

## 臭氧與超音波振盪殺菌效果之研究 — II 對人工染菌大頭紅蝦和斑節蝦之淨化效果

林小玲 · 王文亮 · 薛月娥 · 蔡慧君

### Studies on the Sterilization Effect of Ozone and Ultrasonic Vibration on Microorganism — II. Purification Effect on Bacteria-Seeded Big Head Prawn (*Solenocera melantho*) and Kuruma Prawn (*Penaeus japonicus*)

Sheau-Ling Lin, Wen-Liang Wang, Yueh-Er Shiue and Huey-Jine Chai

This experiment studied the feasibility of using ozone and ultrasound treatments, either individually or simultaneously, on the purification of bacteria-seeded big head prawn (*Solenocera melantho*, from marine source) and kuruma prawn (*Penaeus japonicus*, from culture pond) in a saltwater of 2% NaCl at 5°C. The optimal ozone solubility was obtained from Wang et al. (1991). The *Vibrio cholerae* on Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose (TCBS) agar and *Escherichia coli* counts on Eosin-Methylene Blue (EMB) agar, respectively, and the intrinsic aerobic plate count (APC) were used as the indicators for estimating the purification effectiveness of ozone and ultrasound sterilization, which was placed in cold saltwater with a volume of 160 l in a circulating FRP tank equipped with filters, refrigerator compressor, aeration pump and fine pipes for ozonation.

After treatment with a constant rate of < 0.2 ppm ozone individually for 100 min, the reduction rates in logarithm of the above indicators for *S. melantho* were 1.39, 1.95 and 0.47, respectively, and for *P. japonicus*, 0.95, 0.82 and 0.30, respectively. At individual treatment using ultrasound (27 KHz) for 100 min, the reduction rates of the indicators for *P. japonicus* were 0.69, 1.36 and 1.03, respectively. At the same treatment for 120 min, rates for *S. melantho* were 0.87, 1.12 and 0.6, respectively. For simultaneous sterilization with ozone (either < 0.2 ppm or < 0.8 ppm) and ultrasound for 80 min, the reduction rate of *E. coli* for *P. japonicus* and *S. melantho* were 2.25 and 1.70, respectively. Using the same treatment for 100 min, the reduction rates of *V. cholerae* and APC were 0.83 and 2.0 for *P. japonicus*, respectively, and 1.55 and 1.50 for *S. melantho*, respectively.

The purification treatment of bacteria-seeding experiment was said to be

effective by some workers when the reduction rate of bacterial count was more than two log cycles. From our results, the treatments of ozone and ultrasound, either individually or simultaneously, on bacteria-seeded *S. melanthro* and *P. japonicus* were not very effective. Thus, we consider it as not feasible to use ozone in combination with ultrasonic vibration to purify either *S. melanthro* or *P. japonicus* after harvest.

關鍵字：臭氧、超音波、大頭紅蝦、斑節蝦、人工染菌、霍亂弧菌、大腸桿菌生菌數

Key words: Ozone, Ultrasound, Big head prawn, Kuruma prawn, Bacterial-seeding, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, APC.

## 前 言

外銷冷凍蝦類常因帶菌問題而產生困擾<sup>(1)(2)</sup>，尤其是日本對進口蝦類實施霍亂弧菌檢疫後<sup>(3)</sup>，一旦檢出有霍亂毒素 (cholera toxin) 存在即行銷毀，往往造成業者之慘重損失，筆者等在人工染菌活草蝦以臭氧淨化的試驗中<sup>(4)</sup>，雖未獲良好成果，但是繼之以臭氧併用超音波對霍亂弧菌的殺菌模擬試驗中<sup>(5)</sup>，卻獲得一些結果，因此將其運用在冷却鹽水機上。

但是霍亂弧菌具有幾丁質分解酵素，與帶有幾丁質之橈腳類及蝦蟹類關係密切<sup>(6)(7)</sup>。蝦類一旦帶菌，雖經清洗或施用消毒劑消毒，亦很難完全去除，且霍亂弧菌對熱之抵抗力，因蝦體內所含幾丁質之遮蔽作用而大增<sup>(7)</sup>；最近有些學者<sup>(8)</sup>研究，霍亂弧菌之抗凍物質存在於蝦殼內，其主要成份包含幾丁質和胺基酸。

