

養殖草蝦衛生細菌調查及消毒試驗

王文亮·張士軒·駱秋燕

Sanitary Survey on Grass Prawn and Experiment of Effectiveness on Disinfectant Treatment

Wen-Liang Wang, Shyh-Shiuan Chang and Chiu-Yen Lo

To understand and improve the sanitary quality of cultural grass prawn and sanitary conditions from environment to frozen product, 45 grass prawn samples from ponds, 25 pond water samples, and 17 samples collected from 4 manufacturers during processing stages were investigated.

Aerobic plate count (APC), *E. coli*, and *Salmonella* for grass prawn were $10^5 \sim 10^7$ CFU/g, <18-430 MPN/100g and 8 positives respectively and $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml, <18-540 MPN/100ml, and 4 positives respectively for pond water. All the *Salmonella* positives were found in pond water salinity less than 18 ppt. Fortunately, no *V. cholerae* was detected. When the salinity less than 19 ppt or water temperature over than 28°C, the manufacturer must pay attention to the sanitary status of pond grass prawn, according to the statistics.

Although the APC of raw grass prawn meat for local frozen factories was about 10^6 CFU/g, bathing with tap water containing 200 ppm sodium hypochlorite for 40 min. had 200 times decreasing effect.

Cooking, of course, was the most effective method. However, it must be careful since recontamination might occur during or after cooling by improper treatment.

By adding autoclaved 5% grass prawn meat or 5% grass prawn shell into alkaline peptone water for *in vitro* test, the resistant ability of *V. cholerae* to environment or disinfectant can be increased. This is the reason why the *in vivo* test always far away from the *in vitro* test. Two select strains of *V. cholerae*, i.e. O1 and non-O1 serotype were used in this experiment.

Ozonation accompanied with aeration was used in the purification. 2g per hour of ozone was flowing into 20 l of brackish water (contains 15 ppt salinity at 28°C), there was of no clear and obvious effect to kill *V. cholerae* within 80 min. bathing treatment in this paper.

前 言

本省養殖草蝦在民國 75 年年產量達 45,817 公噸，價值約 109 億新台幣⁽¹⁾，其中大部份供應外

銷，年來因養殖面積迅速擴充，估計年產 10 萬公噸將為時不遠。近年因日本對進口蝦類實施霍亂菌檢疫，一發現帶菌即以銷毀，不僅業者損失慘重，且亦有損其他農水產品之形象，本所乃針對此一問題進行調查。

由於霍亂菌與糞便污染指標菌間並沒有絕對的相關性⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾，且 non-O1 型霍亂菌對公共健康之重要性仍在爭議中⁽⁵⁾，近年世界各沿岸地區的海水及水產生物也不斷發現 non-O1 型霍亂菌，即使最先進的國家如美國^{(4)~(10)}及日本⁽¹¹⁾也屢有發現，顯然霍亂菌在天然水域普遍存在已是不爭之事實，吾人將防不勝防。儘管如此，在未經 WHO 同意前，食品若被檢出霍亂菌，即使是低毒性或無毒性，仍需予以銷燬，吾人對可能發生問題的水產品，仍有必要在養殖環境衛生，加工廠環境消毒，加工人員之衛生及原料之消毒等各方面同時進行改善，以減少霍亂菌發生之機率。

許等⁽¹²⁾曾進行 *in vitro* 試驗發現在 28 - 30 °C 下，含 0.2 mcg/ml Panfuran-S 之海水在 4 小時具有殺滅霍亂菌之效力，同條件下含 1 mcg/ml 之 merthiolate 亦具有效果，二者均在低濃度下有急速殺滅霍亂菌的效力，認為係理想之霍亂殺菌劑。但 1977 年日本發表 Panfuran-S 有致癌性，在同年 7 月禁止使用。劉等⁽¹³⁾發表 furazolidone 0.5 mcg/ml, oxolinic acid 5 mcg/ml, glutaraldehyde 31 mcg/ml 均具高度之殺霍亂菌效果，認為可取代 Panfuran-S 應用在進口虱目魚苗及鰻苗之消毒。董⁽¹⁴⁾試驗將次氯酸鈉、明礬、經基二甲苄銨 (benzalkonium chloride)、有機碘 (商品名 Indophores) 等接種於試管內 (*in vitro* test) 及以活鱉進行 *in vivo* 試驗，認為加工原料鱉須以 Indopores 30 ppm 或經基二甲苄銨 32 ppm 在強力抽水噴沖下消毒 12 小時以上，並應再以清水沖洗 3 - 6 天以免藥物殘留。董⁽¹⁵⁾亦對多種消毒劑 (BKC-50, furazolidone, furalradone, Povidone-iodine, Iodophores, NaOCl, Ca(ClO)₂, acetic acid, lysol, oless 等) 進行單劑與 2 種併用對牛蛙活體人工感染霍亂菌之消毒試驗，由於考慮藥物殘留問題，建議以 50 - 100 ppm NaOCl 進行消毒。陳⁽¹⁶⁾則採用臭氧進行試管內研究，認為臭氧具有殺滅霍亂菌效果，惟當時尚未進行人工染菌草蝦淨化實驗。

本試驗除了調查養殖池草蝦與加工前、加工過程草蝦之衛生細菌狀況外，亦進行數種消毒劑之試管內與人工染菌活體草蝦進行消毒模擬研究。

材料與方法

一、衛生細菌調查：

(一) 採樣地點：

1. 冷凍加工廠：A、B、C、D 四家均在高雄縣市，由原料至加工各重要階段實施採樣。
2. 養殖池：在宜蘭縣、雲林縣、彰化縣草蝦養殖池採取草蝦及池水進行細菌學測定。

