

## 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

王文亮 · 蔡慧君 · 林小玲 · 薛月娥

### Studies on the Sterilization Effect of Ozone and Ultrasonic Vibration on Microorganism – I. A Model Test on Serotype 01 *Vibrio cholerae*

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

The optimal condition of ozone with an ozonation rate of 160 mg/h in saltwater at 0°C was 2% NaCl solution at pH 7.2. In the model tests, the sterilization effect of ozonation and ultrasound, either individually or simultaneously, on serotype 01 *Vibrio cholerae* suspended in 2% NaCl solution (pH 7.2) were set up at 0, 5 and 25°C, lasting 80 min each. The ozonation rate and the output frequency of ultrasound were 160 mg/h and 20 KHz, respectively. When ozonation was used individually, the typical colony count of *V. cholerae* was reduced around 4 to 5 log cycles at either 0 or 5°C; however, only about 3 log cycles reduction was obtained at 25°C. When only ultrasound was used, *V. cholerae* count was reduced at 3 log cycles. However, the one set up at 25°C was almost ineffective. When ozonation combined with ultrasound was used simultaneously, the one set up either at 0 or 5°C reduced the count of *V. cholerae* up to about 7 log cycles after 40 min treatment. However, the same effect was obtained from the one set up at 25°C for 60 min. The results described above indicated that the sterilization effect of ozonation and ultrasound on *V. cholerae* when used simultaneously was more effective than when used individually.

關鍵字：臭氧、超音波振盪、霍亂弧菌、殺菌

Key words: Ozone, Ultrasonic vibration, *V. cholerae*, Sterilization.

## 前 言

輸日活鱉、活斑節蝦、冷凍草蝦等水產品，常因被檢出霍亂弧菌<sup>(1)(2)</sup>而使業者遭受重大損失，令政府有關當局、業者頭痛不已，中外專家、學者雖然也重視這個問題，進行許多淨化或消毒試驗研究<sup>(3)(4)(5)(6)(7)(8)(14)</sup>，迄今除以煮熟調理加工或以清潔的水多予清洗，降低帶菌的可能性外，仍未能找出有效且安全的處理方法。

霍亂弧菌目前已知與含幾丁質之橈腳類 ( copepods ) 有密切的關係<sup>(9)(10)(11)</sup>，De Paola<sup>(12)</sup>指出霍亂弧菌會分泌幾丁質分解酵素，不但可以增加其對甲殼類之親和力，而且可以增強其對環境變化的抵抗力。Amako等<sup>(13)</sup>亦證實幾丁質與其他蛋白質分解物，如蛋白脲、胺基酸等，均可延長霍亂弧菌在 0℃ 之活存時間。Shimodori等<sup>(15)</sup>從蝦殼萃取物中發現某種熱安定，可被胰蛋白酵素分解之低分子量蛋白質 ( 尚未純化 )，可使霍亂弧菌在 -20℃ 活存 30 天以上。王等<sup>(8)</sup>亦證實以草蝦肉或殼添加至培養基中，均可增強霍亂弧菌對各種化學消毒劑或殺菌劑之抵抗力。由此可知，在某些有機物質存在下，欲開發出實用且安全的水產原料除疫或淨化處理方法，的確有其困難性。

近年，以臭氧來處理廢水或淨化水質已臻實用化，以氣體之型式應用在生鮮肉類、魚類及冷藏庫 ( 車 ) 等之輸送及儲藏亦已商業化，但以溶解在水中的方法應用在超級市場魚介類用的臭氧處理冷卻鹽水機<sup>(14)</sup>，或在人工染菌草蝦模擬實驗<sup>(7)</sup>，其殺菌效果並不顯著。

