



逢甲大學學生報告 ePaper

報告題名

室內生物氣膠之探討

作者：王姿月

系級：環境工程與科學學系四年級

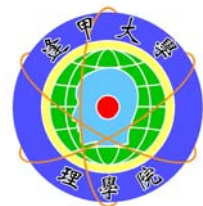
學號：D9279399

開課老師：胡苔莉 教授

課程名稱：畢業論文

開課系所：環境工程與科學學系

開課學年：九十五學年度 第二學期



摘要

現代人平均每天都有 80 % 以上的時間處於室內，室內空氣品質或微生物與引起人類呼吸系統過敏反應有密切的關係。本研究探討室內生物性氣膠分佈之情形，以學生密集之學校教室為探討對象，其中又可分為動態室內環境(體育館韻律舞蹈教室)與靜態室內環境(圖書館閱讀區及一般上課教室)，同時也分析所採集到的微生物種類。

動態環境中，有氧課程的進行會影響空氣中微生物的濃度，同時生物性氣膠之濃度及細菌量與上課人數及課程內容具有相關性。除此之外，使用空調系統之空間，其生物氣膠會受到單位面積之人數密度影響，而開放式之教室，其生物氣膠則會受到室外天氣的影響。

學校室內空間所收集之生物氣膠中，細菌以 *Micrococcus* sp. 和 *Staphylococcus* sp. 居多，真菌則以 *Penicillium* sp. 最為常見。

關鍵字:

安德森六階採樣器, 生物氣膠, 室內空氣品質

目次

摘要.....	I
目錄.....	II
圖目錄.....	V
表目錄.....	VI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2-1 空氣微生物的種類.....	2
2-2 室內生物氣膠的來源.....	2
2-3 生物氣膠之採樣方法.....	3
2-4 分析方法.....	6
2-5 室內生物氣膠規範值.....	7
2-6 生物氣膠對健康的危害.....	8
第三章 研究方法.....	9
3-1 儀器設備.....	9
3-2 儀器原理.....	9
3-3 培養基的配製.....	10
3-3-1 細菌培養基.....	10
3-3-2 真菌培養基.....	10

3-3-3 生理生化測試所需之培養基.....	11
3-4 菌株鑑定.....	13
3-4-1 分離株DNA萃取.....	13
3-4-2 PCR反應組成及條件.....	13
3-4-3 菌株定序.....	14
3-5 單一因子變方分析.....	14
3-6 實驗架構與採樣方法.....	15
第四章 結果與討論.....	17
4-1 動態室內環境.....	17
4-2 靜態室內環境.....	22
4-2-1 圖書館寧靜閱讀區.....	22
4-2-2 一般教學教室.....	23
4-3 空氣採集之未知菌株鑑定.....	25
4-3-1 外觀與格氏染色.....	25
4-3-2 生理生化特性.....	29
4-3-3 分離菌株之DNA定序結果.....	31
第五章 結論.....	36
參考文獻.....	37
附錄一、採樣器之氣動粒徑校正公式.....	39

附錄二、課程與生物氣膠之相關性分析40



圖目錄

圖 3-1 Andersen六階採樣器示意圖	10
圖 3-2 研究流程圖	15
圖 4-1 室內空間使用率與生物氣膠之關係圖	19
圖 4-2 有氧課程種類與室內生物氣膠分佈關係	19
圖 4-3 上課人數對室內生物氣膠之影響	21
圖 4-4 密閉與開放式空間之	23
圖 4-5 空氣採集器第 5、6 階主要菌落外觀及分離株之格氏染色結果	26
圖 4-6 空氣採集器第 5、6 階上菌落之外觀與格氏染色結果	27
圖 4-7 真菌於培養基及解剖顯微鏡下之外觀	28
圖 4-8 PCR以F11/R1492 引子放大之結果	33
圖 4-9 PCR以F968/R1378 引子放大之結果	34
圖 4-10 PCR以F11/R1492 引子放大之結果	35

表目錄

表 4-1 舞蹈教室使用情形與採樣時間	18
表 4-2 細菌濃度與課程間之相關	21
表 4-3 圖書館內生物氣膠變化表	23
表 4-4 生物性氣膠細菌分離株之生理生化測試	30
表 4-5 分離菌株之定序結果	32



第一章 前言

每個人平均每天都有 80 % 以上的時間會處於室內，因此關於室內空氣品質相關議題也應運而生。而近二十年來，中央空調系統及冷氣機的普及為人類生活帶來舒適。但相對的，處於密閉室內，若沒有良好空氣交換系統，很容易造成室內污染物的累積，使得病態建築物症候群(Sick Building Syndromes)問題逐漸顯著。即長時間待在室內，會出現身體不舒服的症狀，例如：眼睛乾癢、呼吸系統不適、頭痛、嗜睡、疲倦與精神無法集中等。

根據許多研究文獻可知：空氣中的微生物與引起人類呼吸系統過敏反應有密切的關係。然而台灣為亞熱帶海島型氣候，終年年平均溫為 20~28 °C，相對濕度平均在 75 % 以上，非常適合微生物生長之條件，因此引起本研究探討之動機。

本研究探討室內環境生物氣膠分佈之情形，其中又可分成動態室內環境(體育館)與靜態室內環境(圖書館及一般上課教室)，同時也分析所採集到的微生物種類。

第二章 文獻回顧

2-1 空氣微生物的種類

空氣微生物又名生物氣膠，主要由細菌細胞、真菌孢子、微生物新陳代謝副產物、花粉與病毒等所組成的粒子，會附著在空氣中的懸浮微粒或是水滴上，其粒徑大小約為 0.3-100 μm (Stetzenbach et al., 2004)。一般生物氣膠之探討對象以細菌和真菌為主。

細菌分為格氏陽性菌(G(+))和格氏陰性菌(G(-))。G(+)具有比較厚的細胞壁，比 G(-)更能抵抗乾燥環境，惡劣環境下會產生內生孢子以求生存。空氣中因為缺乏營養源，對微生物而言並非合適的生存環境，故的 G(+)分佈比 G(-)多。真菌產生孢子進行繁殖，因孢子隨風飄散，形成空氣微生物之一。日常生活中常可看見有機物體腐敗、發黴，就是真菌生長在其表面所造成的現象。

2-2 室內生物氣膠的來源

非工業的室內環境中，生物氣膠最主要的來源為人體，人們藉由談話、打噴嚏、咳嗽、甚至是馬桶使用後沖水都有可能產生細菌。廚房中的食材、家中寵物、景觀植物與花朵、地毯和木頭建材等都與 *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* 孢子的釋放有關聯(Kalogerakis et al., 2005)，此外藉由

開窗保持空氣流通的同時，室外的生物氣膠也會隨著風力的傳播進入室內。

特殊的作業環境例如：農業、木頭製造業或甘蔗業製造過程中，嗜熱性放射線菌會產生大量的菌絲和孢子(Burrell, 1991)。香菇種植區內，因為香菇屬於真菌的一種，其生長過程中會釋放孢子，使得空氣中瀰漫著許多孢囊和菌絲。

辦公大樓常使用的冷卻水塔，設置操作不當時，容易有退伍軍人菌(*Legionella*)的產生，退伍軍人菌會經由冷卻水氣化後，一起進入空調系統，將造成對人體健康的危害(Burrell, 1991)。

2-3 生物氣膠之採樣方法

收集生物氣膠目前常見的有四種方式，分別為衝擊法、液體衝擊法、過濾法和重力法，依照個人採樣的需求而選擇其合適的採樣方法。其中衝擊法和液體衝擊法需要搭配專門的採樣器方能使用，下列就四種採樣原理加以敘述。

1.衝擊法(Impaction)(Stetzenbach et al., 2004 ; Buttner et al., 1997 ; Andersen, 1957)

衝擊法是利用粒子的慣性作用，經由外加馬達抽氣，讓粒子通過多層的篩選裝置，強迫降落在固體培養基上；1958年 Andersen 發表的採樣器(Andersen sampler)即是此原理，其使用的馬達流速為 28.3

L/min。因為每層的孔徑不同，粒子通過的過程中，就如同人體肺部分層篩選，每一層可培養出粒徑大小不同的微生物。衝擊法的操作簡單，且固體培養基是分層放置在採集器的內部即多層篩選裝置，空氣採集後可直接放置恆溫培養箱培養，但是空氣中如果微生物濃度太高，在培養基上會發生菌落重疊的現象，相對的，若採集到的微生物活性不高，對固體培養基上養分攝取有所限制，容易造成微生物死亡，這些都會影響菌落計數的準確性。

2.液體衝擊 (Liquid Impingement)(Stetzenbach et al., 2004 ; Buttner et al., 1997)

液體衝擊與衝擊法的原理雷同，都是利用粒子的慣性作用，使其降落到培養基培養，這兩者最主要的差異為，液體衝擊所使用的是液體培養基，被收集的微生物會在起泡的液體過程中自由地擾動；一般操作此法的空氣流速為 10-12 L/min。液體衝擊法適合用於長時間的採樣，但也因為延長採樣時間，會增加採樣瓶內的壓力，導致減少細菌的生存能力。

3.過濾法(Filtration)(Stetzenbach et al., 2004 ; Buttner et al., 1997)

過濾法是藉由空氣通過濾膜達到分離粒子的效果，再將含有微生物的濾膜移至培養基中培養。但採樣過程中的乾燥效果會影響微生物的培養，因此適於對乾燥環境抵抗力強的微生物生長；對於真菌孢子的

和花粉都有很好的收集效果。

4.重力法(Gravity)(Stetzenbach et al., 2004 ; Buttner et al., 1997)

