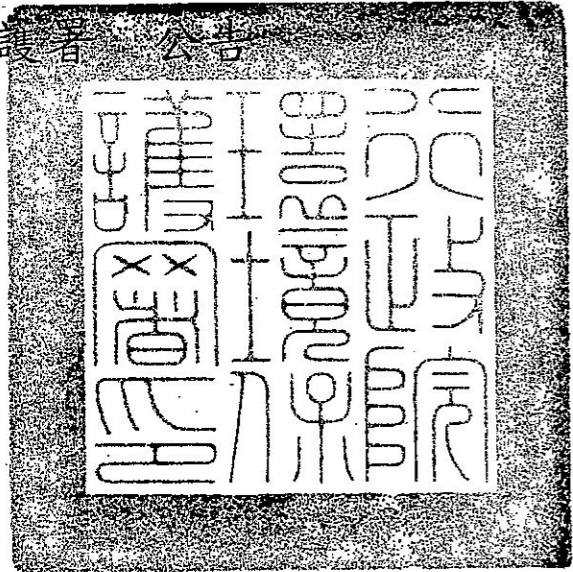


行政院環境保護署公告

發文日期：中華民國103年8月15日
發文字號：環署檢字第1030068287號



主旨：訂定「空氣中細菌濃度檢測方法（NIEA E301.14C）」，
並自中華民國一百零三年十一月十五日生效。

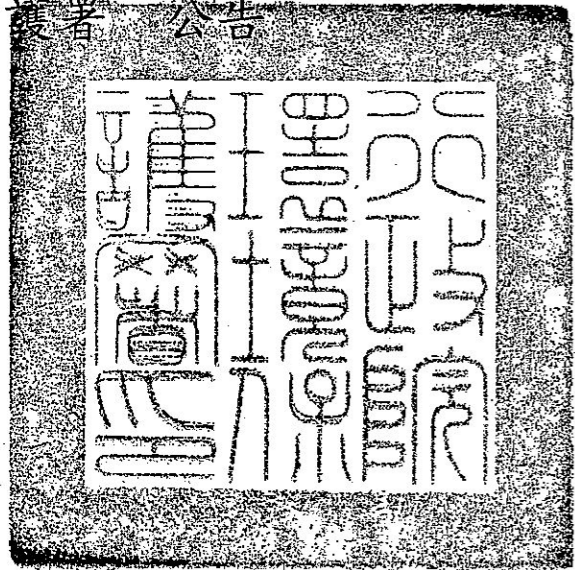
依據：室內空氣品質管理法第十一條第三項。

公告事項：方法內容詳如附件。

署長魏國彥 出國
副署長葉欣誠 代行

行政院環境保護署 公告

發文日期：中華民國103年8月15日
發文字號：環署檢字第1030068290號



主旨：廢止「空氣中細菌濃度檢測方法（NIEA E301.13C）」，
並自中華民國一百零三年十一月十五日生效。

依據：室內空氣品質管理法第十一條第三項。

公告事項：廢止「空氣中細菌濃度檢測方法（NIEA
E301.13C）」。

署長 **魏國彥** 出國
副署長 葉欣誠 代行

空氣中細菌濃度檢測方法

中華民國103年8月15日環署檢字第1030068287號公告

自中華民國103年11月15日生效

NIEA E301.14C

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

- (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：一般使用 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。

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，環己亞胺 (100 μg/mL) 可抑制真菌生長，減少真菌的污染。
 - I. 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 硫化蛋白朊 (Thiopeptone 或 Thiotone)	5.0 g
氯化鈉 (NaCl)	5.0 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

II. 環己亞胺 (Cycloheximide) 100 mg

配製方式，將上述成分 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，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±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。

(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 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

(一) 室內場所可能有不同的個別通風及空調系統分區，採樣點應分佈於不同分區中。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三公尺以上。

(二) 採樣前先以 70%至 75%酒精擦拭採樣器放置培養基之部位。

(三) 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。

(四) 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，最佳量之菌落數為 25 - 250 個菌落之間，但採集時間不可超過 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。採樣皆需進行二重複，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。

(五) 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。

(六) 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。

(七) 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）。

(八) 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 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。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擦乾或吸乾，以減少污染的發生。

- (九) 須依據「室內空氣品質檢驗測定管理辦法」相關規定執行採樣。
- (十) 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±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℃ 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 (註 3)。
- (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 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，換算之數值除以採樣時之吸引空氣量，得到每立方公尺空氣中細菌的濃度，再計算其平均值，單位以 CFU/m³ (Colony forming unit/per cubic meter) 表示。細菌濃度皆以整數表示(小數位數四捨五入)，計算實例說明如範例 1。
- (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。依下列計算式，二重複差異的範圍須介於 x₁ (含) 與 x₂ (含) 之間(註 4) (計算範例 3)，

$$3.64 = 2 \times \sqrt{x_2} - \sqrt{x_1 + 1}$$

x₁ 是數值較小者，x₂ 是數值較大者，x₁ 及 x₂ 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。空白樣品經培養後不得檢出。
- (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、參考文獻

