

行政院環境保護署環境檢驗所

「環境檢測標準方法審議委員會第 281 次會議」會議紀錄

- 一、時間：中華民國 104 年 12 月 25 日（星期五）上午 9 時 30 分
- 二、地點：環檢所 M210 會議室(桃園市中壢區民族路 3 段 260 號)
- 三、主席：顏主任委員春蘭(巫委員月春代) 記錄：楊孟儒
- 四、出(列)席單位及人員：

出席委員：

王委員家麟	何委員國榮	巫委員月春	李委員昆達
李委員達源	凌委員永健	張委員小萍	郭委員雅惠
陳委員成裕	楊委員末雄	楊委員定恭	葉委員明美
劉委員希平	劉委員秀美	鄭委員福田	

請假委員：

王委員文忻	張委員勝祺	郭委員崇義	陳委員兩興
陳委員家揚	彭委員瑞華	詹委員康琴	熊委員同銘

本署空氣品質保護及噪音管制處	陳樺蓁
本署水質保護處	(請假)
本署環境衛生及毒物管理處	(請假)
本署土壤及地下水污染整治基金管理委員會	(請假)
本署環境督察總隊	(請假)
本署環境督察總隊北區環境督察大隊	(請假)
本署環境督察總隊中區環境督察大隊	(請假)
本署環境督察總隊南區環境督察大隊	(請假)
環境檢驗所 楊科長喜男、黃科長壬瑰、尹研究員開民、龔副研究員聖祐、蕭助理研究員旭助、林助理研究員采蓉、楊助理研究員孟儒	

五、主席致詞：(略)

六、上次審議結果辦理情形報告：(一組 楊孟儒)

環境檢測標準方法審議委員會第 278 次會議至第 280 次會議
審查決議事項辦理情形如下：

- (一)「排放管道中氮氧化物自動檢測方法—氣體分析儀法(NIEA A411.75C)」、「排放管道中二氧化硫自動檢測

方法—非分散性紅外光法、紫外光法、螢光法(NIEA A413.75C)」、「排放管道中二氧化碳自動檢測法—NDIR 法(NIEA A415.73A)」、「空氣中二氧化硫自動檢驗方法—紫外光螢光法(NIEA A416.13C)」、「空氣中氮氧化物自動檢驗方法—化學發光法(NIEA A417.12C)」、「空氣中臭氧自動檢驗方法—紫外光吸收法(NIEA A420.12C)」、「空氣中一氧化碳自動檢測方法—紅外線法(NIEA A421.13C)」、「排放管道中氧自動檢測方法—氣體分析儀法(NIEA A432.74C)」、「排放管道中一氧化碳自動檢驗法—非分散性紅外線法(NIEA A704.05C)」等案，公告簽稿會辦本署法規會表示意見中。

會議結論：洽悉。

- (二)本署法規會承辦人員電話表示建議「排放管道中二氧化碳自動檢測法—NDIR 法(NIEA A415.73A)」(方法審議委員會第 278 次會議審議結論略以「“NDIR 法”建議以中文表示」、「空氣中一氧化碳自動檢測方法—紅外線法(NIEA A421.13C)」、「排放管道中一氧化碳自動檢驗法—非分散性紅外線法(NIEA A704.05C)」等三案，方法命名有關「紅外線」或「紅外光」應一致；另經檢討本所現行方法名稱使用「紅外線」或「紅外光」均有，爰此參採法規會意見，方法名稱統一比照「排放管道中二氧化硫自動檢測方法—非分散性紅外光法、紫外光法、螢光法(NIEA A413.75C)」作修正，如：「排放管道中二氧化碳自動檢測法—NDIR 法(NIEA A415.73A)」修正為「排放管道中二氧化碳自動檢測法—非分散性紅外光法(NIEA A415.73A)」、「空氣中一氧化碳自動檢測方法—紅外線法(NIEA A421.13C)」修正為「空氣中一氧化碳自動檢測方法—紅外光法(NIEA A421.13C)」、「排放管道中一氧化碳自動檢驗法—非分散性紅外線法(NIEA A704.05C)」修正為「排放管道中一氧化碳自動檢驗法—非分散性紅外光法(NIEA A704.05C)」。

會議結論：洽悉，本次會議追認通過上述欲修正之方法名稱案。

- (三)「空氣中二氯甲醚及硫酸乙酯等揮發性有機物檢測方法—吸附管採樣／氣相層析質譜儀法(NIEA A751.10B)」、「塗料中揮發性有機物含量測定法—重量法(NIEA A716.11C)」、「塗料中揮發性有機物含量測定法—氣相層析法(NIEA A754.10C)」、「空氣中二乙醇胺檢測方法—去離子水吸收／離子層析法(NIEA A508.10B)」、「水中異丙醇、四氫呋喃、丙酮檢測方法—共沸蒸餾／氣相層析／火焰離子偵測器法(NIEA W788.51B)」、「碳、氫、硫、氧、氮元素含量檢測方法—元素分析儀法(NIEA M403.01B)」等案，預估於105年1月辦理公告事宜。

