

二氧化氯對噬菌體 MS2 及其宿主細胞 之殺菌效果評估

姚國山* 張禎祐* 李淑娟**

*明道大學生命科學學系副教授

**明道大學休閒保健學系學生

摘 要

本研究主要探討電解法二氧化氯溶液對噬菌體 MS2 與其宿主細胞大腸桿菌 (*Escherichia coli* BCRC 50354) 之殺菌效果。經不同濃度與 pH 值之二氧化氯溶液對噬菌體 F-specific bacteriophage (MS2) 及其宿主細胞大腸桿菌 (*E. coli* BCRC 50354) 進行處理，實驗結果顯示 134.00 ppm 濃度之二氧化氯溶液對 F-specific bacteriophage (MS2) 具有顯著之殺菌效果，然而對宿主細胞大腸桿菌 (*E. coli* 50354) 之抑菌率則約為 83.7%。此外，當溶液酸鹼值介於 6.0~8.0 之間，二氧化氯溶液對 F-specific bacteriophage (MS2) 及宿主大腸桿菌 (*E. coli* BCRC 50354) 皆具有穩定之殺菌效果。

關鍵字：二氧化氯、噬菌體、大腸桿菌、殺菌率

*通訊作者. Tel: 04-8876660 ext. 8600
E-mail: ksyao@mdu.edu.tw

壹、前言

二氧化氯是一種帶有特殊的漂白水味道的黃綠色氣體，溶解度極大且性質極為特殊，對水的溶解度大約是氯氣的 5 倍，於 25 °C，30 mm-Hg 分壓下，對水的溶解度為 2.9 g ClO₂/1L H₂O；二氧化氯雖然可迅速溶於水中，但極大部分是以分子型態存在於水中，不會與水分子產生化學反應或解離；二氧化氯是一種氧化力很強的化學消毒殺菌劑，而不是氯化劑，因而沒有氯化劑的毒副作用(朱，1999)，因此被世界衛生組織(WHO)和美國糧農組織(FAO)向全世界推薦的 AI 級高效安全消毒劑與食品添加劑，並被歐美國家推崇為第四代消毒劑。二氧化氯具有高效、低毒、快速、廣譜的殺菌能力，能有效殺死枯草芽孢桿菌、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌以及真菌和藻類，它的殺菌能力是氯製劑的 5~10 倍，殺菌時效長，約為氯的 10 倍。美國環境保護署(EPA)認為二氧化氯是替代氯消毒劑的第一選擇(宋，1999；賀，1999；Aieta, et al., 1986; Junli, et al., 1994; and Werdeho, et al., 1987)。

二氧化氯的強氧化性和殺滅細菌的能力，使得二氧化氯在廢水處理中的研究越來越多，應用也越來越普遍。國外有部分學者利用醋酸、紫外線、臭氧作為廢水之消毒殺菌劑，發現臭氧在低劑量短時間處理下對廢水中的細菌如糞便中的大腸桿菌和鏈球菌及噬菌體(F-specific bacteriophage MS2)等具有顯著的殺菌作用，然而臭氧、紫外線的殺菌作用取決於其使用之標準和方法，故評估總消毒作用之效率時應該再考慮，因此對於廢水中之細菌和病

毒噬菌體之殺菌成效，仍有待進一步深入的探討(Lazarova, et al., 1998)。故本研究主要探討二氧化氯溶液對環境中所存在之噬菌體(F-specific bacteriophage MS2)及其宿主細胞大腸桿菌(*E.coli* BCRC 50354)之殺菌效果，以期作為廢水中之微生物消毒參考，並減少化學藥劑對生態環境的危害。

貳、材料與方法

2.1 實驗設備

2.1.1 微生物培養室(高溫高壓滅菌釜、無菌工作台、恆溫培養箱(Model CRI-60)、pH 測定儀(Spectronics P-2200)、光度分析儀(Genesys 20 spectrophotometer)、Stat Fax 2100 Operator's Manual、Photometer System PC Multi-Direct。

2.1.2 實驗測試用之二氧化氯溶液，是由注溢生化科技公司所提供之機組以電解法製備生成(姚&曾，2006)。

2.2 實驗方法

2.2.1 二氧化氯溶液濃度定量

使用注溢生化科技公司提供之二氧化氯電解溶液為本實驗之消毒劑，並以光度計 Photometer System PC Multi-Direct DPD 法進行二氧化氯溶液濃度之定量(環保署，2006)。

