А.В. Мокієнко

ДІОКСИД ХЛОРУ

Том 2

Мікробіологія

Острог, 2026

А.В. Мокієнко

ДІОКСИД ХЛОРУ

Том 2

Мікробіологія

Монографія

Острог, 2026

УДК 628.16:579

Рекомендовано до друку Вченою радою Національного університету «Острозька академія», протокол №5 від 30 жовтня 2025 року.

Рецензенти:

Мітченко Т.Є., професор кафедри технології неорганічних речовин, водоочищення та загальної хімічної технології хіміко - технологічного факультету Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», доктор технічних наук, професор.

Знак З.О., завідувач кафедри хімії і технології неорганічних речовин Національного університету «Львівська політехніка», доктор технічних наук, професор.

Мокієнко А.В. Діоксид хлору. Том 2. Мікробіологія. Монографія. 2026. 421 с.

Книга присвячена актуальній проблемі застосування діоксиду хлору як ефективного окиснювача і дезінфектанта у технологіях водопідготовки. Другий том є докладною характеристикою кінетики та механізмів інактивації різних мікроорганізмів діоксидом хлору при знезараженні питної води. Представлено узагальнення даних літератури щодо біоцидної дії діоксиду хлору на бактерії, віруси, найпростіші, бактеріальні та грибкові спори, мікроводорості, біоплівки. Окремими фрагментами монографії є результати власних досліджень.

Книга розрахована на мікробіологів, технологів та інженерів в галузі очищення води, а також гігієністів, санітарних лікарів, викладачів і здобувачів ЗВО.

© Мокієнко А.В., 2026 р.

«Не бійся досконалості -
ти ніколи її не досягнеш»
Марія Склодовська-Кюрі (1867-1934),
єдина у світі двічі лауреатка Нобелівської
премії: з фізики (1903) та з хімії (1911).

ЗМІСТ

	ПЕРЕДМОВА	21
РОЗДІЛ 1	МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІЧНОЇ КІНЕТИКИ ІНАКТИВАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ХІМІЧНИМИ ДЕЗІНФЕКТАНТАМИ	23
1.1	Кінетика інактивації за Chick-Watson-Hom	24
1.2	Вейбуллівський (Weibull) підхід до кінетики виживання та інактивації мікробів	28
1.3	Розподіл Weibull	29
1.4	Вираження залежності параметра швидкості Weibull від концентрації	31
1.5	Розтягнута експоненціальна модель	31
1.6	Log-експоненціальна модель	35
1.7	Динамічна дезінфекція	35
1.8	Альтернативні основні функції розподілу	37
1.9	Динамічна версія моделі розподілу Фермі	40
1.10	Поповнення дезінфікуючого засобу та врахування часу його диспергування	41
1.11	Заключні зауваження	46
РОЗДІЛ 2	БАКТЕРИЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	53
2.1	Загальна характеристика	53
2.2	Кінетика і механізм дезінфекції бактерій діоксидом хлору	72
2.2.1	Кінетичні моделі.	75
2.2.2	Оцінка параметрів	78
2.2.3	Біологічні дослідження механізму	80

2.3	Резистентність бактеріальних субпопуляцій до діоксиду хлору	84
2.3.1	Стабільність залишкового $C1O_2$	86
2.3.2	Біоцидна ефективність ClO_2	88
2.3.3	Резистентна *E. coli*	89
2.3.4	Моделювання хемостату	90
2.4	Кінетика і механізм інактивації діоксидом хлору *Pseudomonas aeruginosa і Staphylococcus aureus* при знезараженні води	100
2.4.1	Кінетика інактивації за різних концентрацій діоксиду хлору	103
2.4.2	Вплив Ph на дезінфекцію бактерій діоксидом хлору	105
2.4.3	Вплив температури	107
2.4.4	Вплив початкової щільності бактерій	108
2.4.5	Проникність зовнішньої клітинної мембрани	110
2.4.6	Вивільнення поглинаючих матеріалів з довжиною хвилі 260 нм	111
2.4.7	Зміни в морфології клітин	113
2.5	Синергетичний ефект інактивації *Escherichia coli* шляхом послідовної дезінфекції низькими дозами діоксиду хлору з наступним хлоруванням	122
2.5.1	Інактивація *E. coli* низькими дозами ClO_2	124
2.5.2	Зміна проникності клітинної стінки залежно від низького рівня ClO_2	126
2.5.3	Кінетика розпаду дезінфікуючого засобу	127
2.5.4	Посилення дезінфекції в SD	128

2.5.5	Можливий механізм синергізму	130
2.5.6	Роль pH та температури в SD	131
2.6	Інактивація бактеріальних збудників, як можливих агентів біотероризму, діоксидом хлору	135
2.7	Інактивація діоксидом хлору *Legionella*	144
2.7.1	Досвід практичного застосування діоксиду хлору для контролю *Legionella* в системі водопостачання лікарні	144
2.7.1.1	Рівні діоксиду хлору, хлориту та хлорату	147
2.7.1.2	Спостереження за внутрішньолікарняною легіонельозною інфекцією	147
2.7.2	Порівняння ефективності дезінфектантів щодо контролю біоплівок, найпростіших та *Legionella* в системах побутового питного водопостачання	151
2.7.3	Результати шокової обробки системи водопостачання діоксидом хлору (ClO_2) для контролю *Legionella pneumophila*	156
2.8	Інактивація діоксидом хлору *Mycobacterium avium*	161
2.8.1	Вплив концентрації дезінфікуючого засобу	163
2.8.2	Вплив температури	165
2.8.3	Вплив pH	170
2.8.4	Вимоги до обробки	172

2.9	Дослідження бактерицидної та мікоцидної дії діоксиду хлору по відношенню до збудників нозокоміальних інфекцій *P. aeruginosa, S. aureus*, грибів *роду Candida*	178
2.9.1	Дослідження резистентності еталонних та мультирезистентних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida* до антимікробних препаратів	183
2.9.2	Дослідження біоцидної ефективності ДХ при знезараженні води по відношенню до еталонних штамів збудників нозокоміальних інфекцій *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*	184
2.9.3	Дослідження біоцидної ефективності ДХ при знезараженні води по відношенню до мультирезистентних штамів збудників нозокоміальних інфекцій *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida*	190
РОЗДІЛ 3	ВІРУЛІЦИЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	199
3.1	Загальна характеристика	199
3.2	Кінетика та механізми інактивації вірусів діоксидом хлору при обробці води	218
3.2.1	Ефективність інактивації різноманітних вірусів	219
3.2.2	Вплив експериментальних умов на кінетику інактивації	222
3.2.3	Механізми інактивації	225

3.3	Дослідження віруліцидної дії діоксиду хлору	238
3.3.1	Результати лабораторних досліджень з оцінки віруліцидної дії діоксиду хлору (ДХ) по відношенню до пріоритетних вірусних контамінантів питної води.	238
3.3.1.1	Методика оцінки віруліцидної ефективності діоксиду хлору	238
3.3.1.2	Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо поліовірусів	240
3.3.1.3	Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо аденовірусів	241
3.3.1.4	Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусів Коксакі	242
3.3.1.5	Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусів ЕСНО	243
3.3.2	Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусу пташиного грипу	245
3.3.3	Гігієнічна оцінка віруліцидної дії діоксиду хлору у технологіях підготовки питної води	247
3.3.4	Епідеміологічне підтвердження ефективності діоксиду хлору як засобу мінімізації захворюваності населення водно-обумовленим вірусним гепатитом А	249
РОЗДІЛ 4	ПРОТОЗООЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	259
РОЗДІЛ 5	СПОРОЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	282
5.1	Загальна характеристика	282
5.2	Інактивація діоксидом хлору спор *Bacillus* і *Clostridium*	317

РОЗДІЛ 6	АЛЬГАЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	331
РОЗДІЛ 7	МІКОЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	347
7.1	Поширеність видів грибів у джерелах питних підземних вод	349
7.2	Кінетика інактивації спор грибів за допомогою діоксиду хлору	350
7.3	Фактори, що впливають на ефективність інактивації	352
7.3.1	Вплив концентрації діоксиду хлору	352
7.3.2	Вплив pH та температури	352
7.3.3	Вплив гумінової кислоти	354
7.3.4	Вплив водних матриць	355
7.3.5	Механізми інактивації спор грибів за допомогою діоксиду хлору	357
7.3.5.1	Витік азотистих органічних сполук	357
7.3.5.2	Зміни загального та позаклітинного АТФ	357
7.3.5.3	Спостереження морфології за допомогою SEM	359
7.3.5.4	Короткий опис механізму інактивації	361
7.4	Порівняння ефективності інактивації спор грибів хлором та діоксидом хлору	361
РОЗДІЛ 8	ДІОКСИД ХЛОРУ ЯК ЗАСІБ ВИДАЛЕННЯ БІОПЛІВОК	370
РОЗДІЛ 9	МЕХАНІЗМИ БІОЦИДНОЇ ДІЇ ДІОКСИДУ ХЛОРУ	392
9.1	Бактерицидна дія	392
9.1.1	Зміна проникності клітинної мембрани	392
9.1.2	Інгібування синтезу білка	394
9.1.3	Деструкція генетичного матеріалу	395
9.2	Мікоцидна дія	395

9.3	Механізм інактивації вірусів діоксидом хлору	398
9.3.1	Порушення зовнішньої білкової оболонки вірусу	399
9.3.2	Деградація фрагментів РНК	400
	УЗАГАЛЬНЕННЯ	409
	ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРА	420

ANNOTATION

Mokienko A.V. Chlorine dioxide. Volume 2. Microbiology. Monograph. 2026.

The book is devoted to the current problem of using chlorine dioxide as an effective oxidant and disinfectant in water treatment technologies. The second volume is a detailed characteristic of the kinetics and mechanisms of inactivation of various microorganisms by chlorine dioxide during the disinfection of drinking water. A generalization of literature data on the biocidal effect of chlorine dioxide on bacteria, viruses, protozoa, bacterial and fungal spores, microalgae, biofilms is presented. Separate fragments of the monograph are the results of our own research.

Chapter 1 is devoted to modeling the dynamic kinetics of inactivation of microorganisms by chemical disinfectants. The analysis focuses on the mathematical properties of traditional kinetic models of chemical disinfection and their replacement options when studying dynamic disinfection using dispersive/volatile disinfectants. The main conclusions of the work are as follows.

The most notable microbial survival models of disinfection kinetics are the original and modified versions of the static Chick-Watson-Hom's (CWH) initially developed for water chlorination. They can all be viewed as special cases of the Weibull survival model, where the observed static curve is the cumulative form (CDF) of the times at which the individual targeted microbes succumb to the treatment. The CWH model time's exponent is the distribution's shape factor, and its concentration-dependent rate parameter represents the

distribution's scale factor's reciprocal. Theoretically, the concentration-dependence of the Weibull model's rate parameter need not to be always in a form of a power-law relationship as the CWH model requires, and two possible alternatives are presented. Apart from being chemically reactive, most chemical disinfectants are also volatile, and their effective concentration rarely remains constant. However, the published dynamic versions of the original CWH model are mathematically incongruent with their static versions. The issue is nonexistent in the dynamic version of the Weibull or other distribution-based models, provided that the momentary inactivation rate is expressed as the static rate at the momentary concentration, at the time that corresponds to the momentary survival ratio. The resulting model is an ordinary differential equation (ODE) whose numerical solution can describe survival curves under realistic regular and irregular disinfectant dissipation patterns, as well as during the disinfectant dispersion and/or its replenishment.

Chapter 2 is devoted to the characterization of the bactericidal action of chlorine dioxide (CD or $C1O_2$).

Due to its high oxidizing ability and monomolecular state, CD can easily penetrate the bacterial membrane, disrupting the transmembrane gradient and membrane permeability by inhibiting phosphate transferases. In the process of inactivation of bacteria, CD affects the enzyme chain of glucose oxidase, in particular, mercapto groups (-SH), oxidizing them to -S-S-groups, which leads to the loss of enzyme activity.

The study of the influence of bacterial structure on the effectiveness of chlorine dioxide allowed us to express the opinion that the basis of the difference between bacteria is the structure of peptidoglycan or mucopeptide of the cell membrane.

For example, gram-negative *Escherichia coli* have a one-dimensional structure of a mucopeptide chain with four peptides, as a result of which the disinfectant effectively breaks the chemical bonds of bacteria with subsequent inactivation. Gram-positive *Staphylococcus aureus* is characterized by a three-dimensional spatial structure of the chain, which causes greater resistance to disinfectants. In this regard, *St. aureus* has greater resistance to drugs.

The results of studying the kinetics and mechanism of inactivation by chlorine dioxide of *Pseudomonas aeruginosa* and *St. aureus* during water disinfection (Chapter 2.4) showed the following.

Bacteria inactivation was conducted in batch reactors at varied disinfectant concentrations, pH, temperature and initial bacteria densities in buffered disinfectant demand free water. The bactericidal mechanism in terms of the effect on the permeability of the outer and cytoplasmic cell membranes and the morphology of the cells were explored. At the highest studied concentration (5.0 mg/L), at least 5-log reductions in bacterial population were observed for each strain of bacteria. Chlorine dioxide inactivation showed a stronger sensitivity to changes in water pH conditions with the inactivation rate at 8.5 being at least 4-fold of what pertained at 6.5 but efficiency was less impacted by changes in the initial bacteria density. A rise in temperature from 4 °C to 15 °C resulted in approximately 56% increase in the inactivation rate of *S. aureus*. Chlorine dioxide was found to increase the permeability of outer and cytoplasmic cell membranes and consequently resulting in the release of vital nuclear materials which strongly correlated with loss of cell activity or death. However, from TEM micrographs significant morphological damages or cells lysis was not observed. These results provide vital data on operational strategies to enhance efficient disinfection of water with

chlorine dioxide whilst monitoring regulatory requirements on disinfection by-products.

A synergistic effect of *E. coli* inactivation by sequential disinfection with low doses of chlorine dioxide followed by chlorination has been established (Chapter 2.5). This study investigated *E. coli* inactivation by four types of disinfection: single step disinfection (SSD), SD, traditional sequential disinfection (TSD) and mixed disinfectant disinfection (MDD). Results indicated that SD had higher ability to inactivate *E. coli* than the others, indicating there was a positive synergistic effect on chlorine disinfection by prior dosing with a low level of chlorine dioxide (ClO_2). The ONPG assay suggested that the permeability of cell wall rather than the viability of *E. coli* were changed under 0.02 mg/l ClO_2 treatment. The coexistence of residual ClO_2 and free chlorine also plays an active synergistic effect. Additionally, temperature had a positive effect on *E. coli* inactivation in SD, while inactivation was reduced in alkaline compared to neutral and acidic conditions.

Concerns about the safety of drinking water have led to the collection of data on the effectiveness of disinfectants against bioterrorism (BT) agents in drinking water (Chapter 2.6). Data have previously been published on the efficacy of free available chlorine (FAC), monochloramine, and UV radiation against various spore strains of *Bacillus anthracis, Francisella tularensis, Yersinia pestis, Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Brucella suis,* and *Brucella melitensis*. ClO_2 has been shown to be equal to, if not superior to, FAC as the primary disinfectant for the Gram-negative organisms tested and to have advantages over the use of FAC in situations where the contact time of FAC is insufficient for effectiveness and when there is concern about the formation of halogenated disinfection by-products (trihalomethanes and haloacetic acids) or if the water pH is >8. ClO_2 was found to be slightly more effective than FAC against B. anthracis spores in

water at 25°C and against *F. tularensis* and *B. pseudomallei* strains under all conditions tested (Chapter 2.6).

Experience with the practical use of chlorine dioxide to control *Legionella* in the hospital water supply system has shown the following (Chapter 2.7). During the 17-month evaluation, no nosocomial Legionnaires' disease was detected in the building with the chlorine dioxide system. During this time, one case of nosocomial legionellosis pneumonia was registered in a building without a water purification system.

Chlorine dioxide showed longer residual activity in stagnant areas of the system and was the only disinfectant capable of reducing legionella concentrations in this area below detection levels after flushing. Shock dosing of ClO_2 for 8 hours reduced the number of bacteria in the planktonic phase, and although the procedure did not completely remove the biofilm during this time, there was significantly less bacterial biofilm at the end of the disinfection program (Chapter 2.7).

The effects of pH (6-10), temperature (5-30 °C), and disinfectant concentration (0.5-5 mg ClO_2/L) on the kinetics of *Mycobacterium avium* inactivation with chlorine dioxide were investigated by performing batch experiments in synthetic 0.01 M phosphate and borate buffer solutions (Chapter 2.8). The resulting inactivation curves were generally characterized by a lag phase followed by two subsequent stages, fast and then slow, of pseudo-first-order kinetics consistent with two-population (susceptible and tolerant) kinetics. However, variability that was uncorrelated to experimental conditions was observed; some inactivation curves did not have a lag phase and/or the susceptible population was absent. The inactivation kinetics of the tolerant population was found to be independent of pH and to have temperature dependence according to Arrhenius law with an activation energy of 74.1 kJ/mole. Conservative CT requirements for the inactivation of *M. avium* with chlorine dioxide were estimated using the most

pronounced lag phase observed and absence of the susceptible population (Chapter 2.8).

A chlorine dioxide inactivation study of *Mycobacterium avium* has shown that water treatment plants can achieve adequate control of *M. avium* with chlorine dioxide within the treatment plant or well, providing the required contact time (Chapter 2.8).

Our own studies of the bactericidal and mycocidal action of chlorine dioxide against the causative agents of nosocomial infections *P. aeruginosa, S. aureus*, fungi of the genus *Candida* established that chlorine dioxide in doses of 0.98 - 1.52 mg/l is an effective and reliable means of water disinfection as a possible source of nosocomial infections. This made it possible to substantiate the need for conducting research on the evaluation of the effectiveness of DH in the disinfection of medical instruments, equipment and surfaces (Chapter 2.9).

The general characteristics of the virulicidal effect of chlorine dioxide (Chapter 3.1) indicate that the inactivation of the invasive ability of the hepatitis A virus (HAV) by chlorine dioxide occurred simultaneously with the destruction of antigenicity and damage to the 5'NTR genome. In addition, chlorine dioxide reacts with the protein of the viral capsid, which inhibits the attachment of HAV to host cells.

A review of the kinetics and mechanisms of inactivation of viruses by ClO_2 showed the following (Chapter 3.2). The inactivation efficiencies vary greatly among different virus species. The inactivation rates for different serotypes within a family of viruses can differ by over 284%. Generally, to achieve a 4-log removal, the exposure doses, also being referred to as Ct values (mutiplying the concentration of ClO_2 and contact time) vary in the range of 0.06-10 mg/L · min. Inactivation kinetics of viruses show two phases: an initial rapid inactivation phase followed by a tailing phase.

Inactivation rates of viruses increase as pH or temperature increases, but show different trends with increasing concentrations of dissolved organic matter (DOM). Both damages in viral proteins and in the 5' noncoding region within the genome contribute to virus inactivation upon ClO_2 disinfection.

Our own studies of the virucidal effect of chlorine dioxide on polioviruses, adenoviruses, Coxsackie and ECHO viruses (Chapter 3.3) in drinking water have established the complete absence of virus replication when exposed to chlorine dioxide in doses from 1.02±0.04 mg/l (poliovirus) to 1.51±0.06 mg/l (ECHO virus). Virus resistance increased in the range poliovirus ~ adenovirus < Coxsackie virus < ECHO virus.

It was established that the avian influenza virus with hemagglutinin H_5 showed a certain sensitivity to chlorine dioxide at different temperature regimes: at +4 °C the minimum effective dose was 1.51±0.04 mg/l, while at +36 °C the DC had a virucidal effect at a dose of 1.0±0.02 mg/L.

The established high virucidal efficacy of chlorine dioxide corresponds to the results of our own epidemiological studies of the efficacy of chlorine dioxide as a means of minimizing the incidence of water-borne viral hepatitis A in the population. It was established that the most pronounced negative trend for HAV (-91.544) in the city of Chornomorsk (Odesa region, Ukraine) significantly (by 2.1–3.5 times) exceeded the similar indicator for other territories and Ukraine as a whole. The obtained data are indirect confirmation of the high and reliable virucidal efficiency of DH.

The second indirect confirmation of the virucidal efficiency of DH is the close correlation of the obtained data with the results of virological studies: during the studied period, HAV antigens were not detected in the tap water of Chornomorsk. Thus, DH is an effective means of reducing the incidence of water-borne hepatitis A in the population.

Analysis of the trend of changes in non-infectious morbidity in the population of Chornomorsk showed the absence of any impact on the studied indicators of all categories of the population.

Chapter 4 is devoted to the characterization of the protozoocidal action of chlorine dioxide. It was established that the activation energy of chlorine dioxide exceeded the values previously found for ozone by six units. This observation suggests that the levels of inactivation of *Cryptosporidium parvum oocyst* by chlorine dioxide and ozone may be identical. Comparative data on the effectiveness of chlorine dioxide and other disinfectants against *Naegleria gruberi* indicate that chlorine dioxide at pH=9 and 25°C approaches ozone in terms of effectiveness.

The sporicidal effect of chlorine dioxide (Chapter 5) is that in spores inactivated by chlorine dioxide, metabolism and germination are altered by inhibition of the LuxA and/or B enzymes. Effective inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores by $C1O_2$ has been established.

The algicidal effect of chlorine dioxide (Chapter 6) is evidenced by the discoloration of chlorophyll after oxidation, which clearly indicates damage to the photosynthetic apparatus. This is accompanied by an increase in dissolved organic matter (DOC), which reflects the extracellular excretion of intracellular contents.

Chlorine dioxide is an effective disinfectant against fungal spores and is more effective in inactivating fungi than chlorine (Chapter 7). The Ct value, which reached 99% inactivation efficiency in groundwater, was 1.845 mg/l·min.

Different fungal species show different resistance to chlorine dioxide. Resistance to chlorine dioxide was in the following order: *Cladosporium sp.>Trichoderma sp.>Penicillium sp.*, which is significantly higher than that of bacteria.

The results show that in the tested ranges, the influence of chlorine dioxide concentration and temperature is positive, while the influence of humic acids and water matrices is negative on the inactivation of fungi.

After inactivation with chlorine dioxide, leakage of intracellular substances, an increase in the content of ATP, DNA and proteins, as well as changes in the morphology of spores were observed. Chlorine dioxide showed a strong oxidizing ability and destroyed the cell wall and membrane of fungal spores, which led to their inactivation.

When studying the effectiveness of chlorine dioxide in removing biofilms (Chapter 8), the following was shown. Chlorine dioxide provided inactivation at a log level of 1.6-1.8 for suspended bacteria and only 1 log inactivation for heterotrophic bacteria in biofilms at a low concentration of 0.25 mg/L. The practical implementation of these data is the need to ensure a residual concentration of chlorine dioxide, and not to rely on the disinfecting activity of chlorite to reduce the growth of heterotrophic bacteria in drinking water from water distribution systems.

In Chapter 9, the mechanisms of the biocidal action of chlorine dioxide are discussed. It is shown that chlorine dioxide has different mechanisms of inactivation of different types of microorganisms, taking into account their different structural morphology, cellular composition, volume and stability. For bacteria and fungi, the lethal target of chlorine dioxide is the destruction of the structure of the cell membrane, changing its permeability to intracellular substances, damaging lipid peroxidation and genetic material. The lethal purpose of chlorine dioxide for viruses is to disrupt the viral protein capsid and defragment RNA. Further research is needed to fully understand the mechanisms of pathogen and toxin inactivation. At present, research on the mechanism of disinfection by chlorine dioxide, especially in relation to virus inactivation, is

still insufficient and generally focuses on a specific type of microorganisms. Further research and experiments are needed to confirm the inactivation targets of different types of microorganisms.

ПЕРЕДМОВА

Ця книга є логічним продовженням першої [1], яка була присвячена хімії діоксиду хлору як засобу знезараження питної води. Писалась вона дещо швидше у порівнянні із попередньою. Перш за все тому, що хімія, як «цариця наук», створила родюче підґрунтя для аналізу мікробіологічних ідей та пошуків. По-друге, кількість попередньо обробленого матеріалу у трьох попередніх книгах [2-4] була порівняно із хімію більшою. У будь-якому випадку автор вважав за необхідне продовження цієї аналітичної праці. Як з'ясувалось у цій книзі, послідовність викладу виявилась правильною у тому сенсі, що без фундаментальних хімічних досліджень хімії діоксиду хлору розуміння його мікробіології у контексті обґрунтування біоцидної ефективності могло залишитися певною мірою емпіричним.

З кожним кроком пізнання діоксиду хлору як надзвичайно цікавої хімічної сполуки стає зрозумілим, що у будь якому аспекті його досліджень ставити крапку буде рано. Тут автор цілком і повністю згоден із майже одностайною думкою провідних експертів у цій сфері, що, незважаючи на використання надсучасних методів

досліджень і експоненціальний ріст публікацій, діоксид хлору є найменш вивченим реагентом.

В цій книзі автор намагався узагальнити світовий досвід вивчення біоцидної (в найширшому розумінні цього слова) ефективності діоксиду хлору по відношенню до різноманітних мікроорганізмів. Як і у всіх попередніх працях не зроблено жодного натяку на вичерпність зробленого аналізу. Це знову ж таки, чергова верхівка пізнавального айсбергу. Але, навіть, якщо вона поодинока, в ній, безсумнівно, є сенс.

Література

1. Mokiienko, A. *Dioksyd khloru. Tom 1. Khimiia.* Monograph. [Chlorine Dioxide. Vol. 1. Chemistry. Monograph]. 2026. 424 с. URL https://eprints.oa.edu.ua/id/eprint/9664/1/Dioksyd_hloru_T.1.pdf
2. Mokiienko, A. V., & Petrenko, N. F. (2005). [*Dioksid khlora: primenenie v tekhnologiiakh vodopodgotovki / Chlorine dioxide: Applications in water treatment technologies*]. Одеса: Optimum. 486 с.
3. Mokiienko, A. V., Petrenko, N. F., & Gozhenko, A. I. (2012). [*Dezinfektsiia vody. Gigienicheskie i mediko-ekologicheskie aspekty. T. 2. Dioksid khlora / Water disinfection. Hygienic and medico-ecological aspects. Vol. 2. Chlorine dioxide*]. Одеса: ТЕС. 604 с.
4. Mokiienko, A. V. (2021). [*Dioksid khlora: primenenie v tekhnologiiakh vodopodgotovki / Chlorine dioxide: Applications in*

water treatment technologies]. Одеса: Фенікс. 336 с.

РОЗДІЛ 1
МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІЧНОЇ КІНЕТИКИ ІНАКТИВАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ХІМІЧНИМИ ДЕЗІНФЕКТАНТАМИ

Кінетика мікробної хімічної дезінфекції має довгу історію і була описана математично за допомогою різноманітних моделей, наприклад, Ganguly et al. (2018), Gyurek and Finch (1998), Luukkonen et al. (2015), Santoro et al. (2007), Younas et al. (2014) [1-5]. Найчастіше використовуваними моделями були оригінальна модель Chick-Watson та Hom (Chick 1908; Watson 1908; Hom 1972) [6-9]. Математичні властивості цих моделей та їх застосування до дезінфікуючих засобів, таких як хлор, діоксид хлору, озон, перекис водню, пероцтова кислота, мідь та етанол, були описані та обговорені в численних публікаціях [1-3, 9-23].

Майже незмінно їх відправною точкою була «статична» версія моделі, де концентрація дезінфікуючого засобу, а також температура та інші фактори залишаються постійними. «Динамічні» або швидкісні версії моделі, тобто ті, де концентрація дезінфікуючого засобу змінюється, головним чином через його розсіювання, були

отримані шляхом вираження коефіцієнта виживання як похідної за часом статичної напівлогарифмічної кривої виживання. Оскільки, за дуже рідкісними винятками (зокрема, срібло), дезінфікуючі засоби є як високореактивними хімічно, так і леткими, підтримка їхньої постійної концентрації може бути проблемою. Тому динамічні моделі є незамінними для оцінки антимікробної ефективності одноразових та повторних обробок такими дезінфікуючими засобами.

1.1 Кінетика інактивації за Chick-Watson-Hom

Статична модель Chick-Watson, спочатку розроблена для хлорування води, зазвичай представляється у вигляді:

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = \mathrm{Log}_{10}\left[\frac{N(t)}{N_0}\right] = -kC^n t \qquad (1)$$

де $S(t) = N(t)/N_0$ – це миттєвий коефіцієнт виживання цільового мікроба, $N(t)$ та N_0 – це його миттєва кількість після часу t та його початкова кількість відповідно, а C – концентрація дезінфікуючого засобу. Два регульовані параметри моделі, k та n, характерні для цільового мікроба (який може бути вірусом, бактерією або іншим видом мікроба) та конкретного типу дезінфікуючого засобу. Величини цих параметрів також залежать від умов навколишнього середовища, таких як температура середовища та pH. Слід звернути увагу, що основа логарифма коефіцієнта виживання в цій роботі дорівнює 10, що стосується кількості декад зменшення розміру цільової мікробної популяції. Використання натурального логарифма в рівняннях вплине лише на числове значення k.

Модель Hom, або CWH, є розширеною версією моделі Chick-Watson, яку для статичної дезінфекції можна записати як

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = -kC^n t^m \qquad (2)$$

де показник степеня m – це доданий параметр.

Згідно з цими визначеннями, оригінальна модель Chick-Watson є лише окремим випадком моделі CWH, де m = 1, та оригінальної моделі Chick, де m = n = 1.

Згідно з різними публікаціями, наприклад, Gyurek and Finch (1998), Haas and Joffe (1994), Jessen et al. (2008), Mounaouer and Abdennaceur (2016) та Santoro et al. (2007) [2, 4, 13, 16, 20], динамічна або швидкісна версія моделі Chick-Watson є

$$\frac{d\mathrm{Log}_{10}[(t)]}{dt} = -kC^n \qquad (3)$$

і моделлю CWH, рівняння 3 якої є окремим випадком,

$$\frac{d\mathrm{Log}_{10}[(t)]}{dt} = -kmC^n t^{m-1} \qquad (4)$$

Однак ці два рівняння швидкості (рівняння 3 та рівняння 4) можуть описувати швидкість виживання або інактивації лише за умови, що концентрація дезінфікуючого засобу залишається незмінною, тобто де C і, отже, C_n є постійними протягом усього процесу. Якщо концентрація дезінфікуючого засобу змінюється з часом, тобто де C = C(t) / constant, то правильний висновок диференціального рівняння швидкості, незалежно від того, m = 1 чи m / 1, є такий (Peleg, 2020) [24].

$$\frac{d\mathrm{Log}_{10}[S(t)]}{dt} = -kC(t)^{n-1} t^{m-1}\left[nt\frac{dC(t)}{dt} + mC(t)\right] \qquad (5)$$

Цю математичну проблему не вирішують, беручи рівняння 3 або рівняння 4 за відправну точку, і в такому разі інтегрування призведе до рівняння

$$Log_{10}[S(t)] = -\int_0^t kmC(t)^n t^{m-1} dt \qquad (6)$$

яке, якщо C(t) = константа, не збігається з рівнянням 1 або рівнянням 2.

Haas та Joffe (1994) [13] уникнули цієї проблеми, виразивши C(t) у рівнянні 6 як член експоненціального спаду, тобто,

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = -k' m C_0^n \int_0^t \mathrm{Exp}[-nk_1 t] t^{m-1} dt \qquad (7)$$

що дозволило їм досягти приблизного розрахунку інтеграла (Falsanisi et al. (2006) [10], Chang et al. (2018) [12]).

З сучасним математичним програмним забезпеченням, таким як Mathematica® (Wolfram Research, Champaign IL, USA), а також з іншими комерційно доступними математичними програмами, числовий розрахунок скоригованого динамічного $Log_{10}[S(t)]$, як визначено в рівнянні 7, не є проблемою. Те саме можна сказати про подібні, але більш складні схеми розсіювання концентрації. Проблема з рівнянням 5 як моделі виживання полягає в тому, що вона дозволяє коефіцієнту виживання зростати зі зменшенням концентрації дезінфікуючого засобу навіть на летальному рівні. До цієї теми можна повернутися під час обговорення моделей Weibull та інших моделей, заснованих на розподілі.

Згідно з моделями типу CWH, коли C(t) = 0, цільовий мікроб залишається неушкодженим необмежений час, тобто $Log_{10}[S(t)] = 0$ у будь-який час. Звичайно, швидкість інактивації, що виникає внаслідок дезінфекції ефективним антимікробним хімічним агентом, значно перевищує ту, яка відбувається природним шляхом. Тому вважати останній незначним є розумним у більшості практичних ситуацій та ігнорувати його при побудові моделі повністю виправдано. Теоретично, однак, це може бути не завжди так, як при звичайній обробці природно

нестабільного патогену та/або в кінці обробки високолетким хімічним агентом. У таких випадках, принаймні в принципі, ефективна концентрація дезінфікуючого засобу, якщо її не поповнювати, може різко зменшитися та досягти рівня, де обидві швидкості можуть стати порівнянними за величиною. Якщо корекція для такого, ймовірно, рідкісного сценарію дійсно потрібна, то модель CWH, сформульовану рівнянням 3, можна було б змінити та записати у формі, такій як

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = -k_0 t^{m_0} - kC^n t^m \qquad (8)$$

де k_0 та m_0 – це параметри природного розпаду цільового мікроба за тих самих умов навколишнього середовища.

Або, якщо $m_0 = m$, тоді

$$\mathrm{Log}[S(t)] = -(k_0 + kC^n)t^m \qquad (9)$$

Наріжним каменем оригінальної моделі Chick було те, що інактивація мікробів відбувається за кінетикою першого порядку, рівняння швидкості якої має вигляд

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\boldsymbol{k}N(t) \qquad (10)$$

де k – константа швидкості. Ця константа швидкості, або експоненціального спаду, k, за Chick, пропорційна концентрації дезінфікуючого засобу, тобто $k = k_C C$. У моделі Chick-Watson поняття кінетики першого порядку зберігається, але константа швидкості стає пропорційною концентрації дезінфікуючого засобу, зведеній до степеня n, тобто $k = k_{CW} C^n$. Модель Chick-Watson-Hom (CWH) позбавляється кінетики першого порядку, замінюючи час t на t^m, але зберігає залежність константи швидкості Chick-Watson від концентрації у вигляді $k = k_{CWH} C^n$.

Безсумнівно, константа швидкості дезінфекції k, як би вона не була визначена, повинна бути залежною від концентрації. Але, те, що ця залежність має бути універсальною у степеневому вигляді, тобто kC або kC^n,

зовсім не очевидно. Ось дві гіпотетичні, але не нереалістичні ситуації, коли заміна степеневого члена може бути виправданою. Степеневий член, якщо він не супроводжується уточнюючим оператором «Якщо», не вказує на те, що може існувати ефективна порогова концентрація дезінфікуючого засобу, або не позначає рівень дезінфікуючого засобу, при якому інактивація починається по-справжньому. З іншого боку, степеневий вираз не показує, що може існувати рівень концентрації дезінфікуючого засобу, при якому його ефективність починає вирівнюватися. Там, де таке застереження доречне, відповідність моделі CWH, оцінена за статистичними критеріями, стосуватиметься лише конкретного досліджуваного діапазону експериментальних концентрацій.

1.2 Вейбуллівський (Weibull) підхід до кінетики виживання та інактивації мікробів

Розглянемо популяцію вірусу, бактерії, цисти або будь-якого іншого мікроорганізму, що піддається впливу хімічного дезінфікуючого засобу у воді або іншому середовищі, і припустимо, що окремий член цієї популяції може перебувати в одному з двох станів: життєздатний/живий або інактивований/мертвий. Для спрощення також припустимо, що коли цільовим мікробом є бактерія або циста, поділ клітин не відбувається у відповідному часовому масштабі, і проігноруємо можливість пошкодження та відновлення або адаптації. Ці особливості можна врахувати при побудові моделі виживання, але даної ситуації вони не стосуються. Якби летальний агент застосовувався ідеально рівномірно, і якби всі окремі мікроби були генетично ідентичними, в абсолютно однаковому фізіологічному стані та гомогенно

розподіленими, то теоретично всі вони б піддалися летальному агенту одночасно, а крива виживання їхньої популяції нагадувала б ступінчасту функцію (Peleg 1996, 2006; Peleg and Cole, 1998) [25-27]. Насправді, завжди існує певний ступінь мінливості в межах популяції мікробів, що зазнали впливу, так що окремі мікроби інактивуються та стають незліченними в різний час. Спостережувана крива виживання, таким чином, є записом спектру чутливості (або резистентності) мікробів до агента, вираженого як кумулятивна форма (CDF) часового розподілу інактивації/летальності. Залежно від цільового мікроба, виду дезінфікуючого засобу та умов навколишнього середовища, цей розподіл може набувати різних форм, симетричних або асиметричних, вузьких або широких тощо. Локальний нахил кумулятивної форми цього розподілу, незалежно від його форми, є миттєвою швидкістю виживання або інактивації, яка має обернену розмірність у часі та одиниці вимірювання. Іншими словами, поняття базового спектру опорів або чутливості, що характеризується функцією розподілу, та кінетики інактивації є двома сторонами однієї медалі.

1.3 Розподіл Weibull

Функція розподілу Weibull – це гнучка математична модель, яка застосовується до багатьох непов’язаних явищ відмови/виживання, серед яких інактивація мікробів теплом та іншими засобами, включаючи хімічну дезінфекцію води [26, 28]. Оскільки при моделюванні кінетики дезінфекції мова йде переважно про швидкості інактивації та параметри швидкості, далі доцільно використовувати оригінальну версію цієї моделі, відому як розподіл Rosin-Rammler, щоб зберегти аналогію з моделлю Chick-Watson-Hom.

Метою цього дослідження [29] було дослідити та висвітлити математичні властивості моделей типу Chick-Watson-Hom (CWH), запропонувати розширену версію, яка б усунула їхні теоретичні недоліки, та дослідити потенціал альтернативних кінетичних моделей для опису динамічної хімічної дезінфекції.

При статичній хімічній дезінфекції, тобто за постійної концентрації дезінфікуючого засобу, постійної температури, pH тощо, кумулятивну модель Weibull можна записати як

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = -b(C)t^{m(C)} \qquad (11)$$

де b(C) – це параметр швидкості, що залежить від концентрації, пов'язаний з оберненою величиною масштабного коефіцієнта Weibull, а m(C) – степінь, коефіцієнт форми Weibull. Якщо степінь m(C) не має або має слабку залежність від концентрації і може вважатися практично постійною [28, 30], тоді статична модель виживання мікробів Weibull стає

$$\mathrm{Log}_{10}[S(t)] = -b(C)t^{m} \qquad (12)$$

Таким чином, з формальної точки зору, модель CWH можна розглядати як окремий випадок рівняння 12, де параметр швидкості моделі Weibull b(C) = kC.

Згідно з моделлю Weibull, фактор форми більший за одиницю (m > 1), тобто напівлогарифмічна крива виживання з увігнутістю вниз, вказує на те, що накопичення пошкоджень послаблює стійкість тих, хто вижив, що прогресивно скорочує час, необхідний для їх знищення. Верхня увігнутість (m < 1), відома як «хвіст», ймовірно, вказує на те, що більш вразливі члени цільової популяції швидко знищуються, залишаючи більш стійких тих, хто вижив, для інактивації яких потрібно прогресивно більше часу. Логічно-лінійна крива або те, що називається кінетикою першого порядку, згідно з моделлю Weibull, є

лише окремим випадком, коли фактор форми m = 1.

Спостережуваний час затримки на інакше увігнутій низхідній кривій виживання, відомій як плоске «плече», можна розглядати як ознаку того, що мода розподілу сприйнятливості набагато більша за його дисперсію, і тому немає потреби в операторі «Якщо» у формулюванні моделі, щоб вказати на його існування [24, 26]. Сигмоїдна крива виживання при хімічній дезінфекції, що демонструє як плоске плече, так і хвіст, подібний до описаного Ganguly et al. [1], може розглядатися як ознака того, що популяція, найімовірніше, є сумішшю. Динамічні версії сигмоїдних моделей інактивації можна отримати так само, як і Weibull [26], але вони далі обговорюватися в цій роботі [29] не будуть.

1.4 Вираження залежності параметра швидкості Weibull від концентрації

Теоретично існує безліч можливих способів математичного опису залежності b(C) від C, одним з яких є степеневий закон CWH. Дві такі гіпотетичні криві степеневого закону b(C) проти C показані на верхніх графіках на рис. 1.1 та 1.2, а дві, згенеровані за допомогою альтернативних моделей, – у верхній частині рис. 1.3.

1.5 Розтягнута експоненціальна модель

Розглянемо гіпотетичний сценарій, коли хімічний дезінфікуючий засіб неефективний при низьких концентраціях, а рівень його летальності «зменшується» при високих концентраціях. Між ними є діапазон концентрацій, де летальність спочатку зростає зі швидким зростанням концентрації, а потім з меншою швидкістю, пізніше наближаючись до плато. Такий сценарій можна

описати сигмоподібною залежністю b(C) проти C, як показано у вигляді синьої кривої у верхній частині рис. 1.3.

Гнучка математична модель, яка може описати таку залежність, – це розтягнута експоненціальна модель з трьома параметрами, яку можна записати у вигляді

$$b(C) = b_{\text{asym}}\left\{1-\text{Exp}\left[\left(\frac{C}{C_{c1}}\right)^{p}\right]\right\} \qquad (13)$$

де b_{asym} – асимптотичний рівень b(C), C_{c1} – маркер концентрації точки перегину, а $p > 1$ – показник степеня (де $p < 1$, залежність b(C) від C матиме форму кривої Monod, тобто кривої з прогресивно спадаючим нахилом без точки перегину).

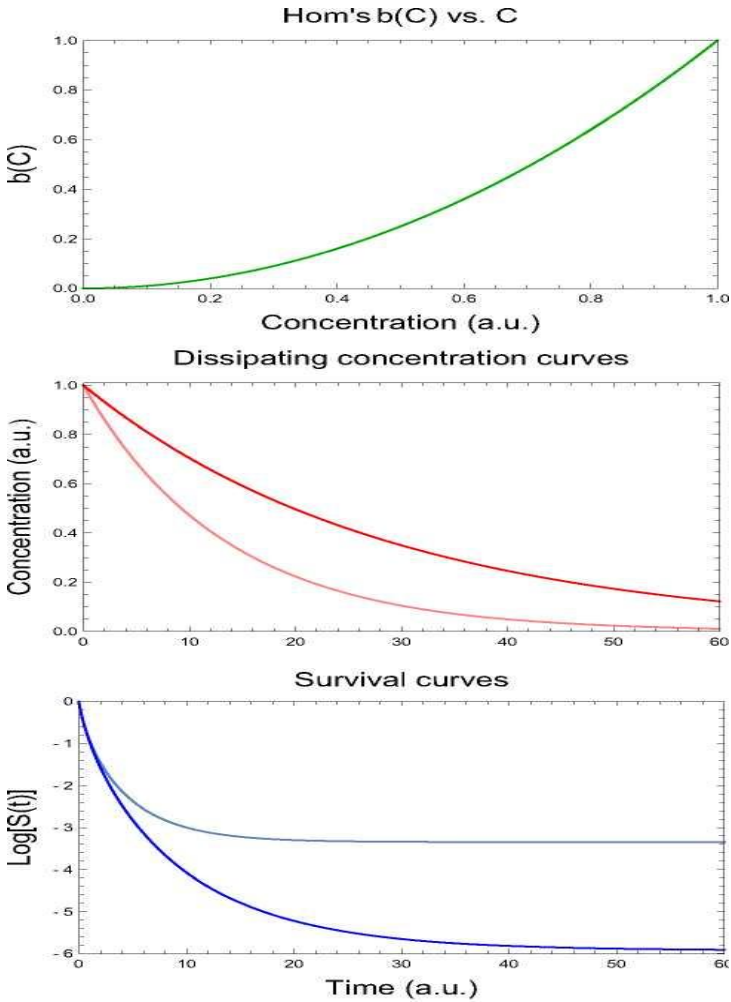

Рис. 1.1 Змодельовані криві виживання під час дезінфекції з експоненціально розсіюючим хімічним агентом, згенеровані за допомогою динамічної версії моделі Weibull (рівняння 15), де b(C) = kC", як у традиційній моделі Chick-Watson-Hom. Зверху - залежність b(C) від C, посередині - два профілі розсіюючої концентрації, а знизу - дві відповідні криві виживання. Складність диференціальних рівнянь швидкості не є перешкодою для їх числового розв'язання.

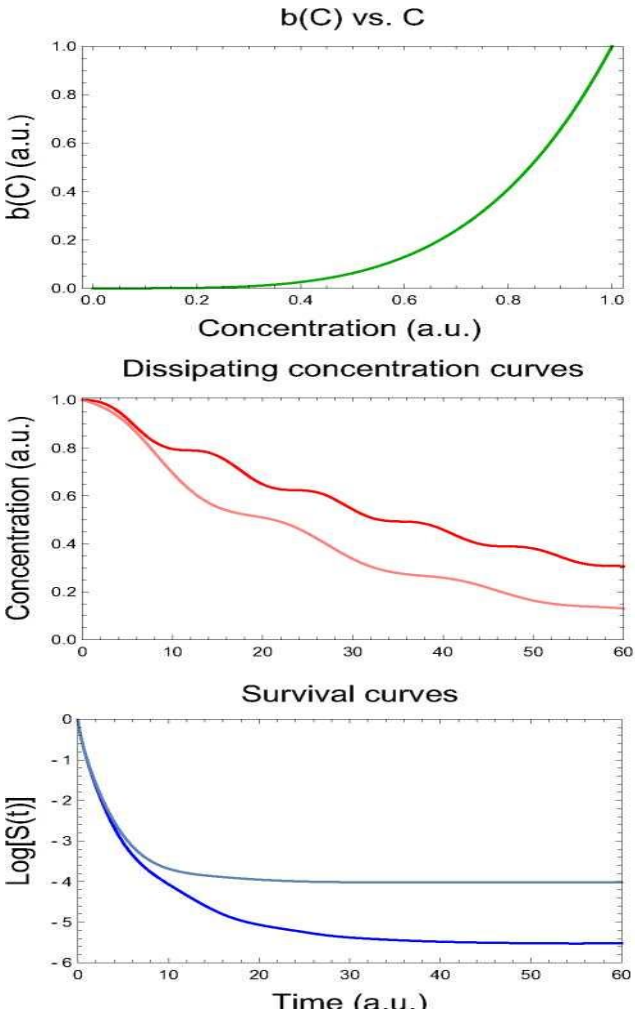

Рис. 1.2 Змодельовані криві виживання під час дезінфекції з нерегулярно розсіюючим хімічним агентом, згенеровані за допомогою динамічної версії моделі Weibull (рівняння 15), де b(C) = kC", як у традиційній моделі Chick-Watson-Hom. Зверху - залежність b(C) від C, посередині - два профілі розсіюючої концентрації, а знизу - дві відповідні криві виживання. Складність диференціальних рівнянь швидкості не є перешкодою для їх числового розв'язання.

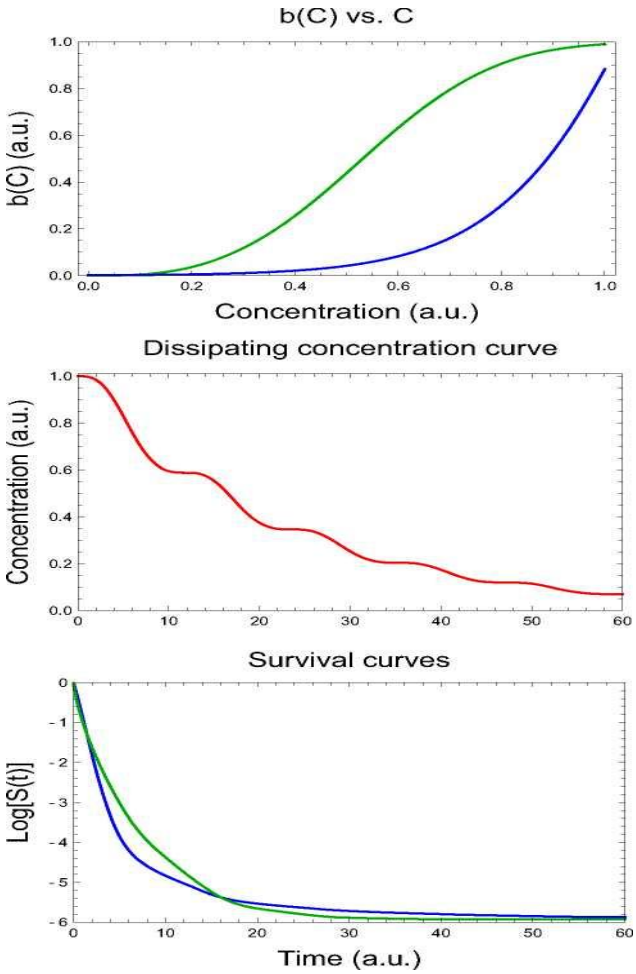

Рис. 1.3 Модельовані криві виживання під час дезінфекції з нерівномірно розсіюючим хімічним агентом, згенеровані за допомогою динамічної версії моделі Weibull (рівняння 15), де b(C) відповідає альтернативним моделям рівняння 13 (зелений) та рівняння 14 (синій). Зверху - залежність b(C) від C, посередині - профіль нерівномірно розсіюючої концентрації, а знизу - дві відповідні криві виживання. Складність диференціальних рівнянь швидкості не є перешкодою для їх числового розв'язання.

1.6 Log-експоненціальна модель

Інший гіпотетичний сценарій, представлений зеленою кривою b(C) від C у верхній частині рис. 1.3, описує ситуацію, коли дезінфікуючий засіб практично неефективний нижче певного рівня концентрації, позначеного C_{c2}, тобто при $C << C_{c2}$, $b(C) \sim 0$, а при $C >> C_{c2}$, b(C) лінійно зростає з концентрацією (як у моделі Chick). Для опису такого сценарію можна використовувати логарифмічну експоненціальну модель з двома параметрами [24, 26].

$$b(C) = \mathrm{Log}[1 + \mathrm{Exp}[k_b(C - C_{c2})]] \qquad (14)$$

Згідно з цією моделлю, при $C >> C_{c2}$, $b(C) = kb(C - C_{c2})$

1.7 Динамічна дезінфекція

Локальний нахил статичної напівлогарифмічної кривої виживання є постійним, тобто незалежним від часу, лише якщо інактивація відбувається за кінетикою першого порядку (тобто m = 1 та n = константа, використовуючи термінологію моделі CWH). Тому, при динамічній дезінфекції, де $m \neq 1$, і де C(t) змінюється з часом, миттєва швидкість інактивації - це статична швидкість при миттєвій концентрації в момент часу, що відповідає миттєвому коефіцієнту виживання [28, 31]. Це перекладається в диференціальне рівняння швидкості,

$$\frac{d\mathrm{Log}_{10}[S(t)]}{dt} = -b[C(t)]m\left[\frac{-\mathrm{Log}_{10}[S(t)]}{b[C(t)]}\right]^{(m-1)/m}$$

$$= -b[C(t)]^{1/m}m[-\mathrm{Log}_{10}[S(t)]]^{(m-1)/m} \qquad (15)$$

яке для m = 1, тобто для кінетики першого порядку, зводиться до $d\mathrm{Log}_{10}/dt = - b[C(t)]$.

Незважаючи на свій громіздкий вигляд, рівняння 15

є звичайним диференціальним рівнянням (ЗДР), яке можна швидко розв'язати чисельно для майже будь-якої можливої реалістичної історії концентрації C(t), зокрема, коли його представлено як інтерполяційну функцію.

На рис. 1.1 (внизу) показано дві змодельовані динамічні криві виживання, де концентрація дезінфікуючого засобу розсіюється експоненціально (середні графіки). Вони були згенеровані за допомогою динамічної моделі Weibull (рівняння 15), де залежність b(C) від C виражається степеневою моделлю, $b(C) = kC^n$, як у моделі CWH.

На рис. 1.2 описано дві такі криві виживання, згенеровані для двох гіпотетичних сценаріїв, де концентрація дезінфікуючого засобу, що розсіюється, демонструє нерегулярні коливання. Як і очікувалося, складні профілі коливань концентрації (показані посередині рисунка) не були перешкодою для відповідних числових розв'язків диференціальних рівнянь швидкості, які майже миттєво дали відповідні криві виживання.

Два додаткові приклади використання рівняння 15 для моделювання дезінфекції за допомогою нерегулярно розсіюючого хімічного агента показано на рис. 1.3. Дві згенеровані криві виживання, показані внизу цього рисунка, були згенеровані за допомогою тієї ж моделі швидкості Weibull, за винятком того, що залежність параметра швидкості, b(C), від концентрації визначалася рівнянням 13 (синім) або рівнянням 14 (зеленим). Тут знову ж таки, складність профілю коливань концентрації, показана посередині рисунка, та складність відповідних членів b[C(t)] не була перешкодою для числового розв'язання двох відповідних рівнянь швидкості. І тут також криві виживання були відображені майже миттєво.

Слід зазначити, що зацікавлений читач може згенерувати власні динамічні криві виживання,

використовуючи рівняння 14 як модель залежності від концентрації, використовуючи вільно завантажувану інтерактивну демонстрацію Wolfram https://demonstrations.wolfram.com/MicrobialSurvivalWithDissipatingDisinfectant/.

Показані коливальні профілі розсіювання концентрації на рис. 1.2 та 1.3 були згенеровані таким чином, що концентрація дезінфікуючого засобу не може зростати, якщо її не поповнювати, і що формулювання рівняння 15 гарантує, що коефіцієнт виживання може лише знижуватися або залишатися стабільним, але ніколи не зростати [26], якщо не відбудеться повторне забруднення або ріст може відновитися при дуже низькій залишковій концентрації дезінфікуючого засобу (за винятком вірусів).

Динамічна версія моделі Weibull для виживання мікробів була спочатку розроблена для термічної інактивації та неодноразово перевірялася. Лише пізніше вона була перевірена для дезінфекції води леткими дезінфікуючими засобами [28]. Під «перевіреною» не мається на увазі добра відповідність експериментальним даним виживання, оціненим за статистичними критеріями або успішною інтерполяцією, а те, що модель правильно передбачила експериментальні дані, які не використовувалися при розрахунку її параметрів.