會議結論：洽悉。

- (四)「水中極性有機物檢測方法—直測式液相層析／串聯式質譜儀法(NIEA W546.50B)」一案，前次會議結論為暫緩辦理公告，待相關方法草案提出後，再行審議。

會議結論：洽悉。

七、檢測方法審議結果：

- (一) 環境微生物檢測通則—細菌(NIEA E101.04C) (草案) (五組尹開民)

本所提案單位承辦人員依委員審查意見修正，修正對照表與修正後草案如後附(附件1、2)；本案依委員意見修正後通過。

- (二) 空氣中細菌濃度檢測方法(NIEA E301.15C)、排放管道中總硫氧化物檢測方法—沈澱滴定法(NIEA A405.73A)、水中亞硝酸鹽氮檢測方法—分立分析系統比色法(NIEA W458.50B)、底泥生物毒性檢測方法—端足蟲更水式法(NIEA B804.30C)等案

審查結論：上開草案順延列入下次方法會再行審查。

八、臨時動議：無

九、散會：上午10時45分。

「環境檢測標準方法審議委員會第 281 次會議」
方法名稱：「環境微生物檢測通則—細菌 (NIEA E101.04C)」
方法草案修訂對照表

章節 或段落	會議資料內容	依委員意見修正後內容
四、設備 與材料 (一) 1.	實驗室內必須具有無菌操作檯，分裝無菌培養基、植菌及處理各種病原性物質，都必須在無菌操作檯內進行。實驗室亦應定期清理保持整潔	實驗室內必須具有無菌操作檯，必須在無菌操作檯內分裝無菌培養基及植菌。操作、使用第二級以上感染性生物材料，須符合衛生福利部公告之「實驗室生物安全管理」及「感染性生物材料管理」相關法規的規定
四、設備 與材料 (二) 1.	避免選擇裝設高溫加熱裝置之培養箱	避免使用高溫加熱裝置之培養箱
四、設備 與材料 (二) 1.	進行細菌培養時，若使用一般溫度計進行溫度監測，每日應記錄溫度 2 次（上、下午各一次，記錄之間隔在 4 小時以上）。若使用可顯示培養期間最高及最低溫度之溫度監測裝置，則於培養結束時記錄培養期間之最高及最低溫度。溫度計之球狀部分或溫度探棒應浸放於甘油、水或礦物油中。宜使用溫度記錄器持續記錄溫度	進行細菌培養時，建議使用溫度紀錄器持續記錄溫度。若使用可顯示培養期間最高及最低溫度之溫度監測裝置，則於培養結束時記錄培養期間之最高及最低溫度。若使用一般溫度計進行溫度監測，應每日記錄溫度 2 次（上、下午各一次，記錄之間隔在 4 小時以上）。溫度計之球狀部分或溫度探棒應浸放於甘油、水或礦物油中
四、設備 與材料 (二) 2.	滅菌時內部不可過於擁擠，因為會造成溫度分布不均勻，降低滅菌的效果	滅菌時內部不可過於擁擠，避免造成溫度分布不均勻，降低滅菌的效果

章 節 或段落	會議資料內容	依委員意見修正後內容
四、設備 與材料 (二) 2.	實驗室如使用高溫乾熱烘箱滅菌，應每月使用溫度計、留點溫度計（又稱最高溫度計）或溫度記錄器等確認滅菌時之最高溫度	實驗室如使用高溫乾熱烘箱滅菌，應每月使用留點溫度計（又稱最高溫度計）或溫度紀錄器等確認滅菌時之最高溫度
四、設備 與材料 (二) 2.	滅菌物品應使用乾熱滅菌專用之指示帶標示是否已滅菌	物品滅菌應使用乾熱滅菌專用之指示帶標示是否已滅菌
四、設備 與材料 (二) 3.	滅菌物品須使用滅菌指示帶標示是否已滅菌。	物品滅菌應使用滅菌指示帶標示是否已滅菌。
四、設備 與材料 (二) 4.	未進行病原性微生物檢測之水質細菌實驗室，可選用正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯（class II 生物安全櫃），以提供無菌之操作空間	未進行病原性微生物（第一級感染性生物材料）檢測之水質細菌實驗室，可選用正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯，以提供無菌之操作空間。操作、使用第二級以上感染性生物材料須使用第二級(Class II)A2、B1 及 B2 型式或以上等級之生物安全櫃
四、設備 與材料 (二) 4.	每季應進行落菌試驗：取 3 個直徑約 90 mm 之非選擇性瓊脂培養基培養皿（如培養皿計數培養基），分別放置於無菌操作檯檯面之左、中、右三處，於送風狀態下暴露 30 分鐘後，在 35 ± 1°C 下培養 48 小時，正常狀態下應無任何菌落生長。無菌操作檯之預濾網及 HEPA (high	每季應進行落菌試驗：取 3 個直徑約 90 mm 之非選擇性瓊脂培養基培養皿（如培養皿計數培養基），分別放置於無菌操作檯檯面之左、中、右三處，於送風狀態下暴露 30 分鐘以上後，將培養皿置於 35 ± 1°C 下，培養 48 ± 3 小時，正常狀態下應無任何菌落生長。無菌操作檯之預濾網