2.2.2 供試噬菌體菌株之培養與製備

供試之噬菌體 bacteriophage MS2 BCRC 70106 購自生物資源保存及研究中心，並由本研究室繼代培養保存，噬菌體 bacteriophage MS2 BCRC 70106 之培養，簡要步驟如下：取 100 μl 噬菌體(MS2)加入 300 μl 宿主細胞大腸桿菌(*E.coli* BCRC 50354)

中反應 15 分鐘後，取混合液 100 μ l 加入 10 ml LB (Luria-Bertani medium, 含有 1% 胰蛋白胍、0.5% 酵母膏及 1% 氯化鈉, pH 7.0), 在 32°C 震盪培養 24 小時後, 取 2 ml (含宿主細胞液及噬菌體) 移入離心管, 離心 10 分鐘以沉澱宿主細胞, 取上清液移至新試管中並過濾(孔徑=0.45 μ m) 去除殘餘菌體, 將 30 ml 之宿主細胞液與 300 μ l 噬菌體懸浮液混合均勻靜置感染 15 分鐘, 作為以下殺菌效果實驗之用。

2.2.3 供試大腸桿菌細菌菌株之培養與製備

供試之大腸桿菌 (*E.coli* BCRC 50354), 購自新竹菌種中心, 並由本研究室繼代培養保存, 大腸桿菌培養於 25 ml LB 培養基, 在 32°C 培養箱中培養 24 小時, 作為下列殺菌效果實驗之用。

2.3 殺菌效果之測試

2.3.1 二氧化氯對噬菌體殺菌效果測試

取上述二氧化氯溶液進行不同濃度、pH 值對 F-specific bacteriophage MS2 處理 15 分鐘, 將作用完畢後之溶液迅速與 3 ml 含 0.7% Agar 之 LB 培養基混合均勻, 再將其倒在 LBA 培養基平板上, 待上層 0.7% LBA 培養基已完全凝固, 再將其倒置培養於 37°C 培養箱中, 隔日觀察並計算溶菌斑數目, 以評估分析其殺菌效果。抑菌率(%) = $[1 - \text{Titer}(t)/\text{Titer}(i)] \times 100\%$; Titer (i) 為對照組(未經二氧化氯溶液處理) 經 24 小時培養後之溶菌斑數, Titer (t) 為實驗組(經二氧化氯溶液處理) 經 24 小時培養後之溶菌斑數。

2.3.2 二氧化氯對宿主細胞殺菌效果測試

取上述二氧化氯溶液進行以其不同濃度、pH 值及菌株 (*E. coli* BCRC 50354) 處

理 15 分鐘, 進行系列稀釋後取 100 μ l 加入 900 μ l LB 培養液內並含 0.01% 之 2, 3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 以作為活菌生長之指示劑, 置於 32°C 培養箱中經 5 小時培養, 並利用光度計 (spectrophotometer) 在波長 545 nm 下測其吸收值, 以評估分析其殺菌效果。抑菌率(%) = $[1 - \text{OD}(t)/\text{OD}(i)] \times 100\%$, OD(i) 為對照組(未經二氧化氯溶液處理) 經 5 小時培養後之吸收值, OD(t) 為實驗組(經二氧化氯溶液處理) 經 5 小時培養後之吸收值。

參、結果與討論

3.1 不同濃度二氧化氯之殺菌效果

3.1.1 不同二氧化氯溶液濃度對噬菌體殺菌效果之影響

分別利用含有 134.00、67.00、6.70、0.67 ppm 等四種不同濃度之二氧化氯溶液, 對噬菌體(F-specific bacteriophage MS2) 進行殺菌效果之評估, 實驗結果如圖一(A) 所示, 二氧化氯溶液濃度在 134.00 ppm 時對噬菌體具有非常顯著之殺菌效果, 其抑菌率約為 98.1%。但當濃度降為 67.00、6.70 及 0.67 ppm 時, 其對 MS2 菌株之殺菌率則分別降為 64.3%、47.2% 及 18.8%。二氧化氯對病毒的殺菌作用與氯溶液之殺菌作用略有不同, 有學者推測認為乃因二氧化氯可以吸附並穿過病毒的鞘蛋白(coat protein) 與病毒內之基因反應, 進而損傷其基因組合, 而氯溶液聚集於病毒鞘蛋白表面之能力略低於二氧化氯溶液(王等, 2001; Huang, et al., 1997)。

