

대장균군 검사용 간이 시험지 개발

한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 분자세포생물그룹, 충남대학교 식품공학과*

이인애[†] · 김재화 · 이희구 · 성창근* · 최인성 · 정태화

국문초록: 대장균군 검사용 간이 시험지는 본 실험실에서 국내 최초로 고안, 개발하였으며 이 간이 시험지법은 현장 검사법의 하나로 대장균군이 내는 succinic acid dehydrogenase 때문에 tetrazolium salt 가 환원되어 적색 반점을 형성하는것을 이용한 방법으로서 이 간이 시험지의 제조는 대체로 종래의 표준 평판법과 거의 동일한 조성의 배지와 시약을 사용하여 여지에 흡착시킨 후, 건조시켜 (60°C) 멸균한 것으로 표준 평판법과 어떤 상관관계가 있는가를 검토하였다. 이 간이 시험지의 제조에서는 bile salt No. 3를 deoxycholate로 대체하여 제조 원가를 절감하였고, 또한 일본에서 현재 시판되고 있는 제품과 품질 비교시험을 하여 더 좋은 결과를 얻었으며 종래의 표준 평판법과 비교하였을 때 오�히려 표준 평판법(24-48시간 배양)보다 빠른 시간(16-20시간 배양)내에 판정할 수 있는 이점이 있으며, 표준 평판법에서는 없어서는 안될 배지나 배양 접시, pipette 등의 자료 및 기구가 일체 필요없고 언제 어디서나 현장에서 직접 시험할 수 있어 매우 간편하며 또한 저렴한 가격으로 제조할 수 있는 경제성이 높은 이점을 갖고 있다.

서 론

대장균군 검사용 간이 시험지는 1955년 독일의 F. J. Förg가 처음으로 대장균군을 대상으로 배지 성분을 시험지에 흡착, 건조, 멸균한 다음 그 시험지를 사용하여 간단하게 대장균군을 검사하는 방법을 고안, 개발한데서^{1,2,3)} 유래되었다. 이 간이 시험지는 현재 유럽 및 미국, 일본 등 몇몇 선진국에서 현장검사법의 하나로서^{4,5)} 널리 이용되고 있으며 그 제조방법은 다양하다. 이 간이 시험지는 수질 및 식품중에 존재하는 대장균군을 측정하여⁶⁾ 환경전반에서 유래하는 일반적인 세균의 오염상황을 알 수 있도록 고안되었으며^{5,9)}, 식품을 원인으로하는 전염병, 식중독 발생의 위험성이나 식품자체의 부패, 변패의 유무, 또한 그 식품이 위생적으로 취급되고 있는가를 쉽게 알 수 있도록 제조되었다. 이 대장균군 검사용 간이 시험지법은 종래의 표준평판법에서는 없어서는 안될 배지⁸⁾, 배양접시, 시험관, pipette,

배양기 등의 자료 및 기구준비가 일체 필요없고, 표준평판법보다 훨씬 빠른 시간내에 현장에서 직접 간편하게 검사할 수 있는 이점을 갖고 있으며^{12,3)}, 정성적인 측정법이지만 검체의 종류나 검사자의 숙달정도에 따라서는 어느정도 정량적인 측정도 가능하다. 본 실험실에서는 대장균군이 가장 민감하게 잘 성장할 수 있는 배지 조성만을 선택하여^{4,7)} 검사용 간이 시험지를 개발하였으며, 이 시험지를 표준 평판법과 비교함과 동시에 여러 식품 및 물(오염수), 식기류 등 각종 검사시료를 대상으로 그 실용성 및 성능을 검토 분석하였을 때 실용적으로 매우 우수한 것으로 판명되었다.

재료 및 방법

대장균은 KCTC 1467(Korean Collection for Type Cultures)을 사용하였고, yeast extract, tryptone, peptone, casamino acid, bile salts No. 3, bacto agar는 Difco Co. (U.S.A.)에서 구입하였고 lactose, sucrose, sodium chloride, sodium citrate는 Kanto Chem. Co. (Japan)에서, sodium deoxycholate는 Tokyo Kasei Chem. Co. (Japan), TTC (2,3,5-tri-

*논문접수 1996년 3월 5일, 수정재접수 1996년 5월 1일.