重力法為直接把培養基暴露在偵測的環境下，經由自然的重力作用讓微生物掉落在培養基上，最後再將採集完成的培養基置入恆溫培養箱中培養。重力法為所有空氣微生物採集法中最簡單，研究費用也最便宜的一種。但因為每種微生物的重力不同，不一定會自動掉落在培養基上，且無法得知採樣的空氣體積，因此在微生物的多樣性及濃度的判定上皆有困難，故重力法較不為推薦。

收集生物氣膠所使用的培養基，有許多廣用性的細菌培養基可以選擇，例如 tryptic soy agar (TSA)、nutrient agar (NA)等，來自環境中和人體的細菌，以 28-35 °C 培養 1-7 天(Buttner et al., 1997)。真菌則使用 malt extract agar (MEA)、rose bengal-containing agars 或 dichloran glycerol-18 agar，培養溫度為 20-25 °C、3-7 天，其中 rose bengal 和 dichloran-containing 使得真菌會聚合成一個明顯的菌落，有助於結果的計數(Buttner et al., 1997)。生物性氣膠之採樣高度約為 120-150 cm (NIEA E301.10C)，亦即人體鼻腔的高度，可以反應出人體所吸入之生物氣膠種類。採樣位置太低，會受到地表揚起之灰塵影響，相對的採樣位置太高，接近冷氣出風口和電扇也會影響採樣的結果。

2-4 分析方法(Buttner et al., 1997)

生物氣膠的分析方法會因為經費、時間、菌種與採集生物氣膠的目的而有所不同，主要的分析方法有：培養法、顯微鏡計數法、免疫分析法、生化分析法和聚合酵素連鎖反應法(The polymerase chain reaction, PCR)。

1. 培養法為使用固體培養基培養後，計數在培養基上的菌落數，
$$[\text{CFU}/\text{m}^3] = [\text{CFU}]_{\text{Petri}} / [(V_s \times \text{min}) / (1000 \text{ L} / \text{m}^3)]$$
 利用此式可求得空氣中微生物的濃度， V_s 為每分鐘馬達所收集的空氣體積(公升)，但對於活性差的微生物，則會有低估的現象。
2. 顯微鏡計數法：活的與死的微生物都可以計數，但是計數的時間冗長，加上必須辨別是否為微生物還是一般懸浮微粒，此方法目前並不常用。
3. 免疫分析法是藉由抗體與特定目標抗原結合，此特定抗原為(1)細胞表面相關蛋白質或多醣體(2)人類的過敏原。此法可用於量測空氣中的過敏原例如：塵蟎和動物毛屑。
4. 生化分析法適於分析空氣中 G(-)產生的內毒素(endotoxins)和真菌(mycotoxins)所分泌的毒素，其中 *Limulus amoebocyte lysate test* 是生化分析中最常用來檢測內毒素的方法。
5. PCR 可以分析出難培養、生長速度慢的微生物，而且使用 PCR 分

析只需要幾個小時的時間就可完成，比起傳統的固體或液體培養節省了許多等待的時間。

2-5 室內生物氣膠規範值

生物氣膠的存在就是室內空氣的污染源之一，人們又長時間處於室內，這些污染源會對身體健康造成風險。美國勞工安全衛生研究所(NIOSH)規範室內生物氣膠最高總濃度為 1000 CFUs/m^3 ，而美國工業工程衛生師協會(ACGIH)則是訂定生物氣膠總濃度最大值為 1000 CFUs/m^3 而且培養基上細菌的菌落數不得超過 500 CFUs/m^3 (Kalogerakis et al., 2005)；台灣環保署將室內空氣品質管制分為兩大類，第 1 類：指對室內空氣品質有特別需求場所，包括學校及教育場所、兒童遊樂場所、醫療場所、老人或殘障照護場所等。第 2 類：指一般大眾聚集的公共場所及辦公大樓，包括營業商場、交易市場、展覽場所、辦公大樓、地下街、大眾運輸工具及車站等室內場所。第一類場所細菌濃度規範上限為 500 CFUs/m^3 ，第二類場所上限則是 1000 CFUs/m^3 ，真菌不論是第一類或是第二類其上限值都不得超過 1000 CFUs/m^3 (環保署, 2006)。

2-6 生物氣膠對健康的危害

生物氣膠主要藉由飛沫傳染，對人體健康最大的危害為影響呼吸系統相關疾病。真菌孢子與花粉的傳播，會使免疫系統弱的人容易有過敏的現象，花粉熱就是因為生物性氣膠所引起過敏反應的個案。除此之外，麩菌病(aspergillosis)、芽生菌病(blastomycosis)、荚膜組織孢子菌感染(histoplasmosis)、球孢子菌病(coccidioidomycosis)等，也都是因為吸入真菌孢子所引起之疾病(Douwes et al., 2002；Burrell, 1991)。

另外，辦公室人員、軍人還有航空飛行員則是退伍軍人菌的高危險族群。退伍軍人菌會引起非肺炎的呼吸道感染(如 Pontiac fever)及全身一些器官的感染(Douwes et al., 2002)，其臨床症狀會因個人體質而有所不同，小至輕微咳嗽、發燒到全身器官衰竭皆有可能發生。

第三章 研究方法

3-1 儀器設備

- 1.生物氣膠採樣器 Andersen 6-stage sampler
- 2.真空源幫浦(Gast 1531107BG557X)
- 3.光學顯微鏡(NIKON ALPHAPHOT-2YS2)
- 4.解剖顯微鏡(ZEISS STEMI 2000-C)
- 5.電子式溫濕計度
- 6.PCR 熱循環機(iCycler iQ, Bio-Rad)

3-2 儀器原理

安德森採樣器的原理是利用幫浦抽取空氣而產生氣流進入採樣器，當氣流通過具有均勻孔洞的金屬篩選階層(每一階有 400 個孔洞)，粒徑大的氣膠經重力加速後所得的重力足夠碰撞篩網下的固體培養基，重力不足的會隨著氣流繼續往下一層移動，直到擁有足夠重力衝擊於篩網下的培養基為止，如圖 3-1 所示。

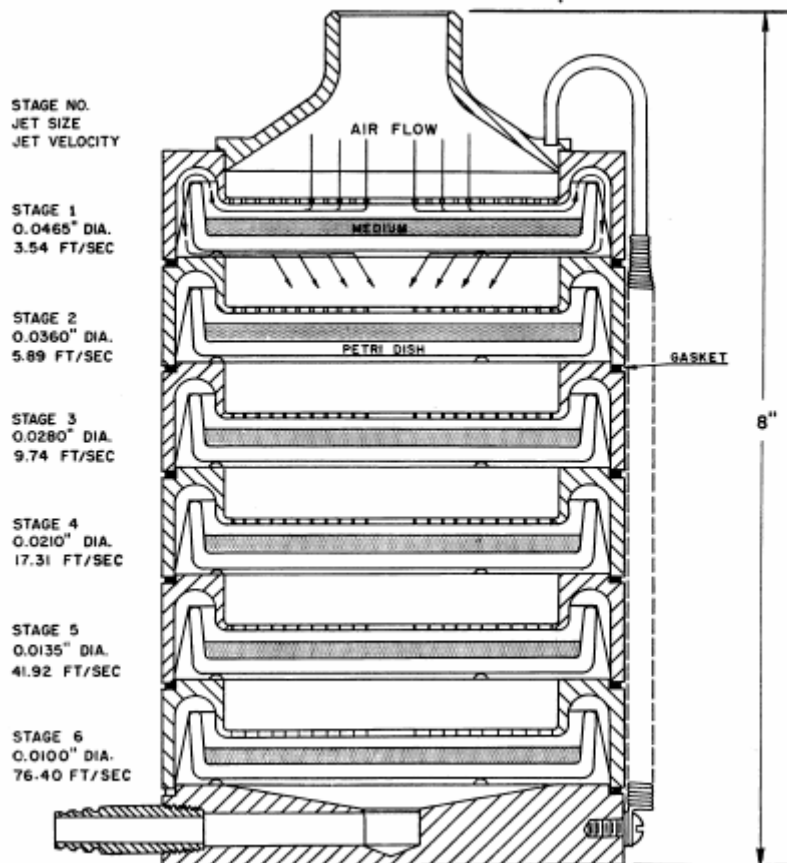


圖 3-1 Andersen 六階採樣器示意圖(Andersen, 1957)

3-3 培養基的配製

3-3-1 細菌培養基(Tryptic Soy Agar, TSA, Bacto)

取胰蛋白大豆培養基(TSB) 30 g、瓊脂(Agar) 15g 加入 1L 之去離子水，混和均勻後，調整 pH 為 7.3 ± 0.2 (25°C) 濕熱滅菌將滅菌完成之培養基倒入 90mm 的塑膠無菌培養皿中，靜置放涼，凝固後再放入 4°C 冰箱保存。

3-3-2 真菌培養基(Malt Extract Agar + Rose bengal)

取麥芽(Maltose, SIGMA) 12.75 g、糊精(Dextrin, OSAKA)2.75 g、

甘油(glycerol, 聯工)2.35 g、蛋白脛(Peptone, BACTO) 0.78 g、瓊脂(Agar, BACTO) 15.0 g、Rose Bengal (Chroma-GESEUSCH ART) 0.05g 加入 1L 去離子水，混和均勻後，調整 pH 為 $4.7 \pm 0.2(25^{\circ}\text{C})$ 濕熱滅菌。將滅菌完成之培養基倒入 90 mm 的塑膠無菌培養皿中，靜置放涼，凝固後再放入 4°C 冰箱保存。

