

不同消毒處理對褐色菜鴨種蛋微生物與孵化之影響⁽¹⁾

鄭智翔⁽²⁾ 蘇晉暉⁽²⁾⁽⁴⁾ 吳弘毅⁽³⁾ 劉秀洲⁽²⁾ 林榮新⁽²⁾

收件日期：107 年 9 月 6 日；接受日期：108 年 3 月 7 日

摘 要

本試驗旨在探討不同消毒處理對褐色菜鴨種蛋微生物與孵化之影響，試驗將收集之種蛋逢機分為 7 組，分別以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘、以霧化之 250 ppm 二氧化氯處理 30 分鐘、以 2.2% 臭氧氣體處理 30 分鐘、以 4.4% 臭氧氣體處理 30 分鐘、以 500 ppm 電解氧化水、500 ppm 四級銨化物及 20 ppm 奈米銀離子溶液噴霧處理 20 分鐘，測試對種蛋之蛋殼表面生菌數與孵化之影響，並進行不同消毒處理對孵化 7 天及 28 天中止鴨胚之病原分析。結果顯示，不同消毒處理均可顯著降低蛋殼表面之生菌數；各處理組之受精率、25 – 28 天中止率、入孵蛋孵化率及受精蛋孵化率均無顯著差異，然而在 0 – 25 天中止率部分，以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組最高。孵化 7 天中止鴨胚之病原分析結果顯示，以濃度 2.2% 及 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組，對多種微生物均有明顯清除效果，其次則為以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組；從孵化 28 天中止鴨胚之病原分析來看，可發現孵化過程中，環境微生物有持續增長之現象。

關鍵詞：種蛋、褐色菜鴨、消毒。

緒 言

有效的家禽疾病控制仰賴於清潔及消毒的良好規劃，而孵化系統掌握雛禽品質，是提供清潔雛禽的重要一環。孵化場主要的污染來源為人員、設備、空氣及種蛋，其中人員為主要的疾病媒介，但設備、種蛋及空氣在某些場合中亦為重要的疾病散布者。如果要生產高品質的家禽，所有的病媒必須成功控制(Ernst, 2004)。種蛋的蛋殼表面若附著墊料、糞便或泥土時，會因為微生物入侵蛋內的機會升高而導致孵化率降低(Tullett, 1990; Cox *et al.*, 2000)。透過消毒來殺滅種蛋蛋殼表面的微生物，才能生產健康的家禽(Futura and Sato, 1977)。甲醛燻蒸雖然廣泛用於國內種蛋孵化前之消毒措施，但近年來不良空氣品質所引發之人體健康危害議題，使得甲醛之使用及規範日益嚴格。許多材料已被研究用來減少雞蛋上的細菌，如四級銨化物(quaternary ammonium products, Quats)(Lowman and Parkhurst, 2014)、電解氧化水(electrolyzed oxidizing water, EOW)(Bialka *et al.*, 2004)、臭氧(ozone, O₃)(Whistler and Sheldon, 1989a, 1989b, 1989c; Rodriguez-Romo and Yousef, 2005; Demirel and Kirikci, 2009)、二氧化氯(chlorine dioxide, ClO₂)(Patterson *et al.*, 1990)及奈米銀離子(silver nanoparticles, Ag-NPs)(Banach *et al.*, 2016)等。然而，實際應用於鴨蛋表面消毒的效果仍有待確定。因此，本試驗藉由給予種鴨蛋不同的消毒處理，藉此瞭解不同消毒處理對鴨蛋表面病菌之殺滅效果以及對種蛋孵化的影響，來尋求鴨隻孵化場甲醛燻蒸之替代消毒方式。

材料與方法

I. 試驗材料

試驗用種蛋來自宜蘭分所自行育成之褐色菜鴨種鴨。鴨隻飼養於非開放式試驗鴨舍，鴨舍一側為網狀地面，設有乳頭式飲水器供鴨隻飲水，另一側設置產蛋箱，並於箱中鋪設粗糠以供鴨隻產蛋，每週固定進行一次全場消毒作業。鴨隻育雛期及育成期之飼料由宜蘭分所自行調配，產蛋期飼料採用商用蛋鴨料，其粗蛋白質及代謝

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2602 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所。

(3) 國立屏東科技大學獸醫學系。

(4) 通訊作者，E-mail：chsu@mail.tlri.gov.tw。

能分別為 19% 及 2,750 kcal/kg，試驗全期之飲水及飼料皆採任食。種蛋受精方式為自然交配，公母比為 1：12，其中母鴨為 180 隻，公鴨 15 隻，合計 195 隻。母鴨產蛋全期之平均產蛋率為 78.7%。母鴨於產蛋期開始前採自然光照，開始產蛋後增加光照至每日 14 小時。每日收集種蛋後，置於 16℃ 之冷藏間儲存，每次收集種蛋時間為 10 天，不同儲存天數之種蛋均分配至各消毒處理組中，以供後續試驗使用。每批次試驗進行 5 種消毒處理，消毒處理後，逢機於各處理組中取 10 顆種蛋，進行蛋殼表面總生菌之取樣，其餘種蛋進行後續孵化與資料收集。