(二) 採樣方法及樣品處理：

1. 養殖池水：取 1.5 l 三份盛於滅菌之細口 PE 瓶中，於 6 小時內携回實驗室，其中二份各以 Toyo No. 1 濾紙過濾雜質後，以抽氣方式通過 0.45 μm 濾膜，分別直接投入含 45 ml 之 lactose broth 內及含 45 ml 1% NaCl 之 Alkaline peptone water (以下簡稱 APW) 內。
2. 草蝦：以滅菌之不銹鋼鑷子夾入無菌採樣 PE 袋內，封口後置於不銹鋼製便當盒內，放入以碎冰冷卻之採樣箱在 8 小時內携回實驗室。

戴用無菌 PE 手套剝除草蝦外殼，蝦肉供測定生菌數、大腸桿菌之用；而以整尾草蝦供測定沙門氏菌及霍亂菌之用。以滅菌之不銹鋼刀將上述蝦肉或整尾草蝦切細後，放入無菌燒杯中，以 Polytron 均質機均質之，此不銹鋼打碎頭在每一樣品均質前均以火焰滅菌之。

(三) 衛生指標細菌測定：

取均質後之供試樣品，依下述方法測定：

1. 生菌數 (Aerobic Plate Count) :

池水分別取 0.1 ml、1ml、10ml 各 3 份，前二者需以 0.85 (w/v) 食鹽水加至 10 ml，通過 0.22 μ m 濾膜，濾膜直接貼在營養洋菜培養基 (Merck) 上，以 35 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 培養 48 \pm 2 小時計數菌落數。草蝦肉部份則依 FDA 法⁽¹⁷⁾ 實施之。

2. 大腸桿菌 (*E. coli*) :

池水分別取 0.1 ml、1ml、10 ml、100 ml 各 3 份如上法過濾，濾膜直接投入 LST broth (Merck) 中，以下與草蝦肉部份同。草蝦肉部份則依 FDA 法⁽¹⁷⁾ 實施之。

3. 沙門氏菌 (*Salmonella*) :

池水經 (二) 1. 所述處理後與草蝦肉部份同樣依 FDA 法⁽¹⁷⁾ 實施測定。

4. 霍亂菌 (*V. cholerae*) :

池水經 (二) 1. 所述處理後與草蝦肉部份同樣依 FDA 法⁽¹⁷⁾ 實施分離及生化反應測定。若有嫌疑時再另測定 cholerae red test 陽性後，送請行政院衛生署預防醫學研究所進行血清學鑑定。

(四) pH 測定：使用本國製 " Bentex " 牌 pH 測筆。

(五) 鹽度測定：以 Atago (日本) S / Mill-0 - 100% 型屈折式鹽度計觀測。

二試管內 (*in vitro*) 及人工染菌草蝦 (*in vivo*) 實驗：

(一) 消毒劑 (disinfectants) :

1. I 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite) : 以含 5.3% 有效氯之原液稀釋至適當濃度應用。

2. II 安定化二氧化氯 (stable chlorine dioxide, ClO₂) 係日本 " 新生實業株式會社 " 出品商品名為 " Benmax " 原液濃度為 10,000 ppm, 稀釋至適當濃度應用。

3. III 百可特 (Bioquat-80) : 主成分為經基二甲苄銨 (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride) 佔 80%, 其餘 20% 為水及酒精, 係宜蘭市 " 全信製藥有限公司 " 出品, 稀釋至適當濃度應用。

4. IV. Newmark: 係新記公司代理之 1 種殺菌劑, 其成分為天然物, 經日本財團法人岡山縣預防醫學協會證明對人體無毒性。

5. V. 安期消毒液 (Antiseptol soln.) : 係「中國化學製藥股份有限公司」出品, 含 10% (w/v) benethonium chloride 及 10% (w/v) alkyl arylpolyoether alcohol 之 10% (w/v) 原液, 稀釋至適當濃度使用。

6. VI. AMI-21 C: 係日本 " Nizuma " 公司出品, 主成分為維生素 E、酒精、界面活性劑及其他天然物, 稀釋至適當濃度使用。

(二) 臭氧產生器: 係康儀公司出品之 " 康民牌 " 臭氧產生機 (ozone generator), 在 27 - 28 $^{\circ}$ C 海水中每小時約可產生 2 g 臭氧 (本試驗中未實施臭氧定量, 僅以 KI 試紙試其有效性)。

(三) 菌種: 菌株 A 係台大動物系魚病學研究室所分離出之 O1 型霍亂菌, 菌株 B 係本所由文蛤所分離出之 non-O1 型霍亂菌。

(四) 試管內 (*in vitro*) 試驗: 取上述各種消毒劑, 以含 1% NaCl 之 APW 稀釋至適當濃度分裝 8 ml, 接種一白金耳之新鮮菌種, 立即置 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 培養至 24 小時。同時在 APW 中添加 5% 之草蝦肉或草蝦殼, 作霍亂菌對各種消毒劑之抵抗力試驗。

(五) 人工染菌草蝦消毒試驗 (*in vivo test*) :

將草蝦 (體長 12 \pm 2 cm, 體重 12 \pm 3 g, n=35) 先蓄養在 28 - 29 $^{\circ}$ C, 鹽度 20 ppt 之海水 200 l 中 8 小時 (不投飼); 另在一 50 l 之塑膠桶中放 15 l 與上述同樣的海水, 接種新鮮菌種, 使其濃度為 10⁵/ml, 將草蝦投入其中染菌 2 小時後, 撈出放在不同消毒劑中消毒 30 分鐘, 以整尾草蝦當作供試樣品。

