

環境衛生用殺菌劑藥效試驗測定法

中華民國 94 年 11 月 30 日環署檢字第 0940097070 號公告

自公告日起實施

NIEA D201.01C

一、方法概要

本方法係使用環境衛生用藥，經噴灑或塗抹等方式得以消滅菌株(可測試菌株如表一)。經使用環境衛生用藥殺菌劑後，檢測其微生物殺菌率可達 99.9% 以上。

二、適用範圍

本方法適用於環境衛生之環境殺菌劑。

三、干擾

- (一)樣品中含有抑制或促進細菌、酵母菌或黴菌生長之物質。
- (二)檢測使用的玻璃器皿及設備含有抑制或促進細菌、酵母菌或黴菌生長的物質。
- (三)其他。

四、設備

- (一)量筒：一般使用 100、500 及 1,000 mL 之量筒。
- (二)定量瓶：一般使用 1,000 及 2,000 mL 之量筒。
- (三)吸管：一般使用有 0.1 mL 刻度之 1、5 及 10 mL 滅菌玻璃吸管或市售無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管(Micropipet)。
- (四)培養皿：90×15 或 100×15 mm 之滅菌玻璃培養皿或市售無菌塑膠培養皿，底面平滑無氣泡、刮傷或其他缺點者。
- (五)稀釋瓶：一般使用 100、250、500 及 1,000 mL 可滅菌之硼矽玻璃製品。
- (六)三角錐瓶：一般使用 500 及 1,000 mL 可滅菌之硼矽玻璃製品。
- (七)容器：容量 120 mL 以上可滅菌之硼矽玻璃瓶或無菌塑膠製有蓋容器，或市售無菌袋。
- (八)冰箱：溫度能保持在 0 至 5°C 者。
- (九)水浴槽：溫度能保持約 50°C 者。
- (十)培養箱：溫度能保持在 35±1°C 者。
- (十一)高壓滅菌釜：用於培養基和稀釋液等不能乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌。溫度能保持在 121°C (壓力約 15 lb/in² 或 1.2 kg/cm²) 滅菌 15 分鐘以上者。

- (十二)無菌操作檯：垂直循環負壓式無菌操作檯有 UV 燈、高效率過濾網、預濾網及有玻璃拉門。
- (十三)乾熱滅菌器（烘箱）：用於玻璃器皿等用具之滅菌。溫度能保持在 160°C 達 2 小時或 170°C 達 1 小時以上者。
- (十四)菌落計數器：適用於菌落之計算者。
- (十五)彎曲玻璃棒：直徑 3 至 4 mm，其形狀與規格如圖一所示。
- (十六)天平：能精秤至 0.01 g 者。
- (十七)接種裝置：適用於細菌、酵母菌或黴菌之移植者。
- (十八)測試菌株：每 mL 菌數介於 10^5 至 10^7 之間者。

五、試劑

(一)培養基：可選取下列之胰蛋白大豆瓊脂培養基（Tryptone soy agar, TSA）或培養皿計數培養基（Plate count agar, PCA）二者之一來培養細菌。依下列配方配製培養基，或使用市售商品化的培養基均可。使用沙氏葡萄糖培養基（Sabouraud Dextrose Agar, SDA）或馬鈴薯葡萄糖培養基（Potato dextrose agar, PDA）來培養黴菌及酵母菌。

1. 胰蛋白大豆瓊脂培養基

胰化蛋白胨（Tryptone）	15.0 g
大豆蛋白胨（Soytone）或蛋白胨（Peptone）	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
蒸餾水	1 L

2. 培養皿計數培養基

葡萄糖（Glucose）	1.0 g
胰化蛋白胨	5.0 g
酵母抽出物（Yeast extract）	2.5 g
瓊脂（Agar）	15.0 g
蒸餾水	1 L