II. 試驗設計

- (i) 對照組：不進行消毒處理。
- (ii) 甲醛 (formaldehyde) 組：依據 Samberg and Meroz (1995) 之方法進行修飾，將種蛋置於消毒櫃中，以市售濃度 24% 之福馬林 (formalin) 溶液為材料，計算消毒櫃體積後，換算 3 倍甲醛氣體所需之福馬林溶液容量，置於加熱器中加熱 5 分鐘使溶液揮發，並持續靜置 25 分鐘，處理時間共 30 分鐘。
- (iii) 二氧化氯 (chlorine dioxide, ClO₂) 組：依據商品使用說明書，將商用二氧化氯藥劑配置為濃度 1,000 ppm 之溶液後，稀釋濃度至 250 ppm，再以超音波霧化器將二氧化氯溶液形成霧化顆粒，粒徑為 3 – 5 microns，透過霧化器內建之風扇，將顆粒導入種蛋消毒櫃中進行消毒處理，處理時間為 30 分鐘。
- (iv) 臭氧氣體 (ozone gas) 組：依據 Whistler and Sheldon. (1989a, b, c) 之方法進行修飾，以超音波霧化器提高種蛋消毒櫃內之相對濕度至 95% 以上，再以商用臭氧產生器，以流速每分鐘 5L、濃度分別為 2.2% 及 4.4% 之臭氧氣體導入容器中進行消毒處理，處理時間為 30 分鐘。
- (v) 消毒水噴霧組：以商用噴霧式造霧機對種蛋進行消毒溶液之噴霧處理，噴霧機馬達之輸出壓力為每平方公分 300 psi，噴頭流量每分鐘 30 mL，消毒櫃中之噴頭裝設方式為上方裝設 12 顆、兩側各裝設 4 顆，合計裝設 20 顆，噴頭孔徑為 0.2 mm，噴霧粒徑為 1.5 – 38 μm，噴霧頻率為每間隔 6 秒鐘噴霧 6 秒鐘，噴霧時間為 20 分鐘，消毒溶液配製方式如下：
 1. 500 ppm 之電解氧化水 (electrolyzed oxidizing water, EOW)：依據商品使用說明書，以商用次氯酸水生成機產製之電解氧化水，經測定有效氯濃度之後，稀釋為有效氯濃度 500 ppm 之溶液。
 2. 500 ppm 之四級銨化物 (quaternary ammonium compounds, Quats)：依據商品使用說明書，以市售之氯化二癸二甲基銨 (didecyl dimethyl ammonium bromide) 為材料，原產品濃度為 50%，依使用說明稀釋為濃度 500 ppm 之溶液。
 3. 20 ppm 銀離子消毒劑：依據商品使用說明書，以商用之奈米銀離子 (silver nanoparticles, Ag-NPs) 消毒劑為材料，原產品濃度為 20,000 ppm，依使用說明稀釋為濃度 20 ppm 之溶液。

III. 測定項目

- (i) 蛋殼表面總生菌數：採用塗抹法，將滅菌後之鋁箔採樣板 2 × 2.5 cm² 覆蓋於蛋殼上，以滅菌水濕潤之滅菌棉花棒塗抹蛋殼表面。塗抹過後之棉花棒投入 10 mL 之滅菌水，強力震盪混合，並取均質液 1 mL 加滅菌水 9 mL 進行連續 10 倍系列稀釋至適當倍數後，取 1 mL 稀釋均質液接種於培養基 (Plate count agar, DIFCO) 於 37℃ 下培養 48 ± 2 小時，計算菌落數 (FDA, 1992)。
- (ii) 孵化測定：種蛋經消毒處理後移入孵化機，溫度及濕度設定分別為 37.5℃ 及 88.5%。孵化期間第 7、14 及 25 日進行照蛋，並統計無精蛋、受精蛋、7、14 及 25 日孵化中止蛋數。孵化第 25 日時將種蛋移入發生機，溫度與濕度設定分別為 37.4℃ 及 91.5%，27 – 28 日雛鴨出殼後，統計未孵化之種蛋數，並以上述資料進行受精率、中止率及孵化率計算。
- (iii) 孵化中止蛋之病原分析：以孵化第 7 天中止之種蛋，及孵化第 28 天未破殼之種蛋為檢體，以 3 mL 針筒抽取卵黃液，以 BioKit Tissue & Cell Genomic DNA KIT (Bio-GT50, 拜爾基特生物科技, 臺灣) 進行 DNA 抽取後，使用不同病原之引子及抽取之 DNA 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 操作，病原項目包含沙門氏菌 (*Salmonella*) (Fronczek *et al.*, 2014)、大腸桿菌 (*E. coli*) (Wang *et al.*, 1996)、水禽雷氏桿菌 (*R. anatipestifer*, RA) (Wei *et al.*, 2013)、金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*, SA) (McClure *et al.*, 2006)、鵝小病毒 (Goose parvovirus, GPV) (朱, 2001)、家禽黴漿菌 (*M. gallisepticum*, MG) (Fraga *et al.*, 2013)、衣阿華黴漿菌 (*M. iowae*, MI) (Boyle *et al.*, 1995)、火雞黴漿菌 (*M. meleagridis*, MM) (Boyle *et al.*, 1995)、犬貓皮膚芽孢菌 (*M. pachydermatis*) (Buommino *et al.*, 2016)、多殺巴氏桿菌 (*P. multocida*) (Wei *et al.*, 2013) 及鏈黴菌 (*Streptomyces*) (Munteanu *et al.*, 2014)，完成聚合酶連鎖反應步驟後，將反應產物進行膠體電泳分析，並進行結果判定。