臭氧是極佳的殺菌劑<sup>(9)(10)</sup>，其氧化力甚強，僅次於氟 (F<sub>2</sub>)，氫氧自由基 (OH·) 與初生態氧 (O)，因無藥物殘留的問題發生，曾使用於自來水之淨化及廢水處理<sup>(11)(12)(13)</sup>；Haraguchi 等人<sup>(14)</sup>研究以臭氧保藏魚類也有一些效果；而 Ishizaki 等<sup>(15)</sup>提出氣態臭氧可抑制 *Bacillus* 菌屬的孢子。

超音波是一種物理性的殺菌劑，可產生空洞效應<sup>(16)</sup>能使細菌休克而將細胞膜上的孔隙 (pore) 張開，增加臭氧進入細菌體內之機會，同時促進臭氧分子生成氫氧自由基提高殺菌力<sup>(17)</sup>，有人研究兩者併用利用於醫院之廢棄物處理<sup>(18)</sup>。

本試驗係參考藤原<sup>(19)</sup>及金井等<sup>(20)</sup>的方法，採用已商品化之冷却鹽水機淨化設備，搭配自行設計的超音波振盪器，繼續前報<sup>(4)(5)</sup>之試驗，探討臭氧、超音波及兩者併用對人工染菌大頭紅蝦和斑節蝦淨化之可行性。

## 材料與方法

### 一、試驗材料：

1. 斑節蝦 (*Penaeus japonicus* Bate, 1988)：來自宜蘭縣某民間養殖場，購於基隆市仁愛市場。
2. 大頭紅蝦 (*Solenocera melanthro* De Man, 1907)：中文名為劍額管鞭蝦，係海洋拖網漁獲物，購於基隆市和平市場。
3. 冷却鹽水殺菌機：日製 Gold System SS-160 NF 型，臭氧產生能力 160 mg/h，具有冷凍裝置，可在 4 小時內將 160 l 鹽水降溫至 2℃。
4. 超音波振盪器：龍門股份有限公司產品，高振盪頻率 27 KHz，輸出功率 1,200 W，振盪器裝有 24 個振盪子。
5. 分光光度計：Hitachi 320，臭氧濃度測定用。

## 6. 供試菌株：

- (1) 霍亂弧菌參考株 ( 01 *Vibrio cholerae* ) 由台大動物系魚病學研究室提供。
- (2) 大腸桿菌 ( *Escherichia coli* ) 係筆者等從宜蘭縣五結鄉養殖池水中分離純化者。
7. 霍亂弧菌和大腸桿菌測定用培養基及玻璃器具。
8. 無菌操作箱：附紫外燈。
9. 恆溫箱：5 °C 及 35 ± 2 °C。

## 二、試驗方法：

1. 臭氧濃度之測定：依 Schechter<sup>(21)</sup> 以適當碘化鉀與臭氧作用，生成紅褐色碘錯離子 (  $I_3^-$  )，比色分析法直接測定  $I_2$  之含量，換算成臭氧量。當臭氧濃度在 0.01 ~ 0.3 ppm 時，取 10 ml 水樣至含 2 ml 5% 碘化鉀中性緩衝液之試管中，將試管置於 5 °C 恆溫箱 30 min 後，在 352 nm 後，以 5 cm 光徑之測光槽於 352 nm 測定其吸光值。

同時加不同量 0.0004 N 碘液之中性磷酸鹽緩衝液 ( 1 ml = 0.96  $\mu$ g  $O_3$  ) 於試管中，加中性磷酸鹽緩衝液至 12 ml ( 或 10 ml )，在 352 nm 測吸光值，作成標準曲線。

2. 臭氧在水中溶存量之測定：在鹽度 2%、水溫 5 °C 之 160 l 冷却鹽水內，通入臭氧 1 hr 後，每隔一段時間取水樣，測其臭氧濃度。

3. 細菌懸濁液：將 1 白金耳供試菌株，分別接種於 300 ml 含 0.85% NaCl 之營養培養液中，在 35 °C 培養 18 hr 後作為供試細菌懸濁液。