上述 1 及 2 之培養基經 121°C 滅菌 15 分鐘後，冷卻至約為 50°C 後，倒入適量之培養基於無菌培養皿中，於室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，保存時間以不超過兩週為限。亦可根據檢驗需求量，依配方比例配製培養基。

3. 沙氏葡萄糖培養基

葡萄糖（Dextrose）	40.0 g
胰化蛋白胨	10.0 g
瓊脂	15.0 g
蒸餾水	1 L

4.馬鈴薯葡萄糖培養基

葡萄糖	1.0 g
胰化蛋白朊	5.0 g
酵母抽出物	2.5 g
瓊脂	15.0 g
蒸餾水	1 L

上述 3 及 4 之培養基經 121°C 滅菌 15 分鐘後，冷卻至約為 50°C 後，培養基分別倒入約 15 mL 至無菌培養皿中，於室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，保存時間以不超過兩週為限。可根據檢驗需求，依配方比例配製培養基。

(二) 無菌稀釋液

1.磷酸二氫鉀溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)溶於 50 mL 之蒸餾水中，俟完全溶解後，以 1.0 N 氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.5 。然後加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

2.氯化鎂溶液

取 8.1 g 氯化鎂($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，先溶於少量蒸餾水中，俟完全溶解後，再加蒸餾水至全量為 100 mL，儲存於冰箱中做為原液備用。

分別取 10 mL 氯化鎂溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀溶液再加入蒸餾水至全量為 2,000 mL，混搖均勻後，分裝於稀釋瓶中，經 121 °C 滅菌 15 分鐘，做為無菌稀釋液備用。

六、步驟

下列之步驟(一)至(五)須在無菌操作台內操作。

- (一)形成單一菌落之方法：一般使用平面培養基，將欲分離之菌落予以三區劃菌或其它適當之純化方法，選出欲測試之菌落，供為殺菌劑藥效測試用。若欲分離酵母菌或黴菌應選用適當方法。
- (二)使用濁度計方法或其它適當方法，將已純化的菌落(一般挑選用平面三區劃菌法最後一區劃菌所得之菌落)加入已滅菌之稀釋液容器中，選用適當的濁度換算成濃度(每 mL 菌數介於 10^5 至 10^7 CFU/mL 之間者)予以測試。
- (三)視樣品中微生物可能濃度範圍進行水樣稀釋步驟，使用無菌吸管吸取 9 mL 之藥劑至無菌試管中，並加入 1 mL 的測試

菌液形成 10 倍稀釋度之水樣，混合均勻，而後自 10 倍稀釋度測試菌液以相同操作方式進行一系列適當之 100、1,000 倍、10,000、等之稀釋水樣並混搖均勻。進行稀釋步驟時，均需更換無菌吸管。

(四)以 1mL 無菌吸管或無菌微量吸管(Micropipet)吸取 0.2 mL 的菌液及 (或) 各稀釋濃度水樣滴在培養基上，每一稀釋濃度做五重複，將無菌之彎曲玻璃棒放在培養基上，再用手或旋轉桌 (Turn table) 旋轉培養皿至水樣均勻分佈於培養基表面。

(五)對照組，以適當濃度之原始測試菌液為對照組。

(六)倒置培養皿於培養箱內，在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培養 48 ± 2 小時。若欲培養酵母菌或黴菌應選用適當方法及培養條件，培養方法詳閱參照生物資源保存及研究中心之方法。

(七)計數各稀釋度培養皿中所產生的菌落數並記錄之，若菌落太多造成計數困難，則以”菌落太多無法計數”(Too numerous to count, TNTC) 表示。

七、結果處理

(一) 數據處理：

1.以含 30 至 300 個菌落之同一稀釋倍數的五個培養皿計算其總菌落數，總菌落數以 菌落數(CFU)/mL (Colony forming units/ mL) 表示之。計算公式如下：
總菌落數(CFU/mL)=選取培養皿之菌落數總和/選取之實際體積總和= $X+Y+Z+A+B / (0.2/D) + (0.2/D) + (0.2/D) + (0.2/D) + (0.2/D)$
X, Y, Z, A, B: 同一稀釋倍數兩個培養皿之菌落數。
D: 稀釋倍數。

