

بررسی قدرت ضد عفونی کنندگی اوزون بر روی باکتری‌ها در سطوح جامد

دکتر محمد کریم رحیمی^۱، دکتر جواد عزیزیان^۲، محمدرضا قمی مرزدشتی^۳

پروانه عدیمی^۱، طاهره فضلعلی کاظمی^۱، لیدا موسوی^۱، شیده پور خلیلی^۱

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۲ دانشگاه آزاد اسلامی، سازمان مرکزی

^۳ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

چکیده

سابقه و هدف: اوزون (O_3) یا آلوتیپ سه اتمی اکسیژن، یک گاز ناپایدار است که به طور وسیع به منظور ضد عفونی و اکسیداسیون مورد استفاده قرار گرفته است. اوزون، قدرت حلالیت نسبتاً خوبی در آب دارد، به طوریکه در مقایسه با اکسیژن در حدود ۲۰ برابر قابلیت حلالیت بیشتری دارد. اوزون یک اکسیدکننده پروتوپلاسم است که بر روی گروه‌های سولفیدریل از اسید آمینه‌های موجود در پروتئین‌های باکتری تاثیر گذاشته و موجب اختلال در فعالیت‌های آنزیمی سلول می‌شود. گاز اوزون می‌تواند کپک‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها را تخریب کند. هدف از این مطالعه، بررسی قدرت ضد عفونی کنندگی گاز اوزون بر روی میکروارگانیسم‌های سطوح است.

مواد و روشها: ۸ گونه از باکتری‌های بیماریزا با تراکم‌های متفاوت (10^2 ، 10^5 ، 10^7 و بیش از 10^7 سلول بر میلی لیتر) در مجاورت با گاز اوزون قرار داده شدند. یک محفظه آلومینیومی با ظرفیت ۳۰۰ لیتر در درون دستگاه هود تعبیه شد و گاز اوزون در آن تولید گردید. در زمان‌های متفاوت (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه) هر یک از غلظت‌های ۸ گانه از باکتری‌ها در مجاورت با گاز اوزون قرار گرفتند و در هر مورد، قبل و بعد از مجاورت با اوزون، تعداد باکتری‌ها به روش برید کانتیر مورد شمارش قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان باکتری‌هایی که در مجاورت با اوزون قرار داده شدند، باسیلوس سرئوس مقاوم‌ترین باکتری در برابر اثرات گندزدایی اوزون شناخته شد. به ترتیبی که غیرفعال سازی آن در تراکم اولیه بیش از 10^7 سلول بر میلی لیتر در بالاترین غلظت اوزن (۳۰ ppm) حاصل گردید. استافیلوکوک اورئوس و میکروکوک در تراکم 10^7 سلول بر میلی لیتر در غلظت اوزن در حدود ۱۰ ppm نابود شدند. اشریشیا کولی و بقیه باسیل‌های گرم منفی بیماریزا در تراکم 10^7 سلول بر میلی لیتر در غلظت‌های بالاتری از اوزن (در حد ۱۵ ppm) تخریب گردیدند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: بر اساس یافته‌های فوق در مواردی که هدف از بکارگیری اوزون، استریل نمودن سطوح باشد باید از غلظتی در حدود ۳۰ ppm استفاده شود اما اگر فقط نابودسازی باکتری‌های غیربیماریزای فاقد اسپور مورد نظر باشد به کارگیری غلظت ۱۵ ppm کفایت می‌کند.

واژگان کلیدی: اوزون، ضد عفونی، میکروارگانیسم سطوح.

مقدمه

می‌شوند. بعنوان مثال، اوزون موجب اکسیداسیون فنل به اسید اگزالیک و اسید استیک می‌شود. اوزون ترکیبات تری هالومتان را به میزان محدود اکسید می‌کند و غلظت آنها را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، به لحاظ داشتن خاصیت ناپایدار در تماس با محلول یدور پتاسیم موجب آزاد شدن ید خواهد شد.

گاز اوزون (O_3) یک عامل اکسیدکننده قوی است که بطور وسیعی برای ضد عفونی و اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثر باکتریسید اوزون، سریع است. در مجاورت با گاز اوزون، بسیاری از ترکیبات آلی به ترکیبات ساده‌تری اکسید

معمولی (اتمسفر) ۱۲ ساعت است و در آب خالص در ۲۰ درجه سانتی گراد، در حدود ۱۶۵ دقیقه است. در زمان حضور آلودگی های ترکیبات آلی در آب، نیمه عمر ازون کاهش می یابد (۱۰).