[†]별책요청 저자

Table 1. Composition of selection media for *E. coli*

Composition	Medium (g/l)					
	1	2	3	4	5	6
Yeast extrat	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-
Tyrptone	5.0	-	10.0	10.0	10.0	-
Peptone	5.0	5.0	-	-	-	10.0
Casamino acid	-	10.0	-	-	-	-
Bile salts No. 3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Lactose	10.0	10.0	10.0	5.0	10.0	10.0
Sucrose	-	-	-	5.0	-	-
Sodium chloride	-	-	10.0	10.0	10.0	5.0
Sodium chitrate	-	-	-	-	2.0	2.0
Agar	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0

phenyltetrazolium chloride)는 Sigma chem. Co. 에서 구입하여 실험하였다. 대장균(KCTC 1467)은 LB배지에서 37℃로 16시간 진탕배양한 후 이를 종균으로 하여 멸균 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 표준평판법에서 평판은 배지를 멸균하여 45-50℃정도로 식힌 다음 평판(plate)을 만들어 균 희석액을 0.1ml씩 분주하여 도말한 후 37℃에서 배양하였고, 간이시험지는 여지(Whatman No.)에 특정 배지를 흡착시켜 건조(60℃), 멸균한 후 균 희석액을 1ml씩 분주하여 멸균 비닐팩에 넣고 37℃에서 배양하여 평판과 간이 시험지에 생긴 집락수를 비교 관찰하였다.

배지의 선택 및 종균 배양

대장균이 가장 잘 자라는 배지를 선택하기 위하여 표 1과 같이 6가지 배지를 사용하여 평판을 만든 다음, 종균을 10¹-10¹⁰까지 희석하여 단계별로 평판에 0.1ml씩 접종한 다음 12, 16, 24 시간 배양 후, 각각의 집락의 수와 크기를 비교 관찰하였다. 종균은 LB 액체배지에서 37℃, 16시간 배양한 것을 사용하였다.

Agar의 농도와 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 농도별 차이

배지는 No. 3, 4를 선택하였고, agar는 농도별로 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0%의 6종류를 제조한 후, 종균을 10⁹까지 희석하여 1ml씩 접종하고, 12, 24, 36, 48시간 동안 배양한 후 비교관찰하여 agar의 농도를 결정하였다. Agar농도와 아울러 TTC농도도 0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.01, 0.02% 까지 여러 단계별로 농도를 다르게 제조하여 16, 24, 48시간 배양한 후 비교관찰하여 TTC농도를

결정하였다.

Coating agent 처리

여지에 배지를 흡착시켜 oven에서 60℃로 건조 시킨 후, polyvinyl alcohol(PVA)를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0% 까지 농도별로 처리하여 제조한 후 37℃에서 24, 48시간 배양하여 비교관찰하였다. 또, gelatin과 PVA를 각각 1%씩 처리하여 처리하지 않았을 때와 비교하였고, 일본 S사 제품과도 비교 시험하였다.

표준평판법과 검사용 간이 시험지법의 비교

종균을 10¹-10¹⁰까지 희석하여 평판과 간이 시험지에 각각 0.1ml과 1ml씩 분주하여 37℃에서 24시간 배양하여 비교하였다. 이때 평판은 Deoxycholate Lactose Agar 배지를 사용하여 만들었고 간이 시험지는 No. 3 배지로 만들어 일본 S사 제품과 함께 비교하였다.

Deoxycholate의 대체

Bile salts No. 3 대신 값이 저렴한 sodium deoxycholate를 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1%농도로 사용하여 간이 시험지를 제조한 후 일본 S사 제품, 표준평판법과 함께 비교 배양하였으며, 이때 종균은 10¹-10¹⁰까지 희석하여 사용하였다.

품질 비교 시험

현재 시중에서 판매되고 있는 여러가지 식품(빙과, 우유, 아이스크림, 두부, 소세지류 등)을 시료로 하여 10¹ - 10¹⁰까지 희석한 다음, 표준평판법과 간이 시험지를 사용하여 37℃에서 20시간 배양하여 각각 비교시험하였다.

