

## 보 문

# 장구균 검출 배지 개발

장동호<sup>1</sup> · 윤준범<sup>1</sup> · 이근현<sup>2</sup> · 박경량<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한남대학교 대덕밸리캠퍼스 생명시스템과학과, <sup>2</sup>주)휴마스

## Development of selective media for Enterococci

Dong-Ho Chang<sup>1</sup>, Jun-Beom Yoon<sup>1</sup>, Keun Heon Lee<sup>2</sup>, and Kyeong Ryang Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Science and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34430, Republic of Korea

<sup>2</sup>Humas Co., Ltd., Daejeon 34113, Republic of Korea

(Received December 17, 2015; Revised January 15, 2016; Accepted January 15, 2016)

**ABSTRACT:** An enterococci selective medium was developed to detect the presence of enterococci for use as a fecal contamination indicator. Among several media which have been known to detect enterococci, the following 9 different kinds of media were selected: Enterococci Confirmatory agar, Azide dextrose agar, Bromocresol-purple azide agar, Esculin bile agar, Citrate azide tween carbonate agar, KF Streptococcus agar, BROLACIN agar, Kanamycin esculin azide agar, and Membrane filter Enterococcus selective agar. Various components from the nine media were mixed to develop a more effective enterococcus selective medium. The newly developed medium named as 'Enterococcus Mixed medium' was more effective than the previous 9 media. Enterococci strains (*Enterococcus avium* KACC 10788, *Enterococcus faecium* KACC 11954, *Enterococcus saccharolyticus* KACC 10783, *Enterococcus durans* KACC 10787, *Enterococcus faecalis* KACC 11304, and *Enterococcus hirae* KACC 10779) and non-enterococci strains (*Escherichia coli* KACC 10005, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KACC 10768, and *Bacillus subtilis* KACC 10111) were used to test the new medium. As a result, the enterococci strains grew well on the Enterococcus Mixed medium whereas the non-enterococci strains did not grow well on it. Additionally, growth of enterococci with freshwater and seawater samples was observed to be good on the Enterococcus Mixed medium. The result of this study confirmed that the Enterococcus Mixed medium was effective in detecting the target enterococci.

**Key words:** *Enterococcus*, freshwater, seawater, selective media

음용수와 오락용수 등에 존재하는 병원균을 감시하고, 분석해서 인간이 사용하는 물이 미생물학적으로 안전한 지를 결정하는 것은 매우 중요하다(Emori and Gaynes, 1993; Bates, 1997; Noskin, 1997). 그러나 일반적으로 물속에 서식하면서 수인성 질환을 일으키는 모든 병원성 미생물을 검출하는 것은 불가능하며(Toranzos and McFeters, 1997), 병원균을 검출하고 계수하는 방법은 비용이 많이 들고 복잡하기 때문에, 전문화된 일부 시설에만 실험을 할 수 있다(Cooper and Danielson, 1997). 따라서 병원균 대신 쉽게 검출할 수 있는 지표미생물을 이용하여 수질환경지표로 사용하고 있고, 그 종류로는 총 대장균군(total coliforms), 분원성 대장균(fecal coliforms; *E. coli*)과 분원성 포도상구균 또는 장구균(fecal streptococci or

enterococci)이 있다. 국내의 경우 수질환경지표로 먹는 물에서는 장구균을 지표로 사용하지 않고, *E. coli*와 분원성 대장균을 주로 사용하며, 검출 기준은 100 ml에서 검출되지 않아야 한다고 규정되어 있다. 그러나 국내와 달리 미국환경보호청(USEPA) 그리고 유럽(EU) 등 선진국에서는 장구균을 지하수 및 오락용수에서 검사하도록 분변오염지표항목으로 지정하여 사용하고 있다. 따라서 국내에서는 장구균에 대해 기준이 없어 미국 지하수법을 인용하여 사용하고 있고, 입욕수질에서만 수질환경지표로 장구균과 *E. coli*를 사용하고 있다. 입욕수질의 경우 검출 기준은 *E. coli*는 500 CFU/100 ml, 장구균은 100 CFU/100 ml 이상 검출되지 않아야 한다고 규정되어 있다.