取 10 g 細切供試樣品，加入 90 ml 含 1 % 無菌生理食鹽水中均質，作 10 倍稀釋，各取 0.1 ml 塗抹在 TCBS 上，在 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下培養 24 小時，計數直徑 2 - 4 mm 之黃色菌落數及 TCBS 上之總菌落數。

(六)人工染菌草蝦以臭氧淨化試驗 (ozonation *in vitro* test) :

將草蝦 (體長 6.0 ± 0.5 cm, 體重 3.0 ± 0.3 g, $n = 60$) 先在 28°C 之 15ppt 鹽度半海水中蓄養 1 天 (不投飼)，如上法染菌，然後在 20 l 半海水中通入臭氧，在 0、20、40、60、及 80 分鐘時分別採樣，如上述方法進行細菌學測定。

(七)帶菌器材及廢水處理：

使用過之 PE 手套、手抄網、水桶等以 1/50 倍濃度安期消毒液消毒 30 分鐘，廢水則加安期消毒液至成 1/100 倍濃度，消毒 30 分鐘後煮沸，倒棄於泥土中。

結果與討論

一、養殖草蝦及養殖池水之衛生細菌狀況：

(一)養殖草蝦：

自民國 75 年 8 月起至 76 年 6 月止至全省養殖池採取樣品共 45 件，如表 1 所示生菌數介於 $10^3 - 10^6$ CFU/g 之間，大腸桿菌由 $< 18 - 430$ MPN/100 g，沙門氏菌有 8 件陽性，而霍亂菌均為陰性。依鹽度而言，無論是生菌數、大腸桿菌或沙門氏菌如表 3 所示在 19 ppt 以下污染均較為嚴重；但就統計學上的意義來看，21 ppt 以下鹽度時污染生菌數並無顯著區別 (表 5)，池水鹽度在 17 ppt 以下時，大腸桿菌與沙門氏菌含量就有顯著意義 ($p < 0.001$)，但在 18 - 28 ppt 間於 $p = 0.05$ 之水準上並無顯著差異 (表 5)。依水溫而言，如表 4 所示生菌數、大腸菌、沙門氏菌三者之分佈，均隨水溫之提高而增加較高菌量之百分率；就統計學上的意義而言，於 $21.8 - 29.8^\circ\text{C}$ 間，生菌數在 $p = 0.05$ 水準上並無顯著差異 (表 5)，但大腸桿菌與沙門氏菌在 $\geq 28^\circ\text{C}$ 時則具有顯著性。顯示養殖池水之水溫 $\geq 28^\circ\text{C}$ 及鹽度 ≤ 17 ppt 時，養殖草蝦之衛生狀況欠佳，加工時需注意清洗。

(二)養殖池水：

如表 2 所示，生菌數在 $5.5 \times 10^3 - 5.7 \times 10^6$ CFU/ml，大腸桿菌 $< 18 - 540$ MPN/100 ml，沙門氏菌陽性有 4 件，霍亂菌均為陰性。由表 3 知，池水鹽度在 19 ppt 以下有 75 % 樣品生菌數 $> 10^6$ CFU/ml，而 23 - 28 ppt 間則為 0 %；在 17 ppt 以下時有 50 % 樣品大腸桿菌 > 200 MPN/100ml，當 > 20 ppt 時所有樣品均 ≤ 100 MPN/100 ml；所有沙門氏菌陽性之樣品，均發現在 17 ppt 以下，依鹽度各衛生細菌仍具相當高之顯著性，由表 5 來看，最好能將池水鹽度維持在 20 ppt 以上。就水溫而言，如表 4 所示 $\geq 28^\circ\text{C}$ 時生菌數 $> 10^5$ CFU/ml 達 100 %，其中 $\geq 10^6$ CFU/ml 有 60 %，大腸桿菌 > 200 MPN/100ml 有 60 %，沙門氏桿菌陽性有 40%，其顯著性均在 $0.01 > p > 0.001$ ，但沙門氏菌的 3 個 level 則在 $p = 0.05$ 之水準上均有顯著性 (表 5)，顯示在調查的溫度範圍內，水溫越高時越需注意改善養殖池之衛生。

雖然影響養殖池及養殖水產物之衛生細菌數量的因素甚多，而且 Kenyon 等⁽⁷⁾ 也曾在 37.1 ppt 的海水中分離出 non-O1 型霍亂菌，然而 DePaola 等⁽⁴⁾ 則指出鹽度 > 16 ppt 時霍亂菌出現機率顯著下降，故筆者等認為根據上面的調查結果分析，提高池水的鹽度，對養殖草蝦之衛生品質可能有改善的效果；幸運地，本調查中養殖草蝦及其池水均未發現霍亂菌。

二、冷凍加工廠加工過程衛生狀況：

調查 4 家冷凍加工廠 (編為 A, B, C, D) 之原料及重要階段之衛生狀況，發現原料之生菌數在 10^6 CFU/g 左右，有二廠 (表 6, C 及 D 廠) 之草蝦原料大腸桿菌陽性，有一廠 (D) 之草

表1 養殖池草蝦之衛生調查

Table 1. Sanitary survey on cultural grass prawn from ponds.