결과 및 고찰

배지의 선택

*E. coli*를 LB배지에서 37℃로 16시간 배양 후 멸균생리식염수로 10¹-10⁹까지 희석하여 6가지 배지에서 배양하였더니 표 2와 같이 배지 No. 3, 4에서는 집락의 크기가 다른 배지에 비해 크고, 집락수도 많이 나타났었다. 배지 No. 1, 2에서도 집락수는 많았지만, 집락의 크기가 매우 작았다.

Agar 농도와 TTC 농도에 따른 차이

배지 No. 3, 4를 사용하여 agar 농도를 다르게 하여 간이 시험지를 제조한 후 평판법과 비교해 본 결과, 표 3과 같이 배지 No. 4보다 배지 No. 3에서 집락수(colony : 자주색 spot)가 많이 나타났고 agar 농도는 0.05% 일때 더 선명하고 많은 spots을 나타냈으며, agar농도 0.2% 이상부터는 간이 시험지에 흡착이 어렵거나, 마른 후 딱딱해져서 사용 할 수 없었다. 또한, 배지 No. 3을 사용하여 TTC농도별로 시험한 결과는 표 4에서와 같이 agar 0.05%, TTC 0.01%에서 가장 좋은 결과를 보였다.

Table 2. The number of *E. coli* colony depending on the type of selection media (colony No./ml)

Medium No.	Dilution fold								
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
1	>500	>500	>500	>500	>500	>300	34	4	0
2	>500	>500	>500	>500	>500	>350	53	4	0
3	>500	>500	>500	>500	>500	>500	48	6	0
4	>500	>500	>500	>500	>500	>350	58	6	1
5	>500	120	10	0	0	0	0	0	0
6	>500	>500	>500	>500	>500	210	20	3	0

Table 3. Effect of various concentrations of Agar on the formation of colony (colony No./ml)

Agar conc (%)	Medium No.					
	No. 3			No. 4		
	Dilution fold of <i>E. coli</i>					
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
0.05	>300	24	3	>300	24	0
0.1	>300	23	2	>300	19	0
Standard Agar Plate	>300	48	6	>300	58	6

Table 4. Effect of various concentrations of TTC on the formation of colony (colony No./ml)

TTC conc. (%)	Dilution fold <i>E. coli</i>					
	10 ⁷		10 ⁸		10 ⁹	
	Agar conc. (%)					
	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1
0.001	47	38	16	17	5	1
0.002	64	37	13	10	2	1
0.004	52	33	10	16	2	2
0.008	62	57	21	7	2	2
0.01	68	54	20	20	5	1
0.02	52	12	9	19	1	0
Standard Agar Plate	158		34		4	

Coating agent처리

간이 시험지에 poly vinyl alcohol(PVA)를 여러 가지로 coating하여 제조한 다음, *E. coli*로 평판법과 비교 시험하여 표 5와 같이 결과를 얻었다. 이때 0.01%-0.05%까지는 coating agent로서의 효과가 없었고 coating agent를 많은 량 처리할수록 집락수는 적게 나타나지만, 간이 시험지 전체에 집락이 골고루 나타나는 coating 효과를 볼 수 있었다. 또한, gelatin과 PVA를 각각 1%씩 처리하여,

Table 5. Effect of various concentration of PVA (colony No./ml)

PVA (%)	Dilution fold of <i>E. coli</i>	
	10 ⁷	10 ⁸
0.1	47	10
0.5	48	9
1.0	76	18
2.0	73	15
Standard Agar Plate	147	36

처리하지 않은 시험지와 평판법 및 일본 간이 시험지와 비교 시험하였을 때 표 6과 같이 coating 하지 않았을 때가 coating한 것보다 훨씬 더 많은 집락을 나타내므로 coating agent는 처리하지 않고 시험하기로 하였다. 또한 일본 간이 시험지와 본 실험실 제품을 비교하였을 때 일본 간이 시험지는 본 실험실에서 제조한 것보다 비교적 집락수가 더 많이 나타났으나 집락이 너무 미세하여 집락을 판별하기 어려운 점이 많았고 또한 균배양액의 농도가 진한 곳에서는 집락이 전혀 나타나지 않는 등의 false negative 및 불규칙한 결과를 나타내어 전문가가 아니면 판별하기 어려운 점이 많았다. 이에 비하여 본 실험실에서 제조한 간이 시험지는 집락수는 약간 떨어지나, 집락이 크고 분명하여 구별하기 쉬운 장점을 갖고 있다.