內藤<sup>(16)</sup>以細菌死滅時的臭氧濃度之氧化還原電位來探討，認為臭氧之殺菌機制，係因氧化還原電位發生急遽變化所致。Mudd等<sup>(17)</sup>認為臭氧會與許多重要的生生物質 ( 如蛋白質及酵素 ) 作用，將其 -SH 基氧化成雙硫 ( -S-S-) 鍵，而造成細菌的死亡。Hamelin及Chung<sup>(18)</sup>則證明臭氧會破壞 DNA polymerase I，造成細菌死亡及 DNA 的降解。De Mik<sup>(19)</sup>則認為臭氧作用於核酸會造成菌體內 DNA 失去被複製性能，嚴重時 DNA 發生斷裂。另外，臭氧攻擊細菌之細胞壁或細胞膜，與膜上脂質反應，造成細胞露出與導致細菌體支解及死亡，穿透細胞膜後則與細胞質 ( cytoplasm ) 內之成分發生作用，將其支解而造成菌體死亡。Burleson等<sup>(20)</sup>在廢水中懸濁包括霍亂弧菌在內的數種細菌及病毒，以臭氧滅菌及以 40 KHz 超音波振盪，發現雖然超音波振盪殺菌效果不臻理想，但若同時併用臭氧時，比單獨使用臭氧效果來得好。

筆者認為併用臭氧及超音波的方法來處理水產品之可行性值得研究，乃先進行體外 ( *in vitro* ) 實驗，以淨化為目標探討適當的除菌條件。

## 材料與方法

1. 菌種：取自臺灣大學動物學系魚病學研究室，係由魚體分離所得之霍亂弧菌 ( O1 血清型 *Vibrio cholerae* )。
2. 臭氧產生器 ( ozone generator )：康民牌 KM-03-Z8 型，臭氧產生能力 800 mg/hr。
3. 超音波振盪機 ( sonicator )：Artek sonic dismembrator Model-150，振盪頻率 20 KHz。
4. 臭氧濃度測定：
  - (1) AOAC<sup>(21)</sup> 方法。
  - (2) 中性緩衝液中反應顯色的方法<sup>(22)</sup>：

加適量碘化鉀與臭氧作用生成紅褐色碘錯離子 (  $I_3^-$  )，以分光光度計測定  $I_2$  吸光值，由碘液標準曲線換算為臭氧量。低濃度 ( 0.01 ~ 0.03 ppm ) 臭氧時，取 10 ml 水樣至含 2 ml 5% 碘化鉀中性磷酸鹽緩衝液中，在 5℃ 下放置 30 分鐘後，迅即移至直徑 5 cm 測光槽 ( cuvette or cell )，

在 352 nm 波長下測吸光值。而在高濃度 (0.03 ppm 以上) 臭氧時, 取 5 ml 水樣至含 5 ml 2% 碘化鉀中性磷酸鹽緩衝液中, 在 5°C 下放置 30 分鐘後, 迅即移至直徑 5 cm 測光槽, 在 352 nm 波長下測吸光值。

5. 霍亂弧菌培養: 自營養洋菜斜面勾取三白金耳菌種, 移入含有 0.8% NaCl 之營養培養液 (nutrient broth) 中, 以 37°C 培養 18~20 小時, 作為供試菌液 (約  $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml)。

6. 實驗方法: 吸取 50 ml 供試菌液於含 450 ml pH 7.2 磷酸鹽緩衝液之 1.5 l 瓶中, 通入臭氧及或以超音波振盪, 每隔一定時間取樣塗抹於 TCBS 洋菜培養基上, 以 37°C 培養 20~24 小時計算其典型霍亂弧菌落數。

## 結果與討論

臭氧在水中之安定性概視臭氧初濃度、水溫、pH 值、有機物及無機物之種類和含量之多寡等因素而異<sup>(23)</sup>, 本試驗先行檢討 pH、水溫及食鹽濃度對臭氧溶存量之影響, 再以較適條件探討臭氧及/或超音波之殺菌效果。

### 一、pH:

Merkulova 等 (1971) 指出稍偏酸性溶液可提高臭氧之安定性; Sherman (1976) 亦說明加少許乙酸於水中可顯著增加臭氧之濃度<sup>(23)</sup>; Yang 與 Chen<sup>(23)</sup> 在 pH 3~11 間以臭氧處理時, pH 較低者殺菌效果較佳。內藤及志賀<sup>(24)</sup> 以 *Bacillus coagulans* 及 *Saccharomyces bayanus* 懸濁液在 5°C 及 20°C 下, 以 0.3 mg/l 臭氧處理時, 在 pH 3~11 間以 pH 低者殺菌效果較好。Huq 等<sup>(11)</sup> 以 pH 6.5、7.5 及 8.5 探討 pH 對霍亂弧菌之殺菌效果, 亦以 6.5 較佳。

