

國立臺灣大學公共衛生學院  
職業醫學與工業衛生研究所

碩士論文

Graduate Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene  
College of Public Health  
National Taiwan University  
Master Thesis

以核酸染劑結合聚合酶連鎖反應定量空氣中活性細菌

Quantification of viable bacteria in air by real-time qPCR  
in combination with nucleic acid dyes



洪念慈

Nien-Tzu Hung

指導教授：張靜文、黃耀輝 博士

Advisor: Ching-Wen Chang Ph.D.、Yaw-Huei Hwang Ph.D.

中華民國 101 年 12 月

December, 2012

## 摘要

空氣中存在著許多對人體健康有害的物質，懸浮於空氣中的微生物（生物氣膠 (bioaerosols))即是其中之一。近年來許多針對室內及室外作業場所生物氣膠之研究，大部分多使用培養法作為其分析環境中總細菌濃度之方法；然而已知生物氣膠具有活性但不可培養 (viable but non-culturable (VBNC))之特性，因此造成以培養法分析時低估實際暴露濃度。

本研究透過核酸染劑結合即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)，建立定量空氣中活性細菌的方法。並比較不同的核酸染劑(ethidium monoazide (EMA) 及 propidium monoazide (PMA))以及不同的濃度之效能、測試其線性關係範圍，並於高濃度細菌暴露之職場進行方法驗證。

於核酸染劑結合 qPCR 結果顯示，相較於未添加核酸染劑之對照組，加入 EMA 或 PMA 之受熱組樣本，其 qPCR 所得之 DNA 濃度顯著較低，顯示 EMA 與 PMA 皆可有效抑制受熱組細菌 DNA 於 qPCR 之放大。而於未受熱組之樣本，無 EMA 處理者其 DNA 量為 6.09 log copies/ $\mu\text{L}$ ，有 EMA 處理者為 2.78~4.58 log copies/ $\mu\text{L}$ ，顯示 EMA 會干擾活性菌定量；而另一核酸染劑 PMA 於未受熱組之結果，無 PMA 處理之 DNA 量為 5.99 log copies/ $\mu\text{L}$ ，而有 PMA 處理者為 4.41~5.41 log copies/ $\mu\text{L}$ ，其差異介於 0.57~1.57 log copies/ $\mu\text{L}$ ，顯示 PMA 較不會影響活性細菌之 DNA 於 qPCR 監測。而進一步觀察不同濃度核酸染劑間之反應，結果顯示濃度為 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之 PMA 可有效抑制受熱組細菌 DNA 於 qPCR 放大，且在此濃度下，不會對活性細菌造成以 qPCR 定量細菌濃度之明顯干擾。因此以 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA 結合 qPCR 作為定量空氣中活性細菌之最佳條件。

進一步以最佳核酸染劑條件 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA 評估偵測細菌濃度範圍，結果顯示其線性範圍介於  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL ( $R^2=0.9945$ )。另考慮每種細菌之 copy number 不同，無法直接將 qPCR 所得之 copies 數換算細菌數，因此本研究亦將

四種環境地點(醫療院所、木材行、豬舍及雞舍)之樣本以 qPCR 分析(copies)及 Baclight 計數(cells)建立可適用於總細菌與活性細菌之環境檢量線，在總細菌之檢量線為  $Y (\log \text{ cells/sample})=1.034 X (\log \text{ copies/sample})-0.6278 (R^2=0.9592)$ ；活性細菌之檢量線為  $Y (\log \text{ cells/sample})=1.085 X (\log \text{ copies/sample})-0.8618 (R^2=0.9665)$ ，高  $R^2$  顯示此兩條檢量線可做為細菌數之換算依據。最後將開發之方法應用於分析職業場所空氣採樣之樣本，其量測場所包括醫療院所、木材行、水稻田、蔬菜田、家禽舍及畜牧業，而將各地點所測得之細菌濃度以 Wilcoxon signed-rank 進行檢定，結果顯示五個地點之總細菌濃度皆大於活性細菌濃度 ( $P<0.0001$ )，活性細菌濃度亦大於可培養細菌濃度 ( $P<0.0001$ )，因此本研究認為以 1.5  $\mu\text{g/mL}$  PMA 結合 qPCR 作為定量職業環境空氣中活性細菌是可行的分析方法。



關鍵字：細菌、即時定量聚合酶連鎖反應、ethidium monoazide、propidium monoazide

# Abstract

Microbial contamination in air has gained particular attention primarily due to the adverse human health effects associated with bioaerosols. The recent studies on monitoring the bioaerosols in occupational settings are commonly based on the analysis with culture assay. However, it has been known that airborne bacteria may be present as viable but not culturable (VBNC) state; therefore, the quantification of airborne bacteria by culture assay may underestimate the actual exposure level.

To deal with this problem that both culture assay and qPCR may not accurately quantify the level of total viable bacteria, this study is initiated to develop a qPCR-based method coupled with nucleic acid dye (ethidium monoazide and propidium monoazide) that can exclusively quantify total viable bacterial. Different types and concentrations of nucleic acid dyes were evaluated. The most appropriate selection on nucleic acid dye was tested for the range of the detection limit, and furthermore, it was pretested in several occupational environments with the high level of total bacteria exposure.

The results of qPCR-based method coupled with nucleic acid dye, for dead cells, a significant decrease of DNA concentration was observed for the heated cells pretreated with EMA or PMA as compared to untreated samples. Indicated that EMA and PMA can penetrate dead bacteria and inhibited the DNA amplification in qPCR.

For live cells, untreated samples DNA concentration were 6.09 log copies/ul. EMA-treated samples were 2.78~4.58 log copies/ul, indicated that EMA can penetrated viable bacteria and decrease the viable cells concentration. For PMA, untreated samples DNA concentration were 5.99 log copies/ul. Otherwise, PMA-treated samples were 0.57~1.57 log copies/ul, there was showed no statistical significant difference in DNA concentration between PMA-treated and -untreated samples. These results demonstrated that PMA penetrated dead bacteria and inhibited the DNA amplification in qPCR, indicating that PMA coupled with qPCR is applicable to quantify the live bacteria. Moreover, the DNA concentrations measured in dead cells were independent of PMA at a concentration of 1.5 µg/mL. Thus, PMA at 1.5 µg/ml with a 20-min light exposure was considered as the most suitable for quantification and thus recommended for all the following experiments in this study.

As for testing on the detection limit of the PMA-qPCR assay, a linear range was obtained for the cells from  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^{10}$  cfu/mL ( $R^2=0.9945$ ). To consider bacteria have different copy number, Can't direct use the copies number conversion bacterial number. Therefore, this study also sample four environmental (), for qPCR analysis (copies) and Baclight count (cells) to establish the applicable total bacteria and viable bacteria in environmental calibration curve. Total bacteria calibration curve was  $Y$  (log cells/sample)= $1.034 X$ (log copies/sample)- $0.6278$  ( $R^2=0.9592$ ); for viable

bacteria calibration curve was  $Y (\log \text{ cells/sample})=1.085 X (\log \text{ copies/sample})-0.8618$  ( $R^2=0.9665$ ). Using the calibration curve to translation from copies number to cell numbers. Finally, this PMA-qPCR based methodology was used for analyzing the samples collected from the air of the workplaces including the hospital, sawmill, rice paddy fields, vegetable fields, poultry and swine,

Various workplaces samples measured concentration of bacteria use the Wilcoxon signed-rank test, the results show that the concentration of total bacteria of the five sites are greater than the viable bacteria concentration ( $p<0.0001$ ), viable bacteria concentration are greater than the concentration of culturable bacteria ( $p<0.0001$ ). Therefore PMA-PCR assay was revealed as suitable for quantification of viable bacteria in those environments.

Keywords : Bacteria, Real-time quantitative PCR, ethidium monoazide, propidium monoazide

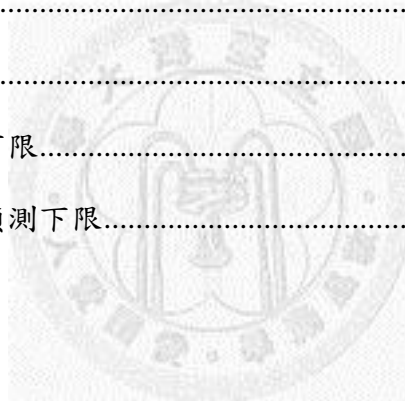
## 目錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 空氣中活性細菌.....	2
2.2 空氣中活性細菌分析方法之比較.....	9
2.2.1 培養法.....	9
2.2.2 顯微鏡鏡檢法.....	10
2.2.3 Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).....	11
2.3 核酸染劑結合聚合酶連鎖反應定量活性細菌.....	16
第三章 研究目的.....	22
第四章 研究架構.....	23
第五章 材料與方法.....	25
5.1 細菌培養液及緩衝溶液.....	25
5.1.1 Tryptic Soy Broth supplemented with 0.25% glucose (TSB+)培養液.....	25
5.1.2 Tryptic Soy Agar supplemented with 0.25% glucose (TSA+)培養基.....	25
5.1.3 磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS).....	26
5.1.4 TE 緩衝溶液.....	26
5.2 總細菌引子及 real-time qPCR 條件測試.....	27
5.3 培養測試之細菌群及建立生長曲線與檢量線.....	28
5.4 加熱處理及核酸染劑配製.....	29
5.4.1 以加熱法產生細胞膜受損之細菌.....	29
5.4.2 核酸染劑配製.....	29
5.5 以核酸染劑處理活性及非活性細菌.....	30
5.5.1 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌之差異.....	30
5.5.2 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與條件.....	31
5.5.3 qPCR 搭配 EMA/PMA 定量活性細菌之上下限值與線性關係.....	32
5.5.4 DNA 萃取.....	33
5.5.5 DNA 萃取回收率.....	33
5.6 備製細菌 DNA 標準品及檢量線.....	36

5.7 環境檢量線建立.....	37
5.8 環境驗證.....	39
5.8.1 採樣器材.....	39
5.8.2 樣本運送.....	39
5.8.3 樣本分析.....	39
5.8.4 空氣中細菌濃度之計算.....	39
5.9 資料分析及統計分析.....	42
第六章 結果.....	43
6.1 選定最佳定量總細菌之引子：.....	43
6.2 real-time qPCR 條件測試：.....	47
6.3 培養測試之細菌群及建立生長曲線與檢量線.....	52
6.4 DNA 萃取回收率.....	53
6.5 加熱法產生細胞膜受損之細菌.....	54
6.6 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌.....	54
6.7 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與其最佳條件.....	56
6.7.1 qPCR Performance 及 QA/QC.....	56
6.7.2 qPCR 搭配 EMA/PMA.....	56
6.7.3 總結.....	61
6.8 qPCR 搭配 EMA/PMA 定量活性細菌之上下限值與線性關係.....	62
6.9 環境檢量線建立.....	64
6.10 環境採樣與驗證.....	66
6.11 方法偵測下限.....	69
6.12 統計檢定.....	70
第七章 討論.....	73
7.1 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌.....	73
7.2 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與條件.....	75
7.3 EMA/PMA 最佳條件之選定.....	79
7.3.1 暗反應時間.....	79



7.3.2 照光強度.....	79
7.3.3 照光時間.....	79
7.3.4 核酸染劑種類及最佳濃度.....	80
7.3.5 總結.....	82
7.4 PMA-qPCR 定量活性細菌濃度之線性關係.....	86
7.5 總細菌 copies 與 cells 之相關性探討.....	89
7.6 NTC 之 Ct.....	98
7.6.1 出現 NTC Ct 值之原因探討.....	98
7.6.2 解決 NTC 之 Ct 值限制.....	99
7.6.3 總結.....	100
7.8 研究限制與建議.....	106
第八章 結論.....	107
參考文獻.....	108
附錄.....	119
附錄一、總細菌偵測下限.....	119
附錄二、活性總細菌偵測下限.....	121



## 圖目錄

圖 1、EMA(左邊)與 PMA(右邊)之化學結構 (分子量分別為 420.31 及 511)	17
圖 2、EMA(左邊)及 PMA(右邊)經光照後與 DNA 形成之共價鍵結	17
圖 3、EMA(左邊)及 PMA(右邊)經光照後與水分子結合形成羥胺	17
圖 4、EMA 與 PMA 結合 qPCR 對 DNA 放大作用機制之影響	18
圖 5、本研究研究流程架構圖	24
圖 6、測試最佳總細菌引子對與 qPCR 條件之流程圖	27
圖 7、培養測試之細菌群與檢量線建立之實驗流程圖	28
圖 8、確認核酸染劑是否可分辨細菌活性之實驗流程	30
圖 9、尋找不同核酸染劑搭配 qPCR 之最佳處理條件	31
圖 10、最佳核酸染劑處理條件下定量活性菌之上、下限值與線性關係之流程圖	32
圖 11、DNA 萃取試劑回收率之流程圖	34
圖 12、Baclight 分析流程圖	35
圖 13、環境檢量線實驗流程圖	38
圖 14、以最佳分析條件定量職場空氣中細菌濃度之流程圖	40
圖 15、環境現場採樣狀況圖示 (A)雞舍 (B)牛舍 (C)豬舍 (D)羊舍 (E)醫療院所 (F)木材行 (G)水稻田 (H)蔬菜田	41
圖 16、於 10 $\mu$ M 引子與 5 $\mu$ L DNA 體積下並以 60 $^{\circ}$ C 為 Annealing 溫度且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 與 2.2 $^{\circ}$ C/s 時之放大曲線圖	51

圖 17、於 10 $\mu$ M 引子與 5 $\mu$ L DNA 體積下並以 60°C 為 Annealing 溫度且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 與 2.2 °C/s 時之檢量線 ( $R^2=0.9994$ ).....	51
圖 18、培養細菌群之生長曲線(n=3).....	52
圖 19、OD 值與細菌濃度檢量線(n=3).....	52
圖 20、DNA 萃取效率.....	53
圖 21、以 23 $\mu$ g/mL EMA 或 PMA 染色未受熱與 90°C 受熱 20 分鐘細菌並於光學顯微鏡(未受熱：A, E；受熱：C, G)與螢光顯微鏡(未受熱：B, F；受熱：D, H)下呈色結果.....	55
圖 22、以不同 EMA 濃度處置未受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異).....	58
圖 23、以不同 EMA 濃度處置受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異).....	58
圖 24、以不同 PMA 濃度處置未受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異).....	60
圖 25、以不同 PMA 濃度處置受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異).....	60
圖 26、qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌.....	61
圖 27、以 1.5 $\mu$ g/mL PMA 處理 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/mL 未受熱組細菌(viable cells only)與含 $1 \times 10^8$ cfu/mL 受熱細菌混合組 (mixture cells)之 qPCR 結果(n=6).....	63
圖 28、總細菌濃度換算檢量線.....	65
圖 29、活性細菌濃度換算檢量線.....	65



## 表目錄

表 1、職業場所總細菌濃度.....	4
表 2、不同環境因子影響細菌活性之文獻.....	6
表 3、培養法之限制.....	9
表 4、顯微鏡分析方法之限制.....	11
表 5、以 qPCR 定量細菌數換算之方法比較.....	12
表 6、空氣中總細菌定量分析使用之引子及探針.....	14
表 7、即時定量聚合酶連鎖反應方法之優缺點分析.....	15
表 8、EMA 核酸染劑結合 qPCR 定量細菌之研究.....	20
表 9、PMA 核酸染劑結合 qPCR 定量細菌之研究.....	20
表 10、定量總細菌之引子序列.....	45
表 11、定量總細菌之引子於 BLAST 測試結果.....	46
表 12、反應試劑引子濃度與 DNA template 體積.....	48
表 13、qPCR 升溫條件測試.....	48
表 14、qPCR 放大效率測試結果.....	49
表 15、總細菌 qPCR 檢量線.....	57
表 16、環境驗證空氣樣本 qPCR 抑制物處理之最佳稀釋倍數.....	67
表 17、環境採樣結果.....	68
表 18、統計檢定表.....	70
表 19、核酸染劑搭配螢光顯微鏡觀察.....	74
表 20、搭配 EMA/PMA 於活性細菌之適用性與條件.....	78

表 21、EMA 核酸染劑搭配 qPCR 定量細菌之最佳條件參數 .....	84
表 22、PMA 核酸染劑搭配 qPCR 定量細菌之最佳條件參數 .....	85
表 23、EMA/PMA-qPCR 定量活性細菌濃度之線性關係 .....	88
表 24、qPCR vs 細菌數檢量線整理 .....	91
表 25、四種環境地點之主要細菌菌種 .....	93
表 26、TSA 可培養之細菌菌種 .....	94
表 27、以 universal primer 定量總細菌之 NTC Ct 值 .....	102
表 28、primer dimer 比較 .....	104
表 29、qPCR 試劑之 free-DNA 汙染情形 .....	104



## 第一章 前言

空氣中可能存在著許多對人體健康有害的物質，懸浮於空氣中的微生物即是其中之一，稱為生物氣膠 (bioaerosols)。生物氣膠包含了懸浮於空氣中的生命體，如：細菌、真菌。這些生物性物質懸浮於空氣中，除了會影響環境的空氣品質外，若是經呼吸道進入人體時，人類的健康將受到威脅。近年來陸陸續續有許多研究針對室內及室外做空氣中的生物氣膠探討，而有研究顯示暴露於空氣中活性細菌可能對人體造成健康危害，且生物氣膠為人體感染以及引發過敏反應之重要來源，因而造成人體呼吸道相關疾病。

而目前用於定量空氣中活性細菌，大部分使用培養法作為偵測環境中總細菌濃度的方法；然而培養法所需時間長，且會有 viable but non-culturable (VBNC) 的情況產生，造成所監測的濃度會有低估的情況。近年來，即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative polymerase chain reaction, real-time qPCR) 可改善培養法低估的情況，且可大幅降低分析時間，然無法分辨細菌活性是其限制。因此，如何準確定量工作環境空氣中活性細菌之濃度與職業性健康風險息息相關，而選擇一個適當且擁有正確定量空氣中活性菌濃度之方法，實有其必要性。近年來，qPCR 結合核酸染劑之方法，廣泛地開發並應用於定量不同活性細菌菌種上。截至目前為止，並未有一種可快速並準確定量空氣中活性細菌濃度之方法。因此，本研究目的係欲評估以 qPCR 結合核酸染劑(ethidium monoazide, EMA 及 propidium monoazide, PMA)之方法，應用於定量空氣中活性細菌，尋找最佳核酸染劑種類及其濃度，並測試其偵測線性關係範圍，同時於高濃度細菌暴露之職場，進行方法之驗證，用以監測職場勞工空氣中活性細菌暴露評估。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 空氣中活性細菌

空氣中可能存在著許多對人體健康有害的物質，懸浮於空氣中的微生物即是其中之一，稱為生物氣膠(bioaerosols)。生物氣膠泛指懸浮於空氣中的生物性微粒，如：細菌、真菌及花粉等。而細菌又分為革蘭氏陽性菌(gram positive bacteria)及陰性菌(gram negative bacteria)。兩者之細胞壁組成在結構上有所不同，可依組成結構的不同來分辨兩者，革蘭氏陰性菌所含的 peptidoglycan layer 較薄（只有單層），位於 outer membrane 和 inner membrane 兩層膜之間，然而革蘭氏陽性菌所含的 peptidoglycan layer 較厚，並堆疊在細胞膜外。而革蘭氏陰性菌之內毒素為主要影響人體健康，有研究指出內毒素(Dutkiewicz et al., 1992)會導致肺部免疫毒素；另革蘭氏陽性菌亦會潛在造成免疫功能傷害(Burrell et al., 1995)。肽糖(peptidoglycan)為細菌細胞壁所含的主要成分，研究指出肽糖(peptidoglycan)會導致發炎症狀產生(Góra et al., 2009)，雖然肽糖相較於內毒素所產生的效應比較低，但吸入肽糖可能會導致多形核細胞(polymorphonuclear cells)對肺泡的通透性增加，製造發炎反應的細胞激素(proinflammatory cytokines)和趨化細胞因子(chemokines)而產生 TNF- $\alpha$  物質，而此物質即會引發內皮細胞的發炎反應。而 Zhiping et al., 1996 等人於畜牧場研究，並以流病學研究證實，吸入肽糖(peptidoglycan)會導致發燒症狀。因此不僅陰性菌所產生之內毒素會影響人類健康，陽性菌亦可能造成潛在健康危害。

因此生物氣膠除可影響空氣品質外，若經呼吸道進入人體時，人類的健康亦可能受到危害。其中，具活性之生物氣膠為人體感染以及引發過敏反應之重要來源(Safatov et al., 2008)，由於活性菌具備新陳代謝及繁殖增生能力(Nocker et al., 2006)，因此當伺機性或致病菌微生物懸浮在空氣中，工作者可能因吸入而感染(Gilbert & Duchaine, 2009)，並導致人體呼吸道相關疾病，甚至引發肺炎(Burge 1989; Crook et al. 1991; Mackiewicz 1998)；相對的，非活性之微生物則無法引發



此情況(Eduard et al., 1990)，但非活性細菌之內毒素已有研究證實為主要影響人體健康之來源(Dutkiewicz et al., 1992)。

而由於文獻支持活性之生物氣膠對於人體產生之健康危害，因此有必要評估工作環境空氣中的活性細菌。基此，越來越多的研究探討職業場所生物氣膠濃度的暴露風險，包括：畜牧場、農田、食品加工廠、模具工廠、醫療院所等(Hameed et al., 2010; Skorska et al., 2005; Gora et al., 2009; Liu et al., 2010)。由於環境的有機物或養殖動植物等易使微生物滋長繁殖增生，因此其空氣中懸浮著高濃度之細菌。不同職業場所總細菌濃度整理如表 1。



表 1、職業場所總細菌濃度

環境地點	分析方法	細菌濃度	參考文獻
<b>家禽業</b>			
Poultry farms	培養法	$2.18 \times 10^5 - 2.71 \times 10^6$ cfu/m <sup>3</sup>	Awad et al., 2010
	qPCR	$5.9 \times 10^{8a}$ equivalent cells/m <sup>3</sup>	Rinsoz et al., 2008
	qPCR	$5.3 \times 10^8$ cells/m <sup>3</sup> <sup>b</sup>	Oppliger et al., 2008
Chicken houses	培養法	培養法： $3.13 \times 10^{6a}$ cfu/m <sup>3</sup>	
	Epifluoresence	EFM/FL：	
	microscopy	$4.20 \times 10^{7a}$ cells/m <sup>3</sup>	
	/fluorochrome,	FCM/FL：	
	(EFM/FL) (染劑 AO)	$6.23 \times 10^{7a}$ cells/m <sup>3</sup>	
	Flow Cytometry,	FISH： $3.66 \times 10^{7a}$ cells/m <sup>3</sup>	
(FCM/FL) (染劑 AO)			
Fluorescent in situ			
hybridization, (FISH)			
Turkey House	培養法	$9 \times 10^4 - 7 \times 10^5$ cfu/m <sup>3</sup>	Fallschissel et al., 2010
<b>畜牧業</b>			
Swine house	培養法	$3.3 \times 10^{5a}$ cfu/m <sup>3</sup>	Chang et al., 2001
Swine farms	培養法	培養法： $1.02 \times 10^5$ cfu/m <sup>3</sup>	Chi and Li., 2005
	EFM/FL (染劑 AO)	EFM/FL：	
	FISH	$5.48 \times 10^6 \sim 2.18 \times 10^7$ cells/m <sup>3</sup> FISH： $5.66 \times 10^6 - 1.32 \times 10^7$ cells/m <sup>3</sup>	
<b>工業廠</b>			
Wastewater	qPCR	$8.62 \times 10^{5a}$ equivalent cell/m <sup>3</sup>	Rinsoz et al., 2008
Sawmills	培養法	$< 10^4$ cfu/m <sup>3</sup>	Rusca et al., 2008
<b>醫療院所</b>			
Hospital	培養法	140-725 cfu/m <sup>3</sup>	Zorman et al., 2007
<b>農業</b>			
Chamomile plants	培養法	$0.28 - 2.33 \times 10^2$ cfu/m <sup>3</sup>	Skorska et al., 2005
Peppermint plants	培養法	$4.15 \times 10^2 - 5.0 \times 10^3$ cfu/m <sup>3</sup>	Skorska et al., 2005

a: mean concentration

b: max concentration

### 2.1.1 影響細菌活性因子探討

由於細菌細胞膜之破損將損及微生物內外物質的傳輸、呼吸代謝以及 ATP 產生等等重要生理機制，故細胞膜破損之微生物可視為不具生物活性的菌種。而在不同環境中，其溫度、溼度等環境因子，皆有可能會影響細菌之細胞膜而造成細菌活性下降。因此細菌活性可能會受環境因子所控制，諸如：溫度、UV、溼度等。

Chi 及 Li 等人 2007 年於環境監測站以培養法及顯微鏡螢光鏡檢法 (EFM/FL) 法進行空氣微生物濃度分析，以兩種分析方法之結果皆顯示大氣溫度與細菌濃度呈現負相關，顯示溫度會對細菌造成傷害。而 UV 所造成細菌活性的影響，如 Lu et al., 2009 等人研究顯示，*Salmonella* 暴露 UV $\geq$ 15 分鐘時，即造成細胞膜破損；而 *Escherichia coli* (O157:H7) 於 UV 暴露 5 秒，即可喪失可培養性 (Nocker et al., 2007)。而溼度不管是細菌或真菌，濕度的增加皆會對微生物之活性有正向關係，由於濕度可包覆於微生物表面，減少微生物與高溫或是 UV 的直接接觸而影響微生物活性 (Rajasekar and Balasubramanian, 2011; Chi and Li, 2007)。因此不同環境場所，如家禽舍及水稻田之環境因子不同，亦可能影響兩種環境之空氣中活性細菌活性率 (viability, culturability)。環境因子對微生物活性 (含可培養性) 之影響整理如表 2。


表 2、不同環境因子影響細菌活性之文獻

因子	實驗室測試/環境採樣	分析方法	菌種	結果	參考文獻
溫度	環境空氣採樣	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 培養法</li> <li>2. EFM/FL : <ul style="list-style-type: none"> <li>• AO, DAPI and SYTO-13 for total microbial cell</li> <li>• PI, YOPRO-1 for non-viable cell</li> </ul> </li> </ol>	總細菌或真菌	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 培養法：大氣溫度與細菌濃度呈現顯著負相關；而真菌濃度與溫度呈現正相關，但未達統計上顯著差異。</li> <li>2. EFM/FL：大氣溫度與總微生物(細菌+真菌)濃度呈現負相關，但未達統計上顯著差異。</li> </ol>	Chi and Li, 2007

表 2、不同環境因子影響細菌活性之文獻(續)

因子	實驗室測試/環境採樣	分析方法	菌種	結果	參考文獻
UV	40W UVC lamp	1. EMA-PCR 2. EMA-LAMP	<i>Salmonella</i>	暴露 UV $\geq$ 15 分鐘時，即造成細胞膜破損。	Lu et al., 2009
	254 mm, 20 cm	1. 培養法 2. PMA-qPCR	<i>E. coli</i> (0157:H7)	1. 培養法: 暴露時間 5 秒, 即可喪失可培養性。 2. PMA-qPCR: >45 分鐘時, 可造成細胞膜破損。	Nocker et al., 2007
	環境空氣採樣	1. 培養法 2. EFM/FL : • AO, DAPI and SYTO-13 for total microbial cell • PI, YOPRO-1 for non-viable cell	總細菌或真菌	1. 培養法: 細菌濃度與 UVA 及 UVB 呈現顯著負相關, 顯示 UV 會對細菌造成傷害; 而 UV 對真菌則未呈現太大傷害。 2. EFM/FL: 總微生物(細菌+真菌)濃度與 UVA 與 UVB 呈現負相關。	Chi and Li, 2007

表 2、不同環境因子影響細菌活性之文獻(續)

因子	實驗室測試/環境採樣	分析方法	菌種	結果	參考文獻
濕度	環境採樣 (Food courts)	培養法	總細菌或真菌	細菌及真菌濃度會隨著相對濕度的上升而增加。	Rajasekar and Balasubramanian, 2011
	環境空氣採樣	1. 培養法 2. EFM/FL : • AO, DAPI and SYTO-13 for total microbial cell • PI, YOPRO-1 for non-viable cell	 總細菌或真菌	兩種分析方法顯示，微生物(細菌+真菌)濃度與相對溼度呈現正相關，但皆未達統計上顯著差異。	Chi and Li, 2007

## 2.2 空氣中活性細菌分析方法之比較

### 2.2.1 培養法

近年來有許多研究針對室內及室外環境探討其活性細菌現況，且大部分研究係使用培養作為分析空氣中活性細菌濃度之定量方法 (Awad et al., 2010; Skorska et al., 2005; Gora et al., 2009)，而培養法具有可偵測活性細菌之優點，且空氣品質之標準也是以培養法作基準；但培養法所需時間長 (Chi and Li, 2005)，且使用的培養基也極其關鍵，培養所得之菌群會因為培養基的不同而有所差異 (Chi and Li, 2005; Chen and Li, 2005)。此外，培養法尚有另一缺點，即是無法偵測處於 viable but non-culturable (VBNC) 的細菌 (Cox, 1989; Heidelberg et al., 1997; Zhen et al., 2009)；目前研究已證實空氣中的致病菌，如：嗜肺性退伍軍人菌 (*Legionella pneumophila*) 及結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 具有 VBNC 的情況 (Ballard et al., 2000; Chen and Li, 2005; Chang and Hung, 2012)。因此，使用培養法分析空氣樣本，極可能低估實際暴露的濃度 (Chi and Li, 2005)。有關培養法之限制整理如表 3。

表 3、培養法之限制

限制	參考文獻
Unable to detect viable but non-culturable (VNBC) bacteria - <i>L. pneumophila</i> - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - <i>Vibrio vulnificus</i>	Ballard et al., 2000; Chen and Li, 2005; Chang and Hung, 2012; Oliver et al., 1995
Underestimation	Chi and Li, 2005
Time-consuming	Chi and Li, 2005
Agar selection bias	Chi and Li, 2005; Chen and Li, 2005

### 2.2.2 顯微鏡鏡檢法

顯微鏡鏡檢是另一種定量空氣中細菌的方法，包括使用血球計數器 (Hemocytometer) 於顯微鏡下直接計數、使用染劑結合螢光顯微鏡 (Epifluorescence microscopy / fluorochrome, EFM/FL) 或是以核酸探針結合螢光顯微鏡 (Epifluorescence microscopy / Fluorescent in situ hybridization, FISH) 之方式達到定量結果。三種方法中，前兩者都只能定量總微生物濃度，無法有效分辨微生物為細菌或真菌，且 EFM/FL 因染色過濾步驟可能導致細菌的損失，因而低估其暴露濃度。而 FISH 實驗之步驟繁瑣，且背景的干擾也會影響判斷是其缺點，然而 FISH 曾被用於退伍軍人病疫情爆發時進行環境分析之用，對 *Legionella* 而言，Mathieu et al. (2006) 研究顯示當培養法無法檢出時，FISH 均有陽性反應；當培養法可測得並可定量時，FISH 亦可測得，但部分樣本低於 FISH 定量下限故無法定量，顯示 FISH 方法有很高的偵測下限，是其缺點。除上述各自之限制外，三種分析方法其分析所花費的時間長，且分析結果可能受到不同操作者計數之不同而有差異 (Chen and Li, 2005)。

而另一種用於定量活性細菌的方法係使用流式細胞儀 (Flow Cytometry, FCM) 搭配特定螢光染劑。此方法具有快速定量之優點 (Chen and Li, 2005)，最早應用於畜牧業以定量空氣中活性細菌 (Lange et al. 1997)。雖然使用 FCM 可快速定量空氣中總微生物及活性微生物，但若空氣中細菌呈現聚集狀態而被採樣器收集，FCM 將無法分辨聚集之細菌數量 (Chi & Li, 2005)；且 FCM 有偵測下限之限制，即當空氣中細菌濃度於  $10^2$  cfu/m<sup>3</sup> 時，此方法無法精確定量空氣中活性生物氣膠濃度 (Lange et al. 1997)。有關顯微鏡分析方法之限制整理如表 4。



表 4、顯微鏡分析方法之限制

方法	限制	分辨活性能力	參考文獻
血球計數器 (Microscopy/Hemocytometer)	1. 花費時間長 2. 很難分辨細菌或真菌	否	Chen and Li, 2005
染劑結合螢光顯微鏡 (EFM/FL)	1. 花費時間長 2. 很難分辨細菌或真菌 3. 可能低估其濃度(染色過濾步驟可能導致損失)	可	Chen and Li, 2005 Chi and Li, 2005; Chi and Li, 2006, Henningson et al., 1997 ; Chen and Li, 2005
核酸探針結合螢光顯微鏡 (FISH)	1. 步驟繁瑣 2. 高偵測下限 3. 易受到螢光背景值之干擾	可	Buchbinder et al., 2002 Bauer et al., 2008
Flow Cytometry (FCM)	1. 無法分辨聚集之細菌數量 2. 高偵測下限	可	Chi & Li, 2005 Lange et al. 1997

### 2.2.3 Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

即時定量聚合酶連鎖反應方法可用以監測具特定片段 DNA 之微生物，並且不受 VBNC 特性之影響，故可有效改善因使用培養法產生的低估情況，是近年來重要且廣泛使用之微生物定量工具。而使用 qPCR 作為定量特定細菌時，可將其定量數據換算成細菌數目，對於暴露評估上更顯現此方法之優點。而細菌數換算方式大部分係將已知 DNA 重量或 copies 數之標準品進行 qPCR 分析，以得到相對應之 Ct 值，藉此兩者(DNA 重量 vs Ct 或 copies 數 vs Ct)關係建立檢量線，而將未知樣本得到之 Ct 值帶入檢量線，即可得到 DNA 重量或總 copies 數，再以特定細菌之 DNA 重量或 copies 數進行細菌數校正。例如 Harms 等人於 2003 年評估廢水處理廠之廢水中 *Nitrospira oligotropha* 濃度，而已知 *N. oligotropha* 之 copies 數為 2，因此樣本由 qPCR 所得之 copies 數除上 2 (2 copies=1 cells)以換

算細菌數；或者細菌數的換算亦可將已知放大片段 DNA 重量代表的細菌數，例如 Chang 及 Hung 於 2012 年，以評估不同採樣器採集 *L. pneumophila* 之效能，而已知 *L. pneumophila* 數與 DNA 重量之關係(4.3 fg= 1 cell)，因此樣本經 qPCR 所得之 DNA 重量除上 4.3，進行細菌數校正。細菌數換算方法整理如表 5。