章 節 或段落	會議資料內容	依委員意見修正後內容
	efficiency particulate air) 濾網應定期更換	及 HEPA 濾網 (high efficiency particulate air filter) 應定期更換
四、設備 與材料 (二) 6.	如須用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定，應使用配備表面電極 (surface probe) 之 pH 計	如須用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定，應使用配備表面電極 (surface electrode) 之 pH 計
四、設備 與材料 (三) 5.	吸管及量筒：體積誤差不得超過 2.5%，並有適當刻度	吸量管及量筒：體積誤差不得超過 2.5%
四、設備 與材料 (三) 6.(1)	材質為混合纖維素酯 (mixed cellulose esters) 或硝化纖維素 (cellulose nitrate) 等	材質為混合纖維素酯 (mixed cellulose esters) 或硝化纖維 (cellulose nitrate) 等
五、試劑 (一) 1.	實驗室內應自行用陽性菌株 (註 4，參見表 1) 或陽性水樣進行測試	實驗室內應自行用陽性菌株 (參見表 1) 或陽性水樣進行測試
表 1	微生物檢測常用之控制菌株 (註 6)	微生物檢測常用之控制菌株 (註 5)
表 1	BCRC 16081 (IFO 3301), RG1(註 7)	BCRC 16081 (IFO 3301), RG1(註 6)
註 2	高壓滅菌釜之操作與檢查，應符合行政院勞動部「鍋爐及壓力容器安全規則」、「勞工安全衛生組織管理及自動檢查辦法」、及「勞工安全衛生教育訓練規則」等相關法規規定	高壓滅菌釜之操作與檢查，應符合行政院勞動部「鍋爐及壓力容器安全規則」、「職業安全衛生管理辦法」及「職業安全衛生教育訓練規則」等相關法規規定
註 4	使用第 2 級危險群微生物，須符合衛生福利部公告「實驗室生物安全管理」及「感染性生物材料管理」	—

章 節 或段落	會議資料內容	依委員意見修正後內容
	相關法規之規定	
註 5	註 5	註 4
註 6	註 6	註 5
註 7	註 7 如使用表 1 外的其他控制菌株，須先進行驗證程序，確認培養出來微生物菌落之性狀與方法要求一致【例如水中大腸桿菌群檢測方法－濾膜法(E202)，於 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 24 ± 2 小時會產生具金屬光澤菌落】，才可使用	註 6 如使用表 1 外的其他控制菌株，須先進行驗證程序，確認培養出來微生物菌落之性狀與方法要求一致【例如水中大腸桿菌群檢測方法－濾膜法(E202)，於 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養 24 ± 2 小時會產生具金屬光澤菌落】，才可使用，並加註生物危害等級(RG1 或 RG2)

環境微生物檢測通則—細菌（草案）

NIEA E101.04C

一、方法概要

本方法通則係環境細菌之檢測概述，提供設備材料、試劑、採樣及保存、檢測步驟、結果處理以及品質管制等之綜合指引。

二、適用範圍

本通則適用於飲用水、飲用水水源、地面水體、地下水體、放流水及廢（污）水之細菌檢測，詳細之規定應參考個別檢測方法。

三、干擾

略。

四、設備與材料

（一）實驗室設施

1. 實驗室空間

實驗室應通風良好，且應避免灰塵及室溫劇烈波動等狀況。宜使用空調裝置，以減少灰塵污染、增加培養箱之操作穩定性，並減低因濕度所引起的儀器和粉末培養基變質等問題。

實驗室之設計運作，應盡量減少人員在操作區域穿行，且最好有一獨立的區域，進行各種培養基、玻璃器皿及材料之準備及滅菌。實驗室內必須具有無菌操作檯，必須在無菌操作檯內分裝無菌培養基及植菌。操作、使用第二級以上感染性生物材料，須符合衛生福利部公告之「實驗室生物安全管理」及「感染性生物材料管理」相關法規的規定。