Heidt<sup>(25)</sup> 發現臭氧在含 0.0001 N NaOH 以上濃度時相當安定, 而在強鹼性 (7 N NaOH) 下則非常安定; Rice<sup>(26)</sup> 整理 1970 年代臭氧應用於有害物質 (priority pollutants) 處理之研究顯示, 在高 pH (8~9) 時, 臭氧在水溶液中會快速分解為氫氧自由基, 而其氧化能力較臭氧分子本身為強。

因以上文獻實驗條件不一, 臭氧測定法亦異, 筆者等為求實用性, 以接近草蝦肉之 pH 來進行試驗, 在 pH 5.0、6.3、7.2 及 8.0 等四組中, 如圖 1 所示, 即在 pH 5.0、6.3、7.2 及 8.0 的 0°C 3% NaCl 水溶液, 通臭氧後, 在前 20 分鐘內臭氧溶存量 (以中性緩衝溶液中反應顏色之方法) 相差不大, 至 60 分鐘為止, 最高與最低僅相差約一倍, pH 7.2 與 8.0 二組較高, 此結果與上述 Heidt 之報告<sup>(25)</sup> 相近。

### 二、鹽 度:

陳等<sup>(7)</sup> 發現臭氧在蒸餾水或在 3% 食鹽水中, 殺菌效果比在含有有機物質的水溶液為強。Hoigne 及 Bader (1983 及 1985) 的研究指出, 海水中臭氧的溶存量顯然比淡水中低, 主要係海水中金屬離子、氯離子、有機物等易促進臭氧之分解<sup>(27)</sup>。加藤等 (1969) 將 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis* 菌液, 懸濁於含 0.85% 鹽水中, 用臭氧處理時, 對細菌之抑制效果比懸濁於蒸餾水中為佳<sup>(24)</sup>; Yang 及 Chen<sup>(23)</sup> 的結果亦顯示含 1.0 及 2.5% NaCl 時較 0% 之殺菌效果良好。內藤及志賀<sup>(24)</sup> 指出不含食鹽之溶液, 其臭氧溶存量較高, 食鹽濃度 5% 比 0% 殺菌效果好, 但濃度超過 5% 殺菌效果反而降低。Huq 等<sup>(11)</sup> 在同條件下, 霍亂弧菌在 5 ppt 下比在 10 或 15 ppt 生存期間短。

本試驗以含 0、2、3、5% NaCl 進行比較, 如圖 2 所示, 臭氧溶存量以 2% 組為最多, 其次為 3% 組, 5% 組與 0% 組最少。

### 三、不同溫度下, 臭氧之殺菌效果:

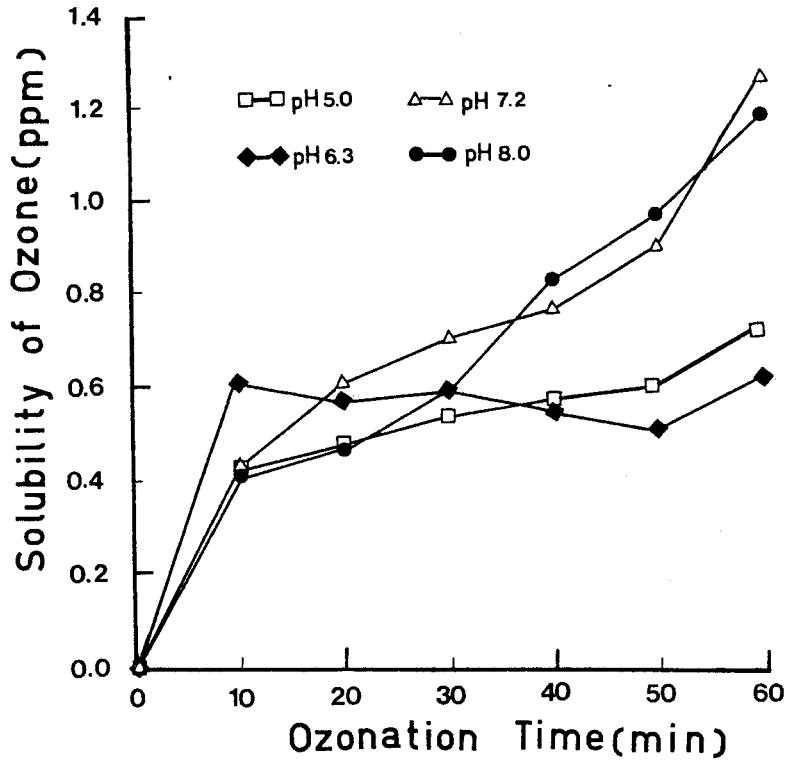


Fig.1 The solubility of ozone in 3% NaCl solution with various pH at 0°C. Ozonation rate = 160 mg/h.