표준 평판법과 검사용 간이 시험지법과의 비교

*E. coli*를 회석하여 평판법과 비교 배양한 결과는 표 7과 같이 일본 간이 시험지는 균 농도가

Table 6. Effect of coating agents

Coating agent	Dilution fold of <i>E. coli</i>			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
None	>300	>300	120	31
PVA (%)	>300	<300	76	18
Gelatin (%)	>300	<300	46	7
Japanese commercial strip	0	0	129	37
Standard Agar Plate	>300	>300	147	36

Table 7. Comparison between the Standard Agar Plate method and the *E. coli* test strip method

Test method	Dilution fold						
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰
KRIBB test strip	>300	>300	>300	78	7	3	0
Japanese commercial strip	0	0	<300	85	8	2	0
Standard Agar Plate	>300	>300	>300	135	23	3	1

Table 8. Effect of deoxycholate in media

Bile salts	Dilution fold of <i>E. coli</i>	
	10 ⁵	10 ⁶
Deoxycholate (%)	0.005	>300
	0.01	>300
	0.03	>300
	0.05	>300
	0.01	>300
Bile salts No. 3	<300	83
Japanese commercial strip	<300	87
Standard Agar Plate	>300	132

Table 9. Comparison of the KRIBB test strips with other commercial product

Sample	Dilution fold					
	10 ¹			10 ²		
	Standard Agar Plate	KRIBB Test Strip	Japanese Commercial Strip	Standard Agar Plate	KRIBB Test Strip	Japanese Commercial Strip
A	>300	>300	>300	>300	<300	116
B	>300	>300	>300	>300	<300	103
C	>300	106	16	<300	76	29
D	82	76	32	5	5	0
E	2	0	0	2	3	0
F	31	17	3	3	0	0
G	3	2	1	1	1	0
H	0	1	0	0	0	0
I	1	0	0	0	0	0
J	171	192	34	21	26	10
K	28	28	26	3	3	1
L	34	23	7	2	2	1
M	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0

높은 곳에서는 전혀 집락이 보이지 않는 false negative 현상은 나타났으며 본 실험실에서 제조한 간이 시험지는 일본 간이 시험지에서 보다 집락 수는 약간 적게 나타나는 경향이 있으나, 집락의 크기가 더 크고 분명하여 전문가가 아니라도 쉽게 판별할 수 있었으며, 평판법과 비교해 볼 때 집락수가 조금 떨어지나 정성적인 실험을 할 때는 상관 없다고 생각된다.

Deoxycholate의 대체

Sodium deoxycholate를 농도별로 bile salts No. 3과 대체하여 만든 간이 시험지를 표준 평판법 및 일본 간이 시험지와 비교 실험하였을 때, 표 8에서 보는 바와 같이 일본 간이 시험지나 bile salts No. 3 사용시 보다 더 좋은 결과를 얻었다. Sodium deoxycholate를 0.005%, 0.01% 사용시에는 0.03% 사용시 보다 더 많은 집락수를 나타내지만, 그람 양성균이 자랄 우려가 있으므로 0.03%를 사용하여 간이 시험지를 제조하였다.

표 8에서 보는 바와 같이 bile salts No. 3으로 제조한 간이 시험지는 일본 간이 시험지보다도 집락수가 약간 떨어지는 결과를 보이지만 bile salts No. 3을 deoxycholate으로 대체하여 제조한 간이 시험지는 평판법과 비교해도 전혀 손색이 없는 것을 알 수 있었다. 더우기 본 간이시험지는 spot이 아주 분명하고 크게 나타나는 장점을 가지고 있어서 비 전문가 일지라도 쉽게 판별할

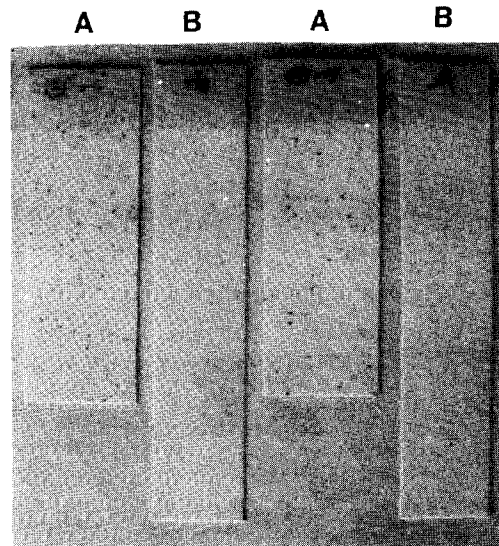


Fig. 1. Comparison of the KRIBB Test Strips(A) with Japanese Commercial Strips(B).