IV. 統計分析

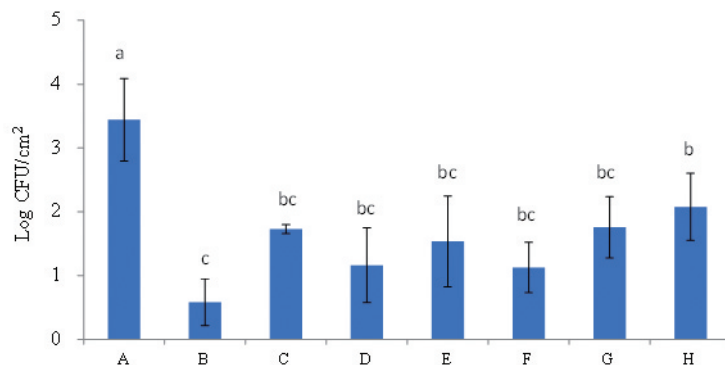
試驗設計為完全逢機設計試驗，試驗測定之結果使用 SAS 統計套裝軟體 (SAS, 2016) 分析，以一般線性模式 (GLM procedure) 進行主效應的變方分析，並以特奇公正顯著差異法 (Tukey's honest significant difference)，比

較各組平均值間之差異顯著性。

結果與討論

I. 不同消毒處理對蛋殼表面生菌數之影響

不同消毒處理對蛋殼表面生菌數之影響如圖 1 所示。對照組 (未經消毒處理)、以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘組、以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組、以濃度 2.2% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以濃度 500 ppm 電解氧化水組、500 ppm 四級銨化物組及 20 ppm 奈米銀離子溶液噴霧 20 分鐘處理組等方式，其蛋殼表面總生菌數分別為 3.44 ± 0.65 、 0.58 ± 0.37 、 1.73 ± 0.07 、 1.16 ± 0.59 、 1.54 ± 0.71 、 1.13 ± 0.93 、 1.76 ± 0.48 及 2.08 ± 0.53 log CFU/cm²；在生菌數清除效率方面，各組分別為 99.86%、98.06%、99.48%、98.76%、99.52%、97.63% 及 95.69%。結果顯示，消毒效果以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘處理組之效果最佳，其次為以霧化之二氧化氯 30 分鐘處理組、以濃度 2.2% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以濃度 500 ppm 電解氧化水處理組及 500 ppm 四級銨化物溶液噴霧 20 分鐘處理組，其與以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘組之間無顯著差異；以 20 ppm 奈米銀離子溶液噴霧處理 20 分鐘之效果，較以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘者為差 ($p < 0.05$)，但仍可顯著降低蛋殼表面之生菌數。有關不同消毒處理對蛋殼表面微生物影響的研究方面，Williams and Gordon (1970) 在室溫下使用 3 倍甲醛燻蒸 (每立方英尺使用 1.2 mL 福馬林及 0.6 g 過錳酸鉀，即每立方公尺釋放 565 mg 甲醛)，結果可殺死蛋殼表面 99.8% 的微生物，更高的濃度 (每立方公尺分別釋放 1,696 及 2,872 mg 甲醛) 與 3 倍甲醛燻蒸的效果無差異。在臭氧的研究方面，Braun *et al.* (2011) 的研究指出，將接種沙門氏菌的雞蛋以濃度 1% 的臭氧處理 120 分鐘，每個蛋可減少 2—4 log CFU 的沙門氏菌。在二氧化氯的研究方面，Kim *et al.* (2016) 的研究結果顯示，在潮濕條件下，暴露於濃度 20、40 及 80 ppm 的二氧化氯氣體 30 分鐘，蛋殼上的沙門氏菌顯著減少，而暴露於濃度 40 及 80 ppm 二氧化氯的條件下，可顯著減少金黃色葡萄球菌的數量。Choi *et al.* (2015) 以濃度 50 及 200 ppm 的次氯酸鈉及二氧化氯溶液浸泡雞蛋，結果發現，浸泡 1 分鐘時，各組對於雞腸道沙門氏菌的致死效力並無差異，然而，浸泡處理 5 分鐘時，以二氧化氯溶液處理，對沙門氏菌的殺滅效果顯著大於用水或次氯酸鈉進行處理者。在四級銨化物與電解氧化水的研究方面，Keita *et al.* (2016) 以濃度 1,500 ppm 的四級銨化物、噴霧粒徑為 5 micron 進行噴霧 45 分鐘，可降低每顆蛋 1 log CFU 以上的生菌數；以濃度 300—400 ppm 的電解氧化水、噴霧粒徑為 10 μ m 進行噴霧處理 30 分鐘，對蛋殼微生物的影響則不顯著。此外，研究顯示噴霧粒徑大小與噴霧壓力亦會影響抑菌效果，Hsu *et al.* (2003) 指出，在噴霧粒徑的影響方面，噴頭粒徑越小所減少的氧化還原電位及其有效氯濃度，比大口徑的噴頭多；在噴霧壓力方面，高壓力噴霧下所減少的氧化還原電位及其有效氯濃度，比在低壓力的噴霧少。因此，噴霧消毒使用大噴頭粒徑以及高壓力的噴霧最可以達到抑菌效果。在收集噴霧後的電解氧化水中含有濃度大於 72 ppm 的有效氯時，可有效減少 3—4 log CFU/mL 的李斯特菌。在銀離子的研究方面，Feng *et al.* (2000) 指出，銀離子可對多達 16 種細菌如大腸桿菌等具有強烈的抑制和殺菌作用。