表 5、以 qPCR 定量細菌數換算之方法比較

對象	換算細菌數/原蟲數之方法	參考文獻
<i>L. pneumophila</i>	4.3 fg DNA =1 cell	Chang and Hung, 2012
<i>Escherichia coli</i>	4.96 fg DNA=1 cells	Nadkarni et al., 2002
<i>Nitrobacter</i>	1 copy =1 cell	Harms et al., 2003
<i>Nitrospira oligotropha</i>	2 copies=1 cells	Harms et al., 2003
<i>Campylobacter jejuni</i> 及 <i>Listeria monocytogenes</i>	1 copy=1 cell	Flekna et al., 2007



然目前已有研究使用即時定量聚合酶連鎖反應法(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)定量空氣中總細菌濃度 (Dutil et al., 2007; Li et al., 2010; Zhen et al., 2009; Oppliger et al., 2008; Rinsoz et al., 2008)。Dutil 等人針對牙科診所的牙醫師及病患，以 IOM 採樣器進行採樣並以 real-time PCR 分析，進行空氣中總細菌及致病菌的暴露評估研究(Dutil et al., 2007)。結果顯示，牙醫師及病患暴露於  $4.3 \times 10^5$  bacteria/m<sup>3</sup> 之總細菌濃度，顯著高於背景值( $P=0.04$ )，顯示牙醫師於工作期間，暴露於空氣中總細菌濃度偏高，可能對其造成潛在健康危害。Zhen 等人 (2009) 則以 portable BioStage 及 RCS High Flow 兩種採樣器採集辦公室及居家空氣中總細菌濃度，進行兩種採樣器效能評估，分析方法係使用 real-time PCR，結果顯示，portable BioStage 採樣器相較於 RCS High Flow 採樣器於兩地點都有較高的總細菌濃度，顯示使用 portable BioStage 採樣器有較高的總細菌採樣效能。另 Li 等人 (2010) 則於地面及 238 公尺之高塔，以 Biosampler 進行空氣中總細菌及綠膿桿菌濃度監測，分析方法係使用 real-time PCR，結果顯示，在地面及 238 公尺的總細菌濃度分別為 1,463 及 1,341 bacteria/L，距離之間濃度並沒有差異，顯示高度並不會影響其總細菌濃度。而 Oppliger 等人(2008)於家禽業不同飼養階段以 Cassette 進行個人空氣採樣，並以 real-time PCR 進行空氣中總細菌及金黃色葡萄球菌濃度監測，結果顯示，當員工進行抓取雞禽時，暴露於總細菌濃度及金黃色葡萄球菌濃度最高，分別為  $5.3 \times 10^8$  cells/m<sup>3</sup> 及  $6.2 \times 10^7$  cells/m<sup>3</sup>；Rinsoz 等人(2008)則在家禽養殖場所及廢水處理場，以濾紙採樣器 Cassette 及液體採樣器 AGI-30 進行採樣並以 real-time PCR 分析，以評估空氣中總細菌暴露。結果顯示，家禽業及廢水處理場之總細菌濃度分別為  $5.9 \times 10^8$  equivalent cell/m<sup>3</sup> 及  $8.6 \times 10^5$  equivalent cell/m<sup>3</sup>，顯示兩者環境之空氣中總細菌濃度偏高，可能會造成工作者潛在健康危害。上述五篇文獻所使用之引子與探針整理如表 6。

總細菌涵蓋了多種細菌菌種，而不同細菌之 copy 數亦有差異，例如 *E. coli* 之 copy 數為 7 (Klappenbach et al., 2001)，而 *N. oligotroph* 之 copy 數為 2 (2

copies=1 cells)；因此以 qPCR 作為定量總細菌之方法時，可能面臨到細菌數換算之問題。

表 6、空氣中總細菌定量分析使用之引子及探針

Universal primers & probe	參考文獻
Forward : TCCTACGGGAGGCAGCAGT Reverse : GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT Probe : (6-FAM)-5-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3-(TAMRA)	Li et al., 2010; Zhen et al., 2009
Forward : GGTAGTCYAYGCMSTAAACG Reverse : GACARCCATGCASCACCTG Probe : (FAM-TKCGCGTTGCDTCGAATTAAWCCAC-TAMRA)	Dutil et al ., 2007
Forward : TCCTACGGGAGGCAGCAGT Reverse : GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT Probe : (5-HEX-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-BHQ1-3)	Oppliger et al., 2008; Rinsoz et al., 2008

即時定量聚合酶連鎖反應方法可用以監測具特定片段 DNA 之微生物，並且不受 VBNC 特性之影響，故可有效改善因使用培養法產生的低估情況；此外，qPCR 方法分析速度快，可有效縮減分析時間 (Alvarez et al., 1994; Sawyer et al., 1994; Olsson et al. 1998; Angenent et al. 2005)，是近年來重要且廣泛使用之微生物定量工具。

然而即時定量聚合酶連鎖反應法因無法分辨微生物的活性 (viability)，在定量時將同時分析活菌與不具活性微生物之 DNA (Herman, 1997; Sheridan et al., 1998; Rudi et al., 2005)，故若直接用其監測空氣中活性細菌，恐將高估實際的暴露風險。方法優缺點整理如表 7。

表 7、即時定量聚合酶連鎖反應方法之優缺點分析

優/缺點	內容	參考文獻
優點	1. 花費時間少	Alvarez et al., 1994; Sawyer et al., 1994;
	2. 改善培養法無法偵測 VBNC 情況	Olsson et al. 1998; Angenent et al. 2005; Zhen et al., 2009; Li et al., 2010
缺點	1. 無法分辨微生物活性	Herman, 1997; Sheridan et al., 1998; Rudi et al., 2005

### 2.3 核酸染劑結合聚合酶連鎖反應定量活性細菌

近年在定量活性微生物方面，已有研究係採取將核酸染劑結合 qPCR 之分析方法(Chang & Hung, 2012)；核酸染劑以 ethidium monoazide (EMA)與 propidium monoazide (PMA)兩類為主(圖 1)。由於採取 qPCR 技術，此方法具有 PCR 之高敏感度且分析快速之優點 (Inoue et al., 2008)。同時，此方法係在進行 DNA 萃取前使 EMA 或 PMA 與細菌作用，若當細菌之細胞膜有缺損時，EMA 或 PMA 可經由細胞膜進入細胞質內，並與 DNA 產生共價鍵結(圖 2)，使得 DNA 無法於後續 qPCR 時被不斷的放大而偵測；至於對於處於細胞膜外多餘的 EMA 或 PMA，則可經由光照步驟加以光解(圖 3)。因此，在經過 EMA 或 PMA 處理並進行 DNA 萃取後，qPCR 僅放大細胞膜完整的微生物之 DNA (圖 4)。由於細菌細胞膜之破損將損及微生物內外物質的傳輸、呼吸代謝以及 ATP 產生等等重要生理機制，故細胞膜破損之微生物可視為不具生物活性的菌種。因此，將核酸染劑結合 qPCR 具有僅定量活性細菌的功能。



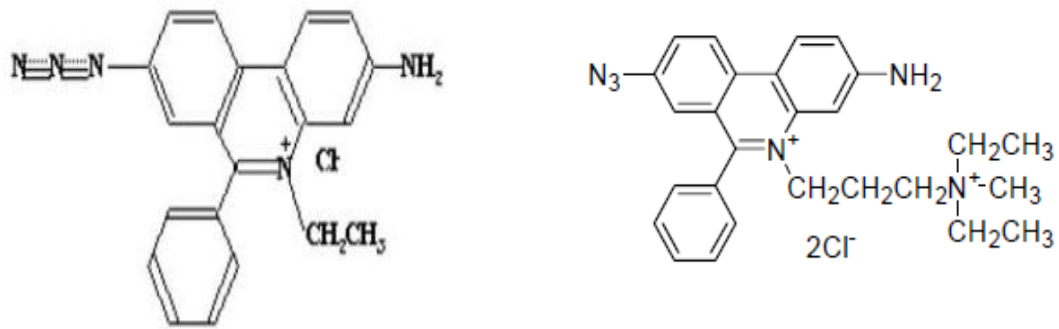


圖 1、EMA(左邊)與 PMA(右邊)之化學結構 (分子量分別為 420.31 及 511)

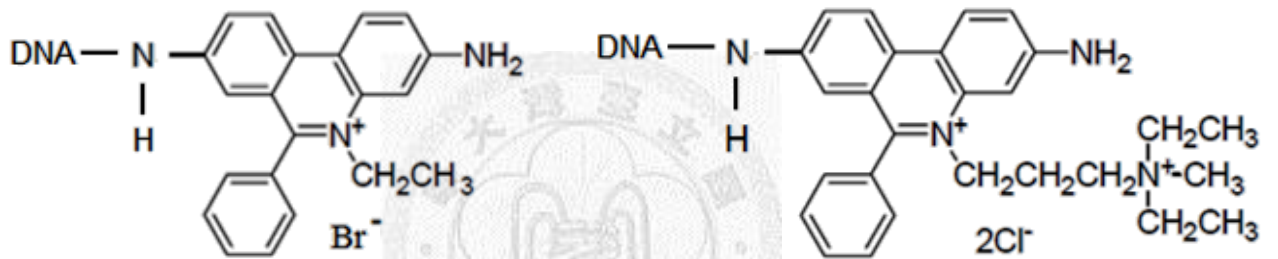


圖 2、EMA(左邊)及 PMA(右邊)經光照後與 DNA 形成之共價鍵結

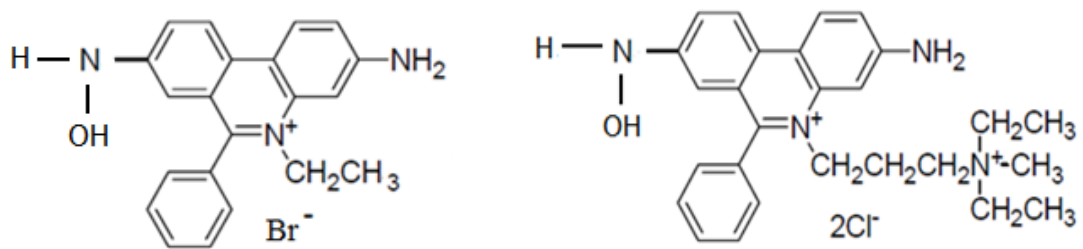


圖 3、EMA(左邊)及 PMA(右邊)經光照後與水分子結合形成羥胺

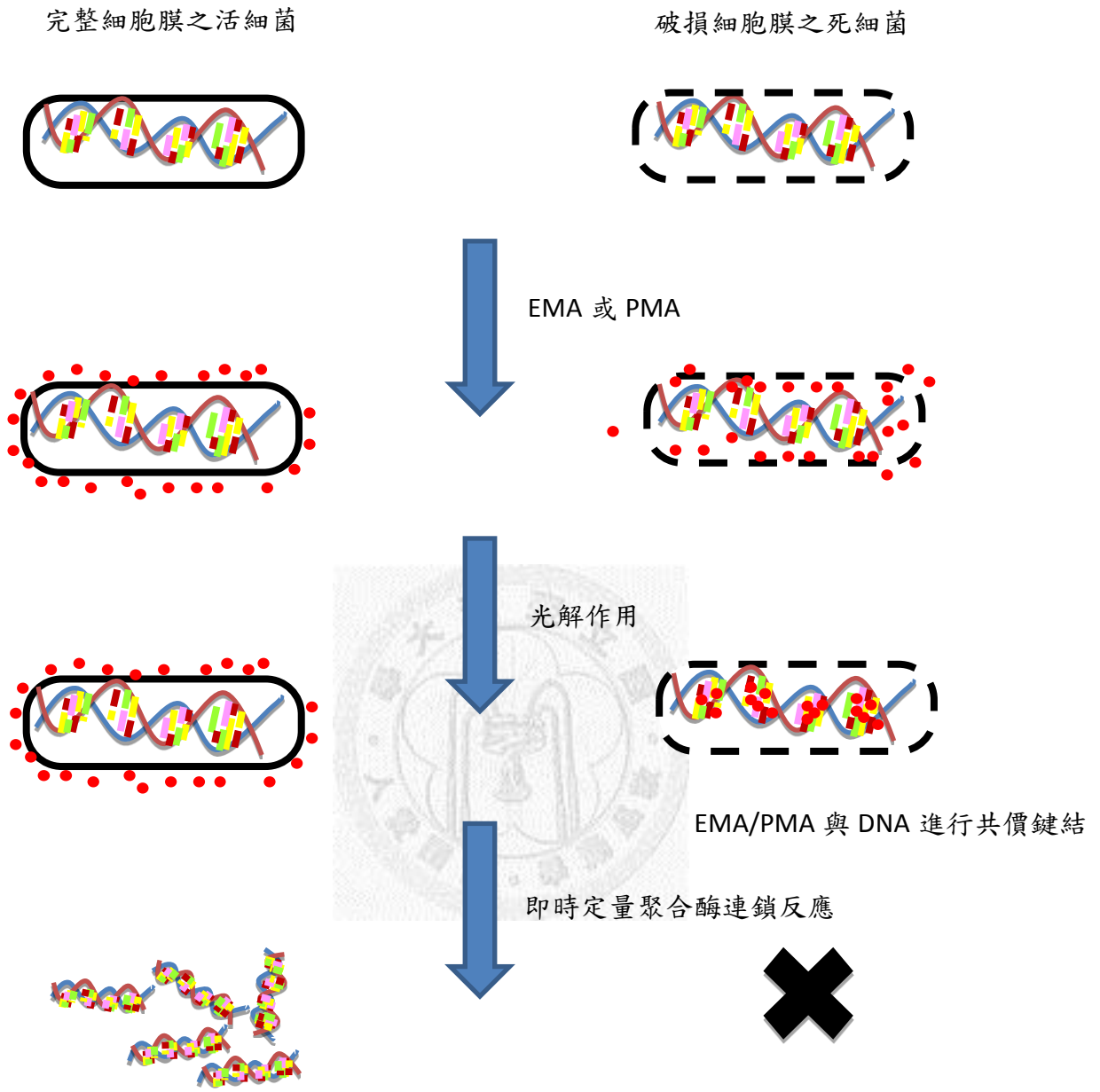


圖 4、EMA 與 PMA 結合 qPCR 對 DNA 放大作用機制之影響



目前此方法已經成功應用於許多微生物上，包括：細菌 (Nocker et al., 2006)、真菌 (Vesper et al., 2008)、原蟲 (Brescia et al., 2009)、病毒 (Fittipaldi et al., 2010)，以及特定病原細菌上，如：*L. pneumophila* (Chang & Chou, 2011)、*Escherichia coli* (Nogva et al., 2003)、*Salmonella* sp. (Nogva et al., 2003)等。在 EMA 與 PMA 方法開發上，主要評估五項參數，包括：核酸染劑種類、染劑最佳濃度、反應時間、照光強度與照光時間，以決定其最佳核酸染劑條件。有關過去在 EMA 與 PMA 相關研究整理如表 8 與表 9。然截至目前為止，尚未將 EMA 或 PMA 結合 qPCR 之方法應用於定量空氣中活性總細菌上。



表 8、EMA 核酸染劑結合 qPCR 定量細菌之研究

細菌菌種	核酸染劑 EMA			照光		參考文獻
	濃度 (µg/mL)	濃度 (µM)	反應時間(min)	強度(瓦特)	時間(min)	
<i>E. coli</i>	100	240	5	650	1	Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	1	Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	1	Nocker & Camper, 2006
<i>L. monocytogenes</i>	100	240	5	650	1	Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	1	Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	2	Flekna et al., 2003
<i>Salmonella sp.</i>	100	240	5	650	1	Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	1	Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	1	Nocker & Camper, 2006
<i>V. vulnificus</i>	2.5	6	5	500	15	Wang & Levin, 2006
	0.5	1.2	5	500	15	Lee & Levin, 2008
	1	2.4	5	500	10	Lee & Levin, 2009
<i>C. jejuni</i>	100	240	5	650	1	Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	2	Flekna et al., 2007
<i>L. pneumophila</i>	2.3	5.5	5	500	20	Chen and Chang, 2009
<i>Legionella spp.</i>	2.5	6	10	500	15	Delgado-Viscogliosi & Delattre, 2009
<i>Staphylococcus spp.</i>	50	120	5	650	5	Kobayashi et al., 2009

1µM = 420.31(EMA 之分子量)\*10<sup>-3</sup> µg/mL

表 9、PMA 核酸染劑結合 qPCR 定量細菌之研究

細菌菌種	核酸染劑 PMA			照光		參考文獻
	濃度 (µg/mL)	濃度 (µM)	反應時間(min)	強度(瓦特)	時間(min)	
<i>E. coli</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2007
	51.1	100	5	650	2	Nocker et al., 2009
<i>Salmonella sp.</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2007
	51.1	100	5	650	2	Nocker et al., 2009
<i>Staphylococcus spp.</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	25.6	50	5	650	2	Kobayashi et al., 2009
	2.8	5.48	20	650	20	Hein et al., 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	51.1	100	5	650	2	Nocker et al., 2009
<i>Mycobacterium avium</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2007
	12.8	25	5	650	2	Kralik & Pavlik, 2010
<i>Serratia marcescens</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
	51.1	100	5	650	2	Nocker et al., 2009
<i>Micrococcus luteus</i>	25.6	50	5	650	2	Nocker & Camper, 2006
<i>Enterococcus faecalis</i>	51.1	100	5	650	2	Varma et al., 2009

1µM =511(PMA 之分子量)\*10<sup>-3</sup> µg/mL

### 第三章 研究目的

從上述文獻回顧顯示，定量空氣中活性細菌濃度而言，以培養法所需時間長，且 VBNC 菌株的存在造成定量活性細菌濃度會有低估之問題；然即時定量聚合酶連鎖反應法則可能造成高估暴露狀況。截至目前為止，並未有一種可快速並準確定量空氣中活性細菌濃度之方法。

有鑑於此，本研究主要目的細分如下：

1. 收集聚合酶連鎖反應定量總細菌之相關文獻，選定最佳定量總細菌之引子及探針。
2. 將兩種核酸染劑搭配顯微鏡，觀察核酸染劑分辨細菌活性之能力。
3. 將兩種核酸染劑結合即時定量聚合酶連鎖反應進行樣本分析，以決定最佳核酸染劑種類及濃度。
4. 以最佳核酸染劑結合 qPCR 條件找出方法之上、下限，以決定可偵測之濃度範圍。
5. 以 qPCR 分析結果(copies/sample)與 BacLight 計數結果(cells/sample)，建立 copies 轉換 cells 之檢量線。
6. 於職業場所進行方法開發驗證及工作者暴露評估。

#### 第四章 研究架構

本研究流程如圖 5 所示。本研究首先收集聚合酶連鎖反應定量總細菌之相關文獻，比較不同引子(primers)應用於總細菌的專一性，並進一步測試 qPCR 最適溫度條件、反應試劑引子濃度與最適之 template DNA 體積，以決定 qPCR 之實驗條件。

而為能準備進行 EMA 與 PMA 測試之總細菌樣本，本研究於雞舍中進行空氣採樣，將採集之微生物於實驗室內進行培養，以作為方法開發之測試細菌來源。在準備測試細菌樣本後，本研究首先以顯微鏡搭配核酸染劑，以確認核酸染劑是否具有進入與區分活菌及死菌之能力。再以所培養之菌液進行兩種核酸染劑 (EMA 及 PMA) 的評估，以決定最佳核酸染劑種類及其濃度，並進而評估此方法之偵測線性範圍。另以 qPCR 分析結果(copies/sample)與 Baclight 計數結果 (cells/sample)，建立 copies 轉換 cells 之檢量線。而在完成方法之實驗室開發後，於具有高濃度細菌之作業環境進行方法之驗證，同時瞭解該場所活性細菌之暴露狀況。

選定最佳定量總細菌之引子及探針

收集定量總細菌之文獻，並以  
NCBI-BLAST 進行引子專一性測試

測試引子於 qPCR 之適用性，並調整溫度條件、反應試劑引子濃度與最適之 template DNA 量



以顯微鏡搭配核酸染劑，驗證核酸染劑是否可以區分活菌及死菌之能力

$1 \times 10^8$  cfu/mL 未受熱組及受熱組(90°C, 20min)之細菌

以 23  $\mu$ g/mL 之 EMA 進行染色

以 23  $\mu$ g/mL 之 PMA 進行染色



評估 qPCR 搭配核酸染劑定量活性細菌之適用性、找尋最佳核酸染劑處理條件

$1 \times 10^8$  cfu/mL 未受熱組及受熱組(90°C, 20min)之細菌

無核酸染劑處理(控制組)

以核酸染劑 EMA 處理  
(0.2~46  $\mu$ g/mL)

以核酸染劑 PMA 處理  
(0.2~46  $\mu$ g/mL)



評估在最佳核酸染劑條件處理下，定量活性細菌之上、下限值與其線性關係

控制組：未受熱組細菌進行十倍序列稀釋，使其濃度範圍為  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL  
混合組：將未受熱組稀釋之各濃度點加入  $1 \times 10^8$  cfu/mL 之受熱組細菌

以最佳核酸染劑處理未受熱之細菌

以最佳核酸染劑處理混合組細菌



環境檢量線之建立：將培養之細菌群進行十倍序列稀釋，使其濃度範圍為  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL

qPCR, PMA-qPCR (log copies/sample)

Baclight (log cells/sample)



於職業場所進行本方法開發之驗證與暴露評估

圖 5、本研究研究流程架構圖

## 第五章 材料與方法

### 5.1 細菌培養液及緩衝溶液

#### 5.1.1 Tryptic Soy Broth supplemented with 0.25% glucose (TSB+)培養液

培養液依照下述過程進行配製，先加入 30 g 之 TSB 於 1 L 血清瓶內，並加入 0.0125 g 之葡萄糖，加入 1000 mL 之去離子水，混合均勻後以 121°C 滅菌 20 分鐘。待溶液冷卻後，將 TSB+培養液保存於 4°C。

TSB+培養液：

藥品名稱	濃度
Pancreatic Digest of Casein	15.0g/L
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.0g/L
Sodium chloride	5.0g/L

#### 5.1.2 Tryptic Soy Agar supplemented with 0.25% glucose (TSA+)培養基

配置時將 40.0 g 的 TSA 加入 1000 mL 血清瓶中，加入 0.0125 g 之葡萄糖，加入 1000 mL 的去離子水均勻混合，混合均勻後以 121°C 滅菌 20 分鐘。待溶液冷卻至 60°C 左右時，在無菌操作台內以每次 20 ml 分別加入直徑 9 公分的培養基中後，放置通風櫥內冷卻凝固即可使用。

TSA+培養基：

藥品名稱	濃度
Pancreatic Digest of Casein	15.0g/L
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.0g/L
Sodium chloride	5.0g/L
Agar	15.0g/L

### 5.1.3 磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS)

配置時將所述之各藥品加入1 L去離子水中，混勻後經121°C 20分鐘滅菌處理，置於室溫下保存。

磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS)：

藥品名稱	劑量
NaCl	8.2 g
KCl	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g

### 5.1.4 TE 緩衝溶液

將所述之各藥品加入 988 mL 的去離子水中。經 121°C 20 分鐘滅菌處理，置於室溫下保存。

TE 緩衝溶液：

藥品名稱	劑量
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	10 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 mL



## 5.2 總細菌引子及 real-time qPCR 條件測試

本研究係以 bacteria 16S rRNA gene 為 qPCR 放大對象，故首先收集以聚合酶連鎖反應定量總細菌之文獻，並對其所使用的引子對，考量其對細菌之專一性。總細菌引子設計的關鍵，係期望該引子會偵測到大多數的細菌，而不會偵測到不是細菌的菌群(真菌或古細菌等)。因此本研究最佳引子之決定係考量引子開發作者是否曾對引子專一性進行實驗測試以及其所用之菌種/數量與結果，另外本研究也另以 NCBI-BLAST 測試各總細菌引子在細菌、真菌及古細菌之專一性。

此外，由於本研究係使用 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche Diagnostic GmbH, Basel, Switzerland)儀器進行 DNA 放大與定量，然從上述中選定之最佳引子對其原始文獻所使用的 PCR 儀器可能並非 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480。考量 qPCR 最佳升溫條件、反應試劑引子濃度與最適之 template DNA 量可能因不同儀器廠牌而有所不同，因此本研究將選定的引子對搭配不同升溫條件進行測試，依據其在 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 之放大曲線及放大效率，作為定量活性細菌之最佳升溫條件，同時也評估最佳的反應試劑引子濃度與最適之 DNA template 量。本實驗測試參考同樣以總細菌為偵測對象 Nadkarni 等人之研究，作者以 *E. coli* 作為 qPCR 標準品 DNA；因此本研究亦使用 *E. coli* (ATCC 25922)於 TSA 培養基下培養 37 °C、48 小時後之菌株，以 QiAamp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 依套件所附操作書進行 DNA 萃取，作為總細菌引子測試的 DNA 標準品來源。研究流程如圖 6 所示。

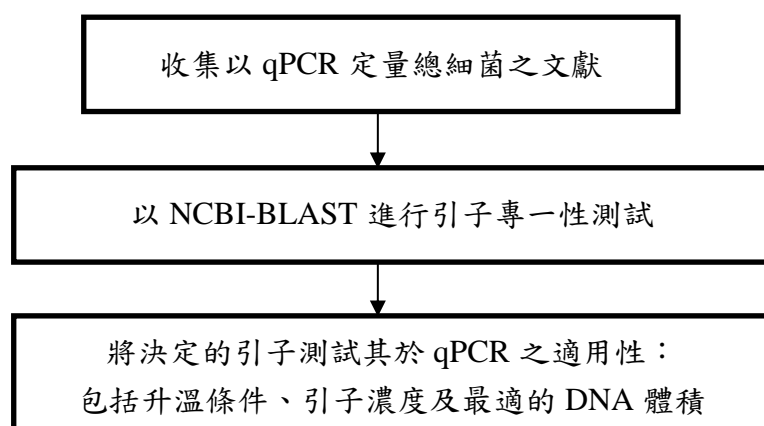


圖 6、測試最佳總細菌引子對與 qPCR 條件之流程圖

### 5.3 培養測試之細菌群及建立生長曲線與檢量線

為了開發定量空氣中總活性細菌之方法，首先需要培養來自空氣之活性細菌作為測試的對象。空氣中細菌的採集係於一配合的雞舍內進行，以內含有 20 mL PBS 液體之生物氣膠採樣器 AGI-30 (Ace Glass Inc., Vineland, NJ, USA)採集空氣 1 小時，期間於每 15 分鐘進行 PBS 的補充(Chang and Chou, 2011)。採樣後將 PBS 液體移至 50 mL 離心管，並放入冰桶內運送至實驗室。PBS 液體先以 3220 g 離心 10 分鐘，移除大部分上清液後，將所剩約 5 mL 之 PBS 樣本置入含有 95 mL TSB+ 之 250 mL 錐形瓶中，於 100 rpm、37°C 培養箱中培養 (Tomazetto et al., 2007)。

每日進行培養液之  $A_{600}$  測定，並製作依據 OD 值之生長曲線。當細菌達到穩定生長前期時，將培養液以 10,000 g 離心 5 分鐘處理，再以 PBS 進行反覆 5 次之清洗後，將菌液進行 10 倍序列稀釋，測定  $A_{600}$  同時以塗抹法將菌液轉至於 TSA+培養基上，培養基將於 37°C 培養箱中培養 48 小時後，計數菌落數並與  $A_{600}$  數值建立檢量線，進行 EMA 及 PMA 核酸染劑條件測試時，利用此檢量線調整起始總細菌濃度至  $1 \times 10^8$  cfu/mL，作為核酸染劑測試實驗之菌液來源(5.4 及 5.5 節)。實驗設計流程如下圖：

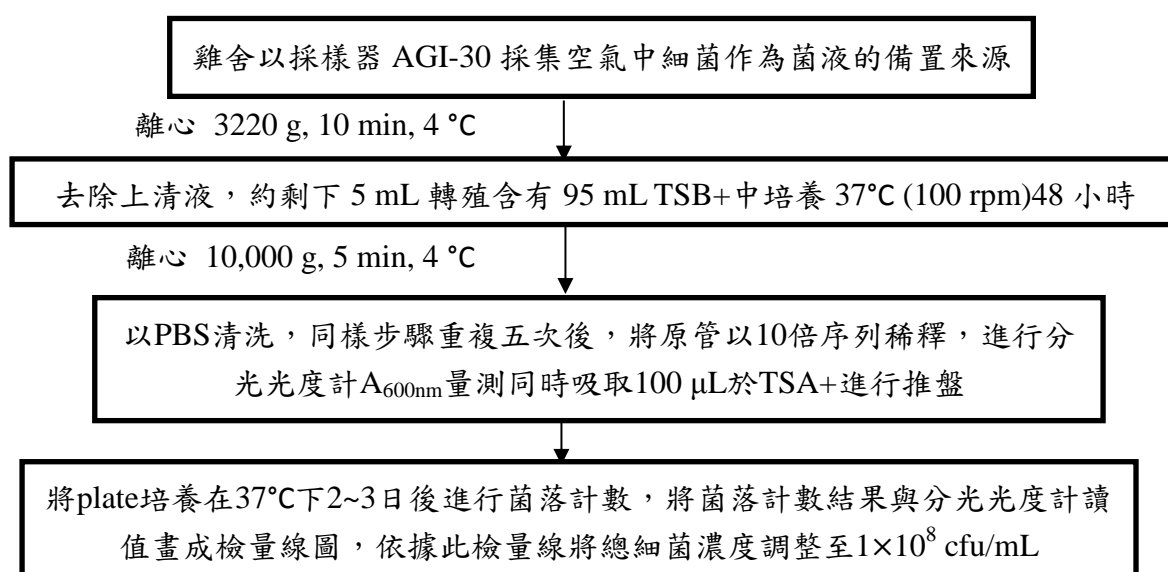


圖 7、培養測試之細菌群與檢量線建立之實驗流程圖

## 5.4 加熱處理及核酸染劑配製

### 5.4.1 以加熱法產生細胞膜受損之細菌

本研究以加熱法產生一群細胞膜受損之細菌（死菌）。首先將總細菌濃度調至約  $1 \times 10^8$  cfu/mL(詳如 5.3 節)，取 20 mL 菌液於 50 mL 離心管中，經 Vortex-Genie 震盪器(Scientific Industries, NY, USA)震盪 15 秒均勻後，置入 90°C 水浴槽 (FIRSTEK, Taipei, Taiwan)中受熱 20 分鐘。自水浴槽取出離心管並等其溫度降至室溫後，以 Pour plating 方式將 0.5 mL 菌液轉至 TSA+中，進行共二重覆，並於 37°C 培養箱中培養 48 小時，以確認受熱細菌是否已失去可培養性。本測試進行二重覆實驗。

### 5.4.2 核酸染劑配製

本研究係使用 EMA (3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl bromide) (Sigma-Aldrich, Taipei, Taiwan)與 PMA (3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl dichloride) (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) 兩種核酸染劑進行測試。冷凍乾燥型態的 5 mg EMA 以 1 mL 之去離子無菌水回溶(Nocker and Camper, 2006)，冷凍乾燥型態的 1 mg PMA 則以 1 mL 之 20% dimethyl sulfoxide (DMSO)回溶(Nocker et al., 2009)，並分別以 500  $\mu$ g/mL 的濃度保存於-20°C。為測試兩種染劑的最佳濃度，首先以無菌水稀釋 EMA，另以 20% DMSO 稀釋 PMA，使其最終濃度分別為 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.3, 11.5, 23 與 46  $\mu$ g/mL。

## 5.5 以核酸染劑處理活性及非活性細菌

### 5.5.1 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌之差異

本實驗將總細菌濃度調至約  $1 \times 10^8$  cfu/mL (詳如 5.3 節)，進行核酸染劑搭配顯微鏡之實驗。首先將受熱後的菌液加入濃度為  $250 \mu\text{g/mL}$  之  $50 \mu\text{L}$  核酸染劑，使其染劑最終濃度為  $23 \mu\text{g/mL}$ 。經過震盪器震盪均勻後，各樣本於室溫下暗反應 5 分鐘，反應後再將各樣本放置於碎冰上並距離 500W HALOLINE® ECO 鹵素燈管(OSRAM, Munchen, Germany) 15 公分處，照射 20 分鐘。從樣本中取  $50 \mu\text{L}$  菌液於載玻片上，蓋上蓋玻片後，在 1000 X 下以螢光顯微鏡(Lieca DM 2500, Houston, U.S.A)觀察。若細菌呈現紅色，表示 EMA 及 PMA 進入細胞內與 DNA 結合。另亦準備未加熱之細菌作為對照組，同步進行相同的實驗。此測試之研究設計流程如下圖：

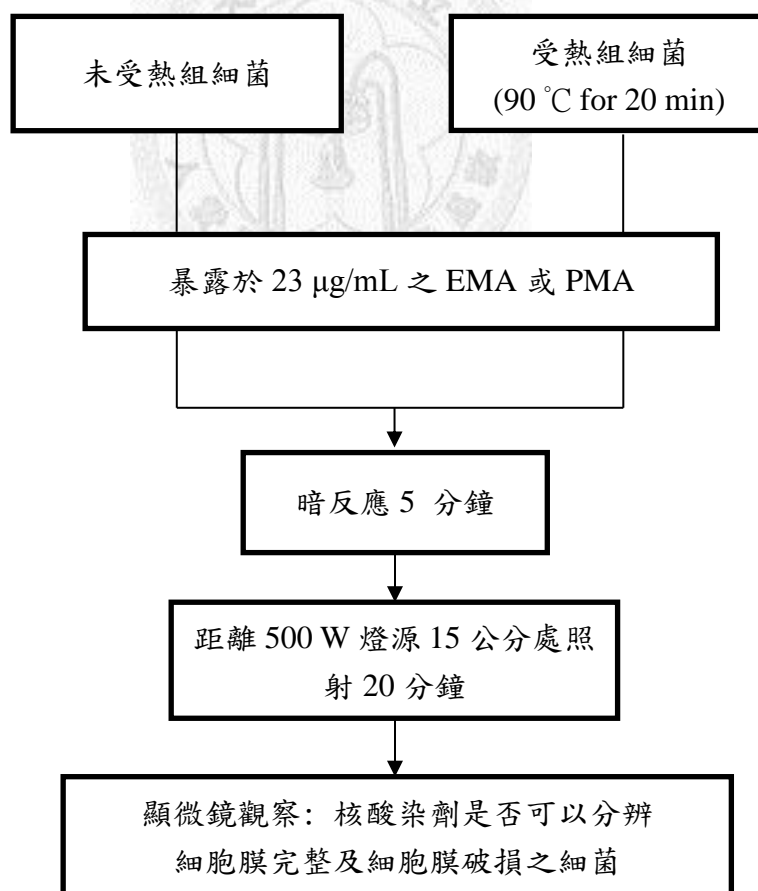


圖 8、確認核酸染劑是否可分辨細菌活性之實驗流程

### 5.5.2 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與條件

為了評估不同核酸染劑搭配 qPCR 之分析方法是否適用於定量空氣樣本中之活性總細菌，並找尋最佳核酸染劑之處理條件，本研究將  $1 \times 10^8$  cfu/mL 之未受熱之總細菌，分別加入濃度為 1、1.5、2、2.3、11.5、23 及 46  $\mu\text{g/mL}$  之 EMA/PMA，進行避光 5 分鐘反應，並置於碎冰上於距離 500 W 燈源 15 公分處照射 20 分鐘；並以無核酸染劑處理之樣本為其對照組。另一方面，準備  $1 \times 10^8$  cfu/mL 且於  $90^\circ\text{C}$  受熱 20 分鐘之總細菌，亦分別加入濃度為 0.2、0.5、1.5、2、2.3 及 11.5  $\mu\text{g/mL}$  之 EMA/PMA，進行避光 5 分鐘反應，並置於碎冰上於距離 500 W 燈源 15 公分處照射 20 分鐘；同樣也以無核酸染劑處理之樣本為其對照組。上述樣本隨即進行 DNA 萃取，並以 qPCR 分析樣本中之 DNA 量。相關實驗設計流程如下圖：