일반적으로 장구균은 장관염 증상을 일으키는 해수와 담수의 위생 상태와 연관 관계가 매우 높고, 대장균과 달리 분변으로 오염되지 않는 환경에서는 존재하지 않는다. 또 장구균은 온혈동물의 분변에서는 항상 나타나고, 하수가 섞여 있는 물

\*For correspondence. E-mail: krpark@hnu.kr;  
Tel.: +82-42-629-8770; Fax: +82-42-629-8769

에 존재하는 하수성분을 이용해 분열하지 않으나, 이들은 하수에서 대장균뿐 아니라, 수인성 질환을 일으키는 병원성균 또는 바이러스와 비슷한 저항성을 갖고 장시간 생존할 수 있기 때문에, 지표미생물로 유용하게 사용 될 수 있음이 확인되고 있다(Sinton et al., 1993a, 1993b; Kay et al., 1994).

장구균은 *Enterococcus* 속(genus I)에 속하는 G+C 함량이 낮은 그람 양성균의 연쇄상 구균으로(Sneath et al., 1986), 일반적으로 통성혐기성이고, 40%의 담즙(bile salt)과 6.5% NaCl 그리고 pH 9.6에서 생존가능하며, 사람의 분변에서 약  $10^5$ - $10^7$  CFU/g의 농도로 존재한다. 인간의 분변에 의한 수계의 오염 시 주로 *E. faecium*과 *E. faecalis*, 그리고 *E. durans*가 검출된다(Volterra et al., 1986; Audicana et al., 1995; Figueras et al., 1998). 또 장구균은 하수, 지하수, 담수에서 대장균과 생존력을 비교한 결과 일부 연구에서 대장균보다 오래 생존함이 확인되었고, 하수의 1차 침전과 여과장치 처리를 통한 장구균의 제거 효율이 대장균보다 훨씬 낮아 virus 생존율과 비슷하게 나타난다고 보고되었다(Cohen and Shuval, 1973).

이처럼 오염의 지표로 활용할 수 있는 장구균 분석 방법에는 최확수(Most probable number; MPN)법(Allen et al., 1982)과, 다중시험관법(multipletube fermentation), membrane filtration 방법(Slanetz and Bartley, 1957), 효소발색(chromogenic enzyme substrate test)법(Perry et al., 2006), 23S rRNA 유전자를 이용한 분자생물학적 기법(He and Jiang, 2005) 등이 있다. 이 중 장구균 검출에 가장 일반적으로 사용되는 방법은 membrane-filtration 방법으로 EPA도 이 방법을 응용한 EPA method 1600-1과 1106.1 방법으로 인증하고 있다. 그러나 이 방법은 오랜 기간 균을 배양해야 하고, 추가로 확인단계에서 3일 이상이 소요되는 단점이 있다.

본 연구는 분변오염의 지표가 되는 장구균을 좀 더 쉽고 정확하게 검출할 수 있는 배지를 개발하여, 이 배지에서의 장구균 배양 조건과 배양시간에 따른 균체 증식 속도 등을 조사한 후, 실제 환경시료에 존재하는 장구균 검출에 활용할 수 있는 지를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

분원성 장구균 검출 배지를 개발하기 위해 9종의 공시균주를 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 장구균 6종(*Enterococcus avium* KACC 10788, *Enterococcus faecium* KACC 11954, *Enterococcus saccharolyticus* KACC 10783, *Enterococcus*

*durans* KACC 10787, *Enterococcus faecalis* KACC 11304, *Enterococcus hirae* KACC 10779)과 비장구균 3종(*Escherichia coli* KACC 10005, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KACC 10768, *Bacillus subtilis* KACC 10111)이고, 이들 균주는 한국 농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

### 배지 조성

장구균의 배양에 적합한 배지를 개발하기 위해, 장구균의 농화배양에 이용되고 있는 가장 일반적 배지인 Enterococci Confirmatory agar, Azide dextrose agar, Bromocresol-purple azide agar, Esculin bile agar, CATC (Citrate azide tween carbonate) agar, KF Streptococcus agar, BROLACIN (Bromothymol-blue Lactose Cystine) agar, Kanamycin esculin azide agar, Membrane filter Enterococcus selective agar 등 총 9종류의 배지(Sneath et al., 1986)를 일차 선별하여 본 실험에 사용하였다. 또 이들 9종류의 장구균 배지들을 다양한 조성으로 실험한 후 장구균 검출에 보다 적합한 *Enterococcus Mixed Medium*을 개발하였고(Table 1), 효소발색법시 형광성을 방해하는 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 대신 장구균에 특이적으로 형광성을 나타내는 4-methumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside (0.008 g/L)를 첨가한 Enterococcus Mixed F medium도 개발하였다.