2. 工作區桌面

桌面的質地必須是以耐高溫、防腐蝕的材質所構成的光滑平面。如果桌面有接縫，其接縫的數目應越少越好。工作區桌

面照明應良好。用於細菌檢測之檯面，使用前後均應以 70% 至 75% 的酒精擦拭消毒（註 1）。

（二）儀器設備

1. 恆溫培養箱：

用於細菌檢測的培養箱，應符合下列條件：(1) 溫度恆定性良好，內部各區溫度差異不可超過 0.5°C；(2) 具有自動控溫之低溫電子加熱裝置；(3) 大型培養箱內應有機械式空氣循環裝置。避免使用高溫加熱裝置之培養箱，因為此類加熱裝置可能會造成局部高溫，使培養基被蒸乾而影響微生物生長。恆溫培養箱的放置地點，室溫宜維持在 16 至 27°C 之間，以不直接受到日曬、溫度變化不大的地方為佳。

進行細菌培養時，建議使用溫度紀錄器持續記錄溫度。若使用可顯示培養期間最高及最低溫度之溫度監測裝置，則於培養結束時記錄培養期間之最高及最低溫度。若使用一般溫度計進行溫度監測，應每日記錄溫度 2 次（上、下午各一次，記錄之間隔在 4 小時以上）。溫度計之球狀部分或溫度探棒應浸放於甘油、水或礦物油中。

2. 高溫乾熱烘箱：

高溫乾熱烘箱用於玻璃、金屬等材質之器皿或設備之滅菌時，溫度應可達到 170 ± 10°C。內部須加裝溫度計以監測滅菌時溫度的變化。滅菌時內部不可過於擁擠，避免造成溫度分布不均勻，降低滅菌的效果。

實驗室如使用高溫乾熱烘箱滅菌，應每月使用留點溫度計（又稱最高溫度計）或溫度紀錄器等確認滅菌時之最高溫度；每季使用乾熱滅菌專用之生物指示劑（如 *Bacillus atrophaeus* 孢子試紙或孢子懸浮液）測試滅菌效果。物品滅菌應使用乾熱滅菌專用之指示帶標示是否已滅菌。

3. 高壓滅菌釜（註 2）：

高壓滅菌釜內部溫度應可達 121°C 以上，其中配置有溫度計、壓力計及安全閥等裝置，及滅菌時間設定裝置。

每次使用滅菌釜都應記錄滅菌的物品種類、溫度及時間。每月應使用留點溫度計（又稱最高溫度計）或溫度紀錄器等確認滅菌時之最高溫度；每季應使用高壓蒸氣專用之生物指示劑

(如嗜熱桿菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 孢子試紙或孢子懸浮液) 測試滅菌效果。物品滅菌應使用滅菌指示帶標示是否已滅菌。

4. 無菌操作檯：

未進行病原性微生物 (第一級感染性生物材料) 檢測之水質細菌實驗室，可選用正壓式無菌操作檯或垂直循環負壓式無菌操作檯，以提供無菌之操作空間。操作、使用第二級以上感染性生物材料須使用第二級(Class II)A2、B1 及 B2 型式或以上等級之生物安全櫃。

每次使用無菌操作檯時應注意下列事項：(1) 應依製造廠商的建議，先送風 20 分鐘以上才可使用，(2) 無菌操作檯內的檯面，使用前後均應以 70% 至 75% 的酒精擦拭消毒。每季應進行落菌試驗：取 3 個直徑約 90 mm 之非選擇性瓊脂培養基培養皿 (如培養皿計數培養基)，分別放置於無菌操作檯檯面之左、中、右三處，於送風狀態下暴露 30 分鐘以上後，將培養皿置於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 下，培養 48 ± 3 小時，正常狀態下應無任何菌落生長。無菌操作檯之預濾網及 HEPA 濾網 (high efficiency particulate air filter) 應定期更換。

5. 菌落計數輔助儀器：

混合稀釋法和塗抹法之菌落計數可使用菌落計數器，以暗視野且具有放大裝置者為佳。

濾膜法之菌落計數可使用放大倍率 10 至 15 倍的雙筒顯微鏡，光源為白色螢光燈，光源方向為菌落上方 60 至 80 度。

6. pH 計：pH 計精確度必須達到 0.1 pH 單位。如須用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定，應使用配備表面電極 (surface electrode) 之 pH 計。

7. 天平：

天平應依據待測物的重量選用：待測物重量小於或等於 2 g 時，應使用秤量 10 g 時精密度至少 1 mg 之天平；待測物重量大於 2 g 時，應使用秤量 150 g 時精密度至少 0.01 g 之天平。

8. 濾膜過濾裝置：

使用不鏽鋼、玻璃、可滅菌塑膠材質或無菌拋棄式之濾杯及濾杯座。如使用濾杯之刻度量測水樣體積，必須每年對刻度

進行校正（註 3），體積誤差不得超過 2.5%。每天使用完畢，須充分清洗後，以鋁箔紙包裹或其他適當容器盛裝滅菌。

9. 冰箱（冷藏箱）：

冰箱如用於儲存樣品、培養基、試劑等物品時，溫度應維持在 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，且不可放置揮發性溶劑、食物或飲料。冰箱須定期清理以免過度擁擠。