3-3-3 生理生化測試所需之培養基

混合酸與丁二醇發酵培養基

取 Polypeptone 7g、葡萄糖(dextrose) 5g、磷酸氫二鉀(dipotassium phosphate) 5g 加入 1L 之 DI 水，調整 pH 至 $6.9 \pm 0.2 (25^{\circ}\text{C})$ ，每支試管分裝 5ml 之液體培養基，濕熱滅菌。

糖類發酵之培養基

(a) 葡萄糖

取葡萄糖 (dextrose) 5 g、polypeptone 5 g、牛肉萃取液 (beef extract) 3 g、酚紅(phenol red) 0.01 g 加入 1L 之 DI 水，試管內放入發酵管及 5ml 之培養基，濕熱滅菌。

(b) 甘露醇

取甘露醇 5 g、polypeptone 5 g、牛肉萃取液(beef extract) 3 g、酚紅(phenol red) 0.01 g 加入 1L 之 DI 水，試管內放入發酵管及 5 ml 之培養基，濕熱滅菌。

(c)乳糖

取乳糖(lactose)5 g、polypeptone 5 g、牛肉萃取液(beef extract) 3g、酚紅(phenol red) 0.01 g 加入 1L 之 DI 水，試管內放入發酵管及 5 ml 之培養基，濕熱滅菌。

觸酶培養基

觸酶培養基同 TSA 培養基。

澱粉水解培養基

牛肉萃取液(beef extract) 3.0 g、澱粉(soluble starch) 10.0 g、瓊脂(agar) 12.0 g 加入 1L 之 DI 水，調整 pH 至 $7.5 \pm 2(25^{\circ}\text{C})$ 濕熱滅菌。將滅菌完成後之培養基倒入 90mm 塑膠無菌之培養皿中，靜置放涼，凝固後再放入 4°C 冰箱保存。

硫化氫培養基

取柯立格勒氏鐵培養基(Kligler iron agar) 13.75 g 加入 250ml 之 DI 水，加熱使瓊脂(agar)完全溶解，分裝培養基至試管內(5ml/支)，濕熱滅菌後放涼凝固，再放入 4°C 冰箱保存。

尿素培養基

取磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 4.55 g、磷酸氫二鈉 4.75 g、酵母萃取物(yeast extract) 0.05 g、酚紅(phenol red) 0.005 g 加入 DI 水 400 ml，分裝培養基至試管內(4ml/支)濕熱滅菌，另外將 10 g 之尿素(urea)加入 100

ml 之DI 水，過濾滅菌後取 1 ml urea加至已滅菌完成之 4 ml培養基內。

3-4 菌株鑑定

3-4-1 分離株 DNA 萃取

從培養基上直接挑出經由空氣採樣器分離之單一菌落，放入 Tryptic Soy Broth (TSB)中以 28°C連續培養三至五天，再以 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)進行 DNA 之萃取，DNA 儲存於-20°C待用。

3-4-2 PCR 反應組成及條件

為了得到足夠之 DNA，利用 PCR 熱循環機(iCycler iQ,Bio-Rad)進行 PCR 放大，研究中使用兩組不同的引子測試其放大效果。

第一組為 F11 (5', -GTTTGATCCTGGCTCAG -3',)與 R1492 (5', -TAC CTTGTTACGACTT-3',)為針對 eubacteriar 具特異性之 16S rDNA 所設計之引子，長度為 1500 bp (Regan et al., 2002)。PCR 反應中包含 10 µl 之 DNA 模版，單股引子 0.4 µM，0.2 mM dNTPs，2.5 mM MgCl₂，2.5 U 之 Taq DNA polymerase，反應總體積為 50 µl。PCR 條件為 80 °C 預熱 5min，95 °C 預變性(predenaturation) 5 min，30 個循環之 95°C 變性(denaturation)1.5 min，52°C 黏合(annealing) 2 min，72°C 下使引子延長(extension) 3 min，最後 72°C 下 10 min，冷卻至 4°C。產物再以

1% (wt/vol) 洋菜膠分析。

第二組為 F968 (5', -AACGCGAAGAACCTTAC-3') 與 R1378 (5', CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') 為針對 eubacteriar 具特異性之 16S rRNA 所設計之引子，長度為 400 bp (黃, 2006)。PCR 反應中包含 10 μ l 之 DNA 模版，單股引子 0.2 mM, 250 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 之 Taq DNA polymerase 及 1 \times buffer, 反應總體積為 50 μ l。PCR 條件為 94 $^{\circ}$ C 預變性(predenaturation) 5 min, 28 個循環之 94 $^{\circ}$ C 變性 1min, 58 $^{\circ}$ C 黏合(annealing) 1 min, 72 $^{\circ}$ C 下使引子延長 2 min, 最後 72 $^{\circ}$ C 下 10 min, 冷卻至 4 $^{\circ}$ C。產物再以 1%(wt/vol) 洋菜膠分析。

3-4-3 菌株定序

分離菌株經 DNA 萃取及 PCR 放大後，委託廠商以自動定序機 (ABI3730) 定序。

3-5 單一因子變方分析

本研究之動態環境中，不同課程間與室內生物氣膠間使用單一因子變方分析(ANOVA)，並在最小顯著差異 (least significance difference test, LDS) 之限制條件下進行相關性分析，使用之統計軟體為 SPSS。

3-6 實驗架構與採樣方法

本實驗分別選擇體育館、圖書館和一般上課教室作為採樣地點，探討動態(體育館)與靜態(圖書館及教室)室內空間生物氣膠濃度的差異；其中體育館選擇在不同的有氧課程結束後採樣，圖書館則在靠近期中與期末考時進行監測，而教室為固定一日課程結束後進行採樣，實驗架構如圖 3-2 所示。

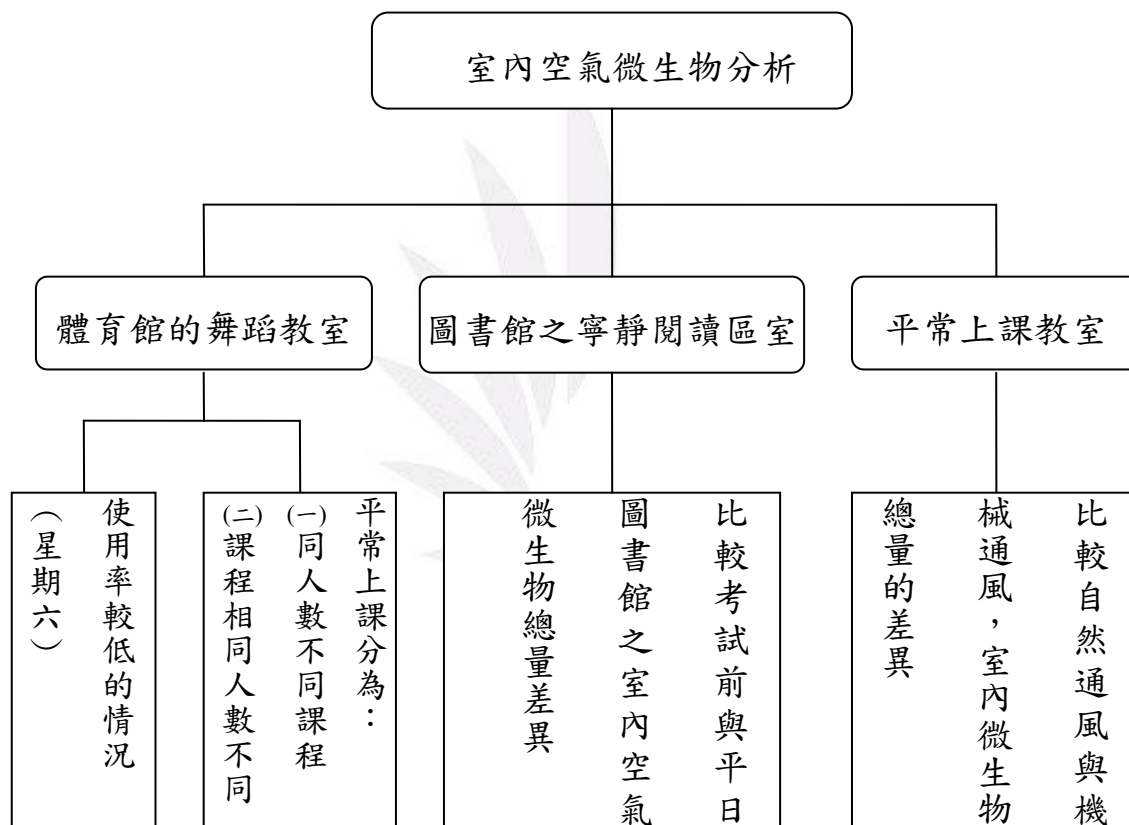


圖 3-2 研究流程圖

採樣時抽氣機的流量為 33 L/Min 比安德森六階採樣器搭配的幫浦流速 28.3 L/Min 大，因此每一階層由上而下所得的粒徑大小會由 7.0、4.7、3.3、2.1、1.1、0.65 μm 變成 5.9、4.0、2.8、1.8、0.87、0.53

μm (計算公式於附錄一)；採樣器置於室內中心處且離地面 120 cm 處，以確實反映出鼻腔與口腔附近的生物氣膠。一般使用安德森六階採樣器以不超過 15 min 為宜(Buttner et al., 1997)，多以 5-10 min 為主(Nevalainen et al., 1992; Pastuszka et al., 2000)。若以 Andersen 採樣器幫浦(28.3 L/Min)搭配採樣時間 10 min 所收集之空氣量，與本次採樣所使用之幫浦(33 L/Min)採樣 8 min 之空氣量相等，且使用 8 min 採樣所得到的菌落數，皆未發生菌落重疊導致難以計數的情況，故本研究之採樣時間為 8 min。採樣同時另於一旁附加空白對照組(即採樣器內放置培養基但不抽取空氣，採集後放入培養箱培養，以確定實驗過程是否遭受污染)，同時記錄採樣現場的溫度及濕度；採集完成後，將培養皿移至恆溫培養箱培養，真菌以 25°C 連續五天，細菌則以 28°C 連續 48 小時，分別進行培養後計數菌落，並挑出不同的菌落，進行顯微照相。