日期 Date	池水鹽度 Salinity (ppt)	pH	水溫 Temp. (°C)	生菌數 A P C (CFU/g)	大腸桿菌 <i>E. coli</i> (MPN/100g)	沙門氏菌 <i>Salmonella</i> (+/-)	霍亂菌 <i>V. cholerae</i> (+/-)
8/05/86	26	7.8	29.1	1.0 x 10	< 18	-	-
	17	7.1	29.3	2.4 x 10	270	+	-
9/09/86	20	7.6	29.7	7.3 x 10	31	-	-
	16	7.1	29.7	2.0 x 10	430	+	-
	18	7.2	29.8	4.5 x 10	280	+	-
10/07/86	21	7.1	27.6	5.1 x 10	71	-	-
	21	7.2	27.7	1.8 x 10	45	-	-
	23	7.3	27.6	3.6 x 10	< 18	-	-
11/04/86	19	7.2	26.4	2.4 x 10	60	-	-
	20	7.1	26.7	9.3 x 10	35	-	-
	20	7.1	26.5	8.7 x 10	< 18	-	-
12/02/86	15	7.0	24.4	3.4 x 10	370	+	-
	16	7.1	24.5	4.1 x 10	410	+	-
1/20/87	20	7.4	21.8	6.9 x 10	< 18	-	-
	20	7.4	22.0	7.2 x 10	36	-	-
	21	7.3	21.9	6.6 x 10	40	-	-
4/20/87	28	7.8	23.1	1.0 x 10	< 18	-	-
	28	7.8	23.3	2.4 x 10	< 18	-	-
	27	7.8	23.1	1.6 x 10	< 18	-	-
5/12/87	20	7.4	24.3	1.8 x 10	130	-	-
	21	7.3	24.4	2.4 x 10	61	-	-
	21	7.3	24.5	9.8 x 10	80	-	-
5/19/87	25	7.7	24.5	3.6 x 10	< 18	-	-
	18	7.2	24.5	4.4 x 10	91	-	-
	26	7.6	24.4	3.2 x 10	< 18	-	-
	16	7.1	24.6	7.0 x 10	170	-	-
	19	7.1	24.5	5.1 x 10	19	-	-
6/03/87	19	7.2	26.4	4.8 x 10	54	-	-
	20	7.3	26.4	1.6 x 10	73	-	-
	23	7.4	26.4	4.7 x 10	< 18	-	-
6/04/87	19	7.2	26.4	5.8 x 10	55	-	-
	13	7.0	26.3	8.3 x 10	74	+	-
	16	7.1	26.4	7.2 x 10	93	-	-
6/06/87	17	7.1	26.5	1.4 x 10	100	-	-
	18	7.2	25.8	1.8 x 10	150	-	-
	20	7.4	27.1	5.6 x 10	23	-	-
6/06/87	20	7.3	27.0	4.4 x 10	27	-	-
	19	7.1	26.6	1.8 x 10	210	-	-
	15	7.1	26.8	6.6 x 10	44	+	-
6/07/87	20	7.3	26.7	5.1 x 10	41	-	-
	18	7.3	26.9	8.5 x 10	37	-	-
	25	7.6	26.7	3.7 x 10	< 18	-	-
6/08/87	21	7.5	27.3	6.9 x 10	23	-	-
	16	7.1	26.4	1.4 x 10	130	+	-
	19	7.2	26.4	2.6 x 10	< 18	-	-

表2 草蝦養殖池水之衛生調查

Table 2 Sanitary survey on the pond water of cultural grass prawn.

日期 Date	池水鹽度 Salinity (ppt)	pH	水溫 Temp. (°C)	生菌數 A P C (CFU/ml)	大腸桿菌 <i>E. coli</i> (MPN/100ml)	沙門氏菌 <i>Salmonella</i> (+/-)	霍亂菌 <i>V. cholerae</i> (+/-)
8/05/86	26	7.8	29.1	7.4×10^5	< 18	-	-
	17	7.1	29.3	5.7×10^6	540	+	-
9/09/86	20	7.6	29.7	8.1×10^5	51	-	-
	16	7.1	29.7	1.4×10^6	410	+	-
	18	7.2	29.8	3.6×10^6	350	-	-
10/07/86	21	7.1	27.6	9.1×10^4	28	-	-
	21	7.2	27.7	5.2×10^5	< 18	-	-
	23	7.3	27.6	6.1×10^4	< 18	-	-
1/20/87	20	7.4	21.8	1.1×10^5	36	-	-
	20	7.4	22.0	1.8×10^5	42	-	-
	21	7.3	21.9	2.4×10^5	61	-	-
4/20/87	28	7.8	23.1	2.8×10^4	< 18	-	-
	28	7.8	23.3	5.5×10^5	< 18	-	-
	27	7.8	23.1	4.7×10^4	< 18	-	-
5/12/87	20	7.4	24.3	5.8×10^4	< 18	-	-
	21	7.3	24.4	2.1×10^4	< 18	-	-
	21	7.3	24.5	1.0×10^5	34	-	-
5/19/87	25	7.7	24.5	8.8×10^4	24	-	-
	18	7.2	24.5	2.0×10^6	130	-	-
	26	7.6	24.4	3.4×10^4	< 18	-	-
	16	7.1	24.6	4.6×10^5	36	+	-
	19	7.1	24.5	8.3×10^5	< 18	-	-
6/08/87	21	7.5	27.3	3.7×10^4	< 18	-	-
	16	7.1	26.4	1.8×10^6	180	+	-
	19	7.2	26.4	1.5×10^6	74	-	-

蝦原料沙門氏菌陽性，但4家之霍亂菌無論是原料或在加工階段均為陰性。

A廠之帶尾熟草蝦個別凍結品(倉儲品)，比剛煮熟冷卻後之半製品生菌數高10倍，可見冷卻過程至凍結階段有染菌之可能。B廠整尾草蝦以含200 ppm NaOCl水處理30分鐘，比同樣處理之去頭草蝦生菌數高約500倍，顯見去頭處理後再以含200 ppm NaOCl水處理效果要好得多。C廠以100 ppm NaOCl處理40分鐘，只降低了約4倍，而帶尾草蝦又比去頭草蝦生菌數低了36倍，顯見帶殼時會減低NaOCl之滅菌效力。D廠以自來水浸洗原料可降低生菌數10倍左右，再以含200 ppm之NaOCl水浸洗45分鐘可比原料降低1,000倍左右的生菌數，煮熟冷卻後即刻採樣測定則只剩24 CFU/g。同樣經煮熟A廠比D廠生菌數高約60倍，因此A廠確需在冷卻過程加以改善。

表3 養殖草蝦及池水依養殖水之鹽度衛生細菌之分佈狀況
 Table 3 Sanitary significance bacteria distribution in grass prawn and pond water dependent on salinity of pond water.

