

2022 年【全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

國中組 成果報告表單

題目名稱： 這樣噴最好！--次氯酸水與二氧化氯的噴霧滅菌實驗

一、摘要

滅菌是防疫新生活中很重要的一部分，但是要怎麼使用滅菌商品才有效？要噴幾次？該停留多久的時間？我們查資料發現過去針對滅菌的研究都是用滴定的方式，跟日常生活的使用方式不同。所以，在這個報告中，我們選擇了已經商品化的次氯酸水與二氧化氯作為研究的對象，採用廠商建議的使用濃度 100 ppm，模擬平常噴霧使用的方式，來探討噴幾次、停留多少時間對消滅大腸桿菌的功效。

實驗的結果可以發現，兩種滅菌劑在噴灑一次的時候，就有很大的滅菌效果，而最有效率的方式是「噴兩次、停留 1 分鐘」，這個結果可以作為日常生活滅菌使用上的依據。

二、探究題目與動機

這兩年疫情深深地影響了我們的生活，在防疫新生活中，進入公共場所都要進行手部清消的動作。某次在新聞中我們看到，除了酒精之外，次氯酸水、二氧化氯也是商品化的滅菌產品。我們上網查了資料，知道次氯酸水是美國 FDA 公告的食品殺菌成分，可用在皮膚消毒清潔以及眼藥水中 (Sipahi et. Al, 2019)，也是日本厚生省公告之食品殺菌添加物 (日本厚生省，2009)，而二氧化氯也是美國 FDA 認可的滅菌劑，可使用於環境清潔與器皿消毒。但是這些資料中，除了建議的使用濃度之外，沒有要噴幾次、要停留多久的說明，都眾說紛紛，這也引發了我們的好奇心。

在訪問教授跟找資料之後我們發現，過去評估商品的滅菌能力是用滴定的方式來做實驗 (Hsu et. al,2019)，跟我們平常用噴霧的方式不一樣，這引發了我們想要做個模擬實驗的動機。

三、探究目的與假設

我們想要了解，在一般民眾的使用方式 (也就是噴霧的方式) 下，滅菌商品該怎麼使用才會有效？我們假設影響滅菌商品有效的因素是「接觸的時間」跟「使用的量」，轉換成日常使用的情況，那就是要噴幾次、以及要在手上停留多久。所以我們的探究目的是：

- 1、了解滅菌實驗的流程及滅菌效果的評估方法。
- 2、探討不同劑量、不同停留時間下，次氯酸水與二氧化氯的噴霧滅菌效果。
- 3、提出次氯酸水與二氧化氯有效噴霧使用建議。

四、探究方法與驗證步驟

在開始正式的實驗之前，我們先去學習怎麼做微生物的實驗 (照片 1)。我們從資料中得知，「大腸桿菌」是環境當中的指標微生物 (SGS，2021)，常常拿來評估環境衛生，也相對安全，所以我們選擇用大腸桿菌來做實驗。

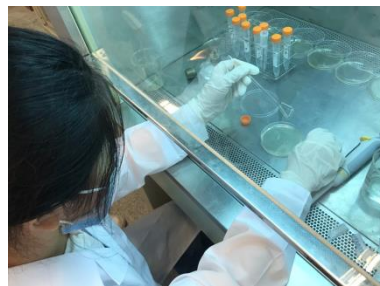
因為要評估不同的停留時間對滅菌效果的影響，所以我們使用了 0.3% 硫代硫酸鈉來中止次氯酸水與二氧化氯的滅菌反應 (硫代硫酸鈉是脫氯劑，會跟消毒水中的 ClO^- 反應)。這也是我們沒有拿酒精來做實驗的原因，因為我們查不到酒精的中止劑。



照片 1、學習做實驗



照片 2、製作培養基



照片 3、抹碟

4-1 實驗設備

我們使用到的實驗藥品與設備整理在表 1。

表 1、實驗藥品、設備及耗材

| 藥品 | 儀器與設備 | | 耗材 |
|-------------------------------------|-------|------------------------|----------------|
| 100 ppm 次氯酸水 | 無菌操作台 | PP 塑膠板 | 培養皿 |
| 100 ppm 二氧化氯 | 滅菌釜 | 5×5 cm ² 框架 | PP 離心試管 |
| 純大腸桿菌菌液 | 震盪機 | 酒精燈 | 噴霧瓶 |
| Tryptone Soy Agar (TSA) 胰蛋白酶大豆瓊脂 | 電子天平 | 定量吸管 (Pipette) | 定量吸管尖 (Tip) |
| 0.3% 硫代硫酸鈉 | 接種環 | 三角錐瓶 | 錫箔紙 |
| 環己烷 | 定量瓶 | | 無菌棉花棒 |
| 酒精(95%、75%) | | | 去離子水 |