4. 臭氧對人工染菌蝦類之淨化效果試驗：將 500 g 大頭紅蝦或斑節蝦以浸漬於上述細菌懸濁液之 300 ml ( 菌數為  $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml ) 中，置於 10 °C 恆溫箱 30 min 後，再將浸泡過之大頭紅蝦或斑節蝦取出，其上覆以紗布，放入不銹鋼籃內，置於含有 2% 食鹽水、水溫 5 °C、已預先通臭氧 1 hr 之冷却鹽水機內，繼續通入臭氧，每隔 20 min 各取整蝦數尾，細碎後取 25 g，加入 225 ml 已滅菌的 0.85% NaCl 溶液中均質，並做適當稀釋。霍亂弧菌在 TCBS ( Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose ) Agar 上塗抹，在 35 °C 培養 16 ~ 18 hr 後，計算黃色典型菌落數目。大腸桿菌在 EMB ( Eosin-Methylene Blue ) Agar 上塗抹，在 35 °C 培養 18 ~ 24 hr 後，計算有金屬光澤之典型菌落數目。

5. 超音波對人工染菌蝦之淨化效果試驗：蝦體之人工染菌法同試驗方法 4。在 160 l、2% 食鹽水、水溫 5 °C 之冷却鹽水內，以投入式超音波振盪器進行淨化效果試驗。定時取樣如上述測定典型菌落數。

6. 臭氧與超音波併用對人工染菌蝦之淨化效果試驗：蝦體之人工染菌方法同試驗方法 4。人工染菌後之大頭紅蝦或斑節蝦置入冷却鹽水殺菌機，以投入式超音波振盪器實施臭氧與超音波併用處理，定時取樣測定典型菌落數。

7. 總生菌數 ( Aerobic Plate Count, APC ) 之測定：本試驗所測定之總生菌數為未經人工染菌者，供對照之用。大頭紅蝦或斑節蝦經臭氧、超音波或臭氧與超音波併用處理後，定時取樣，經均質稀釋後，以 PCA ( plate count agar ) 進行混稀培養，在 30 °C 培養 48 hr，計算其菌落數。

## 結果與討論

### 一、臭氧對人工染菌蝦體之淨化效果：

紅蝦或斑節蝦先浸泡在 *V. cholerae* 或 *E. coli* 菌懸濁液中 30 min，取出放入冷却鹽水機內，通入臭氧至 100 min，在 < 0.2 ppm 臭氧量下，對附著在紅蝦上之 *V. cholerae* 約減少 1.39 個對數值，*E. coli* 約減少 1.94 個對數值，APC 約減少 0.47 個對數值，且三者 20 min 時皆顯著減少，但以機殼減少甚微 ( 圖 1 )。

在 $< 0.2$  ppm 臭氧量，使斑節蝦之 *V. cholerae* 減少 1.95 個對數值，*E. coli* 約減少 0.82 個對數值，而 APC 只減少 0.3 個對數值，其中 *V. cholerae* 在 100 min 時有顯著減少（圖 2）。Herbold 等<sup>(22)</sup>、內藤<sup>(23)</sup> 及山本<sup>(24)</sup> 都認為人工染菌後之淨化處理，應降低 2 個對數值以上，才能說是具有

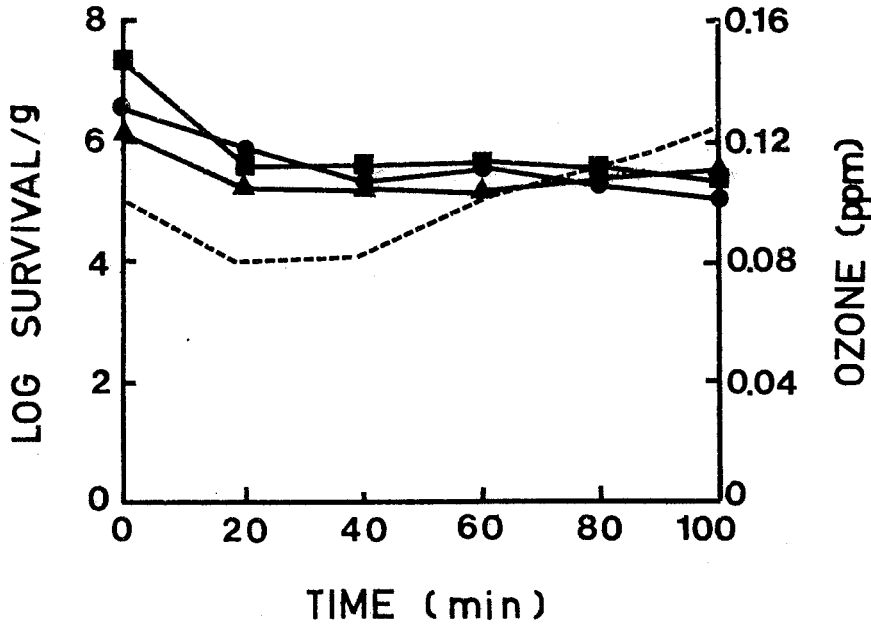


Fig.1 Sterilization effect of ozone treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Solenocera melantho*. Ozone concentration is indicated as (----).