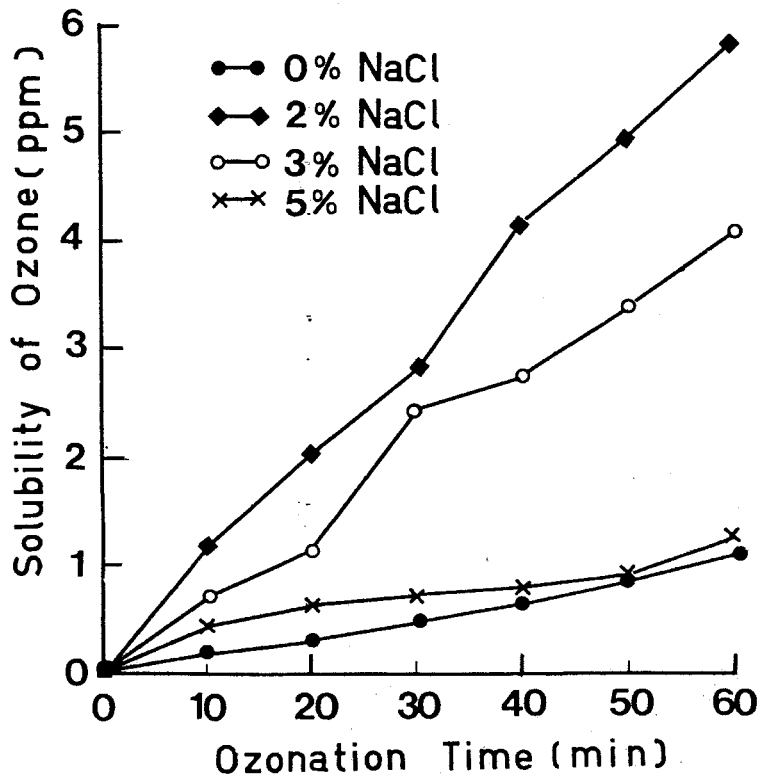


Fig.2 The solubility of ozone in various NaCl solution ( pH 7.2 ) at 0°C. Ozonation rate = 160 mg/h.

Huq 等<sup>(11)</sup>指出 01 血清型霍亂弧菌在 5 及 15 °C 比在 25 及 35 °C 生存期間為短。內藤及志賀<sup>(24)</sup>的報告中，臭氧之殺菌效果在 5 °C 比 20 °C 好。Yang 及 Chen<sup>(23)</sup>的報告中，2 °C 比 25 °C 臭氧溶存量多，殺菌效果亦較佳。陳等<sup>(7)</sup>則認為 5 °C 與 25 °C 比較，對臭氧之殺菌作用差別不大。

本試驗以 0、5 及 25 °C 進行探討，結果如圖 3 所示，5 °C 與 0 °C 之殺菌效果相近，而 25 °C 者則較差，0 °C 者在 60 分鐘內比 5 °C 者約可節省 20 分鐘的處理時間。