* A-Control; B-3X Formaldehyde, 30 mins; C-250 ppm ClO₂, 30 mins; D-2.2% O₃ gas, 30 mins; E-4.4% O₃ gas, 30 mins; F-500 ppm EOW, 20 mins; G-500 ppm Quats, 20 mins; H-20 ppm Ag-Nps, 20 mins.

^{a-c} Means without the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

圖 1. 不同消毒處理對褐色萊鴨種蛋殼表面生菌數之影響。

Fig. 1. Effects of different disinfection treatments on the number of microorganisms on the Brown Tsaiya ducks' eggshell surface.

表 1. 各批次試驗之種蛋孵化數量統計

Table 1. Statistics on the number of incubation eggs in each batch of trials

Batch	Control	3X Formaldehyde, 30 mins	500 ppm ClO ₂ , 30 mins	2.2% O ₃ gas, 30 mins	4.4% O ₃ gas, 30 mins	500 ppm Hi-ClO, 20 mins	500 ppm Quats, 20 mins	20ppm Ag ⁺ , 20 mins	Total
----- Incubation number -----									
1	218	214				213	212	216	1,073
2	351	345				224	227	232	1,379
3	307	317				215	214	211	1,264
4	209	209	208	205	210				1,041
5	201	202	201	202	202				1,008
6	226	226	218	221	223				1,114
Total	1,512	1,513	627	628	635	652	653	659	6,879

II. 不同消毒處理對種蛋孵化之影響

表 2 為不同消毒處理對種蛋孵化之影響。在褐色菜鴨種蛋之受精率、25 – 28 天中止率、入孵蛋孵化率及受精蛋孵化率均無顯著差異。在 0 – 25 天中止率方面，以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組較高 ($P < 0.05$)，其次為以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘組、以濃度 2.2% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組；對照組、濃度 500 ppm 電解氧化水處理組、500 ppm 四級鉍化物處理組及 20 ppm 奈米銀離子溶液噴霧 20 分鐘處理組等 4 組間則無顯著差異，顯示部分消毒處理對種蛋孵化可能有負面之影響。Wistler and Sheldon (1989b) 的研究指出，臭氧是有效的消毒劑，雖然使用氣態臭氧消毒可有效降低種蛋表面之微生物數目，但過度暴露會造成胚胎死亡。在以二氧化氯消毒對種蛋孵化的影響方面，Patterson *et al.* (1990) 指出，以濃度 40 ppm 之二氧化氯泡沫處理，對孵化存活率無不利的影響，並能同時降低蛋的細菌數；然而，當種蛋浸泡在濃度 40 ppm 的二氧化氯溶液中超過 5 分鐘時，或濃度大於 100 ppm 時，孵化率則會下降。另有研究顯示，電解氧化水對種蛋的孵化不會產生負面的影響 (Bailey *et al.*, 1996; Fassenko *et al.*, 2009)。上述結果顯示，針對種蛋的消毒方式需考慮消毒劑的使用濃度與處理時間，才能在消毒與孵化效果間均獲得理想結果。

表 2. 不同消毒處理對褐色菜鴨種蛋孵化之影響

Table 2. Effects of different disinfection methods on hatching of Brown Tsaiya ducks' eggs

	Fertilization	Discontinuation during 0-25 days	Discontinuation during 25-28 days	Total eggs hatchability	Fertilized eggs hatchability
	----- % -----				
Control	96 ± 2	8 ± 2 ^b	22 ± 7	68 ± 7	72 ± 5
3X Formaldehyde, 30 mins	96 ± 2	9 ± 2 ^{ab}	20 ± 8	68 ± 5	73 ± 5
250 ppm ClO ₂ , 30 mins	97 ± 1	14 ± 5 ^a	15 ± 1	67 ± 6	69 ± 5
2.2% ozone gas, 30 mins	97 ± 1	12 ± 2 ^{ab}	15 ± 3	69 ± 0	72 ± 1
4.4% ozone gas, 30 mins	97 ± 1	8 ± 3 ^{ab}	13 ± 5	75 ± 9	77 ± 9
500 ppm EOW, 20 mins	95 ± 1	7 ± 1 ^b	28 ± 6	63 ± 4	70 ± 5
500 ppm Quats, 20 mins	96 ± 0	7 ± 1 ^b	23 ± 5	68 ± 3	74 ± 3
20 ppm Ag-Nps, 20 mins	94 ± 2	6 ± 2 ^b	25 ± 1	65 ± 7	71 ± 8

^{a, b} Means in the same row without the same superscript differ ($P < 0.05$).