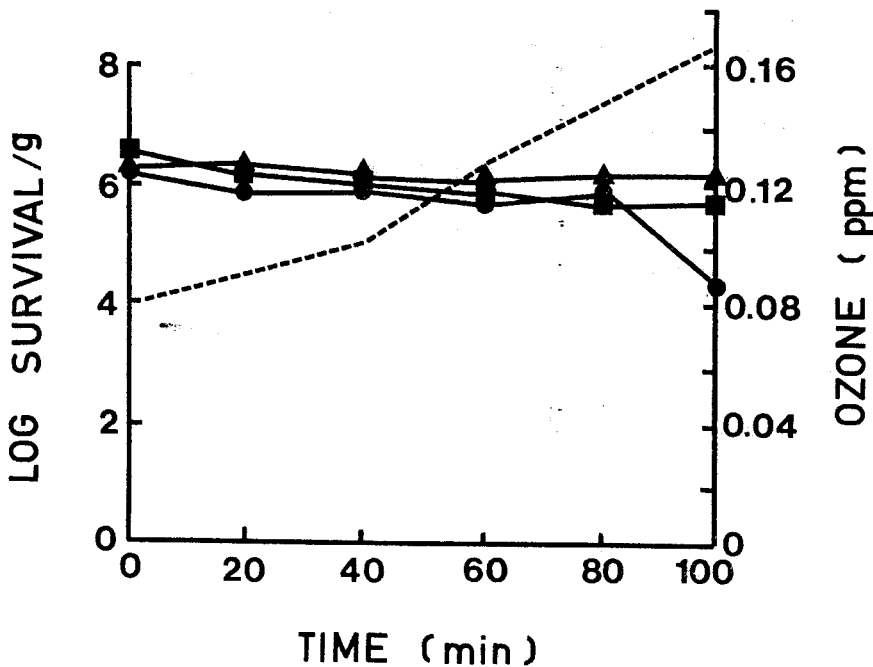


Fig.2 Sterilization effect of ozone treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Penaeus japonicus*. Ozone concentration is indicated as (----).

效果。故單獨使用臭氧來淨化人工染菌用之 *V. cholerae*、*E. coli* 及蝦體本身已存在之 APC，在本試驗中其效果仍未臻理想。

## 二、超音波對人工染菌蝦之淨化效果：

經前述方法人工染菌過之大頭紅蝦及斑節蝦，在 5°C、2% 食鹽水中，以頻率 27 KHz，輸出功率 1,200 W 之超音波振盪處理 100 min 後，斑節蝦之 *V. cholerae* 減少 0.69 個對數值，*E. coli* 則降低 1.36 個對數值，APC 減少 1.03 個對數值，故本試驗中超音波對斑節蝦的淨化效果為 *E. coli* > *V. cholerae* > APC，成績並不理想（圖 3）。

大頭紅蝦經超音波振盪 120 min 後，*V. cholerae* 減少 0.87 個對數值，*E. coli* 減少 1.12 個對數值，APC 減少 0.6 個對數值，故單獨使用超音波對大頭紅蝦及斑節蝦之淨化效果亦均不理想（圖 4）。

## 三、臭氧與超音波併用對人工染菌蝦之淨化效果：

在 5°C 冷却鹽水機內，通入臭氧併用超音波處理人工染菌後之紅蝦，在 < 0.2 ppm 臭氧量和超音波振盪 80 min 時，*E. coli* 減少 1.7 個對數值，但在 100 min 時，*V. cholerae* 減少 1.55 個對數值，APC 減少 1.47 個對數值（圖 5）。即使增加臭氧量至 0.8 ppm（最高值）配合超音波併用處理，所得之結果與前述者 < 0.2 ppm 大致相同（圖 6）。