امروزه، بیشترین کاربرد ازون در کنترل بو (در مقاصد صنعتی و در تصفیه فاضلاب)، تصفیه صنعتی آب و فاضلاب و ضد عفونی کردن آب آشامیدنی است.

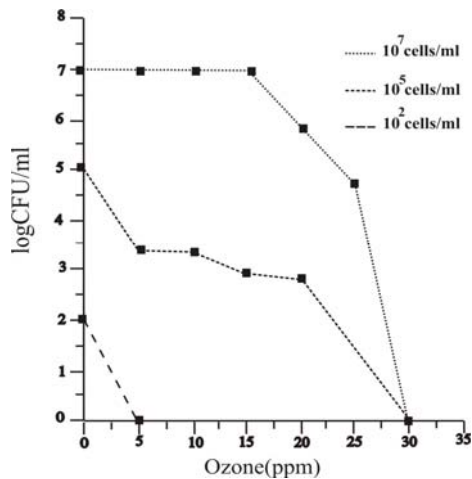
مواد و روشها

محفظه ای از جنس ورق آلومینیوم به حجم ۳۰۰ لیتر در داخل یک هود نصب گردید و دستگاه مولد ازون به درون آن انتقال یافت. قدرت تولید ازون که براساس مولد کرونا از هوای معمولی تولید می شد، به میزان ۳ گرم در ساعت توسط شرکت سازنده اظهار گردید. میزان ازون تولیدی بعد از ۳۰ دقیقه (در این محفظه) به حدود ۵ ppm و بعد از گذشت ۱ ساعت به حدود ۱۰ ppm می رسید. بدین ترتیب بعد از گذشت ۵ ساعت، حدود ۵۰ ppm ازون تولید می شد. بدیهی است که مدت زمان تماس میکروارگانیسم ها با ازون از زمان روشن شدن دستگاه محاسبه شده است. ۸ نوع باکتری عفونت زا که از عفونتهای بیمارستانی جدا شده بودند در تراکم های مختلف اولیه (در ۲ تکرار)، در طی ۱۰ مرحله آزمایش در غلظت های مختلف ازون مورد ازوناسیون واقع شدند. درجه حرارت در طول مدت آزمایش در فضای ایجاد شده 25 ± 2 درجه سانتیگراد بود. تنظیم زمان ازوناسیون در هر مرحله از آزمایش با استفاده از یک زمان سنج خودکار، کنترل می گردید. در جریان هر مرحله از آزمایش، هر یک از ۸ گونه باکتری (نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد)، بطور جداگانه در ۵ ml سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون گردید تا حدود 10^8 سلول در میلی لیتر را ایجاد کند. سه سطح تراکم اولیه 10^5 ، 10^7 و 10^2 سلول در میلی لیتر باکتری بترتیب بعنوان تراکم های زیاد تا ضعیف از هر ۸ گونه باکتری جهت در معرض گذاری با ازون تهیه گردید. این تراکم های مختلف، به روش بریدکانتر^۱ با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی، شمارش گردید. ۰/۱ میلی لیتر از تراکم اولیه 10^8 سلول در میلی لیتر از هر گونه باکتری به پتری دیش استریل

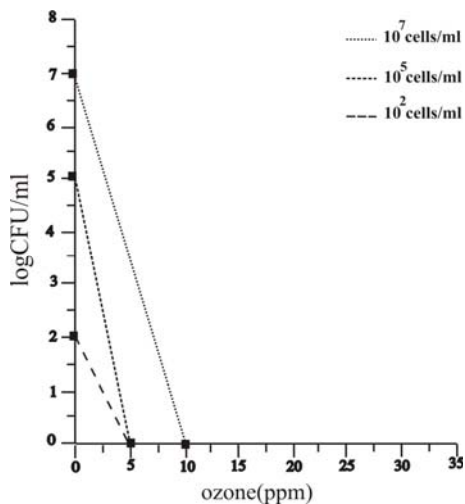
در دستگاه مولد ازون، جریان الکتریکی متناوب موجب جذب الکترون ها به یک الکتروود و سپس جذب آنها به الکتروود دیگر می شود. پس از اینکه الکترون ها به سرعت کافی رسیدند می توانند بعضی از ملکول های اکسیژن (O_2) را به اتم های آزاد (رادیکال اکسیژن) بشکنند. این اتم ها ممکن است با ملکول های اکسیژن (O_2)، ترکیب شده و ملکول های ازون (O_3) را بوجود آورند.