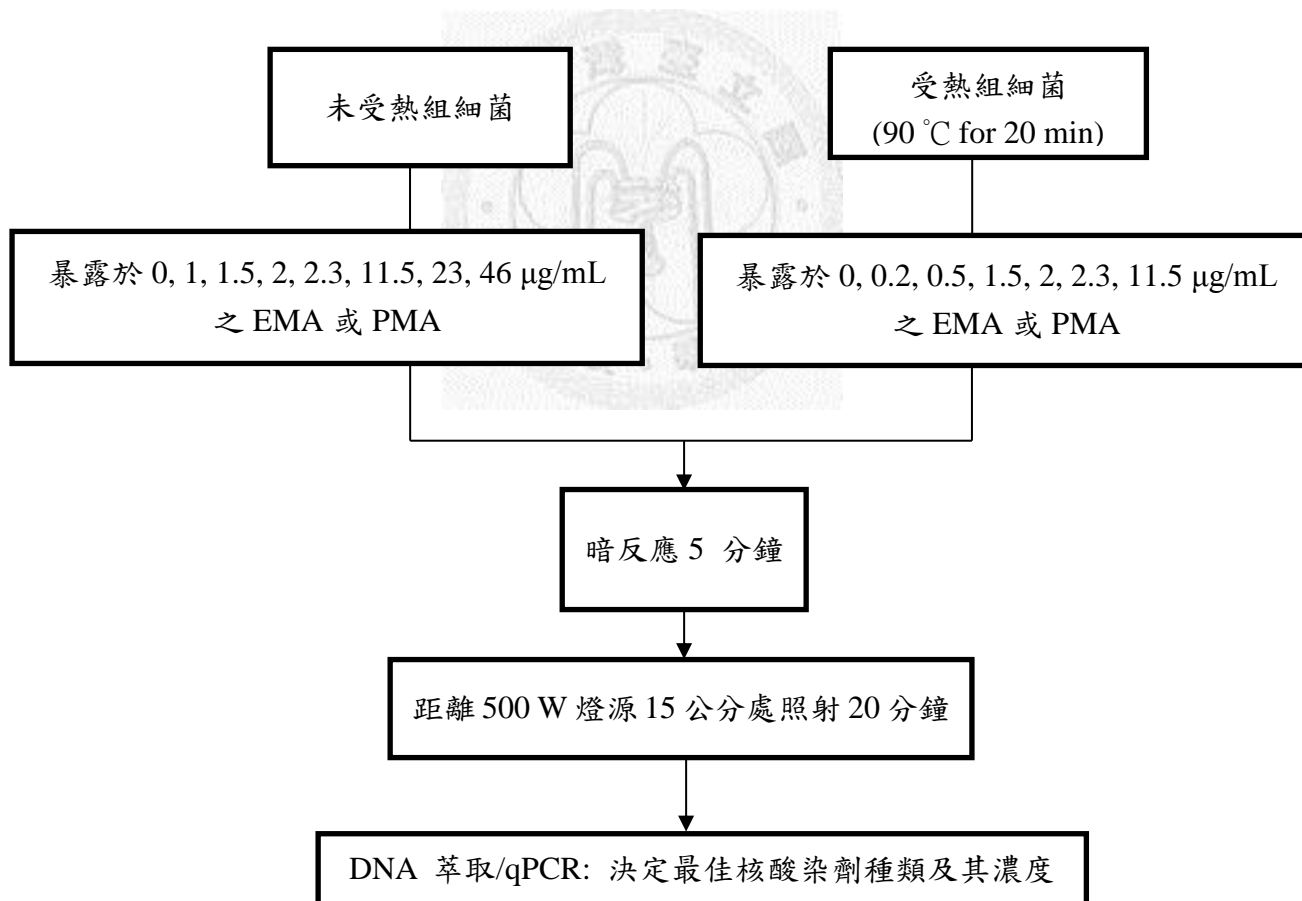


圖 9、尋找不同核酸染劑搭配 qPCR 之最佳處理條件

### 5.5.3 qPCR 搭配 EMA/PMA 定量活性細菌之上下限值與線性關係

為了評估最佳核酸染劑之處理條件，是否適用於定量不同濃度之活性細菌，並確定其偵測之上、下限值，本研究備置濃度約  $1 \times 10^{10}$  cfu/mL 之未受熱組細菌，進行 10 倍序列稀釋，作為控制組；同時亦準備  $1 \times 10^8$  cfu/mL 之受熱細菌濃度，並將其加入經序列稀釋的各未受熱組細菌中，控制每個樣本中之受熱細菌濃度均維持在  $1 \times 10^8$  cfu/mL，但未受熱細菌濃度則介於  $1 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL，用以觀察是否會因為加入高濃度之受熱細菌而影響不同濃度活性細菌之定量，並從中界定符合線性關係的活性細菌濃度範圍。此外亦分析未添加受熱細菌之控制組，以確認不含受熱細菌時的活性細菌定量線性範圍。實驗設計流程如下圖：

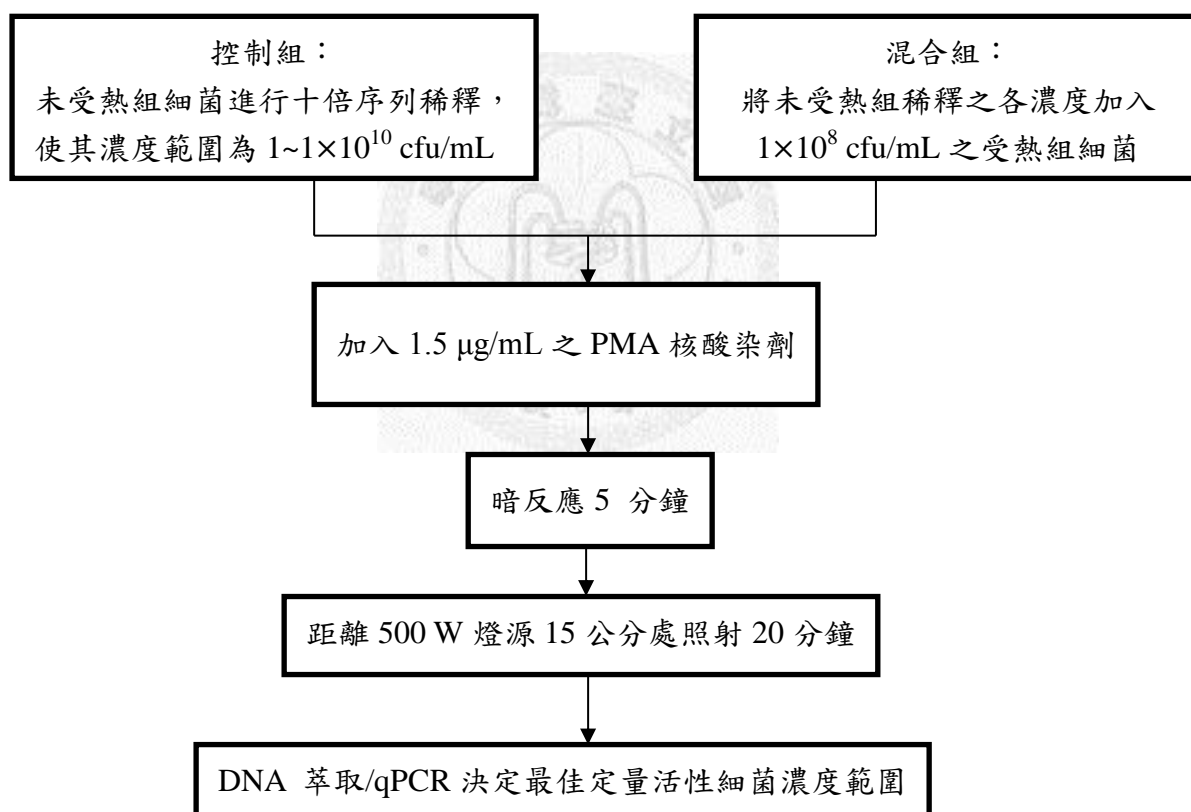


圖 10、最佳核酸染劑處理條件下定量活性菌之上、下限值與線性關係之流程圖

#### 5.5.4 DNA 萃取

受熱與未受熱之細菌在與核酸染劑作用後，隨即進行 DNA 萃取。將樣本先以 20,000 g 離心 5 分鐘兩次後，依循 QIAamp DNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 中萃取細胞的標準流程進行 DNA 萃取。

#### 5.5.5 DNA 萃取回收率

為評估本研究所使用之萃取試劑(QIAamp DNA mini Kit)對於總細菌 DNA 之萃取效率，所以以 *E. coli* (ATCC 25922) 進行實驗，實驗方法係使用劃盤法將第一代 *E. coli* 以接種環培養於 TSA，放置於 37°C 培養箱培養 1 日後，將培養第二代之 *E. coli* 之菌落懸浮於 10 mL 之 PBS 中，並使用分光光度計將其濃度調整為  $1 \times 10^8$  cfu/mL，後續以 QIAamp DNA mini Kit 進行 DNA 萃取後以 qPCR 定量，帶入標準品檢量線計算其 DNA 濃度(copies/uL)後，將所得之濃度除以 7 (7 copies=1 cell) (Farely et al., 1995; Klappenbach et al., 2001) 以得到 *E. coli* 細菌數；而另外以 Baclight 顯微鏡計數作為本實驗回收率之標準值(如圖 11)。其中 Baclight 分析步驟如圖 12。將菌液進行螢光顯微鏡搭配 LIVE/ DEAD Baclight™ Bacterial Viability Kits (Molecular probes, Eugene, Or, USA) Baclight 染劑計數，Baclight 染劑中由 SYTO9 以綠色螢光激發活性細菌(live cells)，PI 以紅色螢光區分死亡細菌(dead cells)。樣本取 1 ml 菌液加入含有 3  $\mu$ L Baclight 染劑(1.5  $\mu$ L 之 SYTO9 及 1.5  $\mu$ L 之 PI)，震盪 5 秒使其混和均勻，並將樣本於室溫下避光 15 分鐘，隨後菌液樣本過濾於 0.2  $\mu$ L polycarbonate filter (Millipore Co.) 上，過濾後之濾紙以螢光顯微鏡下 (Leica Microsystems GmbH., Wetzlar, Germany) 視野下進行計數，每個樣本其計數細菌數範圍為 400~1000 cells。而螢光顏色為橘或紅色者為死亡細菌，螢光為綠色者則為活性細菌，總細菌數則將活性及死亡係菌進行加總，其顯微鏡計數後細菌濃度計算及 Baclight 實驗流程圖如圖 12。

回收率計算方式係以 Baclight 之計數平均結果作為標準值，將 qPCR 定量之

結果除上 Baclight 計數值，以得到 DNA 萃取試劑之回收率（亦即 recovery rate  
(%)= [ qPCR (cells/mL)/Baclight(cells/mL) ] ×100。實驗流程圖如下。

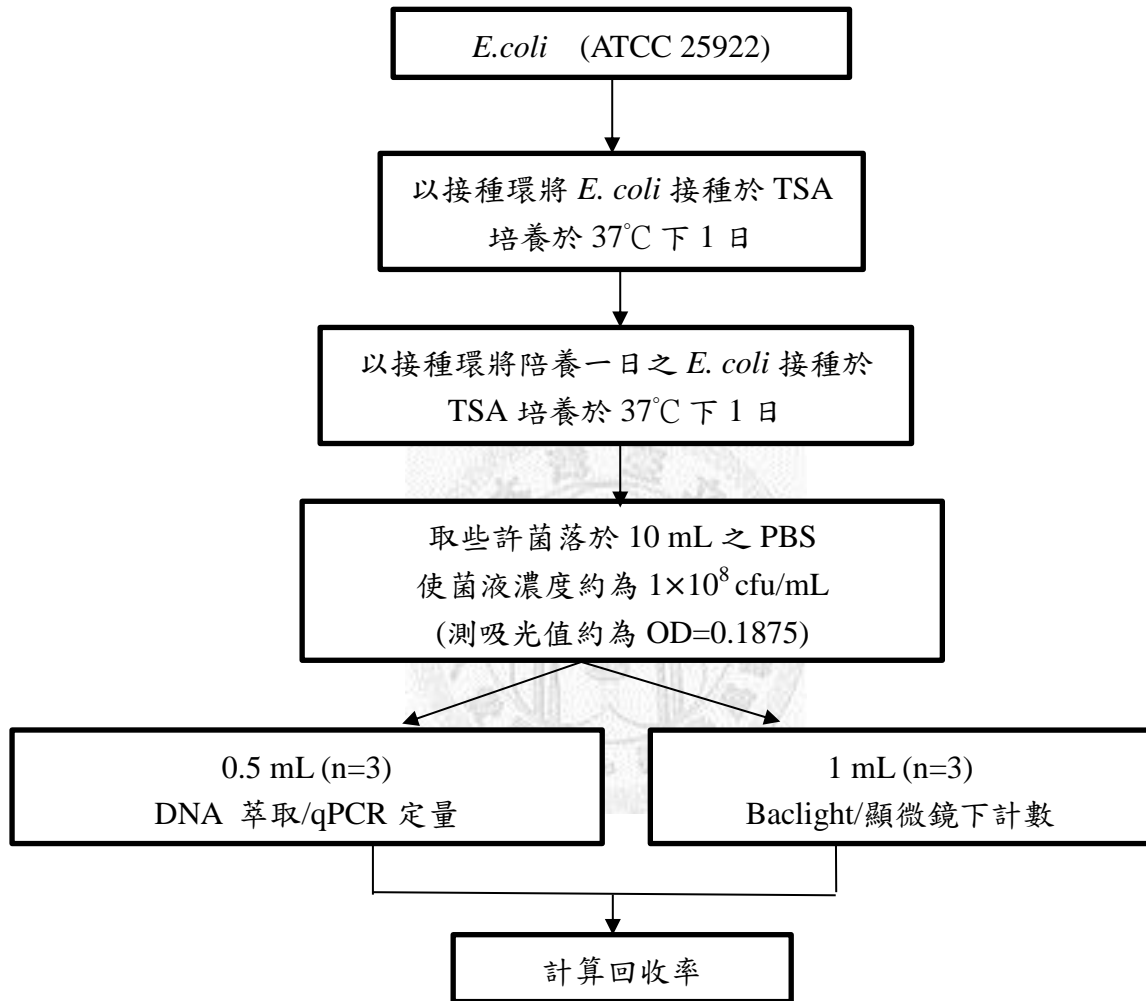


圖 11、DNA 萃取試劑回收率之流程圖



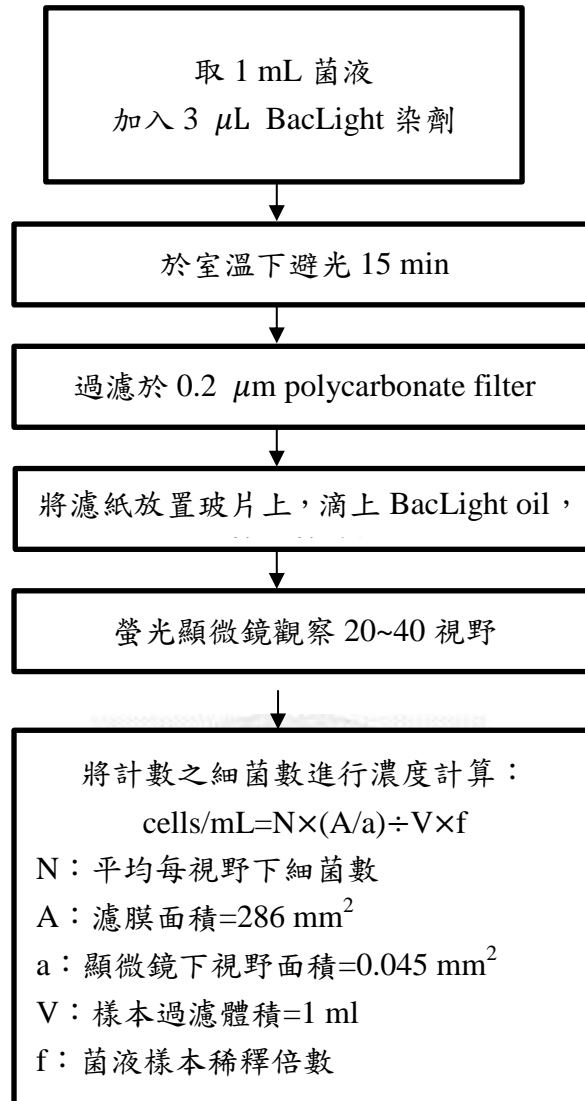


圖 12、Baclight 分析流程圖

## 5.6 備製細菌DNA標準品及檢量線

在製備標準品時，以接種環取標準菌株 *E. coli* (ATCC 25922) 劃於TSA上後，以37°C培養箱培養1日，將菌落取下進行DNA萃取，萃取之DNA經由real-time qPCR放大後，將其產物委外製作已知DNA濃度的標準品。

為備製檢量線，將委外合成之細菌DNA標準品以TE緩衝溶液進行0.5 ng/ $\mu$ L至 0.05 fg/ $\mu$ L 序列稀釋，濃度經過對數處理作為檢量線之X軸。而當DNA濃度越高，其螢光值越早達到偵測之閾值(Threshold)，螢光值達到Threshlod時，當下所進行之循環數(cycle)，即為Ct值。各濃度下之DNA標準品進行即時定量聚合酶連鎖反應之分析，所得Ct值則為檢量線之Y軸，依此建立DNA檢量線。

### 5.6.1 qPCR分析與總細菌定量

本研究在 Roche LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 進行總細菌之 qPCR。定量總細菌之引子為 Greisen *et al.* (1994) 所使用的 DG74 (forward primer) (AGGAGGTGATCCAACCGCA)、RW01 (reverse primer) (AACTGGAGGAAGGTGGGGAT)。real-time qPCR 定量總細菌之反應總體積為 20  $\mu$ l，包括 5  $\mu$ l 樣本 DNA 或標準品 DNA 作為模板、10  $\mu$ l SYBR® Green Supermix(cat. no. 170-8882, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)、0.6  $\mu$ l forward primer (5'- AGGAGGTGATCCAACCGCA -3')、0.6  $\mu$ l reverse primer (5'- AACTGGAGGAAGGTGGGGAT -3') (伯森生物科技股份有限公司)及 3.8  $\mu$ l 無菌水，另外，每次 qPCR 分析時均含有一不含 DNA 模板(以加入去離子無菌水取代之)之 PCR 控制組(no template control, NTC)。待樣本加入 96 孔盤後，封上封膜並在 4°C 以 1500 x g 離心 2 分鐘，於 LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 內進行 qPCR 分析。

參考 Lee and Levin (2007) 並配合 Roche 升溫設定，本研究的 qPCR 升溫條件為先經 95°C 預熱 10 分鐘 (由常溫升溫至 95°C 速度：每秒 4.4°C)，再以 95°C

反應 25 秒、60°C 反應 25 秒 (95°C 降溫至 60°C 速度：每秒 1.1°C) 及 72°C 反應 1 分鐘 (升溫速度：每秒 2.2°C) 方式，重覆 50 次循環，螢光值會在 60°C 反應 1 分鐘末時由系統自動收取；最後在 40°C 反應 15 秒 (60°C 降溫至 40°C 速度：每秒 1°C)。

為定量樣本 DNA，每次 PCR 分析時皆同時分析已知濃度的標準品以建立 DNA 檢量線，並以檢量線斜率 (slope) 計算該次實驗之 qPCR 放大效率 ( $E=10^{(-1/\text{slope})}$ )。另將樣本所得之 Ct 值對照檢量線後，可將 Ct 值換算成樣本 DNA 濃度。

本研究將六次配置相同標準品濃度下所得之各點 Ct 值進行平均與以之的相對應 log DNA copies numbers 製作標準檢量線並計算  $R^2$ ，其放大效率可利用平均所得之檢量線結果配合  $\text{Efficiency}=10^{(-1/\text{slope})}$  進行推算，研究中期平均後放大效率為 1.894， $R^2$  為 0.9994。

## 5.7 環境檢量線建立

本研究使用 16s rRNA 之引子定量總細菌，由於考慮到每種細菌的 copy number 不同，無法直接將樣本 copies 數換成細菌數，因此建立一條由四種環境(醫療院所、木材行、畜牧業、家禽業) 所採集的樣本，經過培養後，將總細菌之濃度調整約為  $1 \times 10^8$  cfu/mL 並經過序列稀釋，使得細菌濃度介於  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL，藉此進行 qPCR 分析以及 Baclight 計數(如圖 12)。將兩者之關係建立一條檢量線，藉此檢量線以進行細菌數的換算。實驗流程如圖 13。

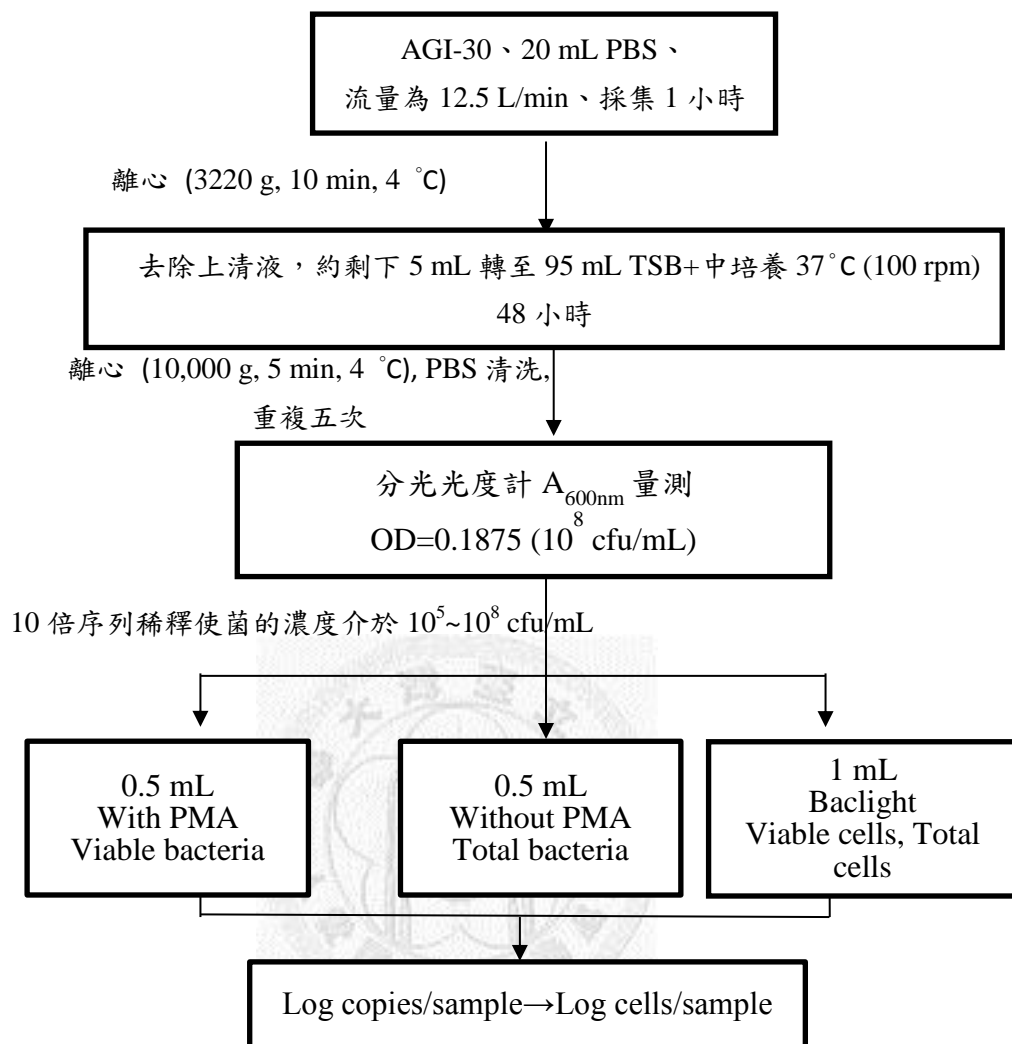


圖 13、環境檢量線實驗流程圖

## 5.8 環境驗證

本研究將實驗室建立之核酸染劑結合 qPCR 之分析方法，於實際職業場所進行該方法之驗證，並進而瞭解該職業場所空氣中活性細菌之暴露狀況。取得部分職業場所同意，於畜牧業、家禽業、木材行、水稻田、蔬菜田及醫療院所進行採樣。

### 5.8.1 採樣器材

在選定的採樣地點將採樣器 AGI-30 置於距離地面高度約 1.2 公尺，且採樣器內裝有 20 mL 之 PBS，進行 1 小時空氣採樣，並於每 15 分鐘進行 PBS 液體補充(流程圖如圖 14)。現場採樣現況如圖 15 (A)~(H)。

### 5.8.2 樣本運送

將採集之液體以 50 mL 離心管盛裝並以 parafilm 封住接縫後，置於碎冰上帶回實驗室進行後續分析。

### 5.8.3 樣本分析

空氣採樣之收集液以 8200 g 離心 10 分鐘後，取出上清液使剩下液體體積約為 2 mL，其中 1 mL 進行培養法分析，另 1 mL 進行 qPCR 分析。後者中之 0.5 mL 以 PMA 處理並進行 DNA 萃取與 qPCR 以定量活性細菌濃度，另外之 0.5 mL 則無 PMA 處理以定量總細菌濃度。

### 5.8.4 空氣中細菌濃度之計算

將 qPCR 分析得到環境樣本之 Ct 值帶入標準品檢量線(如 5.6 節)，並 anti-log 處理，以得到環境樣本之 DNA 濃度(copies/uL)。由於本研究 DNA 萃取最後沖提體積為 100 uL，因此將 DNA 濃度(copies/uL)乘上沖提體積(100 uL)以得到 copies/qPCR sample。另因樣本在 DNA 萃取前之體積為 0.5 mL，且在樣本前處理時將 2 mL 取一半體積進行 qPCR 分析(如圖 14)，故經體積校正後得到 copies/environmental sample。將其取對數後，帶入環境檢量線(詳如 5.7 節)以得到

log cells/sample。再經 anti-log 並校正採樣體積校正後，得到該採樣環境空氣中總與活性細菌濃度(cells/m<sup>3</sup>)。

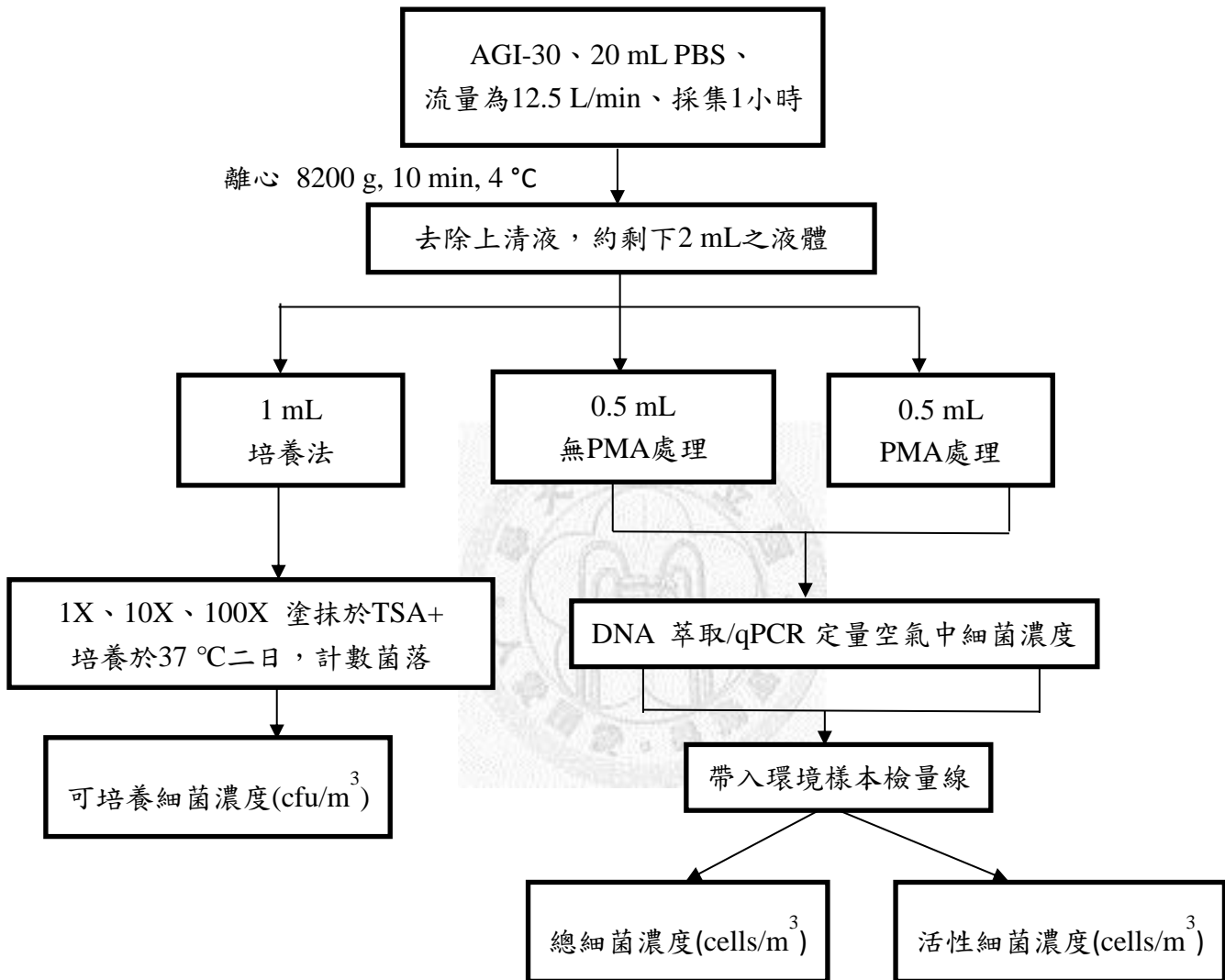


圖 14、以最佳分析條件定量職場空氣中細菌濃度之流程圖



圖 15 、環境現場採樣狀況圖示 (A)雞舍 (B)牛舍 (C)豬舍 (D)羊舍 (E)醫療院所 (F)木材行 (G)水稻田 (H)蔬菜田

## 5.9 資料分析及統計分析

以Microsoft office excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) 進行資料建檔，並求得DNA濃度平均值 (mean)、標準差 (SD)、變異係數 (CV) 及完成檢量線繪圖，同時求取檢量線公式與 $R^2$ 值。由於數據不符合常態分布且樣本數較少，故以無母數分析進行檢定。本研究以Kruskal-Wallis test與Scheffe' test事後檢定有無核酸染劑處理及各式染劑處理下DNA量之差異，也以此方法檢定四個採樣地點在建構環境檢量線時所得測量數據是否有統計差異。除此之外，另以Spearman rank correlation檢定不同活性細菌濃度範圍與其DNA量之關係。最後對六種環境場所空氣濃度，以Wilcoxon signed-rank比較不同分析方法之間所得細菌濃度是否達顯著差異。所有統計係以SAS 9.1版進行分析，顯著標準設定為 $P < 0.05$ 。





## 第六章 結果

### 6.1 選定最佳定量總細菌之引子：

如表 10 所示，目前用於定量總細菌之引子序列分為四組，其中三組曾以不同細菌或真菌進行引子專一性測試。另考慮引子需僅具有細菌之專一性，故本研究將此四組序列以 NCBI-BLAST 進行細菌、真菌及古細菌之專一性測試，其結果整理如表 11。

Bach et al. (2002)的引子共測試了 24 種細菌與 5 種真菌(表 10)，發現其引子可偵測到 24 種細菌，但不會偵測到 5 種真菌，顯示此組引子對於細菌具有專一性；然本研究將此引子序列於 BLAST 進行專一性測試，結果顯示其引子會與真菌 *Rhizopus oryzae* 及 *Morchella esculenta* 做結合(表 11)，進一步比對其 DNA 序列，發現兩株真菌與相對應引子之鹼基對完全一致，顯示若將此組引子用於定量細菌，可能同時會偵測到上述兩株真菌而影響定量細菌之正確性，故非屬最佳引子對。另 BLAST 結果顯示，Bartosch et al. (2004)所設計的引子不會偵測到真菌及古生細菌(表 11)，雖然如此，由於缺乏實驗室細菌專一性之評估(表 10)，故此組引子亦不納入考慮。而 Nadkarni et al. (2002)雖然測試了 49 種細菌，且其結果顯示此組引子可偵測到所測試的 49 種細菌，但 BLAST 結果顯示該引子會與真菌 *Hymenopellis incognita*、*Penicillium chrysogenum* 及 *Rhizopus oryzae* 完全黏合，因此亦未具細菌專一性。至於 Greisen et al. (1994)則曾針對 110 種細菌進行實驗室引子測試，顯示對所測試之細菌具專一性(表 10)，雖然在 BLAST 之結果顯示其會與 *Methanococcoides burtonii* 古細菌結合，但進一步比對其 DNA 序列，發現此株古細菌與相對應引子之鹼基對，其引子對(forward and reverse primers)都各有一個鹼基對與此株古細菌不一樣，因此此組引子恐無法與此株古細菌做有效的黏合，進而於 qPCR 被放大偵測。

