

空氣中細菌濃度檢測方法

中華民國 105 年 12 月 19 日環署檢字第 1050102771 號公告

自中華民國 106 年 3 月 15 日生效

NIEA E301.15C

一、方法概要

本方法係使用衝擊式採樣器抽吸適量體積之空氣樣本，直接衝擊於適合細菌生長的培養基上。於 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 48 ± 2 小時後，計數生長於培養基上之細菌菌落數，並換算為每立方公尺空氣中的細菌濃度。

二、適用範圍

本方法適用於空氣中細菌濃度之檢測。

三、干擾

- (一) 採樣器之幫浦及蓄電池功能異常或功率衰減，造成採樣器操作時流量變異，將影響採樣效率。
- (二) 空氣體積計算的誤差可能來自流量或採樣時間測量所產生。通常以流量控制設備減少空氣體積計算的誤差，可使用計時器將採樣時間測量的誤差減至最小。
- (三) 真菌數量過多將遮蔽或抑制細菌之生長，並可能影響細菌之判讀與計數。
- (四) 風速太強可能影響採樣器的流量校正及查核(Check)。

四、設備與材料

- (一) 可攜型衝擊式採樣器：50%收集效率之截取粒徑 D_{50} (註 1) 應 $\leq 1\ \mu\text{m}$ (須附證明文件)。
- (二) 培養箱：溫度能保持 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 者。
- (三) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。
- (四) 天平：能精稱至 0.01 g 者。
- (五) 菌落計數器：用於計算菌落數目。
- (六) 高壓滅菌釜：能以中心溫度 121°C (壓力約 $15\ \text{lb/in}^2$ 或 $1.05\ \text{kg/cm}^2$) 滅菌 15 分鐘以上者。
- (七) 乾熱滅菌器 (烘箱)：用於玻璃器皿等用具之滅菌。溫度能保持 160°C 達 2 小時或 170°C 達 1 小時以上者。
- (八) 培養皿：選用適合於採樣器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。

- (九) 三角錐瓶：250 至 2000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (十) 冷藏箱：溫度能保持在 10~20°C 者。
- (十一) 水浴槽：溫度能保持在約 48±2°C 者。
- (十二) 無菌操作檯。
- (十三) 流量校正器：校正與量測應可追溯至國家標準或國際標準。
- (十四) pH 計：pH 計之精確度必須達到 0.1 pH 單位。用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定時，應搭配表面電極 (Surface probe)。
- (十五) 光學顯微鏡：能放大至 1000 倍油鏡鏡頭。
- (十六) 濾膜：直徑 13 mm 之無菌濾膜，孔徑 0.45 μm，材質為聚氟化二乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF)，或是聚四氟乙烯 (Polytetrafluoroethene, PTFE)。

五、試劑

- (一) 試劑水：蒸餾水或去離子水，導電度在 25°C 時小於 2 μmho / cm (μS / cm)。
- (二) 配製含環己醯亞胺之胰蛋白大豆瓊脂培養基 (Tryptic Soy Agar with Cycloheximide)。胰蛋白大豆瓊脂培養基為適合細菌生長的培養基，環己醯亞胺 (100 μg/mL) 可抑制真菌生長，減少真菌的污染。
 - (1) 胰蛋白大豆瓊脂培養基 (Tryptic Soy Agar，簡稱 TSA)，其每公升之胰蛋白大豆瓊脂培養基含下列成分：

胰化蛋白朊 (Tryptone)	15.0 g
大豆蛋白朊 (Soytone) 或	5.0 g
硫化蛋白朊 (Thiopeptone 或 Thiotone)	
氯化鈉 (NaCl)	5.0 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g
合計	40.0 g

- (2) 環己醯亞胺 (Cycloheximide) 100 mg

配製方式，將上述胰蛋白大豆瓊脂培養基成分 40 g 溶於 1 公升試劑水中，經 121°C 滅菌 15 分鐘後，置於 48±2°C 的水浴槽中冷卻，秤取 100 mg 環己醯亞胺溶於 2 mL 95% 酒精 (Ethanol)，經無菌濾膜過濾除菌後，全數加入滅菌完成溫度已降至 48±2°C 之上述胰蛋白大