1.8 Альтернативні основні функції розподілу

Хоча гнучку модель Weibull можна розглядати як природний вибір для опису більшості увігнутих висхідних та низхідних напівлогарифмічних кривих виживання, вона не обов'язково має бути унікальною для деяких типів кривих виживання та недостатньою для інших. Наприклад, можна продемонструвати, і це було показано з опублікованими даними про виживання мікробів з

неминучим експериментальним розкидом, що логарифмічний нормальний розподіл працює так само добре, коли застосовується до увігнутих низхідних кривих [32]. Перевага моделі Weibull тут полягає в тому, що при фіксованому коефіцієнті форми, m[C(t)] = константа, лише b[C(t)] слід виражати математично, тоді як при використанні логарифмічно нормального розподілу слід визначати як його середнє логарифмічне значення, так і стандартне відхилення та виражати як функції концентрації дезінфікуючого засобу та часу. Те саме можна сказати про численні інші унімодальні функції розподілу, які можна розглянути [33]. Це не проблема, коли експериментальні напівлогарифмічні криві виживання увігнуті вгору, і в цьому випадку логарифмічний нормальний розподіл навіть не можна розглядати (але експоненціальну функцію розподілу можна). Або, якщо має місце зміна асиметрії, логарифмічний бета-розподіл може бути особливо придатною моделлю.

Існує два типи моделей виживання, для яких функція розподілу Weibull та будь-яка з її альтернативних функцій розподілу явно не є корисною моделлю. Одна з них полягає в тому, що наприкінці помітного плоского «плеча» (часу затримки) коефіцієнт виживання падає настільки круто, що крива виживання нагадує ступінчасту функцію [25]. Інша — це коли падіння за помітним плечем є чітко логарифмічним [34]. Теоретично, останнє можна спостерігати при низьких концентраціях дезінфікуючого засобу, тоді як перше — при високих концентраціях, як схематично показано на рис. 1.4. Він демонструє, що в такому випадку плече стає коротшим зі збільшенням концентрації дезінфікуючого засобу.

Ці два типи кривих виживання та переходи між ними можна описати функцією розподілу Fermi [25], яку

можна записати у вигляді

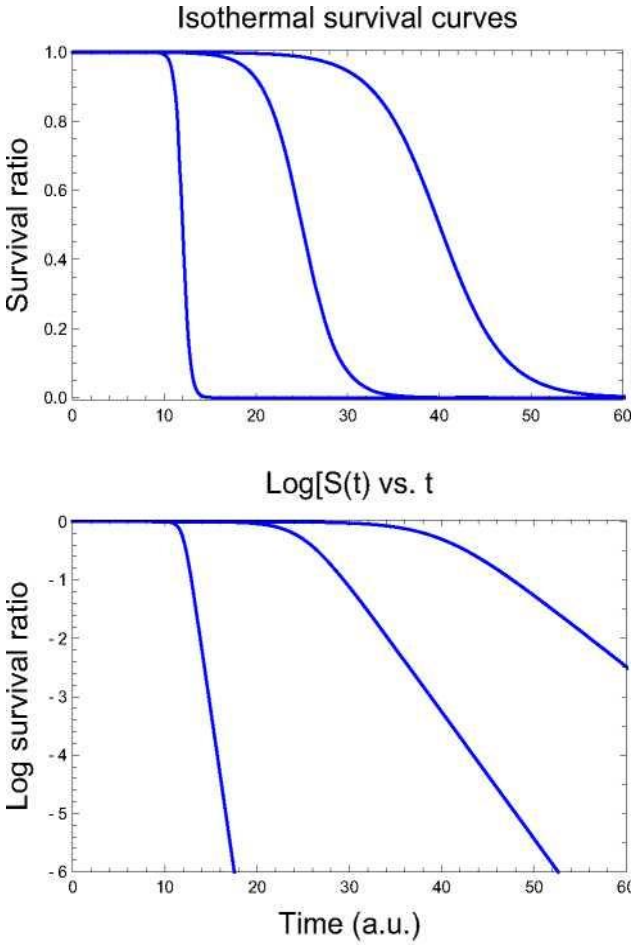

Рис. 1.4 Ізотермічні криві виживання, згенеровані з використанням розподілу Fermi як моделі. Зверху - за лінійними координатами, а знизу - за напівлогарифмічними координатами.

$$S(t) = \frac{1}{1 + \mathrm{Exp}\left[\frac{t - t_c(C)}{k_F(C)}\right]} \text{ or } \mathrm{Log}_{10}[S(t)]$$

$$= -\mathrm{Log}_{10}\left[1 + Exp\left[\frac{t - t_c(C)}{k_F(C)}\right]\right] \qquad (16)$$

де $t_c(C)$ позначає тривалість плеча, що залежить від концентрації, а $k_F(C)$ - нахил лінійної напівлогарифмічної кривої виживання, що знаходиться далеко за його межами. Згідно з цією моделлю, коли $k_F(C) << t - t_c$, крива стає практично нерозрізненою від ступінчастої функції, тобто при $t < t_c$, $S(t) \sim 0$, а при $t > t_c$, $S(t) \sim 0$. Однак S(t) або $\mathrm{Log}_{10}[S(t)]$, як визначено рівнянням 16, є неперервною функцією, яка має дійсні похідні.

1.9 Динамічна версія моделі розподілу Fermi

Уявлення про те, що миттєва швидкість інактивації (або виживання) є статичною швидкістю при миттєвій концентрації в момент часу, що відповідає миттєвому коефіцієнту виживання, можна поширити на модель Fermi, а також на будь-яку іншу динамічну модель виживання.

У випадку моделі Fermi рівняння швидкості можна записати у вигляді

$$\frac{d\mathrm{Log}_{10}[S(t)]}{dt} = -\frac{\mathrm{Exp}\left[\frac{t^*(t) - t_c(t)}{k_F[t]}\right]}{\left(1 + \mathrm{Exp}\left[\frac{t^*(t) - t_c(t)}{k_F[t]}\right]\right)k(t)Ln[10]} \qquad (17)$$

де час, що відповідає миттєвому коефіцієнту виживання, t*(t), дорівнює

$$t^*(t) = t_c(t) + k_F(t)Ln\left[10^{-\mathrm{Log}_{10}[S(t)]} - 1\right] \qquad (18)$$

Знову ж таки, незважаючи на свій громіздкий

вигляд, рівняння 17 є ЗДР і може бути розв'язане чисельно для майже кожного можливого реалістичного профілю C(t). Це рівняння швидкості відрізняється від моделі Weibull, описаної рівнянням 15, не лише базовим рівнянням моделі, яке містить два залежні від часу члени, $t_c(t) = tc[C(t)]$ та $k_F[(t) = [C(t)]$, замість одного, b[C(t)], де m = константа, але й граничною умовою. На відміну від розподілу Weibull (або логнормального) з областю визначення від 0 до ∞, область визначення розподілу Fermi знаходиться від - ∞ до ∞, і, отже, при t = 0 $Log_{10}[S(t)] < 0$ за визначенням. Цю невідповідність усувають, призначаючи граничну умову не як $Log_{10}[S(0)] = 0$, а дуже мале статичне значення $Log_{10}[S(0)]$ при початковій концентрації дезінфікуючого засобу.

Два приклади використання моделі Fermi для генерації кривих виживання за нерівномірно розсіюваних концентрацій дезінфікуючого засобу наведено на рис. 1.5. Показані криві виживання були згенеровані для гіпотетичного дезінфікуючого засобу, два параметри моделі Fermi якого, t_c та k_F у рівнянні 16, експоненціально зменшуються з його концентрацією (верхній край рисунка). Самі криві виживання були розраховані та побудовані практично миттєво, як і очікувалося. Тобто, складність двох рівнянь швидкості не була перешкодою для їх числових рішень.

1.10 Поповнення дезінфікуючого засобу та врахування часу його диспергування

Схеми виживання, представлені на рис. 1.1-1.5, а також у більшості, якщо не у всіх цитованих публікаціях, описують результат гіпотетичної обробки дезінфікуючими засобами, що розсіюються, з відомою початковою концентрацією, тобто при t = 0, $C(t) = C_0$. Однак

запропоновані моделі швидкості також застосовні до процесів, де дезінфікуючий засіб поповнюється (рис. 1.6).

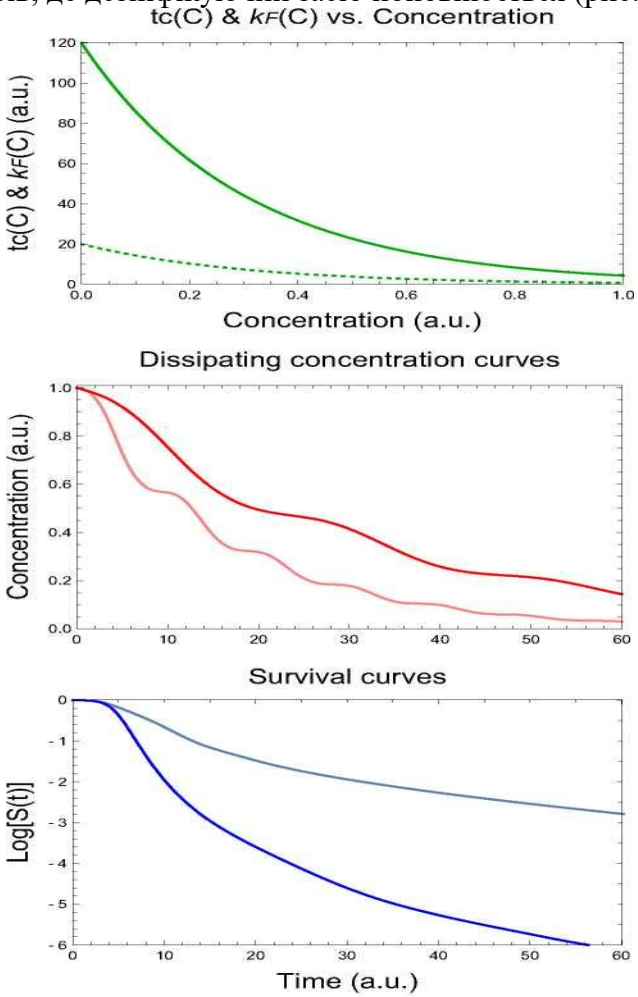

Рис. 1.5 Змодельовані криві виживання під час дезінфекції нерівномірно розсіюючим хімічним агентом, згенерованим за допомогою динамічної версії функції розподілу Fermi (рівняння 17 та 18), параметри якої $t_c(C)$ (суцільна зелена крива) та $k_F(C)$ (пунктирна зелена крива) експоненціально падають. Зверху - залежності $t_c(C)$ та $k_F(C)$ від C, посередині - два профілі нерівномірно розсіюючих

концентрацій, а знизу - дві відповідні криві виживання. Складність диференціальних рівнянь швидкості не є перешкодою для їх числового розв'язання.

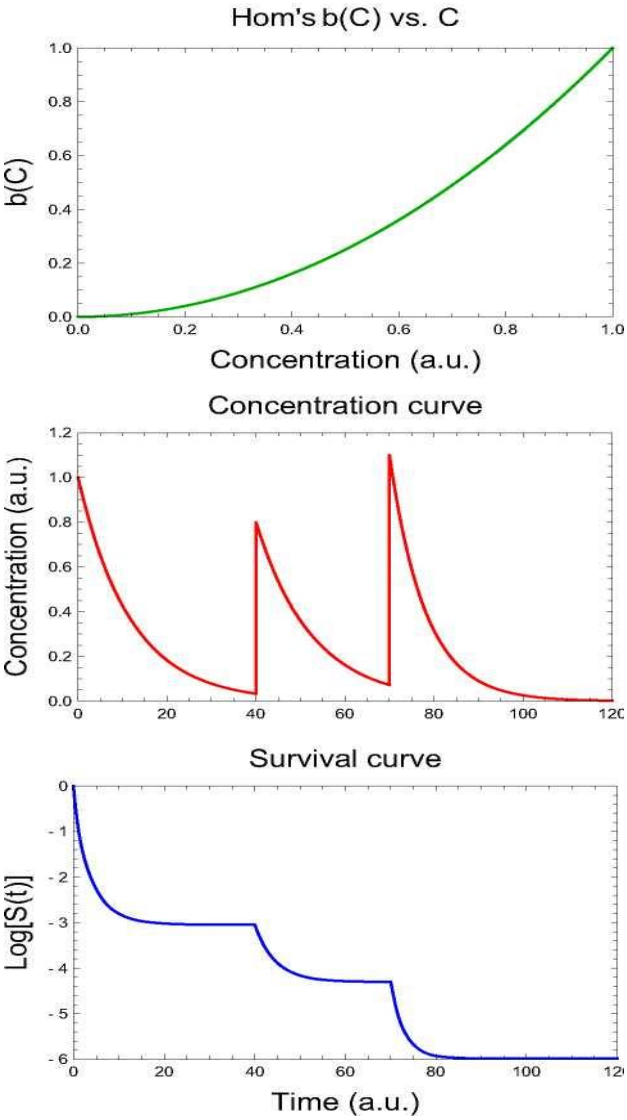

Рис. 1.6 Змодельовані криві виживання, згенеровані

динамічною версією моделі CWH-Weibull для двічі поповненого дезінфікуючого засобу. Оператор "Якщо" в рівнянні швидкості моделі не є перешкодою для її числового розв'язання.

Тут описано ідеалізований гіпотетичний сценарій, де дезінфікуючий засіб поповнюється двічі. Припущення полягають у тому, що поповнення відбувається миттєво, а потім відбувається експоненціальне розсіювання дезінфікуючого засобу. Математичний вираз, який описує показаний профіль концентрації, має два оператори «Якщо», а динамічна модель виживання Weibull (рівняння 15) має b(C), описану степеневим членом, як у моделі CWH. Як і раніше, складність результуючого диференціального рівняння швидкості не була перешкодою для його числового розв'язання за допомогою Mathematica®, і відповідний графік кривої виживання був відображений майже миттєво. Більш реалістичний сценарій полягає в тому, що як початкове застосування дезінфікуючого засобу, так і його поповнення не є миттєвими, а його розсіювання є нерегулярним, а не ідеально експоненціальним, як показано на рис. 1.7. Вираз, який використовувався для створення показаного профілю, мав лише один оператор «Якщо», а модель коефіцієнта виживання знову була вейбуллівською з b(C), описаною степеневим членом, як у моделі CWH. Знову ж таки, складність результуючого диференціального рівняння швидкості не стала перешкодою для його числового розв'язання, і, як і раніше, крива виживання була відображена миттєво для всіх практичних цілей.

На рис. 1.6 та 1.7 чітко показано, що наявне на даний момент математичне програмне забезпечення пропонує зручний інструмент для створення та вивчення реалістичних схем дезінфекції, які включають етапи поповнення та розсіювання дезінфекційного засобу. За допомогою програми, такої як та, що використовується для

створення цих двох рисунків, можна порівняти різні моделі виживання та режими застосування за дуже короткий час.

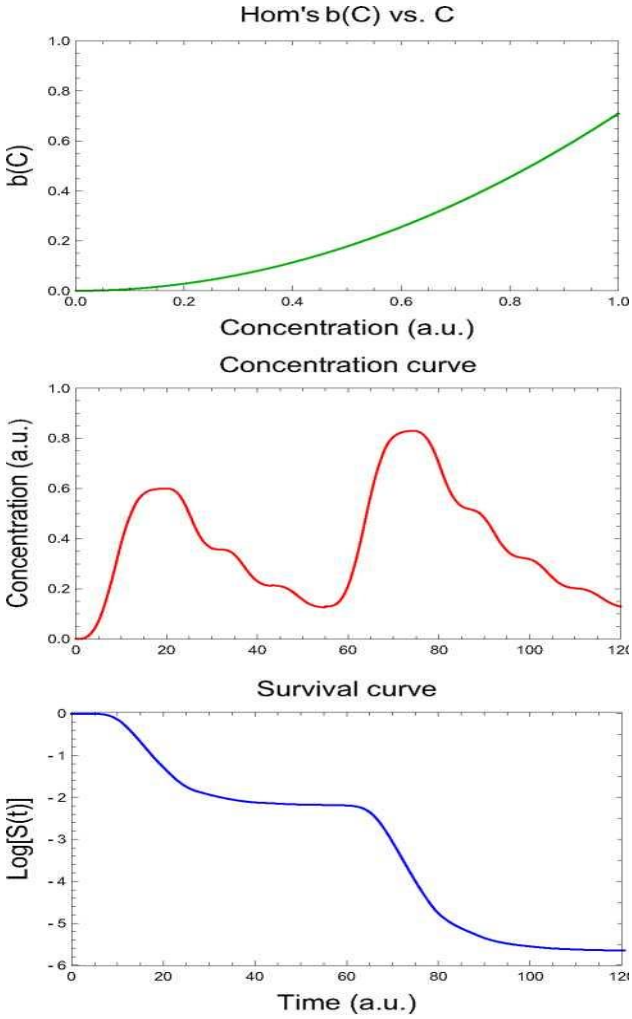

Рис. 1.7 Змодельована крива виживання, згенерована динамічною версією моделі CWH-Weibull для поповненого

дезінфікуючого засобу, дисперсія якого в оброблюваному середовищі займає значний час. Складність диференціальних рівнянь швидкості (яка також включає оператор «Якщо») не є перешкодою для їх числового розв'язання.

Також можна швидко дослідити вплив варіацій або невизначеностей у параметрах виживання цільового мікроба, властивостях дезінфекційного засобу та профілі концентрації, а також оцінити їхній вплив на ефективність обробки. Такі симуляції допоможуть у виборі дезінфекційного засобу, його початкової концентрації та способу його застосування, що може включати час його поповнення.

1.11 Заключні зауваження

Ця робота зосереджена на математичних властивостях традиційних кінетичних моделей хімічної дезінфекції та варіантах їх заміни при дослідженні динамічної дезінфекції за допомогою розсіюючих/летких дезінфекційних засобів. Тому не було докладено жодних зусиль для порівняння ефективності та доцільності різних дезінфекційних засобів або відповідності різних кінетичних моделей експериментальним даним. Основні висновки роботи наступні.

Статичну версію моделі Chick-Watson-Hom можна розглядати як кумулятивну (CDF) форму розподілу інактивації-часу цільового мікроба. Показник ступеня m у рівнянні цієї моделі є коефіцієнтом форми розподілу, а параметр швидкості, $b(C) = kC$ або kC^n, представляє його масштабний коефіцієнт.

Незважаючи на підтвердження опублікованих експериментальних даних, універсальність степеневого співвідношення між параметром швидкості та концентрацією дезінфікуючого засобу не можна вважати само собою зрозумілою. Принаймні теоретично, його

можна замінити іншими виразами, і пропонуються дві альтернативи та їх обґрунтування.

Існує математична проблема з опублікованою динамічною та статичною версіями моделі CWH, яку можна усунути, замінивши її динамічною версією моделі Weibull. Результатом є звичайне диференціальне рівняння (ЗДР), яке можна розв'язати чисельно для майже кожного можливого реалістичного профілю концентрації.

Подібні моделі дезінфекції можна побудувати на основі альтернативних базових функцій розподілу. Прикладом є розподіл Фермі, який може враховувати криві виживання, що нагадують ступінчасту функцію та/або мають значний час затримки з логарифмічно-лінійним продовженням.

Той самий підхід до моделювання можна використовувати для режиму поповнення дезінфікуючого засобу та для врахування того, що відбувається, поки він не досягне своєї початкової концентрації. Незважаючи на складність результуючих рівнянь швидкості, вони також є звичайними диференціальними рівняннями (ЗДР) і можуть бути швидко розв'язані чисельно.

Література

1. Ganguly, P., Byrne, C., Breen, A., & Pilali, S. C. (2018). Antimicrobial activity of photocatalysts: Fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances. *Applied Catalysis B: Environmental, 225*, 51–75. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.018
2. Gyurek, L. L., & Finch, G. R. (1998). Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering, 124*, 783–793.

https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:9(783)

3. Luukkonen, T., Heynink, T., Rämo, J., & Lassi, U. (2015). Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Research, 85*, 275–285. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.040
4. Santoro, D., Gehr, R., Bartrand, T. A., Liberti, L., Notarnicola, M., Dell'Erba, A., Falsanisi, D., & Haas, C. N. (2007). Wastewater disinfection by peracetic acid: Assessment of models for tracking residual measurements and inactivation. *Water Environment Research, 79*, 775–787. https://doi.org/10.2175/106143007X175870
5. Younas, H., Qazi, I. A., Hashmi, I., Awan, M. A., Mahmood, A., & Qayyum, H. A. (2014). Wastewater disinfection by peracetic acid: Assessment of models for tracking residual measurements and inactivation. *Environmental Science and Pollution Research, 21*, 740–752. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1951-x
6. Chick, H. (1908). An investigation of the laws of disinfection. *Epidemiology & Infection, 8*, 92–152.
7. Watson, H. E. (1908). A note on variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Epidemiology & Infection, 8*, 536–542.
8. Hom, L. W. (1972). Kinetics of chlorine disinfection of an ecosystem. *Journal of the Sanitary Engineering Division, 98*, 183–194.
9. Armstrong, A. M., Sobsey, M. D., & Cassanova, L. M. (2017). Disinfection of bacteriophage MS2 by copper in

water. *Applied Microbiology and Biotechnology, 101*, 6891–6897. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8438-4

10. Chang, C. W., Huo, X., & Lin, T. F. (2018). Exposure of *Microcystis aeruginosa* to hydrogen peroxide and titanium dioxide under visible light conditions: Modeling the impact of hydrogen peroxide and hydroxyl radical on cell rupture and microcystin degradation. *Water Research, 141*, 217–226. https://doi.org/ 10.1016/j.watres.2018.07.047
11. Chong, M. N., Jin, B., & Saint, C. P. (2011). Bacterial inactivation kinetics of a photo-disinfection system using novel titania-impregnated kaolinite photocatalyst. *Chemical Engineering Journal, 171*, 16–23. https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.03.058
12. Falsanisi, D., Gehr, R., Santoro, D., Dell'Erba, A., Notarnicola, M., & Liberti, L. (2006). Kinetics of peracetic acid demand and its implications on disinfection of wastewaters. *Water Quality Research Journal of Canada, 41*, 398–409. https://doi.org/ 10.2166/wqrj.2006.043
13. Haas, C. N., & Joffe, J. (1994). Disinfection under dynamic conditions: Modification of Hom's model for decay. *Environmental Science & Technology, 28*, 1361–1366. https://doi.org/10.1021/es00057a024
14. Haas, C. N., & Kara, S. B. (1984). Kinetics of microbial inactivation by chlorine: I. Review of results in demand-free systems. *Water Research, 18*, 1443–1449. https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90033-9
15. Ibarguen-Mondragon, E., Revelo-Romo, D., Hidalgo, A., Garcia, H., & Galeano, L. A. (2020). Mathematical modelling of MS2 virus inactivation by Al/Fe-PILC-

activated catalytic wet peroxide oxidation (CWPO). *Environmental Science and Pollution Research, 27*, 19836–19844. https://doi.org/ 10.1007/s11356-020-08269-2

16. Jessen, A., Randall, A., Reinhart, D., & Daly, L. (2008). Effectiveness of ferrate as a disinfectant for ballast water. *Water Environment Research, 80*, 561–569. https://doi.org/10.2175/106143008X304767
17. John, D. E., Haas, C. N., Nwachuku, N., & Gerba, C. P. (2005). Chlorine and ozone disinfection of *Encephalitozoon intestinalis* spores. *Water Research, 39*, 2369–2375. https://doi.org/ 10.1016/j.watres.2005.01.030
18. Kampf, G. (2018). Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *Journal of Hospital Infection, 98*, 331–338. https://doi.org/ 10.1016/j.jhin.2017.08.025
19. Lambert, R. J. W., & Johnston, M. D. (2000). Disinfection kinetics: A new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *Journal of Applied Microbiology, 88*, 907–913. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01084.x
20. Mounaouer, B., & Abdennaceur, H. (2016). Modeling and kinetic characterization of wastewater disinfection using chlorine and UV irradiation. *Environmental Science and Pollution Research, 23*, 19861–19875. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7204-3
21. Rattanakul, S., Oguma, K., & Takizawa, S. (2015). Sequential and simultaneous applications of UV and chlorine for adenovirus inactivation. *Food and Environmental Virology, 7*, 295–304. https://doi.org/ 10.1007/s12560-015-9196-3

22. Rossi, R., Antonelli, M., Mezzanotte, V., & Nurizzo, C. (2007). Peracetic acid disinfection: A feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environment Research, 79*, 341–350. https://doi.org/10.2175/106143007X175861
23. Schijven, J., Teunis, P., Suylen, T., Ketelaars, H., Hornstra, L., & Rutjes, S. (2019). QMRA of adenovirus in drinking water at a drinking water treatment plant using UV and chlorine dioxide disinfection. *Water Research, 158*, 34–45. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.080
24. Peleg, M. (2021). Microbial dose–response curves and disinfection efficacy models revisited. *Food Engineering Reviews, 13*(2), 305–321. https://doi.org/10.1007/s12393-020-09249-610.1007/s12393-020-09249-6
25. Peleg, M. (1996). Evaluation of the Fermi equation as a model of dose–response curves. *Applied Microbiology and Biotechnology, 46*, 303–306. https://doi.org/10.1007/BF00165800
26. Peleg, M. (2006). *Advanced quantitative microbiology for food and biosystems: Models for predicting growth and inactivation.* CRC Press.
27. Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38*, 353–380. https://doi.org/10.1080/10408699891274219
28. Corradini, M. G., & Peleg, M. (2003). A model of microbial survival curves in water treated with a volatile disinfectant. *Journal of Applied Microbiology,*

95, 1268–1276. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01963.x

29. Peleg, M. (2021). Modeling the dynamic kinetics of microbial disinfection with dissipating chemical agents: A theoretical investigation. *Applied Microbiology and Biotechnology, 105*, 539–549. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11042-8
30. Van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology, 74*, 139–159. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5
31. Peleg, M., & Penchina, C. M. (2000). Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42*, 159–172. https://doi.org/10.1080/10408690091189269
32. Aragão, G. M. F., Corradini, M. G., Normand, M. D., & Peleg, M. (2007). Evaluation of the Weibull and log-normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non-isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology, 119*, 243–257. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.026
33. Walck, C. (2007). *Handbook on statistical distribution for experimentalists.* University of Stockholm. http://www.stat.rice.edu/~dobelman/textfiles/DistributionsHandbook.pdf
34. Najm, I. (2006). An alternative interpretation of disinfection kinetics. *Journal of the American Water*

Works Association, 98, 93–101. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2006.tb07664.x

РОЗДІЛ 2
БАКТЕРИЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

2.1 Загальна характеристика

Ретроспективний аналіз [1] досліджень ефективності діоксиду хлору (ДХ) як антимікробного агента показав наступне.

У 1940-ті роки з'явилися дані, що свідчили про ефективність ДХ як бактерицидного засобу. В одній з перших робіт [2] показано, що ДХ ефективний щодо *Escherichia coli* та *Bacillus anthracoides* у дозах 0,6 та 1 мг/л відповідно навіть при високій каламутності (у присутності суспензії глини). Згідно з іншими даними, збільшення вмісту органіки в оброблюваній воді зменшувало ефективність ДХ [2]. У роботі [3] встановлено, що ДХ у дозі 0,1 мг/л інгібував ріст *E. coli* та інших неспецифічних природних бактеріальних популяцій. Дещо пізніше повідомлено [5], що ДХ в дозі 0,1 мг/л ефективний щодо *Eberthella typhosa, Shigella dysenteriea* та *Salmonella paratyphi B*. При аналогічних pH і температурі дещо більша кількість ДХ була потрібна для інактивації *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococus*.

Інше раннє дослідження [6] показало високу ефективність ДХ порівняно з хлором щодо *S. typhosa* і *S. paratyphi*.

У 1960-х роках було суттєво оптимізовано методики

досліджень [7, 8], що дозволило одержувати «чистіші» розчини ДХ і більш точно дозувати їх у воду. У ці роки апробований спектрофотометрический метод визначення доз і залишкових концентрацій ДХ, розрахована швидкість інактивації ДХ, яка виявилася вищою у порівнянні із хлором [9, 10].

У 70-80-ті роки продовження досліджень ДХ інтенсифікувалося через констатацію взаємозв'язку хлорування питної води з утворенням тригалометанів. Результати досліджень [11 - 15] дозволили встановити, що ДХ – ефективний бактерицидний засіб при звичайних pH питної води (6,0-8,5), має високу швидкість інактивації бактерій і перевершує хлор у тих же дозах.

Пілотні та повномасштабні дослідження щодо знезараження питної води та стічних вод підтвердили ефективність ДХ як бактерициду [16 - 20]. Зокрема, це стосувалося води, яка використовується у технологічних процесах харчової промисловості [21], у тому числі при контамінації бактеріями роду *Salmonellae* [22].

У першій дисертаційній роботі [2], виконаній у СРСР та присвяченій застосуванню діоксиду (двоокису) хлору для знезараження води, встановлено наступне.

1. Двоокис хлору в концентрації 5 мг/л протягом однієї хвилини виявляє стійкий бактерицидний ефект щодо однодобової культури *E. coli* при концентрації 1 млн. мікробних тіл/мл.

2. Двоокис хлору у дозі 0,2-0,4 мг/л знижує рівень зараження *E. coli* дистильованої води від 500 000-900 000 мікробних тіл/мл до одиниць/мл, а при підвищенні дози до 0,6 мг/л забезпечує колі-титр понад 300/л. При порівнянні дії двоокису хлору та хлорного вапна автор зазначила, що дезінфікуюча дія двоокису хлору меншою мірою залежить від тривалості контакту, ніж дія хлорного вапна.

3. Якщо кінцевий бактерицидний ефект при 30-

хвилинній дії двоокису хлору і хлорного вапна майже однаковий, залишаючись все ж таки дещо більшим для двоокису хлору, то при 5-хвилинному контакті виявляється значно більший бактерицидний ефект двоокису хлору.

4. З дослідів з хлорування неосвітлених вод автор робить висновок, що наявність великої кількості завислих речовин (від 0,3 до 1,5 г глини на 1 л води) зменшує бактерицидну дію двоокису хлору, проте підвищення дози від 0,5 до 1 мг/л забезпечує бактерицидну дію навіть при такій великій каламутності.

5. Дані експерименту дозволяють констатувати, що відповідно до зниження pH зменшується величина окислювально-відновного потенціалу (En) двоокису хлору і помічається одночасне зменшення бактерицидного ефекту. Значне зниження En при pH = 9,0 супроводжується також значним зменшенням бактерицидності двоокису хлору.

6. При розгляді впливу органічних речовин на ступінь бактеріцидного ефекту двоокису хлору слід зазначити, що велика кількість органічних речовин суттєво знижує її дезінфікуючу дію. Це, очевидно, пояснюється активною взаємодією двоокису хлору з органічними речовинами.

7. Висока карбонатна жорсткість води негативно впливає на дезінфікуючу дію двоокису хлору. Автор пояснює це, ґрунтуючись на літературних даних та на результатах власних дослідів, реакцією двоокису хлору з карбонатами з утворенням хлоритів та хлоратів. Це підтверджується даними перевірки ефективності дії двоокису хлору на неосвітлену воду відкритих водойм (річки та ставка): наявність органічних речовин у воді та підвищена карбонатна жорсткість збільшують бактерицидну дозу двоокису хлору до 4-5 мг/л.

8. Двоокис хлору в концентрації 0,5-1 мг/л не надає воді, що містить феноли у розведенні 1 : 1 млн, хлорфенольних запахів, тоді як відомо, що вміст фенолу навіть у розведенні 1 : 200 млн. може з'явитися причиною появи хлорфенольних запахів при обробці води хлором.

Автор посилається на роботи Rudolf E. Tompson, опубліковані у журналі Water and Servage у вересні 1944 р. й у січні 1945 р., а також роботу A. E. Bery, опубліковану в тому ж журналі в лютому 1945 р., які висвітлюють результати застосування двоокису хлору на ряді водопровідних станцій для руйнування речовин, що надають воді неприємних запахів. Це особливо важливо для водопроводів, що мають джерелом водопостачання поверхневі водойми, забруднені промисловими стічними водами або водоростями.

На підставі отриманих даних автор дійшла висновку, що «двоокис хлору займе належне місце у практиці дезінфекції води, зокрема, для запобігання виникненню неприємних запахів у воді, що обробляється».

Результати проведених 1949 р. експериментів щодо оцінки ДХ [5] послужили розвитком ідей високої ефективності цього реагенту як бактерициду.

1. ДХ у концентрації менше 0,1 мг/л має бактерицидний ефект щодо звичайної патогенної мікрофлори питної води: *E. typhosa, S. dysenteriae* та *S. paratyphi B* при температурі від 5 ° до 20 °С, pH вище 7,0 та експозиції 5 хв. Фактично можливе використання менших концентрацій, але слід враховувати значення каламутності вихідної води. *P. aeruginosa* та *S. aureus* є більш стійкими формами мікроорганізмів.

2. Як і при знезараженні хлором, санітарно-показовий мікроорганізм *E. coli* показав дещо більшу резистентність до ДХ, ніж патогенні мікроорганізми.

3. Встановлено вплив pH на бактерицидний ефект

ДХ. Для всіх вивчених мікроорганізмів потрібні тим менші дози ДХ, чим більше pH (на відміну від хлору). Так, якщо при pH=7,0 і T=20 °C дози ДХ та хлору, необхідні для інактивації *E. coli ma S. aerogenes*, становили 0,1 та 0,04 мг/л відповідно, то при pH=9,5 і T=5 °C 0,05 і 0,03 мг/л ДХ для інактивації *E. coli і S. aerogenes* і >0,5 мг/л хлору для обох мікроорганізмів.

4. Зазвичай бактерицидний ефект ДХ дещо зменшується зі зниженням температури аналогічно до хлору.

Аналіз експериментальних даних показує, що при однакових умовах знезараження води ДХ відсоток життєздатних *E. coli* був завжди вище відсотка *S. typhi* і *S. paratyphi* B. Отже, кишкова паличка у всіх випадках виявляла більшу резистентність, ніж патогенні бактерії - збудники кишкових захворювань.

Показано, що стабільність залишкових концентрацій ДХ у воді після фільтрів, тобто у тій воді, яка після знезараження надходить у мережу, значно перевищує стабільність залишкового хлору та дещо вище стабільності хлораміну.

Висока стабільність залишкових концентрації ДХ, як дезінфікуючої речовини, може бути віднесена до його позитивних властивостей.

У роботі [23] констатовано взаємозв'язок між бактерицидними властивостями ДХ та її окислювально-відновним потенціалом: збільшення та зменшення бактерицидних властивостей ДХ при різному значенні pH середовища відбувається при паралельному збільшенні або зменшенні окислювально-відновного потенціалу цієї сполуки.

Розуміння особливостей бактерицидного ефекту ДХ нерозривно пов'язане з аналізом механізму дії цього дезінфектанту на клітинному та молекулярному рівні.

У роботі [24] (1967) висловлено припущення, що інактивація бактерій ДХ обумовлена пригніченням синтезу білка. Автори запропонували математичну модель хімічної дезінфекції бактеріальних популяцій з урахуванням теорії хімічних реакцій. Це стало можливим після реалізації низки методичних прийомів: удосконалення процедури обліку результатів, застосування очищених від органіки розчинів, кількісного спектрофотометричного визначення низьких доз дезінфікуючого засобу.

Ця робота була логічним продовженням попередніх досліджень цих авторів [7], які констатували набагато меншу експозицію інактивації бактерій ДХ, ніж точка перелому (30 хвилин), яка зазвичай використовується у вивченні ефективності дезінфекції.

Автори прагнули пояснити ефекти включення ДХ до кінетичної моделі дезінфекції. Це мало на увазі встановлення порядку реакції щодо початкової концентрації клітин *E. coli* з з'ясуванням питання, чи є бактерицидними проміжні ланки реакції або їх сукупність.

Пізніше (1980) повідомлено [25], що інгібування синтезу білка не може бути первинною метою, тому що не торкається ферменту дегідрогенази або дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). У цій роботі для з'ясування механізму дії на бактерії вивчали дію ДХ на дегідрогенази, синтез білка та ДНК у *E. coli* та двох штамів *Haemophilus influenzae*. Експерименти проводили в спеціально сконструйованій установці, яка дозволяла проводити відбір проб для аналізу кількості бактерій, що вижили, в різні проміжки часу (5-1800 сек.) після додавання дезінфектанту. З клітин *H. influenzae*, що зазнали дії ДХ, екстрагували ДНК, і визначали здатність ДНК викликати трансформацію компетентних клітин; крім того, визначали трансформаційну активність ДНК, обробленої

ДХ після часткової екстракції з клітин. Показано, що загальна дегідрогеназна активність *E. coli* повністю пригнічувалася через 5 сек. інкубації бактерій у присутності ДХ, коли більшість клітин ще зберігало життєздатність. ДХ частково пригнічував синтез білка у бактерій, причому ступінь пригнічення була пропорційна початковій концентрації дезінфектанту. Додавання глутатіону не зменшувало інгібуючу дію ДХ на життєздатність клітин, загальну дегідрогеназну активність та синтез білка. При впливі ДХ на цілі клітини *H. influenzae* трансформуюча активність ДНК не змінювалася. Частково очищена ДНК була стійка до ДХ протягом кількох хвилин. Трансформуюча активність очищеної ДНК мало змінювалася навіть після 5 хв інкубації у присутності високої концентрації ДХ (20 мг/л). Автори дійшли висновку, що бактерицидна дія ДХ є результатом інгібування будь яких інших структур, крім досліджених у цій роботі, тобто дегідрогенази, ДНК та білоксинтезуючої системи.

Відповідно до [26] вільні жирні кислоти реагують з ДХ. Повідомлялося [27], що ДХ переривав зовнішню мембранну провідність, що призводило до швидкої втрати іонів калію. З погляду авторів, одночасне інгібування клітинного дихання обумовлено неспецифічною зміною трансмембранного іонного градієнта шляхом деструктуризації зовнішніх мембранних білків та ліпідів із збільшенням проникності мембрани бактеріальних клітин.

У роботі [28] автори спробували пояснити відмінність механізмів бактерицидного ефекту ДХ та хлору. Після розчинення у воді ДХ на 100 % існує у молекулярному стані, завдяки чому безперешкодно впливає на мембрану бактеріальної клітини з подальшим проникненням безпосередньо в її структуру. Внаслідок цього проникність мембрани підвищується, що обумовлює

зміну внутрішньоклітинного осмотичного тиску. Крім цього має місце пригнічення трансмембранних ферментних груп, головним чином, фосфатрансферази. В процесі інактивації бактерій ДХ, вірогідно, впливає на ферментний ланцюг глюкозооксидази, зокрема на меркаптогрупи (-SH) оксидази, окислюючи їх до -S - S - груп, що призводить до втрати активності ензимів.

На відміну від ДХ, хлор у вигляді іонів OCl надає мембранам бактеріальних клітин негативний заряд. Це пояснює, чому бактерицидний ефект хлору нижче, ніж ДХ, і узгоджується з вищим окислювально-відновним потенціалом ДХ порівняно з хлором.

Автори [28] висловлювали спірну думку стосовно первинної мішені для ДХ (периферичні структури чи нуклеїнові кислоти) і припущення щодо участі в інактивації обох механізмів.

У роботі [12] вивчено резистентність бактерій до інактивації дезінфікуючими агентами, яка обумовлена впливом навколишнього середовища на ріст бактеріальних популяцій. Культури *E. coli* термостатували у звичайних умовах і в хемостаті, при цьому параметри росту (субстрат, коефіцієнт росту, температура та щільність клітин) були різні. Для інактивації культур використовували ДХ у дозі 0,75 мг/л. Результати свідчать, що популяції, інкубовані за умов, які максимально ідентичні водному природному середовищу, більш стійкі, ніж вирощені за лабораторних умов, що зазвичай використовуються.

Ця робота [12] є надзвичайно важливою як методологічно цінна ланка в підході до оцінки системи «довкілля – мікроорганізм – дезінфектант», тому її доцільно прокоментувати більш докладно.

Доречно відзначити, що бактерії, які є стійкими до інактивації хімічними дезінфектантами, широко поширені

у різноманітних водних середовищах, включаючи ємності питної води та системи розподілу [29]. Найчастіше резистентність мікроорганізмів пов'язують з асоціацією з суспензією або біоплівками, враховуючи детермінований геномом мікроорганізму захист мембрани, капсули або спори, а також потребу (наприклад, хлорпоглинання) в дезінфікуючому засобі. При цьому упускається ще один важливий фактор – резистентність, обумовлена екологічними змінами у фенотипі, який формується у процесі генерації мікроорганізмів перед дезінфекцією.

Ці фенотипічні зміни можуть бути істотними, особливо протягом лабораторної оцінки дезінфікуючого засобу. Попередньо проведеними дослідженнями [17 - 19] авторів даної роботи [12] показано, наприклад, що фекальні *E. coli*, інкубовані на поживному бульйоні, більш чутливі до хлору та ДХ, ніж аналогічні бактерії, висіяні зі стічної води.

Результати порівняння ефективності інактивації фекальних коліформних бактерій із фільтрату вторинно-очищених стічних вод та вирощених у хемостаті *E. coli* показують, що у першому випадку ця ефективність суттєво нижча [20].

Інші дані [30, 31] підтверджують, що попередні умови росту надають принципово важливий вплив на чутливість мікроорганізму до різних дезінфікуючих засобів: *P. aeruginosa* і атипові мікобактерії здатні розмножуватися в деіонізованій воді, що обумовлює їх більш високу резистентність до ДХ у порівнянні із тими мікроорганізмами, які культивувались на агарі. Аналогічні дані отримані у роботі [32], коли мікроорганізми, ізольовані з води плавального басейну, були набагато резистентніші до йоду, ніж їх лабораторні «двійники», вирощені на агарі.

Завдання цього дослідження [12] полягало в

констатації та поясненні відмінностей у чутливості мікроорганізмів, обумовлених впливом попередніх умов їх розмноження у навколишньому середовищі. Акцент було зроблено на зіставленні тих екологічних параметрів, які зазвичай використовуються у лабораторних умовах, та загальними умовами навколишнього водного середовища. Робоча гіпотеза полягала у констатації важливого впливу відмінностей у температурі та коефіцієнті росту на чутливість мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів. Тому автори порівняли чутливість до дезінфекції культур, вирощених при субмаксимальних коефіцієнтах росту та субоптимальних температурах із звичайними умовами інкубування, за яких досягається максимальний коефіцієнт росту (μ_{max}).

Результати дозволили встановити, що на чутливість *E. coli* до ДХ впливають чотири екологічні параметри росту: 1) характер живильного середовища, 2) ступінь поживного обмеження, 3) температура, 4) щільність культури.

Взаємозв'язок між рівнем росту та чутливістю став очевидним у результаті інших експериментів у цій лабораторії [12]. Встановлено, що для клітин *E. coli*, вирощених у термостаті на поживному бульйоні при 25 °C або 37 °C, чутливість до ДХ зростає з підвищенням інтенсивності росту. При цьому активні транспортні системи поживного субстрату або генетичний матеріал бактеріальних клітин більш схильні до деструкції в зростаючих популяціях, ніж у тих, що вже виросли. Раніше повідомлялося про кореляцію між збільшеною кількістю копіювання ДНК протягом швидкого зростання зі збільшеною чутливістю до ультрафіолетового випромінювання [33].

Ефект температури росту надавав більшого впливу на чутливість порівняно з інтенсивністю зростання.

Найбільш чутливими виявилися популяції, що виросли за більш високих температур зростання. Якщо припустити, що проникність зовнішньої мембрани до невеликих молекул повинна частково залежати від текучості подвійного шару ліпіду, такі результати цілком зрозумілі, якщо врахувати дані, встановлені раніше [7]. У роботі з атиповими мікобактеріями висловлено припущення, що щільні шари ліпіду є протектором проти проникнення хлору [31].

Отримані дані показують, що популяції, вирощені за умов, близьких до навколишнього середовища, є більш стійкими до дезінфікуючих засобів, ніж вирощені за стандартних лабораторних умов. У зв'язку з цим лабораторна оцінка на основі звичайних умов культивування (наприклад, при 37 °C) повинна поєднуватися з альтернативними методами, які представлені в цій роботі [12].

Дана робота становить певний інтерес у контексті оцінки стійкості бактеріальних субпопуляцій до дезінфекції з допомогою ДХ, отримані пізніше цими ж авторами [34].

В цьому дослідженні вивчали можливі причини відхилень від кривих 1-го порядку інактивації мікроорганізмів внаслідок дезінфекції: агрегація, зниження концентрації дезінфектанту чи біологічна гетерогенність. Використовували культури *L. pneumophila* та *E. coli*, вирощені в термостаті у вигляді звичайної лабораторної культури. Визначали стійкість культур до ДХ у концентрації 0,75 мг/л. Досліди проводили у 3 напрямках: по-перше, з'ясовували, чим визначається 2-а фаза біфазної кривої виживання – стійкістю окремих бактерій або відсутністю залишкових концентрацій ДХ; по-друге, визначали бактерицидний ефект залишкових концентрацій ДХ; по-третє, використовували термостат для

максимального наближення лабораторних умов до природних. Показано, що резистентність є фенотиповою характеристикою, яка може бути змінена за зміни умов росту культури, що передував досліду. Для резистентності також важливі температура та швидкість росту культури.

Прикладом практичного застосування запропонованого авторами даних робіт [12, 13, 17 – 19, 27, 34, 35] методичного підходу є результати дослідження ефективності ДХ стосовно аеромонад у розподільчих системах питної води [36].

У цій роботі вивчені питання стабільності концентрації ДХ у воді та показано, що аеромонади більш чутливі до діоксиду хлору порівняно з іншими грамнегативними бактеріями. При цьому чутливість цих мікроорганізмів до ДХ зі збільшенням pH знижується, тоді як до вільного хлору підвищується. Істотне зниження концентрації аеромонад констатовано лише у присутності залишкового ДХ; продукти реакції (хлорити) суттєво не впливають на ріст і розмноження аеромонад. Результати дозволили зробити висновок, що ДХ може бути ефективним засобом для постдезінфекції.

У процесі дослідження ефективності деяких дезінфектантів для 99% інактивації *E. coli* встановлено наступне [28]:

1. При pH 7 хлор ефективніший, ніж ДХ.

2. У формі гіпохлорит іону (ClO^-) та хлорамінів ($NHCl_2$, NH_2Cl) хлор менш ефективний.

3. Бактерицидна ефективність хлору швидко зменшується, починаючи від pH 7, при якому домінуючою формою є HClO, до pH 9 де домінуюча форма - гіпохлорит іон (ClO-), тоді як ефективність ДХ збільшується.

У роботі [37] наведено дані щодо інактивації діоксидом хлору *E. coli* при pH 8, температурах 5 °C і 15 °C: константи інактивації, час, необхідний для інактивації на

99,99 % і відповідні значення Ct (мг/л·хв) від 0,1 до 2,7 мг/л.

У статті [38] представлені результати досліджень порівняльної ефективності ДХ при інактивації деяких мікроорганізмів у воді та вплив різних умов дезінфекції: дози, часу контакту, pH.

Порівняльна оцінка впливу ДХ та рідкого хлору (РХ) на *E. coli* (А) та *E. coli* (В) при 19 ºС та експозиції 20 хв. показала наступне.

Зі зростанням дози ефективність інактивації обома дезінфектантами збільшувалася. Однак бактерицидний ефект ДХ був більш виражений. Наприклад, 99% - на інактивація за допомогою ДХ досягагася при дозі 1,4 мг/л, тоді як РХ - 1,8 мг/л. 99,9% - ний ефект спостерігався при ідентичній дозі 3,0 мг/л обох дезінфектантів.

Експерименти на інших бактеріях (*St. aureus, Bacillus subtilis* і *Sarcina*), проведені в фосфатному буфері при pH = 7,0 і температурі 20 ºС, показали більш ефективну інактивацію цих мікроорганизмів ДХ у порівнянні з РХ: для 98 % - ної інактивації *S. aureus* потрібно 1,5 мг/л ДХ та 2,5 мг/л РХ.

При дозі 2 мг/л обох дезінфектантів протягом 20 хвилин і 19 ºС спостерігалася 95% інактивація даних бактерій при дії РХ і 99,9% ДХ, при цьому такий ефект для *Sarcina* досягався при дозі ДХ 1,5 мг/л і при дозі РХ 2,6 мг/л.

При знезараженні господарсько-побутових стічних вод ДХ та РХ констатовано 99,9 % - ний ефект впливу ДХ у дозі 2,5 мг/л порівняно з РХ у дозі 3,0 мг/л хлору.

При вивченні впливу pH на ефективність інактивації ДХ *E. coli* (В) та *St.aureus* встановлено: ДХ ефективний по відношенню до *St. aureus* у широкому діапазоні pH 3,0-9,0, тоді як РХ у вузькому діапазоні нейтрального стану середовища (7,0-8,0); при впливі на *E. coli* (В) обидва

дезінфектанти були ідентичні.

Аналогічні результати отримані при знезараженні ДХ та РХ господарсько-побутових стічних вод.

Результати порівняльної оцінки експозиції (1, 2, 5, 10 і 20 хв) при 17 ºС на знезаражуючий ефект ДХ і РХ по відношенню до *E. coli* (В) і *St. aureus* свідчать, що ДХ діє швидше - для 98% -ної інактивації *E. coli* (В) і *S. aureus* потрібно 1-2 хв, тоді як РХ - 2,5-3,5 хв.

При дії ДХ і РХ при ідентичних дозі та експозиції (3,0 мг/л; 20 хв.) в натурних умовах експерименту ДХ був також ефективніший.

В обговоренні автори [38] зробили спробу пояснення механізмів бактерицидної дії ДХ та РХ.

Насамперед автори зазначають, що розчинність ДХ у воді (107,9 г/л при 20 °С) у п'ять разів перевищує таку хлоргазу. Порівняно з гідролізом хлоргазу у воді ДХ у воді не гідролізується.

Незважаючи на ненасиченість електронної структури ДХ, він залишається у воді у мономолекулярному стані, що пояснює його швидку дифузію.

При знезараженні води хлором (pH = 7, 0), HOCI і OCl^- співіснують, при цьому HOCI, як нестійка сполука, відіграє головну роль у бактерицидній та дезінфікуючій функції, оскільки в 80 разів більш ефективна, ніж OCl^-. Чим вище pH, тим швидше реакція перетворення HOCI в OCl^- і тим слабша ефективність хлору.

Завдяки високій окислювальній здатності та мономолекулярному стану ДХ може легко проникати через мембрану бактерії, порушуючи трансмембранний градієнт та проникність мембрани за рахунок інгібування фосфаттрансфераз. В процесі інактивації бактерій ДХ впливає на ферментний ланцюг глюкозооксидази, зокрема на меркаптогрупи (-SH), окислюючи їх до -S-S-груп, що

призводить до втрати активності ензимів.

На відміну від ДХ, хлор у вигляді іонів OCl^- надає мембранам бактеріальних клітин негативний заряд. Це пояснює, чому бактерицидний ефект хлору в 2.5 рази нижче, ніж ДХ, і узгоджується з більш високим окислювально-відновним потенціалом ДХ порівняно з хлором.

Встановлено зростання бактеріцидного ефекту зі збільшенням температури: подвоювання кожні 10 °С.

Вивчення впливу бактеріальної структури на ефективність діоксиду хлору дозволило авторам висловити таку думку. В основі відмінності бактерій лежить структура пептидоглікану або мукопептиду клітинної мембрани (рис. 2.1).

Наприклад, грамнегативні *E. coli* мають одномірну структуру мукопептидного ланцюга із чотирма пептидами, внаслідок чого дезінфекційний засіб ефективно порушує хімічні зв'язки бактерій із подальшою інактивацією. Для грампозитивних *St. aureus* характерна тривимірна просторова структура ланцюга, що обумовлює більш значну стійкість до дезінфектантів. У зв'язку з цим, на думку авторів [38], *St. aureus* має більшу резистентність до лікарських засобів. Така сама залежність простежується, якщо проаналізувати результати цієї роботи [38]: для інактивації *St. aureus* і РХ, і ДХ потрібно значно більше, ніж для інактивації *E. coli*.

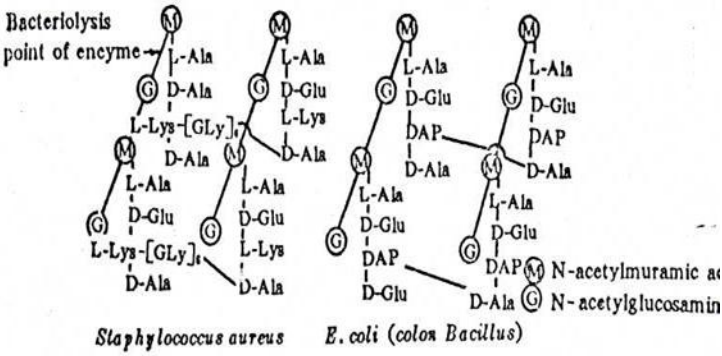

Fig. 12. The structure of peptidoglycan of cell wall for colon *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*.

Рис. 2.1 Структура пептидоглікану клітинної мембрани *E. coli* та *S. aureus*

На додаток до сказаного, для підвищення стійкості деякі бактерії мають спеціальні додаткові структури. Наприклад, наявність джгутика дозволяє бактеріям швидко пересуватися з дезінфекційної області до інтактної. Низька проникність оболонки може блокувати обмін речовин або з клітини і посилити стійкість до дезінфекційних засобів. Протеїни мембрани мають численні дитіозв'язки і сульфіди, які нейтралізують вільні радикали. Слід зазначити, що зі збільшенням «віку» бактерій їхня чутливість до дезінфекційних засобів зменшується.

Наприкінці автори [38] зазначають, що ДХ є адекватною альтернативою хлору.