Table 1. Composition of Enterococcus Mixed medium

Enterococcus Mixed medium (pH 7.2 $\pm$ 0.2)	(g/L)
Peptone	10
Yeast extract	10
Sodium azide	0.5
Lactose	5
Potassium dihydrogen phosphate	2.7
Sodium citrate	10
Agar	16
Also to be added:	
Sodium carbonate solution	20 ml
2,3,5-Triphenyltetrazolium solution	10 ml
<b>Sodium carbonate solution</b>	
Dissolve 2 g of sodium carbonate in 20 ml of distilled water and filter-sterilized	
<b>2,3,5-triphenyltetrazolium solution</b>	
Dissolve 0.1 g of 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in 10 ml of distilled water and filter-sterilized	
Mix all component except for sodium carbonate solution and 2,3,5-triphenyltetrazolium solution and autoclave. Cool down to temperature 50°C, and add sodium carbonate solution and 2,3,5-triphenyltetrazolium solution	

## 배양 조건

각 공시균주를 LB (Difco)배지에서 전배양한 다음 OD 1.0으로 조정하고 Enterococcus Mixed broth와 Enterococcus Mixed F broth에 각각 1%씩 접종한 후 41°C로 조정된 배양기에서 2일 정치배양하며 균의 생육과 형광성을 측정하였다. 측정은 2시간마다 배양액의 일정량을 분취한 후 UV-Spectrophotometer (SmartSpec3000, Bio-Rad)를 이용하여 600 nm에서 균체량을 측정하였고, VersaFluor™ Fluorometer (Bio-Rad)를 이용하여 형광성을 측정하였다.

## 담수와 해수의 장구균 검출 및 측정

담수는 대전에 흐르고 있는 대전천, 관평천, 유등천 그리고 갑천에서 5곳을, 해수는 전라북도 군산시 금강하구에 있는 무역항인 군산항 근처에서 임의로 10곳을 선정하여 실험에 사용하였다. 채취된 시료는 멸균된 용기를 이용해 4°C를 유지하여 실험실로 운반하였다. 현장 시료는 Enterococcus Mixed broth와 Enterococcus Mixed F broth 배지 조성을 100 ml에 맞게 조정하여 멸균시킨 병에 첨가한 후, 담수와 해수에서 채취한 시료를 각각 100 ml씩 취하여 준비된 병에 분주하고 41°C에서 배양하며, 일정량씩 분취하여 600 nm의 UV-Spectrophotometer (SmartSpec3000, Bio-Rad)와, VersaFluor™ Fluorometer (Bio-Rad)를 이용하여 균체량과 형광성을 측정하였다.

## 16S rRNA 유전자를 이용한 동정

현장시료의 장구균 확인을 위해 갑천 시료 100 ml을 membrane filter법을 이용하여 Enterococcus Mixed agar에서 41°C로 1일간 배양하여 검출된 콜로니 중 11개의 단일 콜로니를 임의로 분리하였다. 이들 각각의 콜로니는 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC A-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머를 이용하여 direct PCR을 통해 PCR 산물을 얻은 후 solvent(solgent)에 의뢰하여 16S rRNA gene의 염기서열 분석을 수행하였다. 분석된 각 염기 서열들은 EZbiocloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)에서 염기서열을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 장구균 생장 및 형광성 측정

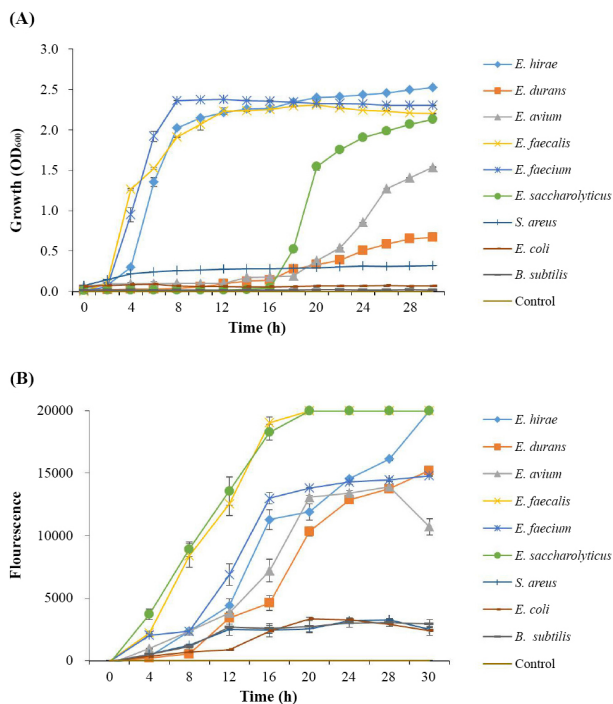
본 실험에 사용한 9종류의 장구균 배지 중 Azide dextrose 배지와 Citrate azide tween carbonate 배지 그리고 Membrane