4-2 實驗方法與步驟

我們的實驗分為兩部分，首先製作細菌的培養基，完成之後才能開始做滅菌的實驗。滅菌實驗也分為兩個部分，首先要選定實驗用大腸桿菌的濃度，然後才是滅菌的噴霧實驗。

1、細菌培養基製作流程

- (1) 1 L 的去離子水加入 40 g TSA，混和後用錫箔紙將三角錐瓶瓶口封口。
- (2) 將三角錐瓶放到滅菌釜中，在 121°C 以及壓力 1.2 kg/m² 下滅菌 15 分鐘以上。
- (3) 調配抑菌劑。取 100 mg 環己烷加入 2 mL 95% 酒精，用定量吸管取 0.1 mL 注入培養基。
- (4) 將培養基移至生物安全櫃中，並點燃酒精燈，使空氣對流。
- (5) 取 20 mL 的 TSA 培養液倒入培養皿中，並開啟 UV 燈等待凝固（照片 2）。
- (6) 凝固後，等待 48 小時觀察有無污染，無污染即可做為細菌培養基。

2、滅菌實驗流程

- (1) 取一塊 PP 塑膠板，表面先以 75%酒精進行消毒。
- (2) 放置 5×5 cm² 框架於塑膠板上，利用無菌棉花棒將濃度固定之菌液接種塗抹至 5×5 cm² 平面範圍內。
- (3) 利用手動噴霧瓶將特定種類與濃度之消毒劑，分別以噴一次、兩次、三次壓按方式噴霧於已接種菌液之平面上，設定噴霧距離為 5 cm。
- (4) 噴霧後分別靜置 1 與 2 分鐘，待消毒劑進行反應。
- (5) 利用無菌棉花棒，在 5×5 cm² 平面上分別用三個方向來回塗抹，同時轉動棉花棒，使其均勻塗抹。
- (6) 將塗抹後棉花棒剪下，放入裝有 9.9 mL 無菌水與 0.1 mL 0.3% 硫代硫酸鈉之試管中，進行震盪。
- (7) 取 0.01、0.1 mL、1 mL 試管內溶液，抹於培養基內（照片 3），以 35°C 培養 24-48 小時後進行菌落數計算。

4-3 大腸桿菌實驗濃度的選擇

實驗首先進行不同稀釋倍率大腸桿菌的培養，以確認實驗中所使用的大腸桿菌濃度，在經過培養後，可以獲得合適的菌落數。因為我們對實驗不熟悉，所以進行了多次的測試。

1、稀釋倍率 1,000,000 倍的測試

分別採用「稀釋 10,000 倍，取 1mL 菌液」、「稀釋 1,000 倍，取 0.1 mL 菌液」的方式進行實驗，實驗中使用已浸泡至 95%酒精並使用酒精燈消毒之三角彎棒抹至沾板上，用無菌棉花棒塗抹後，將塗抹後無菌棉花棒剪下，放進裝有 9.9 mL 無菌水與 0.1 mL 0.3% 硫代硫酸鈉之試管中，震盪完畢後取 0.1 mL 抹碟，重複三次。

兩次實驗結果皆沒有培養出菌落，無法算數。

2、稀釋倍率 10,000 倍及 100,000 倍的測試

有鑑於 1,000,000 倍稀釋倍率太高，大腸桿菌完全沒有長出來，故決定改以 10,000 倍（稀釋 100 倍，取 1mL 菌液）以及 100,000 倍（稀釋 100 倍，取 0.1mL）進行測試。實驗步驟跟第一次的步驟相同。

實驗培養結果顯示，10,000 倍三重複的菌落數分別為：17/23/10 顆；100,000 倍三重複的菌落數分別為：12/5/1 顆。

3、稀釋倍率 100,000 倍及 1,000,000 倍的測試

再調整稀釋倍率，採用稀釋 100,000 倍（稀釋 1,000 倍，取 1 mL 菌液），以及稀釋 1,000,000 倍（稀釋 1,000 倍，取 0.1 mL）的方式進行。實驗步驟跟第一次的步驟相同。