Means ± SE.

表 3. 不同消毒處理對孵化 7 天中止鴨胚之病原分析結果

Table 3. Pathogen analysis of different disinfection methods on 7 days of dead duck embryos

7 days	Control	3X Formaldehyde, 30 mins	500 ppm ClO ₂ , 30 mins	2.2% O ₃ gas, 30 mins	4.4% O ₃ gas, 30 mins	500 ppm Hi-ClO, 20 mins	500 ppm Quats, 20 mins	20ppm Ag ⁺ , 20 mins	Total
Incubation number	1,512	1,513	627	628	635	652	653	659	6,879
Germ	----- Aborted number (Ratio) -----								
<i>Salmonella</i>	27 (45%)	15 (23.8%)	6 (50%)			24 (50%)	9 (42.9%)	3 (16.7%)	84 (34.1%)
<i>E.coli</i>	3 (5%)								3 (1.2%)
<i>R. anatipestifer</i>	6 (10%)					6 (12.5%)			12 (4.9%)
<i>S. aureus</i>	6 (10%)	6 (9.5%)				3 (6.3%)		9 (50.0%)	24 (9.8%)
Goose parvovirus									
<i>M. gallisepticum</i>									
<i>M. iowae</i>									
<i>M. meleagridis</i>									
<i>M. pachydermatis</i>									
<i>P. multocida</i>									
<i>Streptomyces</i>	3 (5%)	6 (9.5%)				15 (31.3%)	6 (28.6%)	6 (33.3%)	36 (14.6%)
Others	15 (25%)	36 (57.1%)	6 (50%)	12 (100%)	12 (100%)		6 (28.6%)		87 (35.4%)
Total	60 (100%)	63 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	48 (100%)	21 (100%)	18 (100%)	246 (100%)

III. 不同消毒處理對種蛋孵化中止鴨胚之病原分析

表 3 為不同消毒處理對孵化 7 天中止鴨胚之 PCR 結果。試驗結果顯示，孵化 7 天之中止鴨胚在鵝小病毒、家禽黴漿菌、衣阿華黴漿菌、火雞黴漿菌及犬貓皮膚芽孢菌等部分均無檢出。試驗期間之孵化 7 天中止蛋共 246 個，其中未測得病原菌之中止蛋有 87 顆，佔孵化 7 天中止蛋數之 35.4%；中止鴨胚中測得沙門氏菌者有 84 個，佔孵化 7 天中止蛋數之 34.1%。顯示孵化 7 天鴨胚中止之原因，主要為其他因素及沙門氏菌所造成，其次分別為鏈黴菌 (14.6%)、金黃色葡萄球菌 (9.8%)、水禽雷氏桿菌 (4.9%) 及大腸桿菌 (1.2%)。對照組 (未消毒處理) 的結果顯示，孵化 7 天之中止鴨胚中各病原菌存在比例主要為沙門氏菌 (45%)、水禽雷氏桿菌 (10%)、金黃色葡萄球菌 (10%)、鏈球菌 (5%) 及大腸桿菌 (5%)，此可反映出鴨隻產蛋環境中微生物的存在情況。從消毒處理對不同微生物的清除效果來看，以濃度 2.2% 及 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組，對多種微生物均有明顯清除效果，其次則為以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組。不同消毒處理對孵化 28 天中止鴨胚之 PCR 結果如表 4 所示。試驗期間之孵化 28 天中止蛋共 237 個，其中中止鴨胚測得沙門氏菌者有 81 個，佔孵化 28 天中止蛋數之 34.2%；未測得病原菌之中止蛋有 63 顆，佔孵化 28 天中止蛋數之 26.6%。顯示造成無法孵化之原因，分別為沙門氏菌與其他因素，其次分別為大腸桿菌 (20.3%)、鏈黴菌 (7.6%)、金黃色葡萄球菌 (5.1%) 及水禽雷氏桿菌 (3.8%)。相較於孵化第 7 天之中止鴨胚分析，大腸桿菌致孵化 28 天中止鴨胚之檢出率有明顯增加的情形，顯示大腸桿菌對於孵化後期之胚胎中止影響很大。此外，部分微生物的比例亦有上升之現象，推測為種蛋孵化過程中，微生物持續增長造成的結果。在孵化第 7 天與第 28 天中止鴨胚之病原分析中，鴨胚因其他因素死亡者分別佔 35.4% 及 26.6%，此可能為孵化過程中的自然死亡。Jassim *et al.* (1996) 指出，孵化過程中的胚胎死亡可能受多種因素影響，如營養、管理及遺傳等。孵化過程的胚胎死亡率常出現在兩個高峰期，第一個高峰在孵化的第一週發生，與代謝過程中乳酸的產生及二氧化碳排除方式的轉換有關；第二階段發生在孵化過程最後幾天，為胚胎對氧氣需求顯著增加的時期。影響鴨隻孵化之病原分析以沙門氏菌的比例最高，Su *et al.* (2011) 於 2007 年 5 月至 8 月進行孵化中止鵝蛋及鴨蛋的沙門氏菌盛行率調查，發現鵝蛋為 40.1% (67/164)，鴨蛋為 47.6% (40/84)，本研究與之有相似的結果。消毒材料中，濃度 20 ppm 之銀離子消毒劑處理組於孵化 28 天之中止鴨胚中未檢出病原菌，顯示該消毒劑於孵化過程中具有持續保護力所導致。Farrokhi *et al.* (2017) 將含有沙門氏菌、金黃色葡萄球菌、芽孢桿菌和大腸桿菌的混合物加入到蛋殼上，並以濃度 500、1,000 及 2,000 ppm 的銀離子膠體噴霧劑對雞蛋進行噴灑。結果顯示，以濃度 2,000 ppm 的噴灑處理效果最佳，其於噴灑第 0 天及第 7 天，細菌數分別為 4.75 ± 0.13 及 $0.93 \pm 0.42 \log \text{CFU}$ ，噴灑後第 14 天及第 28 天時，測定蛋殼表面已無菌落；其次為濃度 1,000 ppm 的處理組，噴灑後第 7、14 及 28 天之菌落數分別為 3.65 ± 0.42 、 1.95 ± 0.67 及 $0.99 \pm 0.64 \log \text{CFU}$ 。