樣品 Sample	鹽度範圍 Salinity range ppt	樣品數 No. of sample collected	生菌數 APC Log No./g,ml					大腸桿菌 <i>E. coli</i> MPN/100g,ml			沙門氏菌 <i>Salmonella</i> Positives
			<4	4-4.99	5-5.99	≥ 6	≤ 18	19-100	101-200	> 200	
Grass prawn	13--17	10	1(10.0)*	1(10.0)	4(40.0)	4(40.0)	0(0.0)	4(40.0)	2(20.0)	4(40.0)	7(70.0)
	18--19	10	0(0.0)	2(20.0)	4(40.0)	4(40.0)	0(0.0)	4(40.0)	2(20.0)	4(40.0)	1(10.0)
	20--21	16	0(0.0)	5(31.2)	8(50.0)	3(18.8)	2(12.5)	13(81.2)	1(6.2)	0(0.0)	0(0.0)
	23--28	9	4(44.4)	2(22.2)	2(22.2)	0(0.0)	9(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Pond water	13--17	4	0(0.0)	0(0.0)	1(25.0)	3(75.0)	0(0.0)	1(25.0)	1(25.0)	2(50.0)	4(100.0)
	18--19	4	0(0.0)	0(0.0)	1(25.0)	3(75.0)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)
	20--21	10	0(0.0)	4(40.0)	6(60.0)	0(0.0)	4(40.0)	6(60.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	23--28	7	1(14.3)	5(71.4)	1(14.3)	0(0.0)	6(85.7)	1(14.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

*Number in parentheses indicated percentage.

表 4 養殖草蝦及池水依養殖水溫衛生細菌之分佈狀況

Table 4 Sanitary significance bacteria distribution in grass prawn and pond water dependent on pond water temperature.

樣品 Sample	溫度範圍 Temperature range °C	樣品數 No. of sample collected	生菌數 APC Log No./g, ml			大腸桿菌 <i>E. coli</i> MPN/100g, ml		沙門氏菌 <i>Salmonella</i> Positives			
			< 4	4-4.99	5-5.99	≥ 6	≤ 18		19-100	101-200	200
Grass prawn	21.8-25.0	16	3(18.8)*	7(43.8)	4(25.0)	2(12.5)	6(37.5)	6(37.5)	2(12.5)	2(12.5)	1(6.2)
	25.1-27.9	24	1(4.2)	4(16.7)	12(50.0)	7(29.2)	5(20.8)	16(66.7)	1(4.2)	1(4.2)	3(12.5)
	≥ 28.0	5	1(20.0)	0(0.0)	2(40.0)	2(40.0)	1(20.0)	1(20.0)	0(20.0)	3(60.0)	3(60.0)
Pond water	21.8-25.0	14	1(7.1)	6(42.8)	6(42.8)	1(7.1)	7(50.0)	6(42.8)	1(7.1)	0(0.0)	1(7.1)
	25.1-27.9	6	0(0.0)	3(50.0)	1(16.7)	2(33.3)	3(50.0)	2(33.3)	1(16.7)	0(0.0)	1(16.7)
	≥ 28.0	5	0(0.0)	0(0.0)	2(40.0)	3(60.0)	1(20.0)	1(20.0)	0(0.0)	3(60.0)	2(40.0)

* Number in parentheses indicated percentage.

表 5 養殖草蝦及池水之衛生細菌依池水鹽度及水溫之顯著性分析

Table 5 Comparisons significant of sanitary bacteria in grass shrimp and pond water dependent on salinity and water temperature.

統計方法 Statistics	衛生細菌 Sanitary bacteria	池 水 Pond water			
		鹽 度 Salinity	溫 度 Temperature	Grass prawn	Pond water
S N K test	APC	<u>2 1 3 4</u>	<u>2 1 3 4</u>	<u>2 3 1</u>	<u>3 2 1</u>
	<i>E.coli</i>	<u>1 2 3 4</u>	<u>1 2 3 4</u>	<u>3 1 2</u>	<u>3 2 1</u>
	<i>Salmonella</i>	<u>1 2 3 4</u>	<u>1 2 3 4</u>	<u>3 2 1</u>	<u>3 2 1</u>
G L M ^b procedure	APC	***	***	ns	**
	<i>E.coli</i>	***	***	**	**
	<i>Salmonella</i>	***	***	*	**

a. Levels with underline are not significantly different at $p = 0.05$.

b. SAS General Linear Models (GLM) Procedure

Class	Levels	Values (range)
Pond water		
Salinity (ppt)	1, 2, 3, 4	13-17, 18-19, 20-21, 23-28
Pond water		
temperature ($^{\circ}\text{C}$)	1, 2, 3	21.8-25.0, 25.1-27.9, ≥ 28

Number of observations in data set = 45

ns, $p > 0.05$; *, $0.05 > p > 0.01$; **, $0.01 > p > 0.001$; ***, $p < 0.001$.