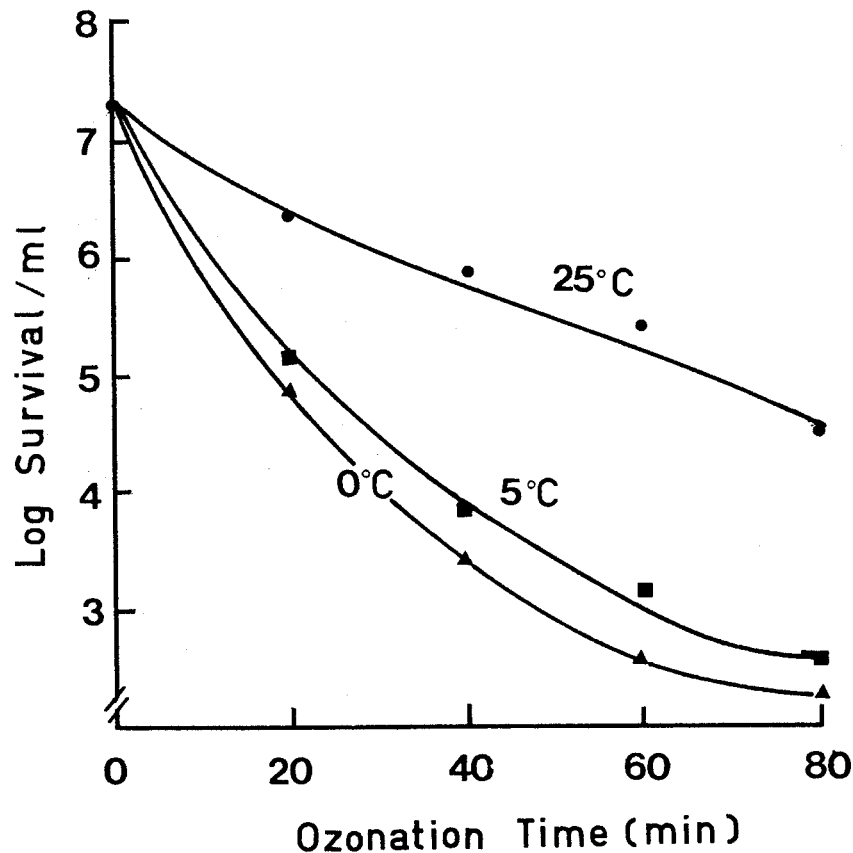


Fig. 3 Sterilization effect of ozone on *Vibrio cholerae* in 2% NaCl solution (pH 7.2) at various temperatures. Ozonation rate = 160 mg/h.

#### 四、不同溫度下，超音波之殺菌效果：

Burleson 等<sup>(20)</sup>認為其原因係超音波可使有機顆粒破碎，使附著其上之細菌分散，而曝露於臭氧中受氧化致被殺滅，並指出因超音波瞬間脈衝 (pulse) 所造成的空洞現象 (cavitation) 可降低有機顆粒之高表面張力，會降低細菌之活力。

筆者等以前述 pH、鹽度之較適條件，使用 20 KHz 頻率之超音波，探討其殺菌效果，如圖 4 所示，0 和 5 °C 的 2% 食鹽水中，80 分鐘後菌數僅降低 3 個對數值，效果不甚理想。

#### 五、不同溫度下，臭氧與超音波併用處理之殺菌效果：

Boucher 等<sup>(28)</sup>認為超音波可加速擴散使有毒氣體分子能迅速滲透進入微生物體內，但此種理論並不能解釋 Dharker<sup>(29)</sup>先以超音波振盪，可節省 50%  $\gamma$ -ray 殺菌線量 (dosage) 之理由。

Dahi<sup>(30)</sup>以 20 KHz 超音波配合臭氧觀察滅菌之效果，從物理化學觀點進行解析，認為超音波可

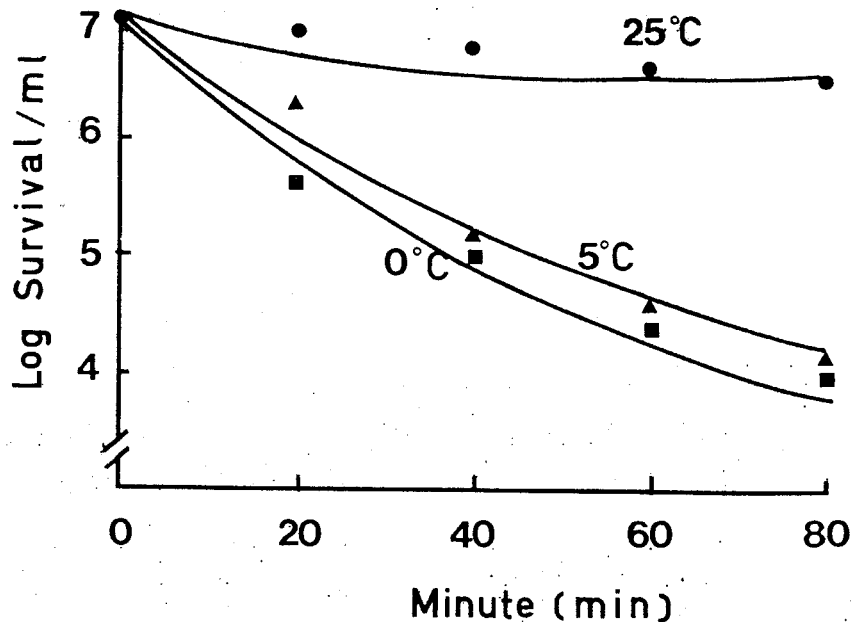


Fig. 4 Sterilization effect of ultrasonic vibration on *V. cholerae* in 2% NaCl solution (pH 7.2) at various temperatures. Frequency of ultrasonic vibration: 20 KHz.