結 論

試驗結果顯示，不同消毒處理對種蛋之表面病原菌殺滅效果方面，以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘處理組之效果最佳，其次為以霧化之二氧化氯 30 分鐘處理組、以濃度 2.2% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組、以濃度 500 ppm 電解氧化水處理組及 500 ppm 四級鉍化鈉溶液噴霧 20 分鐘處理組，其與以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘處理組之間無顯著差異；以 20 ppm 奈米銀離子溶液噴霧 20 分鐘處理組之效果較以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘處理組為差 ($P < 0.05$)，但仍可顯著降低蛋殼表面之生菌數，顯示不同消毒材料透過合適之操作方式，均可成為替代傳統甲醛燻蒸消毒之替代參考。在不同消毒處理對種蛋孵化之影響方面，各組之受精率、25 - 28 天中止率、入孵蛋孵化率及受精蛋孵化率均無顯著差異，然而在 0 - 25 天中止率部分，以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組之中止率較高，其次則為以 3 倍甲醛燻蒸 30 分鐘處理組、以濃度 2.2% 及 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組，顯示消毒處理條件必須進一步調整，以免影響種蛋之孵化。從孵化 7 天中止鴨胚之病原分析結果顯示，以濃度 2.2% 及 4.4% 臭氧氣體 30 分鐘處理組，對多種微生物均有明顯清除效果，其次則為以霧化之 250 ppm 二氧化氯 30 分鐘處理組；然而，從孵化 28 天中止鴨胚之病原分析結果，可發現孵化過程中，環境微生物如大腸桿菌等持續增長之現象，在考量到對種蛋孵化過程中的持續保護力，則以 20 ppm 銀離子溶液噴霧 20 分鐘處理組是為較佳之選擇。

誌 謝

本試驗承行政院農業委員會經費支持【106 農科 -2.5.1- 畜 -L1(2)】。試驗期間承蒙楊瑞琳、陳麗晴、鍾欣婷、李寶雲等同仁協助現場及文書處理，特此誌謝。

表 4. 不同消毒處理對孵化 28 天中止鴨胚之病原分析結果

Table 4. Pathogen analysis of different disinfection methods on 28 days of dead duck embryos

28 days	Control	3X Formaldehyde, 30 mins	500 ppm ClO ₂ , 30 mins	2.2% O ₃ gas, 30 mins	4.4% O ₃ gas, 30 mins	500 ppm Hi-ClO, 20 mins	500 ppm Quats, 20 mins	20ppm Ag ⁺ , 20 mins	Total
Incubation number	1,512	1,513	627	628	635	652	653	659	6,879
Germ	----- Aborted number (Ratio) -----								
<i>Salmonella</i>	18 (54.5%)	15 (35.7%)	18 (46.2%)	6 (28.6%)	6 (40%)	6 (15.4%)	12 (40%)		81 (34.2%)
<i>E.coli</i>	3 (9.1%)	9 (21.4%)	9 (23.1%)	9 (42.9%)	6 (40%)	12 (30.8%)			48 (20.3%)
<i>R. anatipestifer</i>	6 (18.2%)	3 (7.1%)							9 (3.8%)
<i>S. aureus</i>		12 (28.6%)							12 (5.1%)
GPV									
<i>M. gallisepticum</i>									
<i>M. iowae</i>									
<i>M. meleagridis</i>				3 (14.3%)					3 (1.3%)
<i>M. pachydermatis</i>									
<i>P. multocida</i>			3 (7.7%)						3 (1.3%)
<i>Streptomyces</i>	6 (18.2%)	3 (7.1%)	3 (7.7%)		3 (20%)		3 (10%)		18 (7.6%)
Others			6 (15.4%)	3 (14.3%)		21 (53.8%)	15 (50%)	18 (100%)	63 (26.6%)
Total	33 (100%)	42 (100%)	39 (100%)	21 (100%)	15 (100%)	39 (100%)	30 (100%)	18 (100%)	237 (100%)