第四章 結果與討論

本研究進行期間自民國 95 年 9 月至民國 96 年 1 月，其中 9 月至 11 月為體育館採樣，11 月至隔年 1 月則進行一般教室和圖書館的樣本採集。而在數據整理方面，因 Andersen 六階採樣器所得到的菌落多集中於第四至第六階(1.8-0.53 μm)，第一至第三階幾乎沒有菌落生長(5.9-2.8 μm)，故結果以六階所得菌落總和示之。此外，一般認為鼻腔可過濾 10 μm 以上之氣膠，而 10-4 μm 的氣膠可被氣管去除，小於 3 μm 會對支氣管及肺泡造成影響，由此可得知若吸入第四至六階上生長之微生物，將可能沉積於支氣管或肺泡(李王與賴, 2002)。

4-1 動態室內環境

動態室內環境採樣地點為本校體育館第二舞蹈教室，室內空間大小為約 233 m^2 ，可容納人數上限為 100 人。平日此教室用來進行室內有氧課程教學，每堂課限定人數為 60 人。舞蹈教室內使用中央空調系統，以達到空氣的流動與交換，溫度介於 17-25 $^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度則為 63-78 %。每次課程結束後半小時內進行採樣，表 4-1 為第二舞蹈教室使用情況及採樣時間點。

表 4-1 舞蹈教室使用情形與採樣時間

	Mon.	Tue.	Wed.	Thu.	Fri.	Sat.	Sun.
8:00-9:00	—	韻律舞	瑜珈	皮拉提斯	—	—	—
9:00-10:00	—	韻律舞	瑜珈	皮拉提斯	—	—	—
10:00-11:00	太極 18 式	瑜珈	韻律舞	瑜珈	爵士	—	—
11:00-12:00	太極 18 式	瑜珈	韻律舞	瑜珈	韻律舞	—	—
12:00-13:00	階梯有氧*	採樣	混合有氧*	—	拉丁有氧*	—	—
13:00-14:00	太極 18 式	韻律舞	韻律舞	爵士	—	—	—
14:00-15:00	太極 18 式	韻律舞	韻律舞	韻律舞	—	—	—
15:00-16:00	採樣	韻律舞	階梯有氧	韻律舞	—	採樣	—
16:00-17:00	—	韻律舞	階梯有氧	韻律舞	—	—	—
17:00-18:00	—	採樣	採樣	—	—	—	—
18:00-19:00	Hi-Lo有氧*	—	—	—	—	—	—
19:00-20:00	—	—	皮拉提斯*	階梯有氧*	基礎有氧*	—	—
20:00-21:00	瑜珈*	—	—	採樣	瑜珈*	—	—

註：*專門為會員課程，上課人數小於 30 人。

—沒有課程。

因假日沒有課程，可視為無人使用的情況，故假日之採樣為比較教室使用率與生物氣膠的關係，確定有氧活動會對室內微生物濃度造成影響。

教室空間於假日時空氣中之細菌平均濃度為 153 CFU/m³，真菌為 209 CFU/m³。同一空間於上課時段其空氣中之細菌平均濃度為 356 CFU/m³，真菌為 414 CFU/m³(圖 4-1)。由此可知，無人使用的狀態下，室內仍然有生物氣膠的存在，其細菌平均濃度較有課程使用時約有二倍差異。但對真菌而言，上課時段空氣中之真菌含量比假日高出兩倍，顯示有氧課程的進行會影響室內微生物的濃度。因此選擇同為 60 人的不同有氧課程下，進而探討生物氣膠的分佈與課程間是否有

密切的相關性。有氧課程有較靜態的太極與瑜珈，及動態的階梯有氧與韻律舞。

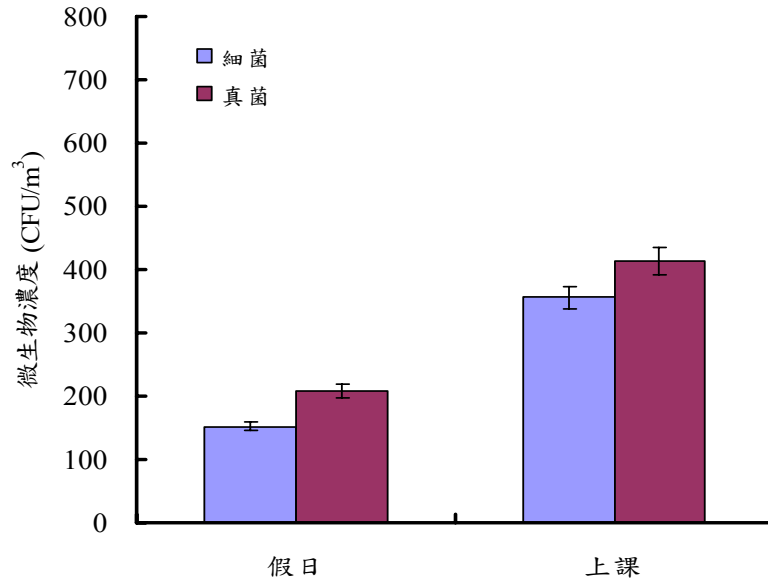


圖 4-1 室內空間使用率與生物氣膠之關係圖(n=4)

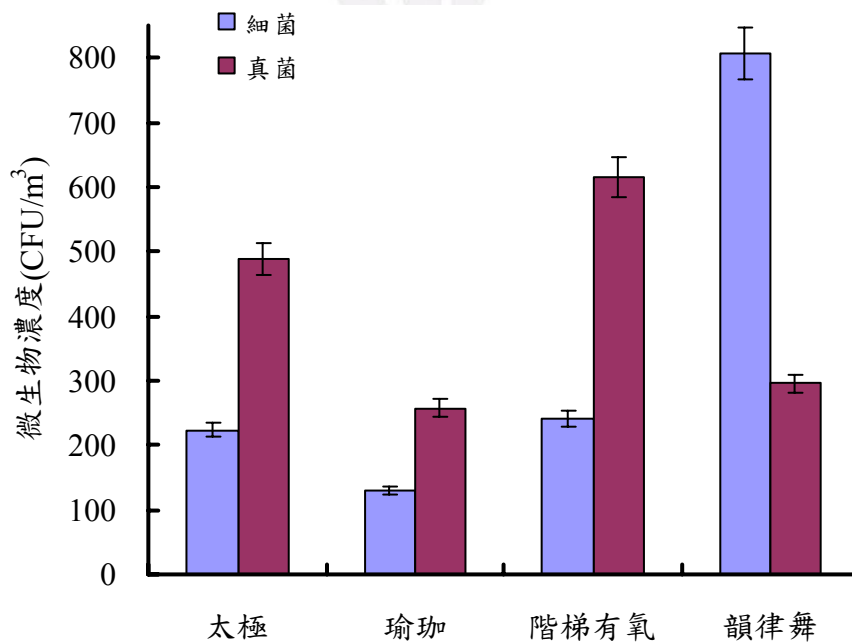


圖 4-2 有氧課程種類與室內生物氣膠分佈關係(n=4)

太極課結束後空氣中的細菌平均濃度為 $224\text{CFU}/\text{m}^3$ ，真菌為 486

CFU/m³。瑜珈課細菌平均濃度為 129 CFU/m³，真菌為 258 CFU/m³。階梯有氧課細菌平均濃度為 241 CFU/m³，真菌為 614 CFU/m³。韻律舞課細菌平均濃度為 806 CFU/m³，真菌為 296 CFU/m³(圖 4-2)。四門課程中太極與瑜珈屬於比較靜態且不穿鞋的活動，階梯有氧與韻律舞必須穿著室內運動鞋上課，鞋子若無經常清洗，在動態的活動下，可能會把附著在鞋子上的粉塵揚起，而造成階梯有氧與韻律舞室內微生物濃度較高。

將課程與生物氣膠濃度進行單一因子變異數分析(LSD)，結果顯示(表 4-2)只有韻律舞蹈課產生之細菌濃度有顯著差異($p < 0.05$)，即代表太極、瑜珈、階梯有氧這三門課雖然採集到的濃度不相同，但是在統計的結果中其實是一樣的，只有韻律舞蹈課所產生的細菌濃度是真正受到課程之影響。真菌濃度方面，統計計算之結果皆無顯著性差異，由此可得知真菌濃度在此四門課程中之濃度並不受到課程活動之影響(附錄二)。

表 4-2 細菌濃度與課程間之相關

	細菌濃度(CFU/m ³)	真菌濃度(CFU/m ³)
	$\bar{X} \pm S.E.$	$\bar{X} \pm S.E.$
太極	224±70	486±157
瑜珈	129±31	258±131
階梯有氧	241±166	614±315
韻律舞	806±111*	296±186