(1)促使臭氧裂解，生成自由基，增加活性，(2)增加通氣常數，相對減少臭氧之殺菌劑量。Burleson等<sup>(20)</sup>以數種病毒(viruses)及細菌(*Staph. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, enteropathogenic *E. coli*, *V. cholerae*, *Shigella flexneri*)，使用臭氧和超音波併用處理，認為具有相乘效果。筆者等認為有可能實用化，乃進行實驗，結果如圖5所示，0及5°C者在40分鐘內即可降低約7個對數值，雖然本報告僅是模擬試驗，但本結果顯示：臭氧和超音波併用處理時，對霍亂弧菌具有極佳之殺菌效果，令筆者等感到非常興奮。

### 摘要

臭氧以 160 mg/h 之速率通入食鹽水溶液中，在 0°C 時臭氧溶存量之最適條件為 pH 7.2 的 2% 食鹽水溶液。對霍亂弧菌 01 血清型滅菌效果之模擬試驗，係以臭氧(通入速率 160 mg/h)或超音波(頻率 20 KHz)或兩者併用，在 0、5 和 25°C、pH 7.2 含霍亂弧菌液(10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> CFU/ml)的 2% 食鹽水溶液中，經 80 min 之處理。單獨使用臭氧時，5°C 和 0°C 之效果相近，可使霍亂弧菌菌數減少 4.5 ~ 5 個對數值，25°C 者減少約 3 個對數值；單獨使用超音波時，5°C 和 0°C 之效果亦相近，可減少霍亂弧菌菌數 3 個對數值，但 25°C 者殆無效果；併用臭氧和超音波時，0°C 和 5°C 者在 40 min 後可使霍亂弧菌菌數減少約 7 個對數值，而 25°C 者則需 60 分鐘才有此一效果。上述結果顯示，以臭氧和超音波併用之處理較其單獨使用時之效果為佳，二者具有相乘之效果。

### 謝辭

本試驗承蒙臺灣大學動物系魚病學研究室提供菌種，康民公司慷慨借用臭氧產生器，本系同仁之協助及張副研究員士軒之指正，謹申謝忱。

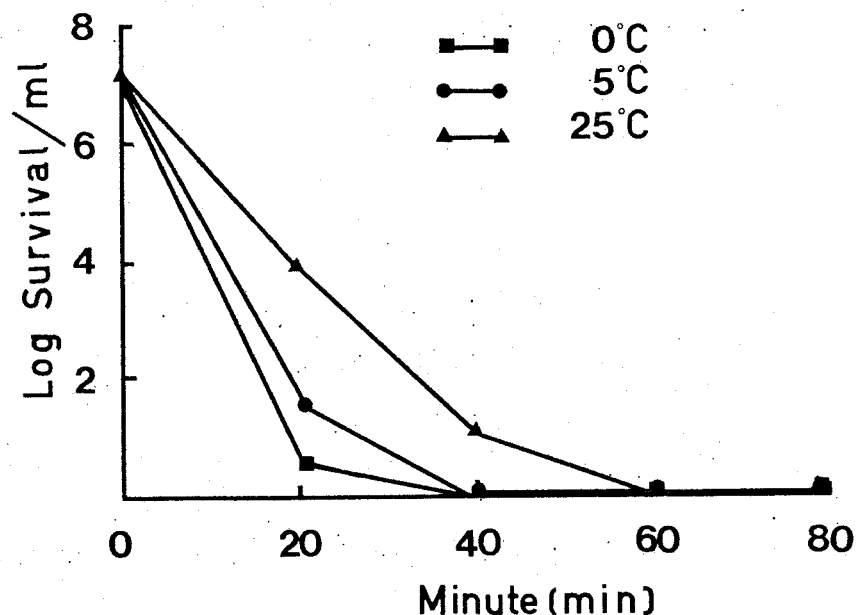


Fig.5 Sterilization effect of both ozone and ultrasonic vibration on *V. cholerae* in 2 % NaCl solution ( pH 7.2 ) at various temperatures. Ozonation rate = 160 mg/h. Frequency of ultrasonic vibration : 20 KHz.