ازون، یک اکسیدکننده پروتوپلاسم است. Komanapalli و همکاران (۱) معتقدند گروههای سولفیدریل در غشاء باکتری، اولین هدفی هستند که مورد تهاجم واقع می شوند. بنابراین Babilon (۲)، ازون بر روی گروه های سولفیدریل از اسید آمینه های موجود در پروتئین های باکتری نیز تأثیر گذاشته و موجب اختلال در فعالیت های آنزیمی سلول می شود. ازون، یک گاز ناپایدار است که در شرایط اتمسفر طبیعی، نقطه جوش در حدود منهای ۱۱۲ درجه سانتیگراد دارد. وزن ملکولی ازون ۴۸ می باشد. ازون، قدرت حلالیت نسبتاً خوبی در آب دارد. این قدرت حلالیت به سهولت در غلظت هایی به میزان ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ واحد در میلیون واحد (۰/۰۵ ppm - ۰/۰۱) و بالاتر حاصل می شود. ازون در هوا بویژه در هوای سرد و خشک، پایدارتر است. برای جبران نمودن نقیصه فوق باید از سیستم های گران قیمت و به چرخش درآورنده و در تماس قراردهنده استفاده شود. علی رغم محدودیت ها و مشکلات فوق، توجه روز افزونی به کاربرد ازون برای غیرفعال سازی عوامل بیماریزای سطوح (از طریق تولید گاز ازون در هوا)، و نابودی باکتری های استافیلوکوک سالیواریوس (۳)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۴)، استافیلوکوک اورئوس و اشیریشیا کولی (۵) توسط ازون معطوف شده است. رفتار ازون در آب و هوا با یکدیگر متفاوت است. خاصیت اکسیدکنندگی بالای ازون در آب، با واسطه رادیکال های مختلفی است که اصلی ترین آنها رادیکال آزاد هیدروکسیل است که از خود ازون نیز فعالتر می باشد (۶). قابلیت بالای اکسیدکنندگی ازون، نشات گرفته از این رادیکال هاست (۷) که موجب ایجاد حالت زیست کشی قوی ازون می گردد. هر چند Facile و همکاران (۸) در مقابل معتقدند که در زمان حضور هر دو ترکیب ازون مولکولی و رادیکال های هیدروکسیل، ازون مولکولی بعنوان عامل غالب اکسیدکننده می باشد. رادیکال های آزاد هیدروکسیل، عمر کوتاهی دارند بنابراین نیمه عمر ازون در آب به دلیل تشکیل این ترکیب و واکنش ازون با سایر اجزای آب به مراتب کمتر از هواست. بنابر نظر Rice و همکاران (۹)، نیمه عمر ازون در هوا (با فشار

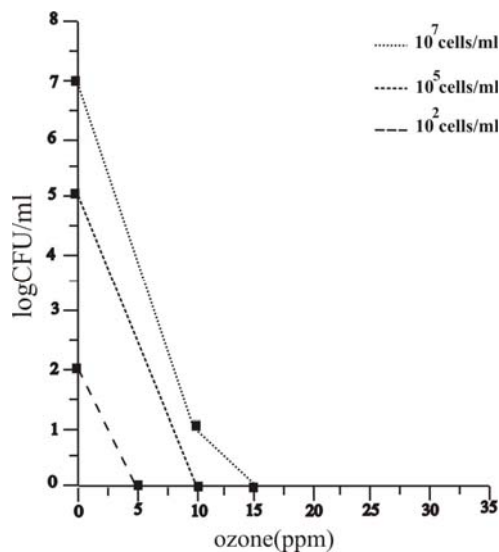
^۱ - در این روش مقادیر اندکی از سوسپانسیون حاوی باکتری (بعنوان مثال ۰/۱ میلی لیتر) در درون پلیت ریخته شده و سپس با آگار نیمه مذب مخلوط می گردد. بعد از ۲۴ ساعت از گرمخانه گذاری تعداد کلونی ها شمارش می شود. بدیهی است هر کلونی نمایش دهنده یک باکتری در سوسپانسیون اولیه خواهد بود.