三、消毒劑在試管中 (*in vitro*) 殺滅霍亂菌之效果實驗：

由於霍亂菌在不同培養基中對環境變化的抵抗能力不同⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ De Paola⁽⁵⁾ 指出霍亂菌含幾丁質分解酵素，不但可以增加其對甲殼類之親和力，而且可延長其存活時間；Huq 等⁽¹⁹⁾ 也指出霍亂菌在橈腳類 (copepods) 存在下，可以增殖較多的量，同時存活時間也較長；Kazunobu 等⁽²⁰⁾ 更進一步在培養基中添加幾丁質及其衍生物、洋菜、胺基酸、蛋白脲、明膠、單醣及多醣等發現胺基酸、蛋白脲、幾丁質及洋菜均可延長霍亂菌在 0°C 的存活時間。因此在進行消毒劑對霍亂菌之殺滅效果試驗時，筆者等除了以鹼性蛋白脲為培養基 (表 7) 外，另外也添加 5% 滅菌草蝦肉 (表 8) 及 5% 滅菌草蝦殼 (表 9)，也發現草蝦肉及殼二者均可增加霍亂菌對消毒劑之抵抗力。

四、草蝦在消毒處理之活存率：

如前所述霍亂菌在某些有機質存在下，可以提高其對環境抵抗力，且由牛蛙及甲魚消毒之經驗，腸道中之霍亂菌比表皮者更難以殺滅，因此需行活存狀態下消毒，同時籍活體之代謝作用也比較沒有藥物殘留的問題，所以在活體消毒時首需瞭解以表 6 為基礎之處理後草蝦的活存率 (表 10) 其中安定化二氧化氯 (ClO_2) 最佳，在極高的濃度下仍有極佳的活存率。

表6 草蝦在冷凍加工過程之衛生細菌狀況
 Table 6 Condition of public health significance bacteria of the grass prawn during processing in frozen factory.

加工廠 Factories	生菌數 A P C *1	大腸桿菌 <i>E. coli</i> *2	沙門氏菌 <i>Salmonella</i>	霍亂菌 <i>V. cholerae</i>	加工階段 Processing stages
A	3.2×10^6				Raw material.
	8.1×10^5				Raw material.
	2.2×10^6	< 18	negative	negative	Raw, tail on.
	1.5×10^3				Cooked, after cooling, tail on.
	1.4×10^4				Cooked, I. Q. F. product, tail on.
B	2.0×10^5				Raw material.
	5.2×10^5				Raw material.
	4.0×10^5	< 18	negative	negative	After treated with 200 ppm NaOCl, raw.
	9.8×10^3				After treated with 200 ppm NaOCl, raw, head off.
C	2.0×10^6	210			Raw material.
	5.8×10^5	< 18			After treated with 100 ppm NaOCl, raw.
	1.0×10^4	< 18	negative	negative	Follow step 2, head off.
	2.8×10^4	< 18			Follow step 2, tail. on.
D	3.5×10^6	75			Raw material.
	4.0×10^5	< 18			After wash with tap water, raw.
	2.0×10^3	< 18	negative	negative	Follow step 2 then treated with 200 ppm NaOCl, raw.
	2.4×10^1	< 18			Follow step 3, after cooked.

*1. Aerobic Plate Count, in C. F. U./g Triplicates.

*2. MPN/100g.

表7 以鹼性蛋白胨水為培養基在試管中進行消毒劑對霍亂菌之殺滅效果試驗
 Table 7 *In vitro* test of some disinfectants on *V. cholerae* strains in the use of alkaline peptone water*¹ as medium.

消毒劑處理 Disinfectant treatment* ²	濃度 Concentration* ³	培養時間(小時) Incubation period (hours)* ⁴					
		8		16		24	
		A* ⁵	B* ⁵	A	B	A	B
Control		+	+	+	+	+	+
I	50	+	+	+	+	+	+
	75	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+
	150	-	+	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-
II	100	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	300	+	-	+	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-
III	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	15	-	+	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-
IV	150	+	+	+	+	+	+
	100	+	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
V	100	+	+	+	+	+	+
	50	+	-	+	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-
VI	1000	+	+	+	+	+	+
	750	+	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-

*1. Contains 1% NaCl.

*2. I. Sodium hypochlorite (NaOCl), contains 5.3% available chlorine.
 II. Benmax, contains 10,000 ppm chlorine dioxide (ClO₂).
 III. Bioquat -80, contains 80% alkyl dimethyl ammonium chloride and 20% water or alcohol.
 IV. Newmark, contains unknown natural substance.
 V. Antiseptol, contains 10% solution of 10% (w/v) benethonium chloride and 10% (w/v) alkyl aryl polyether alcohol.
 VI. AMI-21C, contains vitamin E, alcohol, natural substance, and surface active agent.

*3. Disinfectants I- III represent as ppm while IV - VI as dilution times.

*4. Incubated at 37°C.

*5. Strain A (O1) and strain B (non-O1).

表 8 以含 5% 草蝦肉之鹼性蛋白胨水為培養基在試管中進行消毒劑對霍亂菌之殺滅效果試驗

Table 8 *In vitro* test of some disinfectants on *V. cholerae* strains in the use of alkaline peptone water*¹ contains 5% grass prawn meat as medium.

消毒劑處理 Disinfectant treatment* ²	濃 度 Concentration* ³	培養時間 (小時) Incubation period (hours)* ⁴					
		8		16		24	
		A* ⁵	B* ⁵	A	B	A	B
Control		+	+	+	+	+	+
I	100	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	300	-	+	-	+	-	-
	400	-	-	-	-	-	-
II	200	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+
	600	++	+	+	-	+	-
	800	-	-	-	-	-	-
III	25	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	75	-	+	-	+	-	+
	100	-	-	-	-	-	-
IV	50	+	+	+	+	+	+
	20	+	-	+	-	+	-
	10	-	-	-	-	-	-
V	25	+	+	+	+	+	+
	20	+	-	+	-	+	-
	15	-	-	-	-	-	-
VI	500	+	+	+	+	+	+
	300	+	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-

* 1. Contains 1% NaCl.