在斑節蝦之試驗結果發現，經 100 min 處理後，*E. coli* 減少 1.69 個對數值，*V. cholerae* 則減少 0.83 個對數值，APC 減少 2.2 個對數值（圖 7、圖 8）。

從上述結果發現，無論是單獨使用臭氧，或單獨使用超音波，甚至於兩者合併使用，皆無法將 *V. cholerae*、*E. coli* 或其本身之 APC 去除，達到降低 2 個對數值之目標。原口等<sup>(25)</sup>將鱒魚浸泡在含 0.6 ppm 臭氧的 3% 食鹽水中 30~60 min，也只能將魚體表面 APC 降低 99~99.9%。

Broadwater 等人<sup>(9)</sup>也指出某些有機物質會與臭氧作用，而妨害臭氧擴散，且這些有機物質會緩和抗菌物質的抗菌作用，或遮蔽細菌以形成保護外被，而降低臭氧之消毒效果。此外，因為蝦體成

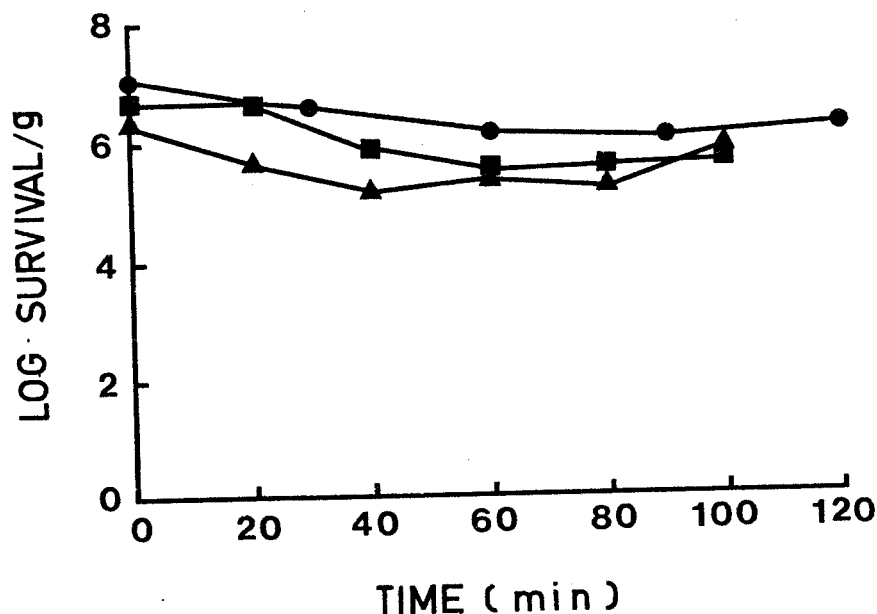


Fig. 3 Sterilization effect of ultrasonic treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Solenocera melanoto*.

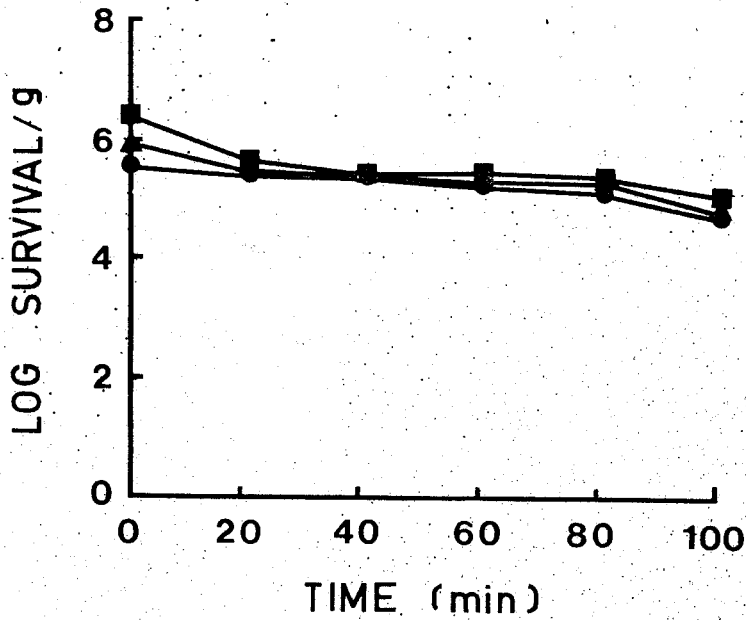


Fig.4 Sterilization effect of ultrasonic treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Penaeus japonicus*.