豆瓊脂培養基中，混合均勻後，依採樣器不同分裝適量之培養基至培養皿中（註2），置於室溫下凝固，pH值以表面電極測定應為 7.3 ± 0.2 （在 25°C ），保存於 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，保存期限14天。可根據檢測需求量，依配方比例配製培養基。

（三）70%至75%酒精：消毒擦拭用。

（四）革蘭氏染劑：含有結晶紫染劑（Crystal violet）、革蘭氏碘液媒染劑（Gram's iodine）、脫色劑（Decolorizer）及番紅（Safranin）或碳酸複紅染劑（Carbolfuchsin）等四種染劑。

六、採樣與保存

除相關法令另有規定外，應依照本方法執行採樣。

- （一）每一場所應於場所營業時間結束前2個小時內完成採樣，惟24小時營業場所可擇任一時段進行採樣。
- （二）每一場所至少應執行2個採樣點，並應選擇在人員動線上，必要時得增加採樣點（如另發現有滲漏水漬跡，微生物生長痕跡及人員抱怨有不適感的地方）。
- （三）採樣位置應距離室內硬體構築或陳列設施最少0.5公尺以上及門口或電梯最少3公尺以上。
- （四）採樣前先以70%至75%酒精擦拭採樣器放置培養基之部位。
- （五）採樣時應將採樣器置於平台處，不可以人員手持採樣器方式進行採樣，以避免採樣人員本身造成的污染。採樣器應置於距離地面約120至150公分之高度。但國民小學及幼兒園場所，採樣器須降低高度，應置於距離地面約100至120公分之處。
- （六）採樣時將含培養基之培養皿放置於採樣器內，抽取適量之空氣體積，以衝擊方式將生物氣膠微粒收集到培養基上，採集時間不可超過10分鐘，以免造成微生物因脫水過度而無法培養，採樣結束後培養皿蓋子應先以70%至75%酒精擦拭，再蓋回培養皿上。採樣應進行二重複，並須以2台採樣器並行採樣，兩台採樣器之間隔為30~40公分，採樣後應於24小時內送至實驗室培養。
- （七）進行下一個採樣前，需再以70%至75%酒精擦拭採樣器放置培養皿之部位後，才能進行下一次的採樣。
- （八）採樣後之培養皿應置於樣品容器內，樣品容器應貼妥樣品標籤並密封且貼上封條。

- (九) 採樣期間攜出之培養基，應避免於運送或搬運期間受到污染，應有防制因跳動導致培養基受到污染的措施（如以石蠟膜（paraffin）、透氣膠帶或塑膠套等封存培養皿）。
- (十) 採樣期間攜出之培養基，應保存於 10~20°C 之冷藏箱內，使用保冷劑（Refrigerant packs）（如冰寶）保溫，不需要使用冰塊，以避免培養皿累積太多的水滴或水氣，造成培養基內的微生物彼此污染。但是實驗室內保存溫度仍應維持在 4 ± 2 °C。採樣前若發現培養皿（含蓋）積留太多的水滴或水氣，應以無菌的吸水紙或棉棒擦乾或吸乾，以減少污染的發生。
- (十一) 採樣前、後應執行流量查核，所測得的流量與校正值差異不得超過 $\pm 5\%$ ，採樣終了時，記錄採樣前、後空氣流量及採集時間，並以下式計算吸引空氣量。

$$V = \frac{Q_s + Q_e}{2} \times t$$

V：吸引空氣量（L）

Q_s ：開始時之流量（L/min）

Q_e ：終了時之流量（L/min）

t：採集時間（min）

七、步驟

- (一) 採樣後將培養皿置於 30 ± 1 °C 培養箱內，倒置培養 48 ± 2 小時。
- (二) 檢測人員應具備區別細菌和真菌之能力（如觀察菌落特徵或進行革蘭氏染色等），以使細菌之計數更為正確。原則上直接計數培養基上長出的菌落即為細菌菌落，但檢測人員若懷疑某些菌落是酵母菌菌落者，則繼續進行七、（三）革蘭氏染色的步驟，依染色結果之微生物大小及形狀，判定該菌落是否為細菌菌落。
- (三) 革蘭氏染色
1. 抹片製作：挑取培養基上長出之菌落，於載玻片上製成薄抹片，風乾並過火數次固定。
 2. 初染：將已固定之抹片，用結晶紫染劑染 1 分鐘，水洗 5 秒鐘。
 3. 媒染：加革蘭氏碘液媒染劑（Gram's iodine）染 1 分鐘，水洗 5 秒鐘。