Література

1. Aieta, E., & Berg, J. D. (1986). A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *Journal of the American Water Works Association, 78*(6), 62–72. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1986.tb05766.x

2. Trakhtman, N. N. (1946). *Dvuokis' khlora v dezinfektsii vody* [Chlorine dioxide in water disinfection]. *Gigiena i sanitariia*, *10*, 10–13.
3. McCarty, J. A. (1944). Chlorine dioxide for the treatment of water supplies. *Journal of the New England Water Works Association, 58*, 252–260.
4. Ridenour, G. M., & Armbruster, E. H. (1949). Bactericidal effect of chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 41*(6), 537–550.
5. Ridenour, G. M., & Ingols, R. S. (1947). Bactericidal properties of chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 39*(6), 561–570.
6. Bedulevich, T. S., Svetlakova, M. N., & Trakhtman, N. N. (1953). *Novye dannye otnositel'no primeneniia dvuokisi khlora dliaobezzarazhivaniia vody* [New data on the use of chlorine dioxide for water disinfection]. *Gigiena i sanitariia*, *10*, 14–17.
7. Benarde, M. A., Israel, B. M., Olivieri, V. P., & Granstrom, M. L. (1965). Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. *Applied and Environmental Microbiology, 13*(5), 776–780.
8. Benarde, M. A., Snow, W. B., & Olivieri, V. P. (1967). Chlorine dioxide disinfection: Temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology, 15*(1), 159–165.
9. Berndt, H., & Linneweh, H. J. (1969). Comparative quantitative studies on the bactericidal activity of chlorine dioxide and chlorine. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie, 41*, 153–159.
10. Tifft, E. C. (1977). Enhancement of high-rate disinfection by sequential addition of chlorine and chlorine dioxide. *Journal of the Water Pollution Control Federation, 49*, 1652–1660.

11. Aieta, E. M., & Roberts, P. V. (1983). Disinfection with chlorine and chlorine dioxide. *Journal of Environmental Engineering, ASCE, 109*, 783–790. https://doi.org/10.1061/JEEGAV.0000885
12. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1982). Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 44*(4), 814–819.
13. Berg, J. D. (1985). Significance of subpopulations of *Legionella pneumophila* and *E. coli* resistant to disinfection by chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 77*(5), 261–270. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1985.tb05563.x
14. Geissek, D. F. (1979). Design optimization of high-rate disinfection using chlorine and chlorine dioxide. *Journal of the Water Pollution Control Federation, 51*, 351–360.
15. Geissek, D. F., & Garveb, S. R. (1977). High-rate disinfection: Chlorine and chlorine dioxide. *Journal of Environmental Engineering, ASCE, 66*, 1089–1092.
16. Aieta, E. M. (1980). Dose–response comparisons for chlorine and chlorine dioxide in disinfection of wastewater. In *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 3, pp. 311–320).
17. Berg, J. D., Aieta, E. M., & Roberts, P. V. (1979). Effectiveness of chlorine dioxide as a wastewater disinfectant. *Progress in Wastewater Technology* (EPA 600/9-79-018). U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
18. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1984). Growth of *Legionella pneumophila* in continuous culture and its sensitivity to chlorine dioxide. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

19. Berg, J. D., Aieta, E. M., & Roberts, P. V. (1980). Comparison of viral and bacterial indicators of disinfection in wastewater with chlorine dioxide. In *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 3, pp. 145–151).
20. Roberts, P. V., Berg, J. D., & Aieta, E. M. (1981). *Chlorine dioxide for wastewater disinfection: A feasibility evaluation* (EPA-600/S2-81-092). U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
21. Lillard, H. S. (1979). Levels of chlorine and chlorine dioxide of equivalent bactericidal effect in poultry processing water. *Journal of Food Science, 44*, 1594–1602. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb06456.x
22. Thiessen, G. P. (1984). The efficacy of chlorine dioxide in controlling *Salmonella* contamination and its effect on product quality of chicken broiler carcasses. *Journal of Food Science, 63*, 647–650.
23. Trakhtman, N. N. (1949). Okislytel'no-vosstanovitel'nye potentsialy i bakteritsidnoe deystvie khlora i khlorsoderzhashchikh soyudineniy / Oxidation-reduction potentials and bactericidal action of chlorine and chlorine-containing compounds. Gigiena i sanitariya, 2, 13–19.
24. Benarde, M. A., Snow, W. B., Olivieri, V. P., & Davidson, B. (1967). Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 15*(2), 257–265.
25. Roller, S. D., Olivieri, V. P., & Kawata, K. (1980). Mode of bacterial inactivation by chlorine dioxide. *Water Research, 14*(6), 635–641. https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90077-4
26. Ghandbaki, E. H. (1983). Reactions of chlorine and chlorine dioxide with free fatty acids, fatty acid esters,

and triglycerides. In *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 4, pp. 256–263).

27. Berg, J. D., Roberts, P. V., & Matin, A. (1986). Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions in *E. coli. Journal of Applied Bacteriology, 47*(3), 234–245.
28. Scarpino, P. V. (1977). Effect of particulates on disinfection of enteroviruses and coliform bacteria in water by chlorine dioxide. In *Proceedings of the AWWA Water Quality Technology Conference.*
29. Seidler, R. J., Morrow, J. E., & Bagley, S. T. (1977). *Klebsiellae* in drinking water emanating from redwood tanks. *Applied and Environmental Microbiology, 33*(5), 893–900.
30. Carson, L. A., Favero, M. S., Bond, W. W., & Petersen, N. J. (1972). Factors affecting the comparative resistance of naturally occurring and subcultured *Pseudomonas aeruginosa* to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology, 23*(5), 863–869.
31. Carson, L. A., Petersen, N. J., Favero, M. S., & Aguero, S. M. (1978). Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology, 36*(6), 839–846.
32. Favero, M. S., & Drake, C. H. (1966). Factors influencing the occurrence of high numbers of iodine-resistant bacteria in iodinated swimming pools. *Applied and Environmental Microbiology, 14*(4), 627–635.
33. Severin, B. F., Suidan, M. K., & Englebrecht, R. S. (1983). Kinetic modelling of UV disinfection of water. *Water Research, 17*, 1669–1680. 10.1016/0043-1354(83)90092-7
34. Berg, J. D., Hoff, J. C., Roberts, P. V., & Matin, A. (1988). Resistance of bacterial subpopulations to

disinfection by chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 80*(9), 115–119. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1988.tb03069.x

35. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1985). Disinfection resistance of *Legionella pneumophila* grown in continuous and batch culture. In *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 5, pp. 123–132).
36. Medema, G. J., Wondergem, E., & van Dijk-Looyaard, A. M. (1997). Effectivity of chlorine dioxide to control *Aeromonas* in drinking water distribution systems. *Water Science and Technology, 2*, 325–326.
37. Botzenhart, G. M., Tarcson, G. M., & Ostruschka, M. (1993). Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. *Water Science and Technology, 27*, 363–370.
38. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Fang, M., & Juli, L. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research, 31*(3), 607–613. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-0

2.2 Кінетика і механізм дезінфекції бактерій діоксидом хлору

Як відомо, ініціатором практичних процедур дезінфекції вважається Joseph Lister. Однак, кількісна процедура для вивчення дезінфекції вперше описана у класичній статті Kronig і Paul [1]. Десять років по тому Madsen і Nyman [2], а потім Chick через рік [3], створили математичну модель хімічної дезінфекції мікробних популяцій. У цих двох статтях запропоновано аналогію між швидкістю мікробної дезінфекції та унімолекулярною реакцією або реакцією першого порядку, яка залишилася моделлю для всіх наступних досліджень.

Протягом 50 років повідомлялося про вдосконалення техніки та висувалися гіпотези щодо механізму руйнування мікробів. У 1946 році Green і Stumpf [4] припустили, що хлор спричиняє загибель мікробів, інактивуючи ферменти, необхідні для окислення глюкози. Knox et al. [5] запропонували фермент тріасефосфатдегідрогеназу як головну мішень для хлорної дезінфекції. Однак досі прямих біологічних доказів будь-якої з цих теорій немає. Як зазначив Wyss [6], «галузь дезінфекції є неквапливою». Дослідження, описане тут, [7] пропонує модифікований математичний підхід до хімічної дезінфекції бактеріальних популяцій завдяки унікальній та швидкій процедурі відбору проб, розчинам без органічних речовин, кількісному спектрофотометричному визначенню низьких доз (частки міліграма на літр) дезінфікуючого засобу, а також теорії та конструкції хімічних реакторів.

Крім того, результати біологічних експериментів, що доповнюють математичну інтерпретацію кривих швидкості, вказують на механізм летального ураження. Це дослідження [7] є прямим продовженням попередньої публікації Benarde et al. [8]. В ній повідомлялося про значну інактивацію, що перевищувала 30-хвилинний кінцевий показник, який зазвичай використовується в дослідженнях дезінфекції. Це, здавалося, вказувало на те, що ClO_2 інактивує основну мішень. Таке припущення призвело до розробки апарату, який дозволяв би визначати відсоток виживання після інтервалів, виміряних у секундах. Після доведеної ефективності цього апарату було проведено дослідження впливу температури на ефективність дезінфекції. У цій серії використовувалися такі константи: pH 6,5; щільність клітин 15 000 на мілілітр; та середовище без органічних речовин. Змінними були концентрація ClO_2, температура та час контакту.

При вивченні залежності виживання від часу та

температури при використанні 0,75 мг/л $C1O_2$ встановлено, що його ефективність безпосередньо залежала від температури. Подібний зв'язок спостерігався при 0,50 та 0,25 мг/л. Для досягнення 99% інактивації концентрація 0,25 мг/л потребувала 110 секунд при 5 °C, 74 секунди при 10 °C, 41 секунду при 20°C та 16 секунд при 30 °C - майже в чотири рази швидше при 30 °C, ніж при 5 °C. При рівні 99,9% час, необхідний для дезінфекції між 5 та 30°C, збільшився до 7,5 разів (21 секунда при 30°C проти 150 секунд при 5°C).

Збільшення концентрації $C1O_2$ мало тенденцію до значного зменшення часу, необхідного для інактивації. На рівні 99% для 0,75 мг/л потрібно було лише 14 секунд при 30°C порівняно з 60 секундами при 5°C. Графічна реалізація цих реакцій показала відсутність прямих ліній, що вказує на відхилення від простих реакцій першого порядку. Тому для визначення найкращого порядку реакції необхідна більш складна обробка. На основі цих даних було б корисно розробити математичну модель, яку біоінженери змогли б використовувати при проектуванні дезінфекційного обладнання. У цих моделях завжди головне завдання - кількісна оцінка цих нелінійних кінетичних параметрів. З цією метою бажано спиратися на класичні підходи, які корелюють дані про швидкість складних хімічних реакцій з температурою та концентрацією. Chick [3] запропонував цей тип розрахунку, якого дотримувалися протягом останніх 60 років (рік статті [7] 1967). Однак протягом останніх 10 років було досягнуто прогресу в кінетичних моделях.

2.2.1 Кінетичні моделі.

На загальну швидкість інактивації *E. coli* діоксидом хлору впливають щонайменше три основні фактори, а саме:

(i) масоперенос ClO_2 у рідині до *E. coli*, (ii) хемосорбція дезінфікуючого засобу на селективних активних центрах на поверхні клітини та (iii) поверхнева та внутрішньоповерхнева дифузія активованого хемосорбованого комплексу з супутнім хімічним впливом на клітинні елементи. З'ясування механізмів дезінфекції на основі кінетичних даних значно ускладнюється можливістю того, що кілька етапів можуть контролювати швидкість. Тому перед використанням кінетичного моделювання важливо визначити, що контролює швидкість: фізичний етап, такий як масопередача або внутрішньоповерхнева дифузія, або хімічний етап, такий як хімічна атака на клітинні елементи. Інакше апроксимація кривої стане безглуздим завданням.

Оскільки більшість хімічних процесів, на відміну від чисто фізичних процесів масопереносу або дифузії, є сильно чутливими до температури, визначення етапів контролю швидкості може бути полегшено шляхом спостереження за впливом підвищеної температури на загальну швидкість інактивації. У цьому дослідженні [7] спостерігався сильний вплив температури. Це говорить про те, що початковою гіпотезою є хімічний етап, який контролює загальну швидкість інактивації. Крім того, адекватне перемішування реакційної суміші виключало масоперенос у рідкій фазі як етап контролю швидкості. Ці факти та гіпотеза про хімічний механізм контролю швидкості служать зручною відправною точкою для змістовного кінетичного моделювання. Якщо припустити, що закон дії мас застосовується до біохімічних реакцій так само, як і до гомогенних рідкофазних реакцій, то для псевдоунімолекулярної моделі кінетичний вираз набуває вигляду

$$-\frac{1}{V}\frac{dVc}{dt} = kc \qquad (1)$$

Для досліджуваної системи *E. coli* рівняння 1 стверджує, що швидкість зникнення клітин *E. coli* на одиницю об'єму за одиницю часу в реакторі пропорційна концентрації (активній масі) клітин, присутніх у будь-який момент часу в системі, причому система тут є рідкою сумішшю в реакторі в будь-який момент часу. Якщо об'єм системи майже постійний, що мало б місце для реакторів періодичної дії без видалення зразка, рівняння 1 набуває вигляду

$$-\frac{dc}{dt} = kc \qquad (2)$$

що є класичним виразом «закону Chick» для дезінфекції. Якщо порядок відрізняється від простого першого порядку, то рівняння 2 необхідно відповідно модифікувати; наприклад,

$$-\frac{dc}{dt} = kc^n \qquad (3)$$

де n - будь-яке дійсне число.

Тепер розглянемо загальний випадок, коли безперервне видалення зразка із системи призводить до зміни об'єму відповідно до закону зменшення об'єму, V = V(t). Рівняння 3 перетвориться на

$$-\frac{dVc}{dt} = kc^n V - \frac{dV}{dt} c \qquad (4)$$

що зводиться до

$$-\frac{dc}{dt} k(c)^n \qquad (5)$$

Очевидно, що випадок, коли об'єм був постійним, ідентичний випадку, коли об'єм був змінним, за умови, що змінні концентрації використовуються повсюди.

Згідно з «Chickian» філософією, прийнято аналогічно формулювати рівняння 3 наступним чином:

$$-\frac{dN}{dt} = k'N^n \qquad (6)$$

де N = кількість, а не концентрація, клітин, що

вижили в системі. Діючи, як і раніше, для випадку змінного об'єму, рівняння 6 стає

$$-\frac{dN}{dt} = k'(N)^n - \frac{dlnV}{dt} \cdot N \qquad (7)$$

Рівняння 7 жодним чином не нагадує рівняння 5, і, крім того, значення k з двох рівнянь принципово відрізняються через одиниці вимірювання та математичну форму диференціальних рівнянь. Навіть якби об'єм був постійним, рівняння 5 та 7 все одно відрізняються та визначають різні значення k. Зв'язок між двома параметрами k для систем зі змінним об'ємом такий

$$k' = (N)^{1-n} \frac{dlnV}{dt} + k(V)^{1-n} \qquad (8)$$

Дійсно дивно, чому, наприклад, Chick [4] наполягав на використанні *N*, кількості живих клітин у системі, як активної маси, у рівнянні 1. Ще більш дивним є той факт, що багато необізнаних експериментаторів, після Chick [4], очевидно, використовували *c* замість *N* під час розрахунку *k*. Висновок, який можна зробити з цих спостережень, полягає в тому, що рівняння 5 являє собою найменш заплутану аналогову модель хімічного закону дії мас. Формулювання, засновані на *N*, а не на *c*, не є розсудливими, оскільки *V(t)* має бути відомим і врахованим математично.

У цій статті [7] акцент робиться не на апроксимації кривої або якості наближення, а на критеріях виразу швидкості. Рівняння 3 є однією з форм класичного закону дії мас, тоді як рівняння 13 не має такої основи і тому має більш слабке підґрунтя, ніж рівняння 3.

При апроксимації кривої завжди можна виявити багато математичних виразів швидкості з однаковим ступенем наближення. Рівняння 5 слід розглядати лише як відправну точку, з якої можуть відштовхуватися майбутні теоретизації.

2.2.2 Оцінка параметрів.

Слід мати на увазі повне усвідомлення, що експериментальні дані авторів [7] можуть не вимагати складного статистичного аналізу, методів апроксимації кривих, детального кінетичного моделювання та пояснення механізму. Автори головним чином зацікавлені в тому, щоб показати нелінійний метод, який можна використовувати з цим типом даних.

Для фіксованих значень температури та початкової концентрації діоксиду хлору невідомі параметри в рівнянні 5, k та n, можна оцінити за допомогою аналізу «помилки найменших квадратів». Критерій, заснований на лінеаризованій формі, такий:

$$\min \sum_{i}^{m} \left[ln\left(-\frac{d\bar{c}}{dt} \right)_i - lnk'' - n ln\bar{c}_i \right]^2 \qquad (9)$$

де $k'' = kc_0^{n-1}$, c_0 = початкова концентрація клітин, $c_n = c/c_0$. Відповідні «нормальні рівняння» такі:

$$m \cdot lnk'' + \sum_{i}^{m} ln\bar{c}_i \cdot n = \sum_{i}^{m} ln\left(-\frac{d\bar{c}}{dt} \right)_i \qquad (10)$$

та

$$\sum_{i}^{m} ln(\bar{c}_i) \cdot lnk'' + \sum_{i}^{m} (ln\bar{c}_i)^2 \cdot n = \sum_{i}^{m} ln\bar{c}_i \cdot ln\left(-\frac{d\bar{c}}{dt} \right)_i \qquad (11)$$

Оцінка параметрів з рівнянь 10 та 11 служить для позначення початкової точки сітки, з якої можна розпочати нелінійний пошук на аналоговому комп'ютері. Звичайно, k'' та n можна оцінити за допомогою нелінійного аналізу «найменших квадратів» на цифровому комп'ютері, але ця процедура вимагатиме використання нелінійних методів пошуку, які фактично еквівалентні за своєю «художньою» формою двоетапній процедурі оцінки параметрів, описаній вище для аналогового комп'ютера.

Масштабована аналогова комп'ютерна діаграма для рівняння 5 з $c = c_n c_0$ та $k'' = kc_0^{n-1}$ з критерієм відповідності базується на мінімально-квадратичній похибці між аналоговою кривою та експериментальними точками. Результати показують, що порядок реакції відносно часу контакту змінюється як залежно від температури, так і від концентрації ClO_2. Крім того, числові результати лінеаризованого аналізу найменших квадратів взагалі не узгоджувалися зі значеннями аналогового комп'ютера, за винятком 32 °C. Значення n залишалися постійними на рівні значень, обчислених за 10 та 11, оскільки було помічено, що похибки апроксимації кривої були більш чутливими до k'', ніж до n. Це також забезпечило основу для порівняння значень k з двох різних методів аналізу. Оскільки n виявилося відносно неважливим, було зроблено спробу побудувати графік енергії активації Арреніуса з припущенням, що варіація в порядку реакції не робить оцінку енергії активації недійсною. Результати цього аналізу показали, що енергія активації становила 12 000 калорій/моль незалежно від концентрації ClO_2.

Кінетична модель у рівнянні 5 вказує шлях до майбутніх досліджень у галузі дезінфекції ClO_2. Перш за все, було припущено, що ClO_2 є надлишковим реактивним компонентом, зміна концентрації якого з часом інактивації не змінюється так суттєво, як концентрація *E. coli*. Ця умова призвела до псевдо nth порядку формулювання рівняння 5.

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на з'ясування впливу включення концентрації ClO_2 у кінетичну модель на апроксимацію кривої даних. Крім того, слід визначити порядок реакції відносно початкової концентрації клітин *E. coli*, щоб з'ясувати, чи проміжні продукти реакції пригнічують швидкість інактивації, чи переважає автокаталітичний механізм. Сильний

температурний вплив, що спостерігається в цьому дослідженні, вже вказав на хімічну природу швидкості інактивації, на відміну від суто фізичних контрольних етапів. Енергія активації *(E)* 12 000 калорій/моль, безумовно, є достатньою, якщо припущення про змінний порядок реакції не впливає на *E*. Значення енергії активації, наведене тут, краще відображає справжню енергію активації, ніж ті, що зазвичай повідомляються на основі будь-якого з наступних кінетичних рівнянь:

$$-\frac{dN}{dt} = kNt \qquad (12)$$

or

$$-\frac{dc}{dt} = kct \qquad (13)$$

2.2.3 Біологічні дослідження механізму

Розробка кінетичної моделі базувалася на припущенні, що псевдо *n*th кінетика описує швидкість реакції та її температурну залежність. Ця модель намагається пояснити загальний механізм. Однак окремі етапи, які складають загальний механізм, залишаються нез'ясованими. З цієї причини були зроблені спроби виявити біологічний шлях ClO_2 для пояснення етапу контролю швидкості.

Швидкість дезінфекції, набагато менша за раніше повідомлені значення, та сильний окислювальний характер ClO_2 свідчать про те, що ймовірним механізмом є хімічне руйнування клітинної стінки бактерій. Якщо клітинна стінка була сильно порушена, білок і нуклеїнова кислота повинні вивільнятися у достатній кількості, щоб отримати характерні піки в області 260- та 280-нм при спектрофотометричному аналізі. Щоб підтвердити факт піків білка та нуклеїнової кислоти, необроблені промиті

клітини механічно руйнували в звуковому осциляторі. При розведенні 1:10 пік простежувався при 260 та 280 нм. У цей момент до розчину додавали ClO_2. При подальшому аналізі змін у кривих не відбулося, що вказує на відсутність видимої реакції між ClO_2, білком або нуклеїновою кислотою.

Велику кількість клітин суспендували в OFD-фосфатному буфері (pH 6,5). Ці клітини центрифугували та промивали тричі. Промиті клітини обробляли ClO_2 протягом 5 хвилин. Потім їх центрифугували до утворення осаду, залишаючи прозору рідину-супернатант. Зразок розчину супернатанту поміщали в 10-сантиметрову кювету для аналізу. Збільшена довжина світлового шляху підвищила чутливість у 10 разів. Відсутність піків поглинання в області 260 та 280 нм свідчила про те, що білок та нуклеїнова кислота не вивільнялися з клітин. Було зроблено висновок, що ClO_2 не спричиняє витікання вмісту клітин і, очевидно, не окислює білковий матеріал до інших продуктів. В роботі Bringmann (1953) [9] за допомогою електронних мікрофотографій показано, що в клітинах, оброблених хлором, не відбувається видимих змін у цілісності клітинної стінки. Висловлено припущення, що летальне ураження в цьому інтервалі цілком може бути пов'язане з впливом на первинну мішень, таку як синтез білка.

Для перевірки цієї гіпотези фенілаланін, мічений ^{14}C, додали до селективного середовища для *E. coli*, що містило приблизно 10^9 клітин. Його негайно помістили у водяну баню з температурою 37°C та далі інкубували. Через певні проміжки часу зразки відбирали та додавали до гарячої трихлороцтової кислоти для осадження білка. Потім до системи додавали діоксид хлору, і знову відбирали зразки через певні проміжки часу. Підрахунок білка, що містив ^{14}C, показав значні відмінності в синтезі білка між

клітинами, обробленими $C1O_2$ та інтактними.

Щоб остаточно підтвердити це спостереження, було проведено друге випробування. Цього разу мічений ^{14}C валін додавали до клітин. Щоб отримати значущі дані про швидкість синтезу білка, з обробкою $C1O_2$ та без неї, було розроблено апарат, який дозволяв відбирати зразки з інтервалами в 10 секунд. Результати цього експерименту показали, що $C1O_2$ різко пригнічує синтез білка. Лаг-фаза не спостерігалася. Це вказує на те, що летальне ураження безпосередньо пов'язане з синтезом білка, а не з інактивацією ферментної системи в катаболізмі глюкози, де утворюється лаг-фаза.

Існує кілька можливостей, наприклад, інгібування утворення аміноациладенілату або інгібування активації амінокислот. Ці два кроки можна було б належним чином розглядати як одну можливість і представити наступним чином: амінокислота + аденозинтрифосфат → аденозинмонофосфат • амінокислота; рибонуклеїнова кислота (sРНК) + амінокислота → sРНК•амінокислота.

Друга можливість може відбуватися на рівні рибосом, представлена виразом sРНК • амінокислота + трансфераза рибосоми /ферменти → специфічний протеїн.

Третя можливість може полягати в інактивації матричної РНК, що запобігає трансляції кодованої інформації.

Четверте пояснення є структурним, а не функціональним: руйнування рибосоми під дією $C1O_2$. Однак, руйнування рибосом повинно призвести до втрати вмісту клітин, чого не відбувалося. Таким чином, інактивація синтезу білка є найбільш імовірною.

Література

1. Kronig, B., & Paul, T. (1897). The chemical foundation for the theory of poison reactions and disinfection. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 25*, 1–112.
2. Madsen, T., & Nyman, M. (1907). On the theory of disinfection. I. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 57*, 388–404.
3. Chick, H. (1908). An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene, 8*, 92–157.
4. Green, D. C., & Stumpf, P. K. (1946). A note on the enzymatic method of estimating chlorine. *Journal of the American Water Works Association, 38*, 1306–1308.
5. Knox, W. E., Stumpf, P. K., Green, D. E., & Auerbach, V. H. (1948). The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. *Journal of Bacteriology, 55*, 451–458.
6. Wyss, O. (1961). Theoretical aspects of disinfection by chlorine. In *Proceedings of the Rudolfs Research Conference: Public Health Hazards of Microbial Pollution of Water* (pp. 400–418). Rutgers, The State University, New Brunswick, NJ.
7. Benarde, M. A., Snow, W. B., Olivieri, V. P., & Davidson, B. (1967). Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 15*(2), 257–265. https://doi.org/10.1128/AEM.15.2.257-265.1967
8. Benarde, M. A., Israel, B. M., Olivieri, V. P., & Granstrom, M. L. (1965). Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. *Applied Microbiology, 13*, 776–780.
9. Bringmann, G. (1953). Electron microscopic findings of the action of chlorine, bromine, iodine, copper, silver and hydrogen peroxide on *E. coli*. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 138*, 155–166.

2.3 Резистентність бактеріальних субпопуляцій до діоксиду хлору

Інактивацію бактерій спочатку запропонував Chick [1] як реакцію першого порядку. Вважалося, що швидкість інактивації є першим порядком за концентрацією бактерій, якщо припустити постійну концентрацію дезінфектанта. Однак більшість емпіричних досліджень показали відхилення від простого процесу першого порядку. Константа швидкості зазвичай зменшується з часом і іноді спостерігається початкова затримка. Rahn [2, 3] запропонував multihit модель для пояснення лаг-фази, яка часто виникає перед логарифмічною інактивацією. Відхилення пояснювалися гетерогенністю популяції, тобто резистентними та чутливими фракціями. Таке ж пояснення було запропоновано Gard [4] для опису інактивації поліовірусу формальдегідом.

Moats [5] узагальнив ці спостереження як чотири основні криві виживання (рис. 2.2).

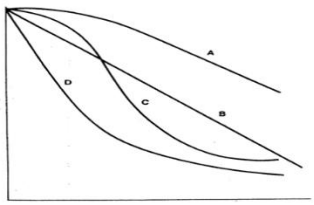

Рис 2.2 Чотири основних типа кривих виживаності бактерій при дезінфекції хімічними дезінфектантами (адаптовано від [5]).

Крива типу А демонструє плече, або лаг, що пояснюється кількома мішенями, необхідними для

інактивації. Лінія типу B – це ідеальна інактивація першого порядку, яка рідко спостерігається. Двофазні криві C та D пояснюються гетерогенними популяціями, які мають резистентну фракцію, серед інших факторів. Двофазні криві характеризуються швидкою початковою інактивацією, а потім зниженням швидкості інактивації, що призводить до графічного утворення плато. Ці криві (C та D) спостерігаються в лабораторії та польових умовах з різними мікроорганізмами та інактивуючими агентами.

Швидке зменшення кількості клітин першого порядку зазвичай спостерігається з більшістю дезінфікуючих засобів протягом перших 90 секунд після контакту, коли відбувається 99-99,9 відсотка інактивації клітин. Однак з практичної точки зору, не менш важливим аспектом реакції інактивації є існування стійкої фракції виживаючих, яка залишається життєздатною навіть після тривалішого часу контакту, типового для систем очищення та розподілу води. Наприклад, хоча в лабораторних експериментах *L. pneumophila* легко інактивується дозою хлору 1,25 мг/л [6], життєздатні *Legionella* виявляються у питній воді із концентраціями вільного хлору від 0,2 до 2,0 мг/л [7]. Очевидно, що виявлення життєздатних резистентних мікроорганізмів при вищій концентрації в польових дослідженнях не відповідає результатам лабораторних досліджень [8].

Мета статті [9] полягала в обгрунтуванні існування резистентної фракції життєздатних мікроорганізмів та демонстрації подібності в цьому відношенні патогену *L. pneumophila* та індикаторної *Escherichia coli*. Для моделювання резистентних популяцій застосовано методологію хемостату. Раніше показано, що на розмір такої популяції впливає попереднє середовище росту [10-11].

Кишкову паличку (*E. coli*) та *Legionella pneumophila*

вирощували або в безперервному, або в періодичному культивуванні. Безперервне культивування досягалося в хемостаті, який використовувався для імітації обмежених поживними речовинами умов субмаксимального росту, що вважається правилом у багатьох водних середовищах. Хемостат дозволяє змінювати один параметр, наприклад, температуру, тоді як усі інші, наприклад, швидкість розведення, pH та розчинений кисень, залишаються постійними. Таких умов неможливо досягти в традиційному періодичному культивуванні. Ці методи були детально описані раніше [11, 12].

2.3.1 Стабільність залишкового ClO_2.

Експерименти доза-відповідь (рис. 2.3) показали, що доза 0,75 мг ClO_2/л забезпечила вимірюваний залишок, водночас даючи значну, але підрахункову кількість життєздатних бактерій після 15-хвилинного часу контакту. При нижчій дозі, 0,50 мг/л, залишок не було виявлено. При вищій дозі, 1,0 мг/л, кількість життєздатних бактерій наближалася до меж виявлення бактеріологічного аналізу.

Далі було досліджено долю ClO_2 після введення дози в реактор інактивації. При дозі 0,75 мг/л залишки коливалися від 0,50 до 0,35 мг ClO_2/л для всіх експериментів, зі стандартним відхиленням 0,10, визначеним під час окремих експериментів. Порівняння з контрольними експериментами, проведеними без додавання бактеріальної суспензії, показало, що приблизно 13 % ClO_2, дозованого в кожному експерименті, було спожито в реакціях з самою бактеріальною суспензією, тоді як 26 % ClO_2 було втрачено внаслідок окисно-відновних реакцій, які не мали відношення до дезінфекції. Контрольні експерименти, проведені в реакторі без газового простору, показали, що 14 % ClO_2 було втрачено

внаслідок випаровування. Результати показано на рис. 2.4.

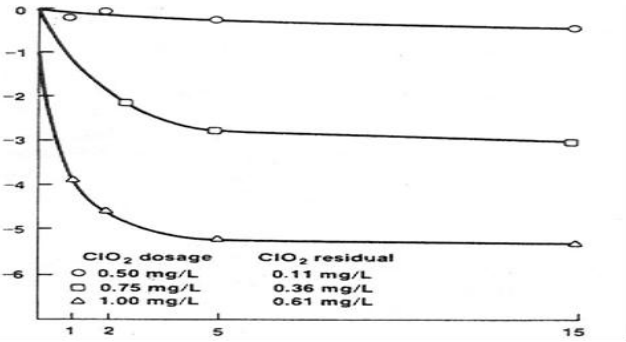

Рис. 2.3 Результати експериментального вивчення залежності «доза-ефект» щодо оптимальної дози діоксиду хлору при інактивації *E. coli* (температура хемостату 25 °C; експозиція 0,40 год).

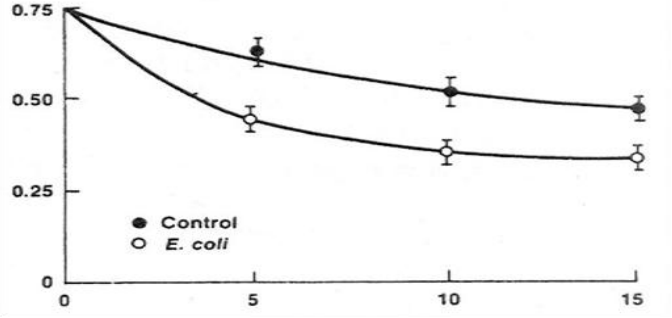

Рис. 2.4 Залишкові концентрації діоксиду хлору в сольовому буфері (контроль-середовище накопичення, дослід - середовище з *E. coli*, початкова концентрація ≈ 10^7 КУО/мл).

Оскільки протягом 15-хвилинного часу контакту в експериментах з інактивацією був присутній вимірюваний

залишок, були проведені подальші експерименти з стійкою фракцією, що вижила.

2.3.2 Біоцидна ефективність ClO_2

Щоб перевірити, чи залишковий $C1O_2$ (порівняно з початковою дозою) є біоцидним, $C1O_2$ дозували у трьох повторних експериментах, потім вимірювали залишок, а через 10 хвилин додавали *E. coli*. Це відрізнялося від звичайного методу, в якому культуру спочатку суспендують у розріджувачі, а потім дозують дезінфікуючий засіб. Розрахований $\log_{10}$ КУО/мл на момент додавання становив 7,33. Залишок $C1O_2$ у цей час становив 0,66 ± 0,33 мг/л. Після додаткових 10 хвилин контакту (загалом 20 хвилин) $\log_{10}$ виживання становив -6,87, а залишок становив 0,34 ± 0,06 мг$C1O_2$/л.

Ці результати узгоджуються з результатами, отриманими за допомогою звичайного протоколу, протягом якого $C1O_2$ дозували в розріджувач, який вже містив суспензію бактеріальних клітин [13]. Коефіцієнт виживання (рис. 2.3) та залишок після інактивації бактерій (рис. 2.4), узгоджуються з попередніми експериментами [12, 13]. На відміну від спостережень щодо хлору біоцидна форма $C1O_2$, здається, залишається активною під час розведення у водній суспензії протягом щонайменше 20 хвилин.

Другий підхід оцінював біоцидну ефективність залишкового $C1O_2$ після 10-хвилинного часу контакту. У цьому експерименті, також проведеному у трьох повторностях, в клітинну суспензію дозували 0,75 мг $C1O_2$/л. Через 10 хвилин вимірювали залишок і додавали другу аліквоту клітин для досягнення початкової концентрації приблизно 10^7 КУО/мл. Суспензію інактивували ще 10 хвилин і вимірювали кількість

бактерій, що вижили, та залишок. Результати показують, що залишок все ще був ефективним через 10 хвилин. Було досягнуто інактивації другої клітинної суспензії, що перевищувала зменшення на чотири логарифмічні одиниці, і виміряний залишок суттєво не змінився. Однак резистентна фракція клітин, що вижили, залишилася.

2.3.3 Резистентна E. coli.

Описані експерименти переконливо свідчать про існування стійкої фракції клітин у будь-якій заданій популяції. Для подальшого підтвердження цього явища було проведено інший тип експерименту, в якому вимірювали фракцію, що вижила, та залишок $C1O_2$ через 10 хвилин. Потім додавали другу дозу $C1O_2$ для досягнення початкової дози в реакторі. Якщо, наприклад, вимірювали залишок 0,45 мг/л, то друга доза забезпечувала приріст на 0,30 мг/л для досягнення концентрації, яка була присутня в нульовий момент часу, коли клітинну суспензію вперше вводили. Під час експерименту додаткові клітини не додавали. Експерименти проводилися протягом двох років, щоб переконатися, що не було відібрано аберантний лабораторний штам. Ці результати також задокументували наявність стійкої фракції клітин після 10-хвилинного часу контакту. Розмір фракції дещо зменшився після другої дози, але не пропорційно розміру другої дози (зазвичай близько 40-50 % від початкової дози 0,75 мг/л). Однофакторний дисперсійний аналіз показав, що не було суттєвої різниці між розміром фракцій, що вижили. Варіабельність коефіцієнтів виживання, досягнута в цих експериментах, можна пояснити наступними змінами в протоколі, які відбулися протягом двох років дослідження: (1) бактерії, вирощені в партіях, збирали в дещо різний час протягом циклу росту, від 18 до 22 годин;

(2) використовували два типи реакторів, одна модель дозволяла додавати ClO_2 у реактор без газового простору; (3) використовували два методи додавання ClO_2, один з яких мінімізував втрати від випаровування за допомогою газонепроникного шприца. Навіть з цими змінами в протоколі результати продемонстрували наявність резистентної фракції клітин.

2.3.4 Моделювання хемостату

Культури *E. coli*, вирощені в хемостаті, порівнювали з природною популяцією коліформних бактерій зі стічних вод. Результати експериментів з дезінфекції ClO_2 показано на рис. 2.5, де порівнюються стійкі популяції *E. coli* та *L. pneumophila*, вирощені в хемостатній культурі в різних неоптимальних умовах росту.

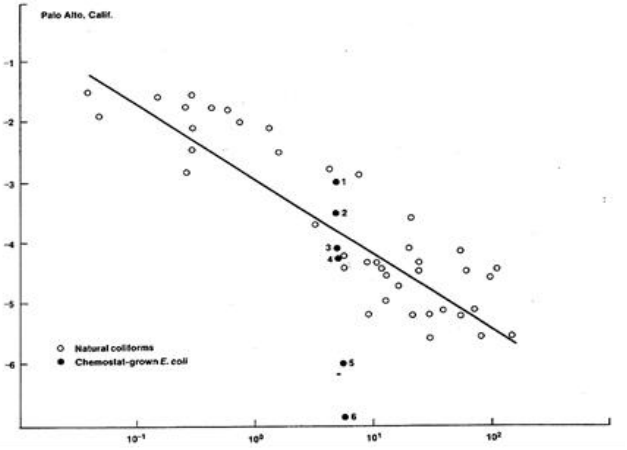

Рис. 2.5 Порівняння інактивації діоксидом хлору фекальних коліформних бактерій з фільтрату вторинно-очищених стічних вод (°) і вирощених в хемостаті *E. coli* (•) (1: D – 0,06 год, температура 15 °C; 2: D – 0,20 год, температура -15 °C; 3 - D – 0,06 год, температура 25 ° C; 4 -

D – 0,20 год, температура 25 ° C).

Відхилення від інактивації першого порядку пояснюють агрегацією або захистом частинками [7, 13, 14] та зниженням концентрації інактивуючого агента [15-18]. Кілька дослідників також пояснюють це явище гетерогенністю мікробної популяції [19, 20].

Ця гетерогенність пояснювалась фенотиповими реакціями на середовище росту [2], вивчалась за допомогою пакетних культур [21] та з використанням ізолятів з навколишнього середовища [22]. Феномен резистентної фракції також спостерігали Haas і Morrison [23] після впливу хлору на *E. coli*. Вони дійшли висновку, що резистентність не є спадковою і, таким чином, може бути зумовлена фізіологічними факторами.

У цьому дослідженні [9] систематично продемонстровано існування резистентної субпопуляції під час експериментів, в яких хімічний залишок виявився біоцидним; умови аналізу (короткий час контакту, нейтральний pH та буфер без поглинання) були адекватними для забезпечення переважання активного $C1O_2$ як вільного радикала [24]. Також не спостерігалася агрегація за допомогою рутинних мікроскопічних процедур. Можливо, що була достатня кількість не виявлених агрегованих клітин, що може пояснювати частину резистентної субпопуляції. Однак, малоймовірно, що агрегація відігравала значну роль у цих експериментах, оскільки було вжито спеціальних запобіжних заходів для усунення агрегатів, а розмір фракції не був випадковим, а насправді контролювався шляхом зміни умов росту [11, 12, 25]. Таким чином, ці результати спростовують гіпотезу про те, що відхилення від інактивації першого порядку можна пояснити виключно зменшенням залишку або агрегацією. Запропонована концептуальна модель не лише враховує існування стійкої фракції, що вижила, але й пов'язує розмір

фракції з чітко визначеними параметрами росту, а саме швидкістю росту та температурою росту [11, 12, 25].

Лабораторне дослідження показало, що цілісність зовнішньої мембрани та контроль її проникності були критичними для інактивації ClO_2 [26]. Можливо, стійка субпопуляція має зовнішні мембрани, які структурно міцніші або захищені від атаки, наприклад, позаклітинним матеріалом так само, як може бути захищена біоплівка. Генетично відібрана стійкість не передбачається. Фактично, дані хемостатних досліджень вказують на те, що це малоймовірно [13].

Крім того, фенотипічні характеристики, які обумовлюють стійкість до ClO_2, як хімічного дезінфікуючого засобу, можуть не передбачати стійкість до інших агентів. Наприклад, у роботі [27] не спостерігалося жодної субпопуляції, стійкої до УФ-випромінювання, при коефіцієнтах виживання, таких як 10^{-5}. Фізіологічні фактори, на які впливають умови росту, такі як проникність зовнішньої мембрани для хімічного агента, можуть не впливати на інактивацію УФ-випромінюванням. Отже, характеристики, що визначають існування та розмір резистентної фракції, ймовірно, залежать від використовуваного антимікробного засобу.

У попередніх дослідженнях [28, 29] ClO_2 інактивував природні популяції фекальних коліформних бактерій, що зустрічаються у вторинно очищених стічних водах. У цьому випадку середовище стічних вод можна розглядати як симуляцію джерела питної води, забрудненого фекальними коліформними бактеріями. Результати, представлені як коефіцієнт виживання відносно добутку залишку та часу, дозволяють передбачити розмір фракції, що вижила, коли час контакту та залишок відомі. Порівняння лабораторних даних у цьому випадку з використанням вирощеної за допомогою

хемостату *E. coli*, з польовими даними з використанням фекальної коліформної групи не позбавлене ризику. Однак інше дослідження показало, що компонент *E. coli* коліформної групи був настільки ж чутливим до хлорування, як і вся коліформна група [30], що підтверджує порівняння. У цьому дослідженні стійка фракція *E. coli*, виражена як log (N_K/N_0), з вибраних хемостатних експериментів узгоджується з моделлю, передбаченою на основі експериментів з коліформними бактеріями стічних вод. Дані хемостата, які найкраще наближають модель, отримані з експериментів, в яких *E. coli* вирощували за неоптимальних температур (15 та 25°C) та при відносно повільних швидкостях росту (D = 0,06 та 0,20 год). Ці конкретні значення (точки 1, 2, 3 та 4 на рис. 2.4) температури та швидкості росту близькі до умов, в яких фекальні коліформні бактерії перебувають у стічних водах перед дезінфекцією, а саме: середня температура 18°C та час перебування в гідравлічному середовищі приблизно 15 годин. З іншого боку, дані виживання хемостатних культур, вирощених з високою швидкістю (D = 0,40 та 0,69 год, точки 5 та 6 відповідно на рис. 2.4), як і очікувалося, відрізняються від даних виживання фекальних коліформних бактерій, вирощених у стічних водах, демонструючи менші коефіцієнти виживання, ніж спостерігалися для популяції стічних вод та хемостатних культур, вирощених з низькою швидкістю. Це додатково підтверджує дві основні тези дослідження: (1) хемостат можна використовувати для моделювання природного середовища росту з урахуванням росту, обмеженого поживними речовинами, та (2) температура та швидкість росту мають значний вплив на чутливість популяцій до дезінфікуючих засобів.

Корисність хемостатної методології показано на рис. 2.6, на якому стійкі популяції *E. coli* порівнюються з

популяціями *L. pneumophila*. Подібна поведінка спостерігається в широкому діапазоні швидкостей розведення; чутливість $C1O_2$ зростає зі збільшенням швидкості розведення [25].

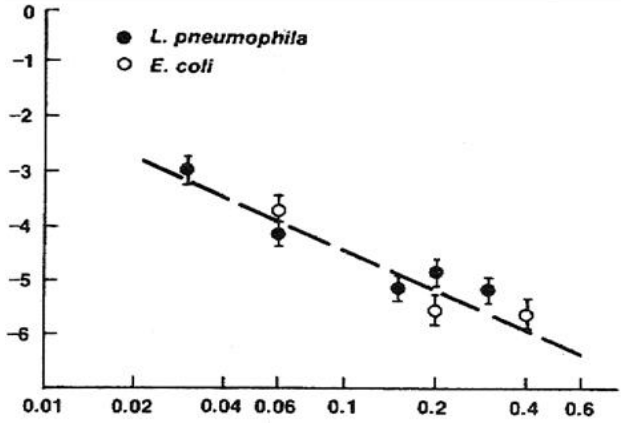

Рис. 2.6 Ефект рівня розчинення на чутливість *L. pneumophila* та *E. coli* до діоксиду хлору в концентрації 0,75 мг/л (ріст на збідненому поживному середовищі; температура 35 °C) [25].

Ці дані вказують на те, що резистентна фракція може бути більшою в популяціях, вирощених в умовах обмеженого вмісту поживних речовин, таких як типові умови для природних середовищ, що використовуються для водопостачання, порівняно з популяціями, культивованими в оптимальних умовах росту, які зазвичай використовуються в лабораторних дослідженнях дезінфекції.

Лабораторні дослідження, проведені з популяціями, вирощеними з високими швидкостями (> 0,1 год),

ймовірно, не помітять наявність резистентної фракції, якщо виживання не спостерігається в діапазоні щонайменше трьох порядків. Дослідження, що зосереджені лише на початковій швидкості інактивації, яку часто вважають першим порядку, можуть давати оманливі дані, які слід використовувати для розрахунків CT [31]. Наприклад, значення CT для 99-% інактивації *E. coli* становить 0,18 для $C1O_2$, дозованого в системі без поглинання при 20 °C [32]. У цьому дослідженні [9] за тих самих умов CT дорівнює приблизно 0,10 для *E. coli*, вирощеної в пакетному режимі, та приблизно 0,75 для культур, вирощених у хемостаті (D = 0,40 год; S_g = 0,16 % поживного бульйону). Якщо припустити кінетику першого порядку, значення CT для 99,9 та 99,99 %% інактивації дорівнюють приблизно 0,20 та 0,75 відповідно, що фактично спостерігається з культурами, вирощеними в пакетному режимі. Однак значення CT (для 99,9 та 99,99 %% інактивації) для культур, вирощених у хемостаті, становлять приблизно 1,5 та 11,3 відповідно. Таким чином, використання культур, вирощених за неоптимальних умов у хемостаті, та врахування фракції, що вижила після 99 % інактивації, дає різну інформацію щодо прогнозу CT. З такими вірулентними патогенами, як *L. pneumophila*, виживання фракції від 10^{-4} до 10^{-6} може становити значну загрозу для здоров'я. Підвищена стійкість природних популяцій *L. pneumophila* порівняно з популяціями, вирощеними на агаровому середовищі, також була повідомлена при використанні хлору як дезінфікуючого засобу [33]. Інші хлоррезистентні патогени, що передаються у воді, наприклад, мікобактерії, виявилися дедалі важливішими як загроза для здоров'я населення [34].

Оскільки стійка фракція створює потенціал для повторної колонізації систем водорозподілу, доцільно оцінювати ефективність процесів очищення шляхом

моніторингу цієї популяції, на додаток до звичайного контролю початкових показниках інактивації, які використовуються для оцінки дезінфікуючих засобів та мікробних забруднювачів, що становлять занепокоєння для громадського здоров'я.

Використання хемостата є інноваційною методологією оцінки антимікробних засобів у лабораторії та може бути кращим за використання звичайних методів періодичного культивування. Моделювання в лабораторії екологічної системи може забезпечити дослідження популяцій, які точніше наближаються до стійкості при польовій оцінці. Оскільки поведінка патогена *L. pneumophila* була подібною до поведінки індикаторної *E. coli*, описана тут методологія може бути застосована і до інших видів бактерій.

Література

1. Chick, H. (1908). An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene, 8*, 92–157.
2. Rahn, O. (1929). The size of bacteria as the cause of the logarithmic order of death. *Journal of General Physiology, 13*(2), 179–183.
3. Rahn, O. (1930). The non-logarithmic order of death of some bacteria. *Journal of General Physiology, 13*(3), 395–399.
4. Gard, S. (1957). Chemical inactivation of viruses. In *Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses* (pp. 162–174). Ciba Foundation.
5. Moats, W. A. (1971). Kinetics of thermal death of bacteria. *Journal of Bacteriology, 105*, 165–171. https://doi.org/10.1128/jb.105.1.165-171.1971
6. Wang, W. L. L., Blaser, M. J., Craven, D. E., & Steigerwalt, A. G. (1979). Growth, survival, and

resistance of Legionnaires' disease bacterium. *Annals of Internal Medicine, 90*(4), 614–618. https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-614

7. Tison, D. L., & Seidler, R. J. (1983). Legionella incidence and density in potable drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology, 45*(1), 337–339. https://doi.org/10.1128/aem.45.1.337-339.1983
8. Plouffe, J. F., Webster, L. R., Hackman, B., & Hackman, W. (1983). Relationship between colonization of hospital buildings with *Legionella pneumophila* and hot water temperatures. *Applied and Environmental Microbiology, 46*(4), 769–770. https://doi.org/10.1128/aem.46.4.769-770.1983
9. Berg, J. D., Hoff, J. C., Roberts, P. V., & Matin, A. (1988). Resistance of bacterial subpopulations to disinfection by chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 80*(9), 115–119. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1988.tb03016.x
10. Berg, J. D. (1984). *Effect of the antecedent growth environment on the sensitivity of Legionella pneumophila and Escherichia coli to chlorine dioxide* [Doctoral dissertation, Stanford University]. Stanford University, CA.
11. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1982). Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 44*, 814–819. https://doi.org/10.1128/aem.44.4.814-819.1982
12. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1983). Growth of disinfectant-resistant bacteria and simulation of natural aquatic environments in the chemostat. In R. L. Jolley (Ed.), *Water chlorination: Environmental impact*

and health effects (Vol. 4). Ann Arbor Science Publishers.

13. Sharp, D. G. (1976). *Virion aggregation and disinfection of water viruses by bromine.* U.S. Environmental Protection Agency.
14. Wei, J. H., & Chang, S. L. (1975). A multi-Poisson distribution model for treating disinfection data. In J. D. Johnson (Ed.), *Disinfection of water and wastewater.* Ann Arbor Science Publishers.
15. Hiatt, C. W. (1964). Kinetics of the inactivation of viruses. *Bacteriological Reviews, 28*, 150–163.
16. Olivieri, V. P., et al. (1971). Inactivation of virus in sewage. *Journal of the Sanitary Engineering Division, ASCE, 97*, 661–672.
17. Waite, T. D. (1978). Inactivation of *Salmonella* sp., *Shigella* sp., and F2 virus by iron(VI) ferrate. Paper presented at the *American Water Works Association Annual Conference*, Atlantic City, NJ.
18. Watson, H. E. (1908). A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene, 8*(3), 536–542.
19. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Pollution Control Federation (WPCF). (1976). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* Washington, DC: APHA.
20. Withell, E. R. (1942). The significance of the variation in shape of time-survivor curves. *Journal of Hygiene, 42*, 124–131.
21. Milbauer, E., & Grossowicz, N. (1959). Effect of growth conditions on chlorine sensitivity of *Escherichia coli. Applied Microbiology, 7*, 71–76.
22. Chai, T.-J. (1983). Characteristics of *E. coli* grown in bay water as compared with rich medium. *Applied and*

Environmental Microbiology, 45, 1316–1320. https://doi.org/10.1128/aem.45.4.1316-1323.1983

23. Haas, C. N., & Morrison, E. C. (1981). Repeated exposure of *E. coli* to free chlorine: Production of strains possessing altered sensitivity. *Water, Air, and Soil Pollution, 16*, 233–242.
24. Noss, C. I., & Olivieri, V. P. (1985). Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. *Applied and Environmental Microbiology, 50*, 1162–1164. https://doi.org/10.1128/br.28.2.150-163.1964
25. Berg, J. D., Roberts, P. V., & Matin, A. (1985). Disinfection resistance of *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* grown in continuous and batch culture. In R. L. Jolley (Ed.), *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 5). Ann Arbor Science Publishers.
26. Berg, J. D., Roberts, P. V., & Matin, A. (1986). Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli. Journal of Applied Bacteriology, 60*, 213–220. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01075.x.
27. Severin, B. F., Suidan, M. K., & Englebrecht, R. S. (1983). Kinetic modelling of U.V. disinfection of water. *Water Research, 17*, 1669–1678. https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90116-6
28. Aieta, E. M., & Roberts, P. V. (1983). Disinfection with chlorine and chlorine dioxide. *Journal of Environmental Engineering, ASCE, 109*, 783–802. https://doi.org/10.1061/JEEGAV.0000885
29. Roberts, P. V., et al. (1980). *Chlorine dioxide for wastewater disinfection* (Technical Report No. 251). Stanford University.
30. Kinney, E. C., Drummond, D. W., & Hanes, N. B. (1978). Effects of chlorination on differentiated

coliform groups. *Journal of the Water Pollution Control Federation, 50*, 2307–2315.
31. Hoff, J. C. (1986). *Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants* (EPA Project Summary No. EPA/600/S2-86/067). Water Engineering Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
32. Olivieri, V. P. (1985). Human pathogens, disinfection, and chlorine. In R. L. Jolley (Ed.), *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 5). Ann Arbor Science Publishers.
33. Kuchta, J. M., States, S. J., McGlaughlin, J. E., Overmeyer, J. H., Wadowsky, R. M., McNamara A. M., Wolford, R. S., & Yee R. B. (1985). Enhanced chlorine resistance of tap water–adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium–passaged strains. *Applied and Environmental Microbiology, 50*, 21–26. https://doi.org/10.1128/aem.50.1.21-26.1985.
34. du Moulin, G. C., & Stottmeier, K. D. (1986). Waterborne mycobacteria: An increasing threat to health. *ASM News, 52*, 525–529.

2.4 Кінетика і механізм інактивації діоксидом хлору *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* при знезараженні води

У роботі [1] автори оцінили ефективність діоксиду хлору як дезінфікуючого засобу проти *Escherichia coli* (ATCC 35218) за різних робочих умов очищення води, а також запропонували бактерицидний механізм. Детально досліджено кінетику та механізм у буферизованій (без потреби в оксиданті) воді (ODF) як функцію концентрації дезінфікуючого засобу (0,5-5,0 мг/л), pH води (6,5-8,5), коливань температури (4-37°C) та щільності бактерій (10^5-

10^7 КУО/мл). Також вивчали вплив ClO_2 на морфологію бактеріальних клітин, проникність зовнішньої мембрани, порушення цитоплазматичної мембрани та внутрішньоклітинну ферментативну активність для з'ясування механізму дії на клітини. Збільшення температури та концентрації дезінфікуючого засобу було пропорційним швидкості знищення клітин, але ефективність виявилася значно зниженою при 0,5 мг/л та менше залежала від щільності бактерій. Бактерицидна ефективність була вищою при лужному pH 8 порівняно з нейтральним та слабокислим pH 7 та 6,5 відповідно. Кінетичні криві дезінфекції відповідали двофазній схемі швидкої інактивації протягом перших 2 хвилин, після чого спостерігалося зменшення навіть за наявності залишкового біоциду. Криві були адекватно описані моделлю Cavg Hom. Зображення бактеріальних клітин, отримані за допомогою електронної мікроскопії, що зазнали впливу летальних концентрацій ClO_2, показали дуже незначне морфологічне пошкодження зовнішніх мембран клітин. Виявлено, що ClO_2 збільшує проникність зовнішніх і цитоплазматичних мембран, що призводить до витоку мембранних компонентів, таких як поглинаючі матеріали з довжиною хвилі 260 нм, та пригнічує активність внутрішньоклітинного ферменту β-D-галактозидази. Порушення цитоплазматичної мембрани та подальший витік внутрішньоклітинних компонентів призводять до інактивації грамнегативних бактерій.