2.培養皿之菌落數不在 30 至 300 個菌落之間時，則依菌落數實際數目以下列方式處理：

(1)若各稀釋度中僅有一個稀釋度之一個培養皿的菌落數在 30 至 300 個之間，則以上述七、(一)、1 公式計算之。

(2)若培養皿中均無菌落生長，則總落數以小於 5 CFU/mL(若無生長為小於 1/0.2 mL 即為小於 5 CFU/mL)表示；若僅有原始水樣有菌落產生且少於 30 個，則以實際菌落數的平均值乘以 5 後的數值表示。

(3)若各稀釋度培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則以最接近 300 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿以上述七、(一)、1 公式計算。

(4)若各稀釋度中有兩個稀釋度的培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則以下列公式計算：

$$\text{總菌落數(CFU/ mL)} = \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5 + Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5}{(0.2/D_1) + (0.2/D_1) + (0.2/D_1) + (0.2/D_1) + (0.2/D_1) + (0.2/D_2) + (0.2/D_2) + (0.2/D_2) + (0.2/D_2) + (0.2/D_2)}$$

註：D₁、D₂：菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度

X₁+ X₂+ X₃+ X₄+ X₅：D₁ 稀釋度的五個培養皿之菌落數

Y₁+Y₂+Y₃+ Y₄+ Y₅：D₂ 稀釋度的五個培養皿之菌落數

(二) 若計算所得之總菌落數小於 1(含 0)，以” <1” 表示；總菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），總菌落數大於 100 以上時，只取兩位有效數字，例如總菌落數為 142 時以 1.4 x 10² 表示，總菌落數 155 時以 1.6 x 10² 表示，總菌落數為 18,900 時以 1.9 x 10⁴ 表示。

(三) 經使用環境衛生用藥後檢測其微生物殺菌率可達 99.9% 以上以上。

(四) 檢測紀錄須註明培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度及各稀釋度的數據等相關資料。

八、品質管制

(一) 微生物採樣人員及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。

(二) 進行微生物檢測時所用的玻璃器皿及設備均須經滅菌處理。

九、精密度及準確度 略。

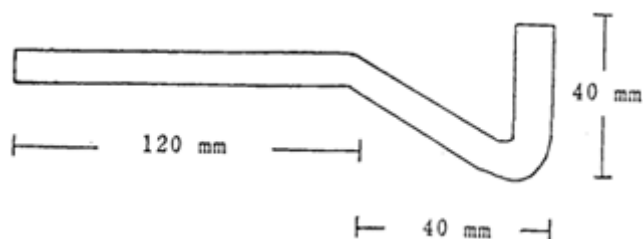
十、參考資料

(一) U.S. APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. pp.9-31. American Public Health Assoc., Washington, D.C. .1998

- (二) 中華民國國家標準，食品微生物之檢驗法－總菌落數之檢驗，CNS 10890 6186，1988。
- (三) 徐爾烈。環境用藥有機磷殺蟲劑及殺菌劑使用安全評估。行政院環境保護署。309 頁。2001。

表一 測試菌株

中文菌株名稱	英文菌株學名
黑麴黴菌	<i>Aspergillus niger</i> BCRC 30130
白色念珠球菌	<i>Candida albicans</i> BCRC20511
毛髮癬菌	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> BCRC32066
仙人掌桿菌	<i>Bacillus cereus</i> BCRC 10603
大腸桿菌	<i>Escherichia coli</i> BCRC 10675
綠膿桿菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BCRC 10944
沙門氏桿菌	<i>Salmonella choleraesuis</i> BCRC 10744
金黃葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> BCRC12657



圖一 彎曲玻棒圖