شکل ۱- منحنی مرگ در یک باسیل گرم مثبت اسپوردار



شکل ۲- منحنی مرگ در کوکسی‌های گرم مثبت



شکل ۳- منحنی مرگ در باسیل‌های گرم منفی

جهت در معرض گذاری با ازون منتقل گردید. تراکم‌های اولیه 10^2 و 10^5 سلول در میلی لیتر نیز با رقیق سازی سوسپانسیون اولیه باکتری (10^8) در حجم‌های مشخصی از سرم فیزیولوژی ایجاد گردید بطوریکه در نهایت، تنها ۰/۱ میلی لیتر از تراکم‌های مذکور از هرگونه باکتری در مجاورت با گاز ازون مورد آزمایش قرار گرفت. پتری دیش‌های حاوی باکتری پس از مجاورت با گاز ازون با ریختن ۲۰ میلی لیتر ژلوز ساده تریپتی کیس سوی آگار نیمه‌مذاب، به روش پورپلیت کشت داده شد. سپس عملیات گرمخانه‌گذاری برای هر پتری دیش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد صورت می‌گرفت و پتری‌دیش‌ها بعد از ۱۲ تا ۱۶ ساعت مورد بازبینی واقع می‌شدند. جهت اطمینان از زنده بودن باکتری‌ها، از هرگونه باکتری مورد آزمایش، یک پتری‌دیش آغشته به باکتری اولیه بدون مجاورت با گاز ازون بطور هم زمان به روش پورپلیت، کشت داده می‌شد. بدیهی است که پس از گرمخانه‌گذاری، تعداد کلونی‌های غیرقابل شمارشی را پدید می‌آورد. همچنین جهت اطمینان از استریل بودن پتری‌دیش‌ها و سرم فیزیولوژی در هر مرحله از آزمایش یک پتری‌دیش محتوی ۰/۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی نیز پورپلیت می‌گردید که بعد از طی زمان انکوباسیون، هیچگونه رشد باکتری را از خود نشان نمی‌داد. میزان ازوناسیون تا جایی پیش می‌رفت که نابودی کامل هرگونه حاصل گردد. تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلونی باکتری در پتری‌دیش‌های مورد ازوناسیون در صورت داشتن رشد باکتریایی، شمارش می‌گردید و برحسب CFU/ml محاسبه می‌گردید.

یافته‌ها

در معرض گذاری ۰/۱ ml از تراکم‌های مختلف در مجاورت با گاز ازون، نتایج متفاوتی را نشان داد. شکل‌های ۱ تا ۳ منحنی مرگ هر یک از گونه‌های باکتریایی را در تراکم‌های مختلف و غلظت‌های مختلف ازون نشان می‌دهد. تراکم اولیه 10^2 سلول در میلی لیتر در همه گونه‌های باکتری (به استثنا باسیلوس سرئوس) در غلظت ۵ ppm و زمان تماس ۳۰ دقیقه ازون نابود شد (شکل ۲، ۳). تراکم اولیه 10^5 سلول در میلی لیتر باکتری، تنها در باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس (شکل ۱) نیاز به بالاترین غلظت ازون (۳۰ ppm) و زمان تماس ۳ ساعت جهت نابودی داشت. این تراکم در بعضی گونه‌ها در غلظت ۵ ppm و در بعضی دیگر در ۱۰ ppm نابود شد (شکل ۲، ۳).

باکتری غیر اسپوردار اشریشیا کولی بعنوان شاخص باکتری‌های مورد آزمایش شناخته می‌شود.

غیرفعال سازی باکتری‌های سطوح توسط ازوناسیون هوا نیازمند دریافت مقادیر به مراتب بیشتر ازون نسبت به محیط آبی می‌باشد. در این تحقیق، غلظت ۳۰ ppm ازون توانست در حدود ۱۰^۷ سلول در میلی لیتر از باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس را در شرایط ازوناسیون هوا نابود سازد. در مطالعه Kowalski و همکاران (۵) تراکم اولیه‌ای در حدود ۱۰^۵ سلول در میلی لیتر از باکتری‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوک اورئوس با غلظت ۳۰۰ ppm ازوناسیون در هوا در مدت زمان ۱۵ ثانیه نابود شده است و تراکم اولیه‌ای در حدود ۱۰^۸ سلول در میلی لیتر از باکتری استافیلوکوک اورئوس نیز توسط غلظت ۱۵۰۰ ppm ازوناسیون در هوا در ۱۵ ثانیه نابود شده است. این در حالی است که در مطالعه Summerfelt (۱۱) اکثریت عوامل بیماری‌زای موجود در محیط آبی، در غلظت‌های بین ۵-۵۰ ppm نابود شده بودند. Rickloff (۱۲) نابودی باکتری‌های اسپوردار باسیلوس و کلستریدیوم را در محیط آبی با ۱۰ ppm ازون و تماس ۱۰ دقیقه عنوان نموده است. Facile و همکاران (۸) نابودی باکتری اسپوردار باسیلوس سوبتیلیس را در محیط آبی تا حد ۲/۵ ppm ازون آزمایش نموده‌اند و Larson (۱۳) نابودی این باکتری را در محیط آبی تا غلظت ۴/۸ ppm ازون گزارش نموده است.

