

# 空氣中真菌濃度檢測方法

中華民國 106 年 1 月 10 日環署檢字第 1060000614 號公告  
自中華民國 106 年 4 月 15 日生效  
NIEA E401.15C

## 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，直接衝擊於適合真菌生長的培養基上。於  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  培養 4 至 5 天後，計數生長於培養基上之真菌菌落數，並換算為每立方公尺空氣中的真菌濃度。

## 二、適用範圍

本方法適用於空氣中真菌濃度之檢測。

## 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誤差或採樣時間測量。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) 細菌數量過多可能影響真菌之判讀與計數。
- (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  $\leq 2 \mu\text{m}$  (須附證明文件)。
- (二) 培養箱：溫度能保持  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  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) 乾熱滅菌器 (烘箱)：用於玻璃器皿等用具之滅菌。溫度能保持  $160^\circ\text{C}$  達 2 小時或  $170^\circ\text{C}$  達 1 小時以上者。
- (七) 高壓滅菌釜：能以中心溫度  $121^\circ\text{C}$  (壓力約  $15 \text{ lb/in}^2$  或  $1.05 \text{ kg/cm}^2$ ) 滅菌 15 分鐘以上者。

- (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。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 至 20°C 者。
- (十一) 水浴槽：溫度能保持在約  $48 \pm 2^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{m}$ ，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  $\mu\text{mho/cm}$  ( $\mu\text{S/cm}$ )。

(二) 培養基：

1. 配製含氯黴素之麥芽抽出物培養基 (Malt extract agar with chloramphenicol)。麥芽抽出物培養基為適合真菌生長的培養基，添加氯黴素(100  $\mu\text{g/mL}$ )，可抑制細菌生長，減少細菌的污染。

(1) 麥芽抽出物培養基 (Malt extract agar，簡稱 MEA) (市售商品化培養基)，每公升之培養基含下列成份：

麥芽 (Maltose)	12.75 g
糊精 (Dextrin)	2.75 g
甘油 (Glycerol)	2.35 g
蛋白胨 (Peptone)	0.78 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

(2) 氯黴素 (Chloramphenicol) (試藥級) 100 mg

配製方式：將上述麥芽抽出物培養基 33.6 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 氯黴素溶於 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 之上述麥芽抽出物培養基中，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 4.7±0.2 (在 25°C)，保存於 4±2°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。

2. 添加氯黴素之二氯喃甘油培養基 (Dichloran glycerol agar with chloramphenicol)。二氯喃甘油培養基為適合真菌生長的培養基，添加氯黴素 (Chloramphenicol, 100 µg/mL)，可抑制細菌生長，減少細菌的污染。

(1) 二氯喃甘油培養基 (Dichloran glycerol agar，簡稱 DG18) (市售商品化培養基)，每一公升之 DG18 含下列成份：

葡萄糖 (Glucose)	10.0 g
蛋白胨 (Peptone)	5.0 g
磷酸二氫鉀 (Potassium dihydrogen phosphate)	1.0 g
硫酸鎂 (Magnesium sulphate)	0.5 g
二氯喃 (Dichloran)	0.002 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

(2) 氯黴素 (Chloramphenicol) (試藥級) 117 mg

(3) 甘油 (Glycerol) (試藥級) 220 g

配製方式，將上述二氯喃甘油培養基 31.5 g 溶於 1 公升試劑水中，加入 220 g 的甘油，經 121°C 滅菌 15 分鐘後，置於 48±2°C 的水浴槽中冷卻，秤取 117 mg 氯黴素溶於 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 之上述二氯喃甘油培養基中，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 5.6±0.2 (在 25°C)，保存於 4±2°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。

