경우에는 스펙트로포토미터(SPECTRONIC^R GENESYSTM)를 사용하여 측정하였다.

효소활성도 측정 1시간을 주기로 sample을 채취하여 toluene을 사용하여 세포를 파괴한 후, 취한 pellet을 다시 Z-buffer에 suspension 하고 ONPG, ONPGluc 등을 넣고 반응시켰다. 15분이 지난 후, Na₂CO₃ 용액을 첨가해 반응을 종결시키고 흡광도(420nm, 400nm)를 측정하여 β -D-galactosidase 와 β -D-glucuronidase의 활성을 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 시료내의 미생물 수를 검출하기 위하여, 미생물의 숫자가 일정 수준에 이를 때까지 배양한 후, 그 때까지 걸린 시간을 이용하여 초기 미생물 농도를 역추산 하는 방법을 사용하였다. 이 때 가장 문제가 되는 것은 배양 초기에 발생할 수 있는 lag이다. 만일 이 lag가 존재하지 않는다면, 즉 배양 내내 지수적 성장만을 한다면 배양 후의 최종 농도로부터 초기 농도를 예측하는 것이 가능할 것이다. 그러나 우리가 검출하려는 초기 미생물의 농도가 매우 낮기 때문에, 배양 초기의 lag를 우려하지 않을 수 없다. Fig. 1은 다양한 초기세포농도에 대한 세포성장곡선을 보여준다. 세포 농도가 낮을수록 초기의 lag가 길어 보인다. 그러나 lag라고 여겨지는 부분의 정확한 분석을 위해서는 log plot이 적당하며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 여기서 알 수 있는 것은 Fig. 1에서 마치 lag로 보여지는 부분도 농도가 낮아서 그 성장이 잘 감지되지 않았을 뿐이지, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 lag가 아니라 지수적 성장을 하고 있음을 알 수 있다. 농도가 매우 낮은 부분은 현미경하에서 세포수를 세어서 측정하였다.

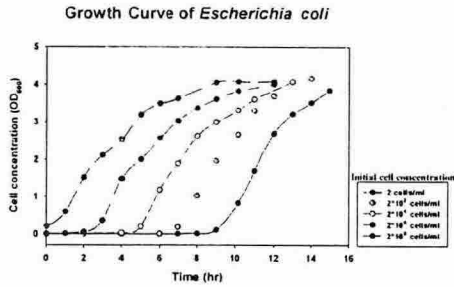


Fig.1. 다양한 초기농도에 대한 세포 성장곡선

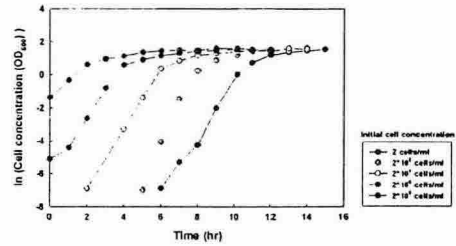


Fig.2. 저농도 cell에서의 지수적 성장

위의 방법으로 초기 미생물 농도를 역추정할 수 있다 하더라도, 배양된 시료는 다양한 종류의 미생물을 포함하고 있을 수 있기 때문에, 우리가 분석하기를 원하는 미생물만의(예를들어 대장균) 농도를 측정할 수 있어야 한다. 만일 대장균에서 특이적으로 발현되는 β -D-galactosidase가 단위세포 당 일정한 양으로 발현된다면, β -D-galactosidase를 측정함으로써 대장균에 속하는 미생물의 농도를 구할 수 있다. Fig. 3은 몇몇 대장균의 단위세포당 β -D-galactosidase의 발현양을 보여 준다. 한 종류의 세포에 대해서는 거의 일정한 발현양을 보이고 있고, 다른 세포간에도 많은 차이를 보이지는 않고 있음을 알 수 있다. 또한 대장균 미생물의 단위세포당 β -D-galactosidase의 활성도는 성장과정 중의 세포 농도에 관계없이 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다.⁽³⁾

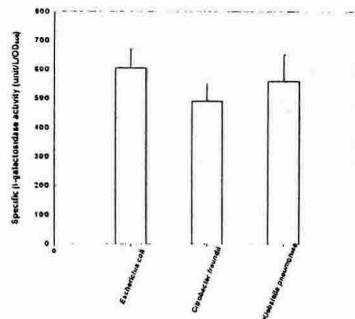


Fig.3. 단위세포당 β -D-galactosidase의 활성도

Estimation of cell concentration for various coliforms

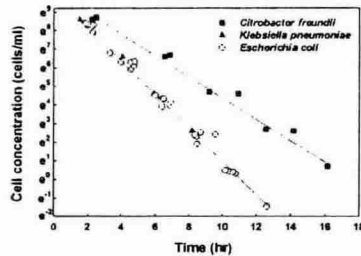


Fig.4. 일정 세포농도에 도달하는 시간과 초기 세포 농도와 의 상관관계

Fig. 4는 앞의 성장곡선을 토대로 다양한 초기 미생물 농도와 일정한 세포농도 ($OD_{600} = 1.8$)에 도달하는 시간과의 관계를 나타낸 결과이다. 일정한 세포농도에 도달하는 시간을 측정하고 Fig.4의 관계를 이용하여 초기 미생물 농도를 추정할 수 있다.

요약

수계 미생물의 세포 농도 정도를 DST와 spectrophotometer를 이용하여 간편하고 빠르게 측정할 수가 있었다. 기존의 MPN와 MF의 방법은 노동집약적이며 false positive나 false negative의 확률이 높고 검출 시간도 하루이상 소요되는 단점이 있었다. 그러나, 세포 성장거동과 DST의 원리를 응용하여 간편한 검출 시스템을 정량적으로 기술함으로써 쉽고 빠르게 수계 미생물의 농도를 측정하는 방법을 제시하였다.

참고문헌

1. L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, and A. D. Eaton (ed.) 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Whshington, D.C.
2. M. Manafi. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media, International J. Food Microlo. **60**. 205-218.
3. I. Tryland and L. Fiksdal. 1998. Enzyme characteristics of β -D-glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **64**(3), 1018-1023.
4. Moira D. Johnston. 1998. A simple and rapid test for quality control of liquid media, using the bioscreen microbiological growth analyser. J. microbiol. methods. **32**. 37-43.