綜合上述結果，由於 Greisen et al. (1994)此組引子曾經過 110 種細菌的測試，且對於所測試之細菌具有專一性，雖然 BLAST 結果顯示會與 *Methanococcoides burtonii* 古細菌結合，但進一步比對序列顯示此株古細菌與相對應引子之鹼基對，都各有一個的鹼基對不一致可能無法有效於 qPCR 被放大偵測，而為能排除此引子對夾取此株古生細菌之可能性，因此進一步以古生細菌(*M. burtonii*)作為關鍵

字在 Web of Science 資料庫查詢 *M. burtonii* 可能存在之環境地點。結果顯示僅有兩篇文獻曾在環境中偵測到 *M. burtonii*；曾在 1992 年被 Franzmann 等人在南極洲之 1-2°C 之湖水(Ace Lake)水樣分離出(Franzmann et al., 1992)；也曾於 1999 年 Li 等人在日本之 6400 公尺深海沉積物中分離出此株古細菌(Li et al., 1999)；此結果顯示 *M. burtonii* 生長於極端環境之可能性較高，然截至目前為止尚未在寒冷之湖水或海洋以外之環境中發現此株古細菌，因此推測一般環境空氣中，此株古細菌存在之機會不高。故本研究以 Greisen (1994)之引子為最佳之總細菌之偵測引子對。



表 10、定量總細菌之引子序列

Universal primers	實驗室專一性測試 菌種數量	引子專一性測 試結果	引子應用之環境/ 臨床樣本	定性/定量	參考文獻
GGTAGTCYAYGCMSTAAACG GACARCCATGCASCACCTG	細菌：24 真菌：5	+	Soil	定量	Bach et al., 2002
TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTATCCTGTT	NA*	NA	Fecal	定量	Bartosch et al., 2004
AGGAGGTGATCCAACCGCA AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	細菌：110	+	Cerebrospinal Fluid	定性	Greisen et al., 1994
TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	細菌：49	+	臨床樣本-牙齒	定量	Nadkarni et al., 2002

\*: Not available (未進行專一性實驗測試)

表 11、定量總細菌之引子於 BLAST 測試結果

Fungi/Archaea	Non-bacteria species detected	Species detected by	Number of non-bacteria species	參考文獻
Fungi	<i>Rhizopus oryzae</i>	both primers	2	Bach et al., 2002
	<i>Morchella esculenta</i> small subunit ribosomal RNA gene.	both primers		
Archaea	ND*	NA**	ND	
Fungi	ND	NA	ND	Bartosch et al., 2004
Archaea	ND	NA	ND	
Fungi	ND	NA	ND	Greisen et al., 1994
Archaea	<i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242, complete genome	此株古細菌與相對應引子之鹼基對都各有一個鹼基對與此組引子不同	1	
Fungi	<i>Hymenopellis incognita</i> 16S ribosomal RNA gene	both primers	3	Nadkarni et al., 2002
	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 complete genome	both primers		
	<i>Rhizopus oryzae</i>	both primers		
Archaea	ND	NA	ND	

\*: Not detected

\*\* : Not available

## 6.2 real-time qPCR 條件測試：

由於Greisen et al. (1994)係於傳統PCR上測試並開發總細菌之偵測引子，後續Lee and Levin (2007)則將此引子應用於qPCR，然其所使用的PCR儀器為DNA Engine Opticon® 2 system (MJ Research Corp., Waltham, MA, USA)，與本研究所使用之儀器Roche LightCycler® 480不同。考量qPCR最佳升溫條件、反應試劑與引子濃度以及最適之DNA template量，可能因使用之儀器廠牌不同而有所不同，故以選定的引子對(Greisen et al., 1994)搭配不同升溫條件進行測試，並依據其在Roche LightCycler® 480之放大效率及放大曲線，作為定量活性細菌之最佳升溫條件。

本研究係將 0.5 ng/μL 至 0.5 fg/μL 之 *E. coli* 標準品作為測試 qPCR 條件之 DNA template。測試條件包括兩組反應試劑引子濃度(5 及 10 μM)與兩組 DNA template 體積(2 及 5 μL)(表 12)，以及三組 qPCR 升溫條件(測試 A: Annealing 溫度 60°C、Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 2.2°C/s 與 4.4°C/s、測試 B: Annealing 溫度 60°C、Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1°C/s 與 2.2°C/s 及測試 C: Annealing 溫度 62°C、Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 2.2°C/s 與 4.4°C/s)(詳如表 13)，而其 qPCR 放大效率結果詳如表 14。

本測試主要目的係找出最佳 qPCR 條件，由於測試 I 及測試 II 係找出適當 qPCR 條件，進行比較多次的實驗，因此測試 I 及測試 II 之實驗樣本數與測試 III 到測試 VII 之樣本數不同。

表 12、反應試劑引子濃度與 DNA template 體積

Reagents	測試 A	測試 B	測試 C	測試 D
	Volume/sample ( $\mu\text{L}$ )	Volume/sample ( $\mu\text{L}$ )	Volume/sample ( $\mu\text{L}$ )	Volume/sample ( $\mu\text{L}$ )
SYBR® Green Supermix	10	10	10	10
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.6	0.6	NA*	NA
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.6	0.6	NA	NA
Forward primer (5 $\mu\text{M}$ )	NA	NA	0.6	0.6
Reverse primer (5 $\mu\text{M}$ )	NA	NA	0.6	0.6
DNA template	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
dd water	6.8	3.8	6.8	3.8
Total volume	20	20	20	20

\*: Not applicable

表 13、qPCR 升溫條件測試

Program	測試 A	測試 B	測試 C
Pre-incubation			
Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )& time	95, 10 min	95, 10 min	95, 10 min
Denaturation			
Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )& time	95, 25 sec	95, 25 sec	95, 25 sec
Annealing			
Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )& time	<b>60, 25 sec</b>	<b>60, 25 sec</b>	<b>62, 25 sec</b>
Speed ( $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ )	<b>2.2</b>	<b>1.1</b>	<b>2.2</b>
Elongation			
Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )& time	72, 1 min	72, 1 min	72, 1 min
Speed ( $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ )	<b>4.4</b>	<b>2.2</b>	<b>4.4</b>
Number of cycles	50	50	50
Cooling			
Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )& time	40, 15 sec	40, 15 sec	40, 15 sec
Speed ( $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ )	1	1	1

表 14、qPCR 放大效率測試結果

條件	測試內容						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Primer concentration	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M
DNA volume	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Annealing temperature at 60°C	✓	✓			✓	✓	✓
Annealing temperature at 62°C			✓	✓			
升溫速度 (°C/s) Annealing : 2.2 Elongation : 4.4	✓	✓	✓	✓	✓		
升溫速度 (°C/s) Annealing : 1.1 Elongation : 2.2						✓	✓
PCR 放大效率	1.799~1.8	1.842~2.057	1.752	1.768	1.897	1.887	2.103
樣本數	2	4	1	1	1	1	1

表 14 顯示，當引子濃度為 5  $\mu\text{M}$  且 DNA 體積為 2  $\mu\text{L}$ ，並以 Annealing 溫度為 60 $^{\circ}\text{C}$  且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 2.2 與 4.4  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  進行測試，其放大效率介於 1.799~1.8 (測試 I，表 14)；將引子濃度增加至 10  $\mu\text{M}$  而維持 DNA 體積(2  $\mu\text{L}$ )與升溫條件不變(Annealing 為 60 $^{\circ}\text{C}$  且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 2.2 與 4.4 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )時，其放大效率介於 1.842~2.057 (測試 II，表 14)，較引子濃度為 5  $\mu\text{M}$  時為佳。而在相同 DNA 體積(2  $\mu\text{L}$ )與升溫條件下，若將 Annealing 溫度提升至 62 $^{\circ}\text{C}$ ，在引子濃度為 5 與 10  $\mu\text{M}$  時其放大效率各為 1.752 及 1.768 (測試 III 與 IV，表 14)，顯示放大效率並未因為升高 Annealing 溫度而提升。

此外，表 14 進一步顯示，若將 DNA 體積從 2  $\mu\text{L}$  提高至 5  $\mu\text{L}$ ，在引子濃度 10  $\mu\text{M}$ 、Annealing 溫度為 60 $^{\circ}\text{C}$  且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 2.2 與 4.4  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  下進行測試，顯示其放大效率為 1.897 (測試 V，表 14)；若降低 Annealing 與 Elongation 升溫速度至 1.1 及 2.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ，在相同 DNA 體積(5  $\mu\text{L}$ )與 Annealing 溫度(60 $^{\circ}\text{C}$ )下，對於引子濃度為 5  $\mu\text{M}$  與 10  $\mu\text{M}$  之 PCR 之放大效率各為 1.887 及 2.103 (測試 VI 與 VII，表 14)，顯示在引子濃度(10  $\mu\text{M}$ )、DNA 體積(5  $\mu\text{L}$ )與 Annealing 溫度(60 $^{\circ}\text{C}$ )時，降低升溫速度似有較佳的放大效率。由於不同組別實驗皆呈現良好 PCR 放大曲線圖及檢量線，因此僅以引子濃度為 10  $\mu\text{M}$ 、DNA 體積為 5  $\mu\text{L}$ 、Annealing 溫度為 60 $^{\circ}\text{C}$  而 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 及 2.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  之放大曲線圖及檢量線顯示之(圖 16 及圖 17)。



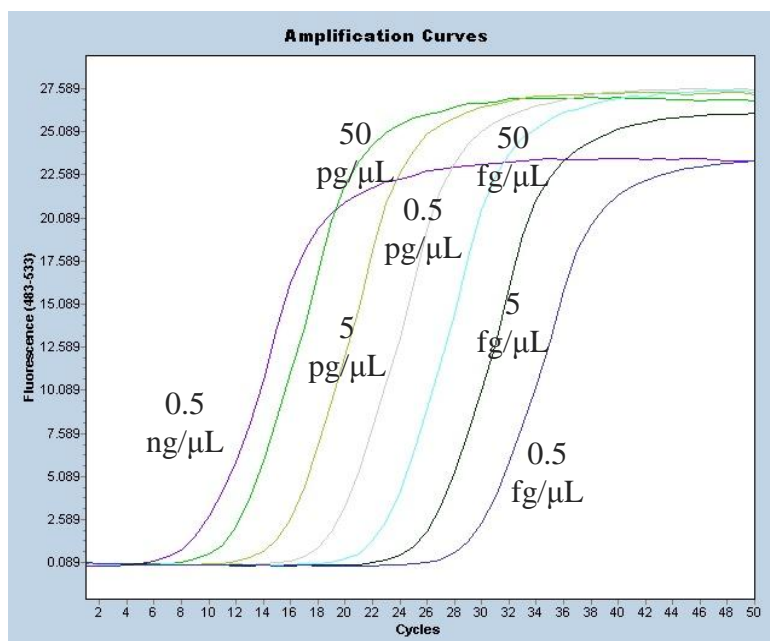


圖 16、於 10  $\mu\text{M}$  引子與 5  $\mu\text{L}$  DNA 體積下並以 60 $^{\circ}\text{C}$  為 Annealing 溫度且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 與 2.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  時之放大曲線圖

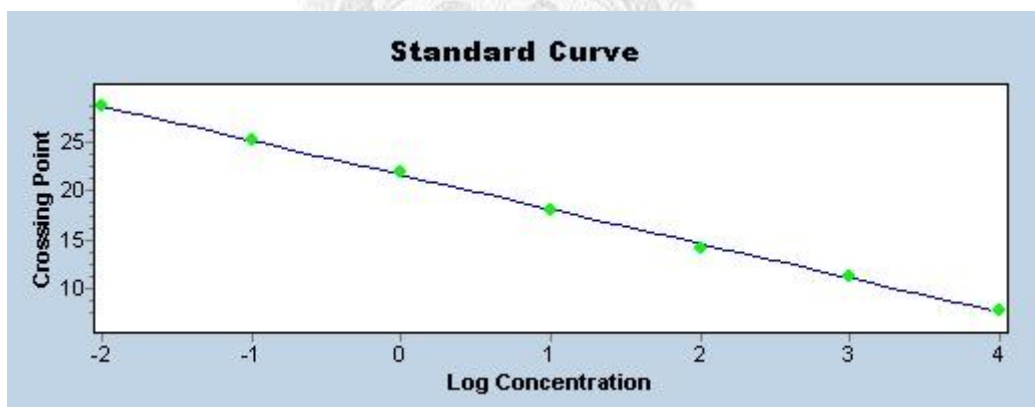


圖 17、於 10  $\mu\text{M}$  引子與 5  $\mu\text{L}$  DNA 體積下並以 60 $^{\circ}\text{C}$  為 Annealing 溫度且 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 與 2.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  時之檢量線 ( $R^2=0.9994$ )

綜合上述 PCR 放大效率、放大曲線圖及檢量線之結果，顯示在引子濃度為 10  $\mu\text{M}$ 、DNA 體積為 5  $\mu\text{L}$  且設定 Annealing 溫度為 60 $^{\circ}\text{C}$  而 Annealing 與 Elongation 升溫速度分別為 1.1 及 2.2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  時有最高之放大效率(表 14)與良好的放大曲線圖(圖 16)及檢量線( $R^2=0.9994$ 、圖 17)，因此以此作為定量活性細菌之最佳 qPCR 條件。

### 6.3 培養測試之細菌群及建立生長曲線與檢量線

為了找出最佳細菌生長條件並據此培養細菌以作為核酸染劑實驗菌液之來源，因此建立細菌群之生長曲線。生長曲線之實驗共進行三批次測試，結果顯示(圖 18)，培養於 48 小時時達到穩定生長前期，且 OD 數值也相對較穩定(CV=1.19%)，因此以培養二日之細菌群作為核酸染劑實驗菌液之來源。

核酸染劑實驗需要將細菌濃度調至  $1 \times 10^8$  cfu/mL，因此將培養二日之培養液進行  $A_{600}$  測定同時以塗抹法將菌液轉至 TSA+培養基上，於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中培養 48 小時後，計數菌落數並與  $A_{600}$  數值建立檢量線，本實驗共重複三次，將三次不同批次的結果合併後顯示(圖 19)，OD 值與細菌濃度呈現良好線性關係( $R^2=0.986$ )。因此依據此建立之檢量線，作為調整後續核酸染劑實驗之起始細菌濃度，使其為  $1 \times 10^8$  cfu/mL。

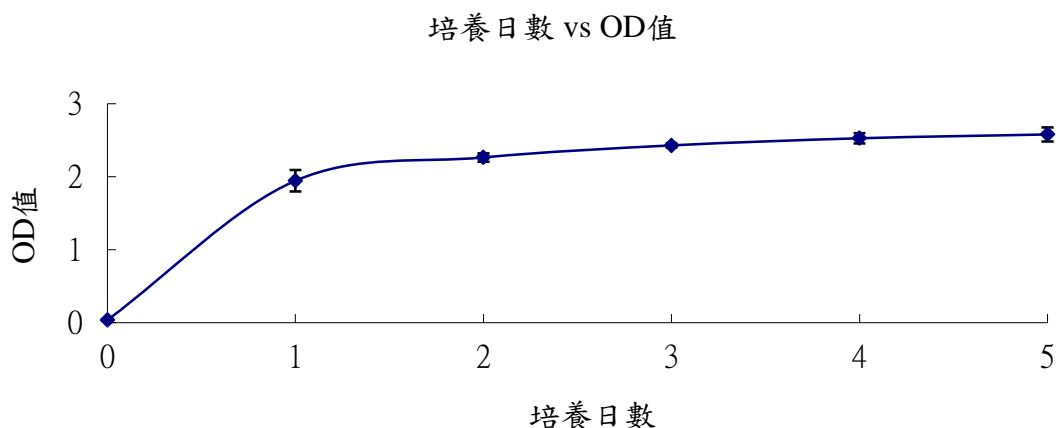


圖 18、培養細菌群之生長曲線(n=3)

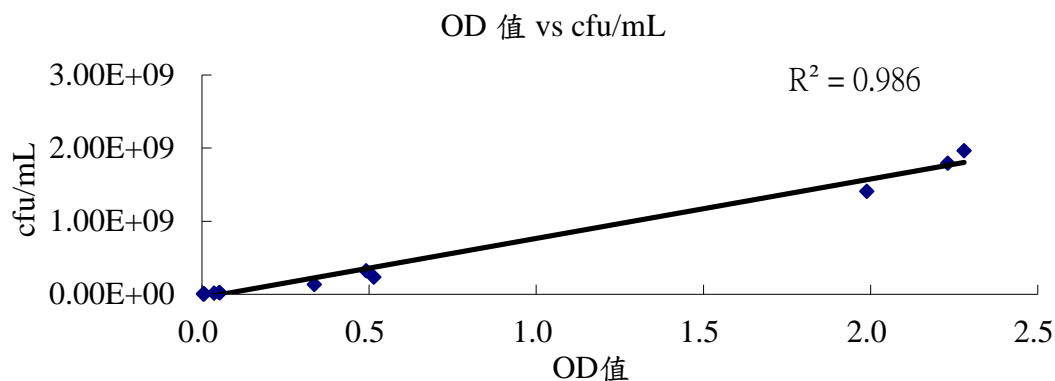


圖 19、OD 值與細菌濃度檢量線(n=3)

#### 6.4 DNA 萃取回收率

為了評估 DNA 萃取試劑對於總細菌之 DNA 萃取效率，本研究使用培養第二代之 *E. coli* (ATCC 25922) 以 QIAamp DNA mini Kit 進行 DNA 萃取及 qPCR 定量，另也以 Baclight 搭配顯微鏡計數當作計算回收率之標準值。結果顯示(圖 20)，以 Baclight 所得到的 *E. coli* 濃度為  $5.37 \times 10^8$  cells/mL ( $\pm 7.21 \times 10^7$ )；而 qPCR 所得之 *E. coli* 濃度為  $5.30 \times 10^8$  cells/ mL ( $\pm 5.23 \times 10^7$ )。因此以本實驗使用之萃取試劑(QIAamp DNA mini Kit)所得之 DNA 萃取試劑萃取平均回收率為 100.78% (SD = 23.73%)。

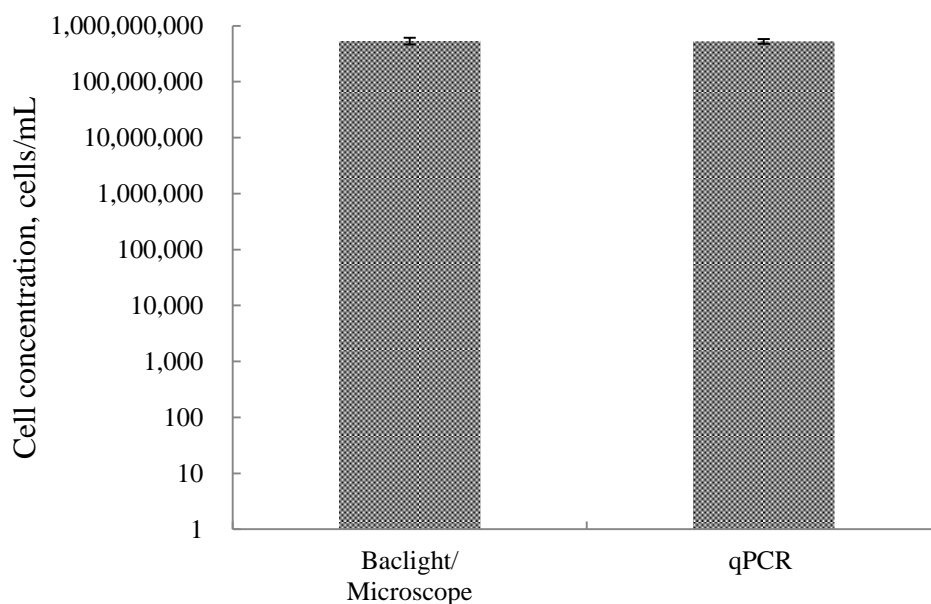


圖 20、DNA 萃取效率

## 6.5 加熱法產生細胞膜受損之細菌

本研究以置入 90°C 水浴槽中受熱 20 分鐘之方式，產生一群細胞膜受損之細菌。經將其置於 TSA+培養基上培養 48 小時後發現均無菌落形成，顯示以 90°C 水浴槽中受熱 20 分鐘，細菌確實失去可培養性。

## 6.6 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌

將未受熱與受熱的細菌，分別以 23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EMA 進行染色處理，在光學顯微鏡下觀察未受熱的細菌之密度為 41 cells/field(圖 21 A)，而螢光顯微鏡觀察同樣視野時，發現部分未受熱的細菌呈現紅色之密度為 38 cells/field(圖 21 B)，有 92%  $[(38/41)*100\%]$  之未受熱細菌被 EMA 染色，表示 EMA 會進入到之未受熱細菌的細胞膜內。至於受熱 (90°C, 20 min) 之細菌，同樣於光學顯微鏡觀察顯示未受熱的細菌密度為 17 cells/field (圖 21 C)，於螢光顯微鏡觀察同視野受熱的細菌呈現紅色之密度為 16 cells/field，有 94%  $[(16/17)*100\%]$  之受熱的細菌都呈現紅色(圖 21 D)，顯示受熱後的細菌之細胞膜應有明顯的破損致使 EMA 進入其內部。

同樣對未受熱與受熱的細菌，以 23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PMA 進行染色處理，並在光學顯微鏡及螢光顯微鏡下觀察樣本。在光學顯微鏡下未受熱的細菌之密度為 56 cells/field (圖 21 E)，以螢光顯微鏡觀察同樣視野時，發現未受熱細菌呈現紅色之密度為 0 cells/field(圖 21 F)，表示 PMA 較不會進入到未受熱之細菌內。至於 90°C 受熱 20 分鐘之細菌，同樣於光學顯微鏡下受熱細菌之密度為 32 cells/field(圖 21 G)，螢光顯微鏡觀察同視野發現，幾乎全部受熱的細菌都呈現紅色(31 cells/fields) (圖 21 H)，顯示有 96%  $[(31/32)*100\%]$  之受熱的細菌細胞膜應有明顯的破損並確實可使 PMA 進入其內部。

綜合上述顯微鏡結果顯示，EMA 或 PMA 皆可進入受熱細菌的細胞膜內，但 EMA 也會進入完整細胞膜內(圖 21 B)，而 PMA 較無此情況。

光學顯微鏡

螢光顯微鏡

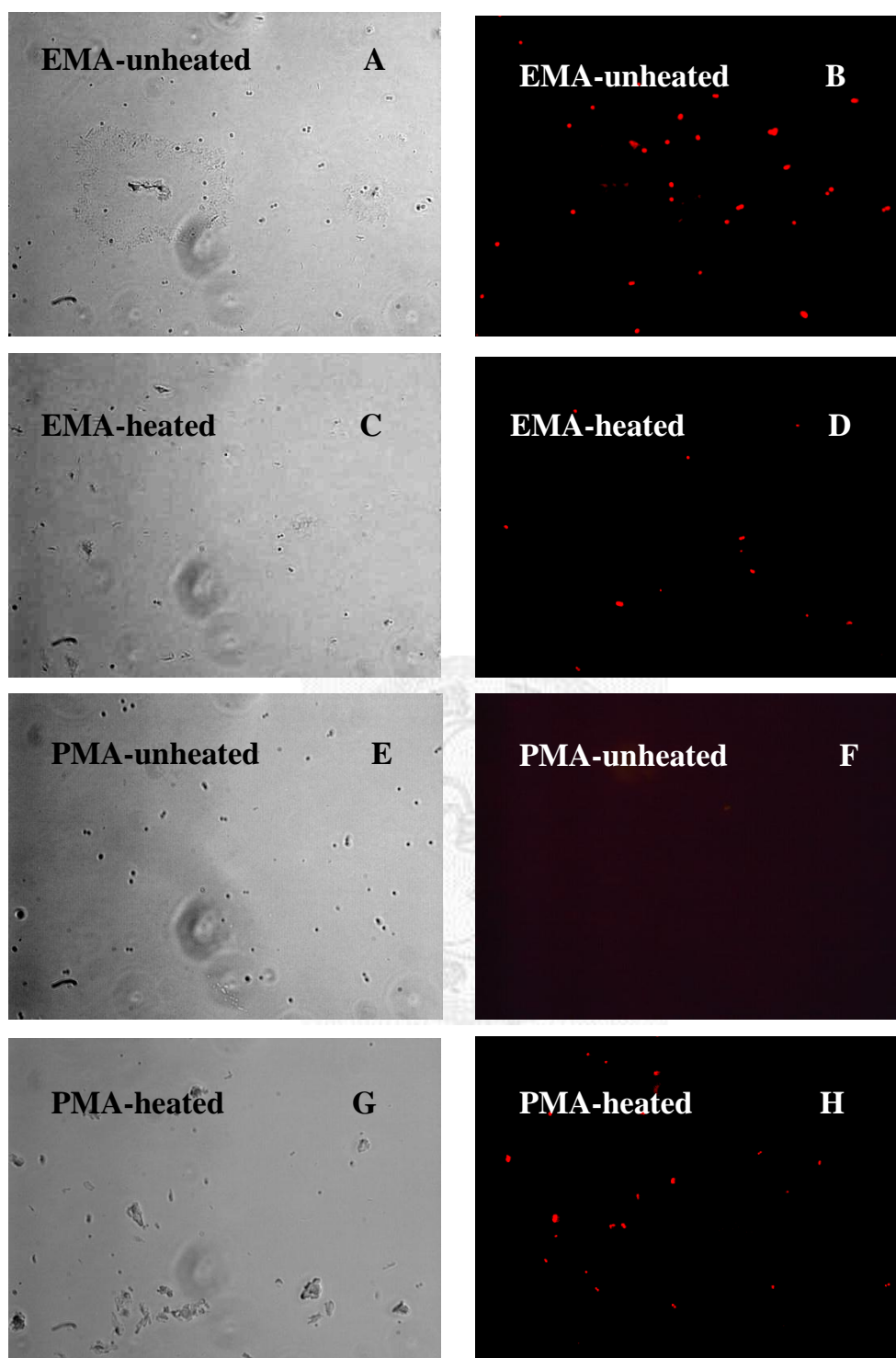


圖 21、以 23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EMA 或 PMA 染色未受熱與 90°C 受熱 20 分鐘細菌並於光學顯微鏡(未受熱：A, E；受熱：C, G)與螢光顯微鏡(未受熱：B, F；受熱：D, H)下呈色結果

## 6.7 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與其最佳條件

### 6.7.1 qPCR Performance 及 QA/QC

所有實驗室測試或環境樣本皆於當日進行樣本 DNA 萃取並於 7 天內進行 qPCR 分析。樣本進行分析時，也同步分析經系列稀釋之標準品(原始濃度為： $2.94 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L)，並依據系列稀釋之標準品建立檢量線。所配置之 DNA 標準品檢量線之濃度範圍為  $1.47 \times 10^2 \sim 1.47 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L。每次樣本分析時，將同步建立檢量線，且檢量線之 Ct 範圍皆涵蓋當次樣本之 Ct 範圍，並以當次檢量線推算樣本之 DNA 濃度。本研究將六次總細菌檢量線，其放大效率最大值為 1.959，最小值為 1.897，且每次  $R^2$  皆為 0.99 以上。將 6 次檢量線所得之結果進行合併(如表 15)，qPCR 放大效率利用公式  $\text{Amplification efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})}$  計算為 1.894，其  $R^2$  為 0.9994，Ct 之標準差 SD 與 CV(%) 分別介於 0.37-0.61 及 2.03-3.43 %。在每批次進行分析時，皆備製一試劑空白樣本(Non template control, NTC)，以作為 qPCR 分析之實驗室空白樣本。

### 6.7.2 qPCR 搭配 EMA/PMA

為了評估最佳染劑種類及濃度，將未受熱之  $1 \times 10^8$  cfu/mL 細菌以 1、1.5、2、2.3、11.5、23 及 46  $\mu$ g/mL EMA 或 PMA 染色 5 分鐘，接著進行 20 分鐘的照光。而受熱 (90°C, 20 min) 之  $1 \times 10^8$  cfu/mL 細菌則以 0.2、0.5、1、1.5、2、2.3 及 11.5  $\mu$ g/mL EMA 或 PMA 染色 5 分鐘，接著進行 20 分鐘的照光，樣本經 DNA 萃取與 qPCR 定量其 DNA 濃度(log copies/mL)。最後將兩種核酸染劑 EMA 或 PMA 處理後之 qPCR 所得結果，以 Kruskal-Wallis test 搭配事後 Scheffe' test 進行統計檢定。在未受熱的樣本中(圖 22)，無 EMA 處理者之 DNA 量為 6.09 log copies/ $\mu$ L，而有 EMA 處理者為 2.78~4.58 log copies/ $\mu$ L，其 qPCR 所得 DNA 濃度較未添加 EMA 樣本為低，約有 2 log copies/ $\mu$ L 損失，且 EMA 濃度越高，下降程度越明顯，而當 EMA 濃度高達 11.5  $\mu$ g/mL 或以上時，其 DNA 濃度與 no template control (NTC) 之值(1.76 log copies/ $\mu$ L) 最為接近。上述結果顯示，EMA 會進入部分活性細菌內並與 DNA 結合，干擾活性細菌之 DNA 於 qPCR 監測與定量。然而對於受熱的樣本(圖 23)，無 EMA 處理者所得 DNA 量為 5.36 log copies/ $\mu$ L，較有 EMA 處理者(3.74 log copies/ $\mu$ L) 為高，其差異介於 1.59- 3.13 log copies/ $\mu$ L，顯示 EMA

確實可以抑制死菌被 qPCR 放大。然圖 22 與圖 23 的數據顯示，EMA 處理雖然能抑制非活性細菌被 qPCR 偵測與定量，但同樣也會進入活性細菌內而影響活菌於 qPCR 監測與定量。

表 15、總細菌 qPCR 檢量線

Standard DNA	copies/ $\mu$ L	log copies/ $\mu$ L (X)	N	Mean Ct (Y)	SD	CV (%)
50 pg/ $\mu$ L	1.47E+07	7.17	6	10.67	0.37	3.43
5 pg/ $\mu$ L	1.47E+06	6.17	6	13.87	0.46	3.33
0.5 pg/ $\mu$ L	1.47E+05	5.17	6	17.58	0.52	2.96
50 fg/ $\mu$ L	1.47E+04	4.17	6	21.41	0.61	2.86
5 fg/ $\mu$ L	1.47E+03	3.17	6	24.75	0.71	2.87
0.5 fg/ $\mu$ L	1.47E+02	2.17	6	28.61	0.58	2.03
Amplification efficiency				1.894		
R <sup>2</sup>				0.9994		
公式				Y = -3.6041X + 36.301		

\*1 ng/ $\mu$ L=2.94 $\times$ 10<sup>8</sup> copies/ $\mu$ L

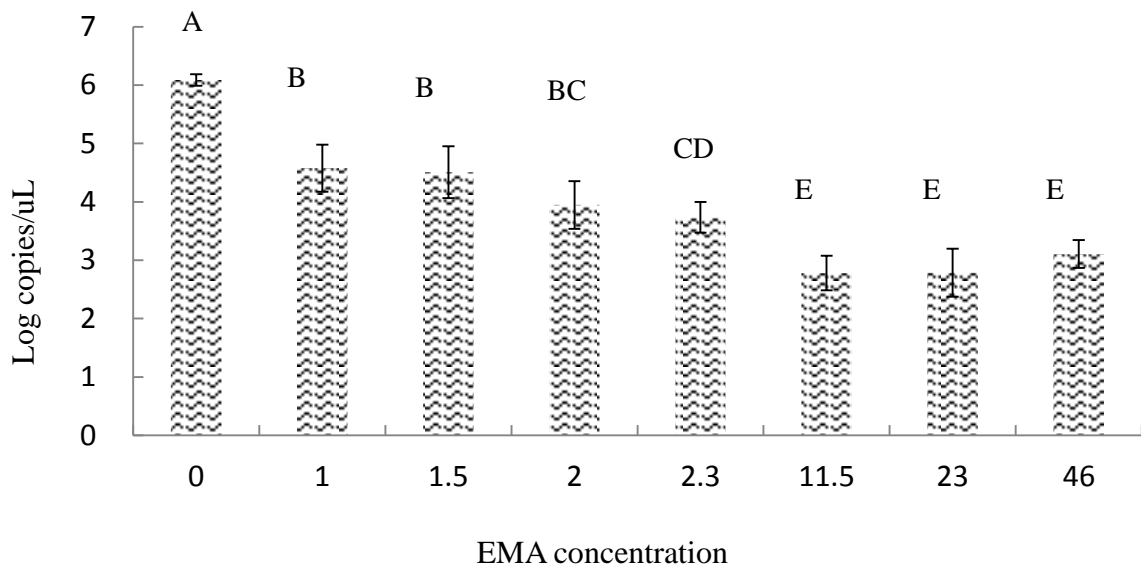


圖 22、以不同 EMA 濃度處置未受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異)

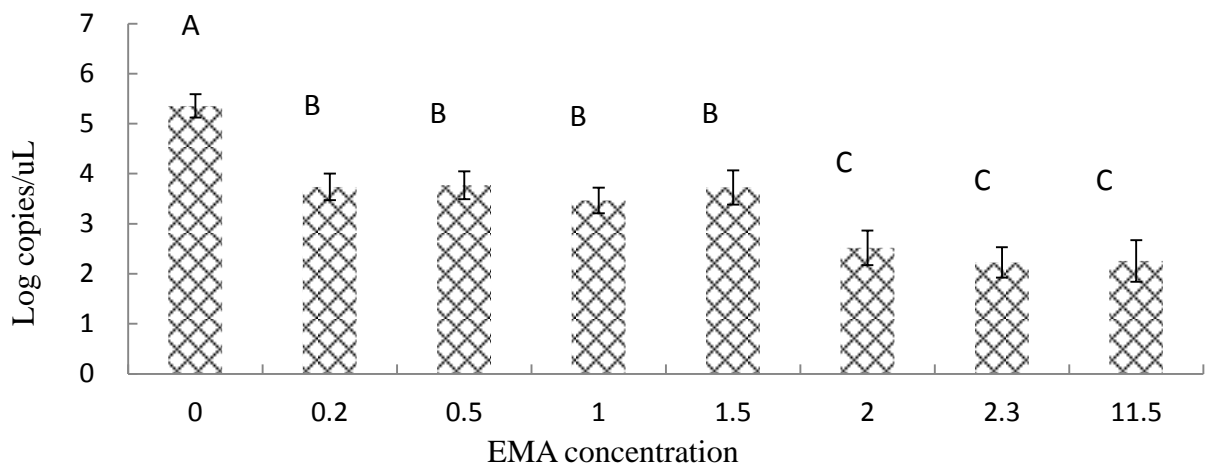


圖 23、以不同 EMA 濃度處置受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異)