*p < 0.05

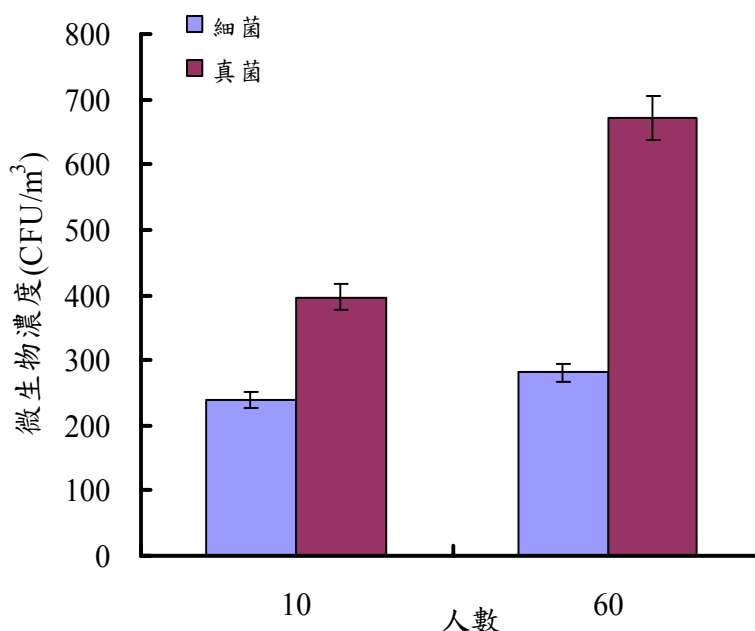


圖 4-3 上課人數對室內生物氣膠之影響(n=4)

上課人數為 10 人之階梯有氧課程，其空氣中之細菌平均濃度為 240 CFU/m³，真菌為 397 CFU/m³。相同課程下，人數為 60 人之空間其空氣中之細菌平均濃度為 281 CFU/m³，真菌為 672 CFU/m³(圖 4-3)。由文獻中得知非特殊作業環境中，室內生物氣膠主要來源為人類及動物的攜帶(Kalogerakis et al., 2005)，由人數與課程之結果也反應出此事實，隨著人數的增加，微生物濃度也跟著增加。在人數固定

下，不同課程間，生物氣膠的濃度關係雖然無法直接從圖 4-2 反應出其相關性，但固定相同課程，比較不同人數間的關係即有明顯的結果。

4-2 靜態室內環境

4-2-1 圖書館寧靜閱讀區

本校圖書館二樓寧靜閱讀區，面積為 169 m²，可容納人數為 74 人。圖書館內藉由中央空調系統進行室內氣體交換，溫度介於 20-25 °C，相對濕度為 63-68 %，於每週三和六閉館前半小時採樣，結果如表 4-3。

寧靜閱讀區平時使用率約 30-40 %，隨著考試的接近，使用的人數也逐漸增多。考前第三週仍然是維持平時的情況，而考前一週是人數最多的時候(74 人)。相同地，隨著人數的增多，室內空氣微生物的濃度也會跟著上升。另外期末考當週，正逢寒流來襲，寧靜閱讀區內的人數約 55 人，可能因為室外天氣寒冷加上人數減少，造成期末考當週的室內微生物濃度減少。

此外圖書館內禁帶食物，加上寧靜閱讀區內並無舊書刊或報紙，因此真菌的濃度比細菌來的低(林, 1997)。

表 4-3 圖書館內生物氣膠變化表

	細菌(CFU/m ³)		真菌(CFU/m ³)	
	期中考(25 °C)	期末考(20 °C)	期中考(25°C)	期末考(20°C)
考前第三週	12	-	12	-
考前第二週	133	-	41	-
考前一週	393	201	48	48
考試當週	432	127	102	12

註：-未採樣。每週採樣 n=2

4-2-2 一般教學教室

一般教學教室選擇理學大樓 404 教室為採樣地點，面積為 73 m²，最多可容納 72 人。教室內分別藉由窗型冷氣機與自然通風兩種方式達到空氣交換，其溫度介於 22-24 °C，相對濕度為 60-79 %。固定於星期二下午四點採樣，結果如圖 4-4。

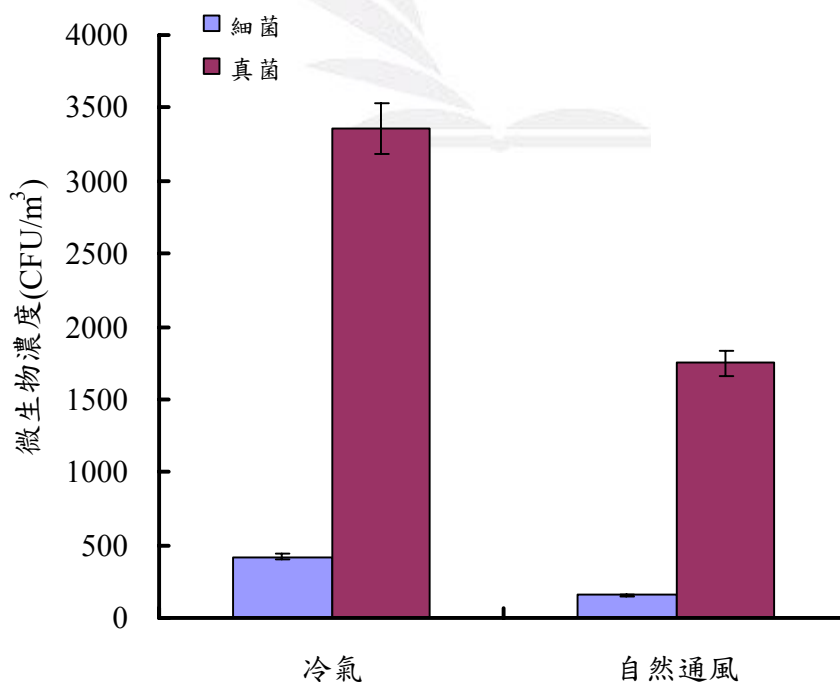


圖 4-4 密閉與開放式空間之生物氣膠之差異(n=4)

密閉式空間為使用冷氣進行室內空氣循環，去年(民國 95 年)正值暖冬，12 月初採樣期間仍然有幾天使用冷氣，其細菌平均濃度為 420 CFU/m³，真菌為 3358 CFU/m³。開放式空間採自然通風，細菌平均濃度為 159 CFU/m³，真菌為 1751 CFU/m³。

由於教室之垃圾桶中經常有未食用完的食物存在，其溫濕度非常適合微生物生存之條件下，使得教室內不論使用冷氣或是自然通風下之真菌濃度遠高於圖書館(102 CFU/m³)。就教室而言，使用冷氣時的微生物濃度大於自然通風，冷氣機的濾網若沒有定時清洗，容易形成微生物的溫床，造成室內生物氣膠濃度升高(蔡, 1995)。除此之外，採取自然通風情況下，戶外氣流進入室內，可帶動室內外之氣體交換，使室內空氣污染物不易累積，故保持室內外空氣的流通能有助於降低一般室內生物氣膠的濃度。

依據環保署公告室內空氣微生物濃度規範值中，第一類室內環境(學校及教育場所、兒童遊樂場所、醫療場所、老人或殘障照護場所等)細菌濃度最高值為 500 CFU/m³、真菌為 1000 CFU/m³。相較所採集的教室樣本中，真菌濃度已經遠大於環保署的規範值，若長時間處於此環境下，存在對健康影響之風險。

密閉空間下，圖書館與一般教室可容納之人數幾乎相等，但因空間大小不同，使得圖書館之單位面積人口密度為 0.43 (人/m²)，教室

為 $0.9(\text{人}/\text{m}^2)$ 。單位面積下，人口數越多，所產生的生物氣膠濃度也會越高，這也有可能是圖書館內微生物濃度低於教室的原因之一。

4-3 空氣採集之未知菌株鑑定

4-3-1 外觀與格氏染色

因以 Andersen 六階採樣器分析生物氣膠，細菌大多集中於第五階和第六階($0.53\text{-}0.87\ \mu\text{m}$)，因此從第五及第六階之培養皿上依據不同之外觀挑出單一菌落並培養，無先分離純化則直接進行格氏染色與外型觀察。

菌株 1 號為黃色圓形中間隆起，大小約 $2\times 1.5\ \text{mm}$ ，球菌，G(+)。2 號菌株是白色圓形中間隆起，大小約 $1\times 1\ \text{mm}$ ，球菌，G(+)。採集到的樣本中以這兩株菌出現的比例最高且數量最多(圖 4-5)。3 號為黃色圓形，中間有立體皺折紋路，大小約為 $6\times 6\ \text{mm}$ ，桿菌，G(-)。4 號菌為白色立體，周圍呈現不規則狀，中間突出，大小約 $6\times 7\ \text{mm}$ ，桿菌，G(+)。5 號菌為紅色圓形，中間隆起，大小約為 $2\times 3\ \text{mm}$ ，橢圓形，G(+)。這三株菌出現的頻率及次數都不高(圖 4-6)。

真菌則主要分佈於第四階和第五階($0.87\text{-}1.78\ \mu\text{m}$)，以青黴菌最多，白黴菌次之(圖 4-7)。

(A)



(B)



(C)