Однак добре відомо, що внутрішня чутливість мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів значно варіюється [2, 3]. Тому відповідне визначення оптимальних робочих умов дезінфікуючого засобу частково залежатиме від цільового організму. Таким чином, необхідні ширші дані щодо дезінфекції інших видів бактерій діоксидом хлору.

Pseudomonas aeruginosa – це грамнегативна бактерія, яка повсюдно поширена в навколишньому середовищі та здатна адаптуватися до різних умов. Її також можна знайти у воді, зокрема в басейнах, гідромасажних ваннах та водопровідній воді [4-6]. Дійсно, передача через лікарняну водопровідну воду була описана як дуже значуща [7]. Є навіть повідомлення про виділення *P. aeruginosa* з бутильованої води [6]. Її часто описують як умовно-патогенний мікроорганізм через зв'язок із небезпечними для життя захворюваннями у пацієнтів з опіками, після операцій та осіб з ослабленим імунітетом у лікарняних умовах. Вона також є поширеною причиною інфекцій у пацієнтів, які страждають на муковісцидоз [8].

Staphylococcus aureus поширений у різних харчових продуктах (м'ясо та молоко) [9, 10], а також у зразках води з навколишнього середовища [11, 12]. Штами метицилін-резистентного золотистого стафілокока (MRSA) останнім часом привернули особливу значну увагу через ризики передачі потенційних інфекцій від тварин до людини [13].

У попередніх дослідженнях з моніторингу ефективності діоксиду хлору в боротьбі з цими штамами бактерій використовувалися відносно високі концентрації дезінфікуючого засобу [14, 15]. Однак такі концентрації можуть не підходити для задоволення нормативних вимог при дезінфекції питної води. Більше того, наявні дані із систематичного дослідження в літературі, що стосується використання діоксиду хлору для інактивації *P. aeruginosa* та *S. aureus*, досить обмежені.

У роботі [16] вивчали кінетику інактивації *P. aeruginosa* та *S. aureus* діоксидом хлору за різних умов концентрації окиснювача, pH води, температури та початкової щільності бактерій. Також досліджували бактерицидний механізм дії діоксиду хлору на штами бактерій.

2.4.1 Кінетика інактивації за різних концентрацій діоксиду хлору

Рівні логарифмічної інактивації для дезінфекції *P. aeruginosa* та *S. aureus* діоксидом хлору зведені на рис. 2.7.

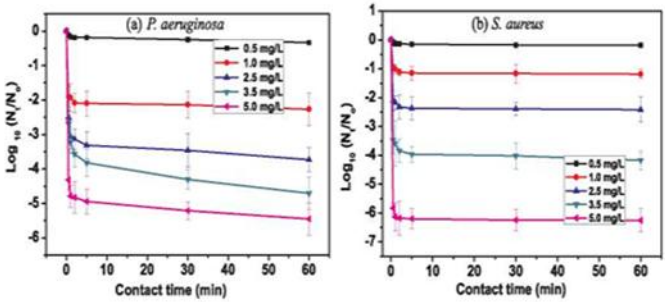

Рис. 2.7 Кінетика інактивації *P. aeruginosa* та *S. aureus* діоксидом хлору при різних концентраціях окиснювача. Дані отримані при pH 8,05 та 22 ± 2 °C.

Як і очікувалося, досягнуті рівні інактивації загалом збільшувалися зі збільшенням початкової концентрації діоксиду хлору. Криві інактивації за різних застосованих доз були типово нелінійними, але радше характеризувалися швидким початковим експоненціальним зменшенням популяції бактерій, за яким слідувала повільна кінетична фаза. Більше того, відповідні рівні інактивації були переважно функцією застосованої дози порівняно з впливом часу контакту. Це було видно зі спостереження, що за будь-якої застосованої концентрації діоксиду хлору відмінності в рівні логарифмічної інактивації, отримані при t = 2 хв та t = 60 хв, були переважно статистично незначущими ($p > 0,05$). Таким

чином, це свідчить про те, що використання CT (концентрація дезінфікуючого засобу, C x час контакту, T) для оцінки ефективності інактивації є певним чином ненадійним.

Тим часом, при порівнянні чутливості бактеріальних штамів врахування рівня логарифмічного зниження інактивованих клітин є життєво важливим. При дозі ClO_2 1,0 мг/л спостерігалося ~2,0 логарифмічне зниження *P. aeruginosa*, тоді як доза 2,5 мг/л була достатньою для досягнення щонайменше 2,0 логарифмічного зниження у випадку *S. aureus*. Навпаки, коли клітини піддавалися впливу 5,0 мг/л, було отримано приблизно 5-логарифмічне та 6-логарифмічне зниження для *P. aeruginosa* та *S. aureus* відповідно. Запропоновано кілька інтерпретацій цього явища, головною з яких є гіпотеза про хімічну дезінфекцію [17]. Згідно з цим принципом, штам бактерій складається з субпопуляцій різних фракцій (залежно від типу мікроорганізму), які за своєю суттю мають різну чутливість до дезінфікуючого засобу, що піддається впливу в певний момент часу [18]. Можна припустити, що більш чутливі фракції *P. aeruginosa* швидко інактивуються при концентрації 1,0 мг/л, тоді як для ефективного знищення відносно більш стійких субпопуляцій потрібні вищі концентрації діоксиду хлору. Аналогічно, для значної зміни популяції *S. aureus* через наявність більш стійких фракцій потрібні відносно вищі дози. Зниження швидкості інактивації, яке призводить до повільної кінетичної фази, є прямим наслідком різноманітності бактеріальної популяції, що має різні реакції на різні концентрації дезінфікуючого засобу. Однак, слід зазначити, що концентрація 0,5 мг/л була практично неактивною для штамів бактерій, що розглядалися в цьому дослідженні. Наприклад, незважаючи на час контакту для реакції протягом 1 години

було отримано менше 0,3 логарифмів інактивації. Зазвичай, у питній воді рекомендується, щоб застосовувана доза не перевищувала 1,5 мг/л [19]. Згідно з результатами [16], такі концентрації можуть бути недостатніми для води, що містить велику кількість бактеріальної популяції.

Розраховані константи швидкості інактивації та параметри моделі Cavg Hom показали нелінійну характеристику інактивації діоксидом хлору P. *aeruginosa, S. aureus,* а також *E. coli* [1] у воді.

2.4.2 Вплив pH на дезінфекцію бактерій діоксидом хлору

Зміна pH води на кінетику інактивації бактерій діоксидом хлору показано на рис. 2.8.

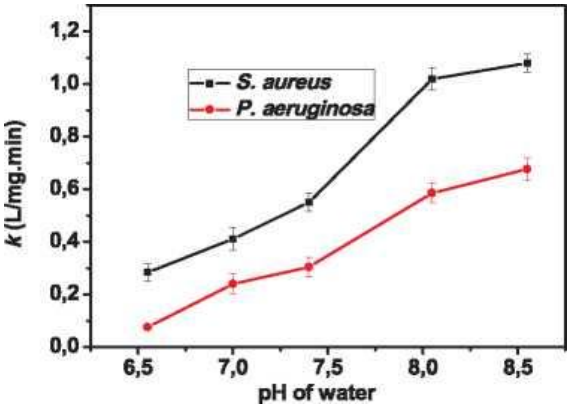

Рис. 2.8 Вплив зміни pH води на константи швидкості інактивації *P. aeruginosa* та *S. aureus* під впливом 2,0 мг/л діоксиду хлору при температурі 22 ± 2 °C.

Графік зображує константи швидкості інактивації як кінетичної реакції псевдопершого порядку між

діоксидом хлору та клітинами бактерій за різних умов pH води. Слід підкреслити, що для всіх експериментів з інактивації початкова щільність бактерій не залежала від жодних умов pH, що розглядалися в цьому дослідженні. При визначенні констант швидкості враховувалася лише швидка початкова фаза, яка слідувала за кінетикою першого порядку, оскільки різниця між логарифмічними даними інактивації в точках переходу та кінцем фази хвоста кінетичних кривих виявилася значною мірою статистично незначущою ($p > 0,05$).

Швидкість інактивації бактерій суттєво зростала зі збільшенням pH і найефективніші рівні інактивації були зареєстровані в лужних умовах pH. За аналогічних експериментальних умов зміна pH від 6,5 до 8,5 призвела приблизно до 4-кратного та 7-кратного збільшення швидкості інактивації *S. aureus* та *P. aeruginosa* відповідно. Ці результати переконливо вказують на суттєвий вплив pH води на ефективність дезінфекції діоксидом хлору. Роль pH значною мірою стала предметом суперечок серед дослідників. Широко визнано, що на відміну від вільного хлору, ефективність діоксиду хлору охоплює широкий діапазон умов pH [20, 21] і практично не залежить від змін pH води. І навпаки, інші дослідники повідомляли про значний вплив pH на ефективність інактивації мікробів діоксидом хлору [22, 23].

Було висловлено припущення, що спостережувана підвищена реакційна здатність діоксиду хлору в лужних умовах може бути пов'язана з утворенням більш реакційноздатних перехідних частинок, що складаються з іонів OH^-, діоксиду хлору та субстрату [24]. Також було припущено, що тут мають місце швидкі реакції діоксиду хлору з цистеїном та глутатіоном в лужних умовах, які є важливими компонентами активності кількох ферментатів у бактеріальних клітинах [25]. У попередній роботі [1]

автори вказали, що лужні умови pH прискорюють швидкість розпаду діоксиду хлору [26, 27], а механізм цього процесу підвищує швидкість окислення мікробних клітин. На цьому етапі висока ефективність інактивації в лужних умовах pH є непереконливою. На практиці існують побоювання, що в таких умовах залишкові дози в системах розподілу питної води, ймовірно, розкладаються швидше, що піддає воду повторному забрудненню в системі розподілу [26]. Таким чином, бажано поєднувати діоксид хлору з більш стабільними дезінфікуючими засобами, такими як монохлорамін або вільний хлор [28].

2.4.3 Вплив температури.

Температура є важливим фізичним параметром, який впливає на ефективність хімічних дезінфікуючих засобів. Вплив температури на константи швидкості інактивації псевдопершого порядку після впливу на штами бактерій діоксиду хлору концентрацією 2,0 мг/л показано на рис. 2.9.

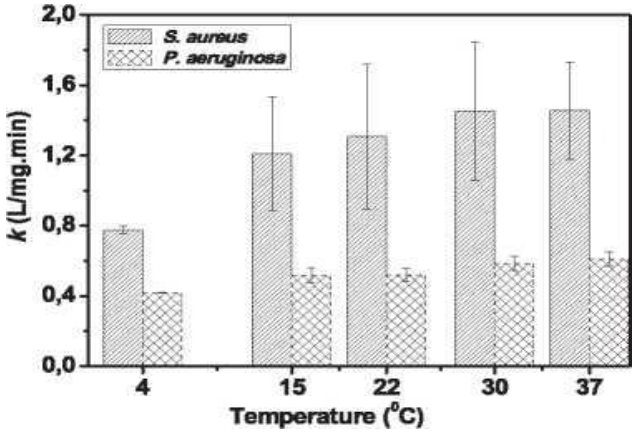

Рис. 2.9 Зміна температури води від констант швидкості інактивації k для *P. aeruginosa* та *S. aureus* під впливом 2,0 мг/л діоксиду хлору (pH 8,05).

Константи швидкості визначалися з швидкої початкової фази або логарифмічної області кривих дезінфекції, що відповідає кінетиці першого порядку [29]. Значна різниця ($p < 0,05$) між константами швидкості інактивації в розглянутому діапазоні температур спостерігалася як для *P. aeruginosa*, так і для *S. aureus*. Зокрема, для *S. aureus* підвищення температури з 4 °C до 15 °C призвело до збільшення швидкості інактивації приблизно на 56%. Загалом, швидкість інактивації постійно зростала зі збільшенням температури від 15 °C до 37 °C.

Оскільки хімічну дезінфекцію часто ототожнюють з хімічними реакціями [17], вважається, що підвищена активність дезінфекційного засобу з температурою значною мірою зумовлена збільшенням ефективних зіткнень молекул дезінфекційного засобу з бактеріальними клітинами з ініціацією окислювальних процесів, що призводять до загибелі клітин.

2.4.4 Вплив початкової щільності бактерій

Також вивчався вплив початкової щільності бактерій на ефективність діоксиду хлору. На рис. 2.10 показано кінетику інактивації, коли бактеріальні штами піддавалися впливу концентрацій, достатніх для отримання щонайменше 2 логарифмів інактивації.

Загалом, не було отримано суттєвої різниці ($p > 0,05$) між константами швидкості інактивації при різних щільностях бактерій для кожного з досліджуваних

мікроорганізмів. Подальше порівняння результатів, де початкова щільність підтримувалася на рівні ~10^8 КУО/мл, свідчить про те, що за подібних експериментальних умов швидкість інактивації та, власне, логарифми інактивації мікроорганізму під впливом діоксиду хлору, будуть менше залежати від початкової щільності бактерій.

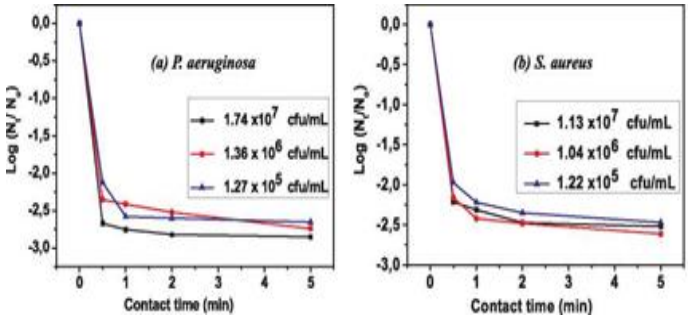

Рис. 2.10 Кінетика інактивації бактерій діоксидом хлору при різних початкових щільностях: (a) *P. aeruginosa* під впливом 1,0 мг/л, та (b) *S. aureus* під впливом 2,5 мг/л ClO_2.

У подібному дослідженні в реакторі періодичної дії [30] продемонстровано, що початкова щільність бактерій *E. coli*, вирощених до стаціонарної фази, була статистично значущим фактором у швидкості інактивації монохлораміном, але це не стосувалося клітин в експоненціальній фазі. В іншій пов'язаній роботі з монохлораміном та озоном для клітин *E. coli* та спор *Bacillus subtilis* [31] встановлено, що вплив початкової щільності був пов'язаний лише з реакцією монохлораміну з *E. coli* стаціонарної фази. Таким чином, було зроблено висновок, що вплив початкової щільності на дезінфекцію залежить від фази росту та типу цільового мікроорганізму.

Кворум-сенсорика в бактеріальних клітинах – це механізм міжклітинної комунікації, який використовується окремими клітинами для оцінки експресії генів, градієнта дифузії та локальної щільності в багатоклітинній поведінці [32, 33]. Це явище пов'язують з індукцією резистентності серед клітин високої щільності до антибіотиків та антимікробних препаратів [34]. Однак у роботі [16] в експериментальних умовах цей ефект не спостерігався, ймовірно, тому, що діоксид хлору як сильний окиснювач впливає на кілька ділянок [35, 36] всередині клітини. Це робить малоймовірним розвиток резистентності клітинами за допомогою специфічних механізмів експресії генів, або, скоріше, клітини піддавалися впливу відносно високої концентрації дезінфікуючого засобу.

2.4.5 Проникність зовнішньої клітинної мембрани

Потенціал діоксиду хлору порушувати цілісність зовнішньої клітинної мембрани та його внесок у бактерицидний механізм оцінювали за допомогою аналізу поглинання NPN (1-N-phenylnaphthylamine). Зовнішня клітинна мембрана є відмінною рисою грамнегативних бактерій [37], тому аналіз NPN проводився лише з *P. aeruginosa*. Вплив діоксиду хлору призвів до значного збільшення поглинання хромогенного зонда NPN залежно від концентрації. Наприклад, обробка клітин концентраціями діоксиду хлору 1,0; 2,5 та 5,0 мг/л призвела до середнього поглинання приблизно 17%, 47% та 83% відповідно від поглинання, індукованого 1,0 М ЕДТА, який є добре відомим мембранопроникним агентом.

Зовнішній шар зовнішньої мембрани *P. aeruginosa* складається переважно з ліпополісахаридів і функціонує як ефективний бар'єр проникності для зовнішніх гідрофобних

або ліпофільних молекул, включаючи NPN [38]. Однак, коли цілісність зовнішньої мембрани порушується зовнішніми агентами, молекули NPN проникають у фосфоліпідне середовище внутрішнього шару зовнішньої мембрани, створюючи підвищену інтенсивність флуоресценції, величина якої залежить від кількості молекул зонда, що потрапляють у клітини. Навпаки, молекули NPN у зовнішньому водному середовищі, як правило, спричиняють слабку інтенсивність флуоресценції. Результати вказують на те, що вплив діоксиду хлору на бактерії порушив неушкоджені зовнішні ліпополісахаридні мембрани та дозволив проникнення хромогенних молекул NPN [39]. Це призвело до підвищеної інтенсивності флуоресценції, вираженої як поглинання. Збільшення концентрації діоксиду хлору також призвело до більшого поглинання NPN, що може свідчити про збільшення кількості бактеріальних клітин, зовнішні мембрани яких були змінені. Таким чином, зміна мембрани може відповідати збільшенню інактивації або загибелі клітин.

2.4.6 Вивільнення поглинаючих матеріалів з довжиною хвилі 260 нм

Бактеріальна цитоплазматична мембрана є місцем життєво важливих клітинних процесів, таких як дихання, синтез ліпідів та компонентів клітинної стінки, підтримка гомеостатичних умов, а також контроль кількох метаболічних процесів клітини [37]. Вона переважно складається з напівпроникного фосфоліпідного бішару з вбудованими білками та регулює перенесення розчинених речовин та метаболітів у клітину та з неї. Порушення цитоплазматичної мембрани призводить до викиду критично важливих внутрішньоклітинних компонентів клітини, таких як нуклеїнові кислоти (ДНК та РНК), які

сильно поглинають УФ-світло при 260 нм, у навколишній матрикс [39].

На рис. 2.11 графіки показують вивільнення ядерних матеріалів після впливу на клітинні суспензії різних концентрацій діоксиду хлору. Криві поглинання ілюструють співвідношення клітин, оброблених діоксидом хлору, до необроблених клітин, що використовуються як контроль. Це співвідношення зазвичай характеризуються різким збільшенням протягом перших 10 хвилин вимірювання та стабільним після цього.

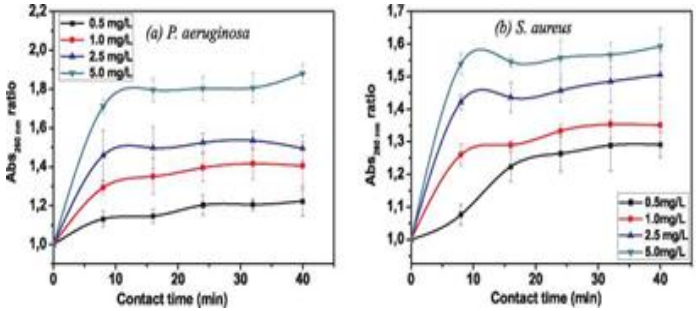

Рис. 2.11 Вплив обробки ClO_2 на вивільнення поглинаючих матеріалів 260 нм з (a) *P. aeruginosa* та (b) *S. aureus*. Дані поглинання виражені як співвідношення клітин, оброблених ClO_2, до необроблених клітин.

При концентрації 5,0 мг/л спостерігалося майже 1,8 та 1,6-кратне збільшення поглинаючих матеріалів при 260 нм для *P. aeruginosa* та *S. aureus* відповідно через 40 хвилин контакту. Також виявлено збільшення кількості внутрішньоклітинних ядерних матеріалів, що вивільняються в позаклітинний матрикс, з початковою концентрацією діоксиду хлору, і ця тенденція була очевидною для обох мікроорганізмів. Також

спостерігалася сильна кореляція між максимальним рівнем інактивації, отриманим для заданої концентрації, та максимальною кількістю вивільнених поглинаючих матеріалів при 260 нм, визначеною за допомогою вимірювань абсорбції.

Діоксид хлору є сильним окиснювачем, який інактивує мікробні клітини шляхом окислення. Його реакції протікають шляхом відщеплення одного електрона від реакційноздатних органічних субстратів бактеріальних клітин. Можливі місця ініціювання реакцій окислення залежать від селективної реакційної здатності діоксиду хлору до органічних функціональних груп або сполук. Наприклад, діоксид хлору реагує повільно або практично не реагує з первинними амінами та ненасиченими жирними кислотами [40]. Однак, було виявлено, що реакції з амінокислотами, такими як цистеїн, тирозин та триптофан, є швидкими [25] і тому вважаються сприятливими реакційними місцями для ініціювання реакцій з цитоплазматичною мембраною. Також було продемонстровано, що діоксид хлору піддається надзвичайно швидким реакціям окислення з нікотинамідаденіндинуклеотидом (НАДН), який є ключовим коферментом у багатьох біологічних окисно-відновних реакціях, а також у синтезі аденозинтрифосфату (АТФ) [41]. Пов'язування цих результатів, таким чином, дозволяє припустити, що після проникнення через зовнішню мембрану бактеріальної клітини діоксид хлору далі націлюється на цитоплазматичну мембрану та окислюється шляхом окисно-відновних реакцій з більш реакційноздатними відновлювальними сполуками в мембрані. Малоймовірно, що реакції з певною цільовою групою сполук або компонентів клітини можуть бути відповідальними за загибель клітин. Натомість, реакції з кількома мішенями всередині клітини можуть зрештою

накопичуватися, порушуючи життєво важливі метаболічні процеси та призводячи до втрати активності або інактивації.

2.4.7 Зміни в морфології клітин

Вплив обробки діоксидом хлору на морфологію бактеріальних клітин оцінювали за допомогою трансміссійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Репрезентативні електронні мікрофотографії, що показують морфологію клітин *S. aureus* та *P. aeruginosa* до та після обробки, представлені на рис. 2.12. Типові клітини коккоподібної форми з чітко окресленими неушкодженими внутрішніми та зовнішніми мембранами спостерігалися до та після обробки *S. aureus*. Видимі морфологічні пошкодження структури клітин, спричинені діоксидом хлору, не були помітними.

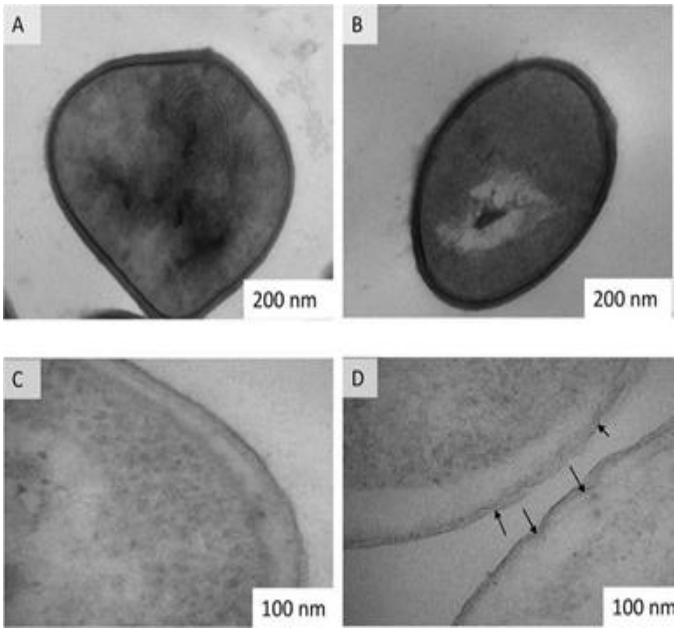

Рис. 2.12 Типові ТЕМ-мікрофотографії бактеріальних клітин до та після обробки 4,0 мг/л ClO_2 (22 ± 2 °C, pH 8,0). (A) *S. aureus* до обробки, (B) *S. aureus* після обробки, (C) *P. aeruginosa* до обробки, (D) *P. aeruginosa* після обробки.

Однак, у оброблених клітин *P. aeruginosa* спостерігалося деяке очевидне збільшення шорсткості та невеликі заглиблення на зовнішніх поверхнях клітин (як показано стрілками). Подальший аналіз зображень також показав значне збільшення ($p < 0,05$) товщини клітинної стінки *P. aeruginosa* після обробки діоксидом хлору (середня товщина до обробки становила 33,85 ± 5,30 нм, а після обробки - 55,43 ± 6,58 нм). З іншого боку, товсті пептидогліканові клітинні стінки грампозитивного *S.*

aureus могли підвищити стійкість клітинної стінки до видимих пошкоджень. Незважаючи на це, з цих спостережень очевидно, що діоксид хлору не окислює та не інактивує бактеріальні клітини, завдаючи грубих морфологічних пошкоджень. Ще цікавіше узгодити, як він індукує збільшення проникності зовнішньої цитоплазматичної мембрани без лізису клітин. Однак, діоксид хлору є високоселективним мономерним вільним радикалом [36], який має потенціал дифундувати через мембрани та реагувати з більш реакційноздатними фрагментами клітинних компонентів, такими як глутатіон, триптофан та цистеїн. Витік життєво важливих клітинних компонентів може суттєво сприяти загальній інактивації бактерій.

Висновки

У цій роботі [16] досліджено кінетику діоксиду хлору як дезінфікуючого засобу при інактивації *P. aeruginosa* та *S. aureus*. Результати показали, що діоксид хлору інактивує бактеріальні клітини не шляхом лізису, а шляхом дифузії через зовнішні та цитоплазматичні мембрани, збільшуючи їхню проникність та викликаючи вивільнення життєво важливих компонентів клітин, що призводить до їхньої інактивації.

Література

1. Ofori, S., Maddila, J., Lin, S. B., & Jonnalagadda, S. B. (2017). Chlorine dioxide oxidation of Escherichia coli in water: A study of the disinfection kinetics and mechanism. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 52(6), 598–606.

https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1293993
2. Tumah, H. N. (2009). Bacterial biocide resistance. Journal of Chemotherapy, 21(1), 5–15.
3. Russell, A. D. (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. Journal of Applied Microbiology, 92(S1), 1S–3S. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.1.x
4. Lefebvre, X., Bertrand, X., Quantin, C., Vanhems, P., Lucet, J. C., Nuemi, G., Astruc, K., Chavanet, P., & Aho-Glele, L. S. (2017). Association between Pseudomonas aeruginosa positive water samples and healthcare-associated cases: Nine-year study at one university hospital. Journal of Hospital Infection, 96(3), 238–243. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.01.011
5. Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Vol. 201, pp. 71–115). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3
6. Caskey, S., Stirling, J., Moore, J. E., & Rendall, J. C. (2018). Occurrence of Pseudomonas aeruginosa in waters: Implications for patients with cystic fibrosis. Letters in Applied Microbiology, 66(6), 537–541. https://doi.org/10.1111/lam.12872
7. Garvey, M. I., Bradley, C. W., Tracey, J., & Oppenheim, B. (2016). Continued transmission of Pseudomonas aeruginosa from a wash hand basin tap in a critical care unit. Journal of Hospital Infection, 94(1), 8–12. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.05.017
8. Pier, G. B. (2012). The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. Journal of Experimental Medicine, 209(7), 1235–1239. https://doi.org/10.1084/jem.20120463
9. Teramoto, H., Salaheen, S., & Biswas, D. (2016).

Contamination of post-harvest poultry products with multidrug resistant Staphylococcus aureus in the Maryland–Washington DC metro area. Food Control, 65, 132–135. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.030

10. El Haddad, L., Roy, J. P., Khalil, G. E., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Labrie, S., & Moineau, S. (2016). Efficacy of two Staphylococcus aureus phage cocktails in cheese production. International Journal of Food Microbiology, 217, 7–13. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.022
11. Hatcher, S. M., Myers, K. W., Heaney, C. D., Larsen, J., Hall, D., Miller, M. B., & Stewart, J. R. (2016). Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in surface waters near industrial hog operation spray fields. Science of the Total Environment, 565, 1028–1036. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.184
12. Ben Said, M., Abbassi, M. S., Gomez, P., Ruiz-Ripa, L., Sghaier, S., Ibrahim, C., Torres, C., & Hassen, A. (2017). Staphylococcus aureus isolated from wastewater treatment plants in Tunisia: Occurrence of human and animal associated lineages. Journal of Water and Health, 15(5), 638–643. https://doi.org/10.2166/wh.2017.283
13. Aires-de-Sousa, M. (2017). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus among animals: Current overview. Clinical Microbiology and Infection, 23(6), 373–380. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002
14. Behnke, S., & Camper, A. K. (2012). Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm, and planktonic cells. Biofouling, 28(7), 635–647. https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700705

15. Hinenoya, A., Awasthi, S. P., Yasuda, N., Shima, A., Morino, H., Koizumi, T., Fukuda, T., Miura, T., Shibata, T., & Yamasaki, S. (2015). Chlorine dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multidrug-resistant Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter baumannii. Japanese Journal of Infectious Diseases, 68(4), 276–279. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.489
16. Ofori, I., Maddila, S., Lin, J., & Jonnalagadda, S. B. (2018). Chlorine dioxide inactivation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in water: The kinetics and mechanism. Journal of Water Process Engineering, 26, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.09.001
17. Lambert, R. J., & Johnston, M. D. (2000). Disinfection kinetics: A new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. Journal of Applied Microbiology, 88(5), 907–913. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01057.x
18. Najm, I. (2006). An alternative interpretation of disinfection kinetics. Journal of the American Water Works Association, 98(2), 93–101.
19. Gray, N. F. (2014). Chlorine dioxide. In Microbiology of Waterborne Diseases (2nd ed., pp. 591–598). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00031-4
20. Huang, J., Wang, L., Ren, N., & Ma, F. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Water Research, 31(3), 607–613. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8
21. Chang, C.-Y., Hsieh, Y.-H., Hsu, S.-S., Hu, P.-Y., & Wang, K.-H. (2000). The formation of disinfection by-products in water treated with chlorine dioxide. Journal of Hazardous Materials, 79(1–2), 89–102.

https://doi.org/10.1016/S0304-3894(00)00379-7
22. Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., Xue, B., Wang, Y., Zhu, D., & Wang, X. (2013). Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. Environmental Science & Technology, 47(9), 4590–4597. https://doi.org/10.1021/es3048693
23. Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. Applied and Environmental Microbiology, 71(6), 3100–3105. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3100-3105.2005
24. Nadupalli, S., Koorbanally, N., & Jonnalagadda, S. (2011). Chlorine dioxide-facilitated oxidation of the azo dye amaranth. Journal of Physical Chemistry A, 115(42), 11682–11688. https://doi.org/10.1021/jp2052106
25. Ison, I. N., Odeh, I. N., & Margerum, D. W. (2006). Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. Inorganic Chemistry, 45(21), 8768–8775. https://doi.org/10.1021/ic061342b
26. Liu, U., von Gunten, U., & Croué, J.-P. (2013). Enhanced chlorine dioxide decay in the presence of metal oxides: Relevance to drinking water distribution systems. Environmental Science & Technology, 47(15), 8365–8372. https://doi.org/10.1021/es4011756
27. Odeh, I. N., Francisco, J. S., & Margerum, D. W. (2002). New pathways for chlorine dioxide decomposition in basic solution. Inorganic Chemistry, 41(25), 6500–6506. https://doi.org/10.1021/ic0257318
28. Brandt, M. J., Johnson, K. M., Elphinston, A. J., & Ratnayaka, D. D. (2017). Disinfection of water. In Twort's Water Supply (7th ed., pp. 475–511).

Butterworth-Heinemann.
29. Ortega-Gomez, E., Fernandez-Ibanez, P., Ballesteros Martin, M. M., Polo-Lopez, M. I., Esteban Garcia, B., & Sanchez Perez, J. A. (2012). Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on Enterococcus faecalis survival. Water Research, 46(19), 6154–6162. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.059
30. Kaymak, C., & Haas, C. N. (2008). Effect of initial microbial density on inactivation of Escherichia coli by monochloramine. Journal of Environmental Engineering and Science, 7(3), 237–245. https://doi.org/10.1139/S08-003
31. Li, L. (2004). Effect of initial microbial density on the disinfection efficiency in a continuous flow system and validation of disinfection batch kinetics in a continuous flow system (Doctoral dissertation, Drexel University).
32. Siddiqui, M. F., Rzechowicz, M., Harvey, W., Zularisam, A. W., & Anthony, G. F. (2015). Quorum sensing-based membrane biofouling control for water treatment: A review. Journal of Water Process Engineering, 7, 112–122. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.02.009
33. Turan, N. B., Chormey, D. S., Buyukpinar, C., Engin, G. O., & Bakirdere, S. (2017). Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. Trends in Analytical Chemistry, 91, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.004
34. Roy, V., Adams, B. L., & Bentley, W. E. (2011). Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. Enzyme and Microbial Technology, 49(2), 113–123. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.001
35. Berg, J., Roberts, P., & Matin, A. (1986). Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of

Escherichia coli. Journal of Applied Bacteriology, 60(3), 213–220. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01094.x

36. Noszticzius, Z., Wittmann, M., Kály-Kullai, K., Beregvári, Z., Kiss, I., Rosivall, L., & Szegedi, J. (2013). Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. PLoS ONE, 8(11), e79157. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079157
37. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(5), a000414. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414
38. Masschelein, J., Clauwers, C., Stalmans, K., Nuyts, K., De Borggraeve, W., Briers, Y., Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2015). The zeamine antibiotics affect the integrity of bacterial membranes. Applied and Environmental Microbiology, 81(4), 1139–1146. https://doi.org/10.1128/AEM.03200-14
39. Liang, F., Yuan, F., Liu, F., Wang, Y., & Gao, Y. (2014). Structure and antimicrobial mechanism of ε-polylysine–chitosan conjugates through Maillard reaction. International Journal of Biological Macromolecules, 70, 427–434. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.057
40. Sharma, V. K., & Sohn, M. (2012). Reactivity of chlorine dioxide with amino acids, peptides, and proteins. Environmental Chemistry Letters, 10(3), 255–264. https://doi.org/10.1007/s10311-011-0346-y
41. Bakhmutova-Albert, E. V., Margerum, D. W., Auer, J. G., & Applegate, B. M. (2008). Chlorine dioxide oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Inorganic Chemistry, 47(6), 2205–2211. https://doi.org/10.1021/ic701790a

2.5 Синергетичний ефект інактивації *Escherichia coli* шляхом послідовної дезінфекції низькими дозами діоксиду хлору з наступним хлоруванням

Традиційна послідовна дезінфекція (TSD) з альтернативними дезінфекційними засобами для досягнення 1 log інактивації, а потім вільним хлором для подальшої інактивації, довела свою ефективність у видаленні патогенів [1-5]. Послідовні обробки базуються на використанні сильнішого окиснювача, такого як озон або ClO_2, як основного дезінфекційного засобу, а потім слабшого окиснювача, такого як вільний хлор, як вторинного дезінфекційного засобу. Синергетичний ефект при послідовних обробках, ймовірно, зумовлений активністю дезінфекційних агентів, що реагують зі специфічними хімічними групами в клітинній стінці бактерій [6]. Схоже, що вторинному дезінфекційному засобу дозволяється швидше проникати через частково пошкоджені шари клітинної стінки після дії первинного дезінфекційного засобу [2]. Синергетичний ефект сприяє зменшенню дози дезінфікуючого засобу та експозиції, необхідних для досягнення того ж рівня інактивації, що призводить до зниження як експлуатаційних витрат, так і утворення побічних продуктів дезінфекції [7]. Однак у попередніх експериментах з послідовної дезінфекції, які автори [8] назвали традиційною послідовною дезінфекцією, первинний дезінфікуючий засіб використовувався для інактивації 90% мікроорганізмів (1 log інактивації), тоді як вторинний дезінфікуючий засіб інактивував лише 10% [1, 2, 7, 9]. Ця процедура не видається перспективною для практичного застосування через можливу елімінацію первинного дезінфікуючого засобу в системі вторинної дезінфекції.

Продемонстровано, що низький рівень

дезінфікуючого засобу здатний ефективно інактивувати фаг MS2 *Escherichia coli* [10]. Son et al. [6] спостерігали синергетичний ефект, коли невелику кількість ClO_2 змішували з вільним хлором (співвідношення концентрацій 1,8/200) до неактивних спор *Bacillus subtilis*. Однак, наскільки відомо, немає інформації про видалення патогенів за допомогою низького рівня дезінфікуючого засобу з подальшим вільним хлором при послідовній дезінфекції (SD).

E. coli дуже чутлива до хімічних дезінфікуючих засобів. Щоб отримати 1 log інактивації *E. coli*, попередні дослідження показали, що значення CT (концентрація дезінфікуючого засобу x час контакту) становило близько 0,08 мг/л·хв для вільного хлору та 0,03 мг/л·хв для ClO_2 відповідно [11, 12]. Cho et al. [12] досліджували механізми інактивації *E. coli* кількома дезінфікуючими засобами на основі 1 log інактивації. Вони виявили, що вільний хлор мав незначний вплив на проникність клітин, тоді як ClO_2 частково пошкоджував як поверхню клітин, так і внутрішні компоненти. Huang et al. [13] встановили зв'язок між поступовим пошкодженням клітин та його впливом на загальний процес фотокаталітичної інактивації *E. coli* діоксидом титану. Ці результати показали, що проникність клітин повинна бути змінена до того, як відреагують внутрішньоклітинні матеріали. Davis et al. [14] продемонстрували відсутність втрати життєздатності *E. coli* при пошкодженні лише клітинної стінки. Більше того, пошкоджену клітинну стінку можна було відновити під час субкультивування на агарових чашках для дослідження життєздатності. Крім того, оскільки у системі водопостачання залишається лише невелика кількість залишкового вторинного дезінфікуючого засобу, може виникнути незапланована необхідність додаткового дезінфектанта (SD), який дозується для забезпечення

достатньої дезінфекції перед розподілом води користувачам.

У статті [8] SD прийнято та визначено як процедуру, в якій два дезінфікуючі засоби використовуються та послідовно застосовуються в одній системі. Мета дослідження полягала в наступному: (a) визначити, чи може низький рівень ClO_2 покращити дезінфекцію вільним хлором, (b) з'ясувати синергетичний ефект низького рівня ClO_2 з вільним хлором на інактивацію *E. coli* та (c) оцінити роль pH та температури в SD. Було досліджено чотири методи дезінфекції: одноступенева дезінфекція (SSD), SD, TSD та дезінфекція змішаними дезінфікуючими засобами (MDD).

2.5.1 Інактивація E. coli низькими дозами ClO_2

Cho et al. [12] досліджували механізми інактивації *E. coli* кількома дезінфікуючими засобами та виявили, що ClO_2 спричиняє деяке пошкодження поверхні та деградацію внутрішніх компонентів у міру прогресування інактивації. З іншого боку, втрати життєздатності *E. coli* не було виявлено, коли була пошкоджена лише клітинна стінка [14]. Виходячи з цих висновків, процес інактивації *E. coli* ClO_2 можна описати як послідовність реакцій ClO_2 з компонентами клітинної стінки, перш ніж він досягне цитоплазми, після чого відбувається збільшення проникності клітинної стінки та подальше проникнення ClO_2 у цитоплазму і, зрештою, загибель клітини [15, 16]. Таким чином, може існувати певний рівень ClO_2, який пошкоджує лише клітинну стінку, і коли ClO_2 перевищує цей рівень, настає інактивація клітини.

Для перевірки процедури в SSD-експериментах (вихідна інокуляція від 3 x 10^6 до 1 x 10^7 КУО/мл) було протестовано чотири різні концентрації ClO_2 (0,005, 0,01,

0,02 та 0,05 мг/л). Як показано на рис. 2.13, життєздатність *E. coli* дещо змінювалася при концентрації ClO_2 нижче 0,02 мг/л, тоді як інактивація 3,75 log спостерігалася при концентрації 0,05 мг/л ClO_2 протягом 30 хвилин обробки.

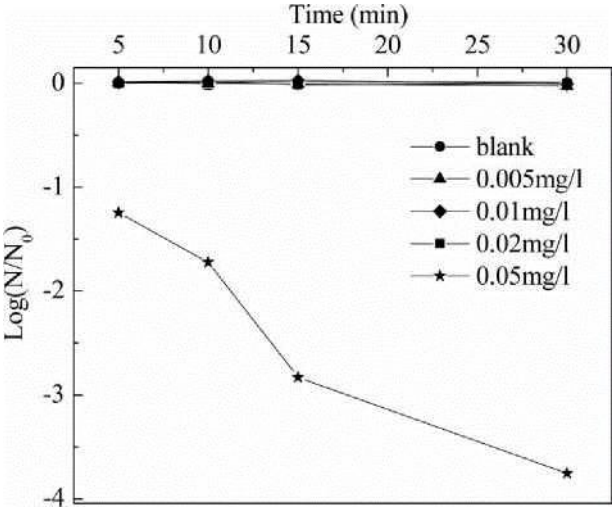

Рис. 2.13 Інактивація *E. coli* при різних концентраціях ClO_2 (pH 7,1; 20 °C).

Отже, можна зробити висновок, що ClO_2 при концентрації нижче 0,02 мг/л здатний лише пошкоджувати клітинні стінки, і таким чином змінювати проникність клітин, маючи незначний вплив на внутрішні компоненти клітини. Однак, коли його концентрація перевищує 0,05 мг/л, ClO_2 може проникати в клітину після пошкодження клітинної стінки і таким чином реагувати з внутрішніми компонентами клітини, знижуючи життєздатність *E. coli*. На основі цих результатів у наступних експериментах було використано розчин ClO_2 з концентрацією 0,02 мг/л.

2.5.2 Зміна проникності клітинної стінки залежно від низького рівня ClO_2

Як описано Huang et al. [13], інтактні клітини *E. coli* мають дуже низьку проникність для ONPG.

Примітка. Тест ONPG, або тест на о-нітрофеніл-β-D-галактопіранозид, – це біохімічний тест, який використовується в мікробіології для виявлення наявності ферменту бета-галактозидази в бактеріях. Цей фермент має вирішальне значення для ферментації лактози, і тест ONPG допомагає ідентифікувати бактерії, які можуть бути уповільненими або слабкими ферментаторами лактози.

Як показано на рис. 2.14, обмежена доступність ONPG для γ3-D-галактозидази в інтактних клітинах відображалася в дуже низькій швидкості гідролізу, яка становила менше 2,6% (52,9 ± 6,5 нмоль/л · (хв мг сухої маси клітин)$^{-1}$ від такої в лізованих клітинах (2078,9 ± 111,6 нмоль/л · (хв мг сухої маси клітин)$^{-1}$. Це узгоджується зі значеннями, отриманими в попередніх дослідженнях (менше 2 та 2,3%) [12, 13]. Після дозування 0,02 мг/л ClO_2 та реакції протягом 5 хвилин швидкість гідролізу збільшилася до 148,0 ± 8,9 нмоль/л · (хв мг сухої маси клітин)$^{-1}$, що вказує на пошкодження клітинної стінки ClO_2 [12, 13]. Однак швидкість гідролізу ONPG залишалася постійною з подальшим збільшенням часу реакції. Це свідчить про те, що (а) ClO_2 може пошкодити клітинну стінку протягом кількох хвилин, та (б) низький рівень ClO_2 витрачається протягом 5 хвилин. Тому в наступних SD-експериментах було обрано 5-хвилинний інтервал.

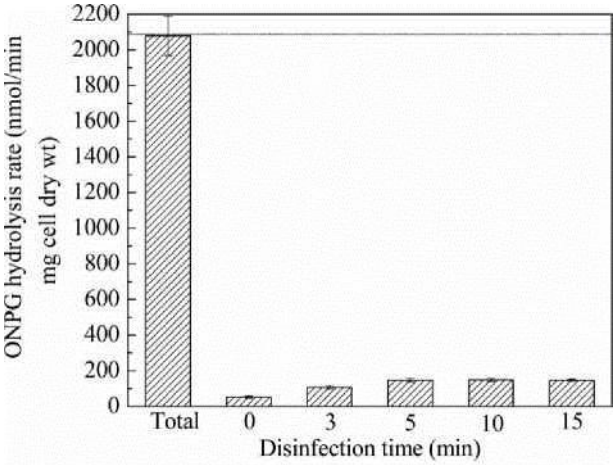

Рис. 2.14 Зміна швидкості гідролізу ONPG з часом для *E. coli* (від 1 х 10^7 до 3 х 10^7 КУО/мл) шляхом дозування 0,02 мг/л ClO_2 (pH 7,1; 20 °C).

2.5.3 Кінетика розпаду дезінфікуючого засобу

Кінетика першого порядку ($C_t = C_0 \exp^{-kt}$) була визнана прийнятною для прогнозування розпаду хімічного дезінфікуючого засобу при використанні ClO_2 або O_3 [10, 12]. Однак, у цьому дослідженні [8] кращу регресію показала степенева функція pow2p2 ($C_t = C_0$ x $(1 + t)^{-k}$), а не кінетика першого порядку. Це додатково підтверджується тим фактом, що значення k зменшувалося зі збільшенням початкової концентрації дезінфікуючого засобу. Зі збільшенням початкової концентрації хлору з 0,2 до 1,5 мг/л значення k зменшувалося з 1,3178 до 0,3041. Крім того, вища температура або нижчий pH призводили до вищого значення k.

Дозування 0,02 мг/л ClO_2 в експериментах SD, MDD та TSD може призвести до співіснування залишкового

ClO_2 та Cl_2. Щоб визначити вплив низького рівня ClO_2 на розпад Cl_2, були проведені додаткові експерименти шляхом дозування 0,02 мг/л ClO_2 у розчин PBS за певних умов перед дозуванням різних концентрацій Cl_2. Методом DPD (N, N-diethyl-p-phenylelenediamine) було виявлено незначну різницю в концентрації Cl_2 з дозуванням ClO_2 та без нього. Крім того, 0,02 мг/л ClO_2 перевищувало межу виявлення методу DPD. Таким чином, автори [8] не визначали концентрацію ClO_2 і не розраховували значення CT.

Значення CT, наведені нижче, були оцінені лише на основі концентрації Cl_2.

2.5.4 Посилення дезінфекції в SD

Як показано на рис. 2.15, за перші 0,2 мг/л·хв (30 с) було отримано 4,4 log інактивації в SD, але лише 2,7 log інактивації в SSD. Більше того, значення CT становило лише 1,0 мг/л·хв для SD для досягнення 6,0 log інактивації (зниження на 29,6%) порівняно з SSD (1,4 мг/л · хв). Це вказує на те, що наявність низького рівня ClO_2 мала синергетичний ефект на подальшу дезінфекцію хлором. Отримані результати можна пояснити наступним чином: (а) проникність клітинної стінки змінювалася низьким рівнем ClO_2, що прискорювало швидкість проникнення хлору всередину клітини та призводило до більшої ефективності інактивації; (б) може існувати синергетичний ефект окиснювача з його проміжними продуктами. Щоб знайти ключову причину, були проведені експерименти як з TSD, так і з MDD, результати яких показано на рис. 2.15.

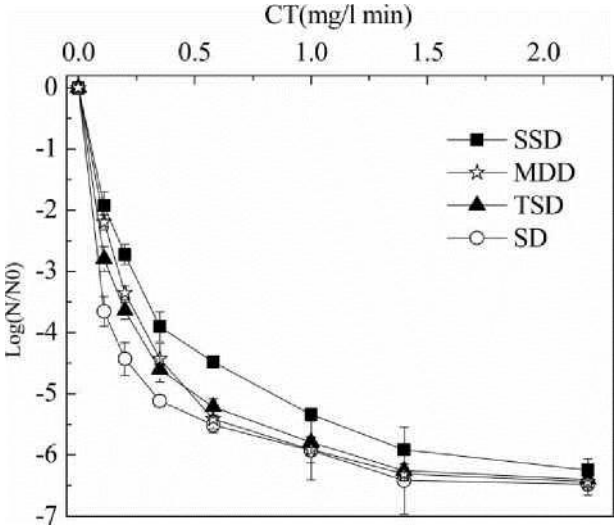

Рис. 2.15 Порівняння інактивації *E. coli* у чотирьох типах експериментів з дезінфекції (pH 7,1; 20 °C).

Ефективність інактивації як у MDD, так і в TSD була вищою порівняно з SSD, але нижчою, ніж у SD, у межах 1,0 мг/л · хв. У межах 0,46 мг · л/хв (~1,6 хв) спостерігалася вища ефективність інактивації в TSD порівняно з MDD, але їхня різниця поступово зменшувалася зі збільшенням CT, наприклад, різниця між ними становила близько 0,6 log при 0,11 мг·л/хв, але була майже незначна при 0,46 мг·л/хв. У діапазоні CT 0,46-1,4 мг/л · хв спостерігалася вища ефективність інактивації в MDD порівняно з TSD. Тим не менш, різниці в ефективності дезінфекції між MDD, TSD та SD не спостерігалося, коли CT був вищим за 1,4 мг/л·хв.

Крім того, вищезазначені результати дають підставу вважати, що існування низького рівня залишкового дезінфекційного засобу може відігравати активну роль у

системі дезінфекції, наприклад, скорочуючи час дезінфекції або зменшуючи дозу дезінфекційного засобу. Тому дозування додаткового дезінфекційного засобу перед традиційною дезінфекцією може бути корисним у практичних операціях.

2.5.5 Можливий механізм синергізму

Як згадувалося раніше, коли була пошкоджена лише клітинна стінка, втрати життєздатності *E. coli* не виявлено. Однак це разюче відрізняється від інших типів патогенів, що зустрічаються під час очищення води, таких як *Cryptosporidium parvum* та віруси, оскільки пошкодження стінки ооцисти та вірусної оболонки може призвести до їхньої нездатності до розмноження. У випадку *E. coli* хімічні дезінфекційні засоби можуть зазнавати реактивного транспорту через клітинну стінку та пошкоджувати внутрішні компоненти клітини, такі як γ3-D-галактозидаза [13]. Підвищена ефективність інактивації як в SD, так і в TSD порівняно з SSD продемонструвала, що існує синергетична функція низького рівня ClO_2 для дезінфекції вільним хлором шляхом зміни проникності клітинної стінки та полегшення подальшого транспорту вільного хлору.

З іншого боку, незважаючи на відсутність втрати життєздатності *E. coli* при обробці ClO_2 концентрацією 0,02 мг/л, ефективність інактивації в SD виявилася вищою, ніж у TSD, що свідчить про синергетичний ефект залишкового ClO_2 та/або утворених ним проміжних продуктів на дезінфекцію вільного хлору. Son et al. [6] досліджували зміну УФ-поглинання з часом для суміші Cl_2 та ClO_2. Результати показали, що ClO_2 був стабільним у концентрованому розчині хлору в кислих умовах. Отже, підвищена ефективність дезінфекції може бути зумовлена

лише синергетичним ефектом самого ClO_2 з вільним хлором.

Підсумовуючи, механізм синергії низького рівня ClO_2 на інактивацію *E. coli* хлором можна описати як послідовну процедуру. По-перше, низький рівень ClO_2 реагує з компонентами клітинної стінки *E. coli*, що призводить до збільшення її проникності. По-друге, підвищена проникність клітинної стінки прискорює проникнення хлору та залишкового ClO_2 у цитоплазму, а потім дезінфікуючий засіб реагує з цитоплазмою та викликає загибель клітин. Крім того, співіснування залишкового ClO_2 та вільного хлору також відіграє активну синергетичну роль.

Механізм синергії чітко пояснює, чому ефективність інактивації як у TSD, так і в SD була вищою, ніж у SSD. З іншого боку, вищу інактивацію в SD порівняно з TSD можна пояснити синергетичним ефектом співіснування залишкового ClO_2 та вільного хлору. Хоча в MDD відбувається як збільшення проникності клітинної стінки, так і співіснування дезінфікуючого засобу, нижча ефективність у MDD спостерігалася в перші 0,46 мг/л·хв (~1,6 хв), ніж у TSD, що може бути пов'язано з часом, необхідним для зміни проникності за допомогою ClO_2. Зі збільшенням часу реакції різниця в ефективності інактивації зменшувалася між MDD та TSD, і зрештою призвела до вищої ефективності інактивації в MDD після 0,46 мг/л·хв.

2.5.6 Роль pH та температури в SD

Як pH, так і температура є ключовими факторами для інактивації патогенів вільним хлором. Як показано на рис. 2.16a, температура позитивно вплинула на інактивацію *E. coli* в SD, що подібно до впливу

традиційних хімічних дезінфікуючих засобів [17]. Спостерігалося зниження ефективності інактивації при збільшенні pH з 7,1 до 8,2 (рис. 2.16b).

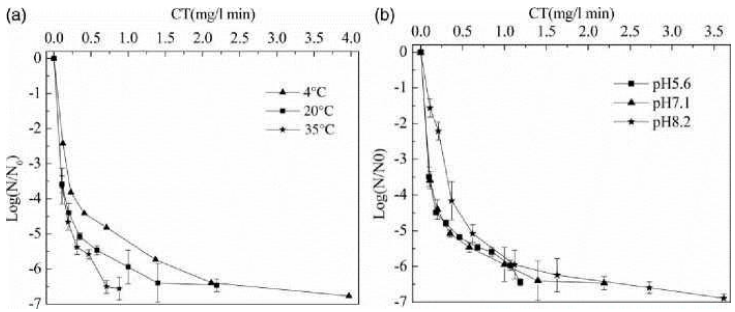

Рис. 2.16 Вплив (a) температури (pH 7,1) та (b) pH (20 °C) на інактивацію *E. coli* в SD.

Це дослідження [8] продемонструвало, що інактивацію *E. coli* можна посилити шляхом попереднього дозування низького рівня ClO_2 при дезінфекції вільним хлором через зміну проникності клітинної стінки, спричинену ClO_2, що полегшує транспортування вільного хлору, та синергетичний ефект співіснування залишкового ClO_2 та вільного хлору. Крім того, інактиваційна здатність зростала зі збільшенням температури в SD, тоді як у лужних умовах була виявлена нижча ефективність дезінфекції, ніж у кислих та нейтральних. Це дослідження також показало, що дозування низьких рівнів дезінфекційного засобу перед традиційною дезінфекцією потенційно може бути корисною стратегією в практичних дезінфекційних операціях.