至於 PMA 的結果則顯示於圖 24 與圖 25 中。對於未受熱樣本(圖 24)，無 PMA 處理之 DNA 量平均為 5.99 log copies/ $\mu$ L，而有 PMA 處理者為 4.41~5.41 log copies/ $\mu$ L，其差異介於 0.57~1.57 log copies/ $\mu$ L，顯示相較於 EMA (圖 22)，PMA 的使用較不會影響活性細菌之 DNA 於 qPCR 監測與定量。然而對於受熱的樣本 (圖 25)，無 PMA 處理者所得 DNA 平均濃度為 5.36 log copies/ $\mu$ L，較有 PMA 處理者高 0.14~3.16 log copies/ $\mu$ L。且在各 PMA 測試濃度中，當 PMA 濃度高於 1  $\mu$ g/mL 或以上時，受熱組樣本其 qPCR 所得之 DNA 濃度顯著低於未添加 PMA 之對照組，兩者差值介於 2.69~3.16 log copies/ $\mu$ L，顯示 PMA 在濃度等於或大於 1 $\mu$ g/mL 時可有效抑制受熱組細菌 DNA 於 qPCR 之放大。



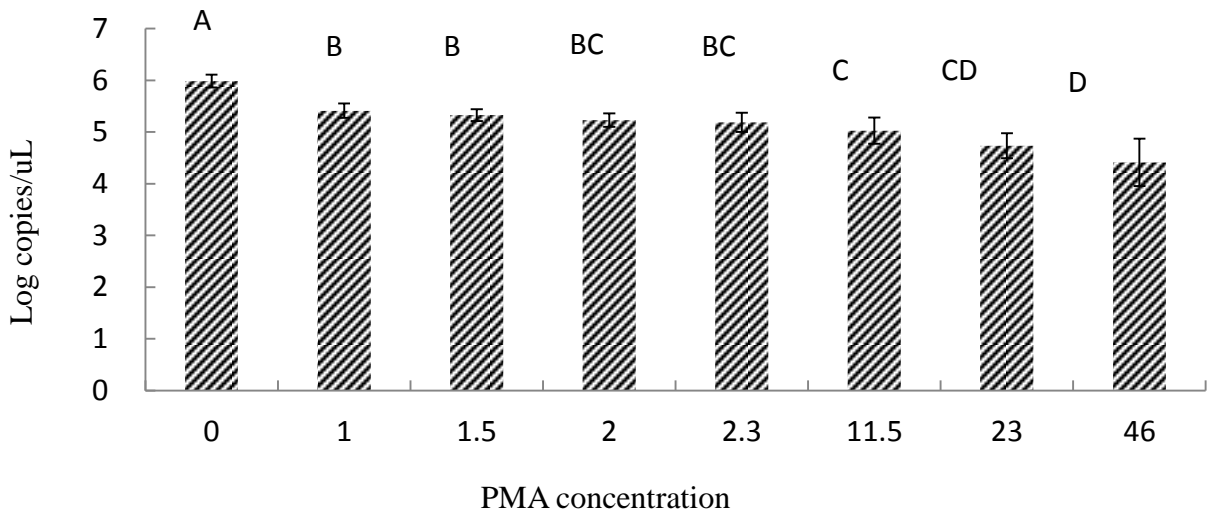


圖 24、以不同 PMA 濃度處置未受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異)

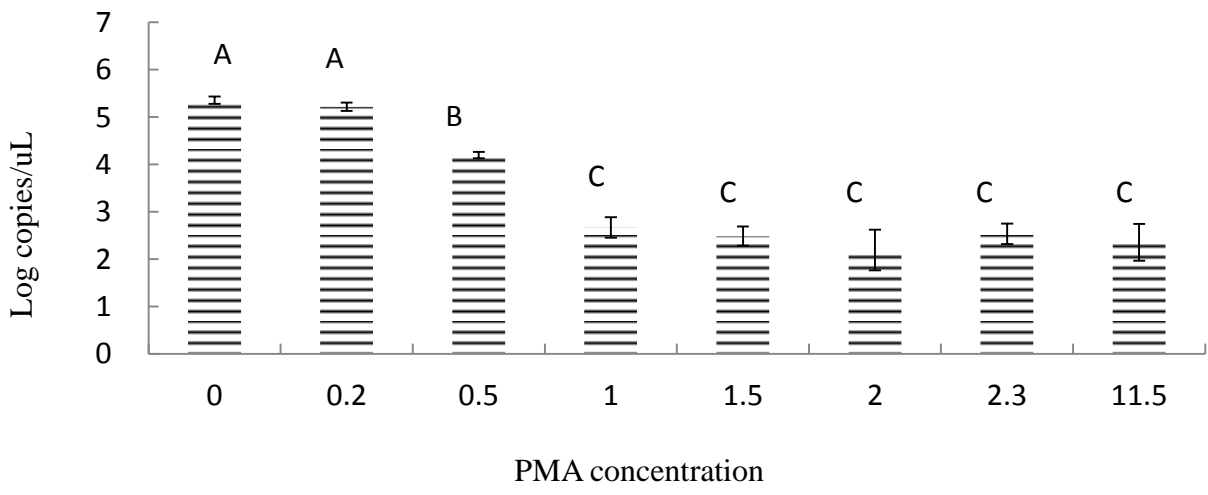


圖 25、以不同 PMA 濃度處置受熱組細菌並經 qPCR 後所得 DNA 濃度(n=6，英文字母相同者代表該組間之 DNA 濃度未達統計顯著差異)

### 6.7.3 總結

兩種核酸染劑結果顯示，EMA 會進入部分活性細菌內並與 DNA 結合，干擾活性細菌之 DNA 於 qPCR 監測與定量(圖 26 A)。然而對於受熱的樣本(圖 26 B)，無 EMA 處理者所得 DNA 量為 5.36 log copies/ $\mu$ L，較有 EMA 處理者(3.74 log copies/ $\mu$ L)為高，顯示 EMA 確實可以抑制死菌被 qPCR 放大。然 EMA 處理雖然能抑制非活性細菌被 qPCR 偵測與定量，但同樣也會進入活性細菌內而影響活菌於 qPCR 監測與定量。進一步觀察不同 PMA 濃度間反應，顯示 1.5  $\mu$ g/mL 之 PMA 即可有效抑制受熱組細菌於 qPCR 放大(圖 26 D)，且在此濃度下，不會對活性細菌造成 qPCR 定量濃度之明顯干擾(圖 26 C)。因此本研究認為以 1.5  $\mu$ g/mL PMA 為結合 qPCR 定量空氣中活性細菌之最佳條件。

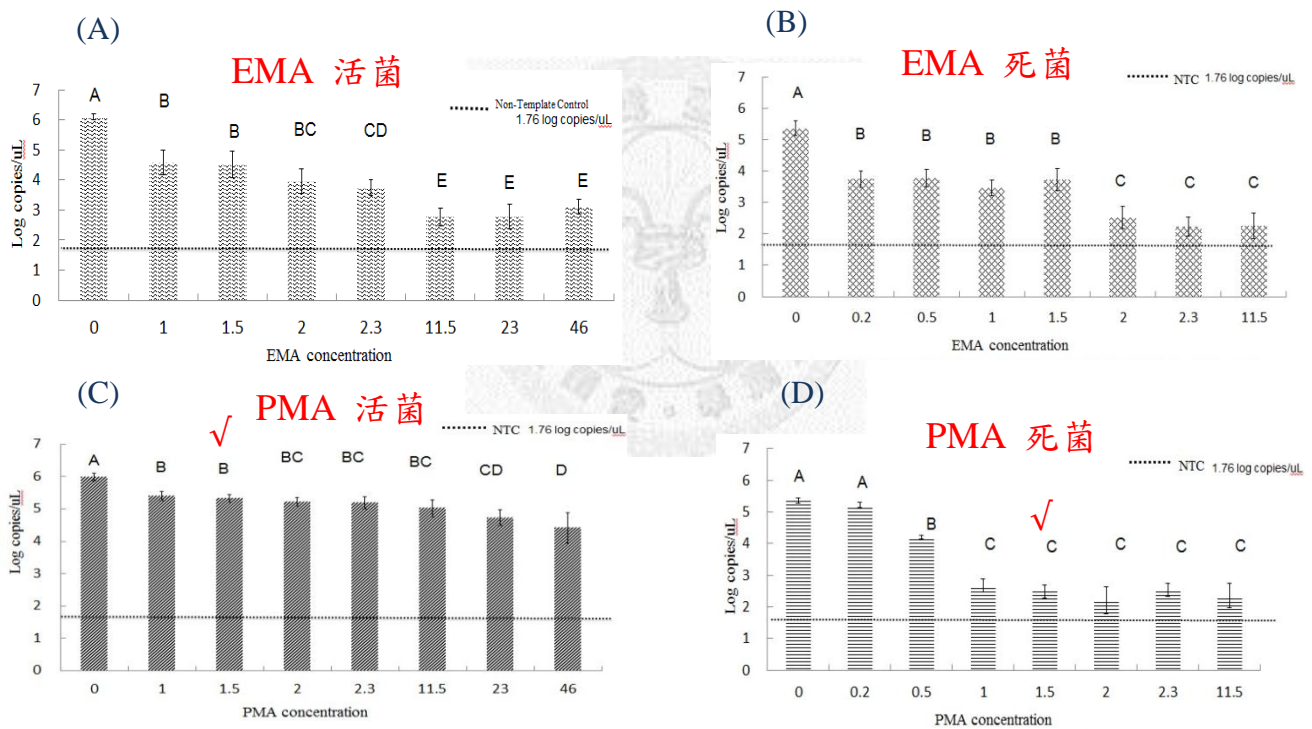


圖 26、qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌

## 6.8 qPCR 搭配 EMA/PMA 定量活性細菌之上下限值與線性關係

偵測上、下限的標準定義為在線性關係良好之範圍內可偵測之最高與最低之細菌數量，同時需滿足未受熱組與 90°C 受熱 20 分鐘之細菌兩者間之 DNA 量可因核酸染劑的處理而有明顯區別。

本實驗首先備置未受熱細菌之濃度調至約  $1 \times 10^{10}$  cfu/mL，進行 10 倍序列稀釋，作為控制組(viable cells only)；同時亦準備  $1 \times 10^8$  cfu/mL 之受熱細菌濃度，並將其加入序列稀釋的各未受熱組細菌中成為具有混合菌群之實驗組(mixture cells)，並控制每個樣本中之受熱細菌濃度均維持在  $1 \times 10^8$  cfu/mL，但未受熱細菌濃度介於  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL，用以觀察是否會因為加入高濃度之受熱細菌而影響不同濃度活性細菌之定量，並從中界定符合線性關係的活性細菌濃度範圍。此外亦分析未添加受熱細菌之控制組，以確認不含受熱細菌時的活性細菌其定量線性範圍。將上述樣本分別以 1.5  $\mu$ g/mL 之 PMA 處理，並皆進行 DNA 萃取與 qPCR 分析。

結果如圖 27 顯示，對於活菌濃度  $\geq 10^4$  cfu/mL 時，不含死菌的對照組與添加死菌的實驗組在活菌的測定數值上相當，將對照組與添加死菌之實驗組之濃度範圍為  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL 時所得數據進行 Wilcoxon 統計檢定，結果顯示兩組之 DNA 濃度並未有統計上顯著差異( $p=0.75$ )，顯示 PMA 確實可抑制死菌的 DNA 在 PCR 中不被放大。而依據定量活性細菌之線性關係結果，其對照組( $R^2=0.9945$ )與添加死菌之實驗組 ( $R^2=0.9846$ ) 最佳線性範圍皆介於  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL。

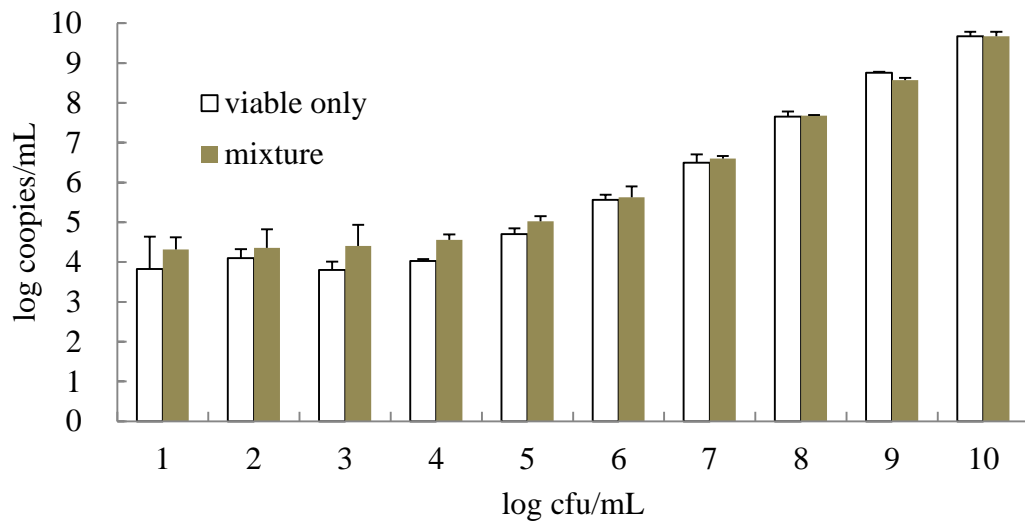


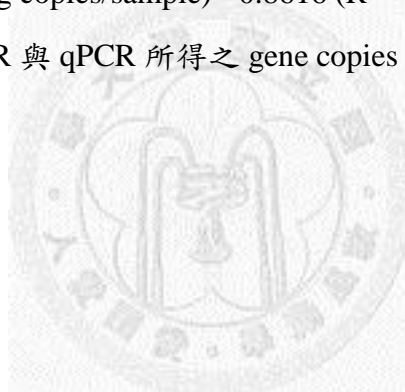
圖 27、以 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA 處理  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL 未受熱組細菌(viable cells only)與含  $1 \times 10^8$  cfu/mL 受熱細菌混合組 (mixture cells)之 qPCR 結果(n=6)



## 6.9 環境檢量線建立

由於每種細菌之 copy number 不同，無法直接將樣本中之 copies 數換算為細菌數，為了解決此困擾，本研究於醫療院所、木材行、畜牧業及家禽業等環境採集空氣樣本後，於實驗室內使用 qPCR 及 Baclight 兩種方法建立轉換 copies 與 cells 之檢量線，因此得到四條環境檢量線。而為了瞭解四條檢量線是否可以合併，因此將四個地點所得到總與活性細菌之 gene copies 或 cell counts 以 Kruskal-Wallis test 進行統計檢定進行，結果顯示四個地點之 gene copies 或 cell counts 之間均無顯著差異( $P>0.70$ )，因此將四個環境之檢量線合併以建立可以適用於以 PMA-qPCR 與 qPCR 定量總細菌之環境檢量線。

結果如圖 28 及圖 29 所示，在總細菌之檢量線公式為  $Y (\log \text{ cells/sample}) = 1.034 X (\log \text{ copies/sample}) - 0.6278 (R^2 = 0.9592)$ ；活性細菌之檢量線為  $Y (\log \text{ cells/sample}) = 1.085 X (\log \text{ copies/sample}) - 0.8616 (R^2 = 0.9665)$ 。高  $R^2$  值顯示可利用檢量線校正 PMA-qPCR 與 qPCR 所得之 gene copies 至細菌數。



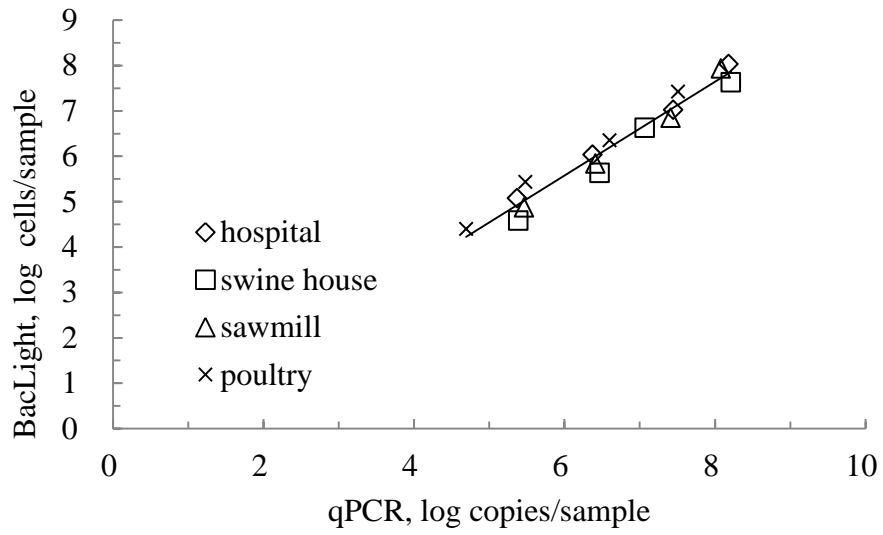


圖 28、總細菌濃度換算檢量線

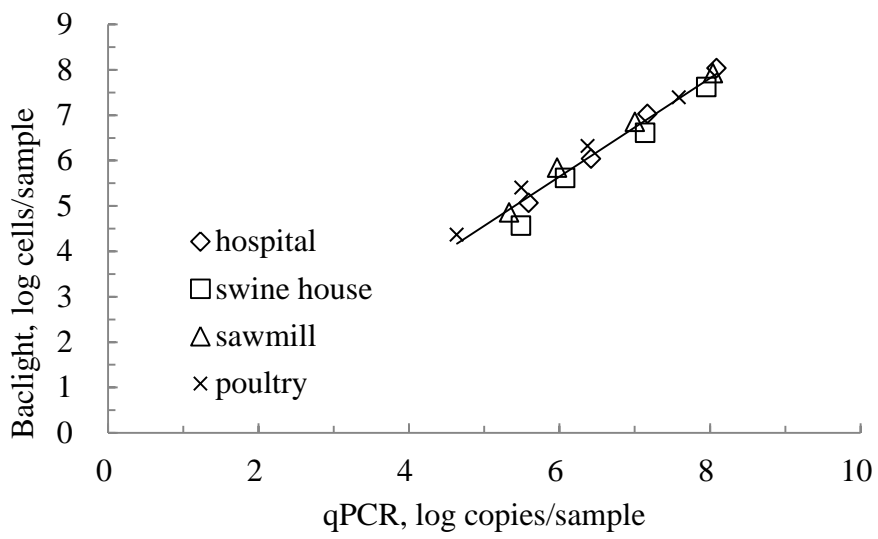


圖 29、活性細菌濃度換算檢量線

## 6.10 環境採樣與驗證

將實驗室建立之定量空氣中活性細菌之方法(PMA-qPCR)，於實際職業場所（家禽業、畜牧業、醫療院所、木材行、水稻田及蔬菜田）進行採樣以驗證開發之分析方法。而在環境採樣時，可能因環境中之雜質或其他抑制物同時被採樣器採集而造成後續 qPCR 偵測 DNA 濃度時，產生干擾或抑制 DNA 片段之正常放大，使儀器無法精確定量其 DNA 濃度。為避免及降低此現象，本研究將環境驗證之樣本經 DNA 萃取後，以 TE buffer 進行 2、10 及 20 倍稀釋，藉此同步稀釋樣本中之抑制物，並選取原倍及稀釋樣本經校正稀釋倍數後，可獲得最高樣本濃度值作為該地點之細菌濃度，並將最佳稀釋倍數下之濃度計算樣本之 Viability 與 Culturability。

呈現環境驗證之空氣樣本針對總細菌濃度及活性細菌濃度之最佳 DNA 稀釋倍數分析結果。對總細菌濃度而言，多數樣本在 10 倍稀釋下可得到最高細菌濃度(70.8%)，其次為未稀釋樣本(16.7%)；而在活性細菌濃度而言，10 倍稀釋下亦可得到最高濃度(62.5%)，其次為 2 倍稀釋樣本(16.7%)。顯示多數環境樣本皆須經過抑制物稀釋方可得到精確之 DNA 濃度。

將其最佳稀釋倍數樣本在 qPCR 所得到之數值 (log copies/sample)帶入環境檢量線(圖 28、圖 29)以得到各樣本之細菌數，經校正採樣體積後得到不同環境空氣中細菌濃度如表 17 所示，並進一步將此細菌濃度以統計方法 Wilcoxon signed-rank 進行檢定。結果顯示，五個地點之總細菌濃度皆大於其活性細菌濃度 ( $p < 0.0001$ )，而活性細菌濃度大於可培養細菌濃度 ( $p < 0.0001$ )。此結果顯示，以 PMA-qPCR 定量職場空氣中活性細菌，是一可行的分析方法。此外，本研究發現，在五類採樣地點中，家禽業空氣中細菌濃度最高，其平均總細菌濃度為  $2.3 \times 10^7$  cells/m<sup>3</sup>、平均活性細菌濃度為  $4.4 \times 10^6$  cells/m<sup>3</sup>，而可培養細菌之平均濃度為  $1.4 \times 10^5$  cells/m<sup>3</sup>；畜牧業其次，其平均活性細菌濃度為  $7.0 \times 10^5$  cells/m<sup>3</sup>，而可培養細菌之平均濃度為  $1.8 \times 10^4$  cfu/m<sup>3</sup>；至於醫療院所之平均活性細菌濃度為  $3.8 \times 10^5$  cells/m<sup>3</sup>，可培養細菌之平均濃度為  $1.6 \times 10^3$  cfu/m<sup>3</sup>。上述結果顯示家禽業相較於其他作業場所有較高細菌暴露。另一方面可培養性(Culturability, %)之細菌於五個環境地點皆低於 1.5%；而醫療院所之 Viability(%)為五個地點最高(71.1%)，家禽舍則最低(13.7%)，顯示不同環境之細菌活性率不同，可能係受環境因子所



影響，如溫度、濕度等；而於環境驗證結果顯示，不同職業場所之活性細菌濃度顯著高於可培養細菌濃度達 31~1098 倍，顯示培養法嚴重低估職業環境中活性細菌濃度。

表 16、環境驗證空氣樣本 qPCR 抑制物處理之最佳稀釋倍數

Location	N	Total concentration, cells/m <sup>3</sup>				Viable concentration, cells/m <sup>3</sup>			
		1X 稀釋	2X 稀釋	10X 稀釋	20X 稀釋	1X 稀釋	2X 稀釋	10X 稀釋	20X 稀釋
醫療院所	6	2/6	0/6	4/6	0/6	0/6	1/6	5/6	0/6
木材行	6	2/6	0/6	3/6	1/6	2/6	0/6	3/6	0/6
水稻田	3	0/3	0/3	3/3	0/3	1/3	0/3	1/3	1/3
蔬菜田	3	0/3	0/3	1/3	2/3	0/3	3/3	0/3	0/3
家禽舍	3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
畜牧業	3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
總最佳稀釋倍數比率(%)		16.7% (4/24)	0% (0/24)	70.8% (17/24)	12.5% (3/24)	12.5% (3/24)	16.7% (4/24)	62.5% (15/24)	4.2% (1/24)

\*最佳稀釋倍數：樣本經稀釋倍數校正後，可獲得最高樣本濃度值者，此時之稀釋倍數稱為最佳稀釋倍數。

表 17、環境採樣結果

Location (n)		Concentration <sup>a</sup> , cells/m <sup>3</sup>			Viability <sup>b</sup> (%)	Culturability <sup>c</sup> (%)
		Total cell	Viable cell	Culturable cell		
醫療院所 (6)	Mean	4.8×10 <sup>5</sup>	3.8×10 <sup>5</sup>	1.6×10 <sup>3</sup>	71.7	0.4
	SD <sup>e</sup>	2.7×10 <sup>5</sup>	3.0×10 <sup>5</sup>	8.2×10 <sup>2</sup>	25.7	0.3
木材行 (6)	Mean	8.8×10 <sup>5</sup>	8.4×10 <sup>5</sup>	7.6×10 <sup>2</sup>	62.5	0.3
	SD	1.7×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>	33.4	0.3
水稻田 (3)	Mean	6.2×10 <sup>5</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>	5.0×10 <sup>2</sup>	42.3	0.3
	SD	8.6×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>2</sup>	22.5	0.3
蔬菜田 (3)	Mean	1.3×10 <sup>5</sup>	2.1×10 <sup>4</sup>	3.5×10 <sup>2</sup>	16.9	0.3
	SD	2.1×10 <sup>4</sup>	3.5×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>	5.1	0.1
家禽舍 (3)	Mean	2.3×10 <sup>7</sup>	4.4×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	13.7	0.9
	SD	2.8×10 <sup>7</sup>	6.2×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>5</sup>	7.4	0.4
畜牧業 <sup>f</sup> (3)	Mean	1.2×10 <sup>6</sup>	7.0×10 <sup>5</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>	60.3	1.2
	SD	6.9×10 <sup>5</sup>	2.8×10 <sup>5</sup>	1.5×10 <sup>4</sup>	11.9	0.9

<sup>a</sup> Total, viable and culturable bacteria was quantified by qPCR, PMA-qPCR, and culture assays, respectively.

<sup>b</sup> Viability, % = (concentration of viable cells/concentration of total cells)×100

<sup>c</sup> Culturability, % = (concentration of culturable cells/concentration of total cells)×100

<sup>d</sup> Number of samples.

<sup>e</sup> Standard deviation.

<sup>f</sup> Sampling was conducted respectively at a cow, goat, and swine house.

## 6.11 方法偵測下限

本研究在未置入任何 DNA 時，其 NTC 之 Ct 值平均約為 31.35，可能與 qPCR 試劑內含有 free DNA 所造成之污染有關。因此以 qPCR 定量總細菌時，樣本中細菌濃度於 qPCR 分析之結果 Ct 值與 NTC Ct 相近，即無法準確分辨樣本中總細菌之 DNA 濃度。而為了解定量總細菌及活性總細菌之 qPCR 方法偵測下限，本研究以 NTC 之 Ct 做為 qPCR 定量總細菌及活性細菌方法偵測下限之依據，並假設 qPCR 分析之 NTC Ct 值為空氣中樣本之 Ct 值，回推計算 qPCR 方法偵測空氣中總細菌及活性總細菌之濃度偵測下限。

本研究將 qPCR 分析得到之 36 筆 NTC Ct 值帶入每次 qPCR 分析之標準品檢量線(如 5.6 節)，並 anti-log 處理，以得到 NTC 之 DNA 濃度(copies/ $\mu$ L)。由於本研究 DNA 萃取最後沖提體積為 100  $\mu$ L，因此將 DNA 濃度(copies/ $\mu$ L)乘上沖提體積(100  $\mu$ L)以得到 copies/qPCR sample。假設 NTC 之樣本處理與環境樣本相同，在 DNA 萃取前之體積為 0.5 mL，且在樣本前處理時將 2 mL 取一半體積進行 qPCR 分析(如圖 14)，故 NTC 之 DNA 濃度經體積校正後即得到 copies/sample。將其取對數後，帶入環境檢量線(詳如 5.7 節)以得到 log cells/sample。再經 anti-log 並校正採樣體積校正後，得到假設之空氣中總細菌或活性總細菌濃度(cells/ $m^3$ )。

結果顯示(附錄一、附錄二)，36 筆之 NTC Ct 值經過計算後，NTC 之平均總細菌濃度為 233.47 cells/ $m^3$ 、SD 為 49.25 cells/ $m^3$ ；平均活性總細菌濃度為 189.05 cells/ $m^3$ 、SD 為 41.59 cells/ $m^3$ 。依此表示，使用流量為 12.5 L/min 之 AGI-30 採集空氣 1 小時並以 qPCR 作為定量空氣中總細菌及活性總細菌之方法，偵測下限分別為 233.47 cells/ $m^3$ (總細菌)及 189.05 cells/ $m^3$ (活性總細菌)；顯示空氣中總細菌及活性總細菌之濃度要高於 233.47 cells/ $m^3$ (總細菌)及 189.05 cells/ $m^3$ 時方可被 qPCR 準確定量。

## 6.12 統計檢定

本研究之檢定方法與結果如下：

表 18、統計檢定表

依變數 (Y)	自變數 (X)	統計方法	樣本數	P 值	r	事後檢定/統計表示意義
最佳核酸染劑處理條件 DNA 量 (log copies/ $\mu$ L)	比較無核酸染劑 EMA 處理與 7 種 有 EMA 處理於未受熱之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	48	<0.0001	無	A>B>C>D>E A=無 EMA 處理 B=1, 1.5 及 2 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理 C=2 及 2.3 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理 D=2.3 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理 E=11.5, 23 及 46 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理
	比較無核酸染劑 EMA 處理與 7 種 有 EMA 處理於受熱之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	48	<0.0001	無	A>B>C A=無 EMA 處理 B=0.2, 0.5, 1 及 1.5 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理 C=2, 2.3 及 11.5 $\mu$ g/ml 之 EMA 處理
	比較無核酸染劑 PMA 處理與 7 種 有 PMA 處理於未受熱之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	48	<0.0001	無	A>B>C>D A=無 PMA 處理 B=1, 1.5, 2 及 2.3 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理 C=2, 2.3, 11.5 及 23 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理 D=23 及 46 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理
	比較無核酸染劑 PMA 處理與 7 種 有 PMA 處理於受熱之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	48	<0.0001	無	A>B>C A=無 PMA 處理及 0.2 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理 B=0.5 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理 C=1, 1.5, 2, 2.3 及 11.5 $\mu$ g/ml 之 PMA 處理

表 18、統計檢定表(續)

依變數 (Y)	自變數 (X)	統計方法	樣本數	P 值	r	事後檢定/統計表示意義
qPCR-PMA 定量活性細菌之線性關係						
DNA 量 (log copies/mL)	比較 PMA 處理於不同濃度之活性細菌 (活菌濃度範圍 4~10 log cfu/ml)	Spearman rank correlation	42	<0.0001	0.99	無
	比較 PMA 處理於不同濃度之混合細菌(活菌+死菌) (活菌濃度範圍 4~10 log cfu/ml)	Spearman rank correlation	42	<0.0001	0.99	無
	比較有 PMA 處理下活性細菌與混合細菌 (活菌濃度範圍 4~10 log cfu/ml)	Wilcoxon rank sum test	84	0.75	無	無
四個地點(醫療院所、木材行、畜牧業及家禽舍)之環境檢量線						
DNA 量 (log copies/sample) qPCR	比較四個地點之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	16	0.91	無	四個環境地點於總細菌之結果並無顯著差異
	比較四個地點之活性細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	16	0.70	無	四個環境地點於活性細菌之結果並無顯著差異
細菌量 (log cells/sample) Baclight	比較四個地點之總細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	16	0.83	無	四個環境地點於總細菌之結果並無顯著差異
	比較四個地點之活性細菌	Kruskal-Wallis test Scheffe's test	16	0.83	無	四個環境地點於活性細菌之結果並無顯著差異

表 18、統計檢定表(續)

依變數 (Y)	自變數 (X)	統計方法	樣本數	P 值	r	事後檢定/統計表示意義
環境樣本 total, viable, culturable 濃度						
DNA 量 (cells/m <sup>3</sup> or cfu/m <sup>3</sup> )	比較六種環境場所 total 與 viable 濃度	Wilcoxon signed-rank	24	<0.0001	無	total concentration>viable concentration
	比較六種環境場所 viable 與 culturable 濃度	Wilcoxon signed-rank	24	<0.0001	無	viable concentration>culturable concentration
	比較六種環境場所 total 與 culturable 濃度	Wilcoxon signed-rank	24	<0.0001	無	total concentration>culturable concentration



## 第七章 討論

### 7.1 以顯微鏡搭配核酸染劑(EMA/PMA)觀察活性及非活性細菌

近年來，以核酸染劑結合qPCR之分析，已運用於定量不同活性微生物上。為了以不同方法證實核酸染劑結合qPCR可區分活性與非活性細菌，因此另以顯微鏡搭配核酸染劑觀察實驗樣本。

本研究將未受熱與受熱的細菌，分別以23 µg/mL的EMA及PMA進行染色處理，並以螢光顯微鏡觀察，比較兩種染劑區分活性與非活性細菌之能力，結果顯示在非活性細菌之實驗，兩種核酸染劑皆可以進入細胞膜內而呈現紅色亮點(圖 21 D, H)。而活性細菌實驗，PMA僅少部分未受熱細菌呈現紅色(圖 21 F)；但EMA結果顯示部分未受熱的細菌呈現紅色(圖 21 B)，表示EMA會進入未受熱細菌的細胞膜內。此結果與Nocker等人研究觀察到的結果相似(Nocker et al., 2006)，他們將9種不同菌株(*Escherichia coli* 0157:H7、*L. monocytogenes*、*M. luteus*、*M. avium*、*Pseudomonas syringae*、*Salmonella typhimurium*、*Streptococcus sobrinus*、*S. marcescens* 及 *Staphylococcus aureus*)，分別以PMA或EMA結合SYTO9進行細菌染色，再透過傳統PCR與螢光顯微鏡分析，比較EMA與PMA區分活性與非活性細菌之能力。其結果顯示，9種菌株以50 µM之EMA或PMA處理下，於非活性細菌兩種核酸染劑皆會呈現紅色亮點，兩種核酸染劑並無差異。至於以PMA處理之活性細菌則未被PMA染色，但發現EMA會進入到部分活性*E. coli* 0157:H7、*L. monocytogenes*、*M. luteus*、*M. avium*、*S. sobrinus*及 *S. aureus*而於螢光顯微鏡下呈現紅色亮點，顯示EMA將會干擾活性細菌之定量。因此，Nocker等人認為PMA因不會進入活性細菌細胞內，故較EMA更具有分辨活性與非活性細菌之能力(Nocker et al., 2006)。另外，Lee 及 Levin於鱈魚上分離總細菌以進行核酸染劑的測試，於螢光顯微鏡下觀察，發現1 µg/mL EMA亦會滲透至少數未經受熱處理(活性細菌)之樣本(Lee & Levin, 2010)。而Flekna等人於2007年分別測試*C. jejuni*及*L. monocytogenes*兩種菌種，將活性與非活性菌進行混合後，在顯微鏡明視野下，*C. jejuni*混合菌與*L. monocytogenes*混合菌之平均密度分別為35.3 cells/field與14.8 cells/field。當以100 µg/mL EMA處理混和樣本並搭配螢光顯微鏡觀察(二重複測試)時，發現*C. jejuni*混合菌與*L. monocytogenes*混合菌中，被EMA染色之細菌密度平均分別為36.3 cells/field與15 cells/field。顯示活性與非活性的