10. 溫度監測裝置：

用於冰箱及培養箱溫度監測時，溫度計至少須有 1°C 之刻度，但用於 40°C 以上之培養溫度監測時，溫度計至少需有 0.5°C 之刻度。如使用溫度連續記錄裝置，應具備相同之靈敏度。如用於培養箱或冰箱之溫度監測，應將溫度計之球狀部分或溫度探棒浸在水或甘油中。

11. 水浴槽：

水浴槽應具有自動控溫之加熱裝置及水循環裝置。須使用校正過之溫度監測裝置浸放於水浴中監測溫度變化。水浴槽內部應維持清潔避免污染。

實驗室若以水浴槽代替培養箱培養微生物，則使用時必須注意下列的事項：（1）培養時水浴的水面高度，必須高過試管中培養基的高度。（2）水浴裝置應有屋形蓋，以防止水分、熱氣散失，保持溫度恆定。除此之外，用於細菌培養時，若使用一般溫度計進行溫度監測，每日應記錄溫度 2 次（上、下午各一次，記錄之間隔在 4 小時以上）。若使用可顯示培養期間最高及最低溫度之溫度監測裝置，則於培養結束時記錄培養期間之最高及最低溫度。

（三）實驗材料

1. 採樣容器：

應使用無菌玻璃容器或無菌塑膠容器。採樣容器應符合下列條件：（1）大小應能裝下足以完成所有檢驗之樣品，且仍留有適當空間便於將樣品搖晃均勻；（2）如須重複使用，容器應易於清洗，且容器材質應可重複滅菌；（3）在實驗完成之前，可確保樣品不受污染。建議使用廣口玻璃瓶，或是聚丙烯（polypropylene）等可滅菌材質之廣口塑膠瓶。也可使用市售無菌袋。

2. 稀釋瓶：

以硼矽玻璃或其它不會被腐蝕的玻璃材質製品為主，瓶蓋內側如具墊片，須使用滅菌時不會產生微生物抑制物質之材質製成。稀釋瓶之側面應標示體積刻度。可使用滅菌時不會生成有毒物質之耐滅菌塑膠瓶取代玻璃製品。

3. 製備培養基器皿及培養皿：

製備培養基時，使用硼矽玻璃或其他不會被腐蝕、及不會釋放影響微生物生長物質的材質所製成的容器即可。不可使用銅製品。培養皿可使用市售之無菌培養皿。

4. 發酵試管及發酵管：

使用體積足以同時容納培養基和水樣之試管。當試管用於產氣試驗時，內部必須倒置一發酵管。發酵管必須可完全被培養基充滿，大小必須使氣泡易於觀察。

5. 吸量管及量筒：體積誤差不得超過 2.5%。

6. 濾膜及吸收襯墊：

濾膜的過濾效果依製造廠商、種類及製造批號而有所不同，用於細菌檢測時應符合下列標準(相關資料可請廠商提供)：

(1) 材質為混合纖維素酯 (mixed cellulose esters) 或硝化纖維 (cellulose nitrate) 等，直徑為 47 mm，孔隙之平均直徑為 0.45 μm 。

(2) 必須不具毒性，不可有刺激或抑制微生物生長的物質存在，不能干擾培養基中的指示劑；格線必須不具毒性。過濾後細菌（例如大腸桿菌）之回收率應 $\geq 90\%$ 。

(3) 應注意菌落生長在濾膜上的大小及顏色是否正常、是否有明確的邊緣，濾膜上的格線是否會影響菌落生長，菌落在濾膜上的分布是否均勻等。

細菌檢測所使用之吸收襯墊不可含有亞硫酸根離子等抑制物質，直徑約 47 mm，厚度約 0.8 mm，須可吸收 2.0 ± 0.2 mL 之液態培養基（相關資料可請廠商提供）。

五、試劑

(一) 試劑水：

用於製備培養基或稀釋液時，導電度在 25°C 時須小於 2 μ mho/cm (μ S/cm)，且不可含有任何抑制微生物生長的成分及任何營養成分。

(二) 化學藥品：

至少須為試藥級或相同等級，因為藥品中的雜質可能會抑制或刺激微生物生長。

(三) 培養基

1. 培養基的品質

為了確保培養基品質，宜使用市售之商品化培養基。不同廠牌、不同批號的培養基，其品質可能都會有差異，所以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，實驗室內應自行用陽性菌株（參見表 1）或陽性水樣進行測試，確認培養出來的微生物菌落大小及數量，與先前使用的培養基一致（同一樣品使用前後兩批培養基分別進行測試，結果之對數差異值應落於精密度管制參考範圍內）。若無先前使用的培養基可供比對，則須以微生物數量已知之品管查核樣品，進行培養基測試。