filter Enterococci Selective 배지가 장구균만 생장하고 비장구균들은 저해되어 장구균 검출에 비교적 적합한 배지로 확인되었다(자료 미제시). 그러나 이 배지들도 조건에 따라 일부 장구균이 생장하지 않거나 비장구균이 생장하였다. 따라서 이들 배지성분 중 coliforms group의 생장을 저해하기 위해 sodium azide 함량을 0.5 g/L로 조정하였고, indicator agent로 2,3,5-triphenyltetrazolium solution을 첨가하였다. 그리고 저온성 세균 및 일부 중온성 세균이 증식하지 못하도록 배양 온도를 41°C로 조절하여 장구균만 생장하고 비장구균은 저해되는 Enterococcus Mixed medium을 개발하였다. 그리고 6종의 장구균과 3종의 비장구균을 대상으로 개발된 Enterococcus Mixed broth배지에서 균의 생육을 Enterococcus Mixed F broth배지에서 형광성 실험을 진행하였다.

개발된 각 배지에 9종의 공시균주를 접종하여 41°C에서 48시간 배양하며, 균의 생육과 형광성을 3회 반복하여 측정한 결과, *E. faecium*과 *E. hirae* 그리고 *E. faecalis*는 접종 후 6시간 안에 OD 1.0에 도달해 가장 활발히 생장하였고, *E. saccharolyticus*는 약 18시간 후에, *E. avium*은 26시간 후에 OD 1.0에 도달하였다. 그리고 *E. durans*는 다른 장구균에 비해 비교적 늦게 생장하여 배양 30시간 후에도 OD 0.7을 나타내었고, 비장구균인 *E. coli*와 *B. subtilis* 그리고 *S. aureus*는 모두 이 배지에서 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 그리고 형광성 측정에서 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride를 첨가할 경우 균의 생장 측정은 가능하지만, 배양액의 색 자체가 강하게 나타나 형광성은 측정할 수가 없었다. 따라서, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 제거한 후 대신 4-methylumbelliferyl-β-D-glycoside를 첨가하여 만든 배지에 각각의 균을 접종하여 형광성을 관찰한 결과, 장구균은 접종한 후 9시간부터 20시간 내에 측정치가 10,000 이상의 형광성이 나타나는 반면 비장구균은 생장이 저해됨과 동시에 형광성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 따라서, 9종류의 장구균 배지에서는 일부 장구균만 생장하거나 비장구균이 생장한 반면 본 연구에서 개발한 Enterococcus Mixed medium은 6종의 모든 장구균이 생장하였고, 비장구균은 저해되어 새로이 개발된 Enterococcus Mixed medium이 장구균 검출에 적합한 배지임을 확인하였을 뿐만 아니라, 비장구균을 제외한 모든 장구균은 형광성을 나타내어 효소발색법을 이용한 Enterococcus F Mixed medium도 장구균 검출에 활용할 수 있음을 확인하였다.