Література

1. Driedger, A. M., Rennecker, J. L., & Mariñas, B. J.

(2000). Sequential inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with ozone and free chlorine. Water Research, 34(14), 3591–3597. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00059-9

2. Corona-Vasquez, B., Rennecker, J. L., Driedger, A. M., & Mariñas, B. J. (2002). Sequential inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with chlorine dioxide followed by free chlorine or monochloramine. Water Research, 36(1), 178–188. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00249-8
3. Ballester, N. A., & Malley, J. P. (2004). Sequential disinfection of adenovirus type 2 with UV-chlorine-chloramine. Journal of the American Water Works Association, 96(4), 97–103. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2004.tb10589.x
4. Leggett, L. A., Lee, J. K., & Shin, G. A. (2008). Inactivation of human adenovirus serotype 2 by sequential disinfection with UV irradiation and free chlorine. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 108, 613.
5. Murphy, H. M., Payne, S. J., & Gagnon, G. A. (2008). Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate Escherichia coli in drinking water biofilms. Water Research, 42(8–9), 2083–2092. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.021
6. Son, H., Cho, M., Kim, J., Oh, B., Chung, H., & Yoon, J. (2005). Enhanced disinfection efficiency of mechanically mixed oxidants with free chlorine. Water Research, 39(4), 721–727. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.022
7. Cho, M., Kim, J. H., & Yoon, J. (2006). Investigating synergism during sequential inactivation of Bacillus subtilis spores with several disinfectants. Water Research, 40(15), 2911–2920.

https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.013
8. Yang, W., Yang, D., Zhu, S.-Y., Chen, B.-Y., Huo, M.-X., & Li, J.-W. (2012). The synergistic effect of Escherichia coli inactivation by sequential disinfection with low-level chlorine dioxide followed by free chlorine. Journal of Water and Health, 10(4), 557–564. https://doi.org/10.2166/wh.2012.067
9. Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Sequential disinfection of Cryptosporidium parvum by ozone and chlorine dioxide. Ozone: Science & Engineering, 19(5), 409–423. https://doi.org/10.1080/01919519708547330
10. Hornstra, L. M., Smeets, P. W. M. H., & Medema, G. J. (2010). Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. Water Research, 45(5), 1847–1855. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.006
11. Kouame, Y., & Haas, C. N. (1991). Inactivation of Escherichia coli by combined action of free chlorine and monochloramine. Water Research, 25(9), 1027–1032. https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90210-7
12. Cho, M., Kim, J., Kim, J. H., & Yoon, J. (2010). Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. Water Research, 44(11), 3410–3418. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.018
13. Huang, Z., Maness, P. C., Blake, D. M., Wolfrum, E. J., Smolinski, S. L., & Jacoby, W. A. (2000). Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 130(2–3), 163–170. https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00205-1
14. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. S., Wood, W. B., & McCarthy, J. M. (1973). Microbiology (2nd ed.). Harper Collins College Division.

15. Arana, I., Santorum, P., Muela, A., & Barcina, I. (1999). Chlorination and ozonation of wastewater: Comparative analysis of efficacy through the effect on Escherichia coli membranes. Journal of Applied Microbiology, 86(6), 883–888. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00762.x
16. Cho, M., Snow, S. D., Hughes, J. B., & Kim, J. H. (2011). Escherichia coli inactivation by UVC-irradiated C60: Kinetics and mechanisms. Environmental Science & Technology, 45(22), 9627–9633. https://doi.org/10.1021/es2020298
17. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). (1999). Alternative disinfectants and oxidants guidance manual (EPA 815-R). Office of Water.

2.6 Інактивація бактеріальних збудників, як можливих агентів біотероризму, діоксидом хлору

Занепокоєння щодо безпеки питної води призвело до збору даних щодо ефективності дезінфікуючих засобів проти агентів біотероризму (BT) у питній воді. Раніше були опубліковані дані щодо ефективності вільного доступного хлору (FAC), монохлораміну та ультрафіолетового випромінювання проти різних штамів спор *Bacillus anthracis, Francisella tularensis, Yersinia pestis, Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Brucella suis* та *Brucella melitensis* [1-4]. Показано, що ClO_2 більш ефективний, ніж FAC для багатьох протестованих організмів [5]. Як відомо, стандартним вимірюванням ефективності дезінфікуючого засобу є значення Ct - добуток залишкової концентрації дезінфікуючого засобу, C у мг/л, та часу контакту, t (у хвилинах, протягом якого залишковий дезінфікуючий засіб контактує з патогенами у воді). Посібник з правил обробки поверхневих вод

Агентства з охорони навколишнього середовища США містить таблиці значень Ct для інактивації 2-$\log_{10}$ (99%) та 3-$\log_{10}$ (99,9%) патогенів за певних pH та температури [7].

У дослідженні [8] сім агентів ВТ (12 ізолятів) були піддані впливу ClO_2, після чого були розраховані значення Ct для інактивації на 2- та 3-$\log_{10}$. Оскільки на ефективність дезінфікуючого засобу можуть впливати температура та pH води, випробування проводилися при 5 та 25°C, а також при pH 7 та 8.

Два штами спор *Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Francisella tularensis, Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei* та видів *Brucella* були інокульовані в розчин ClO_2 з початковою концентрацією 2,0 (лише спори) та 0,25 мг/л (всі інші бактерії) при pH 7 або 8, 5 або 25°C. При концентрації 0,25 мг/л у питній воді шість видів були інактивовані щонайменше на три порядки протягом 10 хвилин. Спорам *Bacillus anthracis* знадобилося до 7 годин при 5°C для такої ж інактивації з 2,0 мг/л ClO_2.

ClO_2 був значно менш ефективним ($P < 0,01$) для інактивації спор *B. anthracis*, ніж усі інші протестовані бактерії. Значення Ct спор *B. anthracis* були в 100-1000 разів вищими, ніж у досліджуваних вегетативних мікроорганізмів. Значення Ct для *B. suis, B. melitensis, B. mallei, B. pseudomallei, F. tularensis* та *Y. pestis* були <2 мг/л · хв для інактивації 3-$\log_{10}$ за всіх протестованих комбінацій pH та температури. У 74 з 80 проведених тестів значення Ct були <1,0 мг/л · хв для вегетативних форм агентів ВТ.

Ефективність ClO_2 на більшість грамнегативних мікроорганізмів залежала від температури, про що свідчать нижчі значення Ct при 5°C, ніж при 25°C для того ж ступеня інактивації. Єдиним винятком був *B. pseudomallei* CA 652 при pH 7, де значення Ct залишалося незмінним (0-4 мг · хв/л) за обох температур. Для спор обох штамів *B.*

anthracis спостерігалася значна різниця між значеннями Ct при 5 та 25 °C ($P < 0,01$). Якби спори *B. anthracis* обробляли 2 мг/л ClO_2, то для інактивації 3-log_{10} при 5°C знадобилося б щонайменше 7 годин, а при 25°C – щонайменше 1 година.

Відмінності між грамнегативними мікроорганізмами були найбільш помітними при 5 °C. Значення Ct для обох штамів *F. tularensis, B. melitensis* та *B. suis* (лише pH 7), були значно більшими, ніж для *Y. pestis, B. pseudomallei B. mallei* (всі $P < 0,01$) для інактивації 3-log_{10}.

Істотна різниця у значеннях Ct між pH 7 та 8 спостерігалася для більшості досліджених грамнегативних бактерій, причому pH 8 був більш ефективним. Винятками з цього узагальнення були *B. suis* при 25°C ($P = 0,06$), *B. mallei* M-9 при 25°C ($P = 0,35$) та *F. tularensis* LVS при 5°C ($P = 0,44$). Не було виявлено суттєвої різниці в інактивації спор *B. anthracis* між pH 7 та 8 ($P = 0,99$ для 2-log зниження та $P = 0,93$ для 3-log зниження). Не було виявлено різниці в життєздатності негативних контрольних КУО (лише бактерії, без ClO_2) між початковим та кінцевим часом відбору проб за всіх умов температури та pH.

ClO_2 зазвичай використовується як передокислювальний або первинний дезінфікуючий засіб з типовими дозами від 0,07 до 2,0 мг/л ClO_2 [5, 7]. У дослідженні дезінфекції, проведеному Американською асоціацією водоканалів у 2008 році, середня концентрація ClO_2, що використовувалася на 17 очисних спорудах становила 1,18 мг/л із середнім часом контакту 13,8 хв [9, 10]. Усі протестовані грамнегативні ВТ-агенти були інактивовані щонайменше на 3-log_{10}, ще перебуваючи на очисній споруді, за умов температури та pH, що використовувалися в цьому дослідженні.

Хоча ефективність ClO_2 знизилася при 5°C,

дезінфікуючий засіб все ще був достатньо ефективним для всіх протестованих грамнегативних бактерій. Загальновідомо, що зниження температури води призводить до зменшення ефективності багатьох дезінфікуючих засобів на основі хлору, таких як ClO_2, FAC та монохлорамін [7]. Ця тенденція спостерігалася для всіх протестованих мікроорганізмів, окрім *B. pseudomallei* CA 652, який не виявляв суттєвої різниці в значеннях Ct при 5 або 25°C при pH 7. *B. pseudomallei* CA 652 відрізнявся від інших протестованих мікроорганізмів тим, що виробляє велику кількість екзополісахариду (EPS), що робить колонію на вигляд дуже мукоїдною [11]. EPS може створювати велику потребу в ClO_2, зменшуючи доступний дезінфікуючий засіб одразу після інокуляції тестового розчину. Тому фактичний розпад ClO_2 протягом експерименту був не лінійним, як передбачалося, а міг швидко знижуватися. Таким чином, розрахунок значення Ct для цього мікроорганізму може бути не таким точним, як для інших протестованих бактерій. EPS також може забезпечити певний захист цього ізоляту від ClO_2. ClO_2 інактивує бактерії, окислюючи білки, порушуючи проникність зовнішньої мембрани та функцію ферментів [7]. O'Connell et al. [4] виявили, що ізолят є більш стійким до FAC, ніж штам ATCC 23343.

Вищі значення Ct при 5°C для *F. tularensis, B. melitensis* та *B. sui*s могли бути пов'язані з відмінностями в клітинній морфології, виявленими у *F. tularensis* та *B. melitensis*, які уповільнювали проникнення ClO_2. Було показано, що ізоляти *F. tularensis* більш стійкі до FAC, ніж інші грамнегативні бактерії, можливо, через наявність капсули [2]. Види *Brucella* є представниками класу альфапротеобактерій і, як зазначено, мають різні структури ліпополісахаридного ядра мембрани, ніж інші грамнегативні мікроорганізми [12]. Раніше було показано,

що *Brucella melitensis* більш стійка до монохлораміну, ніж до інших грамнегативних ВТ-агентів [3].

Ефективність FAC та монохлораміну залежить від pH води [13, 14]. Деякі дослідження показали, що ефективність ClO_2 не залежить від pH [7, 15-19]. Це дослідження [8] виявило, що pH 8 був пов'язаний з нижчими значеннями Ct для багатьох протестованих бактерій, і ці відмінності найбільш виражені при 5°C. Найнижчі значення Ct для грамнегативних агентів ВТ спостерігалися при pH 8 при 25°C, хоча всі значення Ct були нижче 2 мг/л·хв, а більшість нижче 0,5 мг/л·хв.

Загалом, ефективність ClO_2 вважається кращою при нижчих температурах води та вищому pH (що суперечить оптимальним умовам для FAC), і що ClO_2 є рівноцінним, якщо не кращим дезінфікуючим засобом, ніж FAC [5, 7]. При pH 7 це твердження залишається вірним, за винятком чотирьох штамів, протестованих у цьому дослідженні [8]. Коли значення Ct FAC та ClO_2 порівнюються при pH 7, FAC виявляється ефективнішим (нижчі значення Ct), ніж ClO_2, у зниженні життєздатності *B. melitensis, Y. pestis Harbin, B. mallei* M-13 та *B. mallei* M-9 (лише 5 °C) на 3 log_{10} [2, 4]. У цьому дослідженні [8] значення Ct FAC при pH 8 для штамів *B. pseudomallei* та *F. tularensis* LVS були попередньо протестовані за ідентичних умов. Виявлено, що ClO_2 перевершує FAC за ефективністю при інактивації цих мікроорганізмів [4, 20].

На відміну від протестованих грамнегативних ВТ-агентів, не виявлено інактивації спор *B. anthracis* на 2-log_{10} протягом середнього часу обробки 13,8 хвилин за цих умов дослідження, що потребувало б подальшої обробки, такої як коагуляція, флокуляція або FAC. Крім того, зниження температури спричинило збільшення значень Ct спор *B. anthracis* зі значною різницею, що спостерігалася між 5 та 25°C ($P < 0,01$). Що стосується pH, то суттєвої різниці між

значеннями Ct при pH 7 та 8 не спостерігалося. Інші дослідники також спостерігали відсутність різниці в ефективності ClO_2 проти спор *Bacillus sp*. при різних рівнях pH [18, 19].

При порівнянні ефективності ClO_2 з FAC при pH 7 та 25°C для спор *B. anthracis*, значення Ct коливалися від 60 до 102 мг/л · хв. Однак, при pH 7 та 5°C спори *B. anthracis* були більш чутливими до FAC, ніж до ClO_2, що продемонстровано значеннями 3-$\log_{10}$ Ct штаму Sterne 271 та 667 мг/л·хв для FAC та ClO_2 відповідно. Ця різниця була не такою вираженою при pH 8, зі значеннями 3-$\log_{10}$ Ct *B. anthracis* Sterne 478 та 606 мг/л · хв для FAC та ClO_2 відповідно [21]. У попередньому дослідженні Cho et al. [19] виявили, що спори *B. subtilis* були менш чутливими до FAC, коли pH збільшувався з 5,6 до 8,2, тоді як їхня чутливість до ClO_2 не залежала від pH, хоча всі тести проводилися при 25°C. У цьому дослідженні ClO_2 був дещо ефективнішим в інактивації спор Sterne при pH 8, ніж при pH 7, за обох протестованих температур, але різниця не була суттєвою (P = 0,94).

ClO_2 може бути рівним, якщо не перевершувати, FAC як основний дезінфікуючий засіб для протестованих грамнегативних мікроорганізмів і мати переваги над використанням FAC у ситуаціях, коли часу контакту FAC недостатньо для ефективності та коли є занепокоєння щодо утворення галогенованих побічних продуктів дезінфекції (тригалогенометанів та галооцтових кислот) або якщо pH води >8 [5, 7]. Було показано, що ClO_2 дещо ефективніший, ніж FAC, проти спор *B. anthracis* у воді з температурою 25°C та проти штамів *F. tularensis* та *B. pseudomallei* за всіх протестованих умов. Основною перевагою FAC є його здатність зберігати залишкову концентрацію в системі розподілу, але використання ClO_2 як основного дезінфікуючого засобу та подальше

використання FAC як вторинної обробки може бути життєздатним варіантом. Деякими недоліками використання ClO_2 є утворення побічних продуктів хлориту та хлорату (максимальна межа <1,0 мг/л), вища вартість виробництва, ніж хлору, та необхідність спеціалізованого обладнання на місці [5, 7].

Це дослідження [8] надає значення Ct для конкретних штамів ВТ та показників якості води, що були протестовані. Різниця в каламутності та доступності поживних речовин може впливати на ефективність ClO_2, тому подальші дослідження для повної оцінки корисності дезінфекції ClO_2 є важливими для захисту населення у випадку забруднення питної води вибраними ВТ-агентами.

Література

1. Rose, L. J., & O'Connell, H. (2009). UV light inactivation of bacterial biothreat agents. Applied and Environmental Microbiology, 75(9), 2987–2990. https://doi.org/10.1128/AEM.02659-08
2. Rose, L. J., Rice, E. W., Jensen, B., Murga, R., Peterson, A., Donlan, R. M., & Arduino, M. J. (2005). Chlorine inactivation of bacterial bioterrorism agents. Applied and Environmental Microbiology, 71(1), 566–568. https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.566-568.2005
3. Rose, L. J., Rice, E. W., Hodges, L., Peterson, A., & Arduino, M. J. (2007). Monochloramine inactivation of bacterial select agents. Applied and Environmental

Microbiology, 73(11), 3437–3439. https://doi.org/10.1128/AEM.02826-06

4. O'Connell, H. A., Rose, L. J., Shams, A., Bradley, M., Arduino, M. J., & Rice, E. W. (2009). Variability of Burkholderia pseudomallei strain sensitivities to chlorine disinfection. Applied and Environmental Microbiology, 75(17), 5405–5409. https://doi.org/10.1128/AEM.00613-09
5. Gates, D. (1998). The chlorine dioxide handbook. American Water Works Association.
6. Harakeh, M. S., Berg, J. D., Hoff, J. C., & Matin, A. (1985). Susceptibility of chemostat-grown Yersinia enterocolitica and Klebsiella pneumoniae to chlorine dioxide. Applied and Environmental Microbiology, 49(1), 69–72. https://doi.org/10.1128/AEM.49.1.69-72.1985
7. United States Environmental Protection Agency. (1999). Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. U.S. Environmental Protection Agency.
8. Shams, A. M., O'Connell, H., Arduino, M. J., & Rose, L. J. (2011). Chlorine dioxide inactivation of bacterial threat agents. Letters in Applied Microbiology, 53(1), 1–6. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03095.x
9. American Water Works Association Water Quality Division Disinfection Systems Committee. (1998). Committee report: Disinfection at large and medium-sized systems. Journal of the American Water Works Association, 92(5), 32–43. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2008.tb09758.x
10. American Water Works Association Water Quality Division Disinfection Systems Committee. (2008).

Committee report: Disinfection survey, Part 2—Alternatives, experiences, and future plans. Journal of the American Water Works Association, 100(6), 110–124.

11. Steinmetz, I., Rohde, M., & Brenneke, B. (1995). Purification and characterization of an exopolysaccharide of Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei. Infection and Immunity, 63(10), 3959–3965.
12. Iriarte, M., Gonzalez, D., Delrue, R. M., Monreal, D., Conde, R., Lopez-Goni, I., Letesson, J. J., & Moriyon, I. (2004). Brucella lipopolysaccharide: Structure, biosynthesis, and genetics. In I. Lopez-Goni & I. Moriyon (Eds.), Brucella: Molecular and cellular biology (pp. 159–191). Horizon Bioscience.
13. Berman, D., & Hoff, J. C. (1984). Inactivation of Simian Rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. Applied and Environmental Microbiology, 48(2), 317–323. https://doi.org/10.1128/AEM.48.2.317-323.1984
14. United States Environmental Protection Agency. (2006). The effectiveness of disinfectant residuals in the distribution system. U.S. Environmental Protection Agency.
15. Vicuna-Reyes, J. P., Luh, J., & Marinas, B. J. (2008). Inactivation of Mycobacterium avium with chlorine dioxide. Water Research, 42(6–7), 1531–1538. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.039
16. Ruffell, K. M., Rennecker, J. L., & Marinas, B. J. (2000). Inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with chlorine dioxide. Water Research, 34(3),

868–876. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00284-8
17. Junli, H., Li, W., Nenqi, R., Fang, M., & Li, J. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. Water Research, 31(3), 607–613. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8
18. Foegeding, P. M., Hempstapat, V., & Giesbrecht, F. G. (1986). Chlorine dioxide inactivation of Bacillus and Clostridium spores. Journal of Food Science, 51(1), 197–201. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10864.x
19. Cho, M., Kim, J.-H., & Yoon, J. (2006). Investigating synergism during sequential inactivation of Bacillus subtilis spores with several disinfectants. Water Research, 40(15), 2911–2920. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.013
20. Adcock, N., Rose, L. J., Sivaganesan, M., Yu, A. K., & Rice, E. W. (2006, May). Chlorine inactivation of Francisella tularensis in drinking water. In ASM General Meeting (Poster Session 072/Q, Q-125). Orlando, FL.
21. Rice, E. W., Adcock, N. J., Sivaganesan, M., & Rose, L. J. (2005). Inactivation of spores of Bacillus anthracis Sterne, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis subsp. israelensis by chlorination. Applied and Environmental Microbiology, 71(10), 5587–5589. https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5587-5589.2005

2.7 Інактивація діоксидом хлору *Legionella*

2.7.1 Досвід практичного застосування діоксиду хлору для контролю Legionella в системі

водопостачання лікарні

Види *Legionella* залишаються важливою причиною нозокоміальної пневмонії. Справжня частота нозокоміальних інфекцій невідома; проте деякі дослідження показали, що види *Legionella* є збудниками до 30% нозокоміальних пневмоній [1,2]. Незважаючи на підвищену обізнаність та прогрес у лікуванні цих інфекцій, рівень смертності від нозокоміальної легіонельозної пневмонії залишається в діапазоні від 35% до 40% [3, 4]. Оскільки природним середовищем існування цих мікроорганізмів є вода, вони широко поширені в системах водопостачання будівель. Дослідження води різних лікарень показали, що до 70% систем лікарняного водопостачання забруднені *Legionella* [5]. Ці інфекції, ймовірно, стануть ще більш значною проблемою, оскільки імуносупресивні стани як основні ризики для нозокоміальної легіонельозної хвороби [6] стають більш поширеними.

Зв'язок між забрудненням водопостачання лікарень та внутрішньолікарняними випадками був добре продемонстрований і додатково підтверджується тим фактом, що в групі лікарень, де легіонели не вдалося виділити з водопостачання, жодних внутрішньолікарняних випадків не було виявлено, незважаючи на інтенсивне спостереження [7]. Цей зв'язок викликав великий інтерес до вивчення методів боротьби з легіонелами у водопостачанні лікарень. Наразі для цієї мети доступно кілька методів, включаючи перегрів (термічне знищення), ультрафіолетове випромінювання, іонізацію міді та срібла, гіперхлорування, хлораміни, обробку озоном та діоксидом хлору [8]. Хоча системи гарячого водопостачання вже давно вважаються основними резервуарами для цих мікроорганізмів, з'являється все більше доказів того, що

забруднення систем питного водопостачання (питного або холодного) може бути ще більшим ризиком внутрішньолікарняних інфекцій [9, 10]. Таким чином, зростає інтерес до оцінки ефективності та безпеки цих методів обробки як гарячого, так і питного водопостачання в лікарнях. У роботі [11] представлено результати оцінки безпеки та ефективності діоксиду хлору для боротьби з легіонельозом в новій будівлі лікарні.

Хоча діоксид хлору використовується вже багато років у промислових та муніципальних системах водопостачання [12-15], досвід його використання (стаття датована 2003 роком) для видалення легіонел з водопостачання лікарень слід визнати обмеженим [16,17].

Протягом 17 місяців після заповнення системи кількість легіонел у воді постійно знижувалася з 41% усіх протестованих ділянок на початку дослідження до 4% (P = 0,001) (рис. 2.17).

Було виділено лише *L. anisa*, яку культивували як із систем гарячого, так і з холодного водопостачання. Через 17 місяців єдиним тестовим місцем із наявністю легіонели був п'ятий поверх будівлі, найбільш віддалений від джерела діоксиду хлору.

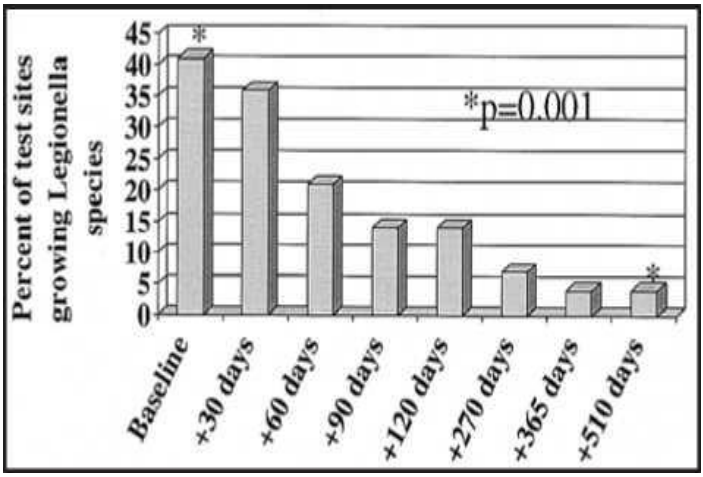

Рис. 2.17 Відсоток тестових ділянок із наявністю видів *Legionella* під час оцінки системи з діоксидом хлору. Зниження з 41% до 4% було статистично значущим (P = 0,001).

2.7.1.1 Рівні діоксиду хлору, хлориту та хлорату

Хоча система була розроблена для забезпечення максимального рівня діоксиду хлору 0,8 мг/л, до введення будівлі в експлуатацію вводили рівні до 2,0 мг/л для перевірки ефективності систем вугільної фільтрації. Зразки фільтрованої води з апаратів для гемодіалізу не містили іонів хлориту та хлорату, навіть при концентрації діоксиду хлору 2,0 мг/л. Аналогічно, зразки фільтрованої води з лабораторного обладнання не містили іонів хлорату та хлориту при концентрації діоксиду хлору до 1,6 мг/л. Після 1 місяця та 17 місяців експлуатації рівні діоксиду хлору та хлориту були оцінені по всій будівлі. Система була налаштована на досягнення максимального рівня діоксиду хлору 0,8 мг/л і це дійсно був виміряний рівень у

головній точці очищення. Рівень діоксиду хлору не перевищував цільовий показник максимального залишкового рівня дезінфікуючого засобу, встановлений EPA, у 0,8 мг/л, а рівень хлориту не перевищував цільовий показник максимального рівня забруднюючих речовин, встановлений EPA, у 1,0 мг/л. Через 1 місяць рівні були вищими на нижніх поверхах будівлі, але ця різниця зникла після 17 місяців (рис. 2.18).

2.7.1.2 Спостереження за внутрішньолікарняною легіонельозною інфекцією

Під час 17-місячної оцінки в будівлі з системою діоксиду хлору не було виявлено жодного випадку внутрішньолікарняної легіонельозної інфекції. Протягом цього часу було зареєстровано один випадок внутрішньолікарняної легіонельозної пневмонії в будівлі без системи очищення води.

Це перше дослідження ефективності та безпеки системи з діоксидом хлору в медичному закладі США. Відомі обмежені опубліковані дані з Європи, що підтверджують ефективність діоксиду хлору в інактивації видів *Legionella* в системах водопостачання лікарень [16,17]. Сімнадцять місяців безперервної роботи такої системи в одній будівлі лікарні майже повністю елімінували *Legionella* з водопостачання будівлі. Єдина ділянка залишилася забрудненою на верхньому поверсі будівлі, найдальшому від джерела діоксиду хлору.

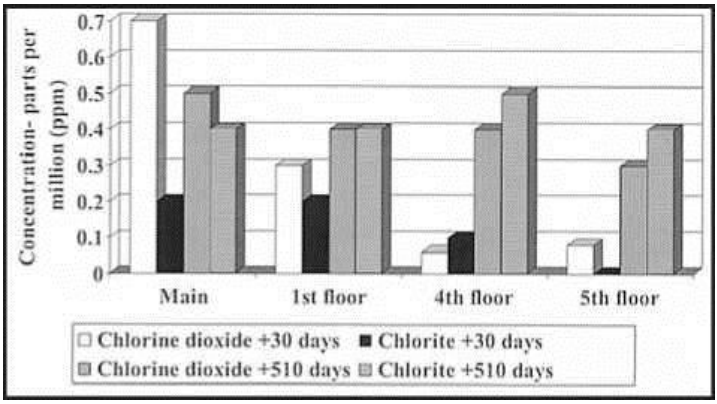

Рис. 2.18 Концентрації діоксиду хлору та хлориту в різних місцях по всій будівлі після 30 та 510 днів експлуатації системи. Через 30 днів рівні були вищими на головному поверсі, ніж на першому та верхньому поверхах; Однак, ця різниця значно зменшилася до 510-го дня.

Результати [11] були отримані, коли система працювала лише з понеділка по п'ятницю з 7:00 до 19:00, коли потреба у воді була достатньою для роботи системи. Автори не використовували «шокову обробку діоксидом хлору». Крім того, не проводили регулярне відкриття всіх дистальних кранів, а просто покладалися на звичайне використання кранів для впливу води, обробленої ClO_2. Враховуючи отримані результати, автори [11] вважали, що легіонели могли б бути знищені швидше, якби до кранів зверталися частіше. Відомо, що види легіонел мешкають у біоплівках у трубах та пристроях, що обмежують потік (наприклад, аератори кранів). Хоча дані in vitro свідчать про те, що діоксид хлору може проникати крізь ці плівки, це проникнення перешкоджається зменшенням впливу діоксиду хлору на біоплівки, як це відбувається в дистальних кранах, які використовуються рідко. Протокол

відкриття кранів, особливо на верхніх поверхах, міг би допомогти системі швидше досягти рівноваги, що збільшило б час впливу діоксиду хлору на труби на верхніх поверхах.

Експлуатація системи виявилася безпечною відповідно до чинних федеральних норм, що регулюють допустимі рівні діоксиду хлору та хлориту. Вони визначали максимальний залишковий рівень діоксиду хлору не більше 0,8 мг/л, а максимальний залишковий рівень хлориту 1,0 мг/л у питній воді [18]. Встановлено, що при використанні максимальної концентрації діоксиду хлору в основному джерелі води рівні діоксиду хлору та хлориту були значно нижчими за максимально допустимі рівні. Фактично, навіть на приладі, найближчому до основного водопроводу, сума діоксиду хлору та хлориту була нижчою за 0,8 мг/л у половині проведених вимірювань. Тоді (2003 рік) хлорат-іони у питній воді не нормувались, однак, за досвідом авторів [11] рівень хлорату ніколи не перевищував 0,4 мг/л.

Виявлено, що невдовзі після заповнення системи рівні діоксиду хлору та хлориту були набагато вищими на приладах, що знаходилися найближче до основного водопроводу. Однак з часом будівля досягла рівноваги, і через 17 місяців не було виявлено різниці в рівнях діоксиду хлору та хлориту в місцях трубопроводу, які були найближчими до генератора діоксиду хлору, та тими, які були найдальше від нього.

Обмежені дослідження в діалізних центрах, що використовують воду, оброблену діоксидом хлору, не виявили жодних побічних ефектів [19]. Ці потенційні проблеми авторами [11] вирішені шляхом встановлення двох додаткових вугільних фільтрів до діалізного обладнання, які видалили весь діоксид хлору та хлорит, навіть при найвищих рівнях діоксиду хлору. Аналогічно,

вугільні фільтри використовувалися для видалення діоксиду хлору та хлориту з води для чутливого лабораторного обладнання.

Основним обмеженням цього дослідження [11] була коротка тривалість оцінки. Хоча початкові результати є обнадійливими, автори не коментували довгострокову ефективність. В одному дослідженні системи іонізації міді та срібла результати першого року були аналогічно обнадійливими, але ефективність знизилася після 3 років експлуатації [20]. Однак 6-річний досвід роботи з діоксидом хлору в Королівській лікарні Глазго був багатообіцяючим [17]. Ще одним обмеженням було те, що постійний польовий моніторинг рівнів діоксиду хлору та хлориту не проводився, і тому теоретично можливо, що максимальні рівні перевищувалися в ті часи, коли не проводилися випробування. Однак це видається дуже малоймовірним, оскільки система з діоксидом хлору має функції безпеки, які автоматично вимикають пристрій, щоб запобігти перевищенню рівня діоксиду хлору у воді 0,8 мг/л.

Зі старінням та захворюваністю госпіталізованих пацієнтів ризик внутрішньолікарняних легіонельозних інфекцій лише зростатиме. Крім того, деякі штати США розглядають можливість прийняття законодавства, яке вимагатиме від закладів охорони здоров'я розробляти плани боротьби з легіонелою, що включатимуть регулярний контроль її наявності у воді. Таким чином, інтерес до систем очищення води для лікарень, ймовірно, продовжуватиме зростати. На жаль, немає достатнього великого, довгострокового досвіду, щоб припустити, що будь-яка з цих систем явно перевершує інші. Тому вкрай важливо, щоб установи, які використовують ці системи, повідомляли про свій досвід. Автори [11] вважають, що отриманий досвід роботи з діоксидом хлору свідчить про

перспективність його використання для інактивації легіонел в системах водопостачання лікарень.

2.7.2 Порівняння ефективності дезінфектантів щодо контролю біоплівок, найпростіших та Legionella в системах побутового питного водопостачання

Метою дослідження [21] було порівняння ефективності різних дезінфікуючих засобів, що застосовуються для боротьби з легіонелою в системах водопостачання побутових приміщень. Для цієї мети було розроблено симулятор такого водопостачання, який дозволив моделювати реальні умови. Система із семи однакових установок була використана для порівняння ефективності очищення за еквівалентних умов конструкції системи, матеріалів, гідравліки, якості води, температури та початкового забруднення. Під час дослідження кожен із шести контурів отримував безперервне застосування одного з наступних дезінфікуючих засобів: хлор, електрохлорування, діоксид хлору, монохлорамін, озон або мідь/срібло. Сьомий контур використовувався як контрольний і залишався необробленим. Оцінка ефективності цих дезінфікуючих засобів базувалася на їхній здатності зменшувати не тільки легіонелу, але й найпростіших та біоплівки, які сприяють утворенню та поширенню цих бактерій у системах водопостачання, а також впливають на їх стійкість до обробки. Згідно з цими критеріями, діоксид хлору та хлор (у вигляді гіпохлориту або отриманий шляхом електрохлорування) були найефективнішими засобами обробки в цьому дослідженні. Однак, порівняно з хлором, діоксид хлору показав тривалішу залишкову активність у системі, що було перевагою з точки зору застосування у великих трубопровідних системах. Системи водопостачання в

побуті є відомими резервуарами мікробного забруднення, включаючи біоплівки, найпростіші та умовно-патогенні мікроорганізми, такі як легіонелла. Навіть за наявності залишків дезінфікуючих засобів мікроорганізми можуть розмножуватися в цих системах, що призводить до контакту користувачів системи з інфекційними мікроорганізмами. Багато епідеміологічних досліджень визначили системи водопостачання в побуті як причину захворювань, що передаються через воду.

Блок моделювання побутового водопостачання, розроблений для цього дослідження [21], дозволив моделювати основні аномалії, які можна знайти в системах побутового (питного) водопостачання. Були змодельовані аномалії температури, швидкості води та часу утримання води в системі. Відтворення цих аномалій сприяло забрудненню системи та дозволило краще розрізняти показники очищення. Вважається, що в системах побутового водопостачання, де такі аномалії відсутні, і за умови наявності ефективної системи контролю дозування дезінфікуючих засобів, різниця між показниками очищення повинна бути менш значною. Процедура усунення забруднення, застосована до системи, призвела до створення стабільної біоплівки, популяцій легіонел та амеб на кожній із семи установок, що складали пілотну установку. Після встановлення цих популяцій система була використана для порівняльної оцінки ефективності в еквівалентних умовах проектування системи, матеріалів, гідравліки, якості води, температури та початкового забруднення. Ефективність обробки оцінювали не лише щодо легіонел, але й щодо амеб та біоплівок, які сприяють утворенню та поширенню цих бактерій у водних системах, а також їх стійкості до обробки. Ґрунтуючись на оцінці цих параметрів, можна було спостерігати відмінності в ефективності обробки серед протестованих дезінфікуючих

засобів.

Діоксид хлору та хлор (у вигляді гіпохлориту або отриманий електрохлоруванням) були найефективнішими засобами обробки в цьому дослідженні [21]. Це проявилося у здатності хлору та діоксиду хлору зменшувати забруднення легіонелами у воді та біоплівці рециркуляційних контурів, а також підтримувати концентрацію легіонел нижче аналітичних меж виявлення протягом усього дослідження. Хоча електрохлорування було описано як більш потужний дезінфікуючий засіб порівняно з хлором, особливо для найпростіших, у цьому дослідженні не спостерігалося суттєвої різниці між результатами, отриманими з хлором та електрохлоруванням. Це може бути пов'язано з використанням маточного розчину для забезпечення належного контролю дозування. Як наслідок, короткоживучі окислювальні радикали, що утворилися в результаті цього процесу, ймовірно, були втрачені протягом чотирьох-п'ятиденного періоду використання маточного розчину. Подальші дослідження були б корисними для оцінки ефективності обладнання, що дозволяє пряме введення отриманого розчину без необхідності використання маточного розчину.

Діоксид хлору продемонстрував меншу здатність видаляти біоплівку, ніж хлор. Однак ця різниця у видаленні біоплівки могла бути пов'язана з різницею у застосованих концентраціях (0,5 мг/л для діоксиду хлору проти 2,5 мг/л для хлору). Порівняно з хлором, діоксид хлору продемонстрував довшу залишкову активність у застійних зонах системи і більш виражену здатність знизити концентрацію легіонел у цій частині нижче рівня виявлення після початку промивання. Однак, коли застосовувалося одноразове промивання, за ним протягом 24 годин відбувалася повторна колонізація застійних зон.

Отже, в реальних системах слід виконувати їх промивання разом із випускними отворами (крани, душі) дезінфікованою водою щонайменше один раз на день. Випускні отвори та пов'язані з ними трубопроводи, які рідко використовуються та не потрібні, слід видалити або ізолювати. Це підтверджує, що контроль мікробного забруднення вимагає постійного підтримання залишку дезінфікуючого засобу по всій водопровідній системі. Хоча «шокові» дози дезінфікуючого засобу можуть бути ефективними для контролю росту в короткостроковій перспективі або для екстреної деконтамінації, довгостроковий контроль вимагає постійного застосування дезінфікуючого засобу та промивання, щоб забезпечити циркуляцію ефективних концентрацій дезінфікуючого засобу по всій системі.

У цьому дослідженні [21] контроль дозування діоксиду хлору був досягнутий за допомогою амперометричного датчика, який забезпечував точний та надійний контроль. На відміну від датчика діоксиду хлору, амперометричні датчики загального хлору, що використовувалися в цьому дослідженні, потребували серйозного обслуговування (заміна та калібрування мембрани кожні 48 годин), ймовірно, через швидке забруднення їхньої мембрани. Такі датчики були недостатньо надійними для застосування на місці. Альтернативні рішення, такі як датчики окисно-відновного потенціалу або колориметричні датчики (хоча й не тестувалися в цих дослідженнях), є кращими для контролю дозування хлору.

Озон у концентрації 0,5 мг/л мав вплив на всі популяції планктону та біоплівки в усьому циклі рециркуляції, навіть за відсутності виявлених залишків після контактної колони. Цей результат був несподіваним, але його можна пояснити наявністю у воді системи циклу

залишків озону нижче меж виявлення. Озон досяг найбільшого зменшення кількості амеб у циклі рециркуляції і тому видається перспективною технологією для боротьби з легіонелою. Як і інші методи обробки, крім діоксиду хлору, озон був неефективним для зменшення забруднення легіонелою в застійних зонах. Подальші дослідження були б корисними для оптимізації його дозування та досягнення кращого контролю над легіонелою та амебами. Також необхідні польові дослідження для оцінки доцільності цієї технології на реальних системах водопостачання, де трубопровідні системи можуть бути більш розгалуженими.

Монохлорамін був ефективним проти планктонних та прикріплених у біоплівку легіонел, але не виявляв ефекту проти амеб та не мав здатності видаляти біоплівку. Однак, метод приготування монохлораміну не дозволяв підтримувати стабільну концентрацію. Це призвело до недостатнього дозування в рециркуляційному контурі (0,5 мг/л замість цільових 2 мг/л). Відсутність комерційно доступного продукту або генератора для цієї хімічної речовини є серйозною перешкодою щодо її потенційного використання для боротьби з легіонелою в побутових системах водопостачання. Як альтернатива, можна передбачити окреме введення аміаку та хлору, що призводить до утворення монохлораміну в системі, але доцільність та ефективність такого способу приготування потребують додаткових досліджень.

В умовах експерименту, особливо зважаючи на французький нормативний ліміт 10 мкг/л для срібла, мідь/срібло продемонстрували низьку ефективність за всіма протестованими параметрами.

2.7.3 Результати шокової обробки системи водопостачання діоксидом хлору (ClO_2) для контролю

Legionella pneumophila

У роботі [22] представлено результати шокової обробки системи водопостачання діоксидом хлору (ClO_2) для контролю *Legionella pneumophila*. Діоксид хлору отримували в результаті реакції діоксиду антинію з розведеною кислотою для отримання розчину з концентрацією 20000 мг/л. Для дозування системи використовувався насос зі зворотним зв'язком, щоб досягти кінцевої концентрації ClO_2 від 50 до 80 мг/л. Ця концентрація ClO_2 підтримувалася протягом 8 годин у резервуарах для зберігання. Вся вода з кранів та душових в палатах зливалася, доки з кранів не виходило від 50 до 80 мг/л ClO_2. Ця концентрація підтримувалася на всіх виходах протягом 1 години. Потім концентрацію ClO_2 підтримували на рівні 3-5 мг/л.

Обробка систем гарячого та холодного водопостачання за допомогою ClO_2 знизила загальну мікробну флору відділень А та В лікарні з >3000 до 70 КУО/мл. До обробки діоксидом хлору з холодної води була виділена *L. pneumophila*, після обробки її не було виявлено. Кількість бактерій, визначена з мазків з холодного та гарячого кранів, становила >3000 КУО/мл до обробки та <100 після обробки кранів. Однак обробка душових лійок, схоже, не була успішною, оскільки після обробки було виявлено >3000 КУО/мл. Оскільки душовий шланг не дезінфікувався, це могло пояснити наявність великої кількості нелегіонельозних бактерій, таких як *Flavobacteria* та *Alcaligenes*, у душових лійках. Автори припустили, що система холодного водопостачання була резервуаром для патогену. Одним із таких місць може бути виготовлена з гуми труба душового шланга, яка не була продезінфікована. Окрім цього, з гуми у воду могли мігрувати органічні сполуки як поживні речовини для

бактерій.

Вода із труби холодного контуру душу була лише злегка жовтою. Внутрішня поверхня труби виглядала дуже чистою та без корозійних відкладень. На відміну від спостережень, зроблених на трубі до обробки ClO_2, на поверхні труби холодної води було мало бактерій. Вода з труби гарячого контуру душу мала злегка жовто-зелений колір, а труба мала мідний наліт корозії, що проходив горизонтально вздовж внутрішньої поверхні. На внутрішній поверхні труби була присутня значна кількість накипу та бактерій. При фарбуванні на життєздатність приблизно 50% мікроорганізмів були метаболічно активними, що свідчить про наявність термотолерантної популяції мікроорганізмів у душовій трубі, яка спочатку подавалася з водою з температурою 60°C. Ці мікроорганізми, ймовірно, були стійкими до впливу ClO_2 або були захищені біоплівкою від нього під час обробки.

Автори [22] сформулювали наступні висновки

L. pneumophila була виділена лише один раз з холодної води перед обробкою, але були присутні умови, що сприяли виживанню та росту легіонел. Це низький вміст хлору у воді, зберігання в резервуарах для холодної води при температурі вище 20°C, наявність органічних сполук з'єднувальних шлангів, температура гарячої води нижче рекомендованої та відсутність дезінфекції душових шлангів.

Коригувальний захід у вигляді шокового дозування ClO_2 протягом 8 годин знизив кількість бактерій у планктонній фазі, і хоча процедура не повністю видалила біоплівку протягом цього часу, після завершення програми дезінфекції бактеріальної біоплівки було значно менше. Виявлено, що всі біоплівки, виявлені до та після обробки ClO_2, демонструють життєздатність.

Література

1. Stout, J. E., & Yu, V. L. (1999). Nosocomial Legionella infection. In C. G. Mayhall (Ed.), Hospital epidemiology and infection control (pp. 1–14). Lippincott Williams & Wilkins.
2. Johnson, J.T., Best, M.G., Goetz, A., Wicker, H., Yu, V.L., Vickers, M., Wagner, R., & A. Woo (1985). Nosocomial legionellosis in patients with head and neck cancer: Implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. The Lancet, 2(8449), 298–300. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)91599-1
3. Kool, J. L., Fiore, A. E., Kioski, C. M., Brown, E. W., Benson, R. F., Pruckler, J. M., Glasby, C., Butler, J. C., Cage, G. D. J., Carpenter, C., Mandel, R. M., England, B. & Breiman, R. F. (1998). More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of Legionnaires' disease among transplant patients. Infection Control and Hospital Epidemiology, 19(12), 898–904. https://doi.org/10.1086/647758
4. Lepine, L. A., Jernigan, D. B., Butler, J. C., Pruckler, J. M., Benson, R. F., Kim, G., Hadler, J. L., Cartter, M. L. & Fields, B. S. (1998). A recurrent outbreak of nosocomial Legionnaires' disease detected by urinary antigen testing: Evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system. Infection Control and Hospital Epidemiology, 19(12), 905–910. https://doi.org/10.1086/647759
5. Her Majesty's Stationery Office. (1987). Second report of the committee of inquiry into the outbreak of Legionnaires' disease in Stafford in April 1985. Her Majesty's Stationery Office.
6. Yu, V. L., & Nguyen, M. L. T. (1991). Legionnaires' disease: New insights. Clinics in Chest Medicine, 12(2),

257–268.
7. Yu, V. L. (1998). Resolving the controversy on environmental cultures of Legionella: A modest proposal. Infection Control and Hospital Epidemiology, 19(12), 893–897. https://doi.org/10.1086/647756
8. Lin, Y. E., Vidic, R. D., Stout, J. E., & Yu, V. L. (1998). Legionella in water distribution systems. Journal of the American Water Works Association, 90(9), 112–121. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1998.tb08489.x
9. Stout, J. E., & Yu, V. L. (1997). Legionellosis. The New England Journal of Medicine, 337(10), 682–687. https://doi.org/10.1056/NEJM199709043371007
10. Joseph, C. A., Watson, J. M., Harrison, T. G., & Bartlett, C. L. R. (1994). Nosocomial Legionnaires' disease in England and Wales, 1980–1992. Epidemiology and Infection, 112(2), 329–345. https://doi.org/10.1017/S0950268800057743
11. Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., & Merz, W. (2003). A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control Legionella species in a hospital water supply. Infection Control and Hospital Epidemiology, 24(8), 575–579. https://doi.org/10.1086/502254
12. Chang, S. L. (1982). The safety of water disinfection. Annual Review of Public Health, 3(1), 393–418. https://doi.org/10.1146/annurev.pu.03.050182.002125
13. Källén, B. A., & Robert, E. (2000). Drinking water chlorination and delivery outcome: A registry-based study in Sweden. Reproductive Toxicology, 14(4), 303–309. https://doi.org/10.1016/S0890-6238(00)00051-6
14. Wondergem, E., & van Dijk-Looijaard, A. M. (1991). Chlorine dioxide as a post-disinfectant for Dutch drinking water. Science of the Total Environment,

102(1), 101–112. https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90377-5

15. Kanitz, S., Franco, Y., Patrone, V., Caltabellotta, M., Raffo, E., Riggi, C., Timitilli, D. & Ravera, G. (1996). Association between drinking water disinfection and somatic parameters at birth. Environmental Health Perspectives, 104(5), 516–520. https://doi.org/10.1289/ehp.96104516
16. Hamilton, E., Seal, D. V., & Hay, J. (1996). Comparison of chlorine dioxide and chlorine for control of Legionella in a hospital potable water supply. Journal of Hospital Infection, 32(2), 156–160.*
17. Hood, J., Cheape, G., Mead, A., & Curran, E. (2000, March). Six years' experience with chlorine dioxide in the control of Legionella pneumophila in the potable water supply of Glasgow Royal Infirmary. Paper presented at the 4th Decennial Conference on Nosocomial and Healthcare-Associated Infections, Atlanta, GA.
18. Environmental Protection Agency. (2002). National primary drinking water regulations (Federal Register, 67, 14502; codified at 40 CFR §141.53 and §141.54).
19. Smith, R. P., & Willhite, C. C. (1990). Chlorine dioxide and hemodialysis. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 11(1), 42–62. https://doi.org/10.1016/0273-2300(90)90049-C
20. Rohr, U., Senger, M., Selenka, F., Turley, R., & Wilhelm, M. (1999). Four years of experience with silver-copper ionization for control of Legionella in a German university hospital hot water system. Clinical Infectious Diseases, 29(6), 1507–1511. https://doi.org/10.1086/313524
21. Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F., & Levi, Y. (2005). Comparison of

disinfectants for biofilm, protozoa and Legionella control. Journal of Water and Health, 3(4), 423–434. https://doi.org/10.2166/wh.2005.047

22. Walker, J. T., Mackerness, C. W., Mallon, D., Makin, T., Williets, T., & Keevil, C. W. (1995). Control of Legionella pneumophila in a hospital water system by chlorine dioxide. Journal of Industrial Microbiology, 15(5), 384–390. https://doi.org/10.1007/BF01569969

2.8 Інактивація діоксидом хлору *Mycobacterium avium*

Mycobacterium avium – це умовно-патогенний мікроорганізм людини, який викликає респіраторні інфекції як у імунокомпетентних осіб, так і у пацієнтів з ослабленим імунітетом [1, 2]. Також відомо, що він викликає шийний лімфаденіт у дітей [3], а також був виділений у пацієнтів з муковісцидозом [4] та ВІЛ-позитивних пацієнтів [2]. Тільки у Сполучених Штатах 25-50% пацієнтів із СНІДом на пізній стадії мають респіраторні, кишкові або дисеміновані інфекції, спричинені *M. avium* [5]. Особливе занепокоєння викликає стійкість *M. avium* у системах очищеної питної води [6, 7], лікарняних водопроводах [2, 8, 9] та гідромасажних ваннах [10]. Встановлено, що ізоляти від пацієнтів зі СНІДом мають той самий ДНК-відбиток, що й ізоляти *M. avium*, виділені з води із систем водопостачання [2, 8, 9]. Оскільки відсутні докази передачі *M. avium* від людини до людини [5], є підстави вважати, що питна вода є ймовірним джерелом інфекції. Хоча в Сполучених Штатах забруднення питної води *M. avium* наразі не регулюється, Агентство з охорони навколишнього середовища США включило цей патоген як частину комплексу *Mycobacterium avium* до списку кандидатів-забруднювачів

[11] для оцінки необхідності майбутніх регуляторних дій.

У Сполучених Штатах для дезінфекції поверхневих або ґрунтових вод під впливом поверхневих вод можуть використовуватися хлор, монохлорамін, діоксид хлору та озон [12]. Було показано, що *M. avium* відносно стійкий до всіх цих дезінфікуючих засобів [13-17]. Taylor et al. [13] виявили, що стійкість *M. avium* до всіх чотирьох дезінфікуючих засобів була більш ніж у 50 разів більшою, ніж у *Escherichia coli* за тих самих досліджених експериментальних умов. Крім того, було виявлено, що значення CT (тобто інтегрований вплив концентрації дезінфікуючого засобу з часом) для досягнення 99,9% (3 log) інактивації *M. avium* вільним хлором, найпоширенішим хімічним дезінфікуючим засобом, варіюється не тільки між штамами *M. avium*, але й залежить від різних умов росту, таких як температура, фаза росту та рівень кисню [15], а також від характеристик якості води, таких як температура та pH [17]. Високу стійкість *M. avium* до вільного хлору за низької температури та пов'язаний з цим сильний вплив pH можна проілюструвати на наступному прикладі. CT для 99,9% інактивації *M. avium* вільним хлором при 5 °C, зростає з 10 000 до 190 000 мг/л·хв при збільшенні pH з 7 до 9 [17]. Це означає, що при постійній концентрації хлору, наприклад, 4 мг Cl_2/л, час контакту, необхідний для інактивації 99,9% клітин, збільшиться з 42 год (pH 7) до 33 діб (pH 9). Отже, використання вільного хлору при 5 °C призведе до незначного контролю *M. avium* на очисних спорудах питної води (pH 7 та 9) та у відповідних системах розподілу (pH 9). Тому існує потреба дослідити альтернативні підходи до дезінфекції, які могли б забезпечити захист від *M. avium*, а також інших мікробних забруднювачів, що викликають занепокоєння. Кандидатом, який потенційно може забезпечити ефективний контроль

M. avium, а також (оо)цист найпростіших, є діоксид хлору. Діоксид хлору наразі (2008 рік) використовується менш ніж на 5% водоочисних споруд у Сполучених Штатах [18]. Однак, ймовірно, його застосування зросте, якщо буде визнано ефективним у боротьбі з *M. avium*, оскільки, окрім забезпечення належного контролю над цим та іншими новими та регульованими мікробними патогенами, діоксид хлору утворює нижчі рівні органічних побічних продуктів дезінфекції, що наразі регулюються [19].

Дані літератури свідчать, що діоксид хлору може бути дуже ефективним проти *M. avium*, при цьому для досягнення 99,9% інактивації при 23 °C та pH 7 для п'яти штамів *M. avium*, вирощених у середовищі, CT складає 2-11 мг/л · хв [13]. Однак вплив характеристик якості води, таких як температура та pH, на чутливість *M. avium* до діоксиду хлору залишається нез'ясованим. Тому метою цього дослідження [20] було дослідити вплив pH, температури та концентрації дезінфікуючого засобу на кінетику інактивації *M. avium* діоксидом хлору.

2.8.1 Вплив концентрації дезінфікуючого засобу

Кінетика інактивації *M. avium* діоксидом хлору при pH 10, 20°C та початковій концентрації c_0 = 0,90-4,10 мгClO_2/л представлена на рис. 2.19.

Для всіх наборів даних була отримана єдина крива, яка показує, що концентрація дезінфікуючого засобу не впливала на кінетику інактивації *M. avium* діоксидом хлору.

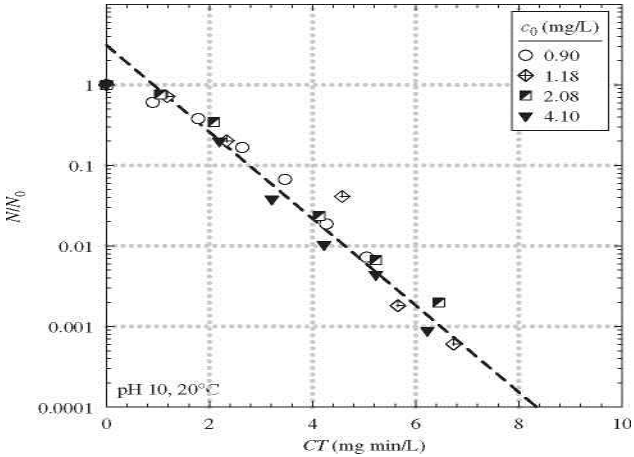

Рис. 2.19 Кінетика інактивації *M. avium* діоксидом хлору при pH 10 та 20 °C.