* 2. The same notation as Table 4.

* 3. Disinfectants I - III represent as ppm while IV - VI as dilution times.

* 4. Incubated at 37°C.

* 5. Strain A and strain B as shown in Table 4.

表 9 以含 5% 草蝦殼之鹼性蛋白胨水為培養基在試管中進行消毒劑對霍亂菌之殺滅效果試驗

Table 9 *In vitro* test of some disinfectants on *V. cholerae* strains in the use of alkaline peptone water*¹ contains 5% shell of grass prawn as medium.

消毒劑處理 Disinfectant treatment* ²	濃 度 Concentration* ³	培養時間(小時) Incubation period (hours)* ⁴					
		8		16		24	
		A* ⁵	B* ⁵	A	B	A	B
Control		+	+	+	+	+	+
I	300	-	+	-	+	-+	+
	400	-	+	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
II	600	+	+	+	-	+	-
	800	+	+	+	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-
III	75	+	+	+	+	-	+
	100	-	+	-	+	-	-
	125	-	-	-	-	-	-
IV	20	+	-	+	+	+	-
	10	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
V	20	+	+	+	+	+	+
	15	+	-	+	-	+	-
	10	-	-	-	-	-	-
VI	500	+	+	+	+	+	+
	300	+	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-

* 1. Contains 1% NaCl.

* 2. The same notation as Table 4.

* 3. Disinfectants I - III represent as ppm while IV - VI as dilution times.

* 4. Incubated at 37°C.

* 5. Strain A and strain B as shown in Table 4.

五消毒劑對人工染菌草蝦之滅菌效力：

以上述各實驗為基礎，選取適當的濃度進行人工染菌草蝦之消毒試驗，除 Antiseptol 外，在消毒期間內草蝦均活存，對所用之 2 株試驗菌株，均以二氧化氯殺滅力較佳，Antiseptol 次之（表 11），但其效果仍不理想。

六臭氧對人工污染草蝦滅菌效力：

表 10 草蝦在消毒處理時之活存率
Table 10 Survival of grass prawn during sanitary treatment.

消毒劑處理 Disinfectant treatment* ¹	濃 度 Concentration* ²	消毒時間 (分鐘) Bathing periods (min)		
		30	60	90
Control		5/5	5/5	5/5
I	300	5/5	5/5	5/5
	400	4/5	3/5	3/5
	500	0/5	-	-
II	600	5/5	5/5	5/5
	800	5/5	5/5	5/5
	1000	4/5	4/5	3/5
III	75	5/5	4/5	3/5
	100	3/5	2/5	0/5
	125	0/5	-	-
IV	20	5/5	2/5	0/5
	10	3/5	0/5	-
	5	0/5	-	-
V	20	1/5	0/5	-
	15	0/5	-	-
	10	0/5	-	-
VI	500	4/5	2/5	0/5
	300	1/5	0/5	-
	100	0/5	-	-

* 1. The same notation as Table 4.

* 2. Disinfectants I - III represent as ppm while IV - VI as dilution times.

由於筆者等在消毒劑試驗並未得到良好的結果，乃依陳⁶⁶之結果以臭氧發生器所生臭氧通入水中，進行草蝦之淨化，以每小時通入 2 g 的臭氧於 20 l 之半海水（鹽度 15 ppt，溫度 28°C），至 80 分鐘為止，仍未能得到理想的結果（表 12）。

摘 要

- 一、調查 45 件養殖草蝦樣品，生菌數 $10^5 - 10^7$ CFU/g，大腸桿菌 $< 18 - 430$ MPN/100g，8 件沙門氏菌陽性均發生在池水鹽度 ≤ 18 ppt 之樣品，霍亂菌均為陰性。
- 二、調查 25 件池水樣品，生菌數 $10^4 - 10^5$ CFU/ml，大腸桿菌 $< 18 - 540$ MPN/100 ml，4 件沙門氏菌陽性均發生在池水鹽度 ≤ 17 ppt 之樣品，霍亂菌均為陰性。
- 三、統計分析顯示，池水之鹽度 ≤ 19 ppt 及水溫 $\geq 28^\circ\text{C}$ 時衛生狀況值得注意。
- 四、冷凍加工廠之原料草蝦生菌數約 10^6 CFU/g，以 200 ppm 次氯酸鈉浸洗時，最低可降低生菌數

表 11 一些消毒劑對人工污染草蝦之滅菌效力

Table 11 Effectiveness of some disinfectants on artificial contaminated living grass prawn.*¹

Disinfectant treatment* ²	Concen- tration* ³	T C B S* ⁴ CFU/g			
		Strain A		Strain B	
		Typical	Total	Typical	Total
Control		1.8 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁵
I	300	1.0 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁴	3.6 x 10 ⁴	6.5 x 10 ⁴
II	800	1.7 x 10 ³	1.3 x 10 ³	1.2 x 10 ³	4.7 x 10 ³
III	50	1.3 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁴	2.5 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁴
IV	50	6.3 x 10 ⁴	1.3 x 10 ⁵	2.8 x 10 ⁴	9.6 x 10 ⁴
V	50	8.2 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴	3.4 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴
VI	750	4.4 x 10 ⁴	4.8 x 10 ⁴	8.8 x 10 ³	4.0 x 10 ⁴

- * 1. Grass prawn for this experiment was selected, 12±2 cm in body length and 12±3 g in body weight (n = 35).
- * 2. The same notation as Table . Treat was carried out at 28°C in 20 ppt for 30 min.
- * 3. Disinfectants I - III represent as ppm while IV-VI as dilution times.
- * 4. Incubate at 35±0.5°C for 18±2 hours.