- (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 : Bioaerosol 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) 行政院環境保護署，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 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，塑膠培養皿須填充 45 mL 培養基；選用 MAS-100 系列之採樣器，塑膠培養皿須填充 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。

註 3：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。

註 4：二重複差異的管制範圍對照表

(1) 篩孔數 300 個孔洞之採樣器二重複差異管制範圍對照表

X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
0	8	1	10	2	13	3	15	4	16	5	18
6	20	7	22	8	23	9	25	10	26	11	28
12	29	13	31	14	32	15	34	16	35	17	37
18	38	19	40	20	41	21	42	22	44	23	45
24	47	25	48	26	49	27	51	28	52	29	53
30	55	31	56	32	57	33	59	34	60	35	61
36	62	37	64	38	65	39	66	40	68	41	69
42	70	43	71	44	73	45	74	46	75	47	77

48	78	49	79	50	80	51	82	52	83	53	84
54	85	55	87	56	88	57	89	58	90	59	92
60	93	61	94	62	95	63	96	64	98	65	99
66	100	67	101	68	103	69	104	70	105	71	106
72	107	73	109	74	110	75	111	76	112	77	113
78	115	79	116	80	117	81	118	82	119	83	121
84	122	85	123	86	124	87	125	88	127	89	128
90	129	91	130	92	131	93	133	94	134	95	135
96	136	97	137	98	139	99	140	100	141	101	142
102	143	103	144	104	146	105	147	106	148	107	149
108	150	109	151	110	153	111	154	112	155	113	156
114	157	115	159	116	160	117	161	118	162	119	163
120	164	121	166	122	167	123	168	124	169	125	170
126	171	127	172	128	174	129	175	130	176	131	177
132	178	133	179	134	181	135	182	136	183	137	184
138	185	139	186	140	188	141	189	142	190	143	191
144	192	145	193	146	194	147	196	148	197	149	198
150	199	151	200	152	201	153	202	154	204	155	205
156	206	157	207	158	208	159	209	160	210	161	212
162	213	163	214	164	215	165	216	166	217	167	218
168	220	169	221	170	222	171	223	172	224	173	225
174	226	175	228	176	229	177	230	178	231	179	232
180	233	181	234	182	236	183	237	184	238	185	239
186	240	187	241	188	242	189	243	190	245	191	246
192	247	193	248	194	249	195	250	196	251	197	253

198	254	199	255	200	256	201	257	202	258	203	259
204	260	205	262	206	263	207	264	208	265	209	266
210	267	211	268	212	269	213	271	214	272	215	273
216	274	217	275	218	276	219	277	220	278	221	280
222	281	223	282	224	283	225	284	226	285	227	286
228	287	229	289	230	290	231	291	232	292	233	293
234	294	235	295	236	296	237	297	238	299	239	300*
240	300*	241	300*	242	300*	243	300*	244	300*	245	300*
246	300*	247	300*	248	300*	249	300*	250	300*	251	300*
252	300*	253	300*	254	300*	255	300*	256	300*	257	300*
258	300*	259	300*	260	300*	261	300*	262	300*	263	300*
264	300*	265	300*	266	300*	267	300*	268	300*	269	300*
270	300*	271	300*	272	300*	273	300*	274	300*	275	300*
276	300*	277	300*	278	300*	279	300*	280	300*	281	300*
282	300*	283	300*	284	300*	285	300*	286	300*	287	300*
288	300*	289	300*	290	300*	291	300*	292	300*	293	300*
294	300*	295	300*	296	300*	297	300*	298	300*	299	300*
300	300*										