در این آزمایش روش کار به گونه‌ای بود که بعنوان مثال غلظت ۴۰ ppm ازون به اجبار بعد از ۲۴۰ دقیقه ازوناسیون مداوم دستگاه مولد ازون و غلظت ۵۰ ppm ازون بعد از ۳۰۰ دقیقه حاصل شده است. در آزمایش گندزدایی باکتری‌های سطوح (توسط ازوناسیون هوا)، ایجاد غلظت‌های متنوع از قبل ایجاد شده از ازون (در هوای محیط مورد آزمایش) و سپس آزمون نمودن زمانهای تماس مختلف برای هر باکتری می‌تواند در تفسیر نتایج مربوط به مقاومت هرگونه باکتری نسبت به این ماده گندزدا بیشتر موثر واقع گردد.

بنابر نظر Kowalski و همکاران (۵)، وجود رطوبت در هوا موجب افزایش سمیت گاز ازون از طریق افزایش تشکیل رادیکال‌ها می‌گردد. همچنین در پاره‌ای از آزمایشات ازوناسیون، اثر درجه حرارت محیط (در محیط آبی) نیز بر روی قابلیت نابودی عوامل بیماری‌زا مطالعه شده است.

دستگاه‌های معمولی تولید کننده ازون، غلظت‌هایی از ۱٪ تا ۳٪ از گاز ازون را در هوا ایجاد می‌کنند اما در مجاورت با اکسیژن خالص، غلظت‌هایی در حدود ۰.۶٪ از گاز ازون تولید می‌شود. غلظت بسیار بالای مورد نیاز جهت گندزدایی و

تراکم اولیه ۱۰^۷ سلول در میلی لیتر که بعنوان بالاترین تراکم باکتری، در مجاورت با ازون قرار گرفت تنها در باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس در مجاورت با غلظت ۳۰ ppm نابود گردید (شکل ۱). تراکم اولیه ۱۰^۷ سلول در میلی لیتر در کوكسی‌های گرم مثبت، استافیلوکوک اورئوس و میکروکوک در غلظت ۱۵ ppm ازون (با زمان تماس ۹۰ دقیقه) نابود شدند (شکل ۲) ولی این تراکم اولیه در باسیل‌های گرم منفی از قبیل اشریشیا کولی، پseudomonas آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلاتیفی و پروتئوس در مجاورت با ۱۰ ppm ازون (در زمان ۶۰ دقیقه) تخریب شد. یافته‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- غیرفعال شدن انواع باکتریها در مجاورت با ازون

| باکتری | زمان مجاورت | | | |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | قبل | ۳۰' بعد | ۶۰' بعد | ۹۰' بعد |
| استافیلوکوک اورئوس | * | استریل | استریل | استریل |
| باسیلوس سرئوس | ۱×۱۰ ^۷ | ۱×۱۰ ^۸ | ۱×۱۰ ^۷ | ۱×۱۰ ^۶ |
| پseudomonas آئروژینوزا | * | ۱×۱۰ ^۲ | استریل | استریل |
| سالمونلا تیفی | * | ۱×۱۰ ^۲ | استریل | استریل |
| کلبسیلا پنومونیه | * | ۱×۱۰ ^۲ | استریل | استریل |
| اشریشیا کولی | ۱×۱۰ ^۷ | ۱×۱۰ ^۱ | استریل | استریل |
| پروتئوس | ۱×۱۰ ^۷ | ۱×۱۰ ^۱ | استریل | استریل |

* غیر قابل شمارش

بحث

یافته‌ها نشان می‌دهد باکتری‌های فاقد اسپور در محدوده‌های تراکم اولیه ۱۰^۷-۱۰^۲ سلول در میلی لیتر حداکثر در مجاورت با غلظت ۱۵ ppm ازون قابل نابودی و غیرفعال سازی می‌باشند. تنها باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس می‌باشد که در غلظت اولیه ۱۰^۷-۱۰^۵ سلول در میلی لیتر نیاز به غلظت‌های بسیار بالاتری از ازون (تا حد ۳۰۰ ppm) و زمان تماس ۱۸۰ دقیقه دارد (جدول ۱). از این رو بعلت مقاومت بالای باکتری‌های اسپوردار نسبت به مواد گندزدا، اصولاً از آنها جهت آزمایش روش‌های مختلف گندزدایی استفاده می‌شود. البته، در آزمایشات گندزدایی در محیط آبی جهت تولید آب آشامیدنی،