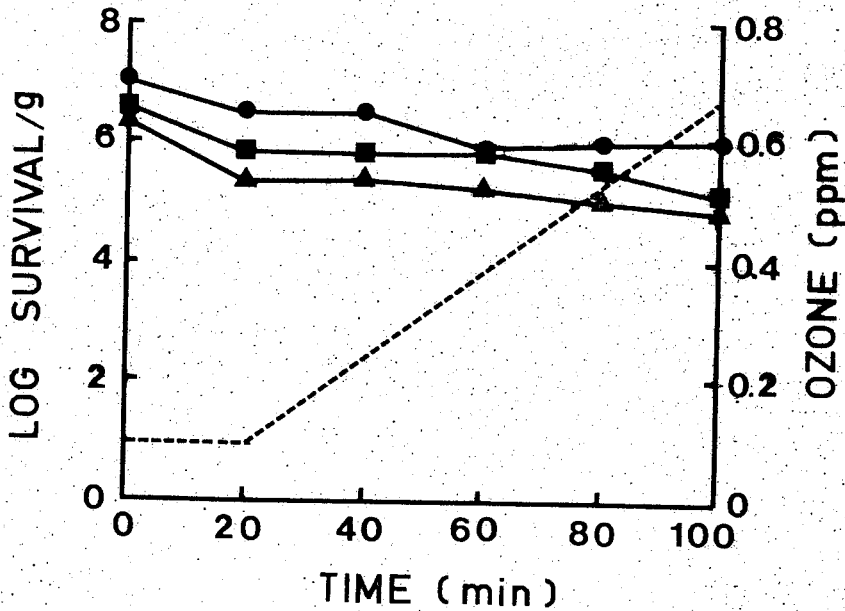


Fig.5 Sterilization effect of combined ozone and ultrasonic treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Solemocera melantho*. Ozone concentration is indicated as (----).

份具有遮蔽作用，也會影響殺菌效果。

結 論

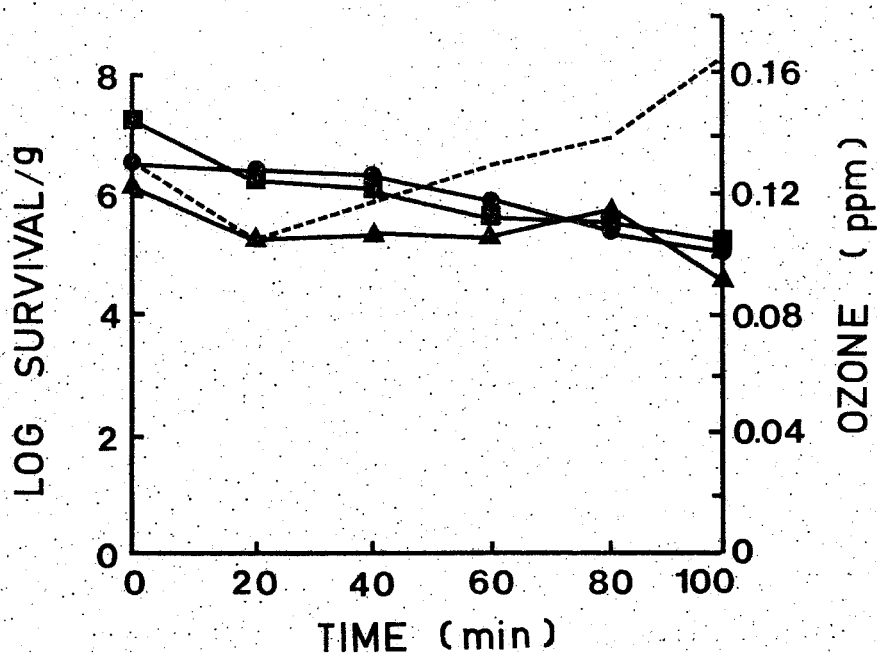


Fig. 6 Sterilization effect of combined ozone and ultrasonic treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Solenocera melantho*. Ozone concentration is indicated as (----).

