

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 تأثیر 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 اوزون (۳۰ ppm) حاصل گردید. استافیلوکوک اورئوس و میکروکوک در تراکم 10^7 سلول بر میلی لیتر در غلظت اوزون در حدود ۱۰ ppm نابود شدند. اشیریشیا کولی و بقیه باسیل‌های گرم منفی بیماریزا در تراکم 10^7 سلول بر میلی لیتر در غلظت‌های بالاتری از اوزون (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 نابود سازی باکتری‌های غیر بیماریزای فاقد اسپور مورد نظر باشد به کارگیری غلظت ۱۵ ppm کفایت می‌کند.

واژگان کلیدی: اوزون، ضد عفونی، میکروارگانیسم سطوح.

مقدمه

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

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.

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.

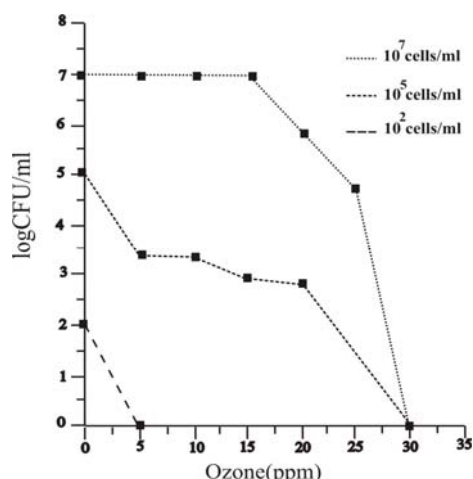
مواد و روشها

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 ازناسیون واقع شدند. درجه حرارت در طول مدت آزمایش در فضای ایجاد شده 25 ± 2 درجه سانتیگراد بود. تنظیم زمان ازناسیون 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 ، 10^6 و 10^7 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 برید کانتر^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

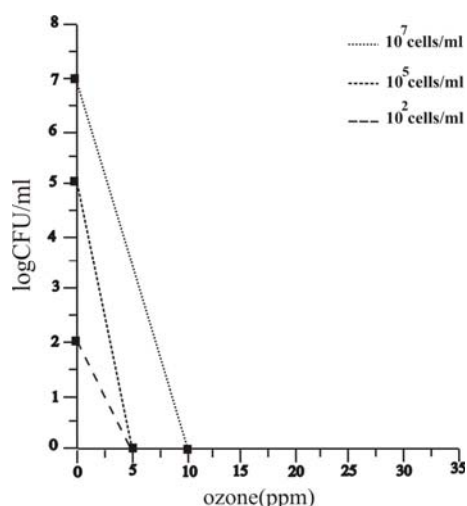
در دستگاه مولد ازون، جریان الکتریکی متناوب موجب جذب الکترون ها به یک الکتروود و سپس جذب آنها به الکتروود دیگر می شود. پس از اینکه الکترون ها به سرعت کافی رسیدند می توانند بعضی از ملکول های اکسیژن (O_2) را به اتم های آزاد (رادیکال اکسیژن) بشکنند. این اتم ها ممکن است با ملکول های اکسیژن (O_2)، ترکیب شده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

ازون، یک اکسید کننده پروتوپلاسم است. Komanapalli و همکاران (۱) معتقدند گروه های سولفیدریل در غشاء باکتری، اولین هدفی هستند که مورد تهاجم واقع می شوند. بنابراین Bablon (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 ۰/۱ تا ۰/۵ واحد در میلیون واحد (ppm ۰/۵ - ۰/۱) 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 اکسید کنندگی 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 اکسید کنندگی ازون، نشأت 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 اکسید کننده 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

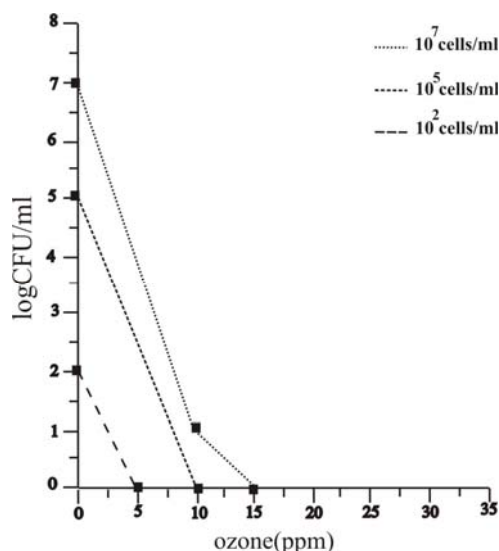
^۱ - در این روش مقادیر اندکی از سوسپانسیون حاوی باکتری (بعنوان مثال ۰/۱ میلی لیتر) در درون پلیت ریخته شده و سپس با آگار نیمه مذب مخلوط می گردد. بعد از ۲۴ ساعت از گرمخانه گذاری تعداد کلونی ها شمارش می شود. بدیهی است هر کلونی نمایش دهنده یک باکتری در سوسپانسیون اولیه خواهد بود.