3.1.2 不同濃度二氧化氯溶液對大腸桿菌

細菌殺菌效果之影響

分別利用含有 134.00、13.40、1.34、0.13 ppm 等四種不同濃度之二氧化氯溶液，對大腸桿菌細菌進行殺菌效果之評估，實驗結果如圖一(B)，二氧化氯溶液濃度在 134.00 ppm 時對大腸桿菌具有良好之殺菌效果，其抑菌率約為 83.7%。當濃度降為 13.40 ppm 時，其抑菌率並無顯著下降（約為 81.6%），但當濃度降為 1.34 及 0.13 ppm 時，其殺菌率則分別降為 51.6% 及 12.1%。此結果與 Fu *et al.*(2003)所指出二氧化氯濃度為 15 ppm 時對 *E. coli* (ATCC 8099)之殺菌率約為 93.22% 相類似。

3.2 不同 pH 值對二氧化氯殺菌效果之影響

為了解二氧化氯溶液在不同 pH 值環境中對噬菌體 MS2 及宿主大腸桿菌生長之影響，利用 0.1 M 磷酸鉀緩衝液 pH 6.0、pH 7.0 及 pH 8.0 等作為系列稀釋之緩衝溶液，抑菌結果如圖二所示。當 pH 值在 6.0、7.0 及 8.0 時且不同濃度之二氧化氯溶液，對噬菌體 MS2 及宿主大腸桿菌之殺菌率，皆無顯著的變化。換言之，酸鹼值介於 6.0~8.0 之間，二氧化氯溶液具有穩定之殺菌效果。此結果與 Huang *et al.*(1997)及姚&曾（2006）所指出二氧化氯溶液於較寬的酸鹼範圍內仍具有抑菌作用相符。