*C. jejuni*及*L. monocytogenes*活幾乎均被EMA染色，意味著EMA不僅進入非活性細菌內，亦會進入活性*C. jejuni*及*L. monocytogenes*細胞膜內(Flekna et al., 2007)。此結果亦與本研究觀察總細菌之現象相似。這樣的結果可能係因兩種核酸染劑之化學結構不同所致。從圖 1顯示，EMA帶一正電荷，而PMA則有兩個正電荷，因此在細胞膜通透性上，僅帶一個正電荷的EMA相較於帶兩個正電荷的PMA，較容易進入細胞內部 (Nocker et al., 2006)。核酸染劑搭配顯微鏡觀察之相關文獻如表 19。

整體而論，顯微鏡結果顯示EMA或PMA皆可進入受熱細菌的細胞膜內，但EMA同時也進入完整細胞膜內(圖 21 B)，而PMA較無此情況。故證實PMA之處裡確實較EMA更適合用於區分活性與非活性細菌。

表 19、核酸染劑搭配螢光顯微鏡觀察

細菌菌種	樣本種類	EMA	結果	參考文獻
<i>E. coli</i> 0157:H7 <i>L. monocytogenes</i> <i>M. luteus</i> <i>M. avium</i> <i>P. syringae</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. marcescens</i> <i>S. aureus</i> <i>S. sobrinus</i>	ATCC	50 $\mu$ M	EMA 會進入到部分活性菌種而於螢光顯微鏡下呈現紅色亮點，因而干擾活性細菌之定量。	Nocker et al., 2006
Total bacteria from fish	魚肉	1 $\mu$ g/mL	EMA 亦會滲透至少數未經受熱處理之樣本。	Lee & Levin, 2010
<i>C. jejuni</i> <i>L. monocytogenes</i>	ATCC	100 $\mu$ g/mL	活性或非活性菌之幾乎都被EMA染色。	Flekna et al., 2007



## 7.2 qPCR 搭配 EMA/PMA 於定量活性細菌之適用性與條件

本研究以核酸染劑結合qPCR定量活性細菌，並從中尋求最佳核酸染劑種類及濃度。結果發現，有EMA處理者(4.56 log copies/ $\mu$ L)較無EMA處理(6.09 log copies/ $\mu$ L)之DNA量下降約有1.5 log copies/ $\mu$ L，且濃度越高，下降程度越明顯。此與Nocker與Camper於2006年研究結果相似。Nocker與Camper於2006年研究發現，在未受任何壓力下之活性*E.coli* O157:H7，經100  $\mu$ g/mL EMA處理者相較於無EMA處理者之DNA量下降約6成 (Nocker & Camper, 2006)。

相同現象也曾出現於Kobayashi等人之研究，以EMA-qPCR定量*S. aureus* 及 *Staphylococcus epidermidis*，EMA濃度分別為2.5、10、50 及 100  $\mu$ g/mL。結果顯示，50  $\mu$ g/mL EMA於非活性細菌*S. aureus*之Ct差值(無EMA處理與有EMA處理相減)大約為14.73，顯示EMA可抑制非活性*S. aureus*被qPCR偵測。然Kobayashi等人也發現，活性*S. aureus*之Ct差值亦有6.05，意味著EMA雖然可以抑制非活性*S. aureus*被qPCR偵測，但同樣也會抑制活性細菌而影響其定量的正確性(Kobayashi et al., 2009a)。為了比較不同細菌濃度下EMA處理是否會產生差異，Kobayashi等人進一步將不同濃度( $3.4 \times 10^4$ 、 $7.0 \times 10^5$ 及 $7.8 \times 10^6$  cfu/mL) 之活性及非活性*S. epidermidis*，以50  $\mu$ g/mL EMA處理並以qPCR定量。結果顯示，濃度為 $3.4 \times 10^4$  cfu/mL 之活性與非活性細菌之Ct數值並無差異；然當細菌濃度越高 ( $7.0 \times 10^5$ 及 $7.8 \times 10^6$  cfu/mL) 時，活性細菌之Ct差值(無EMA處理-有EMA處理)大約為12，高於非活性細菌之Ct值差值 (4-7)，顯示EMA抑制活性*S. epidermidis*比抑制非活性細菌更明顯，達統計上顯著差異( $p < 0.01$ )。因此作者認為EMA無法有效分辨活性與非活性 *S. epidermidis*，也無法正確定量其中的活性菌(Kobayashi et al., 2009b)。類似發現亦出現於Flekna等人於2007年之研究，該作者測試*C. jejuni*及*L. monocytogenes*兩種菌種，並以qPCR方法評估EMA分辨活性細菌之適用性。結果顯示，活性*C. jejuni*及*L. monocytogenes*在無EMA處理時所得濃度分別為 $3.6 \times 10^6$ 及 $4.2 \times 10^8$  cells/mL，而有EMA處理者濃度分別為 $3.5 \times 10^4$  及 $6.5 \times 10^6$  cells/mL，顯示EMA處理後，活性*C. jejuni*及*L. monocytogenes*濃度皆下降2 log左右，據此作者認為EMA不具分辨活性*C. jejuni*及*L. monocytogenes*之能力(Flekna et al., 2007)。

在PMA方面，Kobayashi等人曾以50  $\mu$ M PMA結合qPCR針對*S. aureus* 及 *S.*

*epidermidis*進行測試，結果顯示，PMA可以顯著抑制非活性*S. aureus* 及 *S. epidermidis*之DNA於qPCR放大，其有無PMA處理所得之DNA濃度差值介於3-4 log cells/sample；而在活性*S. aureus* 及 *S. epidermidis*的部分，有無PMA處理之濃度下降不到1 log cells/sample。因此作者認為，以50  $\mu$ M PMA結合qPCR之方法可區分活性與非活性*S. aureus* 及 *S. epidermidis*並定量其中的活性菌 (Kobayashi et al., 2009)。

而Cawthorn 及 Witthuhn 以兩種核酸染劑(EMA與PMA)在不同濃度(10、50及100  $\mu$ g/mL)下結合傳統PCR測試*Enterobacter sakazakii*，以尋求最佳核酸染劑種類及其濃度。於非活性細菌結果顯示，濃度50或100  $\mu$ g/mL之EMA與PMA均可有效抑制死菌被放大，顯示此兩種核酸染劑皆可以抑制非活性細菌於PCR被偵測；而於活性細菌結果顯示，加入三種不同濃度(10、50及100  $\mu$ g/mL)之EMA後，其PCR結果皆與無EMA處理之控制組達統計顯著差異( $P < 0.05$ )，顯示EMA會進入活性*E. sakazakii*而干擾定量；另一方面，以10、50及100  $\mu$ g/mL之PMA處理者，其與無PMA處理之控制組則未達統計上顯著差異( $P > 0.05$ )，顯示PMA較不會干擾活性*E. sakazakii*定量。因此作者認為PMA較EMA更適用於定量活性*E. sakazakii*(Cawthorn & Witthuhn, 2008)。

Nocker等人亦曾以濃度50  $\mu$ M 之EMA及PMA結合PCR處理9種不同菌株 (*E. coli* 0157:H7、*L. monocytogenes*、*M. luteus*、*M. avium*、*P. syringae*、*S. typhimurium*、*S. sobrinus*、*S. marcescens* 及 *S. aureus*)。結果顯示，兩種染劑皆會進入非活性9種菌株，且有EMA或PMA處理者較無核酸染劑處理之控制組，其DNA濃度下降超過9成；另一方面不同菌種在活性細菌測試時，發現EMA會進入部分菌種活性細菌(*E. coli* 0157:H7、*L. monocytogenes*、*M. luteus*、*M. avium*、*S. sobrinus*及 *S. aureus*)，依菌種不同，其DNA濃度下降程度約5至9成不等，顯示EMA會因而干擾這些活性細菌的定量；而以PMA進行測試9種活性菌種時，發現有PMA處理者與無PMA處理者其DNA濃度並無差異。因此Nocker等人認為PMA不會進入活性細菌之細胞內，而較EMA更具有分辨活性與非活性細菌之能力，證實在相同核酸染劑濃度下，PMA較EMA更具有分辨活性與非活性之細菌，並可結合qPCR定量活性細菌(Nocker et al., 2006)。總結上述，多數研究顯示，EMA會進入部分活性細菌內，干擾後續qPCR定量。而本研究以EMA測試活性細菌時，也發現相同現象，有EMA處理者較無EMA處理之DNA量下降約有1.5 log copies/ $\mu$ L損失，且

EMA濃度越高，活性細菌DNA濃度下降程度越明顯；反之，PMA處理者則無此情況。因此，本研究認為當以核酸染劑結合qPCR定量活性細菌時，PMA較EMA更能有效正確定量。



表 20、搭配 EMA/PMA 於活性細菌之適用性與條件

細菌菌種	PMA	EMA	分析方法	結果	參考文獻
<i>E. coli</i> 0157:H7 <i>S. typhimurium</i>		100 µg/mL	real-time PCR	有 EMA 處理者(100 µg/mL)相較於無 EMA 處理者之 DNA 量下降約 6 成。	Nocker & Camper, 2006
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	-	2.5, 10, 50 and 100 µg/mL	real-time PCR	EMA 會進入到部分活性菌種細胞膜內，造成測得之 DNA 濃度下降約 4 log。	Kobayashi et al., 2009
<i>C. jejuni</i> <i>L. monocytogenes</i>		100 µg/mL	real-time PCR	EMA 會進入到部分活性菌種細胞膜內，造成測得之 DNA 濃度下降約 2 log。	Flekna et al., 2007
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	50 µM	-	real-time PCR	PMA 可有效抑制非活性細菌，且不會干擾活性細菌測得之 DNA 濃度下降。	Kobayashi et al., 2009
<i>E. sakazakii</i>	10, 50, 100 µg/mL	10, 50, 100 µg/mL	傳統 PCR	EMA 會進入到部分活性菌種細胞膜內，造成測得之 DNA 濃度下降 2 成。	Cawthorn and Witthuhn, 2008
<i>E. coli</i> 0157:H7 <i>L. monocytogenes</i> <i>M. luteus</i> <i>M. avium</i> <i>P. syringae</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. marcescens</i> <i>S. aureus</i> <i>S. sobrinus</i>	50 µM	50 µM	傳統 PCR/ 顯微鏡觀察法	EMA 會進入到部分活性菌種細胞膜內，依不同菌種其所測得之 DNA 濃度與無 EMA 處理者相比，下降約 5~9 成。	Nocker et al., 2006
Total bacteria from fish	3 µg/mL	1 µg/mL	real-time PCR	於高溫度條件下，EMA 較 PMA 有效抑制非活性細菌，因此作者認為 EMA 較佳。	Lee & Levin, 2009

\*: 作者認為EMA不適用

### 7.3 EMA/PMA 最佳條件之選定

截至目前為止，以核酸染劑結合qPCR之方法，已成功應用於許多微生物上，而在方法開發上，主要評估五項參數，包括：暗反應時間、照光強度、照光時間，核酸染劑種類及核酸染劑最佳濃度，以決定最佳核酸染劑條件。因此本研究將五種設定參數與其他研究做比較，並評估各參數對於選擇最佳核酸染劑條件之影響。而為瞭解本研究建立之定量空氣中活性細菌之最佳核酸染劑條件，與其他人的最佳條件間之差異性，因此整理相關研究如表 21與表 22。

#### 7.3.1 暗反應時間

核酸染劑是否完全進入破損之細胞膜內，暗反應時間是其關鍵；而依不同菌種及核酸染劑濃度，其最佳暗反應時間可能不同。Nocker等人於2006年針對活性及非活性之*E.coli* O157: H7，以3、30及240  $\mu\text{M}$ 之PMA處理經不同暗反應時間(1、5及15分鐘)，結果顯示，搭配三種暗反應時間即可抑制非活性*E.coli*之DNA偵測，然在反應15分鐘時，發現以濃度為240  $\mu\text{M}$ 之PMA處理，活性*E.coli*之DNA量與未添加PMA之DNA量減少約20%，因此作者認為反應時間5分鐘為最佳(Nocker et al., 2006)。而反應5分鐘為普遍研究所使用之條件(如表 21及表 22)。然本研究之反應時間也與多數研究相同亦為5分鐘。

#### 7.3.2 照光強度

樣本以核酸染劑處理後，以照光的方式激發核酸染劑與DNA做共價鍵結，以抑制非活性菌之DNA於qPCR放大偵測。而通常將樣本置於碎冰上距離燈源15-30公分(如表 21及表 22)，此外EMA及PMA吸收光分別為456及464 nm，因此使用之照光系統需涵蓋上述之波長，而多數研究使用之照光系統為500及650瓦特(如表 21及表 22)。而目前為止，雖然未看見研究上有比較兩種照光系統對選擇核酸染劑條件之影響，然本研究認為500瓦特之照光強度應比650瓦特對於照光過程產生之熱效應為弱，對樣本之傷害性較低，因此認為以500瓦特之照光系統可能較650瓦特佳；而核酸染劑定量活性真菌上目前亦有研究使用light-emitting diodes(LEDs)燈(Vesper et al., 2008)，且LEDs燈之波長為456 nm，接近EMA (456 nm)及PMA (464 nm)之吸收波長，而不會產生熱源為其優點。

#### 7.3.3 照光時間

核酸染劑是否有效與DNA做反應，照光時間是重要因子之一。分兩個層次

說明：(1)非活性細胞膜內之核酸染劑經由照光激發與DNA作共價鍵結，而照光不足會影響核酸染劑未能有效與非活性之DNA做結合，造成結果偽陽性(Fittipaldi et al., 2012)；(2)另一方面完整細胞膜外之核酸染劑，亦經由照光將多餘之未進入細胞內之核酸染劑有足夠時間轉變為羥胺，使核酸染劑不再具有與DNA結合之能力，而不會於DNA萃取時與DNA作結合進而影響qPCR定量(Varma et al., 2009; Fittipaldi et al., 2012)。因此照光的時間是否充足，可能會影響qPCR定量的結果。然依不同研究及菌種，其照光時間範圍1到20分鐘(如表 21及表 22)，然而照光時間應足夠使核酸染劑與非活性細菌之DNA結合抑制放大偵測，同時亦不會使活性細菌於定量時受干擾。而本研究照光時間為20分鐘，亦考慮照光時間不足會影響其樣本定量結果，因此亦認為照光20分鐘為最佳核酸染劑條件。

#### 7.3.4 核酸染劑種類及最佳濃度

許多針對單一菌種之核酸染劑研究證實，EMA可能會進入活性細菌內(內容詳如7.2節)，干擾活菌定量(Cawthorn & Witthuhn, 2008; Flekna et al., 2007; Nocker et al., 2006)；而PMA尚未發現進入活性細菌內之狀況。而雖然研究顯示EMA會干擾活性菌定量，但其低濃度之EMA亦有成功應用於特定細菌上，例如於*V. vulnificus*之最佳EMA濃度為2.5 µg/mL (Wand and Levin, 2006)、*Legionella*之最佳EMA濃度為2.3 µg/mL (Chen and Chang, 2010)、魚肉總細菌最佳EMA 濃度為1 µg/mL (Lee and Levin, 2007)。而不同菌種，可能亦影響選擇之核酸染劑種類及濃度。例如依不同菌種之最佳EMA濃度範圍由1至 100 µg/mL；PMA之最佳濃度範圍由6至100 µM (3至51 µg/mL)；而多數針對EMA染劑進行最佳核酸染劑評估之結果顯示，最佳EMA濃度為100 µg/mL(表 21)；另研究評估之最佳PMA濃度多為50 µM (25.5 µg/mL)相較EMA為低。亦有文獻指出，高濃度之EMA及PMA，會干擾qPCR準確定量活性細胞(Inoue et al.,2008; Varma et al.,2009)。而本研究定量空氣中活性細菌之最佳PMA濃度為1.5µg/mL，相較於其他研究所使用之核酸染劑濃度為低，顯示低濃度之PMA結合qPCR應用於定量空氣中活性細菌時，即具有分辨活性細菌之能力。

另與總細菌(魚肉)為測試對象之研究做比較，Lee 與 Levin 於2009年以鱈魚為對象並以qPCR進行EMA及PMA核酸染劑之評估，搭配暗反應5分鐘，距離500瓦特燈源15公分照光10分鐘，結果顯示EMA及PMA為最佳核酸染劑條件分別為1及 3 µg/mL。而作者另比較不同加熱溫度下(45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90及

95 °C)受熱5分鐘，比較兩種核酸染劑抑制非活性細菌之能力，結果顯示在50 °C時，以EMA測得之DNA百分比濃度為 $81.5 \pm 14.6\%$ 、PMA則為100%；而受熱於85 °C時，以EMA處理者未測得DNA百分比濃度(0%)、而PMA則有 $3.2 \pm 2.0\%$ ；當受熱溫度為90 °C時，其PMA測得之DNA百分比濃度亦有 $0.7 \pm 0\%$ 。而受熱後之細菌結果顯示，EMA所測得之DNA量比PMA測得的少，因此作者認為EMA較PMA具有分辨非活性細菌之能力(Lee & Levin, 2009)。另Pan及Breidt等人於2007年以8 log cfu/mL之*L. monocytogenes* 培養於不同溫度(5、15、25及37 °C)下2小時，並以EMA及PMA濃度分別為240  $\mu\text{M}$ 及50  $\mu\text{M}$ 處理，以EMA處理結果發現隨著溫度的上升，細菌可培養性下降程度越高，而培養於37 °C之樣本與未經溫度處理之控制組相比，約下降2.4 log cfu/mL；另一方面PMA與控制組相差則不到 0.1 log cfu/mL。而為了排除上述結果係兩種核酸染劑處理濃度不同所致，作者亦將活性細菌以50  $\mu\text{M}$ 之EMA處理，其結果與濃度為240 $\mu\text{M}$  之EMA結果無差異。因此作者認為EMA會進入活性細菌之原因可能係溫度的上升，改變細胞膜對外界物質之滲透性(Pan & Breidt, 2007)。而Yáñez等人(2011)認為EMA較PMA能抑制非活性細菌，原因可能為兩種核酸染劑所帶電荷不同所致，PMA較EMA多帶一正電荷，因此僅有一正電荷之EMA容易進入細胞膜內，也較能抑制非活性細菌之DNA放大偵測 (Yáñez et al.,2011)。因此Lee 及 Levin之研究，當於90 °C受熱5分鐘時，本研認為加熱時間過短部分細菌之細胞膜可能尚未完全破損。而以EMA處理者未測得DNA濃度(0%)，其PMA測得之DNA濃度亦有 $0.7 \pm 0\%$ ，由於EMA相對於PMA對於細胞膜通透性高，因此即使細胞膜未完全破損，也較PMA容易進入非活性細菌內抑制DNA放大偵測；相對的PMA亦測到少量DNA濃度，並不全然為PMA無法進入非活性細菌所致。然本研究以90 °C 加熱20分鐘，理當細菌之細胞膜應幾乎完全破損，且在相同核酸染劑濃度(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )下顯示PMA較EMA(圖 23與圖 25)有效進入非活性細菌並抑制其DNA被放大偵測，因此本研究認為以核酸染劑定量空氣中總細菌之測試結果，PMA較EMA具有分辨非活性細菌之能力。

本研究之最佳核酸染劑條件為1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之PMA，而Lee及Levin為最佳核酸染劑條件為 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA。進一步探討兩者研究之核酸染劑條件參數，相異之處為照光時間不同，Lee及Levin之研究為10分鐘，本研究照光時間較長，為20分鐘。而Varma等人於2009年之研究，發現若照光時間不足，可能造成完整細胞膜外之核酸染劑無法轉變為羥胺而被水解，而在DNA萃取時增加核酸染劑與DNA

結合之可能性，影響qPCR之定量(Varma et al., 2009)；亦或照光時間不足使核酸染劑未充分與非活性之DNA作結合(Nocker et al., 2012)，導致需要更高之核酸染劑濃度始能抑制非活性細菌之DNA放大偵測。例如Delgado-Viscogliosi等人於2009年針對*L. pneumophila*進行不同核酸染劑EMA濃度(2.5、5及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )搭配不同照光時間(1及15分鐘)測試，而照光1分鐘時，加入EMA濃度為之2.5、5及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其非活性細菌之DNA濃度較未添加核酸染劑之控制組下降約為1.87~2.61 log genomic unit/mL；而將照光時間拉長變為15分鐘時，有EMA處理之非活性細菌之DNA濃度較未添加核酸染劑之控制組下降約為3.02~3.28 log genomic unit/mL。顯示在相同EMA濃度處理下，照光時間越長，核酸染劑較充分與非活性之DNA作結合，因此越能抑制非活性細菌之DNA於qPCR放大偵測。而Lee及Levin研究照光時間為10分鐘，照光時間相較於本研究之20分鐘為少，因此需要更高之PMA濃度(3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )方能抑制非活性細菌之DNA放大偵測；另本研究認為偵測之對象亦可能影響其核酸染劑條件，Lee及Levin偵測對象為魚肉中總細菌，而魚肉中之主要細菌菌種為*Enterobacteriaceae*、*Vibrionaceae*及*Pseudomonads* (Sarter et al., 2007)；本研究係以雞舍空氣中總細菌作為偵測對象，主要細菌菌種可能有*E. coli*、*Bacillus*及*Staphylococcus spp.* (Vučemilo et al., 2007; Awad et al., 2010)，細菌種類不同，以致最佳核酸染劑濃度有所差異，例如Zhu等人於2012年之研究，針對*Vibrio parahaemolyticus*菌種進行6種PMA濃度(2、4、8、12、16及20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )測試，顯示最佳核酸染劑為PMA濃度8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Kobayashi等人於2009年針對*Staphylococcus spp.*進行核酸染劑PMA測試，結果顯示最佳核酸染劑PMA濃度為25.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；由上述兩篇針對不同菌種核酸染劑測試結果顯示，偵測對象(菌種)不同，最佳核酸染劑條件亦有所差異。

綜合上述，本研究與Lee及Levin之研究同樣係針對總細菌做測試，所得之最佳核酸染劑濃度不同，認為可能因照光時間不同及偵測對象不同，導致總細菌之最佳核酸染劑濃度相異。

### 7.3.5 總結

核酸染劑之參數設計可能影響其核酸染劑結合qPCR定量之結果；而與相關研究之核酸染劑條件參數作比較，本研究核酸染劑反應時間為5分鐘，與大部分核酸染劑實驗設定相似；而距離燈源20分鐘也與大部份之研究相同；本研究使用500瓦特作為照光系統，認為500瓦特之照光強度應比650瓦特對於照光過程產



生之熱效應為弱，對樣本之傷害亦較低；而照光時間為20分鐘，比大部分研究為長，考慮樣本裡多餘之核酸染劑應經充分照光而水解，而不會在DNA萃取後與DNA作結合而影響qPCR定量，因此本研究認為照光20分鐘為最佳。

基此，本研究在固定反應時間(5分鐘)與照光強度(500瓦特)照射20分鐘下，本研究顯示1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之PMA及可有效抑制受熱組細菌於qPCR放大，且在此濃度下，不會對活性細菌造成qPCR定量上的干擾。因此本研究認為以1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之PMA為結合qPCR定量空氣中活性細菌之最佳條件。



表 21、EMA 核酸染劑搭配 qPCR 定量細菌之最佳條件參數

偵測微生物	核酸染劑 EMA			照光			備註	參考文獻
	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	暗反應時間 (分)	強度 (瓦特)	時間 (分)	距離 (公分)		
<i>C. jejuni</i>	100	240	5	650	1	20		Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	2	20	vcp	Flekna et al., 2007
<i>E. coli</i>	100	240	5	650	1	20		Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	1	20		Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	1	20	vcp	Nocker & Camper, 2006
<i>L. monocytogenes</i>	100	240	5	650	1	20		Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	1	20		Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	2	20	vcp	Flekna et al., 2007
	10	24	5	500	5	20		Soejima et al., 2008
<i>Legionella spp.</i>	2.3	5.5	5	500	20	20		Chen & Chang, 2010
	10	24	10	-	5	-		Chang et al., 2009
Mixed bacteria flora	1	2.4	5	500	10	15		Lee & Levin, 2009
<i>Salmonella sp.</i>	100	240	5	650	1	20		Rudi et al., 2005
	100	240	5	650	1	20		Nogva et al., 2003
	100	240	5	650	1	20		Nocker & Camper, 2006
<i>S. aureus</i>	50	120	5	650	5	20	vcp	Kobayashi et al., 2009
<i>S. epidermidis</i>	50	120	5	650	5	20	vcp	Kobayashi et al., 2009

$1\mu\text{M} = 420.31(\text{EMA 之分子量}) \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$

vcp: viable cell penetration

表 22、PMA 核酸染劑搭配 qPCR 定量細菌之最佳條件參數

偵測微生物	核酸染劑 PMA			照光			備註	參考文獻
	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	暗反應時間 (分)	強度 (瓦特)	時間 (分)	距離 (公分)		
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	51.1	100	5	650	2	-		Verma et al.,2009
<i>E. coli</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>Enterococcus faecalis</i>	51.1	100	5	650	2	-		Verma et al.,2009
<i>L. monocytogenes</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>M. luteus</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>M. avium</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
Mixed bacteria flora	3	6	5	500	10	15		Lee & Levin, 2009
<i>P. syringae</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>S. typhimurium</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>S. marcescens</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>S. aureus</i>	25.6	50	5	650	5	20		Kobayashi et al., 2009
	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006
<i>S. epidermidis</i>	25.6	50	5	650	5	20		Kobayashi et al., 2009
<i>S. sobrinus</i>	25.6	50	5	650	2	20		Nocker et al., 2006

$1\mu\text{M} = 511(\text{PMA 之分子量}) \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$

#### 7.4 PMA-qPCR 定量活性細菌濃度之線性關係

本研究證實，將空氣樣本以 1.5  $\mu\text{g/mL}$  之 PMA 處置並於暗室內反應 5 分鐘，再以 500 瓦特光暴露 20 分鐘，是定量空氣中細菌之最佳核酸染劑實驗條件。基於此，本研究進一步評估此方法在含有高濃度之死菌下，不同濃度之活性細菌於 PMA-qPCR 分析所得 DNA 濃度與初始活菌濃度之線性關係。結果顯示，其線性關係介於  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL ( $R^2=0.9945$ )。亦整理相關研究之結果，如表 23。

Cawthorn 及 Witthuhn 於 2008 年研究則係以 100  $\mu\text{g/mL}$  之 PMA 結合傳統 PCR 測試 *E. sakazakii*，以評估 PMA 是否可在含有高濃度死菌之樣本中區分不同初始濃度之活性細菌，因此備製濃度為  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 之活性細菌，而將  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 活性細菌依不同比例 0%、25%、50%、75% 及 100%，分別加入濃度為  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 之受熱細菌，以傳統 PCR 觀察混合樣本之反應。結果顯示，在混合死活兩類細菌的樣本中，相對於僅有活性細菌之樣本而言，其含有不同活菌比例 (0%、25%、50%、75% 及 100%) 之混合細菌樣本於傳統 PCR 偵測結果，其 DNA 量相對百分比分別為 0%、24%、51%、73% 及 97%，而未添加死菌所得之 DNA 量則分別為 0%、25%、50%、75% 及 100%。比較兩類樣本之結果，顯示在不同濃度之活性 *E. sakazakii* 加入高濃度之死菌，其活性細菌 DNA 量與未添加死菌所得之 DNA 量並無太大差異，因此認為即使於混合樣本中，PMA 仍具有分辨活性細菌之能力 (Cawthorn & Witthuhn, 2008)。

EMA 結合 qPCR 時也有相似的結果報告於過往的文獻中。Wang 等人 (2010) 曾針對 *Salmonella* 進行不同活性菌濃度之線性關係實驗，將  $10^6$  cfu/mL 之死菌分別加入  $10^1 \sim 10^9$  cfu/mL 之活性 *Salmonella* 中，並以 10  $\mu\text{g/mL}$  EMA 進行樣本處理與 qPCR 分析。結果顯示，其所測得之活性細菌 DNA 量與可培養活性細菌濃度 (cfu/mL) 間，在濃度為  $10^2 \sim 10^9$  cfu/mL 內呈現良好的線性關係 ( $R^2=0.9792$ ) (Wang & Mustapha, 2010)。另 Pilar 等人 (2009) 針對 *L. pneumophila* 以濃度為 2.5  $\mu\text{g/mL}$  之 EMA 搭配 qPCR 進行測試，同樣以混合活性與死菌之實驗觀察 EMA 是否可在高濃度死菌中定量活性細菌，該作者將  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 之受熱細菌，加入濃度分別為  $1.0 \times 10^8$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、及  $1.0 \times 10^5$  cfu/mL 之活性細菌中，並以 qPCR 加以定量。結果顯示，其所得之 DNA 量與可培養活性細菌濃度 (cfu/mL) 間，在在濃度範圍為  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$  cfu/mL 時呈現良好之線性 (Pilar et al., 2009)。

Lee 與 Levin (2009)以鱈魚為對象，以 EMA 與 PMA 結合 qPCR 進行不同活性菌濃度之線性關係實驗。將不同濃度 ( $3.2 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $3.2 \times 10^7$  及  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)之活性細菌，分別加入濃度為  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 之死菌，並以  $1 \mu\text{g/mL}$  之 EMA 或  $3 \mu\text{g/mL}$  之 PMA 處理。結果顯示，兩種核酸染劑在上述活性細菌濃度範圍( $3.2 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$ 、 $3.2 \times 10^7$  及  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)中，皆呈現良好之線性，其最佳線性範圍為  $3.2 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$  cfu/mL。

綜合上述各研究顯示，其所測試之活性細菌濃度範圍有異，但多介於  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL (Wang & Mustapha, 2010; Pilar et al., 2009; Lee & Levin, 2009)；而添加死菌之濃度亦不盡相同，分別為  $1 \times 10^6$  (Wang & Mustapha, 2010)、 $1 \times 10^7$  (Cawthorn & Witthuhn, 2008) 與  $1 \times 10^8$  (Pilar et al., 2009; Lee & Levin, 2009) cfu/mL。本研究活菌測試範圍皆比上述文獻廣，介於  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL，而添加死菌之濃度亦最高 ( $1 \times 10^8$  cfu/mL)，在研究設計上更為嚴謹。從本研究結果顯示，當活菌濃度  $\geq 10^4$  cfu/mL 時，不含死菌的樣本與混合活菌與死菌的樣本在活菌的測量數值相當 ( $p=0.75$ )，顯示其不受死菌的干擾，可正確定量活性細菌的濃度，其最佳線性範圍介於  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL ( $R^2=0.9945$ )。進一步與其他相關文獻做比較 (Lee & Levin, 2009; Pilar et al., 2009; Wang & Mustapha, 2010)，本研究之偵測上限為最高 ( $1 \times 10^{10}$  cfu/mL)；偵測下限濃度亦低於 Pilar (2009)針對 *L. pneumophila* 測試活性細菌之線性結果 ( $1.0 \times 10^5$  cfu/mL)及 Lee 與 Levin (2009)在鱈魚上偵測活性總細菌之結果 ( $3.2 \times 10^5$  cfu/mL)。進一步與 Lee 及 Levin (2009)之總細菌的研究比較，本研究之良好線性範圍 ( $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL)相較於 Lee 與 Levin 研究 ( $3.2 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$  cfu/mL)為廣，偵測下限也比 Lee 與 Levin 研究為低，故同樣以總細菌為測試對象，本研究所建立的活性細菌線性範圍較 Lee 與 Levin (2009)為佳。另外，本研究之偵測下限值比 Wang & Mustapha (2010)之研究 ( $2 \log$  cfu/mL)高，相較於 Wang 等人 (2010)以單一類細菌 (*Salmonella*) 為對象，本研究較高的偵測下限結果，可能係因本研究偵測對象為總細菌，受 qPCR 試劑中含有細菌 DNA 之干擾，故當測試之活性細菌濃度低於  $10^4$  cfu/mL 時，其 DNA 濃度與未添加任何細菌之結果趨近相似，故無法精確分辨濃度低於  $10^4$  cfu/mL 之樣本，使得下限濃度受到限制所致。有關試劑干擾之探討論述於 7.6 節中。

表 23、EMA/PMA-qPCR 定量活性細菌濃度之線性關係

對象	viable cells conc. (cfu/mL)	dead cells conc. (cfu/mL)	核酸染劑/ 濃度	最佳線性範圍 (cfu/mL)	R <sup>2</sup>	參考文獻
Total bacteria from air	1×10 <sup>1</sup> to 1×10 <sup>10</sup>	1×10 <sup>8</sup>	1.5 µg/mL PMA	1×10 <sup>4</sup> ~1×10 <sup>10</sup>	0.9945	This study
Total bacteria from fish	3.2×10 <sup>5</sup> 、1.0×10 <sup>6</sup> 、3.2×10 <sup>6</sup> 、 1.0×10 <sup>7</sup> 、3.2×10 <sup>7</sup> 及 1.0×10 <sup>8</sup>	1×10 <sup>8</sup>	3 µg/mL PMA 1 µg/mL EMA	3.2×10 <sup>5</sup> ~1×10 <sup>8</sup>	-	Lee & Levin, 2009
<i>E. sakazakii</i>	0、2.5×10 <sup>6</sup> 、5.0×10 <sup>6</sup> 、7.5×10 <sup>6</sup> 及 1.0×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	100 µg/mL PMA	-	-	Cawthorn & Witthuhn, 2008
<i>Salmonella</i>	1×10 <sup>1</sup> to 1×10 <sup>9</sup>	1×10 <sup>6</sup>	10 µg/mL EMA	1×10 <sup>2</sup> ~1×10 <sup>9</sup>	0.9792	Wang & Mustapha, 2010
<i>L. pneumophila</i>	1×10 <sup>5</sup> , 1×10 <sup>6</sup> , 1×10 <sup>7</sup> , 1×10 <sup>8</sup>	1×10 <sup>8</sup>	2.5 µg/mL EMA	1×10 <sup>5</sup> ~1×10 <sup>8</sup>	-	Pilar et al., 2009

## 7.5 總細菌 copies 與 cells 之相關性探討

以 qPCR 定量細菌時，其濃度的表示方式之一係以 DNA copies 之量來呈現 (Bach et al., 2002)，然若能轉換成以細菌數目來呈現職業場所勞工的暴露，將更具意義。然不同細菌在所偵測之 DNA 片段上之 copy number 不全然相同，故進一步回顧目前以 qPCR 定量總細菌之研究，以解析他人如何處理此議題。