3. 以上培養基擇一使用。

(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，設定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乾燥而無法培養，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 至 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 至 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  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 。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吸乾或擦乾，以減少污染的發生。
- (十一) 須執行室外測值之採樣，採樣相對位置，應依下列建築物之通風型式，擇一點 (含) 以上採樣：
1. 公告場所使用中央空調系統設備將室外空氣引入室內者，採樣器架設應鄰近空調系統之外氣入口且和外氣入口同方位，採樣器採樣口高度與空調系統之外氣入口相近。
  2. 公告場所以自然通風或使用窗型、分離式冷氣機者，採樣器架設應位於室內採樣點相對直接與室外空氣流通之窗戶或開口位置。
- (十二) 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  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  培養箱內，倒置培養 4 至 5 天。應注意菌落計數前，應儘可能不去擾動生長在培養基上的黴菌菌落，以免孢子飛散形成新的菌落，造成計數不正確。
- (二) 檢測人員應具備區別細菌和真菌之能力 (如觀察菌落形態及特徵或進行革蘭氏染色等)，以使真菌之計數更為正確。原則上直接計數培養基上長出的菌落即為真菌菌落，但檢測人員若懷疑某些

菌落是細菌菌落者，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，判定該菌落是否為真菌菌落。

### （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. 以光學顯微鏡鏡檢，區分酵母菌及細菌（酵母菌成圓形或橢圓形，大小 6  $\mu\text{m}$  以上，細菌球菌呈圓形，大小 3  $\mu\text{m}$  以下，酵母菌明顯比細菌大。其餘形狀非呈圓形或橢圓形者，皆判定為非酵母菌）。
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真菌菌落，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。若麥芽抽出物培養基有發生黴菌菌落過度生長的情形，則應選用二氣喃甘油培養基，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真菌的濃度，以整數表示（小數位數四捨五入），單位以  $\text{CFU}/\text{m}^3$ （Colony forming unit/per cubic meter）表示，計算實例說明如範例 1。

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

註： $X_1$ 、 $X_2$  為二重複樣品菌落數經校正表換算之數值

$V_1$ 、 $V_2$  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，真菌濃度小於偵測極限 (Limits of Detection, LOD)，以「 $< 1 \times 1000 / \text{吸引空氣量 (公升)} CFU/m^3$ 」表示 (計算實例說明如範例 2)。
- (三) 計算真菌濃度室內外比值 (計算實例說明如範例 3)，比值計算至小數點一位 (四捨五入)，但需注意當培養皿長出菌落數與採樣器的篩孔數相同時，即無法計算室內外比值，應減少採樣體積重新採樣。
- (四) 運送空白及設備空白若無菌落生長，以「未生長 (No growth)」表示。
- (五) 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、真菌濃度室內外比值等。

## 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  $\pm 5\%$ 。
  - 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, AGGIH, 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：D<sub>50</sub>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 空氣中真菌濃度計算實例

A 衝擊式採樣器，共抽吸 84.3 L 的空氣樣品，MEA 培養基長出 79 個真菌菌落；B 衝擊式採樣器，共抽吸 82.5 L 的空氣樣品，MEA 培養基長出 73 個真菌菌落，真菌濃度為 1011 CFU/m<sup>3</sup>，計算如下：

區分	採樣器吸引空氣量(L)	培養皿長出真菌菌落數	校正表換算後數值	計算 1 立方公尺空氣中真菌濃度	結果表示 CFU/m <sup>3</sup>
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 空氣中無真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，皆無真菌菌落生長以  $< 1 \times 1000 \div (283 + 280) \times 2$  CFU/m<sup>3</sup> 表示，計算結果為  $< 3.6$  CFU/m<sup>3</sup>，以  $< 4$  CFU/m<sup>3</sup> 表示。

### 計算範例 3 真菌濃度室內外比值計算實例

某大樓會議室室內真菌濃度為 500 CFU/m<sup>3</sup>，室外真菌濃度為 1000 CFU/m<sup>3</sup>，室內外比值為  $500/1000 = 0.5$ 。

### 計算範例 4 空氣中真菌二重複差異計算實例說明

例 1 某採樣位置二重複之真菌菌落數為 (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真菌菌落數為 (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。