4. 脫色：用酒精、丙酮或是兩者混合之脫色劑洗至不再有紫色褪出，數秒即可，水洗 5 秒鐘。
 5. 複染：用番紅或碳酸複紅染劑染 1 分鐘，水洗 5 秒鐘。
 6. 自然風乾。
 7. 以光學顯微鏡放大 1000 倍油鏡鏡檢，區分細菌及酵母菌（細菌球菌呈圓形，大小 3 μm 以下，酵母菌成圓形或橢圓形，大小 6 μm 以上，細菌明顯比酵母菌小。其餘形狀非呈圓形或橢圓形者，皆判定為細菌）。
 8. 革蘭氏染色操作步驟可依各廠牌操作說明書進行試驗。
- (四) 計數各培養皿中所產生的細菌菌落，並記錄之。若因六之(七)、(八)因素造成污染的情形發生(如瀰漫生長)，應重新採樣分析。

八、結果處理

- (一) 每個採樣位置採集的二重複樣品完成菌落計數後，先個別參照採樣器原製造廠商提供之校正表【Positive hole correction (conversion) table】進行換算，再依下列公式計算空氣中細菌的濃度，以整數表示(小數位數四捨五入)，單位為 CFU/m³ (Colony forming unit/per cubic meter)，計算實例說明如範例 1。

$$\begin{aligned} \text{空氣中細菌濃度 (CFU/m}^3\text{)} &= \frac{\text{二重複樣品菌落數換算數值之總和}}{\text{二台採樣器吸引之空氣總量}} \\ &= \frac{X_1 + X_2}{V_1 + V_2} \end{aligned}$$

註：X₁、X₂ 為二重複樣品菌落數經校正表換算之數值

V₁、V₂ 為二台採樣器之空氣吸引量

- (二) 採集時間達 10 分鐘之樣品，培養後若無菌落生長，細菌濃度小於偵測極限 (Limits of Detection, LOD)，以「< 1 x 1000 / 吸引空氣量 (公升) CFU/m³」表示 (計算實例說明如範例 2)。
- (三) 運送空白及設備空白若無菌落生長，以「未生長 (No growth)」表示。

- (四) 檢測紀錄須註明採樣起始及終了時間、採樣器流速、採集時間、吸引空氣量、培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度等。

九、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) 每個採樣位置須進行二重複。計算二重複的差異係將二重複的數值代入下列計算式，計算結果須小於3.64（計算範例3）

$$2 \times (\sqrt{x_2} - \sqrt{x_1 + 1}) < 3.64 \quad [\text{參考資料(四)}]$$

x_1 是數值較小者， x_2 是數值較大者， x_1 及 x_2 值皆為原始計數的菌落數（即未經校正表換算前的菌落數）

- (三) 培養基的品質，每次使用一新品牌或新批號的培養基時，除了應取得該批培養基的原廠測試證明（內容應包含標準菌株之測試結果）之外，實驗室內再依九、（二）進行二重複差異分析，確認與先前使用的培養基一致。
- (四) 每批次採樣時，應進行運送空白及設備空白。空白樣品經培養後不得檢出。設備空白樣品執行方式為將含培養基之培養皿置入採樣器內，置放時間與樣品採樣時間相同，但不進行抽氣。
- (五) 培養基於實驗室保存、採樣運送及培養期間，均應保持倒置。
- (六) 採樣器有下列情形之一時，則須進行流量校正，校正時應置入充填有培養基的培養皿，以校正器調整採樣器流量至原製造廠商建議之設計流量。
1. 新機啟用時。
 2. 馬達修理、保養或更換零件後。
 3. 流量計修理、調整或更換。
 4. 單點查核時偏離設計流量超過±5%。
 5. 每3個月的定期校正。

十、精密度與準確度

略

十一、參考資料

- (一) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment. AGGIH, Cincinnati, 1989.