實驗培養結果，100,000 倍三重複的菌落數分別為：113/無法計算/71 顆；1,000,000 倍三重複的菌落數分別為：21/32/45 顆。



照片 4、沒有長出



照片 5、一大顆(失敗)



照片 6、21 個菌落

照片 4-6 是部分實驗的結果。依據三個批次的試驗結果，並考量實驗操作熟悉程度的影響，經過討論，決定以 100,000 倍的濃度進行後續的噴霧實驗，實驗條件為將菌液稀釋 1,000 倍，取 1 mL 使用。

4-4 次氯酸水、二氧化氯噴霧滅菌試驗

我們選擇次氯酸水、二氧化氯兩種市面上常見的消毒液來做實驗，並採用廠商建議、可噴灑於人體的濃度來進行滅菌效果的評估。沒有選擇酒精的原因是因為酒精沒有停止劑，也就是說，沒有辦法在實驗中針對「時間」這個因素來進行分析，所以只能放棄。

1、原始菌液的實驗結果

我們做了一組沒有滅菌的實驗作為對照組，三重覆結果為：119/120/147 顆，平均為 128.7 顆（菌落數）。

2、次氯酸水與二氧化氯的滅菌實驗結果

本實驗中，次氯酸水與二氧化氯的濃度選用 100 ppm，這是市售滅菌噴霧的建議使用濃度。而在次氯酸水與二氧化氯的使用量上，則為模擬民眾使用的習慣，分別進行「噴一次」、「噴兩次」、「噴三次」來進行實驗。而次氯酸水與二氧化氯的停留時間則設定為 1 分鐘與 2 分鐘。實驗照片為照片 7-9，結果如下表 2，並將其繪至成圖 1 及圖 2。



照片 7、120 個菌落



照片 8、11 個菌落



照片 9、2 個菌落

表 2、次氯酸水與二氧化氯滅菌實驗結果 (單位：顆)

| | 停留時間 | 次氯酸水 | | 二氧化氯 | |
|------|------|------------------------|-------|------|-------|
| | | 菌落數 | 菌落數平均 | 菌落數 | 菌落數平均 |
| 原始菌液 | | 119/120/147 · 平均 128.7 | | | |
| 噴一次 | 1 分鐘 | 16 | 11.3 | 14 | 15.0 |
| | | 10 | | | |
| | | 8 | | | |
| | 2 分鐘 | 8 | 4.3 | 2 | 1.3 |
| | | 1 | | | |
| | | 4 | | | |
| 噴兩次 | 1 分鐘 | 3 | 2.7 | 1 | 0.7 |
| | | 5 | | | |
| | | 0 | | | |
| | 2 分鐘 | 3 | 2.3 | 0 | 1.0 |
| | | 1 | | | |
| | | 3 | | | |
| 噴三次 | 1 分鐘 | 2 | 1.7 | 1 | 0.7 |
| | | 1 | | | |
| | | 2 | | | |
| | 2 分鐘 | 3 | 2.3 | 1 | 0.7 |
| | | 1 | | | |
| | | 3 | | | |