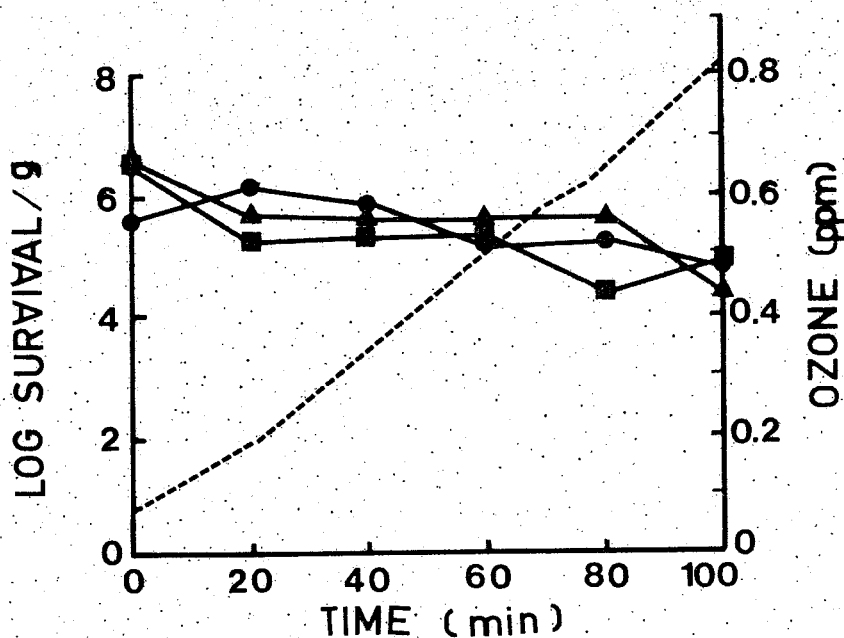


Fig. 7 Sterilization effect of combined ozone and ultrasonic treated 2% NaCl solution at 5°C, on *V. cholerae* (●), *E. coli* (■), Total plate count (▲) in bacteria-seeded *Penaeus japonicus*. Ozone concentration is indicated as (----).

海產紅蝦或養殖斑節蝦在霍亂弧菌或大腸桿菌懸濁液 ( $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml) 中浸泡 30 min, 然後置入 160 l 5°C 之 2% NaCl 中, 以臭氧 (最高 0.8 ppm) 或超音波 (27 KHz, 1,200 W) 或兩者併用, 處理至 100 分鐘之人工染菌試驗, 對霍亂弧菌或大腸桿菌及蝦體內原已存在之總生菌數之淨

化效果均未達理想，筆者等認為，外銷用冷凍蝦尚無使用臭氧或超音波或兩者併用處理以降低帶菌或然率之必要。

## 摘 要

本研究係根據體外 (*in vitro*) 實驗所得臭氧溶解度之最適條件 (水溫 5 °C, 鹽度 2% 之食鹽水), 探討以臭氧或超音波或兩者併用, 對人工染菌之紅蝦或斑節蝦之淨化效果。在 5 °C 容量 160 l 含 2% 食鹽水之冷却鹽水機內, 分別通入臭氧、投入超音波振盪機, 或兩者同時使用, 進行 100 ~ 120 min 淨化處理, 其結果以減少之對數值表示如下: 單獨使用臭氧 (< 0.2 ppm) 100 min 後, 其人工染菌紅蝦之淨化效果為 *E. coli* (1.94) > *V. cholerae* (1.39) > APC (0.47); 對人工染菌斑節蝦之淨化效果, 依次為 *V. cholerae* (1.95) > *E. coli* (0.82) > APC (0.3)。單獨使用超音波振盪處理人工染菌斑節蝦 100 min 後, *V. cholerae* 減少 0.69, *E. coli* 減少 1.36, APC 減少 1.03; 人工染菌之紅蝦在 120 min 後, 分別減少 0.87、1.12、0.60。以臭氧和超音波併用處理, 無論在低濃度 (< 0.2 ppm) 或較高濃度 (< 0.8 ppm) 臭氧, 接種於斑節蝦體之 *E. coli* 在 80 min 時減少 1.69, 但 *V. cholerae* 及 APC 在 100 min 後才降低 0.83 及 2.2; 紅蝦經處理 80 min 後, *E. coli* 減少 1.7, 而 100 min 後 *V. cholerae* 及 APC 分別減少 1.55 及 1.47。有些學者對人工染菌淨化效果之研究, 認為應降低 2 個對數值以上, 才能說是有效果。故本實驗單獨使用臭氧或超音波或兩者併用, 對人工染菌後之大頭紅蝦和斑節蝦, 其淨化效果均未達理想。