و موثرتر است، اما تحقیقات وسیع تری در مورد اقتصادی تر شدن بکارگیری سیستم ازوناسیون مورد نیاز می باشد. از طرف دیگر، بدلیل مقاومت پایین تر ویروس ها نسبت به باکتری ها در برابر ازون، گندزدایی ویروس ها در سطوح (توسط ازون) می تواند سودمند واقع گردد (۱۴). به لحاظ اینکه گاز ازون، یک گاز ناپایدار می باشد لذا باید دستگاه تولید کننده ازون دقیقا در محل به کارگیری آن تعبیه شود و از ساختن دستگاه مرکزی و سیستم های توزیع و پخش کننده خودداری گردد. تولید گاز ازون به حرارت بستگی دارد. لذا روش های کاهش دادن دما، نقش اساسی در عملکرد مناسب دستگاه دارند.

غیرفعال سازی عوامل بیماریزای سطوح در هوا (نسبت به محیط آبی) توسط ازون، از مهمترین عوامل عدم بکارگیری رایج ازون در گندزدایی عوامل بیماریزای سطوح در محیط های بسته محسوب می گردد. غلظت های بالای مورد نیاز، موجب افزایش هزینه تولید ازون (افزایش مصرف انرژی) و همچنین افزایش قابل توجه هزینه نگهداری سیستم نسبتا گرانبهائی ازوناسیون می گردد. گندزدایی سطوح در مکان های حساسی چون اتاق های عمل، اتاق های بستری بیماران در بیمارستان ها و اتاق های فوق سترون (با هدف افزایش شاخص بهداشتی آنها) با استفاده از ازون، امکان پذیر می باشد و نسبت به سیستم های گندزدایی اشعه وای بنفش UV به مراتب قوی تر

REFERENCES

1. Komanapalli IR, Mudd JB, Lau BH. The effects of ozone on the metabolic activities of Escherichia coli K-12. *Toxicol Lett* 1997; 90(1): 61-6.
2. Bablon ME. Fundamental aspects, practical application of ozone. In: Langlais B, Reckhow DA, Brink DR, eds. *Ozone in water treatment: application and engineering*. American Water Works Association Research Foundation. Denver Co; 1991. p. 311-16.
3. Elford WJ, Eude JV. An investigation of the merits of ozone as an aerial disinfectant. *J Hyg* 1942; 42: 240-65.
4. Heindel TH, Streib R, Botzenhart K. Effect of ozone on airborne microorganisms. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1993; 194(5-6): 464-80.
5. Kowalski WJ, Bahnfleth WP, Whittam TS. Bactericidal effects of high airborne ozone concentrations on escherichia coli and staphylococcus aureus. *Ozone Sci Eng* 1998; 20: 205-21.
6. Nickols D, Varas AJ. Ozonation. In: Bryant EA, Fulton GP, Budd GC, eds. *Disinfection alternatives for safe drinking water*. New York: Van Nostrand Reinhold. 1992. p. 196-258.
7. Rice RG. Application of ozone for industrial wastewater treatment. *Ozone Sci Eng* 1997; 18: 477-515.
8. Facile N, Barbeau B, Prevost M, Koudjonou B. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for giardia and cryptosporidium inactivation by ozone. *Water Res* 2000; 34(12): 3238-46.
9. Rice RG, Robson CM, Miller GW, Hill AG. Uses of zone in drinking water treatment. *J Am Water Works Assoc* 1981; 73: 1-44.
10. Duviol L, Leynen M, Van Damme A, Ollevier F. Fighting zebra mussel folding with ozone. In: *Proceedings of the EPRI PSE Service Water System Reliability Improvement Seminar*. 1996; EPRI, Daytona Beach, FL.
11. Summerfelt ST. Ozonation and UV irradiation – an introduction and examples of current applications. *Aquac Eng* 2003; 28: 21-36.
12. Rickloff JR. An evaluation of the sporocidal activity of ozone. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 683-6.
13. Larson MA, Marinas BJ. Inactivation of Bacillus subtilis spores with ozone and monochloramine. *Water Res* 2003; 37: 833-44.
14. Botzenhart K, Tarson G, Ostruschka M. Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. *Water Sci Tech* 1993; 27: 363-70.