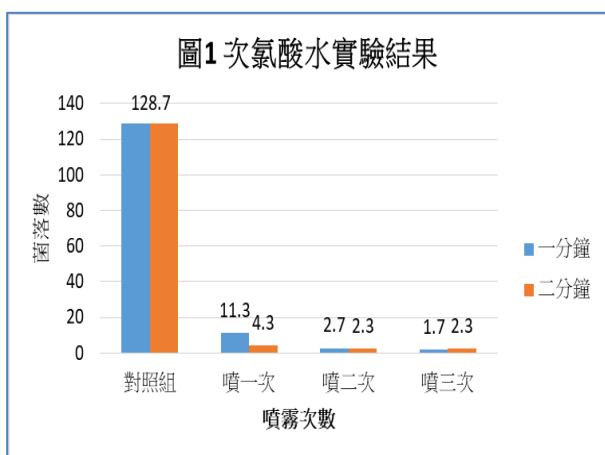


圖 1、次氯酸水滅菌結果

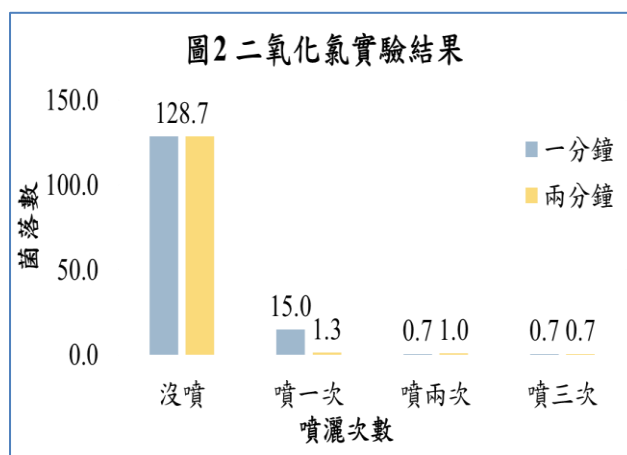


圖 2、二氧化氯滅菌結果

由圖 1 可以看出，使用次氯酸水進行消毒滅菌，在噴一次的時候就有很顯著的效果（原始菌液的平均數量為 128.7 顆），噴 2 次之後有更好的效果，但是噴 2 次跟噴 3 次的效果很類似。進一步探討次氯酸水停留時間造成的影響，可以看出，停留時間 2 分鐘的效果普遍比較好，以噴一次的時候差距最為明顯，噴 2 次、噴 3 次的時候兩者差異不大。比較奇特的是噴三次的情況下，停留時間 2 分鐘的菌落數比停留時間 1 分鐘還要高，這可能是因為滅菌效果太好，能夠數到的菌落數很少，所以有任何的誤差就會被放大了。然而，除去這個部分的矛盾之外，可以初步看出，使用次氯酸水進行滅菌，比較合適的噴灑次數為 2 次，而在噴灑兩次的情況下，停留時間 1 分鐘即可獲得相當良好的滅菌效果。

由圖 2 可以看出，使用二氧化氯進行消毒滅菌，在噴一次的時候就有很顯著的效果（原始菌液的平均數量為 128.7 顆），噴 2 次之後有更好的效果，但是噴 2 次跟噴 3 次的效果很類似。進一步探討二氧化氯停留時間造成的影響，可以看出，停留時間 2 分鐘的效果在噴一次的時候差距最為明顯，噴 2 次、噴 3 次的時候兩者差異不大。在噴 2 次的實驗中也發生了停留時間 2 分鐘的菌落數比停留時間 1 分鐘還要高的情況，推測也是因為滅菌效果太好，能夠數到的菌落數很少，所以有任何的誤差就會被放大了。然而，除去這個部分的矛盾之外，可以初步看出，使用二氧化氯進行滅菌，比較合適的噴灑次數為 2 次，而在噴灑兩次的情況下，停留時間 1 分鐘即可獲得相當良好的滅菌效果。

五、結論與生活應用

本研究以 100 ppm 的次氯酸水跟 100 ppm 的二氧化氯完成了大腸桿菌的噴霧滅菌實驗，實驗結果發現，兩種滅菌劑在噴霧一次的時候，就有很大的滅菌效果。次氯酸水在停留一分鐘的時候，可以將大腸桿菌的菌落數從 128.7 顆，降到 11.3 顆，停留時間兩分鐘的時候，可以降到 4.3 顆；另一方面，二氧化氯也不惶多讓，在停留一分鐘的時候，可以將大腸桿菌的菌落數從 128.7 顆，降到 15.0 顆，停留時間兩分鐘的時候，更可以降到 1.3 顆！而在噴兩次、噴三次的實驗中，無論是次氯酸水還是二氧化氯，都可以把大腸桿菌的菌落數降到 3 以下。

我們進一步探討該怎麼使用這兩種滅菌劑最有效率，發現無論是次氯酸水還是二氧化氯，都是以「噴兩次、停留 1 分鐘」最有效率，這也可以做為日常生活中滅菌使用上的參考。

參考資料

- Hsu, Y. F., Chuang, C. Y., Huang, H. C., & Yang, S. (2019). **Applying Membrane-Less Electrolyzed Water for Inactivating Pathogenic Microorganisms**. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(6), 15019-15027.
- Sipahi H, Reis R, Dinc O, Kavaz T, Dimoglo A, Aydın A. (2019). **In vitro biocompatibility study approaches to evaluate the safety profile of electrolyzed water for skin and eye**. *Human & Experimental Toxicology*. 38(11):1314-26.
- 日本厚生省，(2009/8)，次亜塩素酸水の食品添加物指定に関連する資料，
<https://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/08/dl/s0819-8m.pdf>
- SGS，(2021/8/13)，大腸桿菌檢測方法與標準，<https://msn.sgs.com/Article.aspx?n=5812&d=FOOD>