Як показано на рис. 2.19, кінетика інактивації характеризувалася початковою лаг-фазою, за якою слідувало зниження життєздатності псевдопершого порядку, що можна було змоделювати за допомогою затримки експресії Chick–Watson [21]:

$$\frac{N}{N_0} = \begin{cases} 1 & \text{if } CT \leq CT_{lag} = \frac{1}{k}\ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right), \\ \frac{N_1}{N_0}\exp\left(-k(CT - CT_{lag})\right) & \text{if } CT \geq CT_{lag} = \frac{1}{k}\ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right). \end{cases} \quad (1)$$

де N/N_0 – частка життєздатних клітин *M. avium* після часу t впливу дезінфікуючого засобу, N_1/N_0– перетин з віссю, отриманий екстраполяцією псевдопершого порядку лінії до вертикальної осі, k – константа швидкості інактивації після фази затримки в л/(мг · хв), а CT – інтегрований вплив дезінфікуючого засобу з часом у мг/л·хв, або

$$CT = \int_0^t c(\lambda)\,d\lambda, \quad (2)$$

де c(λ) - концентрація дезінфікуючого засобу в момент часу λ (0≤λ≤t), виміряна прямою спектрофотометрією. У цьому дослідженні було використано затримку моделі Chick–Watson, оскільки відповідний кінетичний член другого порядку можна було легко включити до рівнянь проектування проточного реактора [22-24].

Лінійні частини всіх наборів даних на рис. 2.19 були одночасно підігнані до рівняння (1) за допомогою лінійної регресії для отримання параметрів N_1/N_0 та k. Отримана крива апроксимації при pH 10 та 20 °C показана на рис. 2.19, а отримані параметри апроксимації становили N_1/N_0 = 3,12 та k = 1,24 л/(мг · хв) (табл. 2.3), з відповідним CT_{lag} = 0,918 мг/л·хв.

Таблиця 2.3

Константи швидкості, отримані шляхом апроксимації інактивації *M. avium* діоксидом хлору

pH	Температура	k, л/(мг · хв)
6	5	(2,67 + 0,09) x 10^{-1}
6	10	3,63 x $10^{-1,a,b}$
6	30	3,45±0.11[a]
10	20	1,24±0,04

[a] Значення, отримане для найстійкішого набору даних.

[b] Помилка не розрахована, оскільки використовувався лише один набір даних.

2.8.2 Вплив температури

Експериментальні результати інактивації *M. avium* діоксидом хлору при pH 6 та температурах 5, 10 та 30 °C представлені на рис. 2.20. Відповідно до результатів рис. 2.20, кінетика інактивації при 5 °C (рис. 2.21a)

характеризувалася унікальною кривою в межах тестованого діапазону концентрацій. Параметри, отримані шляхом апроксимації всіх наборів даних на рис. 2.21a за допомогою рівняння (1), становили N_1/N_0 = 5,61 та k = 0,267 л/(мг · хв) (табл. 2.3), а відповідний CT_{lag} = 6,46 мг/л·хв.

На відміну від спостереження при 5 °C, спостерігалася мінливість кінетики інактивації при 10 та 30 °C (рис. 2.21b та 2.21c відповідно). Як показано на рисунках, для різних наборів даних загалом було отримано різні криві. Однак чіткої кореляції між мінливістю та початковою концентрацією дезінфікуючого засобу, що використовувалася при будь-якій з двох температур, не спостерігалося.

Подібна мінливість, також не пов'язана з концентрацією дезінфікуючого засобу, була зареєстрована для інактивації *M. avium* вільним хлором [17]. Кінетика інактивації *M. avium* вільним хлором характеризувалася початковою швидкою стадією інактивації без лаг-фази, за якою слідувала повільніша кінетика.

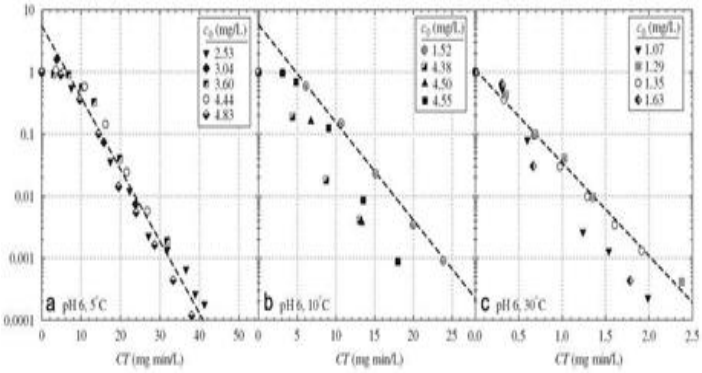

Рис. 2.21 Вплив температури на кінетику інактивації

M. avium діоксидом хлору при pH 6.

Ця поведінка була представлена двопопуляційною моделлю сприйнятливих та толерантних клітин, але їх частки загалом непередбачувано варіювали між повторними тестами. Подібно до спостережень у цьому дослідженні [20], більша мінливість спостерігалася для експериментів з вільним хлором при вищих температурах порівняно з 5 °C. Хоча не було виявлено жодного експериментального параметра, який би корелював зі спостережуваною мінливістю або наявністю двох популяцій, однією з можливих причин може бути те, що культури містили кілька варіантів колоній. Варіанти колоній та спонтанний перехід між типами колоній були описані в літературі [25-27] і можуть пояснити спостережувані результати.

Як показано на рис. 2.21c, при 30 °C спостерігалися дві окремі криві. Експериментальні набори даних при двох проміжних концентраціях, c_0 = 1,29 та 1,35 мгClO_2/л, дали криву інактивації без спостережуваного плеча та одну фазу кінетики псевдопершого порядку з константою швидкості інактивації k = 3,45 л/(мг · хв), що узгоджується з наявністю лише толерантних клітин (повільніша кінетика). На противагу цьому, набори даних при c_0 = 1,07 та 1,63 мгClO_2/л мали плече з $CT_{lag} \approx$ 0,240 мг/л · хв, за яким слідувала стадія швидкої (чутливі клітини) кінетики та завершальна фаза повільної (толерантні клітини) кінетики. Однак, константа швидкості інактивації другої повільнішої стадії виявилася такою ж, як і отримана для наборів даних при c_0 = 1,29 та 1,35 мг ClO_2/л. Це узгоджувалося зі спостереженнями з вільним хлором, де швидкість інактивації другої стадії була приблизно постійною для всіх кривих [17].

Подібно до результатів, отриманих при 30 °C,

кінетика інактивації при 10 °C показала варіабельність серед отриманих кривих (рис. 2.21b). Набір даних при найнижчій концентрації c_0 = 1,52 мгClO_2/л мав найповільнішу кінетику, що характеризувалася фазою затримки та наступною фазою інактивації псевдопершого порядку. Цей набір даних був підігнаний до рівняння (1) з результуючими параметрами підгонки N_1/N_0 = 5,77 та k = 0,363 л/(мг · хв), та відповідним CT_{lag} = 4,83 мг/л·хв. Набір даних при c_0 = 4,38 мгClO_2/л на рис. 3.21b мав найшвидшу загальну кінетику, що характеризується відсутністю лаг-фази, за якою слідує фаза псевдо-кінетики першого порядку приблизно з такою ж швидкістю, як і для стадії після лаг-фази експерименту при c_0 = 1,52 мгClO_2/л. Набори даних при c_0 = 4,50 та 4,55 мгClO_2/л, мабуть, характеризуються лаг-фазами та подальшою послідовно швидкою (чутливі клітини) та повільною (толерантні клітини) кінетикою, хоча відповідні константи швидкості не могли бути отримані через обмежену кількість точок даних.

Двопопуляційний аналіз даних інактивації діоксидом хлору, подібний до того, що повідомлялося для вільного хлору, не проводився через додаткову складність, спричинену наявністю змінної лаг-фази, знову ж таки без чіткої кореляції з використаними експериментальними параметрами. Однак для цілей проектування та регулювання використання найповільнішої кінетики має забезпечити консервативний підхід. Отже, з результатів, наведених на рис. 2.21, вплив температури на кінетику інактивації *M. avium* діоксидом хлору можна оцінити, використовуючи підібрані параметри, що відповідають найповільнішій кінетиці при кожній температурі. Константи швидкості інактивації, k, отримані при температурах 5, 10 та 30°C, були нанесені на рис. 2.22 та підігнані до виразу Арреніуса:

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right), \quad (3)$$

де А - коефіцієнт частоти зіткнень у л/(мг · хв), E_a - енергія активації в Дж/моль, R - ідеальна газова стала = 8,314 Дж/(моль х К), а Т - абсолютна температура в К.

Параметри, отримані методом найменших квадратів, підібрані до рівняння (3), становили А = 1,98 х 10^{13} л/(мг · хв) та E_a = 74,1 кДж/моль, причому останнє показує, що інактивація *M. avium* діоксидом хлору має відносно сильну температурну залежність. Хоча енергія активації нижча за 96,5-100,3 кДж/моль, про яку повідомлялося для інактивації *M. avium* вільним хлором [17], вона знаходиться в діапазоні 69-87 кДж/моль, про яку повідомлялося для інактивації ооцист *Cryptosporidium parvum* озоном, діоксидом хлору, вільним хлором та монохлораміном [28, 29]. Останнє вважалося найсильнішою температурною залежністю серед забруднювачів води в промисловості питної води США, доки не було повідомлено про кінетику інактивації *M. avium* вільним хлором [17].

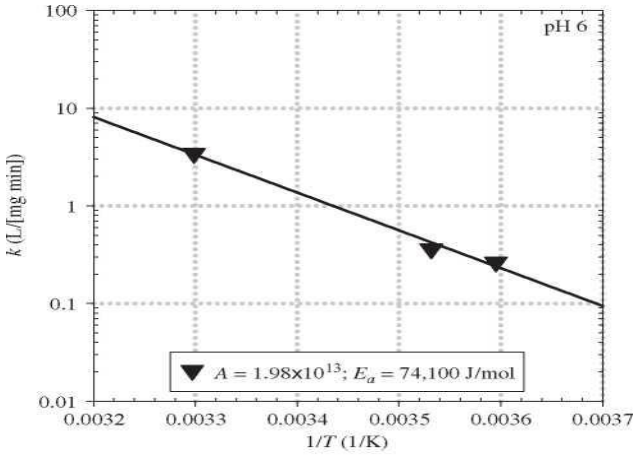

Рис. 2.22 Графік Арреніуса для найтолерантніших клітин *M. avium* при pH 6.

2.8.3 Вплив pH

Апроксимовану криву на рис. 2.22 було використано для прогнозування константи швидкості k = 1,23 л/(мг · хв) для інактивації *M. avium* діоксидом хлору при 20 °C та pH 6. Це значення знаходилося в межах 1% від k = 1,24 л/(мг · хв), отриманого раніше шляхом апроксимації даних при 20 °C та pH 10 (рис. 2.20) відповідно до рівняння (1). Це свідчить про те, що pH не впливає на кінетику інактивації *M. avium* діоксидом хлору.

Відсутність залежності від pH можна було додатково оцінити, порівнявши результати експериментів, проведених при 20 °C та pH 6, 8 та 10 (рис. 2.23).

Криві інактивації, показані пунктирними лініями на рис. 2.23, були отримані шляхом апроксимації наборів даних з найповільнішою кінетикою на кожному графіку (перший набір даних при c_0 = 1,18 мгClO_2/л для pH 6, c_0 = 1,18 та 4,95 мгClO_2/л для pH 8, та всі експериментальні концентрації для pH 10), але з використанням k = 1,23 л/(мг · хв), передбаченого за допомогою рівняння (3) при 20 °C.

Як показано на рис. 2.23, хоча мінливість спостерігалася за кожних експериментальних умов, напівпрогнозовані криві для толерантної популяції узгоджувалися з наборами даних інактивації з найповільнішою кінетикою, що підтверджує відсутність залежності від pH в експериментальному діапазоні pH 6-10, та підтверджує, що рівняння (3) з A = 1,98 x 10^{13} л/(мг · хв) та E_a = 74,1 кДж/моль можна використовувати для консервативного представлення кінетики інактивації *M.*

avium діоксидом хлору.

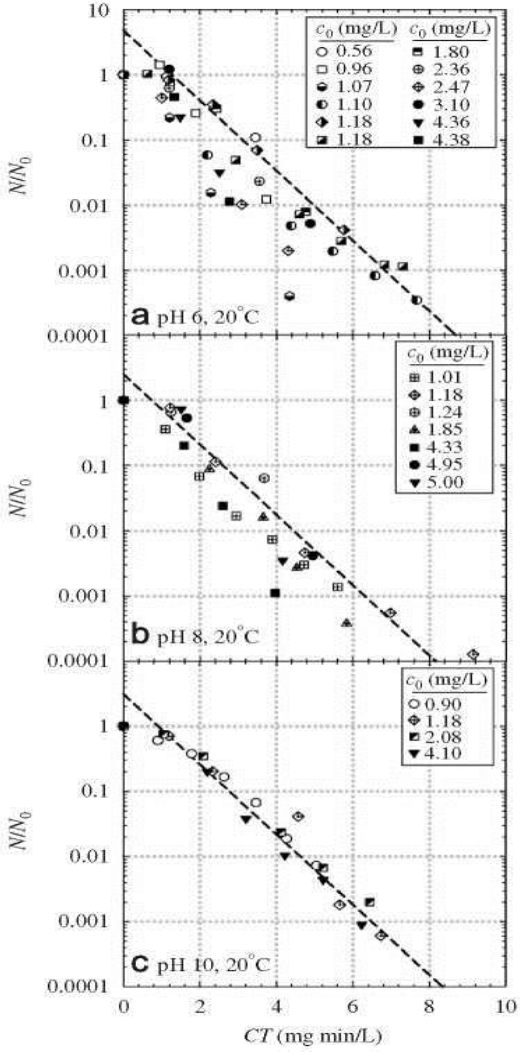

Рис. 2.23 Вплив pH на кінетику інактивації *M. avium*

діоксидом хлору при 20 °C.

Рівняння (3) з A = 1,98 x 10^{13} л/(мг · хв) та E_a = 74,1 кДж/моль тепер можна використовувати для прогнозування константи швидкості інактивації k = 1,68 л/(мг · хв) толерантної популяції *M. avium* при 23 °C, і це значення k можна використовувати разом з рівнянням (1) для прогнозування CT, необхідної для досягнення 99,9% інактивації *M. avium* при 23 °C. Отримане значення передбачає: якщо N_1/N_0 = 1, то CT становить 4,1 мг/л·хв. Ця величина знаходиться в діапазоні 2-11 мг/л·хв, про який повідомляли Taylor et al. [13], для різних штамів *M. avium* при 23 °C.

2.8.4 Вимоги до обробки

Рівняння (1) з константами швидкості інактивації, передбаченими за допомогою рівняння (3), та A = 1,98 x 10^{13} л/(мг · хв) та E_a = 74,1 кДж/моль можна використовувати для забезпечення консервативного представлення кінетики інактивації *M. avium* діоксидом хлору в діапазоні температур 5-30 °C. Хоча значення N_1/N_0 та відповідні значення CT_{lag} непередбачувано варіювалися між наборами даних за однакових експериментальних умов, найвище значення N_1/N_0 = 5,77, що спостерігалося при pH 6 та 10 °C, можна використовувати для цієї мети. Використання температурно-незалежного значення N_1/N_0 для кінетики затримки Chick–Watson підтверджується деякими експериментальними спостереженнями, такими як ті, що були описані для інактивації ооцист *C. parvum* озоном [21]. Консервативні значення CT, отримані за допомогою цього підходу для досягнення ефективності, наприклад, 99,9 % для інактивації *M. avium* діоксидом

хлору, становлять 36, 21, 7 та 3 мг/л · хв за відповідних температур 5, 10, 20 та 30 °C.

Кінетика інактивації *M. avium* діоксидом хлору загалом характеризувалася лаг-фазою, за якою слідувала фаза відносно швидкої кінетики псевдо-першого порядку та кінцева фаза повільнішої кінетики, що узгоджується з кінетикою двох популяцій. Хоча мінливість загалом спостерігалася в обсязі лаг-фази, а також у частках чутливих та толерантних популяцій за заданого набору умов, ця мінливість не чітко корелювала з жодною з досліджених експериментальних умов. Двостадійна кінетика після лаг-фази узгоджувалася з даними, отриманими для інактивації *M. avium* вільним хлором [17], де також спостерігалися дві популяції чутливих та толерантних клітин, але без виникнення лаг-фази.

Було виявлено, що константи швидкості інактивації найбільш стійких клітин (тобто найповільнішої кінетики) відповідають експресії Арреніуса з енергією активації 74,1 кДж/моль, що вказує на відносно сильну температурну залежність. Впливу pH у діапазоні pH 6-10 для кінетики інактивації толерантної популяції не спостерігалося.

Значення CT, розраховані за різних температур з використанням затримки кінетики Chick–Watson з найконсервативнішими отриманими кінетичними параметрами, показали, що у процесі водопідготовки можна досягти адекватного контролю *M. avium* за допомогою діоксиду хлору, забезпечуючи необхідний час контакту.

Література

1. Huang, J. H., Kao, P. N., Adi, V., & Ruoss, S. J. (1999). Mycobacterium avium-intracellulare pulmonary infection in HIV-negative patients without preexisting

lung disease: Diagnostic and management limitations. Chest, 115(4), 1033–1040. https://doi.org/10.1378/chest.115.4.1033

2. von Reyn, C. F., Maslow, J. N., Barber, T. W., Falkinham III, J. O., & D'Arbelt, R. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of Mycobacterium avium infection in AIDS. The Lancet, 343(8906), 1137–1141. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90542-8
3. Wolinsky, E. (1995). Mycobacterial lymphadenitis in children: A prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. Clinical Infectious Diseases, 20(4), 954–963. https://doi.org/10.1093/clinids/20.4.954
4. Olivier, K. N., Weber, D. J., Wallace, R. J., Jr., Faiz, A. R., Lee, J.-H., Zhang, Y., Brown-Elliot, B. A., Handler, A., Wilson, R. W., Schechter, M. S., Edwards, L. J., Chakraborti, S., & Knowles, M. R. (2003). Nontuberculous mycobacteria I: Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 167(6), 828–834. https://doi.org/10.1164/rccm.167.6.828
5. Inderlied, C. B., Kemper, C. A., & Bermudez, L. E. M. (1993). The Mycobacterium avium complex. Clinical Microbiology Reviews, 6(3), 266–310. https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.266
6. Falkinham III, J. O., Norton, C. D., & LeChevallier, M. W. (2001). Factors influencing numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. Applied and Environmental Microbiology, 67(3), 1225–1231. https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001

7. Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L., & Stelma, G. N., Jr. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 65(6), 2492–2496. https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2492-2496.1999
8. von Reyn, C. F., Waddell, R. D., Eaton, T., Arbeit, R. D., Maslow, J. N., Barber, T. W., Brindle, R. J., Gilks, C. F., Dawson, D., & Falkinham III, J. O. (1993). Isolation of Mycobacterium avium complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. Journal of Clinical Microbiology, 31(12), 3227–3230. https://doi.org/10.1128/JCM.31.12.3227-3230.1993
9. Aronson, T., Holtzman, A., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Berlin, O. G. W., Hill, H., & Stelma, G., Jr. (1999). Comparison of large restriction fragments of Mycobacterium avium isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. Journal of Clinical Microbiology, 37(4), 1008–1012. https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.1008-1012.1999
10. Embil, J., Warren, P., Yakrus, M., Stark, R., Corne, S., Forrest, D., & Hershfield, E. (1997). Pulmonary illness associated with exposure to Mycobacterium avium complex in hot tub water: Hypersensitivity pneumonitis or infection. Chest, 111(3), 813–816. https://doi.org/10.1378/chest.111.3.813
11. U.S. Environmental Protection Agency. (2005a). Drinking water contaminant candidate list 2: Final notice. Federal Register, 70(36), 9071–9077.
12. U.S. Environmental Protection Agency. (2006a). 40 CFR Parts 9, 141, and 142. National primary drinking water regulations: Long term 2 enhanced surface water treatment rule; final rule. Federal Register, 71(3), 653–702.

13. Taylor, R. H., Falkinham III, J. O., Norton, C. D., & LeChevallier, M. W. (2000). Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. Applied and Environmental Microbiology, 66(4), 1702–1705. https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1702-1705.2000
14. Pelletier, P. A., Carney, E. M., & du Moulin, G. C. (1991). Comparative resistance of Mycobacterium avium complex and other nontuberculous mycobacteria to chloramines. In Proceedings of the AWWA Annual Conference (pp. 46–58). American Water Works Association.
15. Falkinham III, J. O. (2003). Factors influencing the chlorine susceptibility of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum. Applied and Environmental Microbiology, 69(9), 5685–5689. https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5685-5689.2003
16. Sulzer, F., Ramadan, F., & Wuhrmann, K. (1959). Studies on the germicidal action of ozone. Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, 21(1), 112–122.

17. Luh, J., & Marinas, B. J. (2007). Inactivation of Mycobacterium avium with free chlorine. Environmental Science & Technology, 41(14), 5096–5102. https://doi.org/10.1021/es062320m
18. U.S. Environmental Protection Agency. (2005b). Economic analysis for the final Stage 2 disinfectants and disinfection byproducts rule.
19. U.S. Environmental Protection Agency. (2006b). 40 CFR Parts 9, 141, and 142. National primary drinking water regulations: Stage 2 disinfectants and disinfection byproducts rule; final rule. Federal Register, 71(2),

388–493.
20. Vicuna-Reyes, J. P., Luh, J., & Marinas, B. J. (2008). Inactivation of Mycobacterium avium with chlorine dioxide. Water Research, 42(6–7), 1531–1538. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.035https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.035
21. Rennecker, J. L., Marinas, B. J., Owens, J. H., & Rice, E. W. (1999). Inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with ozone. Water Research, 33(11), 2481–2488. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00006-0
22. Kim, J.-H., Tomiak, R. B., & Marinas, B. J. (2002). Inactivation of Cryptosporidium oocysts in a pilot-scale ozone bubble-diffuser contactor. I. Model development. Journal of Environmental Engineering, 128(6), 514–521. https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:6(514)
23. Kim, J.-H., von Gunten, U., & Marinas, B. J. (2004). Simultaneous prediction of Cryptosporidium parvum oocyst inactivation and bromate formation during ozonation of synthetic waters. Environmental Science & Technology, 38(7), 2232–2241. https://doi.org/10.1021/es034879m
24. Kim, J.-H., Elovitz, M. S., von Gunten, U., Shukairy, H. M., & Marinas, B. J. (2007). Modeling Cryptosporidium parvum oocyst inactivation and bromate in a flow-through ozone contactor treating natural water. Water Research, 41(2), 467–475. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.013
25. McCarthy, C. (1970). Spontaneous and induced mutation in Mycobacterium avium. Infection and Immunity, 2(3), 223–228. https://doi.org/10.1128/IAI.2.3.223-228.1970
26. Stormer, R. S., & Falkinham III, J. O. (1989).

Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of Mycobacterium avium. Journal of Clinical Microbiology, 27(11), 2459–2465. https://doi.org/10.1128/JCM.27.11.2459-2465.1989

27. Woodley, C. L., & David, H. L. (1976). Effect of temperature on the rate of the transparent-to-opaque colony type transition in Mycobacterium avium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9(1), 113–119. https://doi.org/10.1128/AAC.9.1.113-119.1976
28. Corona-Vasquez, B., Rennecker, J. L., Driedger, A. M., & Marinas, B. J. (2002a). Sequential inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with chlorine dioxide followed by free chlorine or monochloramine. Water Research, 36(1), 178–188. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00249-8
29. Corona-Vasquez, B., Samuelson, A., Rennecker, J. L., & Marinas, B. J. (2002b). Inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts with ozone and free chlorine. Water Research, 36(16), 4053–4063. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00119-0

2.9 Дослідження бактерицидної та мікоцидної дії діоксиду хлору по відношенню до збудників нозокоміальних інфекцій *P. aeruginosa, S. aureus*, грибів *роду Candida*

Згідно з даними [1], існує тісний взаємозв'язок мікробної контамінації питної води та нозокоміальними інфекціями (НІ). У цій роботі представлено аналіз 43-х спалахів водно-обумовлених (НІ) (за винятком легіонельозу) за період з 1966 по 2001 рр. Встановлено, що лише госпітальні пневмонії, спричинені контамінацією води *P. aeruginosa*, є причиною 1400 випадків смерті

щороку. Автори акцентують увагу: незважаючи на доступність ефективних заходів контролю, відсутні рекомендації для запобігання цим інфекціям та стандартам якості води для лікарень. У зв'язку з цим визнано необхідним додаткове знезараження води, що подається до лікарень.

Гострота цієї проблеми підкреслює необхідність пильної уваги до НІ в нашій країні. Однак, як свідчать дані, викладені у проблемній статті [2], НІ в Україні – terra incognita, а захворюваність на них – лише верхівка величезної піраміди. Недостатність реєстрації НІ підтверджується наступним: на 1000 хворих у країнах СНД реєструється 2 випадки, тоді як у Чехії - 163, Швеції - 117, Іспанії - 100.

Поверхневе ставлення до НІ призводить до того, що інфекції часто не фіксуються і замовчуються. Водночас у Європейському Союзі щорічно реєструється до 5 млн. випадків НІ. З них 100 тис. закінчуються смертю пацієнта. У США із 2 млн інфікованих пацієнтів помирає 80 тис. [2].

Слід зазначити, що полімерні матеріали лікарняного середовища, контаміновані госпітальними штамами, можна розцінювати як локальні резервуари і можливі джерела вторинних вогнищ НІ. Крім того, вони можуть бути фактором, що сприяє селекції мультирезистентних штамів [3].

Таким чином, питна вода як циркулююча в системах госпітального водопостачання, так і призначена для функціонування різних систем життєзабезпечення лікарень може бути ймовірним джерелом інфікування пацієнтів збудниками НІ, що свідчить про необхідність використання ефективного бактерицидного агента для вторинного знезараження води.

Це дослідження виконано в рамках виконання дисертаційної роботи [4].

Дослідження біоцидної ефективності діоксиду хлору (ДХ) по відношенню до збудників нозокоміальних інфекцій передбачали вивчення біоцидної ефективності ДХ у дозах 0,3 - 1,5 мг/л по відношенню до збудників нозокоміальних інфекцій (НІ) як можливих контамінантів води систем госпітального водопостачання: грамнегативним *P. aeruginosa*, грампозитивним *S. aureus* та грибам роду *Candida*.

Музейні штами отримані у бактеріологічній лабораторії Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Номери штамів: *P. aeruginosa* ATCC 9027; *S. aureus* ATCC 6538P; *C. albicans* ATCC 10231.

Мультирезистентні штами *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida* (по 4 для кожного мікроорганізму) виділені з клінічного матеріалу, відібраного в Одеській обласній клінічній лікарні.

Джерела виділених штамів такі. *P. aeruginosa* 48/3 – виділення з носу, 8/2 - змив з трахеоскопа, 12/2 - виділення уретри, 90/8 - дезрозчин Декосепт; *S. aureus* - 50/8 - раньове виділення, 121/1 - виділення кон'юнктиви, 17/11 - виділення гайморової пазухи; гриби роду *Candida* - 80/210, 4/81, 2/5, 32/8 – виділення піхви.

Вивчення резистентності до антимікробних препаратів (АП) музейних та мультирезистентних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida* проводили на середовищі АГВ за допомогою стандартних паперових дисків диско-дифузійним методом відповідно до вимог [5].

Для оцінки резистентності використовували такі АП:

- для *P. aeruginosa* – рифампіцин, хіконцил KRKA, доксициклін, ципрофлоксацин, нітрофурантоїн, левоміцетин, норфлоксацин, цефазолін, гентаміцин, еритроміцин, офлоксацин, цефтріаксон, ципробіт, зиквін, азитроміцин;

- для *S. aureus* – рифампіцин, хіконцил KRKA, доксициклін, ципрофлоксацин, нітрофурантоїн, левоміцетин, норфлоксацин, цефазолін, гентаміцин, еритроміцин, офлоксацин, цефтріаксон, ципробіт, зіквінмік, азитроміцин, флемоксин;

- для *C. albicans* та грибів роду *Candida* – ністатин, клотримазол, флуконазол, амфотерицин, нізорал.

У процесі гігієнічної оцінки біоцидної дії ДХ по відношенню до збудників НІ використовували комерційні живильні середовища Ендо, Сабуро, елективний сольовий агар, середовища Гісса, середовище АГВ, МПБ з 1% глюкозою.

Матеріал відбирали сухим стерильним ватним тампоном і засівали на щільні живильні середовища. Потім тампон із залишком матеріалу занурювали в рідке середовище накопичення.

Посіви інкубували при температурі +37 °С протягом 24-48 годин. Потім відзначали характер росту на поживних середовищах. Вивчали морфологію виділених мікроорганізмів мікроскопією з забарвленням за Грамом. Виділені мікроорганізми ідентифікували відповідно до визначника Берджі [6].

Вивчення бактерицидної активності діоксиду хлору проводили у питній доочищеній воді «Прозора», що не містила залишкового дезінфектанту.

З 24-годинних агарових культур готували завись з концентрацією 5 ОД (1 млрд. м.т./мл) за стандартом каламутності і титрували в обсязі 5 мл до кінцевої концентрації 1000 і 100 м.т./л. ДХ додавали з розрахунку 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,50 мг/л. Досліди проводили за температури + 24 °С.

Після експозиції 30 хв., 2 години, 3,5 години, 24 години дозовано висівали 0,1 мл суспензії на 2 чашки з середовищем АГВ. Посіви на середовищі АГВ інкубували

24 - 48 годин при 37 ° С і проводили кількісний облік колоній, що виросли, враховуючи середньоарифметичний показник зростання на 2-х чашках. За відсутності зростання до «дослідних» пробірок додавали рівний обсяг МПБ, інкубували 24 години при 37 °С і робили повторний висів на чашку з АГВ середовищем. Паралельно за тих самих умов проводили контрольні дослідження без додавання ДХ. Бактерицидну та бактеріостатичну активність ДХ оцінювали за достовірною різницею зростання колоній мікроорганізмів у дослідних та контрольних пробах. Усі дослідження проводили у 4-х повторностях з обчисленням середніх показників.

Паралельно з бактеріологічними проводили мікологічні дослідження. Первинний матеріал засівали на агар Сабуро та МПБ з 1% глюкозою. Посіви культивували при +28 °С протягом 7 днів з переглядом чашок починаючи з 2-х діб. За відсутності росту на щільному живильному середовищі в період спостереження готували препарат "роздавлена" крапля з осаду в рідкому середовищі та переглядали під мікроскопом. При виявленні грибів робили висів на щільне живильне середовище. Ідентифікацію виділених культур проводили на підставі темпу росту та морфології колоній. Для диференціації дріжджоподібних грибів роду *Candida* та справжніх дріжджів вивчали філоментацію на картопляному агарі. Видову ідентифікацію грибів роду *Candida* проводили на підставі морфології колоній на твердих середовищах, характеристики псевдоміцелію на картопляному агарі, наявності хламідоспор та результатів зимограми (ферментації вуглеводів із утворенням кислоти та газу) [7].

Число повторностей для кожного еталонного штаму склало 16, для кожного мультирезистентного – 24. Достовірність відмінності бактерицидної дії ДХ в

залежності від його дози, рівня зараження та експозиції (в порівнянні з контролем) проводили згідно [8, 9].

2.9.1 Дослідження резистентності еталонних та мультирезистентних штамів P. aeruginosa, S. aureus та грибів роду Candida до антимікробних препаратів

Перед проведенням досліджень з оцінки ефективності біоцидної дії ДХ стосовно еталонних та мультирезистентних штамів досліджували їх стійкість до різних антимікробних препаратів (АП) за критеріями чутливості (чут.) – помірної стійкості (п/ст.) – стійкості (ст.).

Як видно з отриманих даних, еталонним штамам не була характерна повна чутливість до апробованих АП (за винятком *S. aureus*): P. aeruginosa виявляла стійкість до рифампіцину, хіконцилу KRKA, нітрофурантоїну, левоміцетину, еритроміцину, поліміку, азитрозолу, цефтріаксону, медоміцину, мирамістину. *C. albicans* були помірно стійкі до клотримазолу, флуконазолу, амфотерицину; стійкі до низоралу, чутливі до ністатину.

Для мультирезистентних штамів була властива більш мозаїчна картина стійкості/чутливості до АП. Наприклад, усі чотири штами *P. aeruginosa* (48/3, 8/2, 12/2, 90/8) були стійкими до рифампіцину, хіконцилу KRKA, нітрофурантоїну, цефазоліну, еритроміцину, кліримеду, мирамістину, азитроміцину. Для інших АП «стійкість/чутливість» коливалася: наприклад, до доксицикліну були чутливі штами 48/3, 90/8, проте штами 8/2, 12/2 стійкі; до гентаміцину був стійкий штам 48/3, штами 8/2, 90/8 – чутливі, а штам 12/2 виявляв помірну чутливість.

Для штамів *S. aureus* 50/8, 121/2, 63/14, 17/11 коливання чутливості до одного і того ж АП були ще більш виражені: повна стійкість для всіх штамів була констатована тільки до хіконцилу KRKA, повна чутливість - тільки до зиквіну, тоді як для інших АП були властиві різні варіанти поєднань чутливості - помірної чутливості - стійкості.

Для мультирезистентних штамів грибів роду *Candida* (80/2, 104/8, 12/5, 32/8) була характерна також повна стійкість всіх штамів тільки для нізоралу, а повна чутливість - для ністатину, тоді як для інших антигрибкових препаратів стійкість одного штаму змінювалася на чутливість іншого.

Таким чином, еталонні (*P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*) і мультирезистентні (*P. aeruginosa, S. aureus* і гриби роду *Candida*) штами збудників нозокоміальних інфекцій мають різну резистентність до антимікробних препаратів, більш виражену у мультирезистентних штамів, виділених з клінічного матеріалу.

2.9.2 Дослідження біоцидної ефективності ДХ при знезараженні води по відношенню до еталонних штамів збудників нозокоміальних інфекцій P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans

Результати досліджень біоцидної ефективності ДХ при знезараженні води по відношенню до еталонних штамів збудників нозокоміальних інфекцій *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans* свідчать, що у всіх випадках була значне, а при використанні дози зараження 10^1 КОЕ/мл, повне пригнічення ДХ росту усіх трьох еталоних штамів мікроорганізмів:

• ріст *P. aeruginosa* пригнічувався в 21 раз навіть при мінімальній інактивації, коли використовувалися дози

зараження 10^2 КУО/мл і найнижча доза ДХ (0,32±0,05 мг/л) при 24 годинах експозиції; достовірність відмінності у зростанні колоній $\chi^2 = 44,3182$; для решти доз зараження та доз ДХ це явище ще більш виражене;

• для *S. aureus* при мінімальній інактивації зростання пригнічувалося в 8,5 рази - при використанні дози зараження 10^2 КУО/мл та найнижчій дозі ДХ – 0,32±0,05 мг/л при 24 годинах експозиції; достовірність відмінності у зростанні колоній у контролі та після обробки $\chi^2=47,5034$; в решті випадків ефект ще більш виражений, ніж до повної інактивації;

• зростання еталонного штаму дріжджового гриба *C. albicans* при мінімальній інактивації пригнічувалося у 8 разів (при дозі зараження 10^2 КУО/мл та дозі ДХ 0,53±0,07 мг/л); $\chi^2 = 77,5208$ вказує на дуже високу достовірність відмінності росту у контролі та після обробки ДХ; в інших випадках значення величини χ^2 ще вище.

Таким чином, еталонні штами досліджених мікроорганізмів у дозі зараження 10^1 КУО/мл високо статистично достовірно повністю інактивуються ДХ у дозі від 0,32±0,05 до 0,89±0,04 мг/л, а штам P. aeruginosa повністю інактивується. При більшому рівні контамінації (10^3 КУО/мл) повної інактивації немає, проте відзначається значне пригнічення росту еталонних штамів мікроорганізмів.

При дії ДХ на *P. aeruginosa* та *S. aureus* спостерігається наступна тенденція - зі збільшенням часу експозиції ефективність знезараження знижується, особливо це помітно при найнижчих дозах ДХ та дозі зараження 10^3 КУО/мл. При впливі ДХ на еталонний штам *C. albicans* спостерігається зворотна тенденція - зі зростанням часу експозиції пригнічення росту також зростає. На наведеному нижче графіку (рис. 2.24) представлено зміну відсотка колоній, що виросли (по

відношенню до контролю) всіх трьох вивчених еталонних штамів при зміні часу експозиції від 0,5 години до 24 годин і вихідній дозі ДХ 0,32±0,05 мг/л.

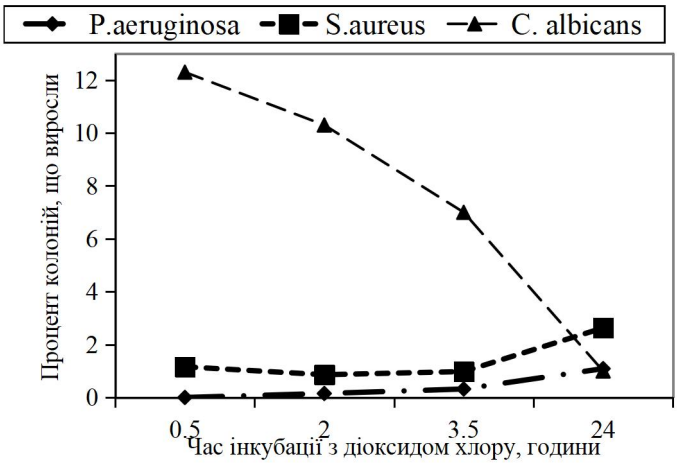

Рис. 2.24 Залежність відсотка виросших колоній еталонних штамів мікроорганізмів (по відношенню до контролю) від експозиції впливу ДХ.

Як видно з представлених на діаграмі даних, відсоток колоній, що виросли, зростає з часом експозиції. Відмінність між кількістю колоній *P. aeruginosa* через 0,5 - 2 години експозиції (0,15 ± 0,21% і 0,32 ± 0,27% відповідно) і через 24 години експозиції (1,09 ± 0,47%) статистично достовірна з похибкою менше 5%.

Такої достовірної відмінності для *S. aureus* не зазначено, проте констатовано таку ж тенденцію. Це, вірогідно, пояснюється можливою наявністю стійких клітин, які починають розмножуватися в процесі експозиції у міру втрати активності дезінфектанту.

Для *C. albicans*, які більш стійкі до ДХ, ніж перші два мікроорганізми, спостерігається зворотна тенденція: зі збільшенням часу експозиції впливу ДХ їх ріст не збільшується, а знижується. Відмінність між максимальним ростом колоній (12,3±2,4%) через 0,5 години експозиції з ДХ і через 3,5 і 24 години експозиції з ДХ (7,0±2,2% і 1,0±0,8% відповідно) статистично достовірна з похибкою менше 5%. Таку відмінність грибів від бактерій можна пояснити тим, що гриби більш стійкі до дії дезінфектантів, однак практично не можуть розмножуватися в процесі експозиції у зв'язку з сильним збідненням живильного середовища.

Вплив дози ДХ на ріст вивчених мікроорганізмів представлений на рис. 2.25. Графіки побудовані для найбільшої дози зараження – 10^3 КУО/мл і тієї експозиції, при якій спостерігався найбільший ріст мікроорганізмів, тобто менш виражена дезінфікуюча дія. Оскільки навіть у цьому випадку виразно простежується зростання дезінфікуючої дії ДХ із зростанням його дози, то в інших випадках ця закономірність виражена ще більше.

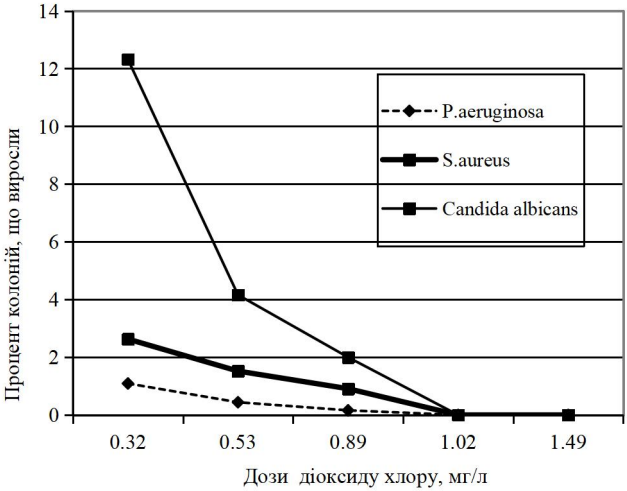

Рис. 2.25 Вплив різних доз ДОХ на ріст еталонних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* (24 години експозиції) та *C. albicans* (0,5 години експозиції).

Як видно з представлених графіків, навіть при максимальній дозі зараження 10^3 КУО/мл, зі зростанням дози ДХ його здатність пригнічувати зростання мікроорганізмів, практично лінійно зростає (відсоток колоній, що виросли, знижується) Достовірність відмінності (χ^2) між ростом колоній при дозах ДХ (0,32-0,89 мг/л) представлена у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Достовірність відмінності χ^2 у зниженні кількості колоній, що виросли, при зростанні дози ДОХ при максимальній дозі зараження 10^3 КУО/мл та експозиції 24 години

Мікроорганізм	Порівнювані концентрації діоксиду хлору, мг/л

	0,32 – 0,53	0,32 – 0,89
P. aeruginosa	4,3828	11,2599
S. aureus	2,4901	7,4446
C. albicans	18,9332	53,0632

Як видно з даних табл. 2.4, між впливом найменшої і двох більших доз ДХ на мікроорганізми відмінність статистично високо достовірна. Тільки для доз ДХ 0,32 і 0,53 мг/л при впливі на *S. aureus* відмінність не доведено - $\chi^2 < 3,841$, але з дози 0,89 мг/л ця відмінність достовірна.

При дозі зараження 10^2 КУО/мл ця тенденція ще більш виражена – при часі інкубації 0,5 та 2,0 години всі дози ДХ повністю пригнічують ріст *P. aeruginosa* та *S. aureus*. При дозі зараження 10^1 КУО/мл ДХ незалежно від дози пригнічує ріст всіх трьох еталонних штамів.

Враховуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що доза ДХ 0,89±0,04 мг/л ефективно пригнічує ріст еталонних штамів всіх трьох вивчених мікроорганізмів і її дія повністю зберігається протягом навіть 24 годин експозиції, якщо доза зараження становить 10^1 КУО/мл. При дозі зараження 10^2 КУО/мл ДХ у дозі 0,89±0,04 мг/л повністю пригнічує ріст *P. aeruginosa*, а ріст *S. aureus* пригнічується при експозиції дещо більше 2 годин. Ріст *C. albicans* повністю пригнічується при експозиції 2,0 – 3,5 години. Зростання дози зараження до 10^3 КУО/мл призводить до того, що доза ДХ 0,89±0,04 мг/л не ефективна щодо *S. aureus* та *C. albicans*, проте ріст *P. aeruginosa* пригнічується.

Менша доза ДХ (0,53±0,07 мг/л) впливає практично аналогічно на ріст як *P. aeruginosa*, так і *S. aureus*, але практично не пригнічує ріст *C. albicans* у дозі зараження 10^2-10^3 КУО/мл.

Мінімальна доза ДХ (0,32±0,05 мг/л) повністю пригнічує ріст всіх трьох мікроорганізмів, якщо доза зараження дорівнює 10^1 КУО/мл.

Слід врахувати, що ДХ у всіх дозах, навіть у мінімальній (0,32±0,05 мг/л), якщо не пригнічує ріст мікроорганізмів, значно і статистично високо достовірно його знижує.

Дози ДХ 1,02±0,08 та 1,49±0,09 мг/л викликали повну інактивацію всіх вивчених штамів незалежно від дози зараження (10^1 - 10^3 КУО/мл) та від часу інкубації (0,5-24 години).

Загалом ефективною щодо вивчених мікроорганізмів слід вважати дозу 0,89±0,04 мг/л при експозиції 2-3 години. Збільшення дози до 10^2 КУО/мл і більше недоцільно через високу ефективність дози 0,89±0,04 мг/л. Зниження дози до 0,53±0,07 мг/л і нижче призводить до зниження ефективності знезараження.

2.9.3 Дослідження біоцидної ефективності ДХ при знезараженні води по відношенню до мультирезистентних штамів збудників нозокоміальних інфекцій P. aeruginosa, S. aureus та грибів роду Candida

Цілком очікувано, що всі мультирезистентні штами виявилися значно менш чутливими до ДХ, ніж еталонні.

Якщо у еталонних штамів ДХ в дозах 1,02±0,08 і 1,49±0,09 мг/дм викликав повну інактивацію всіх вивчених штамів незалежно від дози зараження (10^1-10^3 КУО/мл) і від часу інкубації (0,5-24 годин), то у резистентних штамів тільки доза ДХ 1,52±0,11 мг/л викликала повну інактивацію всіх трьох мікроорганізмів при дозах зараження 10^1 і 10^2 КУО/мл. Тоді як еталонні штами в дозі

зараження 10^1 КУО/мл повністю інактивувалися ДХ в мінімальній дозі 0,32±0,05 мг/л.

Як і еталонний, мультирезистентний штам *P. aeruginosa* виявився чутливішим до ДХ, ніж *S. aureus*. Так, ДХ у дозі 0,98±0,09 мг/л викликав повну інактивацію цього штаму незалежно від експозиції, тоді як для *S. aureus* через 3,5 та 24 години експозиції спостерігалося відновлення росту, що свідчило про неповну інактивацію.

Гриби роду *Candida* у дозі зараження 10^1 та 10^2 КУО/мл інактивувалися ДХ лише у максимальній дозі (1,52±0,11 мг/л). При цьому гриби в дозі зараження 10^1 КУО/мл інактивувалися повністю незалежно від часу інкубації, а в дозі 10^2 КУО/мл - тільки при часі інкубації понад 0,5 години. Дози ДХ 0,83±0,05 та 0,98±0,09 мг/л викликали повну інактивацію грибів при дозі 10^1 КУО/мл та часу інкубації понад 0,5 години.

Нижчі дози ДХ на мультирезистентні гриби мали менший вплив, тільки знижуючи їх ріст, але практично не викликаючи повної інактивації.

На рис. 2.26 представлена залежність інактивуючої дії ДХ залежно від часу інкубації.

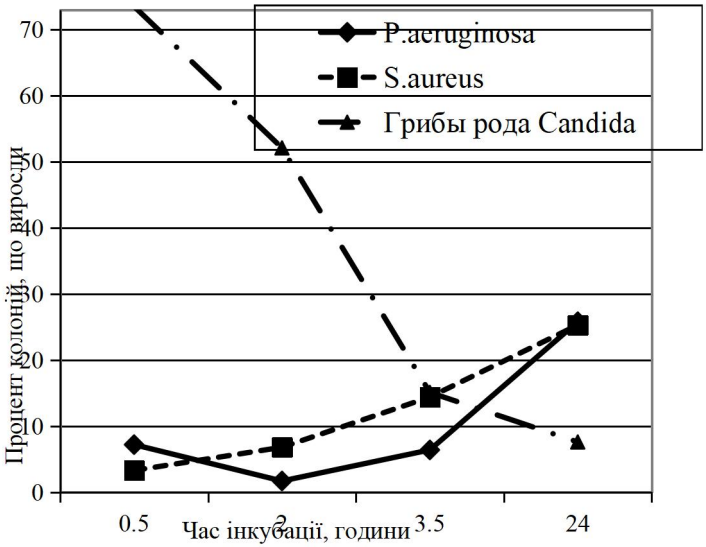

Рис. 2.26 Вплив часу інкубації на ріст мультирезистентних штамів мікроорганізмів при різних дозах ДХ

Як видно з представлених на рис. 2.26 графіків, загальна тенденція залежності впливу ДХ на мультирезистентні штами, така ж, як і на еталонні (рис. 2.24). Для *P. aeruginosa* та *S. aureus* зі збільшенням експозиції ефективність знезараження знижується, а для грибів роду *Candida* – збільшується. Для мультирезистентних штамів ця тенденція більш виражена. Так, якщо у еталонних штамів *P. aeruginosa* та *S. aureus* це зростання становило від 0% до 1,9% і від 1,16% до 2,63% відповідно, то для мультирезистентних штамів це зростання склало від 7,2% до 25,8% і від 3,3% до 25,4%. З наведених діаграм видно, що мультирезистентні до АП штами виявляються резистентнішими до ДХ порівняно з

еталонними. Достовірність відмінності впливу експозиції впливу ДХ на ріст еталонних та мультирезистентних штамів представлена у табл. 2.5, де наведені дані щодо мінімальної дози ДХ (0,31±0,04 мг/л) та максимальної дози зараження (10^3 КУО/мл).

Таблиця 2.5

Достовірність відмінності впливу експозиції впливу ДХ на ріст еталонних та мультирезистентних штамів (χ^2)

Вид мікроорганізму	Експозиція, год			
	0,5	2	3,5	24
P.aeruginosa	29,4893	4,1080	29,2222	164,8188
S.aureus	10,460	34,7938	94,7882	187,0122
Гриби роду *Candida*	282,4213	178,1193	16,6520	23,3318

Як видно з представлених у табл. 2.5 даних, навіть при мінімальній дозі ДХ та максимальній дозі зараження різниця в пригніченні ДХ росту мікроорганізмів між еталонними та мультирезистентними штамами високо достовірна.

В одному випадку помилка менше 5%, але більше 1%, а в інших – менше 1% за допустимої в медико-біологічних дослідженнях 5%. При інших дозах ДХ та дозах зараження це ще більш виражено. Таким чином, еталонні штами досліджених мікроорганізмів значно більш чутливі до ДХ, ніж мультирезистентні.

Вплив різних доз ДХ на ріст мультирезистентних штамів досліджуваних мікроорганізмів представлено на рис. 2.27.

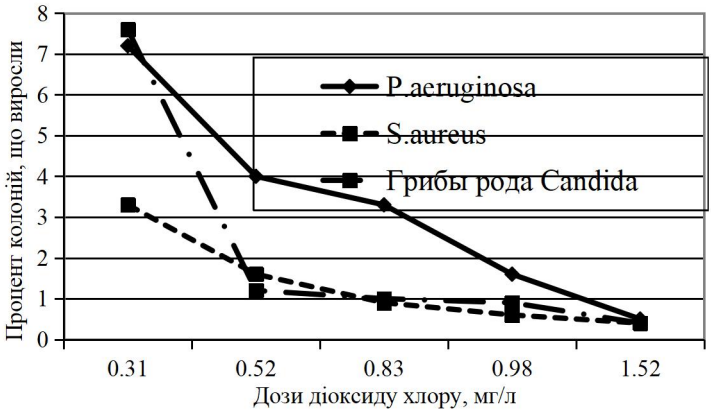

Рис. 2.27 Вплив різних доз ДХ на ріст мультирезистентних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* (24 години експозиції) та грибів роду *Candida* (0,5 години експозиції).

Як видно з представлених графіків, навіть при максимальній дозі зараження 10^3 КУО/мл зі зростанням дози ДХ його здатність пригнічувати зростання мультирезистентних мікроорганізмів зростає (відсоток колоній знижується). Достовірність відмінності (χ^2) між ростом колоній при найнижчій дозі ДХ (0,31±0,05 мг/л) та вищими (0,52±0,06 та 0,83±0,05 мг/л) представлена в табл. 2.6.

Як видно з представлених у табл. 2.6 даних, між впливом на мікроорганізми мінімальної і двома максимальними дозами ДХ відмінність статистично високо достовірна, помилка менше 1%. Для інших доз зараження та експозицій це ще більш виражено. При цьому, як і при різній експозиції, ДХ у різних дозах має більший інактивуючий вплив на еталонні штами, ніж на мультирезистентні. Таким чином, можна зробити висновок,

що для інактивації мультирезистентних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida* найбільш ефективними є дози ДХ в діапазоні 0,98 - 1,52 мг/л.

Таблиця 2.6

Достовірність відмінності (χ^2) у зниженні кількості колоній при зростанні дози ДХ і при максимальній дозі зараження 10^3 КУО/мл

Мікроорганізм	Порівнювані дози ДХ, мг/л	
	0,31 – 0,98	0,98 – 1,52
P. aeruginosa	14,1907	26,7086
S. aureus	14,0675	16,2025
Гриби роду *Candida*	25,4983	22,6384

Висновки

1. Еталонні (*P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*) і мультирезистентні (*P. aeruginosa, S. aureus* та гриби роду *Candida*) штами збудників нозокоміальних інфекцій мають різну резистентність до антимікробних препаратів, більш виражену у мультирезистентних штамів.

2. Вивчення залежностей «доза-час-ефект» при знезараженні води, що містить еталонні штами *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans*, показало високу достовірність зниження кількості виросліх колоній при зростанні дози ДХ до 0,89 мг/л при максимальній дозі 10^3 КУО/мл: χ^2=11,2599; 7,4446; 53,0632 відповідно. При цьому, мінімальна доза ДХ 0,32±0,05 мг/л повністю інактивує всі три мікроорганізми, якщо доза зараження дорівнює 10^1 КУО/мл; при підвищенні дози зараження до 10^2-10^3 КУО/мл ДХ значно і статистично високо достовірно пригнічує ріст вивчених еталонних штамів мікроорганізмів.

3. Мультирезистентні штами *P. aeruginosa, S. aureus* і грибів роду *Candida* мають значно меншу чутливість до ДХ, ніж еталонні, що узгоджується з даними літератури. Загальна тенденція залежності впливу ДХ на вивчені мультирезистентні штами ідентична еталонним, проте більш виражена у порівнянні з ними.

4. Встановлено високу достовірність різниці між впливом мінімальної (0,31 мг/л) та двох максимальних (0,98; 1,52 мг/л) доз ДХ на вивчені мікроорганізми: χ^2= 14,1907; 14,0675; 25,4983 та 26,7086; 16,2025; 22,6384 відповідно.

5. Для інактивації мультирезистентних штамів *P. aeruginosa, S. aureus* та грибів роду *Candida* найбільш ефективними є дози ДХ у діапазоні 0,98 – 1,52 мг/л.