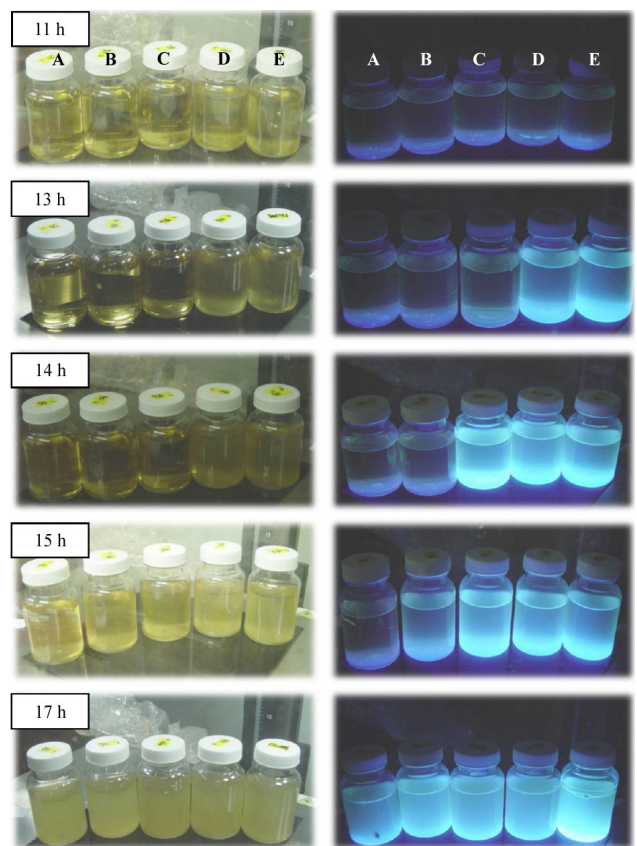
### 환경 시료에서의 장구균 검출 및 개체 수에 따른 형광성 분석

현재 수질 및 여러 환경의 검체에서 장구균을 분리하는데 사용하는 배지로는 Enterococcus agar와 m-Enterococcus agar



**Fig. 1.** Bacterial growth curve (A) on Enterococcus Mixed broth (pH 7.2) and fluorescence measurement (B) on Enterococcus Mixed F broth. Cultures were incubated at 41°C standing for 30 h.

그리고 mEI Agar (Difco) 등이 사용되고 있지만 이들 배지는 장구균 외 다른 균이 검출 되기도 한다(Yoon *et al.*, 2010). 따라서 본 실험에서 개발한 Enterococcus Mixed F medium이 환경 시료에서의 장구균 검출 효율을 확인 하기 위해 대전지역의 주요 하천인 갑천에서 시료를 채취하여 장구균 검출효과를 확인 하였다. 장구균의 개체 수와 형광성의 상관성을 비교 분석하기 위해 시료를 30, 60, 90, 120, 150 CFU/100 ml 이 되도록 희석한 후 41°C에서 18시간 Enterococcus Mixed F broth에 배양하여 1 시간 간격으로 형광성을 측정하였고, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glycoside가 366 nm에서 blue 형광을 띄는 것을 이용하여 육안으로도 관찰하였다(Fig. 2). 또 희석한 장구균의 이론적인 개체수를 확인하기 위해 각각의 희석한 시료를 막여과법을 이용하여 41°C에서 2일간 배양하며 직접 콜로니를 계수하였다. 그 결과 대부분 이론 값과 측정 값이 약 10 CFU/100 ml 정도의 차이를 보여 비교적 근사치를 나타냈으나, 150 CFU/100 ml에서는 약 30 CFU/100 ml 정도의 차이를 나타내었으나(Table 2), 장구균은 100 CFU/100 ml 이상의 유무로 오염 여부를 판단하므로 형광성을 이용하여 장구균을 판단하는데 문제가 없을 것으로 생각된다. 또 균 수에 따른 형광강도의 변화를 확인 해본 결과 홍미롭게도 30, 60, 90 CFU/100 ml까지는 13시간부터 형광성이 나타나기 시작해 14시간만에 형광성이 최대값을



**Fig. 2.** Fluorescence of the increased *Enterococcus* concentration in fresh water after 11 h. A, 30 CFU/100 ml; B, 60 CFU/100 ml; C, 90 CFU/100 ml; D, 120 CFU/100 ml; E, 150 CFU/100 ml.

**Table 2.** The difference between the theoretical value and the measured value of the dilution factor

Theoretical value (CFU/100 ml)	measured value (CFU/100 ml)			
	1st	2nd	3rd	Average
30	21	21	27	23 ± 2
60	60	47	47	51 ± 4
90	98	70	73	80 ± 9
120	95	114	115	108 ± 7
150	112	127	115	118 ± 5

나타내고, 120, 150 CFU/100 ml에서는 12시간부터 형광성이 나타나 약 13-14시간만에 최대값을 나타내었다(Fig. 3). 따라서 Enterococcus Mixed F medium에서 41°C로 배양했을 때, 장구균이 약 100 CFU/100 ml 이상 존재 할 경우 약 13-14시간 이전에 형광성이 나타나고, 100 CFU/100 ml 이하일 경우 약 13-14시간이 지나서 형광성이 나타나는 것으로 확인되어 장구균의 개체수를 간접적으로 추정할 수 있을 것으로 판단된다. 뿐만 아니라 최근에는 이와 같은 효소발색법으로 대장균