Nadkarni 等人(2002)曾以 qPCR 作為定量臨床牙齒樣本中總細菌之方法。偵測對象為細菌之 16S rDNA，透過使用 forward primer (TCCTACGGGA GGCAGCAGT)與 reverse primer (GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT)引子，作者將不同 copy number 之三種菌種：*E. coli* (copy number=7)、*Pseudomonas aeruginosa* (copy number=4)及 *S. aureus* (copy number=9) 進行混合，並以 qPCR 與培養法分別分析之；其中，qPCR 方面，係以 *E. coli* 經引子對放大(forward primer 及 reverse primer 片段之基因位置為 331 及 797，其放大總長度為 466 bp)，再將所得之 DNA 重量以 *E. coli* 細菌作為換算細菌數的基準(1 *E. coli* cell 之 DNA 重量為 4.96 fg)。結果顯示，以 qPCR 所得之 DNA 重量若以 *E. coli* 作為依據轉換，其換算所得之細菌數( $1.3 \times 10^9$  cells/mL)與培養法所得結果( $1.4 \times 10^9$  cells/mL)相似。因此，作者認為 *E. coli* 可作為總細菌數換算之依據。

Rinsoz 等人(2008)在廢水處理廠進行空氣採樣，並以 qPCR 作為定量總細菌濃度之方法，偵測對象為細菌之 16S rDNA，引子對係參考 Nadkarni 等人(2002)之設計。此團隊在處理其數據時，亦參考 Nadkarni 等人(2002)之方法，以 *E. coli* 作為依據將 DNA 重量換算細菌數。另外，Li 等人(2010)於地面上與距離地面 238 公尺之高塔上進行空氣中總細菌濃度監測，偵測對象亦是細菌之 16S rDNA，而引子對也參考 Nadkarni 等人(2002)之設計。在處理數據時，係將 qPCR 定量之結果換算成 DNA 濃度(copies/L)後直接除上 4.1，以得到以細菌數呈現的濃度值(cells/L)，然 Li 等人(2010)並未詳述原因。另 Harms 等人於 2003 年，以 qPCR 定量廢水處理廠之總細菌，其引子對係使用 forward primer (ATGGCTGTCGTCAGCT) 與 reverse primers (ACGGGCGGTGTGTAC)，而作者係假設總細菌之平均 copy 數為 3.6，因此在數據處理時，將 qPCR 定量之結果換算成 DNA 濃度(copies/L)後直接除上 3.6，以得到細菌數濃度值(cells/L)。另 Rothrock 等人於 2012 年定量土壤中總細菌，其引子對係參考 Harms 等人(2003)

之設計，在細菌數換算時，亦參考 Harms 等人(2003)之方法。

本研究偵測對象亦為細菌之 16S rDNA，使用之引子對為 DG74 forward primer (AGGAGGTGATCCAACCGCA)與 RW01 reverse primer (AACTGGAGGAAGGTGGGGAT) (Greisen et al, 1994)，與上述研究 (Nadkarni et al., 2002; Rinsoz et al., 2008; Li et al., 2010; Harms et al., 2003; Rothrock et al., 2012) 不同。考量不同引子對所夾取之 DNA 片段不同，其在細菌內之 DNA copies 數也可能不同。加以不同細菌對此 DNA 片段所擁有的 copies 數也可能不同，故本研究將不同環境(醫療院所、木材行、畜牧業及家禽業)採集之空氣細菌樣本，經過培養以增加細菌濃度後，調整總細菌濃度為  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL，同步進行 qPCR 以及 Baclight/Microscope 計數。將所得數據建立 DNA copies 數目與細菌數之檢量線。如此，即可將環境樣本以 qPCR 所測得總細菌及活性細菌之 DNA copies，經由帶入檢量線得到細菌數後，進一步校正採樣體積以得到採樣環境空氣中細菌濃度 (cells/m<sup>3</sup>)。而亦整理其他使用檢量線方式換算細菌數之文獻(如表 24)，發現有研究係以可培養細菌數(cfu)與 qPCR 所得之 copies 或 DNA 量建立檢量線如表 24，但本研究認為當偵測對象為總細菌時，認為以培養細菌數與 qPCR 之 copies 或 DNA 量之方式建立檢量線，換算濃度時導致低估所偵測對象之濃度 (cfu/m<sup>3</sup>)，由於培養法無法偵測處於 VBNC 之細菌(詳見文獻回顧)，因此認為以培養法及 qPCR 建立總細菌檢量線不妥。而與本研究同樣以顯微鏡鏡檢所得之細菌數與 qPCR 分析之 copies 數建立檢量線之方式，已應用於定量原蟲上，例如 Bridle 等人於 2010 年以 qPCR 定量 *Neoparamoeba perurans*，檢量線建立之方式係以配置不同濃度之 *N. perurans* 懸浮液，同時以顯微鏡計數及 qPCR 分析，將所得之原蟲數目與 DNA copies 數建立檢量線，作為未知樣本換算原蟲數之依據 (表 24); 因此本研究認為以 qPCR 及 Baclight/Microscope 計數建立環境檢量線之方式是可接受的，且應用於環境驗證的數據顯示 (表 17)，經此檢量線所得到不同採樣地點的濃度，其總細菌濃度均大於活性細菌濃度，且後者亦大於可培養細菌濃度，顯示以此建立檢量線的方式，可以適當的將 DNA copies 數目換算細菌數，並進一步獲得空氣中暴露濃度值。



表 24、qPCR vs 細菌數檢量線整理

對象	檢量線建立之方法	R <sup>2</sup>	公式	參考文獻
Total bacteria from air	顯微鏡鏡檢(Baflight)所得之細菌數與 qPCR 所得之 copies 數建立檢量線	0.96 0.97	Total bacteria: Y (log cells/sample)= 1.03 X (log copies/sample)- 0.63 Viable bacteria: Y (log cells/sample)= 1.09 X (log copies/sample)- 0.86	This study
<i>Neoparamoeba perurans</i>	顯微鏡鏡檢(cells)與 qPCR 所得之 copies 數建立檢量線	0.999	Y (copy number)=2008X (cells)	Bridle et al., 2010
<i>Acanthamoeba</i>	顯微鏡鏡檢(cells) hemocytometer vs qPCR 所得之 DNA quantity (fg) 建立檢量線	0.99	Y (DNA log fg)= 1.177X (log cells/sample)-0.209	Chang and Wu, 2010
<i>Hartmannella vermiformis</i>	Fluorescence microscope 所得之細菌數(cells)與 qPCR 所得之 copies 數建立檢量線	0.99	Y (Ct)=-3.75X (log cells/sample)+28.4	Kuiper et al., 2006
<i>Lactococcus garvieae</i>	可培養細菌數(cfu/mL)與 qPCR 所得之 Ct 值建立檢量線	0.989	Y (Ct)= -4.3932X (log cfu/mL)+ 39.871	Jung et al., 2010
<i>Trypanosoma brucei</i>	可培養細菌數(cells/mL)與 qPCR 所得之 Ct 值建立檢量線	0.997	-	Becker et al.,2004
<i>Streptococcus thermophilus</i>	可培養細菌數(cells/mL)與 qPCR 所得之 Ct 值建立檢量線	0.998	Y (Ct)= -3.4289X (log cfu/mL)+ 45.017	Ongol et al., 2009
<i>C. jejuni</i> <i>Campylobacter lanienae</i>	可培養細菌數(cells/mL)與 qPCR 所得之 copies 數建立檢量線	0.99	Y (log genome copies)= 0.91X (log cfu/g) -1.85	Inglis and Kalischuk, 2004

### 7.5.1 TSB 可培養之細菌群探討

TSA 為最常應用於總細菌或單一細菌之培養基質 (Vieira and Nahas, 2005)。而 TSB 與 TSA 之差別為 TSA 多了一項 Agar 成分,其餘成分皆相同(詳如 5.1 節)。因此認為 TSA 可以培養之細菌菌種,同時也可以在 TSB 中被培養。然本研究在建立 copies 數換算細菌數之環境檢量線時,考慮 Baclight 搭配顯微鏡下計數細菌數時,有高偵測下限之限制,基此將四種不同環境(醫療院所、雞舍、豬舍及木材行)採集之環境樣本以 TSB 大量培養細菌群,作為環境檢量線製作之菌液來源。而經 TSB 大量培養之細菌群時,培養過程環境中優勢菌種可能會被優先放大,導致與原先之環境中細菌種類不同,總細菌菌種進而在 qPCR 貢獻之 copies 數可能不同,影響細菌數換算檢量線之正確性。為了解樣本經 TSB 培養之細菌群與實際環境空氣之細菌群是否有差異,故整理四種環境地點之空氣中主要細菌菌種(表 25),同時亦統整 TSA 可培養之細菌菌種(如表 26),觀察四個環境地點之空氣中主要細菌菌種是否可在 TSA 被培養。

表 26 顯示, TSA 可以培養大約有 25 種細菌菌屬分為: *Alcaligenes spp.*、*Arthrobacter spp.*、*Aureobacterium spp.*、*Bacillus spp.*、*Brevibacterium spp.*、*Cellulomonas spp.*、*Curtobacterium spp.*、*Enterobacter spp.*、*Escherichia spp.*、*Exiguobacterium spp.*、*Flavobacterium spp.*、*Halomonas sp.*、*Hydrogenophaga spp.*、*Klebsiella spp.*、*Kluyvera spp.*、*Marinobacter sp.*、*Methylobacterium sp.*、*Microbacterium spp.*、*Micrococcus spp.*、*Mycobacterium sp.*、*Pantoea spp.*、*Phyllobacterium spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Serratia spp.* 及 *Staphylococcus spp.*。四種環境地點的主要細菌菌種(表 25)為 *Bacillus spp.*、*Micrococcus spp.*、*Staphylococcus spp.*、*Pseudomonas sp.*、*Pantoea agglomerans*、*Corynebacterium sp.* 及 *Enterococcus spp.*, 除了 *Rahnella* 菌種目前尚未發現可以在 TSA 上生長,其餘的主要細菌皆可以生長在 TSA 上,認為 TSA 可培養之菌種,在 TSB 亦可被培養;因此空氣樣本以 TSB 培養之細菌菌種與原先之環境中細菌種類差異可能不大,且本研究之 TSB 加入葡萄糖的成分(如 5.1 節),理當可培養較多細菌菌種。雖然些許細菌(如 *L. pneumophila*)無法在 TSA 上生長,但多數菌種(目前整理 132 種細菌)係可以被 TSA 培養出來(表 26),因此認為以 TSB 培養細菌群做為檢量線建立之菌液來源,其菌群的變化影響細菌數換算檢量線之正確性應該不大。

表 25、四種環境地點之主要細菌菌種

	主要細菌菌種	參考文獻
醫療院所	<i>Bacillus spp</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i>	Wan et al., 2011
家禽舍	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Micrococcus sp</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Bacillus</i> <i>Kocuria</i> <i>Staphylococcus</i>	Vučemilo et al., 2007      Awad et al., 2010
畜牧業	<i>S. aureus</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Gibbs et al., 2006 Matkovic et al., 2007
農田	<i>P. agglomerans</i> <i>Aureobacterium testaceum</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Curtobacterium pusillum</i> <i>Microbacterium spp.</i> <i>P. agglomerans</i> <i>Rhodococcus fascians</i> <i>Sanguibacter keddieii</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	Skórska et al., 2005 Góra et al., 2009
木材行	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>P. agglomerans</i> <i>Rahnella sp.</i> <i>Streptomyces albus</i> <i>Bacillus sp.</i> Pseudomonadacea <i>Coliforms</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	Dutkiewicz et al., 2001     Oppliger et al., 2005  Gioffre et al., 2012

表 26、TSA 可培養之細菌菌種

菌種			參考文獻
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			Straka and Stokes, 1959
<i>Pseudomonas geniculata</i>			
<i>Pseudomonas ovalis</i>			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	McInroy and Kloepper, 1995
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Pantoea spp.</i>	
<i>Alcaligenes spp.</i>	<i>Curtobacterium spp.</i>	<i>Phyllobacterium spp.</i>	
<i>Arthrobacter spp.</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	
<i>Aureobacterium spp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas fluor, spp.</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas nofluor, spp</i>	
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Rhizobium japonicum</i>	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>	<i>Serratia spp.</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Hydrogenophaga spp</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	
<i>Burkholderia pickettii</i>	<i>Kluyvera spp.</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<i>Burkholderia solanacearum</i>	<i>Methylobacterium spp.</i>	<i>Variovorax paradoxus</i>	
<i>Cellulomonas spp.</i>	<i>Microbacterium spp.</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>	

表 26、TSA 可培養之細菌菌種(續)

菌種		參考文獻
<i>S. aureus</i>		Cohen et al., 1998
<i>Bacillus</i>		
<i>Diphtheroides</i>		
<i>Pseudomas aeruiginosa</i>		
<i>Sarcinia Lutea</i>		
<i>S. marcescens</i>		
<i>Bacillus pumulis</i>		Halverson et al., 2000
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		
<i>Streptomyces griseus</i>		
<i>Acinetobacter</i>		Spanggaard et al., 2000
<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Moraxella</i>		
<i>Pseudomonas spp.</i>		
<i>Vibrionaceae</i>		
<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>	McCaig et al., 2001
<i>Bacillus insolitus</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i>	
<i>Bacillus macroides</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i>	
<i>Cellulomonas turbata</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	
<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	
<i>Methylobacterium sp.</i>	<i>Streptomyces lavendulae</i>	
<i>Mycobacterium sp.</i>	<i>Xanthomonas sacchari</i>	
<i>Pseudomonas pictorum.</i>	<i>Zoogloea ramigera</i>	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>		

表 26、TSA 可培養之細菌菌種(續)

菌種	參考文獻
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Choi et al., 2003
<i>Abiotrophia defectiva</i>	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	
<i>Halomonas sp.</i>	Yoshie et al., 2006
<i>Marinobacter sp.</i>	
<i>P. agglomerans</i>	Medrano and Bell, 2007
<i>Arthrobacter citreus</i>	Al Bulushi et al., 2008
<i>M. luteus</i>	
<i>S. aureus</i>	
<i>S. epidermidis</i>	
<i>V. vulnificus</i>	Esteve and Alcaide, 2009
<i>Aeromonas jandaei</i>	
<i>Aeromonas bestiarum</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Anguillicola crassus</i>	
<i>Edwardsiella tarda</i>	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	
<i>Pseudomonas/Alcaligenes,</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i> Tsai and Liu, 2009
<i>Bacillus firmus</i>	
<i>Brevibacterium spp.</i>	
<i>Micrococcus spp.</i>	
<i>Staphylococcus arlettae</i>	
<i>S. aureus</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i>	
<i>Staphylococcus intermedius</i>	
<i>Staphylococcus kioosii</i>	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i> Awad et al., 2010
<i>Alcaligenes</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Diplococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Enterobacter</i>	
<i>E. coli</i>	
<i>Flavobacterium</i>	
<i>Klebsiella</i>	
<i>Kocuria</i>	

表 26、TSA 可培養之細菌菌種(續)

	菌種	參考文獻
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	Liu et al., 2010
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	
<i>Bacillus pumilus.</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>	
<i>Endophytic bacteria</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<i>Exiguobacterium spp.</i>		
<i>Micrococcus spp</i>		
<i>Mycobacterium spp.</i>		
<i>Jeotgalicoccus aerolatus</i>		Martin et al., 2011
<i>Jeotgalicoccus coquinae</i>		
<i>Acidovorax</i>	<i>Pantoea</i>	Yashiro et al., 2011
<i>Aeromicrobium</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Aurantimonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	
<i>Curtobacterium</i>	<i>Terracoccus</i>	
<i>Friedmanniella</i>	<i>Xylophilus</i>	
<i>Frigoribacterium</i>		
<i>Frondihabitans</i>		
<i>Labedella</i>		
<i>Massilia</i>		
<i>Methylobacterium</i>		
<i>L. monocytogenes</i>		Su and D'Souza, 2012
<i>S. Typhimurium</i>		

## 7.6 NTC 之 Ct

一般而言，當 PCR 所得的 Ct 值大於 40 時，意味著該樣本受到 PCR 抑制物之干擾致使其 target DNA 無法被偵測，或是代表沒有 target DNA 之存在 (Rønning et al., 2003)。本研究中，沒有置入 target DNA 之 NTC，其 Ct 平均值為 31.35 (SD=0.95)，意味著該樣本含有可被引子黏合與偵測的 DNA。此低於 40 之 NTC Ct 值也曾報告於其他以 universal primers 定量總細菌之相關研究中。如 **錯誤! 找不到參照來源。** Liu 等人(2005)以 qPCR 進行金屬表面總細菌濃度監測之研究時，其 NTC 之 Ct 值約為 32；而 2011 年 Kommedal 等人針對肝臟檢體樣本進行總細菌濃度評估，其所得之 NTC 之 Ct 值為 33。至於 Lee 及 Levin (2009) 在定量魚肉中總細菌時，其所得 NTC 之 Ct 值則為  $29.53 \pm 1.53$ 。

### 7.6.1 出現 NTC Ct 值之原因探討

NTC 出現低 Ct 值之原因之一，可能係因使用之引子在 DNA 複製過程中產生 primer dimer 所致。因此本研究將 NTC 樣本進行 melting curve 分析，結果如圖 30，其溫度 peak 大約於  $88.5^{\circ}\text{C}$ 。由於 primer dimer 多為小片段 DNA，其 melting temperature 多落在  $82^{\circ}\text{C}$  以下 (Hill & Goldspink, 2003)。而 primer dimer 的 A-T 鍵結與 C-G 鍵結的多寡決定 melting temperature，因此進一步將本研究與 Hill 及 Goldspink 之引子對做比較 (表 28)，本研究之 A-T 鍵結之 base pair 有 3 組、C-G 鍵結之 base pair 有 6 組；另 Hill 及 Goldspink 之 A-T 鍵結之 base pair 有 4 組、C-G 鍵結之 base pair 有 9 組，顯示 Hill 及 Goldspink 之引子對之鍵結組數較本研究多，且 Hill 等人研究顯示 primer dimer 之 melting temperature 落在  $82^{\circ}\text{C}$  以下。而本研究之引子對之黏合組數較 Hill 等人少 (表 28)，理當 melting temperature 應低於  $82^{\circ}\text{C}$ ，因此本研究 (圖 30) NTC 高 melting temperature 產物應該不是 primer dimer。

另一 NTC 出現低 Ct 值之原因，可能與 qPCR 試劑內含有 free DNA 所造成之污染有關。文獻曾指出，當使用 qPCR 定量總細菌時，可能因使用之 DNA 聚合酶遭到 DNA 污染，導致 NTC 出現 Ct 值 (Corless et al., 2000; Lyons et al., 2000)。由於 qPCR 所使用之 Taq polymerase，係從熱泉中之細菌 *Thermus aquaticus* 分離出來，因此 polymerase 可能含有前述細菌之 DNA。而亦有研究指出 primer 亦會貢獻 free-DNA，Goto 等人於 2005 年針對三種不同廠商 (Invitrogen, Japan、TaKaRa, BIO 及 PROLIGO, Japan) 合成之引子進行試劑污染測試，結果顯示廠牌 Invitrogen 於 66 次



測試中，皆有測出DNA；而TaKaRa於18次測試，有5次測出DNA；另PROLIGO在60次測試中，皆未測出DNA。顯示不同廠牌合成之primer含有free-DNA之程度亦不同。而作者進一步針對四種廠牌之polymerase及三種廠牌之primer進行不同組合之空白(未添加DNA template)測試(如表 29)，並以傳統PCR分析並作定序，結果顯示試劑中(polymerase及primer)含有*Delftia tsuruhatensis*、*Klebsiella variicola*、*Klebsiella pneumoniae*、*Paenibacillus sp.*及 *Klebsiella oxytoca*等菌種；而Zehr 等人於2003年，使用引子16S rRNA，forward primer (5'-ACWCCTACGGGWGGC AGCA-3') 與reverse primer (5'-CCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')(forward primer 及 reverse primer片段於*E. coli*之基因位置為338及926，其放大總長度為588 bp)，以傳統PCR分析試劑polymerase及primer(未添加DNA template)，而將結果定序後，發現試劑(polymerase及primer)中含有*Acinetobacter*、*Propionibacterium*、*Staphylococcus*、*Actinomyces*、*Stenotrophomonas*及*Delftia*等菌種。而進一步對照兩篇文獻於試劑測試結果，發現皆含有*Delftia*菌種。而Kulakov等人於2002年針對工廠所使用之超純水系統(Ultrapure Water)進行水質檢測，發現純水中含有*Ralstonia pickettii*、*Bradyrhizobium sp.*、*Pseudomonas saccharophilia* 及 *Stenotrophomonas*等菌種(Kulakov et al., 2002)。而有趣的是於Zehr等人(2003)以傳統PCR分析polymerase及primer之空白測試(未添加DNA template)中亦含有*Stenotrophomonas*菌種。因此推論試劑合成所使用之超純水系統中，可能存在細菌，進而生成生物膜(biofilm)，以致合成之polymerase或primer即含有上述菌之free-DNA導致試劑污染(Zehr et al., 2003; Goto et al., 2005)。因此本研究亦認為當以universal primers進行qPCR時，此使用之試劑中之free DNA即被引子放大，導致NTC出現Ct數值之情況。相關試劑之DNA污染情形如表 29。

### 7.6.2 解決 NTC 之 Ct 值限制

由於使用universal primer偵測總細菌時，即面臨到NTC會出現Ct值之狀況，因此Corless等人於2000年嘗試以化學或物理之方法解決試劑背景值之限制，將polymerase以不同強度之UV照射、不同濃度之DNase I (100, 30, 25, 20, 10, and 5 U/L)及不同限制內切酶(*AvaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *Sau3AI*, and *SmaI*)進行實驗，而每組實驗皆有控制組(positive control: *N. meningitides* 或*E. coli*.之DNA)與NTC (negative

control)做對照。其結果顯示，未照射UV之控制組與NTC之Ct分別為23.71及27.21，當照射UV 強度為 $4 J/cm^2$ 時，NTC之Ct值 $>45$ ，但控制組之Ct值則為35.45，顯示以UV處理雖然可以改善NTC之Ct，同時亦會犧牲控制組偵測之正確性；而以DNase I處理時，係將polymerase加入DNase I後，以 $37^\circ C$  10分鐘，使DNase I與polymerase之free DNA作用，接著以5分鐘 $95^\circ C$ 破壞DNase I之活性。DNase I之結果顯示，未處理之控制組與NTC之Ct分別為23.5及28.93，DNase I濃度須高至30 U/L時，方可使NTC之Ct值 $>45$ ，但同時控制組之Ct值亦 $>45$ ；而五種限制酶之測試結果顯示，雖然控制組之Ct值(17.26)與有限制酶處理之Ct值(16.77~16.12)無差異，但沒有限制酶處理之NTC值為28.61，有限制酶處理之Ct值介於27.8~29.2，顯示限制酶的處理並無法使NTC之Ct值改善。因此以UV或DNase I處理下，雖然可改善NTC之Ct值，但同時polymerase之活性可能亦受到物理或化學性之破壞，使qPCR敏感度變差；而Bispo等人於2011年做類似實驗亦發現此結果，將兩種不同之試劑(SYBR Green supermix及TaqMan Universal PCR Master Mix)以DNase I處理，並將加入DNase I之樣本以 $37^\circ C$  30分鐘，使DNase I與polymerase之free DNA作用，接著以 $95^\circ C$  50分鐘破壞DNase I之活性。結果顯示，兩種試劑以DNase I處理後，*S. epidermidis*之DNA標準品( $10 ng/\mu L \sim 1 fg/\mu L$ )，其放大效率SYBR Green supermix及TaqMan Universal PCR Master Mix分別為1.8及1.7，作者亦認為polymerase之活性可能受到DNase I處理之過程中被破壞，使qPCR放大效率變差。因此截至目前為止尚未有一個可以改善NTC之Ct值且同時不會影響標準品定量之正確性的解決方法。

### 7.6.3 總結

綜合上述，使用universal primer作為定量時，NTC之Ct值應為qPCR試劑所貢獻(表 29)。而一般認為以probe於定量上較具專一性，在NTC之結果可能較使用SYBR Green佳，因此進一步比較不同研究使用之qPCR試劑(表 27)，觀察是否probe較SYBR Green為佳，例如Li等人(2010)與An等人(2006)使用之引子皆參考Nadkarni之設計(2002)，但探針Li等人係使用probe ((6-FAM)-5-CGTATTAC CGCGGCTGCTGGCAC-3-(TAMRA))；An等人係使用SYBR Green。於NTC之Ct值分別為28.5 (Li et al., 2010)及 $30.2 \pm 0.36$  (An et al., 2006)，顯示如果未來將SYBR Green換成probe未必能改善NTC之問題。而文獻指出(詳如7.6.1節)，不同廠商合

成之試劑或primer其含free DNA程度亦不同(Zehr et al., 2003; Goto et al., 2005)。推論qPCR試劑的純度可能會影響NTC之Ct值。因此進一步比較以universal primer 定量總細菌之相關研究所使用之qPCR試劑廠牌(如表 27)，試劑廠牌使用Bio-Rad 其NTC之Ct值介於29.53~31.3；而使用Applied Biosystems其NTC之Ct值介於33~38。試劑之廠牌似乎會影響其NTC之Ct值，且以上述兩者廠牌比較，顯示Applied Biosystems之free DNA污染率比Bio-Rad低一些；因此本研究認為未來供應商是否發展更純之試劑供研究使用，應為改善NTC之關鍵；而未來也許可以先針對不同廠商合成之引子或試劑對進行測試，使用free DNA污染率較低之試劑，或許可以改善目前NTC之問題。



表 27、以 universal primer 定量總細菌之 NTC Ct 值

地點/對象	引子	探針	試劑	NTC 之 Ct 值	參考文獻
Mixed bacteria from air	AGGAGGTGATCCAACCGCA AACTGGAGGAAGGTGGGGAT (Greisen <i>et al.</i> 1994)	SYBR Green	SYBR Green supermix (Bio-Rad)	31.3	This study
Mixed bacteria from fish fillets	AGGAGGTGATCCAACCGCA AACTGGAGGAAGGTGGGGAT (Greisen <i>et al.</i> 1994)	SYBR Green	SYBT Green supermix (Bio-Rad)	29.53±1.53	Lee & Levin, 2009
重金屬回收技術(bioleaching)利 用 universal primer 夾取 <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Sulfobacillus acidophilus</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Sulfobacillus</i> <i>thermosulfidooxidans</i> <i>Sulfolobus sp.</i> <i>Acidianus brierleyi</i> 來設計上述六種細菌或古生細 菌之引子	GTAGTCCMSGCYSTAAACGATG AGCTGRCGACRRCCATGCA	SYBR Green	Sybr Green PCR Master 32 Mix (Applied Biosystems)	32	Liu et al., 2005
以 universal primers screening 臨床檢體樣本之總細菌，將 qPCR 之結果定序鑑定細菌菌 種	TTGGAGAGTTTGATCMTGGCTC GTATTACCGCGGCTGCTG (Edwards et al., 1989)	SYBR Green	SYBR master mix (TaKaRa)	33	Kommedal et al., 2011

表 27、以 universal primer 定量總細菌之 NTC Ct 值(續)

地點/對象	引子	探針	試劑	NTC 之 Ct 值	參考文獻
總細菌引子設計	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	(6-FAM)-5-CGTATTACCGCGGCTG CTGGCAC-3-(TAMRA)	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	33~38	Nadkarni et al., 2002
screening 血小板濃厚液之細菌	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT (Nadkarni et al., 2002)	(6-FAM)-5-CGTATTACCGCGGCTG CTGGCAC-3-(TAMRA) (Nadkarni et al., 2002)	TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems)	36	Mohammadi et al., 2005
植栽土壤總細菌濃度監測-玉米及小麥	GGTAGTCYAYGCMSTAAACG GACARCCATGCASCACCTG	FAM-TKCGCGTTGCDTCGAATTA AWCCAC-TAMRA	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	35	Bach et al., 2002
監測距離高塔地面 0 m 與 238 m 之空氣總菌濃度	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT (Nadkarni et al., 2002)	(6-FAM)-5-CGTATTACCGCGGCTG - CTGGCAC-3-(TAMRA) (Nadkarni et al., 2002)	-	28.5	Li et al., 2010
實驗室評估-於 BSC 中將 <i>E.coli</i> 氣膠化，並採樣定量其濃度空氣樣本	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT (Nadkarni et al., 2002)	SYBR Green	SYBR Green supermix (Bio-Rad)	30.2±0.36	An et al., 2006

表 28、primer dimer 比較

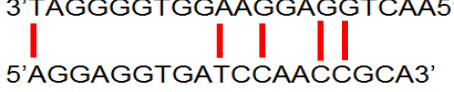
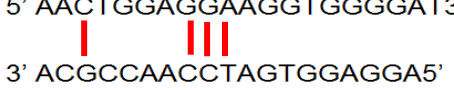
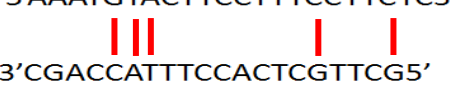
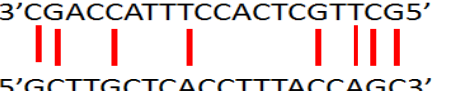
引子對	A-T 與 C-G	參考文獻
3'TAGGGGTGGAAGGAGGTCAA5'  5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3'  5' AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3'  3' ACGCCAACCTAGTGGAGGA5'	A-T : 3 組 C-G : 6 組	This study
5'AAATGTACTTCCTTTCCTTCTC3'  3'CGACCATTTCCTTTCCTTCTC3'  3'CGACCATTTCCTTTCCTTCTC5'  5'GCTTGCTCACCTTACCAGC3'	A-T : 4 組 C-G : 9 組	Hill & Goldspink, 2003

表 29、qPCR 試劑之 free-DNA 汙染情形

qPCR reagent	試劑廠牌	Source of contamination	References
Taq DNA polymerase	-		
primer	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Invitrogen, Japan</li> <li>■ TaKaRa, BIO</li> <li>■ PROLIGO, Japan</li> </ul>	<i>nifH</i>	Goto et al., 2005
Reagent (polymerase, primer)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Polymerase               <ul style="list-style-type: none"> <li>■ TaKaRa Taq (TaKaRa BIO, Shiga, Japan),</li> <li>■ TaKaRa Ex Taq (TaKaRa BIO)</li> <li>■ AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),</li> <li>■ Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)</li> </ul> </li> <li>● Primer               <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Invitrogen, Japan</li> <li>■ TaKaRa, BIO</li> <li>■ PROLIGO, Japan</li> </ul> </li> </ul>	<i>Delftia tsuruhatensis</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Goto et al., 2005
Reagent (polymerase, primer)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Polymerase               <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promega (Taq DNA polymerase)</li> <li>■ Takara (ExTaq™; Madison, WI, USA)</li> <li>■ BD Biosciences Clontech (TITANIUM™ Taq; Palo Alto, CA, USA),</li> <li>■ Ambion (SuperTaq™),</li> <li>■ GeneChoice (Taq Complete; Frederick, MD, USA).</li> </ul> </li> </ul>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Stenotrophomonas</i> <i>Delftia</i>	Zehr et al., 2003

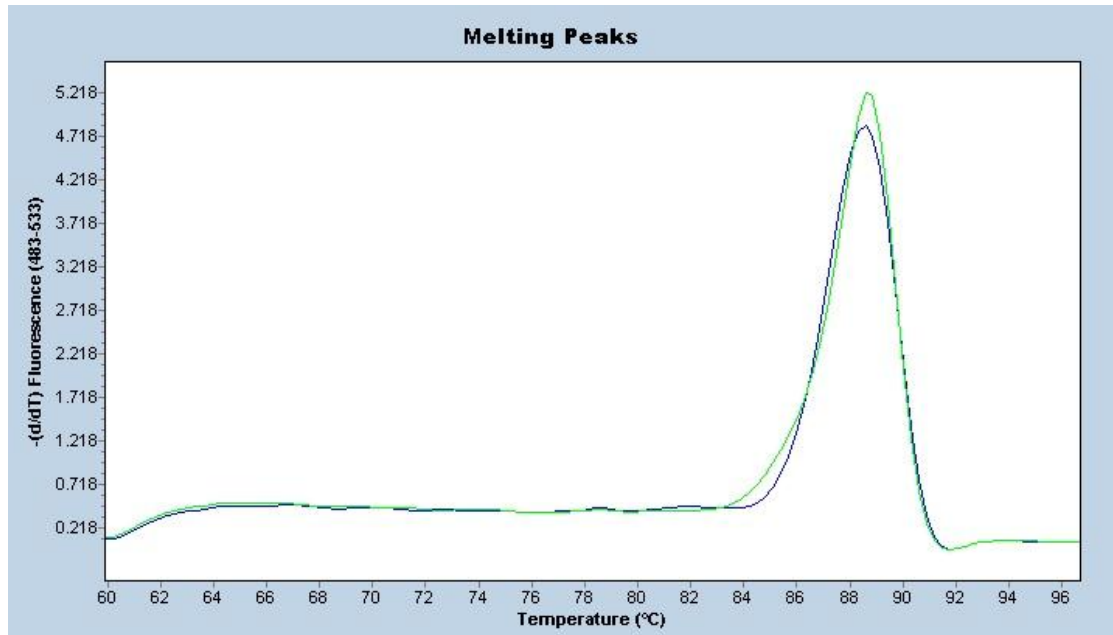


圖 30、NTC 之 Melting curve



## 7.8 研究限制與建議

由於受限於NTC之Ct值，影響本研究方法之偵測下限，進而影響本方法於一些低濃度環境樣本之直接定量。然此可透過結合適當的採樣器，在增加採樣時間與採樣流量下，提升樣本中細菌數量加以改善。

本研究認為未來改善NTC也許可以先針對不同廠商合成之引子或試劑對進行測試，使用free DNA污染率較低之試劑，或許可以改善目前NTC之問題。

除分析技術外，空氣採樣方法亦是影響正確定量生物氣膠的關鍵因素。建議未來亦應對此進行探究，以期能建立監測與定量職業場所空氣中活性細菌的採樣與分析方法。





## 第八章 結論

1. 本研究顯示，在所評估之濃度 23  $\mu\text{g/mL}$  EMA 及 PMA，於螢光顯微鏡下觀察，EMA 或 PMA 皆可進入受熱細菌的細胞膜內，但 EMA 也會進入完整細胞膜內，而 PMA 較無此情況。
2. 本研究顯示，在所評估之各濃度 EMA 及 PMA 中，1.5  $\mu\text{g/mL}$  PMA 可有效抑制受熱組細菌於 qPCR 放大，且在此濃度下，不會對活性細菌造成 qPCR 定量濃度之干擾。因此以 1.5  $\mu\text{g/mL}$  PMA 濃度做為結合 qPCR 定量空氣中活性細菌之最佳條件。
3. 進一步以最佳核酸染劑條件 1.5  $\mu\text{g/mL}$  PMA 評估細菌濃度定量範圍，結果顯示，最佳線性範圍介於  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/mL。
4. 將開發之方法進行職業場所空氣採樣之樣本分析，量測場所包括畜牧場、家禽舍、木材行、水稻田、蔬菜田及醫療院所。結果顯示所開發之 PMA/qPCR 方法確實可作為定量空氣中活性細菌之分析方法。



## 參考文獻

1. Al Bulushi, I. M., Poole, S., Deeth, H. C., Dykes, G. A.. 2008. Quantitative assessment of total and Gram-positive aerobic bacteria in fresh and ambient-temperature-stored sub-tropical marine fish. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1867–1875.
2. Alvarez, A. J., Buttner, M. P., Toranzos, G. A., Dvorsky, E. A., Toro, A., Heikes, T. B. 1994. The use of solidphase polymerase chain reaction for the enhanced detection of airborne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 374–376.
3. Angenent, L. T., Kelley, S. T., Amand, A., Pace, N. R., Mark, T., & Hernandez, M. T. 2005. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4860–4865.
4. Awad, A.H.A., Elmorsy, T.H., Tarwater, P. M., Green, C.F., Gibbs, S. G.. 2010. Air biocontamination in a variety of agricultural industry environments in Egypt: a pilot study. *Aerobiologia*. 26:223–232.
5. Bach, H.J., Tomanova, J., Schloter, M. and Munch, J. C. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods* 49: 235–245.
6. Ballard, A. L., Fry, N. K., Chan, L., Surman, S. B., Lee, J. V., Harrison, T. G. and Towner, K.J. 2000. Detection of *Legionella pneumophila* Using a Real-Time PCR Hybridization Assay. *Journal of clinical microbiology* 38: 4215-4218.
7. Bauer, M., Mathieu, L. A., Deloge-Abarkan, M., Remen, T., Tossa, P., Hartemann, P., Zmirou-Navier, D. 2008. Legionella bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes. *J Epidemiol Community Health* 62:913-920.
8. Becker, S., Franco, J. R., Simarro, P. P., Stich, A., Abel, P.M., Steverding, D. 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 50: 193–199.
9. Brescia, C. C., Griffin, S. M., Ware, M. W., Varughese, E. A., Egorov, A. I. and Villegas, E. N. 2009. *Cryptosporidium parvum* monoazide-PCR, a molecular

- biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 75: 6856-6863.
10. Bridle, A.R., Crosbie, P.B.B., Cadoret, K., Nowak, B.F. 2010. Rapid detection and quantification of *Neoparamoeba perurans* in the marine environment. *Aquaculture* 309 :56–61.
  11. Buchbinder, B., Trebesius, K. and Heesemann, J. 2002. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 241-245.
  12. Burge, H. 1989. Airborne allergenic fungi: Classification, nomenclature and distribution. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 9(2): 307–319.
  13. Burrell, R. 1995. Immunotoxic reactions in the agricultural environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2(1): 11–20.
  14. Chang, C. W. and Chou, F. C. 2011. Assessment of Bioaerosol Sampling Techniques for Viable *Legionella pneumophila* by Ethidium Monoazide Quantitative PCR. *Aerosol Science and Technology* 45:343–351.
  15. Chang, C. W. and Hung, P. Y. 2012. Methods for Detection and Quantification of Airborne Legionellae Around Cooling Towers. *Aerosol Science and Technology*, 46:369–379.
  16. Chang, C.W. and Wu, Y.C..2010. Evaluation of DNA extraction methods and dilution treatment for detection and quantification of *Acanthamoeba* in water and biofilm by real-time PCR. *Water Science & Technology—WST*. 2141-2149.
  17. Chen, N. T. and Chang, C.W. 2010. Rapid Quantification of Viable Legionellae in Water and Biofilm Using Ethidium Monoazide Coupled with Real-Time Quantitative PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109:623–634.
  18. Chen, P. S. and Li, C. H. 2005. Bioaerosol characterization by flow cytometry with fluorochrome. *J. Environ. Monit.* 7: 950-959.
  19. Chi, M. C. and Li, C. S. 2005. Fluorochrome and Fluorescent In Situ Hybridization to Monitor Bioaerosols in Swine Buildings, *Aerosol Sci. Technol.* 39:1101–1110.
  20. Chi, M. C. and Li, C. S. 2006. Analysis of Bioaerosols from Chicken Houses by Culture and Non-culture Methods. *Aerosol Sci. Technol.* 40:1071–1079.