x_1 是數值較小者， x_2 是數值較大者；300*代表採樣器篩孔數為 300 孔洞，產生的菌落數最高為 300

(2) 篩孔數 400 個孔洞之採樣器二重複差異管制範圍對照表

X1	X2	X1	X2	X1	X2	X1	X2	X1	X2	X1	X2
0	8	1	10	2	13	3	15	4	16	5	18
6	20	7	22	8	23	9	25	10	26	11	28
12	29	13	31	14	32	15	34	16	35	17	37
18	38	19	40	20	41	21	42	22	44	23	45
24	47	25	48	26	49	27	51	28	52	29	53
30	55	31	56	32	57	33	59	34	60	35	61
36	62	37	64	38	65	39	66	40	68	41	69
42	70	43	71	44	73	45	74	46	75	47	77
48	78	49	79	50	80	51	82	52	83	53	84
54	85	55	87	56	88	57	89	58	90	59	92
60	93	61	94	62	95	63	96	64	98	65	99
66	100	67	101	68	103	69	104	70	105	71	106
72	107	73	109	74	110	75	111	76	112	77	113
78	115	79	116	80	117	81	118	82	119	83	121
84	122	85	123	86	124	87	125	88	127	89	128
90	129	91	130	92	131	93	133	94	134	95	135
96	136	97	137	98	139	99	140	100	141	101	142
102	143	103	144	104	146	105	147	106	148	107	149
108	150	109	151	110	153	111	154	112	155	113	156
114	157	115	159	116	160	117	161	118	162	119	163
120	164	121	166	122	167	123	168	124	169	125	170
126	171	127	172	128	174	129	175	130	176	131	177
132	178	133	179	134	181	135	182	136	183	137	184

138	185	139	186	140	188	141	189	142	190	143	191
144	192	145	193	146	194	147	196	148	197	149	198
150	199	151	200	152	201	153	202	154	204	155	205
156	206	157	207	158	208	159	209	160	210	161	212
162	213	163	214	164	215	165	216	166	217	167	218
168	220	169	221	170	222	171	223	172	224	173	225
174	226	175	228	176	229	177	230	178	231	179	232
180	233	181	234	182	236	183	237	184	238	185	239
186	240	187	241	188	242	189	243	190	245	191	246
192	247	193	248	194	249	195	250	196	251	197	253
198	254	199	255	200	256	201	257	202	258	203	259
204	260	205	262	206	263	207	264	208	265	209	266
210	267	211	268	212	269	213	271	214	272	215	273
216	274	217	275	218	276	219	277	220	278	221	280
222	281	223	282	224	283	225	284	226	285	227	286
228	287	229	289	230	290	231	291	232	292	233	293
234	294	235	295	236	296	237	297	238	299	239	300
240	301	241	302	242	303	243	304	244	305	245	306
246	308	247	309	248	310	249	311	250	312	251	313
252	314	253	315	254	316	255	318	256	319	257	320
258	321	259	322	260	323	261	324	262	325	263	326
264	328	265	329	266	330	267	331	268	332	269	333
270	334	271	335	272	336	273	338	274	339	275	340
276	341	277	342	278	343	279	344	280	345	281	346
282	348	283	349	284	350	285	351	286	352	287	353

288	354	289	355	290	356	291	358	292	359	293	360
294	361	295	362	296	363	297	364	298	365	299	366
300	367	301	369	302	370	303	371	304	372	305	373
306	374	307	375	308	376	309	377	310	379	311	380
312	381	313	382	314	383	315	384	316	385	317	386
318	387	319	388	320	390	321	391	322	392	323	393
324	394	325	395	326	396	327	397	328	398	329	399
330	400*	331	400*	332	400*	333	400*	334	400*	335	400*
336	400*	337	400*	338	400*	339	400*	339	400*	340	400*
341	400*	342	400*	343	400*	344	400*	345	400*	346	400*
347	400*	348	400*	349	400*	350	400*	351	400*	352	400*
353	400*	354	400*	355	400*	356	400*	357	400*	358	400*
359	400*	360	400*	361	400*	362	400*	363	400*	364	400*
365	400*	366	400*	367	400*	368	400*	369	400*	370	400*
371	400*	372	400*	373	400*	374	400*	375	400*	376	400*
377	400*	378	400*	379	400*	380	400*	381	400*	382	400*
383	400*	384	400*	385	400*	386	400*	387	400*	388	400*
389	400*	390	400*	391	400*	392	400*	393	400*	394	400*
395	400*	396	400*	397	400*	398	400*	399	400*	400	400*

x_1 是數值較小者， x_2 是數值較大者；400*代表採樣器篩孔數為 400 孔洞，產生的菌落數最高為 400

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 1013 CFU/m³，計算如下：

區分	採樣器吸引空氣量	培養皿長出細菌菌落數	校正表換算後數值	計算 1 立方公尺空氣中濃度	平均值	結果表示 CFU/m ³
採樣器 A	84.3	79	88	1044	(1044+982)÷2 = 1013	1013
採樣器 B	82.5	73	81	982		

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 < 3.55239786856 CFU/m³，以 < 4 CFU/m³ 表示。

計算範例 3 空氣中細菌二重複差異管制範圍實例說明

某採樣器篩孔數 400 個孔洞，某採樣位置二重複之菌落數為 (105 及 140)，經查表得知二重複差異管制範圍為 105 ~ 147 之間，結果二重複差異在管制範圍內。