表 12 臭氧對人工污染活草蝦之淨化效果

Table 12 Effectiveness of ozone on artificial contaminated living grass prawn*¹ during purification.

處 理 Treatment* ² (min)	孤菌培養基 菌落數 / 公克 T C B S* ³ CFU/g			
	Strain A		Strain B	
	Typical	Total	Typical	Total
Blank	1.3 x 10 ³	1.6 x 10 ⁵	1.3 x 10 ³	1.6 x 10 ⁵
Control	6.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶
20	6.8 x 10 ³	3.7 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶
40	4.6 x 10 ³	3.5 x 10 ⁴	1.3 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶
60	4.3 x 10 ³	2.8 x 10 ⁴	9.0 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁶
80	4.5 x 10 ³	3.1 x 10 ⁴	2.7 x 10 ⁵	9.2 x 10 ⁵

- * 1. Grass prawn for this experiment was selected, 6±0.5 cm in body length and 3±0.3 g in body weight (n = 60).
- * 2. Experiment was carried out at 28°C in 15 ppt brackish water under aeration.
- * 3. Incubated at 35±0.5°C for 18±2 hours.

- 200 倍，煮熟是最有效的手段，但若冷卻過程不當則效果就打折了。
- 五以試管內試驗各種消毒劑之效力，在鹼性蛋白胰培養液中，添加 5% 滅菌草蝦肉或 5% 滅菌細碎草蝦殼均會提高霍亂菌對消毒劑之抵抗力。
- 六在人工污染草蝦的活體消毒實驗中，以二氧化氯效果較佳，但仍不如理想。
- 七以 2g/h 的臭氧通入 20 ℓ 半海水中進行活體消毒，直到 80 分鐘仍未顯示殺菌效果。

謝 辭

本試驗承代所長敬勸，台西工作站吳主任純衡兄提供草蝦及場地，本系同仁劉助研員輝男兄在實驗上之協助。

參考文獻

1. 台灣省農林廳漁業局 (1987). 中華民國七十五年台灣地區漁業年報.
2. Kaper, J., H. Lockman, R. R. Colwell, and S. W. Joseph (1979). Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **37(1)**, 91 - 103.
3. Colwell, R. R., R. J. Seidler, J. Kaper, S. W. Joseph, S. GRGES, H. Lockman, D. Maneval, H. Bradford, N. Roberts, E. Remmers, I. Huq, and A. Huq (1981). Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **41(2)**, 555 - 558.
4. DePaola, A., M. W. Presnell, M. L. Motes, JR., R. M. McPhearson, R. M. Twedt, R. E. Becker and S. Zywno (1983). Non-O1 *Vibrio cholerae* in shellfish, sediment and waters of the U. S. gulf coast. *J. Food Protec.* **46(9)**, 802 - 806.
5. DePaola, A. (1981). *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: A literature review. *J. Food Sci.* **46(1)**, 66 - 70.
6. Twedt, R. M., J. M. Madden, J. M. Hunt, D. W. Francis, J. T. Peeler, A. P. Duran, W. O. Hebert, S. G. McCay, C. N. Roderick, G. T. Spite, and T. J. Wazenski (1981). Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **41(6)**, 1475 - 1478.
7. Kenyon, J. E., D. C. Gillies, D. R. Piexoto, and B. Austin (1983). *Vibrio cholerae* (non-O1) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **46(5)**, 1232 - 1233.
8. Kenyon, J. E., D. R. Piexoto, B. Austin, and D. C. Gillies (1984). Seasonal variation in numbers of *Vibrio cholerae* (non-O1) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **47(6)**, 1243 - 1245.
9. Haddock, P. L., and F. A. Nocon (1985). NAG *Vibrio cholerae* isolated from imported shellfish in Guam. *Southeast J. Trop. Med. Public health*, **16(1)**, 113 - 116.
10. Rhodes, J. B., H. L. Smith, JR., and J. E. Ogg (1986). Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(6)**, 1216 - 1219.

11. 許國雄 · 許書刀 · 馮天霖 · 李鏡梯 · 吳正軍 (1986). 赴日本考察檢疫作業報告。行政院衛生署。
12. 許書刀 · 劉忠和 (1974). 病原菌污染魚苗之消毒法研究— I。理想霍亂殺菌劑之探求。台灣水產學會刊, 3(2), 77 - 83.
13. 劉忠和 · 李雲章 (1981). 對於水產品理想之霍亂殺菌劑之探討。行政院衛生署預防醫學研究所研究報告彙編, 2, 1 - 6.
14. 董明澄 (1986). 鮭霍亂菌消毒及加工試驗報告。未正式發表。
15. 董明澄 (1986). 養殖牛蛙之衛生消毒研究期中報告。手抄稿。
16. 陳幸臣 (1987). 「養殖蝦原料清洗之標準流程」研討會口述 (開會地點在國立台灣海洋學院海洋廳)。
17. FDA (1984). *Bacteriological analytical manual*. 6th ed. Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration.
18. Shultz, L. M., J. E. Rutledge, R. M. Grodner, and S. L. Biede (1984). Determination of the thermal death time of *Vibrio cholerae* in blue crabs (*Callinectes sapidus*). *J. Food Protec.* 47(1), 4 - 6.
19. Huq, A., P. A. West, E. B. Small, M. I. Huq, and R. R. Colwell (1984). Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(1), 420 - 424.
20. Kazunobu, A., S. Shimodori, T. Imoto, S. Miake, and A. Umeda (1987). Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(3), 603 - 605.