參考文獻

- 朱純燕。2001。水禽類小病毒蛋白基因之分子選殖及抗原性分析。國立中山大學生物科學研究所博士論文。
- Bailey, J. S., R. J. Buhr, N. A. Cox and M. E. Berrang. 1996. Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. *Poult. Sci.* 75: 191-196.
- Banach, M., L. Tymczyna, A. Chmielowiec-Korzeniowska and J. Pulit-Prociak. 2016. Nanosilver Biocidal properties and their application in disinfection of hatcheries in poultry processing plants. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2016: 1-15.
- Bialka, K. L., A. Demirci, S. J. Knabel, P. H. Patterson and V. M. Puri. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poult. Sci.* 83: 2071-2078.
- Boyle, J. S., R. T. Good and C. J. Morrow. 1995. Detection of the turkey pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by amplification of genes coding for rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1335-1338.
- Braun, P. G., N. Fernandez and H. Fuhrmann. 2011. Investigation on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone-Sci. Eng.* 33: 374-378.
- Buommino, E., F. P. Nocera, A. Parisi, A. Rizzo, G. Donnarumma, K. Mallardo, F. Fiorito, A. Baroni and L. De Martino. 2016. Correlation between genetic variability and virulence factors in clinical strains of *Malassezia pachydermatis* of animal origin. *New Microbiol.* 39: 216-223.
- Choi, S., S. Park, Y. Kim, B. S. Kim, L. R. Beuchat, K. Hoikyung and J. H. Ryu. 2015. Reduction of *Salmonella enterica* on the surface of eggshells by sequential treatment with aqueous chlorine dioxide and drying. *Int. J. Food Microbiol.* 210: 84-87.
- Cox, N. A., M. E. Berrang and J. A. Cason. 2000. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching egg- a review. *Poult. Sci.* 79: 1571-1574.
- Demirel, S. and K. Kirikci. 2009. Effect of different egg storage times on some egg quality characteristics and hatchability of pheasants (*Phasianus colchius*). *Poult. Sci.* 88: 440-444.
- Ernst, R. A. 2004. Hatching egg sanitation: the key step in successful storage and production. Retrieved March 24, 2018, from University of California, Agriculture and Natural Resources. Web site: <http://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8120.pdf>.
- Farrokhi, S., H. Ahari and M. R. Abedini. 2017. Comparative effects of colloidal silver nanoparticles used in packaging film and spray in inactivating bacteria experimentally added to chicken eggshells. *Int. J. Food Prop.* 20: 2314-2322.
- Fasenko, G. M., E. E. O'Dea Christopher and L. M. McMullen. 2009. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.* 88: 1121-1127.
- FDA. 1992. Bacteriological analytical manual for foods. Food and Drug Administration Bureau of Food. USA.
- Feng, Q., J. Wu, G. Chen, F. Cui, T. Kim and J. Kim. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52: 662-668.
- Frage, A. P., V. Tatiana, I. Nilo, S. K. F. André, J. C. Álvaro, K. M. Edmundo and R. L. Vagner. 2013. A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. *Braz. J. Microbiol.* 44: 505-510.
- Fronczek, C. F., T. S. Park, D. K. Harshman, A. M. Nicolini and J. Y. Yoon. 2014. Paper microfluidic extraction and direct smartphone-based identification of pathogenic nucleic acids from field and clinical samples. *RSC Adv.* 4: 11103-11110.
- Futura, K. and S. Sato. 1977. The effect of formaldehyde fumigation on bacteria contaminating the eggshell surface, *J. Poult. Sci.* 14: 27-32.
- Hsu, S., C. Kim and S. Prussin. 2003. Effects of air pressure, orifice size and electrostatic charge of spray on chemical properties and bactericidal efficacy of electrolyzed oxidizing water. *Int. J. Food Sci. Tech.* 39: 157-165.
- Jassim, E. W., M. Grossman, W. J. Koops and R. A. J. Luykx. 1996. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poult. Sci.* 75: 464-471.
- Keita, A., A. Huneau-Salaün, A. Guillot, P. Galliot, M. Tavares and J. Puterflam. 2016. A multi-pronged approach to the search for an alternative to formaldehyde as an egg disinfectant without affecting worker health, hatching, or broiler production parameters. *Poult. Sci.* 95: 1609-1616.
- Kim, H., B. Yum, S. S. Yoon, K. J. Song, J. R. Kim, D. Myeong, B. Chang and N. H. Choe. 2016. Inactivation of *Salmonella* on eggshells by chlorine dioxide gas. *Korean J. Food Sci.* 36: 100-108.