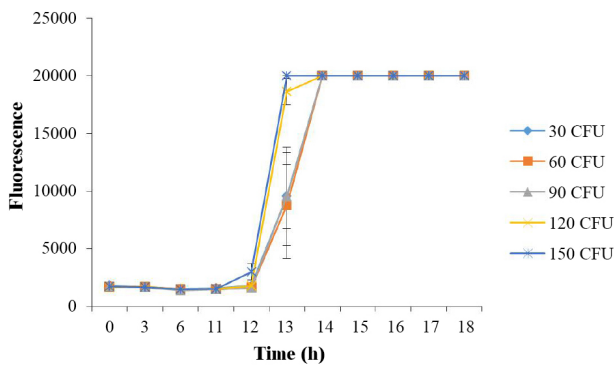


Fig. 3. Comparison of fluorescence based on time. Enterococcus concentration in fresh water was dramatically increased.

을 검사할 수 있는 키트를 제조하여 사용하고 있기 때문에(Lee et al., 2009), 담수나 해수에 존재하는 장구균을 본 연구에서 개발한 효소발색법을 이용하여 분석하면 매우 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

### 분리된 장구균의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

갑천에서 검출한 균이 장구균인지 확인하기 위해 개체수 조사 배지에서 검출된 콜로니 중 무작위로 11개의 콜로니를 분리하여 16S rRNA 유전자의 중합효소 연쇄반응으로 염기서열을 분석하였다. 그 결과 7개 균주가 *Enterococcus faecium* ATCC 19434<sup>T</sup>와 99.64~100%, 3개 균주는 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433<sup>T</sup>와 99.16~100%, 그리고 1개의 균주는 *Enterococcus durans* CECT411<sup>T</sup>와 99.88%의 상동성을 나타내었다(Table 3). 따라서 갑천에서 주로 발견되는 장구균은 *E. faecium*과 *E. faecalis*로 이 두 균주가 우점종인 것으로 생각된다. 이 결과는 Yoon 등(2010)은 국내 및 국외에서 조사한 여러

검체에서 장구균을 분리 할 경우 주로 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 우점종으로 검출된다는 보고와 일치할 뿐 아니라, 본 실험에서 개발된 배지에서 생육된 균들이 장구균임을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