2. 培養基的貯存

(1) 粉末培養基：

粉末培養基應轉緊瓶蓋貯存於低於 30°C、黑暗、乾燥的環境中，如製造廠商另有規定則從其規定。未開封時之有效期限以原廠建議為準。已開封時之有效期限以 2 年為準，但不得超過原廠之建議期限。若發現有結塊、變色、變質等現象時，就不可繼續使用。

(2) 液體及固體培養基：

以粉末培養基製備之液體或固體培養基，應保存於 4 \pm 2°C，保存期限為 14 天。培養基如果內含染料，就須避光保存。如使用鬆蓋培養皿，保存時須密封在塑膠袋或塑膠盒內以避免水分散失過多。

多管發酵法使用之液體培養基，使用前應在培養溫度下

先回溫一晚，確認發酵管中沒有氣泡才可使用，以防止培養基回溫時產生氣泡而影響實驗結果。

3. 培養基的製備：

應注意下列事項：

- (1)應按照方法規定或製造商建議之程序進行培養基配製及滅菌。
- (2)配製培養基時，容器體積至少須為待配培養基體積的兩倍。
- (3)培養基配製過程中如須進行精確之體積量測，應用校正過之量筒或吸管，體積誤差不得超過 2.5%。
- (4)如果培養基配製後須進行分裝，應待所有成分完全溶解後才可分裝。
- (5)培養基配製完成後 2 小時以內必須進行滅菌。
- (6)直接加熱培養基溶液時須持續攪拌，尤其是內含瓊脂的培養基。最好使用具磁石攪拌裝置的加熱板。避免培養基突沸衝出瓶口，且加熱的時間應儘可能縮短。
- (7)培養基不可重複滅菌。
- (8)培養基滅菌或煮沸溶解後，在 45 至 50°C 的水浴中不可存放超過 3 小時。
- (9)煮沸或高溫高壓滅菌之培養基，如須分裝至培養皿，必須先冷卻至約 50°C 才可進行分裝。
- (10)總菌落數混合稀釋法之培養基滅菌後若凝固，只可再融化一次使用，其他培養基則不可再融化使用。
- (11)製備培養基時應記錄使用之培養基名稱、批號、製備時間、製備者、製備量、製備程序及保存條件等。
- (12)製備完成的培養基須加註培養基名稱及製備日期。
- (13)培養基滅菌後之 pH 值應特別注意，新購培養基初次製備時應測定培養基 pH 值，其後應每月測定以確認培養基未變質。
- (14)如果培養基滅菌後，出現顏色明顯變化或產生沈澱物等異常現象時，培養基不得繼續使用。除應記錄異常狀況外，還須檢討發生原因。

4. 培養基 pH 值

液體培養基之 pH 值測定，應於培養基滅菌後，取少量以 pH 計量測。內含瓊脂之培養基，應於培養基滅菌後，取少量待其固化，再以配備表面電極之 pH 計測定其 pH 值。

利用商業化粉末培養基製備培養基時，一般不須調整 pH 值。如滅菌後之培養基其 pH 值未落於製造商建議範圍內，且差異小於 0.5 pH 單位，可使用已過濾除菌之 1 N 氫氧化鈉或鹽酸溶液調整培養基 pH 值（註 4）。然而如滅菌後培養基 pH 值和預期相差超過 0.5 pH 單位，則須將製備之培養基廢棄，並檢討 pH 值變化之原因，其可能原因有：(1) 水質問題，(2) 培養基品質問題，(3) 製備方法錯誤等。檢討後應在相關紀錄上加以標註。

5. 培養基的滅菌

培養基滅菌應注意下列事項：

- (1) 一般培養基之滅菌方式為 121°C 下高溫高壓滅菌 15 分鐘，如檢測方法另有規定則從其規定。
- (2) 如果培養基中含有對熱敏感的物質（如抗生素等），應取對熱敏感物質進行過濾除菌後（使用孔徑為 0.22 μm 之無菌濾膜），再加入已滅菌且溫度已降至可容許範圍之培養基內。其過濾分裝等操作過程，必須在無菌環境下完成。
- (3) 為了使培養基加熱均勻且能快速降溫，滅菌時培養基應小量分裝。如使用高壓滅菌釜滅菌，滅菌物品不可放置得過於擁擠。
- (4) 滅菌後待高壓滅菌釜之壓力降至零，應儘速將培養基取出冷卻，以避免持續加熱造成醣類分解。