6. Резистентність до ДХ у вивчених дозах еталонних та госпітальних штамів зростає у ряді *P. aeruginosa* < *S. aureus* < (*C. albicans*) гриби роду *Candida*.

7. ДХ у дозах 0,98 – 1,52 мг/л є ефективним та надійним засобом знезараження води як можливого джерела нозокоміальних інфекцій.

8. Отримані дані свідчать про необхідність проведення досліджень щодо оцінки ефективності ДХ при дезінфекції медичного інструментарію, обладнання та поверхонь [4, 10 – 17].

Література

1. Anaissie, E. J., Penzak, S. R., & Dignani, M. C. (2002). The hospital water supply as a source of nosocomial infections: A plea for action. *Archives of Internal Medicine, 162*, 1483–1492. https://doi.org/10.1001/archinte.162.13.1483
2. Mukharska, L. (2005). Epid sytuatsiia z vnutrishnolikarnianykh infektsii [Epidemiological

situation of nosocomial infections]. *SES Profilaktychna medytsyna, 5*, 40–45.

3. Pushkina, V. A., Shafran, L. M., Boschenko, Yu. A., et al. (2004). Znachenie polimerov v formirovanii mikrobioty bolnichnogo prostranstva [The importance of polymers in the formation of hospital microbiota]. *Dovkillia ta zdorovia, 2*, 8–12.
4. Mokienko, A. V. (2009). *Ekoloho-hihiienichni osnovy bezpeky vody, obezzarazhenoi dioksyidom khloru* [Ecological and hygienic principles of water safety disinfected with chlorine dioxide] (Doctoral dissertation, O. M. Marzeiev Institute for Hygiene and Medical Ecology, Academy of Medical Sciences of Ukraine). Kyiv.
5. Ministerstvo okhorony zdorovia Ukrainy. (2007). *Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok "Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ"*: Nakaz №167 vid 05.04.07 [On approval of the methodological guidelines "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs": Order No. 167 of April 5, 2007]. Kyiv.
6. Kholt, J. (Ed.). (1997). *Opredelitel' bakterii Berdzhi* [Bergey's manual of determinative bacteriology] (Vols. 1–2). Moscow: Mir.
7. Sutton, D., Fothergill, M., & Rinaldi, M. M. (2001). *Opredelitel' patogennykh i uslovno-patogennykh gribov* [Guide to pathogenic and opportunistic fungi]. Moscow: Mir.
8. Mintser, O. P., Uharov, B. N., & Vlasov, V. V. (1982). *Metody obrabotki meditsinskoi informatsii* [Methods for processing medical information] (pp. 44–50). Kyiv: Vyshcha shkola.
9. UkrNIPCHI im. I. I. Mechnikova. (2003). *Razrabotka komp'iuternoi programmy epidemiologicheskogo i*

epizootologicheskogo analiza bazy dannykh monitoringa tulyaremii v Ukraine i nekotorykh drugikh programm dlia nauchno-issledovatel'skikh rabot [Development of a computer program for epidemiological and epizootological analysis of the tularemia monitoring database in Ukraine and other research programs] (Research Report No. 0102I001226). Odessa.

10. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Gozhenko, A. I., et al. (2006). Dioksid khlora kak sredstvo profilaktiki nozokomialnykh infektsii [Chlorine dioxide as a means of preventing nosocomial infections]. *Annaly Mechnikovskoho instytutu, 4*, 34–37.
11. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Gozhenko, A. I. (2006). Dioksid khlora kak sredstvo dezinfektsii apparata "iskusstvennaia pochka" [Chlorine dioxide as a disinfectant for the artificial kidney apparatus]. In *Proceedings of the Scientific and Practical Conference "Poshuk ta rozrobka novykh profilaktychnykh i likuvalnykh protymikrobnykh zasobiv, antyseptykiv, dezinfektantiv ta probiotykiv"* (p. 134). Kyiv.
12. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Gozhenko, A. I. (2006). K voprosu o vozmozhnosti primeneniia dioksida khlora kak dezinfektanta gibkogo instrumentariia i elementov sistem zhizneobespecheniia [On the possibility of using chlorine dioxide as a disinfectant for flexible instruments and life-support system elements]. In *Proceedings of the same conference* (p. 135). Kyiv.
13. Mokienko, A. V., Pushkina, V. A., Petrenko, N. F., et al. (2008). Obezzarazhivanie vody dioksidom khlora v kontekste profilaktiki nozokomialnykh infektsii [Water disinfection with chlorine dioxide in the context of

nosocomial infection prevention]. *Aktualni problemy transportnoi medytsyny, 4(14)*, 36–41.

14. Mokienko, A. V., Gozhenko, A. I., & Petrenko, N. F., et al. (2008). *Voda i vodno-obuslovlennye infektsii* [Water and waterborne infections] (Vol. 2). Odessa: RA "ART-V".
15. Mokienko, A. V. (2009). Ekologo- i toksikologo-gigienicheskoe obosnovanie primeneniia dioksida khlora kak sredstva obezzarazhivaniia vody mnogo-funktsionalnykh statsionarov i stochnykh vod infektsionnykh bolnits [Ecological and toxicological justification for the use of chlorine dioxide as a disinfectant for hospital and infectious wastewater]. *Sovremennye problemy toksikologii, 1*, 15–18.
16. Mokienko, A. V. (2009). K obosnovaniiu primeneniia dioksida khlora dlia obezzarazhivaniia vody mnogo-funktsionalnykh statsionarov i stochnykh vod infektsionnykh bolnits [On the substantiation of chlorine dioxide use for disinfection of hospital and wastewater]. *SES Profilaktychna medytsyna, 1*, 66–69.
17. Mokienko, A. V., Pushkina, V. A., Petrenko, N. F., et al. (2010). K obosnovaniiu primeneniia dioksida khlora dlia obezzarazhivaniia vody v sistemakh gospital'nogo vodosnabzheniia v kontekste profilaktiki nozokomialnykh infektsii [On the substantiation of chlorine dioxide use for water disinfection in hospital water systems in the context of nosocomial infection prevention]. In *Suchasni aspekty viiskovoi medytsyny: Zbirnyk naukovykh prats Holovnoho viiskovo-medychnoho klinichnoho tsentru "HVKG" MO Ukrainy* (pp. 285–292). Kyiv.

РОЗДІЛ 3
ВІРУЛІЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

3.1 Загальна характеристика

Результати досліджень, проведених у різний час у різних країнах на численних вірусних тест - об'єктах свідчать, що діоксид хлору (ДХ) є ефективним віруліцидом. Вперше про це стало відомо в 1946 році після повідомлення про інактивацію вірусу *Poliomyelitis* діоксидом хлору [1]. Подібні дані отримані іншими дослідниками для *poliovirus* l [2] та *coliphage* [3].

Результати, представлені в роботі [4], демонструють, що *poliovirus* 1 (ПВ) швидше інактивується ДХ при pH=7 і температурі 15 °С, ніж при pH і 5 °С. Криві інактивації ілюстрували, що ПВ був приблизно в 3,5 рази стійкішим до ДХ при 5 °С, ніж при 15 °С. Ці ж дослідники показали, що ПВ інактивується ДХ у 4,6 рази швидше за pH = 9, ніж за pH = 7.

Встановлено, що при нейтральному pH або в присутності аміаку, коли хлор не може реагувати у формі гіпохлористої кислоти, діоксид хлору перевершує хлор при інактивації бактеріофагу f2 [5], *coliphage* [6], *Coxsackie* вірусу B3, *echovirus* 7 0X174, *Sendai virus* та *Vaccinia virus* [7].

Результати експериментальних досліджень з визначення віруліцидної активності різних окиснювачів (хлору, діоксиду хлору, брому, йоду) і зв'язку цього параметра з окислювально-відновним потенціалом середовища показали наступне [8] При pH 7,2

спостерігається кореляція між концентрацією вільного хлору. Введення хлораміну в розчин призводить до різкого погіршення знезаражувальної здатності хлору і не впливає на активність діоксиду хлору, брому, йоду.

У роботі [9] констатовано, що при інактивації поліовірусу та природного коліфагу діоксид хлору в дозі 2 мг/л ефективніший, ніж хлор у дозі 10 мг/л.

Роботи з вивчення механізму віруліцидної дії діоксиду хлору нечисленні.

У дослідженні [10] вивчено реакції інактивації протеїнів бактеріофагу F2 діоксидом хлору.

Вплив діоксиду хлору на здатність бактеріофагу F2 інфікувати *E. coli* K13 оцінювали за ступенем інактивації вірусу протягом початкових секунд контакту, pH та дезінфікуючої концентрації.

Цистеїн не реагував з діоксидом хлору в межах капсули вірусу, про що свідчить реакція цієї амінокислоти із сульфгідрильним реактивом до та після обробки діоксидом хлору. Це підтверджується даними [11], згідно з якими фрагменти цистеїну відіграють роль у стабілізації внутрішньої структури бактеріофагу F2.

Триптофан у неушкодженій капсулі вірусу не реагував з діоксидом хлору. Коли білок капсули вірусу був денатурований і потім піддавався впливу діоксидом хлору, триптофан піддавався деструкції. Подібно до цистеїну, триптофан, очевидно, був захищений в межах капсули вірусу.

Гістидин повільно реагував з діоксидом хлору. Окислення залишків гістидину діоксидом хлору, на думку авторів, не мало принципової важливості в інактивації F2, так як гістидин реагував повільно у вільному стані. Однак, збільшена реактивність гістидину через зміни у третинній структурі вірусу після обробки діоксидом хлору не може бути виключена як фактор, що впливає на інактивацію.

У неушкодженій вірусній капсулі лише фрагменти тирозину реагували з діоксидом хлору. На думку авторів, їхня роль в інактивації F2 діоксидом хлору потребує подальшого вивчення.

Таким чином, гіпотетично інактивація бактеріофага F2 пояснюється деградацією діоксидом хлору фрагментів амінокислоти тирозину як структурного компонента білка капсули вірусу, що пригнічує вірусну адсорбцію і, як результат, здатність вірусу заражати бактерії.

В іншій роботі [12] ті ж автори вивчали здатність діоксиду хлору впливати на вірусну нуклеїнову кислоту бактеріофагу F2.

Інактивацію діоксидом хлору ізольованою РНК порівнювали з інактивацією інтактного вірусу. За ідентичних умов (pH=7,2, температура 5 °C) констатовано понад 4 одиниці вірусної інактивації інтактного вірусу при експозиції 2 хвилини, тоді як обробка ізольованої РНК діоксидом хлору забезпечувала менше ніж 1 одиницю інактивації після 5 хвилин контакту. Рівень інактивації вірусної та ізольованої РНК діоксидом хлору збільшувався зі збільшенням pH.

Інактивацію ізольованої РНК бактеріофагу F2 автори пояснювали реакцією діоксиду хлору з гуанозинмонофосфатом (ГМФ), внаслідок якого останній руйнувався. Разом з тим, ця реакція, ймовірно, не є головним фактором в інактивації непошкодженого вірусу.

Як показують дослідження з оцінки інфекційної здатності (інфективності) РНК інактивованого поліовірусу [13], вірусна РНК – це первинна мета для УФО та гіпохлориту, а виключна мета теплової інактивації – вірусна оболонка.

Оцінка ефективності використання нуклеїнових кислот як маркерів поліовірусів у воді, знезараженої хлором, діоксидом хлору, озоном і УФО, дозволила

сформулювати думку про те, що нуклеїнові кислоти не можуть виражати відмінності між інфекційними та неінфекційними вірусами. У зв'язку з цим, їх наявність не може розглядатися як критерій оцінки засобів для знезараження води [14].

Розвитком вищенаведених робіт є дослідження [15] з інактивації поліовірусу діоксидом хлору та йодом. Встановлено, що діоксид хлору та йод при pH=10,0 зумовлюють порушення реплікації вірусної РНК. Однак механізми інактивації поліовірусів діоксидом хлору і йодом різні. Йод інактивував віруси, ушкоджуючи їх здатність адсорбуватися на HeLa-клітинах, тоді як діоксид хлору інактивував віруси шляхом адсорбції, пенетрації (проникнення) в капсид з подальшим його руйнуванням. Це підтверджується результатами аналізу осаду HeLa-клітин, інфікованих інактивованими діоксидом хлору вірусами, який показав зменшене включення міченого [^{14}C] уридину у вірусну РНК. Автори дійшли висновку, що діоксид хлору інактивував поліовіруси, реагуючи з вірусною РНК та ушкоджуючи вірусний геном.

Запропонована гіпотеза про те, що діоксид хлору при pH 7,0 інактивує віруси, денатуруючи білкову оболонку [16], базувалася на термодинамічному аналізі кривих інактивації, а не на структурному та функціональному аналізі інактивованих вірусів. У цій роботі [15] отримані результати свідчать про різні механізми інактивації діоксидом хлору поліовірусу при pH=6,0 та pH=10.

Автори [15] роблять висновок, що діоксид хлору можна рекомендувати як ефективний первинний або вторинний віруліцидний засіб при pH, значення якого не повинно бути менше 6,0.

У роботі [17] досліджено інактивацію ротавірусів людини (тип 2, Wa) та мавпи (SA-11) діоксидом хлору.

Експерименти проводились при 4 °С у стандартному фосфатному буфері. Обидва типи вірусу були інактивовані протягом 20 сек. при концентрації діоксиду хлору від 0,05 до 0,2 мг/л у лужних умовах. При рівнях контамінації 10^5/л експозиція інактивації при pH=6,0 становила 120 сек. при концентрації діоксиду хлору 0,2 мг/л для ротавіруса Wa та 0,5 мг/л для ротавіруса SA-11. Інактивація вірусів була помірною у нейтральному pH, при якому чутливість до діоксиду хлору була порівнянна для обох типів. Спостережуване підвищення віруліцидної ефективності зі збільшенням pH відрізнялося від результатів більш ранніх досліджень із хлором та озоном, коли віруліцидна дія зменшувалась із збільшенням pH.

Раніше повідомлялося [16], що діоксид хлору інактивував поліовірус типу 1 та ентеровірус більш ефективно при pH 9,0, ніж у нейтральних або кислих умовах. Аналогічний вплив pH констатовано в інших експериментах з поліовірусом тип 1 і ротавірусом SA-11 [18]. Інактивацію ротавірусу людини діоксидом хлору вивчали в роботі [19]. У цих експериментах ротавірус людини типу Хунань, виділений зі стічних вод, був дещо менш чутливим до обробки хлором, діоксидом хлору, озоном і пероцтовою кислотою, ніж ротавірус SA-11.

У цьому дослідженні [17] інактивація діоксидом хлору ротавірусу мавпи SA-11 та людини (HRV) була порівняна при різних концентраціях та рівнях pH.

Результати досліджень показують наступне:

1. При pH=6 та 7 ротавірус SA-11 був досить стійким до діоксиду хлору при концентрації 0,17 мг/л. Коли концентрацію було збільшено до 0,5 мг/л, час 10-кратного скорочення кількості вірусів було зменшено до 2 хв. при pH = 6 та 30 сек. при pH=7.

2. Інактивація HRV діоксидом хлору була помірною при кислому та нейтральному pH і концентрації 0,2 мг/л,

необхідної для 10^5-інактивації в межах 2 хвилин при pH=6 і 3 хвилин при pH=7.

3. Інактивація обох вірусних типів була подібна при нейтральному pH, тоді як HRV, ймовірно, був дещо чутливішим при pH 6,0.

4. Обидва типи ротавірусів були швидко інактивовані діоксидом хлору при pH 8 і залишковій концентрації 0,2 мг/л, що забезпечувало повну 10^5-інактивацію за 15 сек.

Зіставляючи отримані дані з описаними раніше для хлору і озону [20, 21], слід зазначити, що, якщо хлор був дещо ефективнішим, а озон найбільш ефективним по відношенню до SA-11 при pH 7,0, то віруліцидна активність діоксиду хлору при підвищенні pH збільшувалася і наближалася до рівня, який можна порівняти з озоном.

У роботі [22] отримані порівняльні експериментальні результати інактивації вірусів *Poliovirus*-1, *Coxsackie* B1, *ECHO*-11, Herpes simplex type 1HSV, *Mumps* хлором та діоксидом хлору.

Оцінка впливу експозиції 10, 30, 60 хвилин на інактивацію вірусів показала наступне. Зазначено, що доза хлору 7,0 мг/л була не ефективна. Протягом 10 хвилин та сама доза $C1O_2$ також не забезпечувала інактивацію шести вірусів. Але при зростанні експозиції до 30 та 60 хвилин ClO_2 викликав повну інактивацію всіх вірусів.

Тестування впливу pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0) на інактивацію вірусів протягом 30 хвилин свідчило, що якщо хлор був неефективний при всіх значеннях pH, то діоксид хлору викликав інактивацію при pH = 3,0, 5,0, 7,0, але не при pH =9,0. Це може бути викликано диспропорціонуванням ClO_2 за лужних умов.

Таким чином, хлор у дозі 7,0 мг/л не забезпечував інактивацію шести вірусів, тоді як ClO_2 у дозі 7,0 мг/л та

pH 3,0-7,0 протягом 30 хвилин показав високу та повну ефективність.

Обговорюючи отримані дані, автори зазначають таке. Згідно з формулою Van't Hoff-Arrhenius, що виражає відношення часу, необхідного для того ж ефекту дезінфекції, при різниці температур 10 °C (коефіцієнт температури), енергія активації ClO_2 для інактивації поліовірусу А при 15-25 °C і pH = 7,0 становить E = 35 063 (J), що майже відповідає енергії активації 34 580 (J) хлору при pH 7,0 для *Bacillus colon*. Для порівняння, енергія активації хлораміну для інактивації поліовірусу А при 15-25 °C та pH = 9 становить 72,511. Тому, при дезінфекції та інактивації ClO_2 ефективніший, ніж хлор або хлорамін, в енергії активації.

Експерименти інактивації діоксидом хлору аденовірусу серотип 40 (AD40) і котячого каліцівірусу (FCV) показали наступне [23]. При температурі 5 °C діапазони CT для 99,99 % інактивації AD40 склали від > 0,77 до < 1,53 мг/л·хв та від > 0,80 до < 1,59 мг/л·хв при pH 6 та 8, відповідно. При температурі 15 °C цей вірус інактивувався при значеннях CT від > 0,49 до < 0,74 мг/л · хв та < 0,12 мг/л · хв при pH=6 та 8 відповідно. При температурі 5 °C діапазони CT для 99,99% інактивації каліцівірусу FCV склали від > 20,20 до < 30,30 мг/л·хв та > 0,68 мг/л · хв при pH=6 та 8 відповідно. При температурі 15 °C цей вірус інактивувався при значеннях CT від >4,20 до <6,72 мг/л·хв та < 0,18 мг/л·хв при pH=6 та 8 відповідно. Таким чином, вірусна інактивація була вищою за pH= 8, ніж при pH= 6 і при температурі 15 °C, ніж при 5 °C, а каліцівірус FCV є більш стійким до діоксиду хлору, ніж аденовірус AD40 для вивчених умов.

У роботі [24] автори, аналізуючи попередні дослідження інактивації дезінфектантами кишкових вірусів [23, 25-28], відзначають обмеженість даних

ефективності хлору та діоксиду хлору по відношенню до норовірусу (НВ), головним чином, через відсутність адекватних методик культивування [29]. Молекулярні пробірні аналізи, такі як PCR, могли використовуватися для виявлення НВ, однак цей метод дозволяє виявити інактивовані віруси, поки матриця нуклеїнової кислоти існує, що може призвести до недооцінки втрати вірусної інфективності [30]. В одному дослідженні визначили ефективність інактивації хлором НВ з використанням довгої матриці реверс-транскриптази полімеразної ланцюгової реакції (LT RT-PCR) [26]. Цей метод більш ймовірно виявить неінфекційний вірус, оскільки довгі матриці не ушкоджуються. В іншому дослідженні показано, що LT RT-PCR значно недооцінює інфективність вірусу [31]. Це свідчить про необхідність використання як сурогату відповідного НВ як альтернативного методу оцінки ефективності дезінфектантів.

Котячий calicivirus (FCV), представник родини *Caliciviridae*, можна легко виростити у пробірці, до того ж він має подібну НВ організацію геному та архітектуру капсули вірусу [32, 33], що пояснює його використання як сурогату НВ. Попередні дослідження характеризували ефективність хімічних дезінфектантів на FCV [23, 27]. Однак, на відміну від типових кишкових вірусів, FCV дуже чутливий до кислотності середовища. Ця біологічна особливість обумовлює серйозні відмінності FCV та НВ людини у рівнях стійкості до хімічних дезінфектантів [30]. Пацюковий *norovirus* (MNV) може бути легко вирощений при використанні клітин RAW 264.7. Крім цього, у MNV є біологічні особливості, подібні до інших кишкових вірусів, включаючи високу стійкість до низького pH [34, 35]. Тому є підстави вважати, що MNV є кращими сурогатами НВ людини, ніж FCV. Тому мета даного дослідження полягала у визначенні кінетики інактивації хлором та діоксидом

хлору MNV та порівнянні кінетики інактивації різними методами (коротка матриця [ST] RT-PCR, LT RT-PCR та аналіз бляшок).

У цьому дослідженні [24] показано, що ефективність дезінфекції ClO_2 вища, ніж хлором, при 5 °C та 20 °C; однак, відмінності статистично недостовірні (>0,49). У попередніх дослідженнях повідомлялося про кілька суперечливих результатів [22, 23, 27, 36]: більшої ефективності інактивації ClO_2 поліовірусу 1, вірусу Коксакі B3 і вірусу ECHO-11 в порівнянні з рідким хлором [22] і, разом з тим, продемонстровано, що хлор ефективніший, ніж ClO_2, для інактивації AD40 та FCV при pH 6 та 8 [23, 27]. Відносна чутливість кишкових вірусів до різних дезінфектантів могла змінитися в залежності від типу використаних вірусів. У зв'язку з цим, визначаючи ефективність дезінфекції, дуже важливим є вибір належного сурогату НВ.

Порівняння інактивації при температурах 5 °C та 20 °C показало, що зі зростанням температури швидкість інактивації зростає, що підтверджує результати попередніх досліджень (рис. 3.1, 3.2).

На закінчення автори відзначають, що, як і хлор, і ClO_2 можуть використовуватися як ефективні засоби інактивації MNV у воді. При цьому MNV не є більш стійким у порівнянні з іншими кишковими вірусами, наприклад, поліовірусом. У подальших дослідженнях для оцінки дезінфектантів слід використовувати природну воду за різних експериментальних умов.

У роботі [36] виконано оцінку віруліцидної дії ДХ на вірус Коксакі (ВК) B5 при знезараженні стічних вод у потоці. Встановлено, що з трьох ентеровірусів ВК B5 був найбільш стійким: для його інактивації на 99,99 % необхідна доза ДХ склала 17,25 мг/л при експозиції 5 хв.

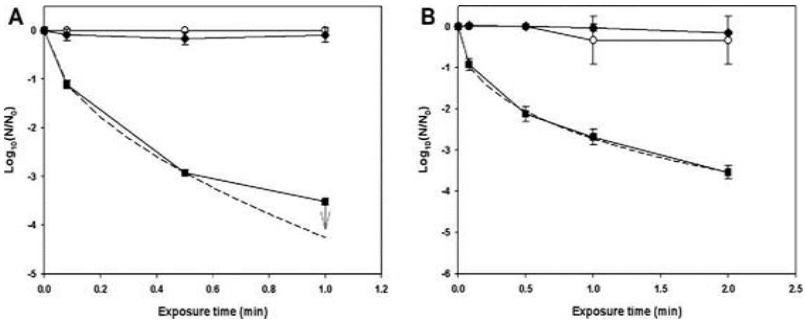

Рис. 3.1 Інактивація MNV та коліфагу MS2 діоксидом хлору (ClO_2) при 5 °C у буфері ODF (pH 7,2). Віруси визначали аналізом бляшок (■), LT RT-PCR (о) та ST RT-PCR (♦). Концентрація діоксиду хлору при інактивації MNV становила 0,288 мг/л (A); коліфагу MS2 – 0,174 мг/л (B).

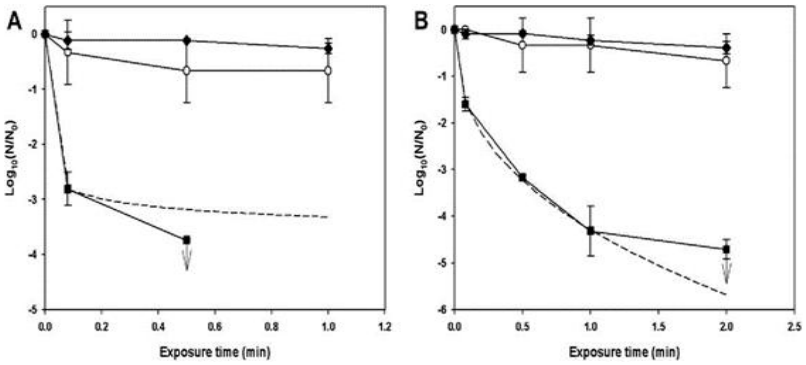

Рис. 3.2 Інактивація MNV та коліфагу MS2 діоксидом хлору (ClO_2) при 20 °C у буфері ODF (pH 7,2). Віруси визначали аналізом бляшок (■), LT RT-PCR (о) та ST RT-PCR (♦). Концентрація діоксиду хлору при

інактивації MNV становила 0,255 мг/л (A); коліфагу MS2 – 0,178 мг/л (B).

Дослідження [37] з обробки стічних вод інфекційного госпіталю в Мілані показали високий віруліцидний ефект ДХ у дозах 5, 10, 15 мг/л по відношенню до ПВ тип 1 при рівні контамінації 2×10^5 БОЕ/л при рівних експозиціях 30 хв. Високий відсоток інактивації вірусів констатований при дозі ДХ 5 мг/л, а їх повне знищення спостерігалося при дозі ДХ 10 мг/л.

В експериментах зі знезараження доочищених стічних вод хлором, ДХ та озоном з використанням зараження ПВ [38] показана вища активність ДХ порівняно з хлором. Так, якщо при хлоруванні повна інактивація вірусів при різних рівнях контамінації спостерігалася при дозах 5-20 мг/л за 60 хв., то при знезараженні ДХ такий ефект спостерігався при дозі 2 мг/л та експозиції 15 - 30 хв.

У роботі [39] докладно проаналізовано та вивчено механізм інактивації вірусу гепатиту А діоксидом хлору. Інактивація інвазивної здатності вірусів, що відбувається через пошкодження вірусного геному та/або деструкції вірусного білка, найбільш важливий та прямий критерій оцінки ефекту дезінфекції вірусів. Якби це було точно відомо і прояснилися механізми інактивації вірусів знезаражуючими засобами, ця інформація могла б представляти цінне керівництво для розробки нових дезінфектантів.

Wang et al. [40] повідомляли, що інфекційний HAV після ультрафіолетового опромінення (УФО) зберігав інтактний білок капсули вірусу. Тому автори припустили, що інактивація HAV УФО пов'язана з впливом на РНК вірусів з інгібування вірусної інвазивної здатності, хоча вірусна РНК могла бути виявлена методом ПЛР [13]. Leveque et al. [41] досліджували дію УФО на HAV у штучній морській воді та встановили, що інфекційний

вірус не ідентифікувався через 15 хв опромінення експериментально забрудненої води, тоді як PCR – ампліфікація геному дозволяла виявити вірусну РНК у всіх зразках навіть через 60 хвилин опромінення. Li et al. [42] повідомляли, що інактивація HAV хлором відбувалася через втрату 5'-нетранслюваної області, а не через деструкцію білка вірусного капсиду.

На додаток до гіпотез про механізми вірусної інактивації діоксидом хлору, викладених у роботах [10, 12, 16] слід додати ще думку Olivieri et al. [43] які припустили, що механізм дії діоксиду хлору включає реакцію з вірусним білком. При інактивації бактеріофага f2 діоксид хлору реагував з вірусною білковою оболонкою по всій її протяжності таким чином, що здатність вірусу приєднуватися до клітин - господарям виявлялася інгібована. Для поліовірусу механізм інактивації полягав у руйнуванні капсиду.

Проте, деякі дослідники вважали, що механізми інактивації вірусів діоксидом хлору пов'язані з пошкодженням РНК. Вже згадувані Alvarez і O'Brien [15] вважали, що механізми інактивації поліовірусу діоксидом хлору пов'язані з впливом на вірусну нуклеїнову кислоту з порушенням повторної реплікації в клітинах - господарях. Taylor та Butler [3] порівняли ефективність та механізми інактивації поліовірусу хлором, діоксидом хлору, бромом та йодом. Встановлено, що йод спричиняє структурні зміни у вірусах, що підтвердилося електронною мікроскопією, проте інші дезінфектанти інактивували поліовірус без видимих структурних змін. Автори вважали, що механізми інактивації цих дезінфектантів пов'язані з впливом на вірусну РНК. Alvarez та O'Brien [10] дійшли висновку - діоксид хлору інактивував поліовірус шляхом реакції з вірусною РНК, що викликало закономірні труднощі виділення його з обробленої питної води [44].

HAV був дещо стійкішим до хлору, ніж інші ентеровіруси [45].

Потреба безпечної та ефективної альтернативи хлоруванню стає все більш актуальною. Значна увага зосереджена на використанні діоксиду хлору у зв'язку з більш вираженою порівняно з хлором віруліцидною дією в ширшому діапазоні pH [39].

Деякі дослідники вважають, що хлор інактивує віруси шляхом пошкодження нуклеїнової кислоти [12, 46, 47] чи вірусного геному [14, 41, 48-50]. Передбачається, що первинною метою інактивації вірусів діоксидом хлору також є нуклеїнова кислота [3, 15, 43].

Дані, представлені в цьому повідомленні [39], вказують, що інактивація інвазивної здатності HAV діоксидом хлору супроводжувалася деструкцією антигенності та пошкодженням 5'NTR геному. Вірогідно, діоксид хлору не тільки порушує повторну реплікацію вірусу всередині клітини-господаря, ушкоджуючи геном HAV, але також реагує з білком вірусного капсиду з наступним інгібуванням адгезії HAV до клітин - господарів.

Підсумовуючи сказане вище, результати цієї роботи дозволяють припустити, що механізм інактивації HAV діоксидом хлору відноситься до механізмів пошкодження нуклеїнової кислоти та/або деструкції антигенності HAV. Можливо, цей критерій повинен використовуватися при розробці нових ефективних засобів дезінфекції та дослідженні механізмів інактивації інших вірусів дезінфікуючими засобами.

Література

1. Ridenour, G. M., & Ingols, R. S. (1946). Inactivation of poliomyelitis virus by chlorine dioxide. *American Journal of Public Health*, *36*(5), 639–644.

2. Scarpino, P. V., Brigano, F. A., Cronier, S. (1979). *Effects of particulates on disinfection of enteroviruses in water by chlorine dioxide* (EPA 600-2-79-054). U.S. Environmental Protection Agency.
3. Taylor, G. R., & Butler, M. (1982). Comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride, and iodine. *Journal of Hygiene*, *89*, 321–338. https://doi.org/10.1017/S0022172400028855
4. Cronier, S., Scarpino, P. V., & Zink, M. L. (1978). Chlorine dioxide destruction of viruses and bacteria in water. In R. L. Jolly, H. Gorchev, & D. M. Hamilton (Eds.), *Water chlorination: Environmental impacts and health effects* (Vol. 2, pp. 651–658). Ann Arbor Science Publishers.
5. Harakeh, M., & Butler, M. (1981). Inactivation of viruses in municipal effluent by chlorine dioxide. In *Viruses and wastewater treatment* (pp. 142–149). Pergamon Press.
6. Berg, J. D., Aieta, E. M., & Roberts, P. V. (1980). Comparison of viral and bacterial indicators of disinfection in wastewater with chlorine dioxide. In *Water chlorination: Environmental impact and health effects* (Vol. 3, pp. 145–151).
7. Smith, J. E., & McVey, J. L. (1973). Virus inactivation by chlorine dioxide and its application to storm water overflow. *Proceedings of the American Chemical Society*, *13*(2), 177–183.
8. Taylor, G. R. (1981). The limitations of redox potential as an estimate of the virucidal properties of disinfectants. In *Viruses and wastewater treatment: Proceedings of the International Symposium, Guildford, 15–17 Sept. 1980* (pp. 183–187). Oxford.
9. Roberts, P. V., Berg, J. D., Aieta, E. M. (1981). *Chlorine dioxide for wastewater disinfection: A*

feasibility evaluation (EPA-600/52-81-092). Environmental Protection Agency.

10. Noss, C. I., Hauchman, F. S., & Olivieri, V. P. (1986). Chlorine dioxide reactivity with proteins. *Water Research*, *20*(3), 351–356.
11. Matthews, R. E. F. (1979). The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology*, *11*, 133–135. https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90012-0
12. Hauchman, F. S., Noss, C. I., & Olivieri, V. P. (1986). Chlorine dioxide reactivity with nucleic acid. *Water Research*, *20*(3), 357–361. https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90013-2
13. Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2003). Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1629–1632. https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1629-1632.2003
14. Moore, N. J., & Margolin, A. B. (1994). Efficacy of nucleic acid probes for detection of poliovirus in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone, and UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(11), 4189–4191. https://doi.org/10.1128/AEM.60.11.4189-4191.1994
15. Alvarez, M. E., & O'Brien, R. T. (1982). Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(5), 1064–1071. https://doi.org/10.1128/AEM.44.5.1064-1071.1982
16. Brigano, F. A. O., Scarpino, P. V., Cronier, S. (1979). Effects of particulates on inactivation of enteroviruses in water by chlorine dioxide. In A. D. Venosa (Ed.), *Progress in wastewater disinfection technology* (EPA-

600/9-79-018, pp. 86–92). Environmental Protection Agency.

17. Chen, Y.-S., & Vaughn, J. M. (1990). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(5), 1363–1366. https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1363-1366.1990
18. Berman, D., & Hoff, J. (1984). Inactivation of simian rotavirus SA-11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(4), 317–323. https://doi.org/10.1128/AEM.48.2.317-323.1984
19. Harakeh, M., & Butler, M. (1984). Inactivation of human rotavirus SA11 and other enteric viruses in effluent disinfectants. *Journal of Hygiene*, *93*, 157–163. https://doi.org/10.1017/S0022172400065482
20. Vaughn, J. M., Chen, Y. S., Lindburg, K., & Morales, D. (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(12), 2218–2221. https://doi.org/10.1128/AEM.53.12.2218-2221.1987
21. Vaughn, J. M., Chen, Y. S., & Thomas, M. Z. (1986). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(4), 391–394. https://doi.org/10.1128/AEM.51.4.391-394.1986.
22. Junli, H., Li, W., Nenqi, R., Li, L., Fun, S.R., & Guanle, Y. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae, and animal planktons in water. *Water Research*, *31*(3), 445–460. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00320-X
23. Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C.P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Applied and*

Environmental Microbiology, *71*(6), 3100–3105. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3100-3105.2005

24. Lima, M. Y., Kim, J.-M., & Ko, G. P. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Research*, *44*, 3243–3251. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.032
25. Black, S., Thurston, J. A., & Gerba, C. P. (2009). Determination of Ct values for chlorine of resistant enteroviruses. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *44*(4), 336–339. https://doi.org/10.1080/10934520902719748
26. Shin, G. A., & Sobsey, M. D. (2008). Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Research*, *42*(17), 4562–4568. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.033
27. Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2003). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 3979–3985. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3979-3985.2003
28. Urakami, H., Ikarashi, K., Okamoto, K., Abe, Y., Ikarashi, T., Kono, T., Konagaya, Y., & Tanaka, N. (2007). Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(17), 5679–5682. https://doi.org/10.1128/AEM.00927-07
29. Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. G., & Estes M. K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, *85*(1), 79–87. https://doi.org/10.1099/vir.0.19483-0
30. Lee, J. E., Zoh, K. D., & Ko, G. P. (2008). Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO_2

under various environmental conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(7), 2111–2117. https://doi.org/10.1128/AEM.02255-07

31. Lim, M. Y., Kim, J. M., Lee, J. E., & Ko, G.P. (2010). Characterization of ozone disinfection of murine norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(4), 1120–1124. https://doi.org/10.1128/AEM.02286-09
32. Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S., & Marshall, J. A. (1999). Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, *41*(1), 51–57. https://doi.org/10.1016/S0195-6701(99)90040-4
33. Jiang, X., Wang, M., Wang, K., & Estes M. K. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, *195*(1), 51–61. https://doi.org/10.1006/viro.1993.1247
34. Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L.-A., & Vinjé J. (2006). Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection*, *69*(11), 2761–2765. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2761
35. Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., & Virgin 4th, H. W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, *299*(5612), 1575–1578. https://doi.org/10.1126/science.1078300
36. Harakeh, S. (1987). The behavior of viruses on disinfection by chlorine dioxide and other disinfectants in effluent. *FEMS Microbiology Letters*, *44*(3), 335–341. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02591.x

37. Monarca, S., Nardi, G., Feretti, D. (1995). Acque reflue ospedaliere: Valutazione di un trattamento di disinfezione con biossido di cloro. *Inquinamento*, *7*, 77–83.
38. Warriner, R., Kostenbader, J. K. D., Cliver, D. O., & Ku W.-C. (1985). Disinfection of advanced wastewater treatment effluent by chlorine, chlorine dioxide, and ozone: Experiments using seeded poliovirus. *Water Research*, *19*(12), 1515–1526 https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90002-6
39. Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., et al. (2004). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Research*, *38*(6), 1514–1519. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.017
40. Wang, C. H., Tschen, S. Y., & Flehmig, B. (1995). Antigenicity of hepatitis A virus after ultraviolet inactivation. *Vaccine*, *13*, 835–840. https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00112-8
41. Leveque, L., Crance, J. M., Beril, C., & Schwartzbrod L. (1995). Virucidal effect of UV light on hepatitis A virus in seawater: Evaluation with cell culture and RT-PCR. *Water Science and Technology*, *31*, 157–160. https://doi.org/10.2166/wst.1995.022
42. Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 4951–4955. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4951-4955.2002
43. Olivieri, V. P., Hauchman, F. S., Noss, C. I. (1985). Mode of action of chlorine dioxide on selected viruses. In R. L. Jolley, J. R. Bull, W. P. Davids, S. Katz, M. H. Roberts, & V. A. Jacobs (Eds.), *Water chlorination:*

Chemistry, environmental impact, and health effects (Vol. 5, pp. 619–634). Lewis Publishers.

44. Shaffer, P. T. B., Metcalf, T. G., & Sproul, O. J. (1980). Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, *40*, 1115–1121. https://doi.org/10.1128/aem.40.4.1115-1121.1980
45. Peterson, D. A., Hurley, T. R., & Hoff, J. C. (1983). Effect of chlorine treatment on infectivity of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 223–227. https://doi.org/10.1128/aem.45.1.223-227.1983
46. Dennis, W. H., Olivieri, V. P., & Kruse, C. W. (1979). The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. *Water Research*, *13*, 357–362. https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90046-0
47. Dennis, W. H., Olivieri, V. P., & Kruse, C. W. (1979). Mechanism of disinfection: Incorporation of Cl-36 into f2 virus. *Water Research*, *13*, 363–369. https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90047-2
48. Han, Y. Q., Zhang, M. L., Yang, R. F. (1996). Study on the relationship between PCR detection results and infectivity of HAV. *China Journal of Disinfection*, *13*, 133–137.
49. Ma, J. F., Staub, T. M., Pepper, I. L., & Gerba C. P. (1994). Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 4203–4206. https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4203-4206.1994
50. Maier, A., Tougianidou, D., Wiedenmann, A., & Botzenhart K. (1995). Detection of poliovirus by cell culture and PCR after UV disinfection. *Water Science and Technology*, *31*, 141–145. https://doi.org/10.2166/wst.1995.020

3.2 Кінетика та механізми інактивації вірусів діоксидом хлору при обробці води

В даний час існує багато досліджень віруліцидної активності ClO_2 щодо вірусів, включаючи віруси без оболонки (наприклад, бактеріофаг, ентеровірус, аденовірус, каліцівірус, ротавірус і парвовірус) і віруси з оболонкою (наприклад, вірус грипу, вірус кору, герпесвірус і вірус чуми). Віруси з оболонкою структурно відрізняються від вірусів без оболонки наявністю двошарової ліпідної мембрани поза білковим капсидом вірусу, який містить білки або глікопротеїни. Різні функціональні групи на зовнішній поверхні вірусів з оболонкою порівняно з вірусами без оболонки ймовірно впливають на їх виживання та поведінку розподілу у водному середовищі [1-3]. Було виявлено, що багато факторів суттєво впливають на швидкість інактивації вірусів, наприклад, дозування ClO_2, pH і температура [4-7]. Механізми інактивації вірусів ClO_2 включають руйнування білка або пошкодження геному [8-12]. Розуміння кінетики інактивації вірусів під час дезінфекції ClO_2 є нагальною потребою для забезпечення достатніх доз дезінфікуючого засобу. З'ясовуючи ефективність та механізми інактивації, можна краще контролювати віруси, що передаються водою, при очищенні води та стічних вод. Таким чином, мета огляду [13] полягала в тому, щоб надати огляд кінетики та механізмів інактивації вірусів при дезінфекції ClO_2, а також визначити прогалини і майбутні напрямки досліджень.

3.2.1 Ефективність інактивації різноманітних вірусів

Як правило, ефективність інактивації бактеріофагів і ротавірусів дуже висока і Ct для 4 log видалення складає 0,06-1,45 мг/л·хв при різному pH і температурі [4, 14, 15]. Собачий парвовірус відносно важко інактивувати: не спостерігалося очевидної інактивації протягом 2 хвилин при дозі ClO_2 1,0 мг/л [15]. Клітинно-асоційований мавпячий ротавірус SA11 є більш стійким до ClO_2, ніж вільно суспендовані віріони [4]. Цікаво, що близькоспоріднені віруси можуть проявляти дуже різну чутливість до ClO_2. Наприклад, у дослідженні Sigstam [11] під час дезінфекції ClO_2 встановлено: хоча послідовності генома та послідовності амінокислот у капсидному білку бактеріофага GA на 74% та 62% ідентичні відповідно бактеріофагу MS2, константа швидкості інактивації GA у 2,84 рази вища, ніж MS2. Sanekata et al. [15] припустили, що інактивація аденовірусу людини ClO_2 була швидшою, ніж аденовірусу собаки. Крім того, щоб досягти 99% інактивації, необхідний час дезінфекції для вірусу Коксакі B5 вдвічі менший, ніж для вірусу Коксакі A9 [16, 17]. Було припущено, що навіть незначні відмінності у складі вірусу можуть призвести до істотних відмінностей у кінетиці інактивації. У майбутніх дослідженнях слід приділяти більше уваги реакціям ClO_2 на молекулярному рівні на різні компоненти вірусу, щоб зрозуміти, як геном і амінокислоти впливають на кінетику реакції з ClO_2 і як їх зміна пов’язана з втратою інфекційності.

Сприйнятливість вірусів з оболонкою до ClO_2 відрізняється від чутливості вірусів без оболонки. Віруси людини без оболонки, такі як ротавіруси, аденовіруси та ентеровіруси людини, широко вивчені [7, 9, 18]. Аналіз кількох резонансних спалахів, таких як лихоманка Ебола, кір, вірус Zika, пташиний грип, SARS, MERS і пандемія COVID-19, спричинених вірусами з оболонкою [15, 19-21] підтвердив, що віруси з оболонкою (вірус грипу, вірус

кору, вірус герпесу людини, вірус чуми собак) легше інактивуються, ніж віруси без оболонки (аденовірус людини, аденовірус собаки, парвовірус собак, каліцивірус котів) при впливі 1,0 мг/л ClO_2. Інші дослідники також припустили, що віруси з оболонкою набагато легше інактивуються вільним хлором, ніж віруси без оболонки [22-24]. Поясненням є здатність ClO_2 реагувати з білками на оболонковій мембрані, такими як спайковий глікопротеїн, пошкодження якого призводить до відмови прикріплення до клітини-хазяїна і інфікування клітини [25-27]. Якщо зібрати дані про різні віруси разом (рис. 3.3), то можна побачити, що віруси, які важко інактивувати ClO_2, є безоболонковими.

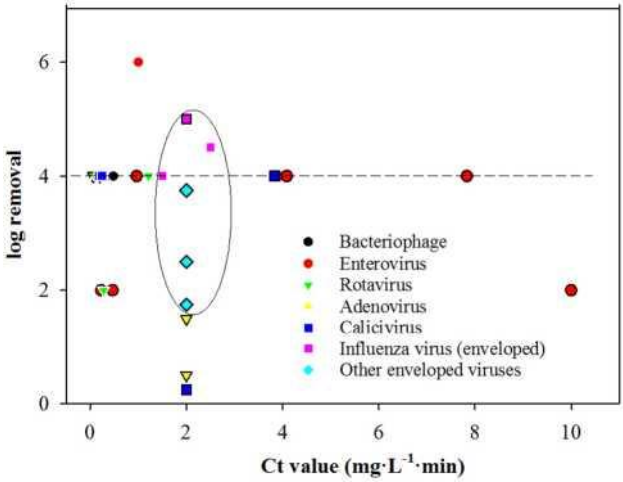

Рис. 3.3 Log видалення вірусів під час дезінфекції ClO_2. Примітка: обведено дані вірусу з оболонкою; лінія вказує варіації значень Ct для досягнення 4-log видалення. Легенда з чорним краєм вказує на те, що значення Ct є добутком початкової концентрації ClO_2 і часу контакту

Крім того, на відміну від УФ-дезінфекції, під час дезінфекції ClO_2 немає очевидної кореляції між показниками інактивації та типами геномів вірусів (наприклад, одноланцюгова ДНК, дволанцюгова ДНК, одноланцюгова РНК і дволанцюгова РНК). Можливе пояснення у тому, що механізми інактивації ClO_2 відрізняються між різними вірусами, що може бути спричинено пошкодженням геному або руйнуванням білка.

Щоб отримати повну картину видалення різноманітних вірусів у воді, на рис. 3.3 показано зв'язок між логарифмом видалення вірусів і значеннями Ct. Слід зазначити, що цей показник для більшості вірусів складає 4 мг/л · хв, однак деякі ентеровіруси, каліцивіруси та аденовіруси важко інактивувати. Відповідно до національних стандартів питної води USEPA (2003), комунальні служби повинні забезпечити інактивацію вірусів у вихідній воді на 4 log. Щоб відповідати цій нормативній вказівці, значення Ct зазвичай має бути більше 10 мг/л·хв. У Китаї та США поріг хлориту в питній воді становить 0,7 мг/л і 1 мг/л відповідно. Загалом, застосовувана доза ClO_2 для дезінфекції питної води становить менше 1,5 мг/л, враховуючи, що 30-70% ClO_2 перетворюється на хлорит [28-30]. Таким чином, час контакту для дезінфекції ClO_2 зазвичай становить десятки хвилин.

3.2.2 Вплив експериментальних умов на кінетику інактивації

Інактивація вірусів ClO_2 має початкову фазу розпаду псевдопершого порядку, за якою слідує фаза повільнішої кінетики або хвостового ефекту. Виникнення хвостів є поширеним при дезінфекції вірусів ClO_2, включаючи

бактеріофаг MS2 [6], ентеровірус 71 [9], ротавірус людини та мавп [4, 5], мишачий норовірус [31], еховірус 11 [32], ентеральний аденовірус і котячий каліцівірус [7]. Повідомлялося, що гетерогенність вірусної популяції або приєднання вірусу до інших (вірусних) частинок можуть бути відповідальними за хвостовий ефект [6, 33-35]. Однак, Sigstam et al. [36] припустили, що для MS2 це обумовлено не агрегацією вірусу чи резистентною підгрупою, а осадженням проміжних продуктів дезінфекції на капсид, які захищають вірус від подальшої дезінфекції.

Початкова фаза швидкої інактивації вірусів демонструє значний дозо-залежний ефект, тобто швидкість інактивації зростає зі збільшенням доз ClO_2, але друга фаза показує меншу різницю [9]. Вища доза ClO_2 має сильнішу дезінфікуючу здатність [37], таким чином, вона може інактивувати віруси за короткий час. Однак, коли час контакту довший, менша доза ClO_2 також може ефективно проникати в структуру поверхні вірусів і призводити до їх інактивації [38]. Таким чином, довший час контакту може послабити вплив дози на інактивацію вірусів і усунути недостатню кількість дезінфікуючого засобу.

Швидкість інактивації вірусу при дезінфекції ClO_2 зростає зі збільшенням pH. Наприклад, ентеровірус 71 демонструє вищу ефективність інактивації ClO_2 при pH 8,2, ніж при pH 5,6 [8]. Встановлено, що поліовірус інактивується в 4,6 рази швидше при pH 9,0, ніж при pH 7,0, і в 8,3 рази швидше, ніж при pH 4,5 при 21 °C [16]. Інактивація бактеріофага f2 збільшується більш ніж на 5 log після обробки ClO_2 протягом 2 хвилин, коли pH підвищується від 5,0 до 9,0 [39]. Посилена інактивація зі збільшенням pH також спостерігається в аденовірусі типу 40 [35], каліцівірусі кішок [35], ротавірусі людини [5] і мавпячому ротавірусі SA11 [40, 41]. На відміну від ефекту дози, pH не так сильно впливає на початкову фазу

інактивації, але, здається, впливає на фазу хвоста. Noss і Olivieri [42] припустили, що результати можуть бути пов'язані зі зміною структури поверхні вірусу та концентрації гідроксильного іону в розчині. Крім того, окремі віруси в суспензії можуть бути індуковані до агрегації, коли pH знижується внаслідок усунення електростатичної сили відштовхування. Повідомлялося, що вірусні агрегати збільшують виживання вірусів у навколишньому середовищі та стійкість до дезінфікуючих засобів [43-45]. Тому більш низький pH несприятливий для інактивації вірусу під час дезінфекції ClO_2.

Швидкість інактивації вірусів ClO_2 залежить від температури і ефективність інактивації підвищується при підвищенні температури від 5 °C до 25 °C [9]. Також повідомлялося, що інфекційність оболонкового бактеріофага Phi6 зменшується на два порядки, коли температура підвищується від 19 °C до 25 °C [46]. Можна пояснити, що енергія активації ClO_2 для інактивації вірусів стає нижчою при вищій температурі [47]. Однак у дослідженні Grunert et al. [48], константи швидкості інактивації бактеріофага PRD1 дещо зменшилися при підвищенні температури від 15 °C до 25 °C через розкладання ClO_2 при вищих температурах.

На ефективність інактивації вірусів також впливає водна матриця. Дослідження показали, що краща ефективність інактивації бактеріофага f2 і вірусу Коксакі B5 спостерігалася у фосфатному буферному розчині, ніж у лікарняних або міських стічних водах [17, 39, 49, 50], головним чином через конкурентне споживання ClO_2 розчиненими органічними речовинами у стічних водах або захисну дію часток, на яких адсорбовані віруси [16, 38, 51]. З іншого боку, спостерігаються й протилежні тенденції. Коли концентрація розчиненої органічної речовини зросла з 0,2 до 2,0 мгС/л, бактеріофаг PRD1 продемонстрував

підвищений відсоток інактивації, а MS2 лише невелику різницю в відсотках інактивації після дезінфекції ClO_2 [48]. Вважалося, що побічні продукти, а не хлорит і хлорат, відповідають за посилену дезінфекцію [52]. Аміак у воді майже не впливав на ефективність інактивації бактеріофага f2 [39].

3.2.3 Механізми інактивації

Обов'язковими вимогами для інфекційного вірусу є можливість зв'язуватися з клітиною-хазяїном, вводити свій геном у клітину-господаря, а також реплікувати та транслювати, коли його геном потрапляє в клітину-господаря. Усі ці функції мають бути недоторканими, щоб вірус був інфекційним. Іншими словами, щоб інактивувати вірус, принаймні одна з цих функцій повинна бути знищена.

Через різний склад і тривимірну структуру білків і нуклеїнових кислот віруліцидний механізм ClO_2 виявляється різним для різних типів вірусів (рис. 3.3).

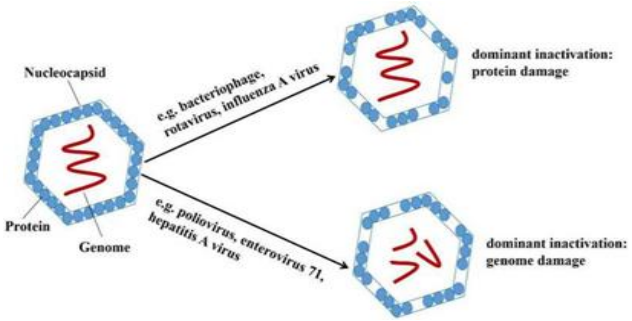

Рис. 3.3 Механізми інактивації вірусів ClO_2

У бактеріофагах, таких як MS2, fr і GA, механізм дії

ClO_2 головним чином включає деградацію білків вірусного капсиду, які в основному відповідають за взаємодію з клітиною-хазяїном [11, 12, 14, 40] Таким чином, прикріплення вірусу до клітин господаря гальмується, що призводить до інактивації вірусів. Також повідомляється, що денатурація білків вірусу є домінуючим механізмом інактивації при дезінфекції ClO_2 ротавірусу людини, при якому немає пошкодження геному [18]. Zhu et al. [53] припустили, що руйнування мембранного глікопротеїну GP2a і GP4 ClO_2 блокує взаємодію між вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRSV) і клітинними рецепторами, що призводить до припинення життєвого циклу цього вірусу.

Відома висока реакційна здатність цистеїну ($1,0 \cdot 10^7$ M^{-1} c^{-1} при pH 7,0) [54], тирозину ($1,4 \cdot 10^5$ M^{-1} c^{-1} при pH 7,0) [55] і триптофану ($3,4 \cdot 10^4$ M^{-1} c^{-1} при pH 7,0) [56] з ClO_2 та їх поширеність в різноманітних білках. Повідомлялося, що залишки цистеїну, тирозину та триптофану є критичними мішенями в реакції між ClO_2 та білками, що спричиняє фрагментацію та денатурацію білків [57]. Однак, реакційна здатність амінокислотного залишку в білку нижча, ніж у вільного триптофану [58]. Наприклад, інактивація ClO_2 вірусу грипу А відбувається внаслідок окислення залишку триптофану (W153) у вірусному білку гемаглютиніні, що руйнує його здатність зв’язуватися з клітинами-господарями [57]. Проте в ентеровірусах, таких як поліовірус, ентеровірус 71 і вірус гепатиту А запропоновано вплив ClO_2 на вірусний геном. Зокрема, інактивація ClO_2 спричинена пошкодженням 5'-некодуючої області в геномі, яка необхідна для утворення нових вірусних частинок у клітині-хазяїні [8-10]. Крім того, повідомлялося, що хоча пошкодження білка відіграє важливу роль в інактивації вірусу поліомієліту, інактивація в кінцевому рахунку пояснюється пошкодженням вірусної

РНК [59, 60]. Стійкість вірусів до дезінфекції тісно пов'язана з цими двома видами механізмів інактивації за допомогою ClO_2.