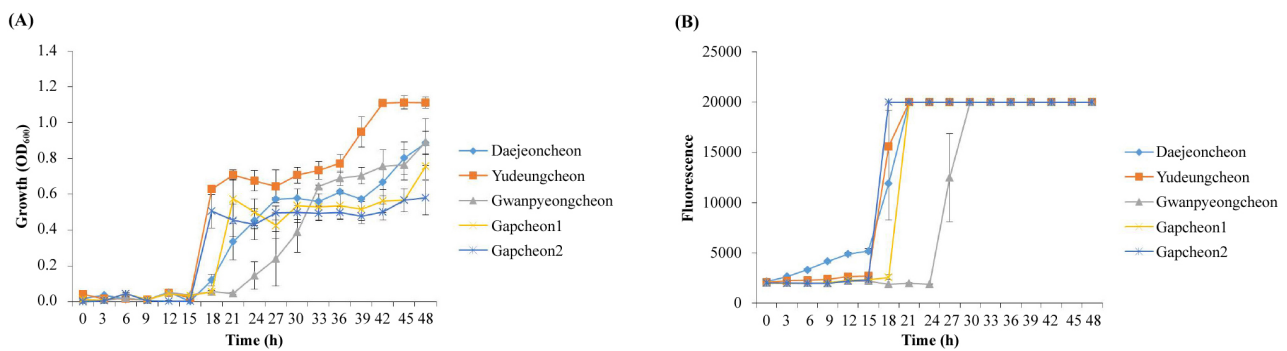
### 개발 배지의 담수 및 해수에서의 장구균 검출

대전천, 유등천 그리고 관평천에서 각 1곳 그리고, 갑천은 두 곳에서 시료를 채취하여 총 5개의 담수 시료와 군산항 주변에서 임의로 11곳에서 해수 시료를 채취하였다. 담수 및 해수의 시료들은 각각 100 ml씩 Enterococcus Mixed medium을 첨가하여 41°C에서 48시간 동안 배양한 후 장구균의 생육 및 형광성을 측정한 결과 모든 시료에서 균이 성장하고 형광성을 띄는 것을 확인하였다. 즉, 담수에서는 배양한지 48시간 정도에서 약 OD 0.6에서 OD 1.2까지 성장하는 것을 확인하였고, 약 16시간부터 형광성이 나타났고(Fig. 4), 해수 역시 OD 0.7에서 OD 1.1까지 장구균이 성장하는 것을 확인하였다. 그리고 형광성은 담수보다는 늦은 약 30시간째부터 형광성이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이는 해수는 NaCl의 함량 등 여러 환경조건들 때문에 장구균 생장이 담수보다 다소 늦게 나타난 것으로 생각되지만 전체적으로 Enterococcus Mixed medium을 이용할 경우 담수와 해수에서 장구균을 검출할 수 있음을 확인하였고, 또 장구균에 특이적으로 이용하는 4-methylumbelliferyl-β-D-glycoside을 이용할 경우 일반 담수와 해수에서 장구균 검출 시 특정 장비가 없어도 장구균의 존재 유무를 간접적으로 확인할 수 있어, 본 연구에서 개발된 배지가 추후 해수와 담수에서 장구균 검출에 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

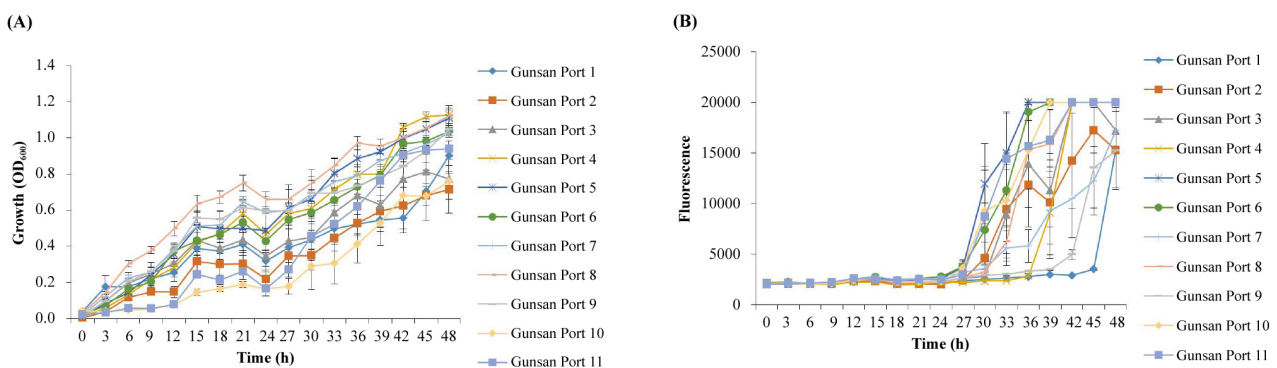
Table 3. Identification of isolates from the Gapcheon in Deajeon by 16S rRNA gene sequence

Colony*	Closest relative based on partial 16S rRNA gene sequences	Similarity (%)	Accession No.
Gap1	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 <sup>T</sup>	100	ASDA01000001
Gap2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 <sup>T</sup>	100	ASDA01000001
Gap3	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109
Gap4	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109
Gap5	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109
Gap6	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109
Gap7	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109
Gap8	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 <sup>T</sup>	99.16	ASDA01000001
Gap9	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	99.64	AJKH01000109
Gap10	<i>Enterococcus durans</i> CECT411 <sup>T</sup>	99.88	AJ420801
Gap11	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136 <sup>T</sup>	100	AJKH01000109

\* Gapcheon sample



**Fig. 4.** Time course on the growth curve (A) and fluorescence measurement (B) of sample in fresh water. The samples were cultured in Enterococcus Mixed and Enterococcus F Mixed medium.



**Fig. 5.** Time course on the growth curve (A) and fluorescence measurement (B) of sample in sea water. The samples were cultured in Enterococcus Mixed and Enterococcus F Mixed medium.