六、採樣與保存

(一) 樣品採集

採集之樣品應具有代表性，且避免污染樣品。盛裝水樣時，採樣容器之上端應留下至少 2.5 公分的空間，以便檢驗時進行樣品混合。

如果欲採取之水樣可能含有餘氯或其他鹵素，就必須在採樣容

器內加入適量之硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 以中和餘氯，避免餘氯在樣品運送過程當中持續進行殺菌反應。採取加氯之廢水時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 10% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 15 mg/L。採取含氯之飲用水水樣時，每 100 mL 之水樣如加入 0.1 mL 之 3% 硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 5 mg/L。硫代硫酸鈉溶液在加入水樣前必須先經滅菌處理，可先加入採樣瓶中再以高壓滅菌釜滅菌，或可用市售內含硫代硫酸鈉之無菌採樣容器。

(二) 樣品保存

運送時水樣溫度應維持在小於 10°C 且不得凍結，而實驗室內保存溫度應維持在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

七、步驟

(一) 實驗室用品之清洗及滅菌

1. 清洗

在清洗器皿時，應注意清潔劑之選用及殘留問題，避免對微生物的生長造成影響。待洗器皿如果可能遭到微生物污染，在清洗之前必須先進行滅菌。實驗室器皿的清洗步驟應包括三個程序：(1) 用適當的清潔劑徹底清潔器皿，(2) 用熱水沖洗除去清潔劑避免殘留，(3) 用試劑水沖洗。

若用洗瓶機清洗各種器皿用具時，必須注意各進水及出水之管線與接頭均應使用不鏽鋼或聚乙烯等不具毒性之材質，而不可用含銅材質。

2. 滅菌

各種器皿用具，應依其耐熱特性，選擇適當的滅菌方法。不鏽鋼器皿、玻璃器皿或可高溫滅菌塑膠（如聚丙烯）器皿可使用高溫高壓滅菌（一般為 121°C 下滅菌 15 分鐘），但滅菌時間應依待滅菌物質之特性而調整（表 2）。有蓋塑膠瓶進行高溫高壓滅菌時，必須將上蓋略為鬆開，而滅菌後須待瓶子及其內容物冷卻至室溫才可將瓶蓋轉緊，以避免瓶子變形。滅菌完成之器皿、用具內部如果有水氣殘留，應置入 50 至 80°C 之烘箱進行烘乾。

不鏽鋼或玻璃材質之用具器皿，也可使用烘箱進行乾熱滅

菌。滅菌時應維持在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 至少 2 小時。

(二) 檢測步驟：參考各檢測方法之規定。

八、結果處理

略。

九、品質管制

(一) 檢測人員能力確認：檢測人員，必須具備微生物基本知識及無菌操作觀念，並且受過相關檢測技術訓練，另外檢測人員每年須以外部績效評估樣品進行績效評估。

(二) 空白樣品分析：包括運送空白及方法空白樣品分析。空白樣品分析須依各檢測方法之規定執行。

1. 運送空白樣品（又稱旅運空白樣品）

用於監控運送過程是否會造成樣品污染。在實驗室中將無菌試劑水或無菌稀釋液置入與盛裝待測樣品相同之採樣容器內（操作過程須避免污染），攜至採樣地點，再與待測樣品放置於同一冰箱運送回實驗室。

2. 方法空白樣品（又稱試劑空白樣品）

用於判知樣品在分析過程是否遭受污染。一般使用無菌稀釋液作為方法空白樣品。

(三) 重複樣品分析

如依方法規定須進行二重複樣品分析，應計算檢測項目之精密度管制之參考範圍，其建立及使用步驟如下：

1. 取 15 個結果為陽性之二重複樣品分析測定值 (D_1 、 D_2)。
2. 依下式分別計算 D_1 、 D_2 的對數值 L_1 、 L_2 （若 D_1 、 D_2 其中之一為 0，則 D_1 、 D_2 皆加 1 後再分別求其對數值）。

$$\log D_1 = L_1 \quad \log D_2 = L_2$$

3. 依下式計算每組重複樣品分析測定值的對數差異值 (R)，再求出 15 組重複之對數差異值平均 (\bar{R})：

$$R = |L_1 - L_2| \quad \bar{R} = \frac{\sum R}{n}$$

4. 精密度管制參考範圍為 $3.27\bar{R}$ (99% 信賴區間)。如後續重複樣品分析之結果，其對數差異值(R)超出精密度管制參考範圍(大於 $3.27\bar{R}$) 時，除非測定值 D_1 、 D_2 均小於 20，否則須放棄此組測定值，並檢討變異太大之可能原因後，重新進行分析。
5. 計算範例如下：

樣品號碼	重複樣品分析結果		結果對數值		對數差異值 $R = L_1 - L_2 $
	D_1	D_2	L_1	L_2	
1	89	71	1.9494	1.8513	0.0981
2	38	34	1.5798	1.5315	0.0483
3	58	67	1.7634	1.8261	0.0627
.
.
.
14	7	6	0.8451	0.7782	0.0669
15	110	121	2.0414	2.0828	0.0414

$$\begin{aligned} \Sigma R &= 0.0981 + 0.0483 + 0.0627 + \dots + 0.0669 + 0.0414 \\ &= 0.71889 \end{aligned}$$

$$\bar{R} = \Sigma R \div n = 0.71889 \div 15 = 0.0479$$

$$\text{精密度管制參考範圍} = 3.27 \times 0.0479 = 0.1566$$

6. 精密度管制參考範圍每年應重新計算一次，即使用前一年最後 15 個陽性樣品，依前述步驟 1 至 4 計算。惟若前一年之陽性樣品不足 15 個時，得依序沿用歷年之數據補足 15 個。

十、精密度與準確度

略。

十一、參考資料

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22 nd Edition, Method 9010 to 9060, 2012.