肆、結論

當二氧化氯溶液濃度於 134.00 ppm 時分別對噬菌體 MS2 菌株及其寄主大腸桿菌 (*E. coli* BCRC 50354) 皆具有顯著的

殺菌效果，而當二氧化氯溶液 pH 值介於 6~8 時，對噬菌體 MS2 菌株及其寄主 *E. coli* BCRC 50354 之殺菌率並無顯著的改變。

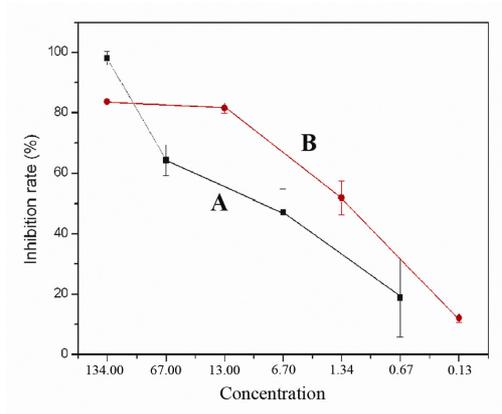
誌謝

感謝注溢生化科技公司提供電解機組製備二氧化氯溶液，以利本研究之進行。特致謝忱。

伍、參考文獻

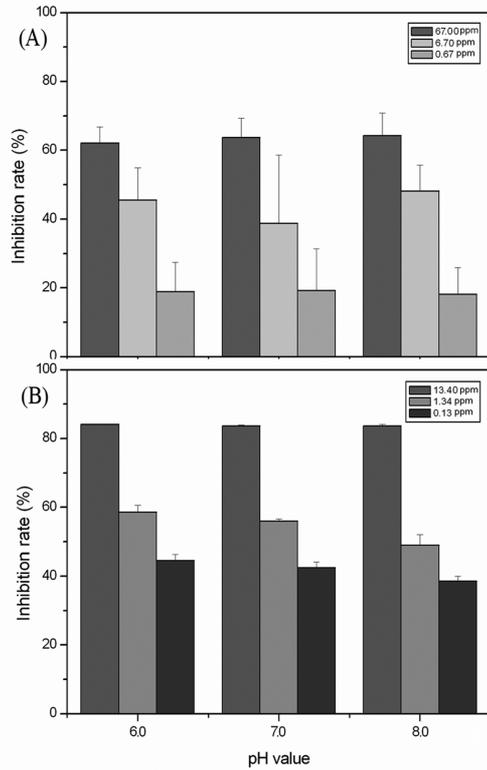
- 王麗、黃君禮、孫榮芳、崔岩。(2001)。二氧化氯對不中流感病毒的消毒效果。中國環境科學 21：256-258。
- 朱文錦。(1999)。二氧化氯在水產養殖中的應用。河南水產 2:14-38。
- 宋力、張佳儀。(1999)。二氧化氯溶液穩定性的研究。中國二氧化氯研究與應用研討會論文集。頁 87。
- 姚國山、曾國欽。(2006)。二氧化氯對植物細菌性軟腐病與基腐病原細菌之殺菌評估。明道學術論壇 2(1):73-78。
- 賀啓環、黃志明。(1999)。二氧化氯的標準化、生產和應用。中國二氧化氯研究與應用研討會論文集。頁 1-5。
- 環保署。(2006)。水中餘氯檢測方法—分光光度計法(NIEA W408.51A)。環署檢字第 0950063028 號公告。
- Aieta, E. M., Hernandez, M., and Hernandez, M. (1986). A balanced view of chlorine dioxide. *J. AWWA* 78: 62-72.
- Fu, D., Wang, J.G., and Chen, K.G. (2003). Experimental observation on germicidal efficacy of stable chlorine dioxide solution. *Chinese J. Disinfect.* (2003), 20(2): 95-98.

- Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F., Liu, X. L., Sun, R.F., and Yang, G. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Wat. Res.* 31(3): 455-460.
- Huang J., Wang L., Ren N., Ma F., and Juli, F. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Wat. Res.* Vol. 31(3): 607-613.
- Junli, H., Chao, Y., and Wang, X. 1994. Influence of chlorine dioxide on chloroform formation. *Environ. Chem.* 13(5): 466-473.
- Lazarova, V., Janex, M.L., Fiksdal, L., Oberg, C., Barcina, I., and Pommepuy, M. (1998). Advanced wastewater disinfection technologies: short and long term efficiency. *Wat. Sci. Technol.* 38 (12): 109-117.
- Werdeho, K.S., and Singer, P.C. (1987). Chlorine dioxide effects on THMPF, TOXFP, and the formation of inorganic byproducts. *J. AWWA* 79:107-13.



圖一 不同濃度之二氧化氯溶液對(A)噬菌體 MS2，及(B)其宿主細胞的殺菌效果。結果為四次實驗平均值 ± 標準差。

Fig. 1. Killing effect of chlorine dioxide dosages on (A): bacteriophage MS2, and (B): host cell, *E. coli*, respectively. Values are mean ± standard error (n=4)



圖二 不同 pH 值之二氧化氯溶液對 (A) 噬菌體 MS2，及 (B) 其宿主細胞的殺菌效果。結果為四次實驗平均值 ± 標準差。

Fig. 2. Killing effect of chlorine dioxide pH on (A): bacteriophage MS2, and (B): host cell, *E. coli*, respectively. Values are mean ± standard error (n=4).

Disinfection efficiency of chlorine dioxide solution on bacteriophage MS2 and *Escherichia coli*

K.S. Yao*, C.Y. Chang*, and S.J. Lee**

*Associate professor of Department of Life Science, MingDao University

**Student of Department of Holistic Wellness, MingDao University

Abstract

In this study, the disinfection efficiency of chlorine dioxide solution prepared by electrolysis method on the F-specific bacteriophage MS2 and its host bacteria (*Escherichia coli* BCRC 50354) was evaluated under various concentrations and pH values. The results showed that the killing effect of chlorine dioxide solution at the concentration of 134.00 ppm on MS2 phage is apparently efficiency. However, the disinfection rate of chlorine dioxide solution at the concentration of 134.00 ppm on *E. coli* is about 83.7%. In addition, the MS2 phage and *E. coli* were constantly killed off by chlorine dioxide solution under the range of pH value from 6 to 8.

Keywords : Chlorine dioxide, Bacteriophage, *Escherichia coli*, Disinfection rate