## 적 요

분변오염의 지표가 되는 장구균을 검출하기 위하여 장구균 선택 배지를 개발하였다. 기존에 알려진 여러 장구균 검출 배지 중 총 9종류(Enterococci Confirmatory agar, Azide dextrose agar, Bromocresol-purple azide agar, Esculin bile agar, Citrate azide tween carbonate agar, KF Streptococcus agar, BROLACIN agar, Kanamycin esculin azide agar, Membrane filter Enterococcus selective agar)의 배지를 선별하였고, 배지 성분을 적절히 조합하여 새로운 배지 Enterococcus Mixed medium을 개발하였다. 배지의 효과를 검증하기 위하여 장구균 6종류(*Enterococcus avium* KACC 10788, *Enterococcus faecium* KACC 11954, *Enterococcus saccharolyticus* KACC 10783, *Enterococcus durans* KACC 10787, *Enterococcus faecalis* KACC 11304, *Enterococcus hirae* KACC 10779)와 비장구균 3종류(*Escherichia coli* KACC 10005, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KACC 10768, *Bacillus subtilis* KACC 10111)를 사용하였다. 그 결과 새롭게 개발된 장구균 검출배지에서 비장구균의 생장이 억제된 반면에 장구균 6종류는 모두

생장하는 것을 확인하였다. 또 환경시료에서 장구균을 분리할 수 있는지 확인하기 위해 하천과 바다에서 채취해온 시료를 이용하여 실험한 결과 장구균의 생장을 확인하였다. 따라서 이 배지를 이용하면 수질 분변오염의 지표가 되는 장구균을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

## 감사의 말

이 논문은 2015년 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었음.

## References

- Allen, H.E., Minear, R.A., and Sues, M.J. 1982. Metal Ions, vol. 2, Chapter 2, pp. 43-168. In Suess, M.J. (ed.), Examination of Water for Pollution Control. A reference handbook-1982. Pergamon, Oxford, UK.
- Audicana, A., Perales, I., and Borrego, J.J. 1995. Modification of kanamycin-esculin-azide agar to improve selectivity in the

- enumeration of fecal streptococci from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4178-4183.
- Bates, J.** 1997. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J. Hosp. Infect.* **37** 89-101.
- Cohen, J. and Shuval, H.I.** 1973. Coliforms, fecal coliforms, and fecal streptococci as indicators of water pollution. *Water Air Soil Pollut.* **2**, 85-95.
- Cooper, R.C. and Danielson, R.E.** 1997. Detection of bacterial pathogens in wastewater and sludge, pp. 222-230. In Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., and Walter, M.V. (eds.), *Manual of Environmental Microbiology-1997*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Emori, T.G. and Gaynes, R.P.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 428-442.
- Figueras, M.J., Inza, I., Polo, F., and Guarro, J.** 1998. Evaluation of the oxolinic acid-esculin-azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine monitoring programme for bathing waters. *Can. J. Microbiol.* **44**, 998-1002.
- He, J.W. and Jiang, S.** 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2250-2255.
- Kay, D., Jones, F., Wyer, M.D., Fleisher, J.M., Salmon, R.L., Godfree, A.F., Jacquotte, A.Z., and Shore, R.** 1994. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet* **344**, 905-909.
- Lee, K.H., Kim, H.S., Kim, B.R., Lee, S.H., In, C.K., and Park, K.R.** 2009. Fluorogenic and chromogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* and total coliform bacter. *J. Korean Soc. Water Quality* **25**, 363-369.
- Noskin, G.A.** 1997. Vancomycin-resistant enterococci: Clinical, microbiologic, and epidemiologic features. *J. Lab. Clin. Med.* **130**, 14-20.
- Perry, J.D., James, A.L., Morris, K.A., Oliver, M., Chilvers, K.F., Reed, R.H., and Gould, F.K.** 2006. Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in *Escherichia coli* and enterococci. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 977-985.
- Sinton, L.W., Donnison, A.M., and Hastie, C.M.** 1993a. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part I: Taxonomy and enumeration. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* **27**, 101-115.
- Sinton, L.W., Donnison, A.M., and Hastie, C.M.** 1993b. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part II: Sanitary significance, survival, and use. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* **27**, 117-137.
- Slanetz, L.W. and Bartley, C.H.** 1957. Numbers of Enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriol.* **74**, 591-595.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G.** 1986. Gram-positive cocci, pp. 999-1103. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Toranzos, G.A. and McFeters, G.A.** 1997. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters, pp. 184-194. In Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., and Walter, M.V. (eds.), *Manual of environmental Microbiology-1997*, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Volterra, L., Bonadonna, L., and Aulicino, F.A.** 1986. Faecal streptococci recoveries in different marine areas. *Water Air Soil Pollut.* **29**, 403-413.
- Yoon, T.H., Lee, H., Lee, S.J., Yeo, I.H., and Eom, S.W.** 2010. Detection of Enterococci and their vancomycin resistance in drinking spring-water. *Korean J. KSEE* **32**, 979-985.