- (二) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Bioaerosols: Assessment and Control, ACGIH, Cincinnati, 1999.
- (三) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 1994-1995 Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, 1994.
- (四) Hung, L. L., Miller, J. D., Dillon, H. K., Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples. 2nd Edition, AIHA, 2005.
- (五) ASTM, Standard guide for using probability sampling methods in studies of indoor air quality in buildings. D5791-95, Standards on indoor air quality, 2002.
- (六) Storey, E., Dangman, K. H., Schenck, P., DeBernardo, R. L., Yang, C. S., Bracker, A., Hodgson, M. J., Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. University of Connecticut Health Center, 2004.
- (七) WHO, Ambient air quality monitoring and assessment. Guidelines for air quality. Geneva, WHO 82-104, 2000.
- (八) Yang, C. S., Heinsohn, P., Sampling and analysis of indoor microorganisms. John Wiley & Sons, Inc. publication, 2007.
- (九) NMAM 0800: Bioaerol Sampling (Indoor Air)Culturable organisms: bacteria, fungi, thermophilic actinomycetes. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition, 1998.
- (十) BS EN ISO 14698-1: Cleanrooms and associated controlled environments – Biocontamination control – Part 1: General principles and methods. <http://www.scribd.com/doc/73559124/ISO-14698-1>, 2003.
- (十一) 香港特別行政區政府室內空氣質素管理小組，辦公室及公眾場所室內空氣質素管理指引，中華民國 92 年。
- (十二) 蘇慧貞、李家偉、李俊璋，建置室內空氣品質標準值暨室內空氣污染源調查及監測查驗制度（第一年），行政院環保署專題委託研究計畫，計畫編號：EPA-100-FA11-03-A018，中華民國 100 年。

註 1：D₅₀之定義為對應於 50% 收集效率時的微粒氣動直徑，它是表示可收集微粒大小的指標。

註2：例如選用安德森採樣器，直徑 10 cm 的玻璃培養皿須填充約 27 mL 培養基，直徑 10 cm 的塑膠培養皿須填充約 45 mL 培養基，直徑 9 cm 的塑膠培養皿須填充約 41 mL 培養基；選用 MAS-100 系列之採樣器，塑膠培養皿須填充約 25 mL 培養基；其他採樣器則依其說明書填充適量的培養基，以免影響採樣效率。

計算範例 1 空氣中細菌濃度計算實例

A 衝擊式採樣器，共抽吸 84.3 L 的空氣樣品，TSA 培養基長出 79 個細菌菌落；B 衝擊式採樣器，共抽吸 82.5 L 的空氣樣品，TSA 培養基長出 73 個細菌菌落，細菌濃度為 1011 CFU/m³，計算如下：

區分	採樣器吸引空氣量(L)	培養皿長出細菌菌落數	校正表換算後數值	計算 1 立方公尺空氣中細菌濃度	結果表示 CFU/m ³
採樣器 A	84.3	79	88.0	(88.0+80.6) ÷(84.3+82.5) x 1000 = 1010.8	1011
採樣器 B	82.5	73	80.6		

計算範例 2 空氣中無細菌菌落生長計算實例

A 衝擊式採樣器採集 10 分鐘，吸引空氣量 283 L，B 衝擊式採樣器採集 10 分鐘，吸引空氣量 280 L，皆無細菌菌落生長以 $< 1 \times 1000 \div (283 + 280) \times 2$ CFU/m³ 表示，計算結果為 < 3.6 CFU/m³，以 < 4 CFU/m³ 表示。

計算範例 3 空氣中細菌二重複差異計算實例說明

例 1 某採樣位置二重複之細菌菌落數為 (105 及 146)，代入九、(二)之計算式，計算結果為 3.57，小於 3.64，符合二重複差異的要求。

例 2 某採樣位置二重複之細菌菌落數為 (105 及 147)，代入九、(二)之計算式，計算結果為 3.66，大於 3.64，不符合二重複差異的要求，須重新採樣。