21. Chi, M. C. and Li, C. S. 2007. Fluorochrome in Monitoring Atmospheric Bioaerosols and Correlations with Meteorological Factors and Air Pollutants. *Aerosol Science and Technology*. 41:672–678.
22. Choi, J.H., Sohn, J.I., Lee, M., Shin, S.W., Koh, S.C.. (2003). Neural network modeling for nutrient dynamics in a recycling piggery slurry treatment system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 21–27.
23. Cohen, H.A., Liora, H., Paret, G., Lahat, E., Kennet, G., Barzilai, A. (1998). Aurioscope earpieces—a potential vector of infection?. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 45 : 47–50.
24. Cox, C.S., 1989. Airborne bacteria and viruses. *Science Progress* 73:469–499.
25. Crook, B., Roberston, J. F., Glass, S. A., Botheroyd, E. M., Lacey, J., and Topping, M. D. 1991. Airborne dust, ammonia, microorganisms and antigens in pig confinement houses and the respiratory health of exposed farm workers. *American Industrial Hygiene Association Journal* 52(7): 271–279.
26. Delgado-Viscogliosi, P., Solognac, L. & Delattre, J. M. 2009. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol* 75: 3502-3512.
27. Dutil, S., Veillette, M., Mériaux, A., Lazure, L., Barbeau, J. and Duchaine, C. 2007. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environmental Microbiology* 9: 2836-2843.
28. Dutkiewicz, J. 1992. Bacteria and their products as occupational allergens. *Pneumonologiai Alergologia Polska* 60(2): 14–21.
29. Dutkiewicz, J., Krysinska-Traczyk, E., Shorska, C., Sitkowska, J., Prazmo, Z., & Urbanowicz, B. 2000. Exposure of agricultural workers to airborne microorganisms and endotoxin during handling of various vegetable products. *Aerobiologia* 16: 193–198.
30. Dutkiewicz, J., Skorska, C., Krysinska-Traczyk, E., Dutkiewicz, E., Matuszyk, A., Sitkowska, J.. 2001. Response of sawmill workers to work-related airborne allergens. *Ann Agric Environ Med* 8: 81–90.
31. Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C. and Green, B. J. 1990. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J.*

- Environ. Monit* 14: 334-339.
32. Esteve, C., Alcaide, E.. (2009). Influence of diseases on the wild eel stock: The case of Albufera Lake. *Aquaculture* 289 : 143–149.
  33. Flekna, G., Stefanic, P., Wagner, M., Smulders, F. J., Mozina, S. S. and Hein, I. 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol* 158: 405-412.
  34. Fittipaldi, M., Rodriguez, N. J., Codony, F., Adrados, B., Penuela, G. A. and Morato, J. 2010. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods* 168: 228-232.
  35. Fittipaldi, M. , Nocker, A. , Codony, F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*. 91 : 276–289.
  36. Gibbs, S. G., Green, C. F., Tarwater, P. M., Mota, L. C., Mena, K. D., Scarpino, P.V.. 2006. Isolation of Antibiotic-Resistant Bacteria from the Air Plume Downwind of a Swine Confined or Concentrated Animal Feeding Operation. *Environmental Health Perspectives*. 114: 1032-1037.
  37. Gioffre, A., Marramao, A., Ianno, A. 2012. Airborne Microorganisms, Endotoxin, and Dust Concentration in Wood Factories in Italy. *Ann. Occup. Hyg.*, Vol. 56, No. 2 :161–169.
  38. Gilbert, Y. and Duchaine, C. 2009. Bioaerosols in industrial environments: a review. *Can. J. Civ. Eng.* 36: 1873–1886.
  39. Góra, A., Mackiewicz., B., Krawczyk, P., Golec, M., Skórska , C., Sitkowska, J., Cholewa, G., Larsson, L., Jarosz, M., Fatla, A., Dutkiewicz, J. 2009. Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in Poland. *Ann Agric Environ Med* 16:143-150.
  40. Goto, M., Ando, S., Hachisuka, Y., Yoneyama, T.. 2005. Contamination of diverse *nifH* and *nifH*-like DNA into commercial PCR primers. *FEMS Microbiology Letters*. 246:33–38.
  41. Halverson, L. J.,\* Jones, T. M., Firestone, M. K.. 2000. Release of Intracellular Solutes by Four Soil Bacteria Exposed to Dilution Stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:1630–1637.

42. Heidelberg, J. F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., Colwell, R., 1997. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63:3585–3588.
43. Hein, I., Schneeweiss, W., Stanek, C. and Wagner, M. 2007 Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Methods* 71: 336-339.
44. Henningson, E. W., Lundquist, M., Larsson, E., Sandstriim, G. and Forsman, M. 1997. A comparative study of different methods to determine the total number and the survival ratio of bacteria in aerobiological samples. *Aerosol Sci.* 28(3):459-469.
45. Herman, L., 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiol.* 14:103–110.
46. Hill, M., and Goldspink, G. 2003. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 549.(2) : 409–418.
47. Inglis, G. D., and Kalischuk, L.D.. 2004. Direct Quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in Feces of Cattle by Real-Time Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 70: 2296–2306
48. Inoue, D., Tsutsui, H., Yamazaki, Y., Sei, K., Soda, S., Fujita, M. and Ike, M. 2008 Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) coupled with ethidium monoazide treatment for selective quantification of viable bacteria in aquatic environment. *Water Sci Technol* 58: 1107-1112.
49. Jung, M.Y., Chang, Y.. and Kim, W.. 2010. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. *Journal of Applied Microbiology.* 108: 1694–1701.
50. Kuiper, M. W., Valster, R. M., Wullings, B.A., Boonstra, H., Smidt, H., and Kooij, D. 2006. Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in Surface Water by Using Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 72: 5750–5756.
51. Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Hall, G. S. and Bauer, T. W. 2009 a. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Letters in Applied Microbiology* 48: 633–638.

52. Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Hall, G. S. and Bauer, T. W. 2009 b. Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Orthop Res* 27: 1243-1247.
53. Kralik, P., Nocker, A. and Pavlik, I. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int J Food Microbiol* 141 Suppl 1: S80-86.
54. Kulakov, L.A., McAlister, M.B., Ogden, K. L., Larkin, M. J., and O'Hanlon, J.F. 2002. Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: . 1548–1555.
55. Lee, J. L. and Levin, R. E. 2010 Selective Detection of Mixed Bacterial Survivors from Fish Fillets after Freezing and Thawing by Ethidium Bromide Monoazide Real-Time PCR. *Food Biotechnology*. 24:270–281.
56. Lee, J. L. and Levin, R. E. 2009. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *Journal of Microbiological Methods*. 76:93–96.
57. Lee, J. L. and Levin, R. E. 2007. Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* 118:312–317.
58. Lee, J. L. and Levin, R. E. 2006. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 67: 456–462.
59. Li, K., Dong, S., Wu, Y. and Yao, M. 2010. Comparison of the biological content of air samples collected at ground level and at higher elevation. *Aerobiologia* 26: 122-144.
60. Liu, H. M., Lin, Y. H., Tsai, M. Y. and Lin, W. H. 2010. Occurrence and characterization of culturable bacteria and fungi in metalworking environments. *Aerobiologia* 26:339–350.
61. Lyons, S. R., Griffen, A. N. & Leys, E. J. 2000. Quantitative realtime PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 38: 2362-2365.
62. Mackiewicz, B. 1998. Study on exposure of pig farm workers to bioaerosols, immunologic reactivity and health effects. *Annals of Agricultural and*

*Environmental Medicine* 5: 169–175.

63. Mathieu, L., Robine, E., Deloge-Abarkan, M., Ritoux, S., Pauly, D., Hartemann, P. and Zmirou-Navier, D. 2006. Legionella bacteria in aerosols: sampling and analytical approaches used during the Legionnaires disease outbreak in Pas-de-Calais. *The Journal of Infectious Diseases* 193:1333–1335.
64. Matković, K., Vučemilo, M., Vinković, B., Šeol, B., Pavičić, Ž., Matković, S.. 2007. Qualitative structure of airborne bacteria and fungi in dairy barn and nearby environment. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 2007 (8): 249–254.
65. Martin, E., Klug, K., Frischmann, A., Busse, H. J., Kämpfer, P., Jäckel, U.. 2011. *Jeotgalicoccus coquinae* sp. nov. and *Jeotgalicoccus aerolatus* sp. nov., isolated from poultry houses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61: 237–241.
66. McCaig, A. E., Grayston, S. J., Prosser, J. I., Glover, L. A.. 2001. Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 37-48.
67. Medrano, E.G., Bell, A.A. 2007. Role of *Pantoea* agglomerans in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology*. 102 :134–143.
68. Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A. and Hunter, N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148: 257–266.
69. Nocker, A. and Camper, A. K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* 72: 1997-2004.
70. Nocker, A., Cheung, C. Y. and Camper, A. K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67: 310-320.
71. Nocker, A., Sossa, K. E. and Camper, A. K. 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 70: 252-260.
72. Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A. K. and Brousseau, R. 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods* 76: 253-261.



73. Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H. and Rudi, K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 34: 804-808, 810, 812-803.
74. Oliver, J. and Bockian, R. 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of vibrio vulnificus. *Applied and environmental microbiology* 61: 2620–2623
75. Olsson, M., Lidman, C., Latouche, S., Bjo`rkman, A., Roux, P., Linder, E., et al. 1998. Identification of Pneumocystis cariniif. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1737–1740.
76. Ongol, M. P., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K.. 2009. A real-time PCR method targeting a gene sequence encoding 16S rRNA processing protein, rimM, for detection and enumeration of Streptococcus thermophilus in dairy products. *Food Research International*. 42 :893–898.
77. Oppliger, A., Charrie N., Droz, P. O., Rinsoz, T..2008. Exposure to Bioaerosols in Poultry Houses at Different Stages of Fattening; Use of Real-time PCR for Airborne Bacterial Quantification. *Ann. Occup. Hyg.* 52: No. 5, 405–412.
78. Oppliger, A., Rusca, S., Charriere, N., Duc, T.V., Droz, P.O.. 2005. Assessment of Bioaerosols and Inhalable Dust Exposure in Swiss Sawmills. *Ann. occup. Hyg.*, Vol. 49, No. 5, 385–391.
79. Pan, Y. and Breidt, J. F. 2007. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Applied and Environmental Microbiology*.73: 8028–8031.
80. Pilar, D. V.,\* L, S. and Delattre J. M. 2009. Viability PCR, a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable *Legionella pneumophila* Cells in Environmental Water Samples. *Applied and environmental microbiology*. 75: 3502–3512.
81. Rinsoz, T., Duquenne, P., Guylaine G.M., Oppliger, A. 2008. Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmospheric Environment* 42 :6767–6774.

82. Rudi, K., Moen B., Drømtorp S. M., and Holck A. L. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and environmental microbiology* 71:1018–1024.
83. Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S. M. and Holo, H. 2005. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 40: 301-306.
84. Safatov, A. S., Andreeva, I. S., Belan, B. D., Buryak, G. A., Emelyanova, E. K., Jaenicke, R., Panchenko, M. V., Pechurkina, N. I., Puchkova, L. I., Repin, V. E., Saranina, I. V. and Sergeev, A. N. 2008. To What Extent Can Viable Bacteria in Atmospheric Aerosols be Dangerous for Humans? *Clean* 36 (7): 564 – 571.
85. Sarter, S., Kha Nguyen, H. N., Hung, L. T., Lazard, J., Montet, D.. 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18: 1391–1396.
86. Sawyer, M. H., Chamberlain, C. J., Wu, Y. N., Aintablian, N., & Wallace, M. R. 1994. Detection of Varicella-Zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *Journal of Infectious Diseases* 169: 91–94.
87. Sheridan, G.E., Masters, C.I., Shallcross, J.A., MacKey, B.M., 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1313–1318.
88. Singh, A., and Singh, A. B. 1994. Airborne fungi in a bakery and the prevalence of respiratory dysfunction among workers. *Grana* 33: 349–358.
89. Skórska, C., Sitkowska, J., Krysińska-Traczyk, E., Cholewa, G., Dutkiewicz, J. 2005. Exposure to airborne microorganisms, dust and endotoxin during processing of peppermint and chamomile herbs on farms. *Ann Agric Environ Med* 12: 281-288.
90. Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F., Gram, L.. 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182 : 1–15.
91. Straka, R. P., Stokes, J. L.. 1959. Metabolic Injury to Bacteria at Low Temperatures. *Journal of bacteriology*: 78(2):181-185.
92. Su, Xiaowei., D’Souza, D. H.. 2012. Reduction of Salmonella Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on produce by trisodium phosphate. *LWT - Food Science and Technology* 45 :221-225.

93. Surekha, M., Krishnareddi, V., & Reddi, S. M. 1996. Aeromycoflora of poultry shed in relation to incidence of mycotoxigenic fungi. *Journal of Palynology* 32: 135–141.
94. Tomazetto, G., Mulinari, F., Staniscuaski, F., Settembrini, B., Carlini, C. R., Marco Antonio Zachia Ayub. 2007. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology* 41:821–827.
95. Vesper, S., McKinstyrb, C., Hartmann, C., Neaced, M., Yoderd, S., Vespere, A. 2008. Quantifying fungal viability in air and waters amples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *Journal of Microbiological Methods* 72: 180–184.
96. Varma, M., Field, R., Stimson, M., Rukovets, B., Wymer, L. and Haugland, R. 2009. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Res* 43: 4790-4801.
97. Vučemilo, M., Vinković, B., Matković, K., Brezak, R.. Bioaerosol in laying hen house. ISAH-2007 Tartu, Estonia.
98. Wan, G.H., Chung, F.F., Tang, C.S.. 2011. Long-term surveillance of air quality in medical center operating rooms. *American journal of infection control*. 39: 302–308.
99. Wang, L. and Mustapha, A. 2010. EMA-Real-Time PCR as a Reliable Method for Detection of Viable Salmonella in Chicken and Eggs. *Journal of food science*. 75: M134-M139.
100. Wang, S. and Levin, R. E. 2006. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *J Microbiol Methods* 64: 1-8.
101. Yáñez, M. A., Nocker, A., Elena, S.S., Múrtula, R., Martínez, L., a, Catalán, V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 85 :124–130.
102. Yashiro, E., Spear, R.N., McManus, P.S.. 2011. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1284–1296.
103. Yoshie, S., Ogawa, T., Makino, H., Hirosawa, H., Tsuneda, S. and Hirata, A.

2006. Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. *Letters in Applied Microbiology* 42: 277–283.
104. Zehr, J.P., Crumbliss, L.L., Church, M. J., Omoregie, E.O., and Jenkins, B. D.. 2003. Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: implications for studies of diversity of functional genes. *BioTechniques* 35:996-1005.
105. Zhen, S., Li, K., Yina ,L., Yaob, M., Zhanga ,H., Chenc, L., Zhouc, M., Chenc, X., 2009. A comparison of the efficiencies of a portable BioStage impactor and a Reuter centrifugal sampler (RCS) High Flow for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *Aerosol Science* 40:503 – 513.
106. Zhiping, W., Malmberg, P., Larsson, B. M., Larsson, K., Larsson, L., Saraf, A. 1996. Exposure to bacteria in swine-house dust and acute inflammatory reactions in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1261-1266.



附錄

附錄一、總細菌偵測下限

	Ct	log copies/ul	copies.	校正樣本體 積(0.5 ml) copies/ml	cell numbers in the rest aliquot copies/sample	log copies/sample	log cells/sample 帶入總細菌檢 量線	cells/sample	total cell concentration (cells/m <sup>3</sup> )	total cell concentration (cells/m <sup>3</sup> ) mean	total cell concentration (cells/m <sup>3</sup> ) sd
ntc	31.65	1.73	173.28	346.56	693.12	2.84	2.31	203.98	271.98	233.47	49.25
ntc	31.64	1.74	173.55	347.09	694.19	2.84	2.31	204.31	272.41		
ntc	30.16	2.13	213.12	426.24	852.49	2.93	2.40	252.66	336.88		
ntc	32.17	1.59	159.37	318.75	637.50	2.80	2.27	187.08	249.44		
ntc	32.55	1.49	149.21	298.43	596.85	2.78	2.24	174.76	233.02		
ntc	31.48	1.78	178.00	356.00	712.00	2.85	2.32	209.73	279.64		
ntc	31.89	1.68	168.00	336.00	672.00	2.83	2.30	197.56	263.41		
ntc	30.16	1.91	191.00	382.00	764.00	2.88	2.35	225.59	300.79		
ntc	31.06	1.67	167.00	334.00	668.00	2.82	2.29	196.34	261.79		
ntc	32.96	1.06	105.74	211.49	422.98	2.63	2.09	122.41	163.21		
ntc	30.2	1.82	181.98	363.95	727.90	2.86	2.33	214.58	286.10		
ntc	31.93	1.52	151.53	303.06	606.13	2.78	2.25	177.57	236.76		
ntc	31.76	1.56	155.98	311.96	623.92	2.80	2.26	182.96	243.95		
ntc	31.74	1.57	156.50	313.01	626.02	2.80	2.26	183.60	244.80		
ntc	30.85	1.80	179.80	359.59	719.18	2.86	2.33	211.92	282.56		
ntc	31.55	1.29	128.72	257.44	514.87	2.71	2.18	150.00	200.00		

ntc	31.92	1.18	118.20	236.39	472.78	2.67	2.14	137.34	183.12
ntc	33.96	0.60	60.18	120.36	240.71	2.38	1.83	68.34	91.12
ntc	31.65	1.26	125.87	251.75	503.50	2.70	2.17	146.58	195.44
ntc	31.64	1.26	126.16	252.32	504.63	2.70	2.17	146.92	195.89
ntc	30.16	1.68	168.25	336.50	673.00	2.83	2.30	197.86	263.82
ntc	32.88	0.91	90.89	181.79	363.57	2.56	2.02	104.68	139.57
ntc	30.11	1.70	169.67	339.34	678.69	2.83	2.30	199.59	266.12
ntc	30.98	1.45	144.93	289.86	579.72	2.76	2.23	169.58	226.10
ntc	30.19	1.67	167.40	334.79	669.59	2.83	2.29	196.83	262.44
ntc	31.13	1.41	140.66	281.33	562.65	2.75	2.22	164.42	219.22
ntc	30.85	1.49	148.63	297.25	594.50	2.77	2.24	174.05	232.07
ntc	32.26	1.09	108.53	217.05	434.10	2.64	2.10	125.74	167.65
ntc	31.74	1.23	123.31	246.63	493.26	2.69	2.16	143.50	191.33
ntc	31.93	1.18	117.91	235.82	471.64	2.67	2.14	137.00	182.66
ntc	31.76	1.23	122.75	245.49	490.98	2.69	2.15	142.81	190.41
ntc	30.2	1.67	167.11	334.22	668.45	2.83	2.29	196.48	261.97
ntc	30.06	1.71	171.09	342.19	684.37	2.84	2.30	201.32	268.43
ntc	30.39	1.62	161.71	323.42	646.83	2.81	2.28	189.92	253.22
ntc	30.89	1.47	147.49	294.98	589.95	2.77	2.24	172.67	230.23
ntc	30.3	1.64	164.27	328.54	657.07	2.82	2.29	193.02	257.37

附錄二、活性總細菌偵測下限

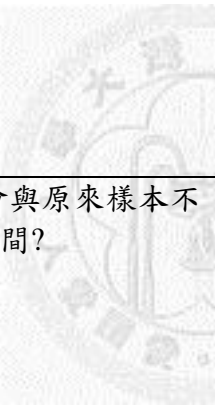
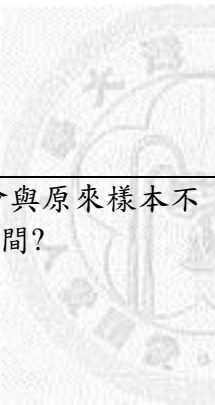
	Ct	log copies/ul	copies.	校正樣本體 積(0.5 ml) copies/ml	cell numbers in the rest aliquot copies/sample	log copies/sample	log cells/sample 帶入活性細菌 檢量線	cells/sample	Viable cell concentration (cells/m <sup>3</sup> )	Viable cell concentration (cells/m <sup>3</sup> ) mean	Viable cell concentration (cells/m <sup>3</sup> ) sd
ntc	31.65	1.73	173.28	346.56	693.12	2.84	2.22	166.22	221.62	189.05	41.59
ntc	31.64	1.74	173.55	347.09	694.19	2.84	2.22	166.49	221.99		
ntc	30.16	2.13	213.12	426.24	852.49	2.93	2.32	208.06	277.42		
ntc	32.17	1.59	159.37	318.75	637.50	2.80	2.18	151.80	202.39		
ntc	32.55	1.49	149.21	298.43	596.85	2.78	2.15	141.32	188.43		
ntc	31.48	1.78	178.00	356.00	712.00	2.85	2.23	171.14	228.18		
ntc	31.89	1.68	168.00	336.00	672.00	2.83	2.21	160.73	214.31		
ntc	30.16	1.91	191.00	382.00	764.00	2.88	2.27	184.74	246.32		
ntc	31.06	1.67	167.00	334.00	668.00	2.82	2.20	159.69	212.92		
ntc	32.96	1.06	105.74	211.49	422.98	2.63	1.99	97.26	129.69		
ntc	30.2	1.82	181.98	363.95	727.90	2.86	2.24	175.29	233.72		
ntc	31.93	1.52	151.53	303.06	606.13	2.78	2.16	143.71	191.61		
ntc	31.76	1.56	155.98	311.96	623.92	2.80	2.17	148.29	197.72		
ntc	31.74	1.57	156.50	313.01	626.02	2.80	2.17	148.83	198.44		
ntc	30.85	1.80	179.80	359.59	719.18	2.86	2.24	173.01	230.68		
ntc	31.55	1.29	128.72	257.44	514.87	2.71	2.08	120.39	160.52		
ntc	31.92	1.18	118.20	236.39	472.78	2.67	2.04	109.75	146.33		
ntc	33.96	0.60	60.18	120.36	240.71	2.38	1.72	52.76	70.35		

ntc	31.65	1.26	125.87	251.75	503.50	2.70	2.07	117.51	156.68
ntc	31.64	1.26	126.16	252.32	504.63	2.70	2.07	117.80	157.06
ntc	30.16	1.68	168.25	336.50	673.00	2.83	2.21	160.99	214.65
ntc	32.88	0.91	90.89	181.79	363.57	2.56	1.92	82.54	110.05
ntc	30.11	1.70	169.67	339.34	678.69	2.83	2.21	162.47	216.62
ntc	30.98	1.45	144.93	289.86	579.72	2.76	2.14	136.93	182.57
ntc	30.19	1.67	167.40	334.79	669.59	2.83	2.20	160.10	213.47
ntc	31.13	1.41	140.66	281.33	562.65	2.75	2.12	132.56	176.75
ntc	30.85	1.49	148.63	297.25	594.50	2.77	2.15	140.72	187.63
ntc	32.26	1.09	108.53	217.05	434.10	2.64	2.00	100.04	133.39
ntc	31.74	1.23	123.31	246.63	493.26	2.69	2.06	114.92	153.22
ntc	31.93	1.18	117.91	235.82	471.64	2.67	2.04	109.46	145.95
ntc	31.76	1.23	122.75	245.49	490.98	2.69	2.06	114.34	152.46
ntc	30.2	1.67	167.11	334.22	668.45	2.83	2.20	159.81	213.08
ntc	30.06	1.71	171.09	342.19	684.37	2.84	2.21	163.94	218.59
ntc	30.39	1.62	161.71	323.42	646.83	2.81	2.19	154.21	205.61
ntc	30.89	1.47	147.49	294.98	589.95	2.77	2.14	139.55	186.07
ntc	30.3	1.64	164.27	328.54	657.07	2.82	2.20	156.86	209.15



口試委員意見回覆

委員意見	回覆
曾老師	
本研究係針對細菌、活菌?是做甚麼菌? 用甚麼對象當方法材料?	謝謝委員的建議。 已於提及菌液之材料方法部分補充說明偵測之對象。 補充在 p.28, 29, 30。
空氣中活菌很重要，但死菌也是有其重要性 (endotoxin、死菌的糞便)也要稍微提及	謝謝委員的建議。 補充相關死菌重要性之文獻，如 p. 3。
菌種拉丁文，有重複者須使用縮寫(結果與討論)	謝謝委員的建議。 已全文檢查。
論文的表格，文中已表示很清楚後，不用再 有表格說明	謝謝委員的建議。 將提及表格之內文作詳細之說明，表格 內容作精簡之修正。 修正如 p. 6, 7, 8, 78。
培養法也是有其優點，黃金標準。且目前研究 也有很多系使用培養法。因此可以提一些優點	謝謝委員的建議。 補充培養法優點之文字說明。 補充如 p. 9。
表格中英文統一	謝謝委員的建議。 將論文之表格進行修改中英文統一。 如 P. 6, 7, 8, 11。
p.19 是總活菌上尚未有人研究。並不是活菌上	謝謝委員的建議。 將文字活性細菌修正為活性總細菌。 如 p. 19。
EMA/PMA 顯微鏡觀察濃度(23 µg/mL)是如何 選擇?	謝謝委員的建議。 此濃度選擇係參考實驗室學姊先前原 蟲之核酸染劑結合 qPCR 方法開發之參 數。
P.60 圖 25，最後選擇是 PMA 1.5 µg/mL? 認為濃度 1 µg/mL 也不錯	謝謝委員的建議。 本研究在濃度 1 µg/mL 顯示可抑制死菌 放大偵測且不會干擾活性細菌定量，但 認為以濃度為 1.5 µg/mL 處理樣本，會 比 1 µg/mL 保守，且 1 及 1.5 µg/mL 也 未達統計上顯著差異，因此認為濃度 1.5 µg/mL 為最佳。
Primer 的選擇?與古生細菌僅差一個 base pair， primer 不一定就黏不到。	謝謝委員的建議。 以古生細菌 <i>Methanococcoides burtonii</i> 作為關鍵字查詢 web of science 資料 庫，共有 72 篇文獻；而其中僅有 2 篇 文獻係採集環境樣本，且分離出此株古 生細菌，其餘皆為針對此株古生細菌做 生化等實驗。 而 2 篇文獻提及偵測到 <i>M. burtonii</i> 之環

	<p>境分別為南極洲之冰湖及日本的深海沉積物中，顯示此株古生細菌可能較喜愛生長於極端之環境當中，因此推測一般環境空氣中，存在此株古生細菌之機會不高。</p> <p>補充如詳 p.43, 44。</p>
p.50 建議也將檢量線補入(放大效率 $R^2$ )	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>已補入檢量線及 <math>R^2</math>，如 P. 51。</p>
p.52 baclight 不是顯微鏡而是染劑	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>已作文字更正。如 p. 53。</p>
p.57 討論章節，應將本研究發現(結果)與其他文獻比較?	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>於討論章節，補上本研究與其他研究的比較、發現、與不同之處。如 p. 73~101。</p>
李老師	
<p>P.54 圖 20，EMA unheated (多)與 heated (少)的紅點差很多。</p> 	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>此結果以定量之方式表示。</p> <p>將同視野下以光學及螢光顯微鏡觀察之細菌數以密度(cells/field)呈現，並將被核酸染劑進入而呈現紅色亮點之細菌數密度以百分比表示。</p> <p>詳如 p. 54。</p>
<p>環境檢量線係經培養在做稀釋會與原來樣本不同(失真)，未來是否有改進的空間?</p> 	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>由於顯微鏡有高偵測下線之限制，以致樣本中微生物濃度需要很高，方能精確計數、定量。因此本研究選擇以培養而得之細菌群做為檢量線建立之細菌來源；而培養之方法，使用之培養基質可能使細菌種類受到限制。為瞭解此限制是否影響細菌數換算之檢量線之正確性，因此整理了四個環境地點的空氣中主要細菌菌種，並觀察空氣中主要細菌菌種是否可以在 TSB 中生長；查詢結果顯示，四個環境地點之空氣中主要細菌菌種，大部分皆可以在 TSB 中生長，因此認為以 TSB 培養細菌群做為檢量線建立之菌液來源，其菌群的變化影響細菌數換算檢量線之正確性應該不大。</p> <p>詳如 p. 92~97。</p>
<p>不同品牌 DNA 污染不同。應該由廠商他們自己把關，是否可由本研究給廠商建議?</p>	<p>謝謝委員的建議。</p> <p>本研究係定量空氣中活性細菌之方法開發，未針對不同品牌之 PCR 試劑做污染測試，因此不太能給予廠商這部分</p>

	之建議。
DNA 稀釋去除抑制物，稀釋倍數換算回去是否會高估實際濃度?	謝謝委員的建議。 樣本之 DNA 稀釋於 PCR 分析結果之 Ct 值，低於偵測下限之 Ct 值才會被納入計算，且在此條件下認為樣本中之 DNA 濃度在儀器上有正確反應，因此在校正稀釋倍數時，不會高估實際 DNA 濃度。
EMA 或 PMA 濃度統一	謝謝委員的建議。 將核酸染劑之兩種濃度單位皆呈現在表格中，並附上換算公式。 詳如 p.20, 21, 84, 85。
線性是否會因為不同菌種而不同?	謝謝委員的建議。 本研究探討核酸染劑結合 qPCR 之定量活性總細菌之方法開發，由於未針對單一菌種做線性之實驗，現階段可能無法有效地去回應此問題。
p.92 內文提及探針=probe，文字修改	謝謝委員之建議。 已作文字修正，如 p. 100。
黃老師	
P.4 表 1 EMF 全名?(全文檢查) p.35 表格 baclight 右邊框框有點多餘(像是 note)	謝謝委員建議。 補上英文全名及流程圖的修改。詳如 P. 4, 35。
p.13 地面 0 m??	謝謝委員建議。 已做文字修改，如 p.13。
開發之方法適用於甚麼環境? 具體條件(細菌濃度、採樣流量建議?)	謝謝委員建議。 本方法由於有高偵測下限之限制，因此環境中細菌濃度須高過本方法之偵測下限，方能正確定量空氣中細菌濃度。而本研究係以 NTC 之 Ct 做為 qPCR 定量總細菌及活性細菌方法偵測下限之依據，並假設 qPCR 分析之 NTC Ct 值為空氣中樣本之 Ct 值，回推計算 qPCR 方法偵測空氣中總細菌及活性總細菌之濃度偵測下限。 補充詳如 p. 69。