- Lowman, Z. and C. Parkhurst. 2014. Effect of Bac-DTM on hatchability, conductance, growth rate and feed conversion ratio on Turkey poults. *Int. J. Food Microbial.* 13: 97-101.
- McClure, J. A, J. M. Conly, V. Lau, S. Elsayed, T. Louie, W. Hutchins and K. Zhang. 2006. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1141-1144.
- Munteanu, N. V., M. Danismazoglu, A. I. Moldovan, I. K. Toderas, R. Nalçacioğlu and Z. Demirbag. 2014. The first study on bacterial flora of pest beetles *Sciaphobus squalidus*, *Tatianaerhynchites aequatus* and *Byctiscus betulae* in the Republic of Moldova. *Biologia* 69: 681-690.
- Patterson, P. H., S. C. Ricke, M. L. Sunde and D. M. Schaefer. 1990. Hatching eggs sanitized with chlorine dioxide foam: egg hatchability and bactericidal properties. *Avian Dis.* 34: 1-6.
- Rodriguez-Romo, L. A. and A. E. Yousef. 2005. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J. Food Prot.* 68: 711-717.
- SAS. 2016. SAS user guide: Statistics, SAS Inst., Cary, NC.
- Samberg, Y. and M. Meroz. 1995. Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epiz.* 14: 365-380.
- Su, Y. C., C. Y. Yu., J. L. Lin, J. M. Lai, S. W. Chen, P. C. Tu and C. Chu. 2011. Emergence of *Salmonella* enteric Serovar Potsdam as a major serovar in waterfowl hatcheries and chicken eggs. *Avian Dis.* 55: 217-222.
- Tullett, S. G. 1990. Science and the art of incubation. *Poult. Sci.* 69: 1-15.
- Wang, R. F., W. W. Cao and C. E. Cerniglia. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1242-1247.
- Wei, B., S. Y. Cha, M. Kang, I. J. Park, O. K. Moon, C. K. Park and H. K. Jang. 2013. Development and application of a multiplex PCR assay for rapid detection of 4 major bacterial pathogens in ducks. *Poult. Sci.* 92: 1164-1170.
- Whistler, P. E. and B. W. Sheldon. 1989a. Biocidal activity of ozone versus formaldehyde against poultry pathogens inoculated in a prototype setter. *Poult. Sci.* 68: 1068-1073.
- Whistler, P. E. and B. W. Sheldon. 1989b. Bactericidal activity, eggshell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult. Sci.* 68: 1074-1077.
- Whistler, P. E. and B. W. Sheldon. 1989c. Comparison of ozone and formaldehyde as poultry hatchery disinfectants. *Poult. Sci.* 68: 1345-1350.
- Williams, J. E. and C. D. Gordon. 1970. The hatchability of chicken eggs fumigated with increasing level of formaldehyde gas before incubation. *Poult. Sci.* 49: 560-564.

Effects of different disinfection treatments on microorganisms and hatchability of Brown Tsaiya ducks' eggs ⁽¹⁾

Chih-Hsiang Cheng ⁽²⁾ Chin-Hui Su ⁽²⁾⁽⁴⁾ Hung-Yi Wu ⁽³⁾ Hsiu-Chou Liu ⁽²⁾ and Jung-Hsin Lin ⁽²⁾

Received: Sep. 6, 2018; Accepted: Mar. 7, 2019

Abstract

The aim of this experiment was to investigate the effects of different disinfection treatments on the effect of microorganisms and hatchability of Brown Tsaiya ducks' eggs. In the experiment, the breeding eggs were divided into 7 groups, which were treated with 3 times of formaldehyde fumigation for 30 mins, treated with 250 ppm atomized chlorine dioxide for 30 mins, 2.2% and 4.4% ozone gas for 30 mins, spray with 500 ppm electrolytic oxidation water, 500 ppm quaternary ammonium compound and 20 ppm nano-silver solution for 20 mins, respectively. The disinfection effect on the number of microorganisms on the eggshell surface and hatching of the breeding eggs were determined. In addition, the pathogens in dead embryos 7 and 28 days after incubation were identified. The results showed that different disinfection methods could significantly reduce the number of the microorganisms on the eggshell surface. In terms of the effect on hatching the breeding eggs, there were no significant differences in fertilization rate, the discontinuation rate of 25-28 days of incubation, hatching rate of incubation eggs and fertilized eggs. However, the group treated with 250 ppm atomized chlorine dioxide for 30 mins had the highest discontinuation rate at 25 days of incubation. The pathogen analysis of the dead embryo at 7 days of incubation showed that the group treated with 2.2% and 4.4% ozone gas for 30 mins had significant effect on reducing various microorganisms, followed by the group treated with atomized 250 ppm chlorine dioxide for 30 mins. The results of the pathogen analysis of the dead embryo at 28 days of incubation showed that the environmental microorganisms continued to grow during the incubation period.

Key words: Breeding Egg, Brown Tsaiya duck, Disinfection.

(1) Contribution No. 2602 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Ilan Branch, COA-LRI, Ilan 26846, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, National Pintung University of Science and Technology.

(4) Corresponding author, E-mail: chsu@mail.tlri.gov.tw.