## 謝 辭

本文承廖所長一久博士之鼓勵, 本所漁業系副研究員李定安與漁業資源系副研究員吳全橙兩位先生協助鑑定蝦種, 本系同仁之協助及張副研究員士軒先生之熱心指正, 臺大動物系魚病研究室提供菌種, 及大勝貿易公司對其代理進口之冷鹽水機提供優惠價格, 始得順利完成, 謹申謝忱。

## 參 考 文 獻

1. 春日 齊 (1986). 輸入魚介類のコレラ菌汚染。食品衛生研究, 36(9), 47-52.
2. 古田榮敬 (1987). 臺灣輸出冷凍食品の衛生管理狀況。食品衛生研究, 37(9), 21-44.
3. 凌和派 (1987). 高屏地區外銷冷凍蝦類加工廠現存缺點研討及改進參考意見。中國水產, 418, 20-24.
4. 王文亮、張士軒、駱秋燕 (1988). 養殖草蝦衛生細菌調查及消毒試驗。臺灣省水產試驗所報告, 45, 245-261.
5. 王文亮、蔡慧君、林小玲、薛月娥 (1991). 臭氧與超音波振盪殺菌效果之研究——I, 對霍亂弧菌之模擬試驗, 臺灣省水產試驗所報告, 50, 291-299.
6. Huq, A., E.B. Small, P.A. West, M.I. Huq, R. Rahman, and R.R. Colwell (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol., 45(1), 275-283.
7. 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. Appl. Environ. Microbiol., 48(2),



- 420-424.
8. Shimodori, S., T. Moriya, O. Kohashi (1989). Extraction from prawn shells of substances cryoprotective for *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol., 55(10), 2726-2728.
  9. Broadwater, W.T., R.C. Hoehn, and P.H. King (1973). Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. Appl. Microbiol., 26(3), 391-393.
  10. Burleson, G.R., T.M. Murray, and M. Pollard (1975). Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. Appl. Microbiol., 29(3), 340-344.
  11. Prengle, H.W. Jr. and E. Charles (1977). New technology: ozone/UV chemical oxidation wastewater process for metal complex organic species and disinfection, AICHE Symposium Series, 74, 228-244.
  12. O'Donovan, D.C. (1965). Treatment with ozone. J. Am. Water Works Assoc., 57, 1167-1192.
  13. Torricelli, A. (1959). Drinking water purification. Adv. Chem. Seriol., 21, 453-465.
  14. Haraguchi, T., U. Simidu and K. Aiso. (1969). Preserving effect of ozone to fish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35, 915-919.
  15. Ishizaki, K., N. Shinriki and H. Matsuyama (1986). Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. J. Appl. Bacteriol., 60, 67-72.
  16. 本間榮一 (1987). プラスチック通し函の超音波洗浄機と洗剤。New Food Industry, 22(3), 28-35.
  17. Dahi, E. (1976). Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. Water Res., 10, 677-684.
  18. 藤原喜久夫 (1985). 海による魚介類洗浄とビブリオ汚染の関係について。食品衛生研究, 35(7), 7-16.
  19. 金井眞佐三、高橋行忠、林 貞雄、矢口慈重、酒井和美、木下貞夫、小山秀子、齊藤富士雄、松澤壽次 (1987). 「オゾン発生装置つま魚介類冷温水処理機」の検討について。食品衛生研究, 37(9), 51-55.
  20. Schechter, H. (1973). Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. Water Res., 7, 729-739.
  21. Herbold, K., B. Flehmig and K. Botzenhart (1989). Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. Appl. Environ. Microbiol., 55(11), 2949-2953.
  22. 内藤茂三 (1987). 食品の殺菌と脱臭へのオゾンの利用。食品と開発, 22(9), 36-44.
  23. 山本武司 (1986). オゾンによる殺菌と問題点。食品と開発, 21(6), 25-28.
  24. 原口達一、清水 潮、相磯和嘉 (1969). オゾンによる鮮魚の保存, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 35(9), 915-919.