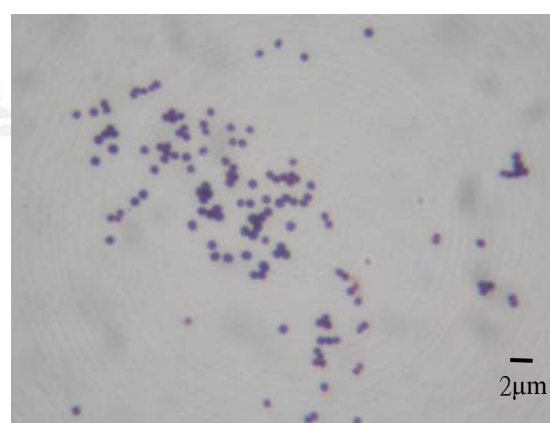
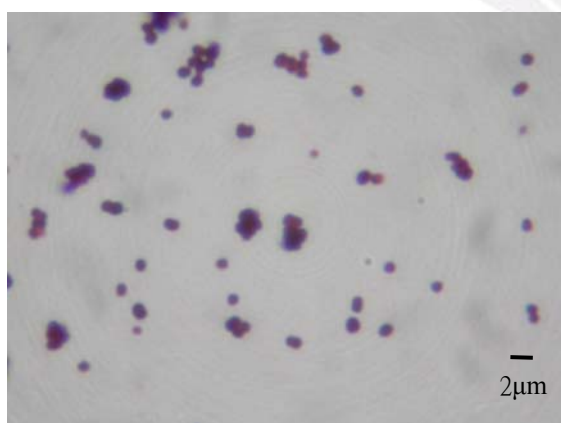
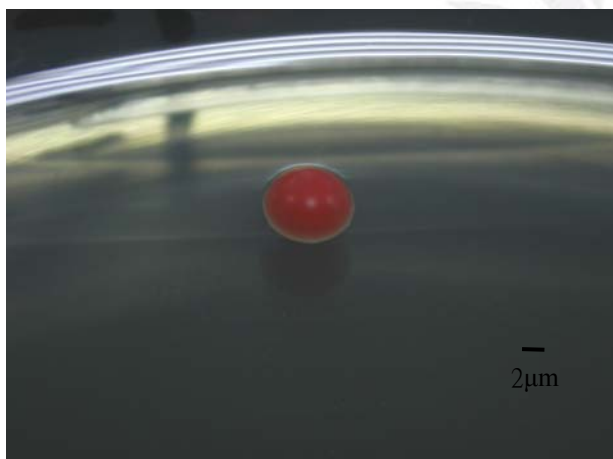


圖 4-5 空氣採集器第 5、6 階主要菌落外觀及分離株之格氏染色結果

(A)TSA 培養基上生長情形，(B)單一菌株外觀，(C)格氏染色(1000×)。

左欄為 1 號菌株，右欄為 2 號菌株。

(A)



(B)

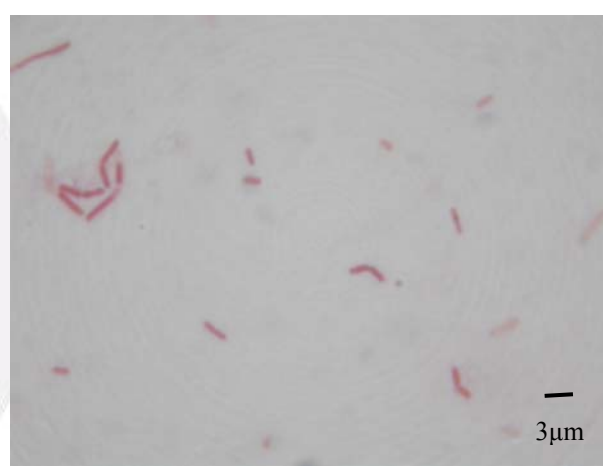


圖 4-6 空氣採集器第 5、6 階上菌落之外觀與格氏染色結果

(A)單一菌株外觀(相機拍攝)(B)格氏染色(1000×)。菌株 3-5 號分別為上，中，下列。

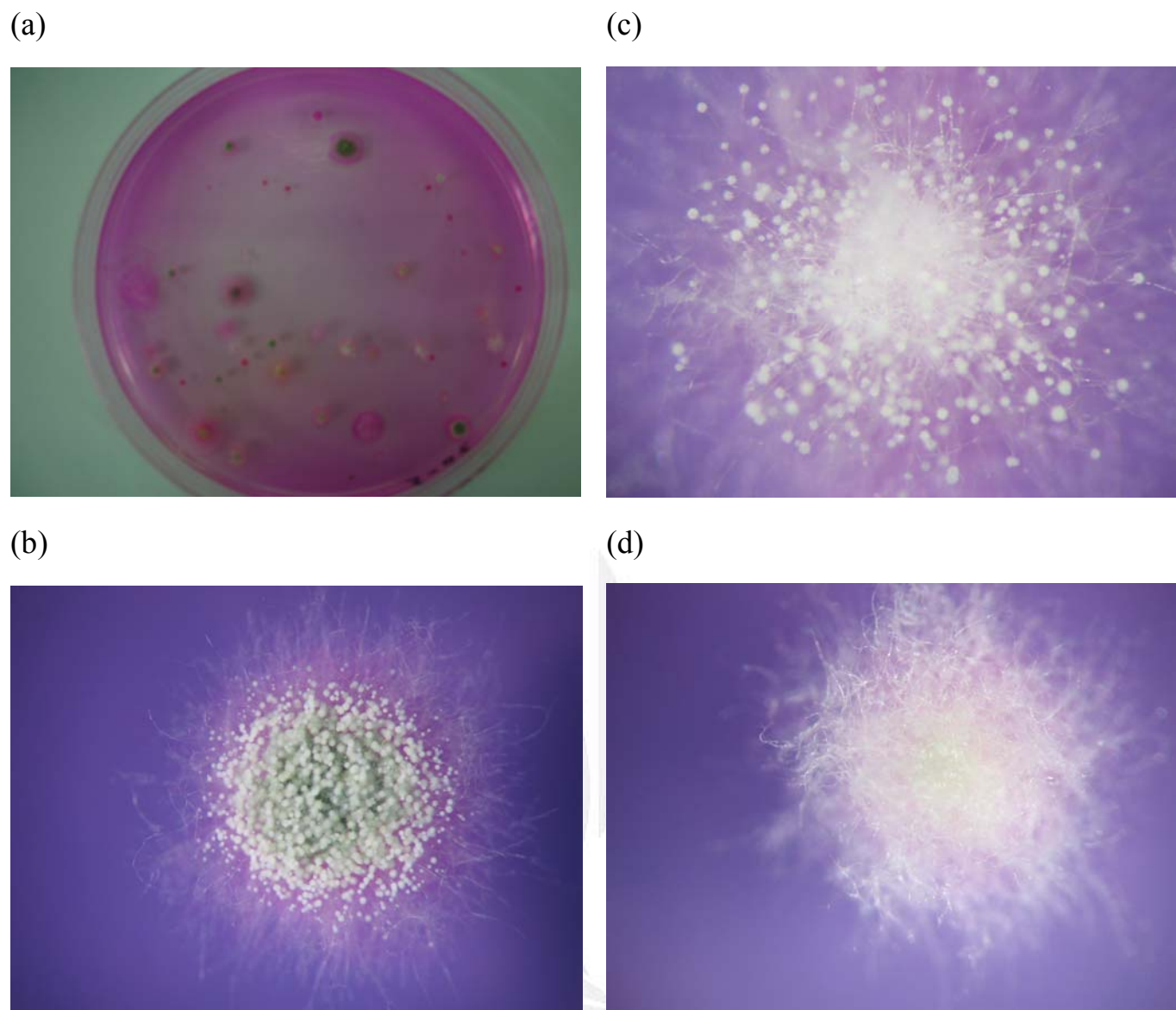


圖 4-7 真菌於培養基及解剖顯微鏡下之外觀

(a)MEA 上生長情形 (b)青黴菌(32×) (c)白黴菌(32×) (d)氣生菌絲(32×)。

4-3-2 生理生化特性

糖類之利用

發酵型的微生物利用有機化合物為能源，以糖類最為被廣泛利用，其中葡萄糖更為大部分發酵型細菌之碳源與能源，而其代謝產物有酸類、醇類、醛類等，氣體則可能有 CO_2 、 H_2 、 CH_4 。五株分離菌株在糖類利用中氧化產生 CO_2 與 H_2O 。而 CO_2 溶於水中形成 H_2CO_3 ，造成pH值下降故酚紅顏色改變。混合酸發酵之結果為五株菌之代謝產物都不是酸類，只有四號菌在丁二醇發酵中，產生醇類之前驅物質乙醯甲基甲醇，其餘分離株均無法發酵糖類。

觸酶試驗

觸酶測試結果顯示，五株分離株均會將 H_2O_2 分解成 H_2O 及 O_2 亦即均屬於好氣型或兼氣型。若為發酵型細菌，利用糖類發酵時，一定會有產酸和產氣兩者現象產生。由糖類利用和觸酶結果可推得五株菌並非真正屬於發酵型細菌，故4號菌可能為兼氣菌，1、2、3、5號菌則為好氣菌。

胞外酵素及其他測試

因 H_2S 之測試其黑色沈澱的產生可視為厭氧菌之反應，五株分離株皆無黑色沈澱產生，即表示五株菌都不屬於厭氧菌，此結果正好與觸酶之結果相符，再次凸顯了五株菌屬於好氣菌或兼氣菌的可能性。

澱粉水解結果顯示只有第四號菌株具有分解澱粉之能力；利用澱粉培養基培養後滴入碘液，會出現明顯的澄清圈，其餘菌株則無澄清圈之呈現。尿素水解結果顯示五株分離菌株都無法使尿素分解產生氨。

表 4-4 生物性氣膠細菌分離株之生理生化測試

編號	1	2	3	4	5
葡萄糖發酵	±	±	±	±	±
甘露醇發酵	±	±	—	±	±
乳糖發酵	±	±	—	±	±
混合酸發酵 (Methy red test)	—	—	—	—	—
丁二醇發酵 (Voges-Proskauer)	—	—	—	+	—
觸酶反應 (Catalase)	+	+	+	+	+
H ₂ S 之產生	—	—	—	—	—
澱粉水解	—	—	—	+	—
尿素水解	—	—	—	—	—