註 1：經過測試，70 至 75%的酒精消毒效果最佳。

註 2：高壓滅菌釜之操作與檢查，應符合行政院勞動部「鍋爐及壓力容器安全規則」、「職業安全衛生管理辦法」及「職業安全衛生教育訓練規則」等相關法規規定。

註 3：濾杯校正步驟可依下列方式之一進行：

- (1) 先將已知體積（如 50 mL）試劑水倒入濾杯。再取裝有 100 mL 試劑水之 100 mL 量筒，將試劑水倒入濾杯，至液面與 100 mL 刻度線切齊，觀察量筒內剩餘水量即可換算濾杯刻線之準確性。
- (2) 以容器盛裝約 150 mL 試劑水，秤重後將試劑水倒入濾杯，至液面與 100 mL 刻度線切齊，再秤量容器及剩餘試劑水之重量總合，即可換算濾杯刻線之準確性。

註 4：滅菌後之培養基如須調整 pH 值，可先取定量培養基測定其 pH 值後，加入無菌之 1 N 氫氧化鈉溶液或鹽酸溶液，使培養基 pH 值落於正確範圍。記錄氫氧化鈉或鹽酸溶液的添加體積，以此換算全體積之培養基應加入之氫氧化鈉或鹽酸溶液體積量。加入此定量的氫氧化鈉或鹽酸溶液混合完全後，再取部分測其 pH 值，以確認 pH 值之正確性。

註 5：如使用表 1 外的其他控制菌株，須先進行驗證程序，確認培養出來微生物菌落之性狀與方法要求一致【例如水中大腸桿菌群檢測方法－濾膜法(E202)，於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養 24 ± 2 小時會產生具金屬光澤菌落】，才可使用，並加註生物危害等級(RG1 或 RG2)。

註 6：經單一實驗室以大腸桿菌(IFO 3301)菌株進行「水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法－酵素呈色及螢光反應檢測法(E215)」驗證，螢光反應呈陰性反應，因此不得以大腸桿菌(IFO 3301)菌株做為 E215 方法之螢光反應檢測法的陽性菌株。

表 1、微生物檢測常用之控制菌株 (註 5)

	陽性控制菌株	陰性控制菌株
大腸桿菌群 (Coliforms)	<i>Escherichia coli</i> BCRC 10675 (ATCC 11775), RG2 BCRC 11509 (ATCC 25922), RG2 BCRC 16081 (IFO 3301), RG1 <i>Enterobacter aerogenes</i> BCRC 10370 (ATCC 13048), RG2 <i>Citrobacter freundii</i> BCRC 12291 (ATCC 8090), RG2 <i>Klebsiella terrigena</i> BCRC 14805 (ATCC 33257), RG1	<i>Proteus mirabilis</i> BCRC 10725 (ATCC 7002), RG2 <i>Enterococcus faecalis</i> BCRC 10066 (ATCC 19433),RG2 <i>Proteus myxofaciens</i> BCRC 12222(ATCC 19692), RG1
大腸桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	<i>Escherichia coli</i> BCRC 10675 (ATCC 11775), RG2 BCRC 11509 (ATCC 25922), RG2 BCRC 16081 (IFO 3301), RG1(註 6)	<i>Enterobacter aerogenes</i> BCRC 10370 (ATCC 13048),RG2 <i>Citrobacter freundii</i> BCRC 12291 (ATCC 8090), RG2 <i>Klebsiella terrigena</i> BCRC 14805 (ATCC 33257),RG1

註：BCRC：生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center)

ATCC：美國標準培養蒐集(American Type Culture Collection)

IFO：日本公益財團法人發酵研究所(Institute for Fermentation, Osaka)

RG1微生物：第1級危險群(Risk Group 1)微生物

RG2微生物：第2級危險群(Risk Group 2)微生物

表 2、不同用品在滅菌釜中建議滅菌時間

類別	時間 (溫度 121°C)
過濾膜及其襯紙	10 分鐘
培養基	依方法規定或製造廠商之規定
檢測後之培養基	60 分鐘
微生物污染之器皿	至少 30 分鐘
過濾裝置、空的樣品採集瓶	至少 15 分鐘
稀釋液	至少 15 分鐘