### 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.吉田榮敬 ( 1987 ). 臺灣における輸出冷凍食品の衛生管理状況。食品衛生研究, 37(9), 21-44.
- 3.劉中和、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集, 2, 1-6.
- 4.藤原喜久夫 ( 1985 ). 海水における魚介類洗浄とビブリオ汚染の關係について。食品衛生研究, 35(7), 7-16.
- 5.董明澄 ( 1986 ). 鯊霍亂菌消毒及加工試驗報告。未見正式發表。
- 6.董明澄 ( 1986 ). 養殖牛蛙之衛生消毒研究報告。未見正式發表。
- 7.陳幸臣、張素娥、尹肖箴 ( 1987 ). 臭氧的殺菌效果及應用於水產加工上之研究。臺灣水產學會刊, 14(2), 79-89.
- 8.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。臺灣省水產試驗所試驗報告, 45, 245-261.
9. Sochard, M.R., D.F. Wilson, B. Austin and R.R. Colwell ( 1979 ). Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. Appl. Environ. Microbiol., 37(3), 750-759.
10. 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.
11. 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 micocosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(1), 420-424.
12. De Paola, A. (1981). *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: A literature review. *J. Food Sci.*, 46(1), 66-70.
  13. Amako, K., S. Shimodori, T. Imoto, S. Miake and A. Umeda (1987). Effect of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(3), 603-605.
  14. 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、齋藤富士雄、松澤壽次 (1987). 「オゾン発生装置つき魚介類冷海水処理機」の検討について。食品衛生研究, 37(9), 51-55.
  15. Shimodori, S., T. Moriya, O. Kohashi, D. Faming, and K. Amako (1989). Extraction from prawn shells of substances cryoprotective for *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(10), 2726-2728.
  16. 内藤茂三 (1986). オゾンによる食品殺菌の実際とその効果。オゾン利用の新技术, 第五章, pp. 193-232, 三秀書房。
  17. Mudd, J.B., L. Leavitt, A. Ongun and T.T. McManus (1969). Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos. Environ. Perg.* 3, 669-682.
  18. Hamelin, C. and Y.S. Chung (1975). The effect of low concentration of ozone on *Escherichia coli* chromosome. *Mut. Res.* 28, 131-132.
  19. De Mik, G. and I. de Groot (1978). Breaks induced in the deoxyribonucleic acid of aerosolized *Escherichia coli* by ozonized cyclohexene. *Appl. Environ. Microbiol.* 35(1), 6-10.
  20. 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.
  21. Greenberg, A.E., R. Trussell and L.S. Cleseri (1985). In "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (16 edn.) pp.426-429. Published by APHA, Washington DC, U.S.A.
  22. Shecter, H. (1973). Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. *Water Res.*, 7, 729-739.
  23. Yang, P.P.W. and T.C. Chen (1979). Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. *J. Food Sci.*, 44(2), 501-504.
  24. 内藤茂三、志賀一三 (1982). 水中の微生物に対するオゾンの殺菌作用。Nippon Shokuhin Kogyo Gokkaishi, 29(1), 1-10.
  25. Heidt, L.J. and V.R. Landi (1964). Ozone and ozonide production and stabilization in water. *J. Chem. Physics*, 41(1), 176-178.
  26. Rice, R.G. (1981). Ozone for the treatment of hazardous materials. *AIChE Symposium Series*, 77(209), 79-107.
  27. 陳錫秋、張瑞璋、賴幸宜、劉天斌 (1988). 臭氧應用於水質處理之效果。環境保護與生態保育研討會論文專輯, p.181-195.
  28. Boucher, R.M.G., M.A. Pisano, G. Tortora and E. Sawicki (1967). Synergistic effects in sonochemical sterilization. *Appl. Microbiol.*, 15, 1257-1261.



29. Dharkar, S.D. (1964). Sensitization of microorganisms to radiation by previous ultrasonic treatment. *J. Food Sci.*, 29, 641-643.
30. Dahi, E. (1976). Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Water Res.* 10, 677-684.