註：±為顏色改變但沒有產氣。

4-3-3 分離菌株之 DNA 定序結果

萃取從空氣中分離菌株之DNA，針對真細菌使用 universal F11/R1492 引子(1500 bp)(Regan et al., 2002)以PCR放大後，產物再以 1% (wt/vol)之洋菜膠分析(圖 4-8)。1 號菌之亮帶不明顯且 3^a菌及 5 號菌沒有亮帶產生，推測可能為DNA含量不足或是PCR反應之溫度不適合，故將DNA放大之產物再以真細菌為 16S rRNA設計之F968/R1378 引子(400 bp)(黃, 2006)進行第二次PCR放大，可看出五株分離菌株皆有明顯亮帶之產生(圖 4-9)。但因使用 400 bp引子所放大之基因序列較短，可比對之菌種範圍較小，不易進行菌種之鑑定。故將第一次PCR未放大之 1、5 號菌株，再以F11/R1492 引子進行第二次放大(圖 4-10)，最後將PCR放大之產物定序，經由NCBI (Nation Center for Biotechnology Information)系統比對分離菌株之基因序列。定序及比對結果 1 號菌為 *Micrococcus luteus*，2 號菌為 *Staphylococcus lentus*，3 號菌為 *Bacillus* sp.，4 號菌為 *Bacillus subtilis*，5 號菌在第一次PCR放大後沒有亮帶之產生，雖然之後再度分別以 400 和 1500 bp之引子放大有明顯之亮帶，但送交定序之結果皆為不良，無法比對出相似之菌株(表 4-5)。本研究結果顯示室內生物性氣膠中，細菌以 *Micrococcus luteus*和 *Staphylococcus lentus*居多，真菌則多為 *Penicillium* sp.，與文獻中指出空氣中之細菌種類以 *Micrococcus* spp.和 *Staphylococcus*

epidermidis 為主，真菌則以 *Penicillium* sp.、*Cladosporium* sp. 與 *Aspergillus* sp. 為常見之菌屬相似(Pastuszka et al., 2000；林, 1997；郭, 1993)。

表 4-5 分離菌株之定序結果

菌株編號	菌種	相似度(%)
1	<i>Micrococcus luteus</i>	97
2	<i>Staphylococcus lentus</i>	98
3	<i>Bacillus</i> sp.	98
4	<i>Bacillus subtilis</i>	99
5	-	-

-定序結果不明確，無法判定。

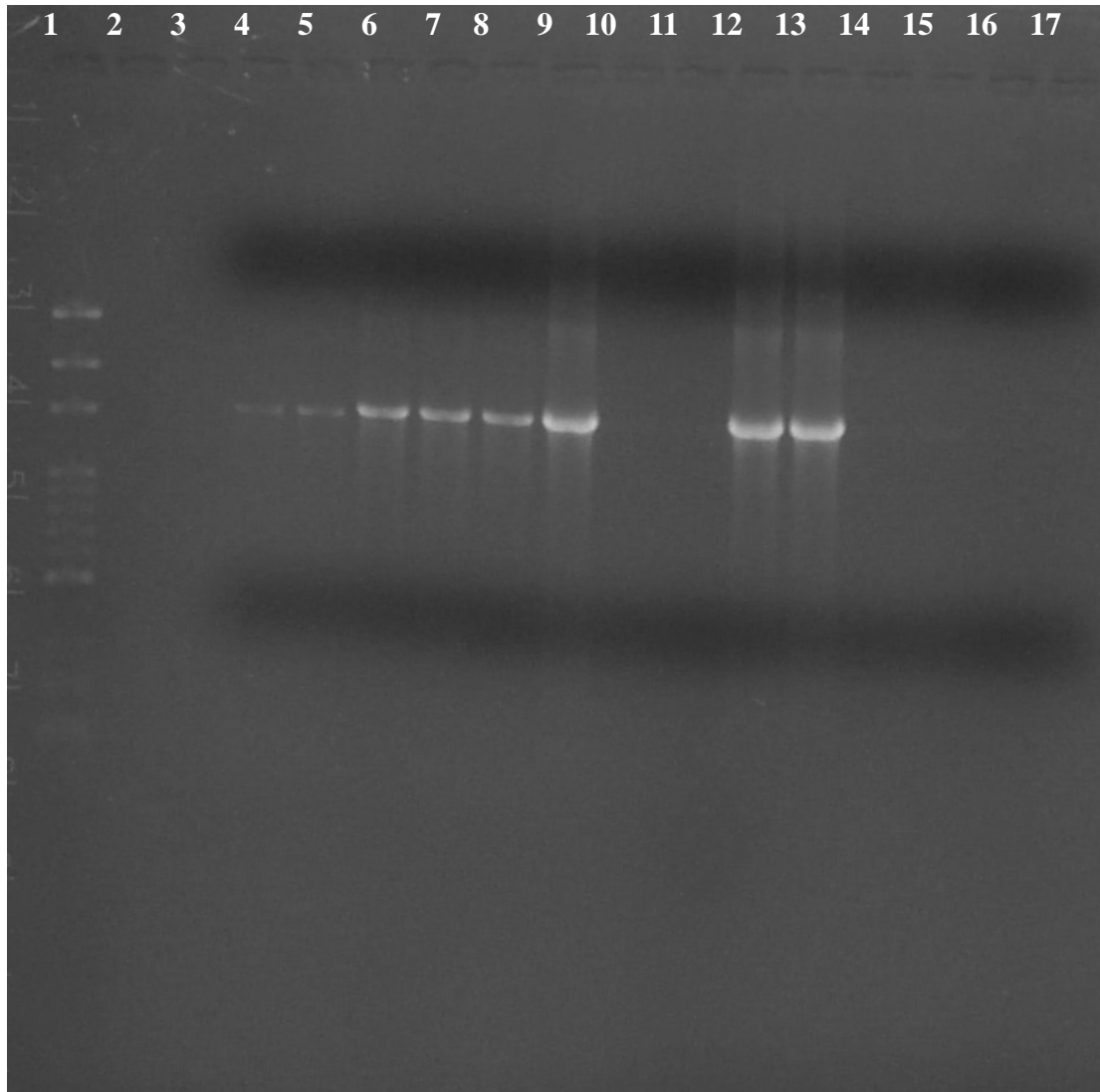


圖 4-8 PCR 以 F11/R1492 引子放大之結果

Lan1 : marker , Lan 4、5 : 菌株 1 , Lan 6、7 : 菌株 2 , Lan 8、9 : 菌株 3 , Lan 10、11 : 菌株 3^a , Lan 12、13 : 菌株 4 , Lan 14、15 : 菌株 5 , Lan 16、17 : 負控制組 (D.I水)。

註: 菌種 3^a與菌種 3 為同一株菌, 但因預防 3 號菌在接菌過程中受到污染, 故 3^a從TSA重新活化後, 培養 48 小時即進行DNA萃取。

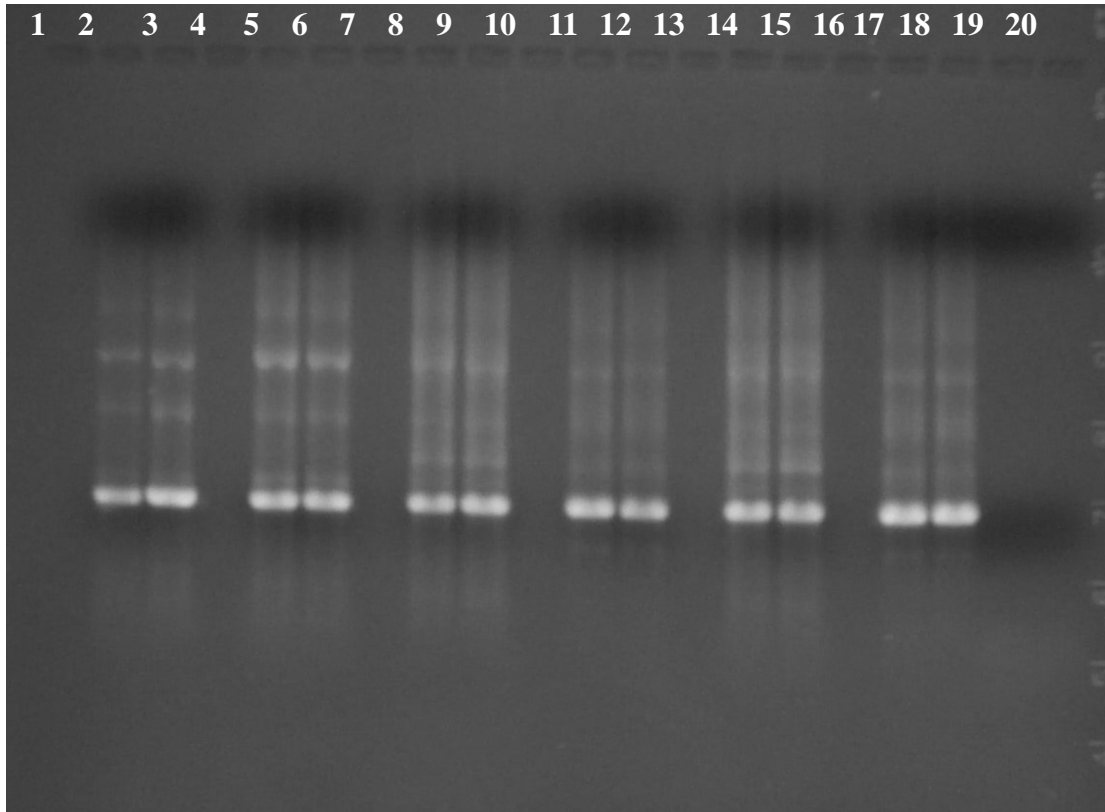


圖 4-9 PCR 以 F968/R1378 引子放大之結果

Lan 2、3：菌株 1，Lan 5、6：菌株 2，Lan 8、9：菌株 3，Lan 11、12：菌株 3^a，Lan 14、15：菌株 4，Lan 17、18：菌株 5，Lan 19、20：負控制組(D.I水)。