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 10^5 و 10^2 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 تربیتی 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 گرمخانه گذاری، تعداد کلونی‌های غیرقابل شمارشی را پدید می‌آورد. همچنین جهت اطمینان از استریل بودن پتری دیش‌ها و سرم فیزیولوژی در هر مرحله از آزمایش یک پتری دیش 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 پتری دیش‌های 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 هریک 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).

تراکم اولیه 10^7 سلول در میلی لیتر که بعنوان بالاترین تراکم باکتری، در مجاور با ازون قرار گرفت تنها در باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس در مجاورت با غلظت ۳۰ ppm نابود گردید (شکل ۱). تراکم اولیه 10^7 سلول در میلی لیتر در کوکسی های 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 باسیل های گرم منفی از قبیل اشیریشیا کولی، پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلاتیفی و پروتئوس در مجاورت با ۱۰ ppm ازون (در زمان ۶۰ دقیقه) تخریب شد. یافته ها 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	*	استریل	استریل	استریل
اورئوس	1×10^7	استریل	استریل	استریل
باسیلوس	*	1×10^8	1×10^7	1×10^6
سرئوس	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4
پسودوموناس	*	1×10^2	استریل	استریل
آئروژینوزا	1×10^7	1×10^2	استریل	استریل
سالمونلا	*	1×10^2	استریل	استریل
تیفی	1×10^7	1×10^2	استریل	استریل
کلبسیلا	*	1×10^2	استریل	استریل
پنومونیه	1×10^7	1×10^2	استریل	استریل
اشیریشیا	*	1×10^2	استریل	استریل
کولی	1×10^7	1×10^1	استریل	استریل
پروتئوس	1×10^7	1×10^1	استریل	استریل

* غیر قابل شمارش

باکتری غیر اسپوردار اشیریشیا کولی بعنوان شاخص باکتری های مورد آزمایش شناخته می شود.

غیرفعال سازی باکتری های سطوح توسط ازوناسیون هوا نیازمند دریافت مقادیر به مراتب بیشتر ازون نسبت به محیط آبی می باشد. در این تحقیق، غلظت ۳۰ ppm ازون توانست در حدود 10^7 سلول در میلی لیتر از باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس را در شرایط ازوناسیون هوا نابود سازد. در مطالعه Kowalski و همکاران (۵) تراکم اولیه ای در حدود 10^5 سلول در میلی لیتر از باکتری های اشیریشیا کولی و استافیلوکوک اورئوس با غلظت ۳۰۰ ppm ازوناسیون در هوا در مدت زمان ۱۵ ثانیه نابود شده است و تراکم اولیه ای در حدود 10^8 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 غلظت های بین ۵-۵۰ ppm نابود شده بودند. Rickloff (۱۲) نابودی باکتری های اسپوردار باسیلوس و کلوستریدیوم 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 نموده اند 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 گونه ای 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 باکتری های سطوح (توسط ازوناسیون هوا)، ایجاد غلظت های متنوع از قبل ایجاد شده از ازون (در هوای محیط مورد آزمایش) و سپس آزمون نمودن زمانهای تماس مختلف برای هر باکتری می تواند 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 رادیکال ها می گردد. همچنین در پاره ای از آزمایشات ازوناسیون، اثر درجه حرارت محیط (در محیط آبی) نیز بر روی قابلیت نابودی عوامل بیماریزا مطالعه شده است.

دستگاه های معمولی تولید کننده ازون، غلظت هایی از ۱٪ تا ۳٪ از گاز ازون را در هوا ایجاد می کنند اما در مجاورت با اکسیژن خالص، غلظت هایی در حدود ۶٪ از گاز ازون تولید می شود. غلظت بسیار بالای مورد نیاز جهت گندزدایی و

بحث

یافته ها نشان می دهد باکتری های فاقد اسپور در محدوده های تراکم اولیه 10^7 - 10^2 سلول در میلی لیتر حداکثر در مجاورت با غلظت ۱۵ ppm ازون قابل نابودی و غیرفعال سازی می باشند. تنها باکتری اسپوردار باسیلوس سرئوس می باشد که در غلظت اولیه 10^7 - 10^5 سلول در میلی لیتر نیاز به غلظت های بسیار بالاتری از ازون (تا حد ۳۰ ppm) و زمان تماس ۱۸۰ دقیقه دارد (جدول ۱). از این رو بعلت مقاومت بالای باکتری های اسپوردار نسبت به مواد گندزدا، اصولا از آنها جهت آزمایش روش های مختلف گندزدایی استفاده می شود. البته، در آزمایشات گندزدایی در محیط آبی جهت تولید آب آشامیدنی،

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 نسبتاً گرانقیمت 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 ورای بنفش UV به مراتب قوی تر

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 دقیقاً 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.

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. Duvivier 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, Tarcson 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.