수 있으며 일본 제품과 비교하여 볼때 훨씬 우수한 것임을 알 수 있었다(Fig. 1).

시료 분석에 의한 간이 시험지와 다른 상품과의 비교

현재 시중에서 판매되고 있는 우유류(H, I), 병과류(M, N)에서는 모두 대장균이 없음이 나타났고, 그외 여러가지 식품 아이스크림류(J, K, L), 두부류(A, B, C, D), 소세지류(E, F, G)를 시료로

한 것에서는 표 9와 같은 결과를 얻었다. 본 KRIBB(Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)간이 시험지는 집락이 크고 분명하며 집락수에 있어서도 평판법과 비교해 볼 때 거의 손색이 없음을 알 수 있다. 그러나, 일본제품은 집락이 아주 미세하고 집락수도 평판보다 적게 나타나고 불규칙하게 나타나므로 전문가가 아니면 판별하기 어려운 점이 많은 것을 볼 때, 본 KRIBB 간이 시험지가 일본제품 보다도 훨씬 우수하게 개발되었음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. US Patent 571001.
2. 일본특허 제 953332.
3. 일본특허 제 1045278.
4. Gilardi GL (1983): Evaluation of a Micro-method for Rapid Identification of Non-enteric Gram negative Rods. *Amer Soc Microbiol Annual Meeting, New Orleans*.
5. Lenette EH, Balows A, Hausser WJ, Truant JP (1980): Manual of Clinical Microbiology, 3th edition. *Amer Soc Microbiol*.
6. Monget D, Boeufgras JM, Desmonceaux M, Ponchon S, Guicherd M (1983): A New System for the Identification of Clinical Isolates of Non-enteric Gram negative Rods. First European Congress of Clinical Microbiology, Bologna.
7. Otto LA, Pickett MJ (1976): Rapid Method for Identification of Gram-negative, Non-fermentative Bacilli. *J Clin Microbiol*, 3: 566-575.
8. Rand MC, Arnold E, Michael J (1980): Microbiological examination of water, pp.875-1151. Mary Ann Franson, " Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 15th Ed., APHA, Inc., Washington, D.C..
9. Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966): The Aerobic Pseudomonas; A Taxonomic Study. *J Gen Microbiol*, 43: 159-271.

=Abstract=

A Study on the Development of Microorganism Test Strips

In-Ae Lee[†], Jae-Wha Kim, Hee-Gu Lee, Chang-Keun Seong*,
In-Seong Choe and Tai-Wha Chung

*Molecular and Cellular Biology Research Group,
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon 306-600,
Department of Food Science & Technology, Taejon, Korea

The objective of this study was to develop a paper strip which could determine *E. coli* qualitatively and quantitatively in water, wastewater, drinks, or food. This paper strip method was a simple and rapid test method that determine *E. coli* by visual identification. In this study, nutrient culture media were formulated and characterized for optimum conditions. Paper strips were then prepared by impregnating into the media and dried at 60°C. The test procedure is quite simple to use. The paper strip was dipped into a sample, and excess sample was removed. The strip was then incubated at 37°C for 16 to 20 hours and the number of colonies on the strip was counted. The color of the colony spots produced by microorganisms varied depending on the media formulation. Violet-red spots were produced by *E. coli*. The test method was simple, rapid and no special laboratory equipment was necessary for visual identification. Therefore, this test method is applicable to on-site tests such as field tests or home tests. The paper strip method was compared with the standard agar plate method and Japanese commercial product. The method of the economical preparation of test strips was studied for production on industrial scale.

Key Words: Paper strip method, Visual identification, Violet-red spot.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(1): 49-55, June 1996]

[†]Corresponding author