註：菌種 3^a與菌種 3 為同一株菌，但 3^a從TSA重新活化後，培養 48 小時即進行DNA萃取。

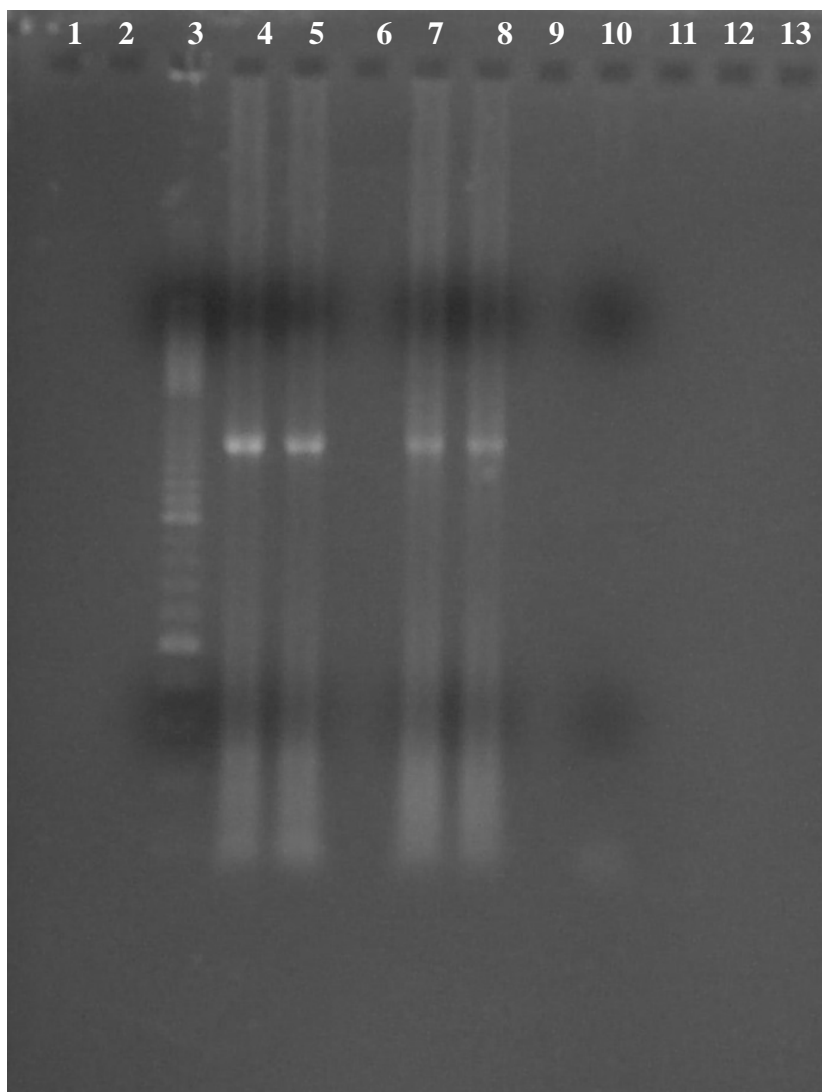


圖 4-10 PCR 以 F11/R1492 引子放大之結果

Lan3 : marker , Lan 4、5 : 菌株 1 , Lan 7、8 : 菌株 5

Lan 10 : 負控制組(D.I 水)。

第五章 結論

- 1.體育館韻律教室在無人使用下依然有生物氣膠之存在，且人為的活動會改變空氣微生物之濃度。
- 2.室內生物氣膠之濃度與人數有正相關。
- 3.經由統計分析結果，韻律舞課程與對室內生物氣膠中細菌濃度有顯著相關，而太極、瑜珈及階梯有氧課程則與細菌濃度無關。生物氣膠中真菌之濃度，則不受課程活動之影響。
- 4.密閉室內空間，如有空調之教室與圖書館閱讀室，生物氣膠濃度受到食物、冷氣機濾網及單位面積之人數影響。開放式室內空間，如開窗之教室，室內生物氣膠則受到室外之天氣狀況影響。
- 5.此次採樣調查之生物性氣膠中，細菌大部分為G(+)尤以 *Micrococcus* sp.和 *Staphylococcus* sp.居多，*Bacillus* sp.出現的頻率及數量較少；真菌則以 *Penicillium* sp.最為常見。

參考文獻

- 李王永泉與賴以賢，2002，空氣污染防治工程，滄海書局。
- 林威州，1997，室內環境中生物氣膠之採樣與分析，逢甲大學環境工程與科學系學士論文，台灣。
- 郭玉梅，1993，亞熱帶地區室內的生物性氣膠空氣品質，勞工安全衛生研究季刊，Vol.1，No.1。
- 黃琬芳，2006，利用生物技術處理廢輪胎-橡膠脫硫去硬化菌之純化與其去硫能力之探討，逢甲大學環境工程與科學研究所 95 級碩士論文，台灣。
- 蔡文城，1995，從圖書館內空氣品質的影響因素談如何維護館內優良空氣品質，圖書館管理學報，Vol.1，pp. 21-34。
- 環保署室內空氣品質資訊網 <http://www.indoorair.org.tw/>
- 環境檢驗所，室內空氣中細菌濃度檢測方法 NIEA E301.10C
- 環境檢驗所，室內空氣中真菌濃度檢驗方法 NIEA E401.10C
- Andersen, A., 1957, New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particle, J. Bacteriol., 76, pp. 471-484.
- Burrell, R., 1991, Microbiological agents as health risks in indoor air, Environ. Health Perspec., 95, pp. 29-34.

- Buttner, M. P., Willeke, K. and Grinshpun, S. A., 1997, Sampling and analysis of airborne microorganisms, In: Hurst, C. J., Kundsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V., Manual of Environ. Microbiol., pp. 629-640.
- Kalogerakis, N., Paschali, D., Lekaditis, V., Pantidou, A., Eleftheriadis, K. and Lazaridis, M., 2005, Indoor air quality bioaerosol measurements in domestic and office premises, *Aerosol Sci.*, 36, pp. 751-761.
- Pastuszka, J. S., Paw, U. K. T., Lis, D. O., Wlazlo, A. and Ulfig, K., 2000, Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland, *Atmospheric Environ.*, 34, pp. 3833-3842.
- Regan, J. M., Harrington, G. W. and Noguera, D. R., 2002, Ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in a pilot-scale chloraminated drinking water distribution system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, pp. 73-81.
- Stetzenbach, L. D., Buttner, M. P. and Cruz, P., 2004, Detection and enumeration of airborne biocontaminants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, pp. 170-174.

附錄一、採樣器之氣動粒徑校正公式

$$d_{50}\sqrt{C} = \sqrt{\frac{9\pi\mu Dj^3(\text{stk}_{50})}{4\rho_p Q}}$$

$$\mu = 1.81 \times 10^{-5}$$

stk 50 = 0.24 (圓形噴孔之標準 stk 50)

ρ_p = aerodynamic d_{50} ($\rho_p = 1000 \text{ kg/m}^3$)

Q = pump 流速/孔數

Dj: 每一階層孔洞的直徑大小



附錄二、課程與生物氣膠之相關性分析

多重比較

依變數: 細菌

LSD

(I) 課程	(J) 課程	平均差異 (I-J)	標準誤	顯著性	95% 信賴區間	
					下界	上界
1.00	2.00	90.2500	149.016	.556	-234.4286	414.9286
	3.00	-11.5000	149.016	.940	-336.1786	313.1786
	4.00	-604.7500*	149.016	.002	-929.4286	-280.0714
2.00	1.00	-90.2500	149.016	.556	-414.9286	234.4286
	3.00	-101.7500	149.016	.508	-426.4286	222.9286
	4.00	-695.0000*	149.016	.001	-1019.6786	-370.3214
3.00	1.00	11.5000	149.016	.940	-313.1786	336.1786
	2.00	101.7500	149.016	.508	-222.9286	426.4286
	4.00	-593.2500*	149.016	.002	-917.9286	-268.5714
4.00	1.00	604.7500*	149.016	.002	280.0714	929.4286
	2.00	695.0000*	149.016	.001	370.3214	1019.6786
	3.00	593.2500*	149.016	.002	268.5714	917.9286

*. 在 .05 水準上的平均差異很顯著。

註：1 太極，2 瑜珈，3 階梯有氧，4 韻律舞

多重比較

依變數: 真菌

LSD

(I) 課程	(J) 課程	平均差異 (I-J)	標準誤	顯著性	95% 信賴區間	
					下界	上界
1.00	2.00	230.0000	296.119	.452	-415.1874	875.1874
	3.00	-126.2500	296.119	.677	-771.4374	518.9374
	4.00	192.0000	296.119	.529	-453.1874	837.1874
2.00	1.00	-230.0000	296.119	.452	-875.1874	415.1874
	3.00	-356.2500	296.119	.252	-1001.4374	288.9374
	4.00	-38.0000	296.119	.900	-683.1874	607.1874
3.00	1.00	126.2500	296.119	.677	-518.9374	771.4374
	2.00	356.2500	296.119	.252	-288.9374	1001.4374
	4.00	318.2500	296.119	.304	-326.9374	963.4374
4.00	1.00	-192.0000	296.119	.529	-837.1874	453.1874
	2.00	38.0000	296.119	.900	-607.1874	683.1874
	3.00	-318.2500	296.119	.304	-963.4374	326.9374

註：1 太極，2 瑜珈，3 階梯有氧，4 韻