Дана робота [13] мала на меті представити огляд кінетики та механізмів інактивації вірусів ClO_2. Ефективність інактивації сильно відрізняється для різних видів вірусів. Швидкість інактивації для різних серотипів вірусів може відрізнятися більш ніж на 284%. Як правило, для досягнення 4-log видалення вірусів (значення Ct як множення концентрації ClO_2 на час контакту) доза ClO_2 варіюється в діапазоні 0,06-10 мг/л·хв. Кінетика інактивації вірусів має дві фази: початкову фазу швидкої інактивації, за якою слідує фаза «хвоста». Швидкість інактивації вірусів зростає зі збільшенням pH або температури, але демонструє різні тенденції зі збільшенням концентрації розчиненої органічної речовини (DOM). Пошкодження вірусних білків та 5'-некодуючої області в геномі сприяють інактивації вірусу після дезінфекції ClO_2.

У цьому огляді [13] підсумовано ефективність інактивації, кінетику та механізми дії різних вірусів на ClO_2 на основі опублікованої літератури. Подальші дослідження мають бути зосереджені на причинах явища «хвоста» та впливі реальних умов очищення води на інактивацію вірусу.

Література

1. Arbely, E., Granot, Z., Kass, I., Orly, J., & Arkin, I. T. (2006). A trimerizing GxxxG motif is uniquely inserted in the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein transmembrane domain. *Biochemistry, 45*(37), 11349–11356. https://doi.org/10.1021/bi061157t

2. Gundy, P. M., Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (2009). Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology, 1*(1), 10–14. https://doi.org/10.1007/s12560-009-9001-6
3. Shigematsu, S., Al, D., Sawoo, O., Batejat, C., Matsuyama, T., Leclercq, I., & Manuguerra, J. C. (2014). Influenza A virus survival in water is influenced by the origin species of the host cell. *Influenza and Other Respiratory Viruses, 8*(2), 123–130. https://doi.org/10.1111/irv.12107
4. Berman, D., & Hoff, J. C. (1984). Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology, 48*(2), 317–323. https://doi.org/10.1128/aem.48.2.317-323.1984
5. Chen, Y. S., & Vaughn, J. M. (1990). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(5), 1363–1366. https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1363-1366.1990
6. Hornstra, L. M., Smeets, P. W. M. H., & Medema, G. J. (2011). Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water Research, 45*(5), 1847–1855. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.029
7. Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(6), 3100–3105. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3100-3105.2005
8. Jin, M., Zhao, Z.-G., Wang, X.-W., Shen, Z.-Q., Xu, L., Yu, Y.-M., Qiu, Z.-G., Chen, Z.-L., Wang, J.-F., Huang, A.-H., & Li J.-W. (2012). The 40–80 nt

region in the 5′-NCR of genome is a critical target for inactivating poliovirus by chlorine dioxide. *Journal of Medical Virology, 84*(4), 526–535. https://doi.org/10.1002/jmv.23289

9. Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., Xue, B., Wang, Y., Zhu, D., Wang, X., & Li J. (2013). Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environmental Science & Technology, 47*(9), 4590–4597. https://doi.org/10.1021/es3041198
10. Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2004). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Research, 38*(6), 1514–1519. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.017
11. Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B. M., Wigginton, K. R., & Kohn, T. (2013). Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology, 79*(11), 3455–3467. https://doi.org/10.1128/AEM.00584-13
12. Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F., & Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science & Technology, 46*(21), 12069–12078. https://doi.org/10.1021/es3028244
13. Ge, Y., Zhang, X., Shu, L., & Yang, X. (2021). Kinetics and mechanisms of virus inactivation by chlorine dioxide in water treatment: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 106*(4), 560–567. https://doi.org/10.1007/s00128-021-03137-3

14. Hauchman, F. S., Noss, C. I., & Olivieri, V. P. (1986). Chlorine dioxide reactivity with nucleic acids. *Water Research, 20*(3), 357–361. https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90002-3
15. Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., Morino, H., Lee, C., Maeda, K., Araki, K., Otake, T., Kawahata, T., & Shibata T. (2010). Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Science, 15*(2), 45–49. https://doi: 10.4265/bio.15.45.
16. Scarpino, P. V. (1979). Effect of particulates on disinfection of enteroviruses in water by chlorine dioxide. *Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency.*
17. Zoni, R., Zanelli, R., Riboldi, E., Bigliardi, L., & Sansebastiano, G. (2007). Investigation on virucidal activity of chlorine dioxide: Experimental data on feline calicivirus, HAV and Coxsackie B5. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 48*(3), 91–99.
18. Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., Wang, X., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B., & Li J. (2013). Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water Research, 47*(10), 3329–3338. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.043
19. Aquino de Carvalho, N., Stachler, E. N., Cimabue, N., & Bibby, K. (2017). Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate.

Environmental Science & Technology, 51(15), 8692–8700. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01712

20. Chen, Q., & Guo, Y. (2016). Influenza viral hemagglutinin peptide inhibits influenza viral entry by shielding the host receptor. *ACS Infectious Diseases, 2*(3), 187–193. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00170
21. Das, G., Mukherjee, N., & Ghosh, S. (2020). Neurological insights of COVID-19 pandemic. *ACS Chemical Neuroscience, 11*(9), 1206–1209. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00321
22. Gallandat, K., & Lantagne, D. (2017). Selection of a biosafety level 1 (BSL-1) surrogate to evaluate surface disinfection efficacy in Ebola outbreaks: Comparison of four bacteriophages. *PLoS ONE, 12*(5), e0177948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177948
23. Rice, E., Adcock, N., Sivaganesan, M., Brown, J., & Stallknecht, D. (2007). Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases, 13*(10), 1568–1570. https://doi.org/10.3201/eid1310.070675
24. Ye, Y., Chang, P. H., Hartert, J., & Wigginton, K. R. (2018). Reactivity of enveloped virus genome, proteins, and lipids with free chlorine and UV254. *Environmental Science & Technology, 52*(13), 7698–7708. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01677
25. Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., & Britton, P. (2003). Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism.

Journal of Virology, 77(16), 9084–9089. https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.9084-9089.2003

26. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., & Farzan M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature, 426*(6965), 450–454. https://doi.org/10.1038/nature02145
27. Yang, Z. Y., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W.-P., Schwartz, O., Subbarao, K., & Nabel G. J. (2004). pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *Journal of Virology, 78*(11), 5642–5650. https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5642-5650.2004
28. Schmidt, W., Bohme, U., Sacher, F., & Brauch, H. J. (2000). Minimization of disinfection by-products formation in water purification process using chlorine dioxide: Case studies. *Ozone: Science & Engineering, 22*(2), 215–226. https://doi.org/10.1080/01919510009479987
29. Sorlini, S., Gialdini, F., Biasibetti, M., & Collivignarelli, C. (2014). Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Research, 54*(1), 44–52. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.12.030
30. Yang, X., Guo, W., & Lee, W. (2013). Formation of disinfection by-products upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or

chloramination of natural organic matter. *Chemosphere, 91*(11), 1477–1485. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.052

31. Lim, M. Y., Kim, J. M., & Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Research, 44*(10), 3243–3251. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.056
32. Zhong, Q., Carratala, A., Ossola, R., Bachmann, V., & Kohn, T. (2017). Cross-resistance of UV- or chlorine dioxide-resistant echovirus 11 to other disinfectants. *Frontiers in Microbiology, 8*, 1928–1940. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01928
33. Gerba, C. P., Nwachuku, N., & Riley, K. R. (2003). Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's contaminant candidate list (CCL). *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA, 52*(2), 81–94. https://doi.org/10.2166/wst.2003.0077
34. Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., Hoff J. C. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology, 50*(2), 261–264. https://doi.org/10.1128/aem.50.2.261-264.1985
35. Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(6), 3100–3105. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3100-3105.2005
36. Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M., & Kohn, T. (2014). On the cause of the tailing

phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. *Water Research, 48*(1), 82–89. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.044

37. Katz, A., Narkis, N., Orshansky, F., Friedland, E., & Kott, Y. (1994). Disinfection of effluent by combinations of equal doses of chlorine dioxide and chlorine added simultaneously over varying contact times. *Water Research, 28*(10), 2133–2138. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90248-7
38. Lin, T., Chen, W., & Cai, B. (2014). The use of chlorine dioxide for the inactivation of copepod zooplankton in drinking water treatment. *Environmental Technology, 35*(22), 2846–2851. https://doi.org/10.1080/09593330.2014.950755
39. Taylor, G. R., & Butler, M. (1982). A comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride, and iodine. *Journal of Hygiene, 89*(2), 321–328. https://doi.org/10.1017/S0022172400066003
40. Berman, D., & Hoff, J. C. (1984). Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology, 48*(2), 317–323. https://doi.org/10.1128/aem.48.2.317-323.1984
41. Chen, Y. S., & Vaughn, J. M. (1990). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(5), 1363–1366. https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1363-1366.1990
42. Noss, C. I., & Olivieri, V. P. (1985). Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. *Applied and Environmental Microbiology, 50*(5), 1162–1164. https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1162-1164.1985

43. Clark, R. M. (1968). A mathematical model of the kinetics of viral devitalization. *Mathematical Biosciences, 2*(3–4), 413–423. https://doi.org/10.1016/0025-5564(68)90012-4
44. Hoff, J., & Akin, E. (1986). Microbial resistance to disinfectants: Mechanisms and significance. *Environmental Health Perspectives, 69*, 7–13. https://doi.org/10.1289/ehp.8669
45. Mattle, M. J., Crouzy, B., Brennecke, M., Wigginton, K. R., Perona, P., & Kohn, T. (2011). Impact of virus aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants. *Environmental Science & Technology, 45*(17), 7710–7717. https://doi.org/10.1021/es201899d
46. Prussin, A. J., Schwake, D. O., Lin, K., Gallagher, D. L., Buttling, L., & Marr, L. C. (2018). Survival of the enveloped virus Phi6 in droplets as a function of relative humidity, absolute humidity, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology, 84*(12), e00551-18. https://doi.org/10.1128/AEM.00551-18
47. Ji, Y., Huang, J., Fu, J., Wu, M., & Cui, C. (2008). Degradation of microcystin-RR in water by chlorine dioxide. *Journal of China University of Mining and Technology, 18*(4), 623–628. https://doi.org/10.1016/S1006-7863(08)60090-5
48. Grunert, A., Frohnert, A., Selinka, H. C., & Szewzyk, R. (2018). A new approach to testing the efficacy of drinking water disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 221*(7), 1124–1132. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.05.005
49. Harakeh, S. (1987). The behavior of viruses on disinfection by chlorine dioxide and other disinfectants

in effluent. *FEMS Microbiology Letters, 44*(3), 335–341. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02591.x

50. Wang, X.-W., Li, J.-S., Jin, M., Zhen, B., Kong, Q.-X., Song, N., Xiao, W.-J., Yin, J., Wei, W., Wang, G.-J., Si, B.-Y., Guo, B.-Z., Liu, C., Ou, G.-R., Wang, M.-N., Fang, T.-Y., Chao, F.-H., & Li, J.-W. (2005). Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome–associated coronavirus. *Journal of Virological Methods, 126*(1–2), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.07.005
51. Fujioka, R. S., Dow, M. A., & Yoneyama, B. S. (1986). Comparative disinfection of indicator bacteria and poliovirus by chlorine dioxide. *Water Science and Technology, 18*(2), 125–132. https://doi.org/10.2166/wst.1986.011
52. Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., Clement, B., & Prévost, M. (2005). Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide. *Journal of Environmental Engineering and Science, 4*(2), 139–151. https://doi.org/10.1139/S04-096
53. Zhu, Z., Guo, Y., Yu, P., Wang, X., Zhang, X., Dong, W., Liu, X., & Guo C. (2019). Chlorine dioxide inhibits the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by blocking viral attachment. *Infection, Genetics and Evolution, 67*, 78–87. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.011
54. Ison, A., Odeh, I. N., & Margerum, D. W. (2006). Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione.

Inorganic Chemistry, 45(21), 8768–8775. https://doi.org/10.1021/ic0611644

55. Napolitano, M. J., Green, B. J., Nicoson, J. S., & Margerum, D. W. (2005). Chlorine dioxide oxidations of tyrosine, *N-acetyltyrosine*, and dopa. *Chemical Research in Toxicology, 18*(3), 501–508. https://doi.org/10.1021/tx049917k
56. Stewart, D. J., Napolitano, M. J., Bakhmutova-Albert, E. V., & Margerum, D. W. (2008). Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide oxidation of tryptophan. *Inorganic Chemistry, 47*(5), 1639–1647. https://doi.org/10.1021/ic701958f
57. Ogata, N. (2007). Denaturation of protein by chlorine dioxide: Oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry, 46*(18), 4898–4911. https://doi.org/10.1021/bi070123d
58. Ge, Y., Lei, Y., Lei, X., Gan, W., Shu, L., & Yang, X. (2020). Exploration of reaction rates of chlorine dioxide with tryptophan residue in oligopeptides and proteins. *Journal of Environmental Sciences (China), 93*, 129–136. https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.01.020
59. Alvarez, M. E., & Brien, R. T. O. (1982). Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Applied and Environmental Microbiology, 44*(5), 1064–1071. https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1064-1071.1982
60. Simonet, J., & Gantzer, C. (2006). Degradation of the poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology, 100*(4), 862–870. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02884.x

3.3 Дослідження віруліцидної дії діоксиду хлору

3.3.1 Результати лабораторних досліджень з оцінки віруліцидної дії діоксиду хлору (ДХ) по відношенню до пріоритетних вірусних контамінантів питної води.

Мета досліджень полягала в оцінці віруліцидної дії діоксиду хлору (ДХ) по відношенню до деяких кишкових вірусів як пріоритетних контамінантів питної води (поліовірусів /ПВ/, аденовірусів /АдВ/, вірусів Коксакі /ВК/, вірусів ЕСНО), а також вірусу пташиного грипу, забруднення яким поверхневих водойм з екскретами перелітних птахів має певну епідемічну небезпеку.

3.3.1.1 Методика оцінки віруліцидної ефективності діоксиду хлору

Віруліцидну дію ДХ вивчали в дозах 1,0 - 1,5 мг/л по відношенню до ПВ, АдВ, пріоритетних ЕВ ВК, ЕСНО та вірусу пташиного грипу як ймовірного небезпечного контамінанта водойм.

Експерименти проводили на базі Централізованої імуно-вірусологічної лабораторії Одеської обласної санітарно-епідеміологічної служби у липні – листопаді 2007 р.

В якості тест-вірусів було відібрано вакцинний штам ПВ Р2 з колекції ВООЗ (Sebin, реєстраційний №589/02, походження: Національний Інститут Біологічних

Стандартів та Контролю, Великобританія /NIBSC/, WHO, International Laboratory for Biological Standarts, код № 95/; свіжовиділені (липень – листопад 2007 р.) з клінічного матеріалу (стільця хворих) та адаптовані до культури клітин штами АДВ (серотип 4); ECHO (серотип 7) та ВК (серотип В5).

Накопичення, титрування вірусу ЦПД проводили в наступних чутливих культурах клітин [1, 2]: лінія мишачих клітин L20B - ПВ Р2; клітини карциноми гортані людини НЕР-2 – АДВ, ВК; клітини рабдоміосаркоми людини RD-ECHO.

Використовували дози ДХ, які широко застосовують у практиці водопідготовки для знезараження води (природних вододжерел, питної) та стічних вод: 0,3 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 мг/л.

Оцінку віруліцидної активності ДХ проводили відповідно до тимчасових методичних рекомендацій, затверджених наказом МОЗ України від 26.05.2006 року № 333 [3].

У досліджувану воду вносили вірус у пропорції, щоб його титр становив 1×10^{-6}, 1×10^{-5}.

Експозиція дезінфекції становила 1 год. при температурі + 4 °С.

ДХ розводили дистильованою водою таким чином, щоб після додавання його до досліджуваної води зберігалася необхідна доза ДХ. Для цього робоче розведення ДХ було в стільки разів вище досліджуваної дози, у скільки разів об'єм досліджуваної води більший за об'єм робочого розведення дезінфектанту.

Дози ДХ та тривалість експозиції вибирали таким чином, щоб результати дослідження показували віруліцидний ефект дезінфектанту залежно від його дози та експозиції.

Нейтралізація ДХ не проводилася у зв'язку з тим, що у всіх дослідах використовувалися заздалегідь аграваванні титри вірусів (10^{-5}-10^{-6}), які відповідали контамінації стічних вод з урахуванням концентрування в 50 разів.

У дослідах із знезараження води використовували контроль вірусу.

Оскільки нейтралізація не проводилася, оцінку віруліцидної активності ДХ здійснювали за допомогою титрування залишкового вірусу. Відразу після закінчення експозиції готували розведення досліджуваної води з ДХ у кількості, необхідній для титрування залишкового вірусу (від 10^{-1} до 10^{-6}), якими інфікували клітинний моношар.

Основним показником ефективності ДХ у заданій дозі та тривалості експозиції при оціночних дослідженнях була повна відсутність ознак розмноження вірусу за умов дотримання необхідного титру (10^{-7}) у вихідній (контрольній) суспензії вірусу.

Загальну віруліцидну ефективність розраховували як різницю між титром вірусу у присутності ДХ та його титром у контролі:

$E = T_К - T_Д$,

де E – загальна віруліцидна ефективність;

$T_К$ – титр вірусу у контролі;

$T_Д$ – титр вірусу у суміші вірус/дезінфектант.

Число повторностей для кожного вірусу склало 20.

Достовірність відмінності χ^2 віруліцидної дії ДХ від його дози та термінів обліку ЦПД (порівняно з контролем) проводили згідно з [4, 5].

3.3.1.2 Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо поліовірусу

Як показали отримані дані, вихідний вірус мав титр 1×10^{-7} (контроль), а впливу ДХ піддавалися його 10 і 100-кратні розведення, тобто у досліді титри вірусу становили 1×10^{-6} та 1×10^{-5}. У першу добу ні в контролі, ні в дослідах не було зареєстровано цитопатогенну дію вірусу – вірус за добу не реплікувався до концентрацій, здатних викликати ЦПД. На другу добу у контролі в половині культур було відзначено ЦПД. Починаючи з 3-х діб у контролі відмічено 100%-не ЦПД. Вплив різних доз ДХ на вірус виразився в наступному.

Доза 0,31±0,08 мг/л не надала жодного впливу, ЦПД було аналогічне контролю, відмінність статистично недостовірна.

Доза 0,52±0,07 мг/л виявилася дещо ефективнішою. ЦПД констатовано тільки на 3 добу в половині культур, тоді як у контролі до цього ж часу були вражені всі культури. На другу та третю добу вплив ДХ у дозі 0,52±0,07 мг/л статистично достовірний. Однак, починаючи з 4-х діб, не відзначалося жодної відмінності від контролю – відмінність не є достовірною.

Доза 1,03±0,09 мг/л виявилася високоефективною: починаючи з 2-ї доби і по 6-у включно, практично повністю пригнічено розвиток вірусу, ЦПД не виявлялося в жодній культурі клітин. Відмінність з контролем є високо достовірною, помилка на другу добу становила менше 5 %, а починаючи з третьої – менше 1 %. Для підтвердження повної нейтралізації вірусу було зроблено 2 подальші пасажі. В обох пасажах протягом 6 діб ЦПД не визначено, тоді як у контролі спостерігалося 100%-е ЦПД.

Вплив ДХ на вірус із меншим титром 1×10^{-5} дещо більш виражений, проте загальна тенденція зберігається. Доза 1,02±0,04 мг/л повністю інактивує вірус, а дози 0,32±0,06 та 0,51±0,05 мг/л на добу довше інгібують ЦПД, проте повністю вірус не інактивують.

3.3.1.3 Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо аденовірусів

У першу добу ні в контролі, ні в дослідах не було зареєстровано ЦПД вірусу. На другу добу у контролі в половині культур відзначено ЦПД. Починаючи з 3-х діб, у контролі реєструвалося 100%-не ЦПД. Вплив різних доз ДХ на вірус виразився в наступному.

Доза 0,33±0,04 мг/л не мала вплив на АдВ, ЦПД було аналогічне контролю, відмінність статистично недостовірно.

Доза 0,51±0,05 мг/л виявилася дещо ефективнішою, ніж при впливі на ПВ. ЦПД виявилася тільки на 4-ту добу і виявлялося в половині культур, тоді як у контролі до цього часу були вражені всі культури. Починаючи з 5-ї доби і до 6-ї включно, ЦПД становила 100 %, як і в контролі; відмінність статистично недостовірна.

Доза 1,01±0,07 мг/л виявилася високоефективною: починаючи з 2-х діб і по 6-і включно, як і при впливі на ПВ, практично повністю пригнічено розвиток вірусу, ЦПД не виявлялося в жодній з культур клітин. Відмінність з контролем є високо достовірною, помилка на другу добу становить менше 5 %, а починаючи з третьої – менше 1 %. Для підтвердження повної нейтралізації вірусу було зроблено 2 подальші пасажі. В обох пасажах протягом 6 діб ЦПД не відзначалося, тоді як у контролі спостерігалося 100% - е ЦПД.

Встановлено, що віруліцидна дія ДХ на АдВ з титрами 1×10^{-5} та 1×10^{-6} практично ідентична з однією відмінністю: при титрі 1×10^{-5} та дії дози ДХ 0,31±0,03 мг/л ЦПД настало на добу пізніше, ніж при титрі 1×10^{-6}.

3.3.1.4 Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусів Коксакі

Встановлено, що ВК виявився значно стійкішим порівняно з ПВ та АдВ до всіх вивчених доз ДХ: вірус з титром 1×10^{-6} не нейтралізувався дозами, які впливали на ПВ та АдВ (0,33±0,01; 0,52±0,04 та 1,04±0,03 мг/л).

ЦПД повністю відповідало контролю, відмінність статистично недостовірна. Тільки дози ДХ 1,50±0,08 мг/л на 3 добу повністю інгібували ЦПД, а на 4 добу ЦПД було зареєстровано лише у 50 % культур (відмінність статистично достовірна). Проте вже з 5-ї доби реєструвалася 100% ЦПД.

При дії на вірус з титром 1×10^{-5} ефект був більш виражений.

ДХ в дозах 1,03±0,05 мг/л повністю нейтралізував ВК з титром 1×10^{-5} (відмінність з контролем достовірна, а починаючи з 3-х діб – високо достовірна).

Доза 0,52±0,07 мг/л за 3 доби повністю нейтралізувала ЦПД, а на 4 добу – на 50 % (відмінність достовірна). Однак, починаючи з 5-ї доби реєструвалося 100%-не ЦПД. Ще менш виражена дія дози 0,32±0,06 мг/л.

3.3.1.5 Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусів ЕСНО

Отримані дані свідчать про те, що віруси ЕСНО виявилися ще стійкішими, ніж віруси Коксакі, до всіх вивчених доз ДХ. Вірус із титром 1×10^{-6} взагалі не нейтралізувався жодною із застосованих доз ДХ. ЦПД при дозах 0,31±0,03 та 0,51±0,04 мг/л повністю відповідало контролю, відмінність статистично не достовірна. Дози ДХ 1,02±0,06 та 1,51±0,02 мг/л інгібували ЦПД на 1-2 добу порівняно з контролем (відмінність статистично

достовірна), проте, на 4 - 5-ту добу спостерігалося 100%-не ЦПД. При дії на вірус з титром 1×10^{-5} дезінфікуючий ефект більш виражений.

Встановлено, що ДХ у дозі 1,51±0,06 мг/л повністю нейтралізував вірус ЕСНО при титрі 1×10^{-5}. Доза 0,30±0,02 мг/л мало впливала на вірус (відмінність з контролем не достовірна). Дози 0,52±0,03 та 1,01±0,08 мг/л пригнічували ЦПД лише до 3-ї та 4-ї доби, але вже з 4-ї – 5-ї доби реєструвалася 100 %-а ЦПД.

Отримані дані свідчать про те, що ПВ та АдВ, присутні у воді у високих титрах (1×10^{-6}, 1×10^{-5}), повністю інактивуються ДХ у дозах 1,03±0,09 - 1,02±0,04 і 1,01±0,07 - 1,03±0,07 мг/л відповідно. Дози 0,51±0,07 - 0,52±0,05 мг/л лише частково нейтралізували віруси, а дози 0,31±0,08 - 0,33±0,04 мг/л мало впливали на них. ВК значно стійкіші: вірус із титром 1×10^{-5} повністю нейтралізувався ДХ лише у дозі 1,03±0,05 мг/л, а вірус із титром 1×10^{-6} повністю не нейтралізувався ДХ навіть у дозі 1,50±0,08 мг/л. Вірус ЕСНО ще більш стійкий до дії ДХ: ефективне пригнічення ЦПД відзначалося лише при дії дозою 1,51±0,06 мг/л на вірус у титрі 1×10^{-5}.

Висновки

Досліджено залежності «доза-час-ефект» віруліцидної дії ДХ по відношенню до значущих вірусних контамінантів питної води (ПВ, АдВ, ВК та ЕСНО). За умови дотримання необхідного титру (1×10^{-7}) у вихідній (контрольній) суспензії вірусу встановлено повну відсутність ознак розмноження вірусу при дії ДХ у наступних дозах:

• на ПВ з титром 1×10^{-6}, 1×10^{-5} – 1,03±0,09 - 1,02±0,04 мг/л;

• на АдВ із титром 1×10^{-6}, 1×10^{-5} – 1,01±0,07 - 1,03±0,07 мг/л;

• на ВК із титром 1×10^{-5} – 1,03±0,05 мг/л;

• на ЕСНО з титром 1×10^{-5} - 1,51±0,06 мг/л.

Достовірність відмінності віруліцидної дії на вивчені віруси ДХ від його дози та термінів обліку ЦПД (порівняно з контролем) у всіх випадках слід розцінювати як високу (χ^2 = 16,200).

Резистентність вірусів зростає у ряді поліовірус ~ аденовірус < вірус Коксаки < вірус ЕСНО.

Враховуючи, що в питній воді такі високі титри вірусів не зустрічаються (для стічної це можливо тільки з урахуванням її концентрування в 50 разів), можна зробити висновок, що для знезараження питної води від зазначених вірусів ефективними є дози ДХ в діапазоні 1,0-1,5 мг/л [10-17].

3.3.2 Дослідження віруліцидної дії ДХ щодо вірусу пташиного грипу

Епідемічна значимість вірусу пташиного грипу обумовлена тим, що дикі перелітні птахи (насамперед водоплавні), які історично є природним резервуаром всіх вірусів грипу А, в період міграції своїми екскретами інтенсивно забруднюють поверхневі водойми, вода яких становить суттєвий ризик зараження домашніх птахів. Ефективне знезараження води, що використовується в господарських цілях, на наш погляд, є надійним бар'єром інфікування населення цим небезпечним інфекційним агентом.

Експерименти з вивчення віруліцидної дії ДХ щодо вірусу пташиного грипу проводили на базі лабораторії імунобіологічних та хіміотерапевтичних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І.І. Мечникова у червні 2008 р.

При дослідженні віруліцидної дії ДХ по відношенню до вірусу пташиного грипу використовували,

як тканинні культури, фрагменти хоріон-алантоїсної оболонки (ХАО) 14-добових курячих ембріонів.

Використаний у роботі штам вірусу пташиного грипу з антигенною формулою H_5N_3 надано до колекції музею лабораторії імунобіологічних та хіміотерапевтичних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І.І. Мечникова ТОВ "Відродження М" (м. Одеса), задепоновано сектором депонування наукового центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біології штамів мікроорганізмів (м. Київ).

При виконанні досліджень використовували методичні рекомендації щодо визначення віруліцидної активності дезінфекційних препаратів [3] та методичні рекомендації з доклінічних досліджень лікарських засобів [6].

Розрахунок $ТІД_{50}$ в експериментах in vitro проводили за методом Кербера у модифікації Ашмаріна [7]. Статистичну значущість віруліцидної дії діоксиду хлору визначали за непараметричним критерієм знаків для пов'язаних вибірок (Р за критерієм знаків) [8].

Віруліцидну дію ДХ по відношенню до збудника пташиного грипу вивчали за двох температурних режимів: +36 і +4 °С. Дози ДХ становили 1,0±0,02; 1,51±0,04 та 1,96±0,06 мг/л. Експозиція – 2 години.

Зразки алантоїсної рідини, що містила вірус, розводили в 100 разів дистильованою водою з відповідною дозою ДХ (дослідні зразки) і дистильованою водою (контрольні зразки). Після інкубації в них визначали вміст інфекційного вірусу титруванням на фрагментах хоріон-алантоїсної оболонки (ХАО) [6, 9]. Десятикратними розведеннями цих зразків інфікували фрагменти ХАО, а через 48 годин термостатування за 37 °С визначали титр вірусу за результатами реакції гемаглютинації (РГА).

Результати вивчення віруліцидної дії ДХ стосовно збудника пташиного грипу при різних температурних режимах наведено в табл. 3.1. Встановлено, що при температурі інкубації +4 °С та експозиції 2 години ДХ проявляв значну віруліцидну дію при дозах 1,51±0,04 та 1,96±0,06 мг/л. При +36 °С препарат був ефективним, починаючи з дози 1,0±0,02 мг/л. При обох температурних режимах дози ДХ 1,51±0,04 та 1,96±0,06 мг/л були ефективнішими.

Таким чином, вірус пташиного грипу з гемагглютиніном H_5 виявляє певну чутливість до ДХ при різних температурних режимах: при +4 °С мінімальна ефективна доза становила 1,51±0,04 мг/л, тоді як при +36 °С ДХ надавав віруліцидну дію при дозі 1,0±0,02 мг/л.

Враховуючи вищезазначене, перспективним є подальше дослідження віруліцидної ефективності ДХ при інших концентраціях, температурних режимах та експозиціях [18].

3.3.3 Гігієнічна оцінка віруліцидної дії діоксиду хлору у технологіях підготовки питної води

Мета досліджень полягала в оцінці віруліцидної дії діоксиду хлору як складової частини гігієнічного обґрунтування його застосування на різних стадіях технологічного процесу водопідготовки.

Відповідно мети досліджували такі зразки води:

1. Водопровідну воду м. Південого Одеської обл. - вторинне знезараження.

2. Природну воду Ізобільненського водосховища (джерело питної води м. Алушти, АР Крим) – передокислення.

3. Природну воду із джерела питної води м. Жовті Води, Дніпропетровська обл. (р. Інгулець, Іскрівське водосховище) - передокислення та постзнезараження.

4. Природну воду із джерела питної води м. Кременчук, Полтавська обл. (Кременчуцьке водосховище) - передокислення та постзнезараження.

Для концентрування вірусів у пробах води водопровідної та відкритих водойм використовували такі методи:

• Принцип концентрування за допомогою аміноетоксиаеросилу полягав в адсорбції вірусу та його антигенів при pH=4,5-5,0, відділенні сорбенту з адсорбованим на ньому антигеном вірусу від інших компонентів суспензії та елюації в трис-буферний розчин при слаболужних значеннях pH=7,8-8.

• Методика збирання та концентрування вірусів за допомогою пакета з макропористим склом. Концентрування вірусів ґрунтувалося на принципі сорбції вірусних частинок високоефективним сорбентом класу кремнеземів – макропористим склом марки МПС 1000 ВГХ та подальшою десорбцією невеликим обсягом елюантів. Технологічна особливість методу полягає в тому, що сорбент поміщений у пакет, який опускають у струм рідини. Це дозволяє використовувати великі обсяги води і тим самим збільшити ймовірність сорбції вірусних частинок, а також уникнути механічного забруднення сорбенту.

Відбір проб води для вірусологічних досліджень проводили за загальними правилами в стерильний посуд. Кожну пробу маркували із зазначенням місця відбору, точки відбору, найменування проби, дати та часу відбору. Термін доставки матеріалу до лабораторії не перевищував 6 годин від моменту відбору. Температура зберігання проб становила +4 ˚С - +8 ºС.

Для ідентифікації вірусних антигенів використовували експрес-методику визначення антигенів рота-, рео-, аденовірусів і ВГА методом імуноферментного аналізу (ІФА) і реакції непрямої геммаглютинації (РНГА) на стандартних тест-системах.

Встановлено наступне [19-22]:

1. Знезараження діоксидом хлору у дозах 0,15-0,30 мг/л води централізованого господарсько-питного водопостачання м. Південний забезпечувало відсутність антигенів аденовірусів та ротавірусів, тобто епідемічну безпечність води, у тих випадках, коли вихідна вода, що надходила на ВОС «Дністер», містила антигени цих вірусів.

2. При передокисленні води Ізобільненського водосховища, для якої характерні мутність до 30 мг/л та індекс ЛКП до 2000-3000 КУО/л, діоксид хлору в концентрації 0,5 мг/л чинив віруліцидну дію по відношенню до виявлених ротавірусів.

3. При вірусологічному дослідженні природної води р. Інгулець та Іскрівського водосховища ідентифіковані антигени ротавірусів. Знезараження води після фільтрів та води з резервуару чистої води (РЧВ) діоксидом хлору в дозі 0,3 мг/л забезпечило відсутність антигенів ротавірусів.

4. При вірусологічному дослідженні природної води Кременчуцького водосховища виявлено антигени вірусу гепатиту А в природній воді та фільтраті. Після знезараження фільтрату діоксидом хлору в дозі 0,5 мг/л ці антигени не виявляли.

3.3.4 Епідеміологічне підтвердження ефективності діоксиду хлору як засобу мінімізації захворюваності населення водно-обумовленим вірусним гепатитом А

Мета полягала у порівняльних епідеміологічних дослідженнях інфекційної та неінфекційної захворюваності населення, яке споживало додатково оброблену діоксидом хлору (ДХ) хлоровану (м. Чорноморськ) воду та хлоровану водопровідну (Україна, м. Одеса, Одеська область, деякі населені пункти Одеської області) воду.

Встановлено, що найбільш виражена негативна тенденція для ВГА (-91,544) у м. Чорноморськ істотно (у 2,1 – 3,5 рази) перевершувала аналогічний показник для інших територій та України загалом. Отримані дані є непрямим підтвердженням високої та надійної віруліцидної ефективності ДХ.

Другим непрямим підтвердженням віруліцидної ефективності ДХ є тісна кореляція одержаних даних з результатами вірусологічних досліджень: протягом вивченого періоду у водопровідній воді м. Чорноморська антигени ВГА не виявляли. Таким чином, ДХ є дієвим засобом зниження захворюваності населення водно-обумовленим гепатитом А.

Аналіз тенденції зміни неінфекційної захворюваності населення м. Чорноморська показав відсутність будь-якого впливу на досліджувані показники всіх категорій населення [23-37].

Література

1. Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya. (1998). *Rukovodstvo po virusologicheskim issledovaniyam poliomielita* [Guide to virological studies of poliomyelitis]. Geneva: WHO.
2. Hirin, V. M., Porokhnitsky, V. H., Voronenko, S. H., et al. (1995). *Posibnyk z medychnoi virusolohii* [Manual

of medical virology] (Ed. V. M. Hirin). Kyiv: Zdorov'ya.

3. Ministerstvo okhorony zdorov'ya Ukrainy. (2006). *Tymchasovi metodychni rekomendatsii MR 9.9.4.5.-126-2006: Vyznachennia virulitsydnoi aktyvnosti dezinfektsiinykh preparativ* [Temporary methodological recommendations MR 9.9.4.5.-126-2006: Determination of virucidal activity of disinfectants] (Order No. 333, 26 May 2006). Kyiv.
4. Mintser, O. P., Uharov, B. N., & Vlasov, V. V. (1982). *Metody obrabotky medychnoyi informatsii* [Methods of processing medical information] (2.3, pp. 44–50). Kyiv: Vyshcha shkola.
5. UkrNIPChI im. I. I. Mechnikova. (2003). *Razrabotka kompyuternoy programmy epidemiologicheskogo i epizootologicheskogo analiza bazy dannykh monitoringa tulyaremii v Ukraine i nekotorykh drugikh programm dlya nauchno-issledovatelskikh rabot* [Development of a computer program for epidemiological and epizootological analysis of tularemia monitoring database in Ukraine and other research programs] (State registration No. 0102I001226). Odessa.
6. Stefanov, A. V. (Ed.). (2002). *Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv: metod. rekomendatsii* [Preclinical studies of drugs: methodological recommendations]. Kyiv: Avicenna.
7. Ashmarin, I. P., & Vorobyev, A. A. (1962). *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistical methods in microbiological

research] (§3a, pp. 85–90). Leningrad: Gosudarstvennoe izdatelstvo meditsinskoy literatury.

8. Gubler, E. V., & Genkin, A. A. (1973). *Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh* [Application of non-parametric statistical tests in biomedical research] (§2.2, pp. 18–19, Table 1). Leningrad: Meditsina.
9. Lozitsky, V. P. (1980). Nekotorye metodicheskie podkhody pri izuchenii protivogrippoznykh svoystv ingibitorov proteoliza [Some methodological approaches for studying anti-influenza properties of protease inhibitors]. In *Metodicheskie problemy eksperimentalnoy khimioterapii virusnykh infektsiy* (pp. 120–125). Minsk.
10. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). Hihiienichna otsinka adenoviruslytsydnoi dii dioksidu khloru pry znezarazhenni vody [Hygienic assessment of adenoviral activity of chlorine dioxide in water disinfection]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, (4), 49–53.
11. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). Virusy Koksaki u pytnii i stichnii vodi: dioksid khloru yak zasib vyrishennia problemy (ohliad literatury i rezultativ vlasnykh doslidzhen) [Coxsackie viruses in drinking and wastewater: chlorine dioxide as a solution to the problem (literature review and own results)]. *Zbirnyk naukovykh prats spivrobitnykiv NMAPO im. P. L. Shupika*, 17(2), 439–449.
12. Mokienko, A. V., & Petrenko, N. F. (2008). Hihiienichna otsinka virulitsydnoi dii dioksidu khloru po vidnoshenniu do priorytetnykh enterovirusiv pytnoi

vody i stichnykh vod [Hygienic assessment of virucidal activity of chlorine dioxide against priority enteroviruses in drinking and wastewater]. *Dosiahnennia biolohii ta medytsyny*, 2, 52–57.

13. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). Poliovirusy u pytnii vodi: stan problemy ta otsinka dioksidu khloru yak zasobu vyrishennia [Polioviruses in drinking water: problem status and evaluation of chlorine dioxide as a solution]. *Medychni perspektyvy*, 13(4), 72–75.
14. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). ESNO-virusy yak kontaminanty pytnoi vody: do analizu problemy i otsinky dioksidu khloru yak virulytsydu [ESNO viruses as contaminants of drinking water: problem analysis and evaluation of chlorine dioxide as a virucide]. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny*, 4(24, chastyna 1), 124–128.
15. Mokienko, A. V. (2008). Hihiienichna otsinka virulitsydnoi dii dioksidu khloru pry znezarazhenni vody (ohliad literatury i rezultativ vlasnykh doslidzhen) [Hygienic assessment of virucidal activity of chlorine dioxide in water disinfection: literature review and own results]. *Hihiiena naselenykh mist*, 51, 115–127.
16. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). Dioksid khloru yak efektyvnyi virulitsydnyi ahent pry znezarazhenni vody [Chlorine dioxide as an effective virucidal agent in water disinfection]. In *Materialy konf. "Suchasni problemy epidemiolohii, mikrobiolohii ta hihiieny"* (Vol. 6, pp. 259–263). Lviv.
17. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2008). Enterovirusy yak faktory biolohichnoi

nebezpeky pytievoi vody: k analizu problemy i otsinky dioksidu khloru yak virulytsydu [Enteroviruses as biological hazards in drinking water: problem analysis and evaluation of chlorine dioxide as a virucide]. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*, 3(23, suppl., part II), 440–441.

18. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., Dziublik, I. V., et al. (2007). Hihiienichna otsinka virulitsydnoi dii dioksidu khloru po vidnoshenniu do virusu ptacheho hryppu [Hygienic assessment of virucidal activity of chlorine dioxide against avian influenza virus]. *Zahalna patologiya ta patolohichna fiziolohiia*, 2(5), 100–104.
19. Petrenko, N. F. (2001). Hihiienichna otsinka znezarazhennia pytievoi vody dioksydom khloru v portakh [Hygienic assessment of drinking water disinfection by chlorine dioxide in ports]. *Visnyk mors'koi medytsyny*, 1(13), 92–97.
20. Petrenko, N. F. (2001). Sanitarno-hihiienichna otsinka zastosuvannia dioksidu khloru dlia obrobky vody z poverkhnevoho vodoistochnyka m. Alushta [Sanitary-hygienic assessment of chlorine dioxide for treating water from surface sources in Alushta]. *Hihiiena naselenykh mist*, 38(1), 211–216.
21. Petrenko, N. F. (2003). Sanitarno-hihiienichna otsinka zastosuvannia dioksidu khloru dlia obrobky vody v systemi tsentralizovanoho hospodars'ko-pytnievoho pryznachennia m. Zhelti Vody [Sanitary-hygienic assessment of chlorine dioxide for treating water in centralized water supply system in Zheltye Vody]. *Hihiiena naselenykh mist*, 42, 92–95.

22. Petrenko, N. F., Mokienko, A. V., & Vynnytska, E. L. (2004). Sanitarno-hihiienichna otsinka zastosuvannia dioksidu khloru v systemi tsentralizovanoho hospodars'ko-pytnievoho vodopostachannia m. Kremenchuk [Sanitary-hygienic assessment of chlorine dioxide in the centralized water supply system of Kremenchuk]. *Hihiiena naselenykh mist*, 43, 89–97.
23. Mokienko, A. V., Zasypka, L. I., Krasnytska, L. V., et al. (2005). Obezzarazhivanie pit'evoi vody dioksidom khlora kak faktor snizheniya zabolevaemosti naseleniya virusnym gepatитом A [Disinfection of drinking water with chlorine dioxide as a factor in reducing the incidence of hepatitis A]. *Dovkillia ta zdorov'ia*, (4), 21–25.
24. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I. (2006). Znezarazhennya vody yak chynnyk vplyvu na zdorov'ia naselennya [Water disinfection as a factor influencing public health]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, 6(98), 76–77.
25. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I. (2006). Analiz ryzykiv dlia zdorov'ia naselennya pit'evoi vody, obezzarazhenei dioksydom khlora (ohliad literatury i vlasnykh doslidzhen) [Analysis of health risks from drinking water disinfected with chlorine dioxide: literature review and own research]. *Aktual'ni problemy transportnoi medytsyny: navkolyshnye seredovyshche; profesiine zdorov'ia; patolohiia*, 1(7), 138–150.
26. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I. (2006). Toksykoloho-hihiienichna otsinka dioksidu khlora yak zasobu obezzarazhennya vody (ohliad

literatury i rezultativ vlasnykh doslidzhen) [Toxicological and hygienic assessment of chlorine dioxide as a water disinfectant: literature review and own results]. *Sovremennye problemy toksykolohii*, 4, 44–49.

27. Petrenko, N. F., Mokienko, A. V., & Hozhenko, A. I., et al. (2007). Dioksid khlora yak optimalnyi zasib zabezpechennia yakosti pit'ovoi vody (ohliad literatury ta vlasnykh doslidzhen) [Chlorine dioxide as an optimal means of ensuring drinking water quality: literature review and own research]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, 2(100), 75–78.
28. Petrenko, N. F., & Mokienko, A. V. (2007). Hlobal'nist' problemy epidemichnoi bezpeky pit'ovoi vody: analytichnyi pohliad na perspektyvy ii rishennia v Ukraini [Global problem of epidemiological safety of drinking water: analytical view of prospects in Ukraine]. *Okhorona zdorov'ia Ukrainy*, 1, 218–219.
29. Mokienko, A. V., & Petrenko, N. F. (2007). Osnovni napriamky zabezpechennia epidemichnoi bezpeky pit'ovoi vody v Ukraini [Main directions for ensuring epidemiological safety of drinking water in Ukraine]. *Vestnyk hyhieny i epidemiiolohii*, 11(2, Suppl.), 33–37.
30. Mokienko, A. V., & Petrenko, N. F. (2007). Epidemichna bezpeka vody v Ukraini v konteksti rekomendatsii VOZ po yakosti pit'ovoi vody [Epidemiological safety of water in Ukraine in the context of WHO recommendations on drinking water quality]. *Hihiiena naselenykh mist*, 49, 82–88.
31. Mokienko, A. V. (2007). Znezarazhennya vody dioksydom khlora yak faktor zabezpechennia

epidemichnoi bezpeky pit'ovoi vody v Ukraini [Disinfection of water with chlorine dioxide as a factor in ensuring epidemiological safety of drinking water in Ukraine]. *Medychni perspektyvy*, 12(4), 92–97.

32. Serdiuk, A. M., Hozhenko, A. I., Mokienko, A. V., et al. (2008). Pytna voda ta infektsiini khvoroby: analytichne ta kontseptual'ne doslidzhennia ryzyku dlia zdorov'ia (ohliad literatury ta vlasnykh doslidzhen) [Drinking water and infectious diseases: analytical and conceptual risk assessment for health (literature review and own research)]. *Zhurnal Akademii medychnykh nauk*, 14(4), 705–718.
33. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I., et al. (2007). O vodnoobuslovlennosti gepatita A: sostoyanie problemy i puti ee resheniya [On waterborne hepatitis A: problem status and solutions]. *Pit'evaia voda*, 2(38), 2–15.
34. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I. (2007). Rotavirusnaia infektsiia (ohliad literatury i rezultatov sobstvennykh doslidzhen) [Rotavirus infection: literature review and own research]. *Pit'evaia voda*, 5(41), 6–16.
35. Mokienko, A. V., Petrenko, N. F., & Hozhenko, A. I. (2006). Epidemiolohichna otsinka vzaemozviazkiv obezzarazhennya pit'ovoi vody z zabolevaemistyu naselennya [Epidemiological assessment of the relationship between drinking water disinfection and population morbidity]. In *Tezy dokladiv VI Mizhnar. kongr. "Voda: ekologiia i tekhnolohiia" (EKVATEK–2006)* (pp. 961–962). Moscow: Sibiko Int.

36. Mokienko, A. V. (2006). Znezarazhennya pytnoi vody i zakhvoriuvanist' naselennia: do analizu problemy [Disinfection of drinking water and population morbidity: problem analysis]. In *Zbirka tez dopovidei nauk.-prakt. konf. (druhi Marzieievski chytannia, prisviacheni 125-richchiu z dnia narodzhennia O. M. Marzieieva) "Aktual'ni pytannia hihiieny ta ekolohichnoi bezpeky Ukrainy"* (pp. 42–43). Kyiv: IGME im. O. M. Marzieieva, AMN Ukrainy.
37. Mokienko, A. V. (2006). Obezzarazhivanie vody i zabolevaemist' naselennia: k otsintsi vzaemozviazkiv [Water disinfection and population morbidity: assessment of interrelations]. In *Materialy nauk.-prakt. konf. IV Mizhnar. vodnoho forumu "AQUA UKRAINA – 2006"* (pp. 285–288). Kyiv.

РОЗДІЛ 4
ПРОТОЗООЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

Цисти лямблій і ооцисти криптоспоридій мають більш виражену порівняно з бактеріями і вірусами резистентність до дії дезінфектантів (хлор, озон), що використовуються на водопровідних станціях. У зв'язку з цим передача їх у більшості випадків здійснюється через питну воду, яка задовольняє стандарти за колі-формними бактеріями.

Згідно з даними літератури, деякі дезінфікуючі засоби (10%-ний формалін або 5%-ний аміак) ефективні щодо ооцист криптоспоридій [1-3]. У роботі [4] апробовано дев'ять рідких дезінфікуючих засобів для перевірки їхньої здатності інактивувати *Cryptosporidium parvum oocysts*. Встановлено, що інактивація ооцист спостерігалася тільки при дії 6 % перекису водню при експозиції 4 хвилини та 13-хвилинної експозиції гідроксиду амонію. Інші дезінфікуючі засоби (70% етанол, 37% метанол, 6% гіпохлорит натрію, 70% ізопропанол та

три комерційні дезінфектанти) не були ефективними при 33-хвилинній експозиції.

Звичайне хлорування питної води навіть після 18 годин контакту є неефективним. Тільки фільтрація через пісок може зменшити концентрацію ооцист, але не усуває їх повністю [5].

Дослідження впливу діоксиду хлору у концентрації 2,0 - 3,3 мг/л на ооцисти *C. parvum* показали його значну ефективність [6].

У роботі [7] наведено результати дослідження знезараження питної води діоксидом хлору у дозі 0,8-1,4 мг/л. Забезпечено видалення *C. parvum* та *Giardia lamblia*.

Дослідження [8, 9] встановили, що діоксид хлору значно ефективніший в інактивації цист амеб у порівнянні із хлором.

Як повідомлялося, використання діоксиду хлору для інактивації чотирьох типів патогенних амеб дозволяє забезпечити їх усунення на 99,81% - 99,99% [10].

Вивчено можливий вплив озону та діоксиду хлору на життєздатність ооцист криптоспоридій у питній воді [11].

Контролювали число ооцист *C. parvum* у демінералізованій воді, обробленій діоксидом хлору або озоном. Дезінфікуючі засоби нейтралізували натрію тіосульфатом. Новонародженим мишам ооцисти вводили інтрагастрально та спостерігали за числом ооцист протягом 7 днів. Попередні дослідження показали, що мінімальна доза (для 100% інфікування) становить 1000 ооцист (на 0,1 мл). Цей рівень (1000 та вище) відповідає максимально зареєстрованому рівню контамінації поверхневих вод [12].

Обробка води, що містить 10^4 ооцист/мл дозою озону 1,11 мг/л протягом 6 хвилин, повністю усунула інфекційну активність ооцист для новонароджених мишей.

Доза озону 2,27 мг/л інактивувала 5×10^5 ооцист/мл протягом 8 хв. Доза діоксиду хлору 0,4 мг/л значно зменшила інфекційну активність такого ж числа ооцист протягом 15 хвилин, хоча деяке число ооцист залишалися життєздатними [12].

Застосування для вторинної дезінфекції питної води діоксиду хлору (0,25 мг/л у Бельгії; 0,20 мг/л у Німеччині; 1 мг/л у США) дозволяє припустити інактивацію всіх ооцист у дещо забрудненій воді, що має бути підтверджено подальшими дослідженнями.

У роботі [13] очищені *C. parvum oocysts* були піддані впливу озоном, діоксидом хлору, хлором та монохлораміном. Для оцінки життєздатності ооцист використовували той самий методичний прийом, що у попередній роботі, тобто проводили порівняльну оцінку інфективності для мишей. Озон та діоксид хлору більш ефективно інактивували ооцисти, ніж хлор та монохлорамін. Більш ніж 90% інактивація була досягнута при дії озоном концентрацією 1 мг/л за 5 хв., діоксидом хлору при концентрації 1,3 мг/л за 60 хв. (рис. 4.1), тоді як для такого рівня інактивації хлору та монохлораміну було потрібно 80 мг/л за 90 хвилин. За вищевказаних умов експерименту та рівні контамінації 600 ооцист діоксид хлору повністю ліквідував їхню інфективність для мишей.

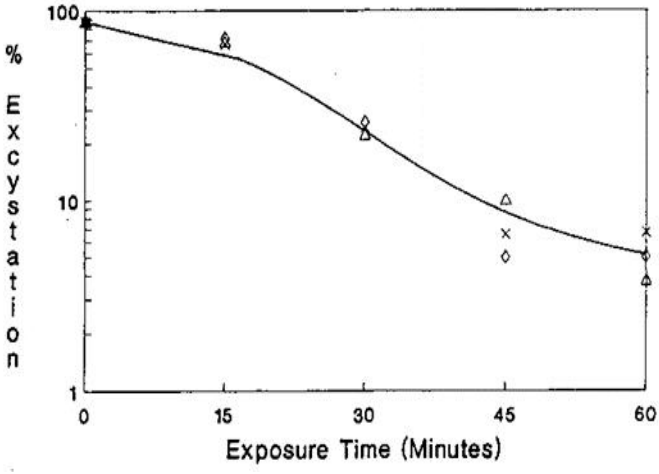

Рис. 4.1 Середнє зниження відсотка ексцистованих *C. parvum oocysts* після дії діоксиду хлору в концентрації 1,3 мг/л при 25 °С. Символи показують результати незалежних випробувань.

Встановлено, що *C. parvum oocysts* є в 30 разів стійкішими до озону і в 14 разів більш стійкими до діоксиду хлору, ніж цисти *Giardia* за тих же умов.

У роботі [14] автори посилаються на раніше досліджені рівні інактивації *C. parvum oocyst* діоксидом хлору [11, 13, 15-19].

Разом з тим, наголошується на непослідовності висновків у цих експериментах, що пояснюється суттєвими відмінностями методів оцінки життєздатності ооцист після ексцистування. Стадії життєвого циклу паразита включають вихід з цисти в організмі господаря після його зараження пероральним шляхом. Досліди in

vitro відрізнялися повільнішими рівнями інактивації порівняно з такими в експериментах, що ґрунтуються на визначенні інфективності у мишей. Однак, той же рівень невідповідності спостерігався і в першій [15, 17], і в другій [15, 16, 18] групі досліджень.

Головна мета роботи [14] полягала в оцінці рівнів інактивації *C. parvum oocyst* діоксидом хлору. Ефективність дезінфекції оцінювали методом, заснованим на зміні ексцистування in vitro [20], автори якого повідомляли про його сумісність із даними інфективності на тваринах в експериментах з дезінфекції озоном. Додаткові завдання включали дослідження впливу pH і температури на кінетику інактивації та оцінку варіацій стійкості *C. parvum oocyst* до інактивації.

Експериментальні результати інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору при 10 °C та pH 8 представлені на рис. 4.2. Виживання ооцист оцінено двома різними підходами обчислення, описаними раніше. Світлі символи відповідали звичайному підходу, запропонованому в [21], який використовувався більшістю інших груп дослідників [15, 17]. Числа, позначені темними символами, були отримані зміненим підходом, запропонованим Rennecker et al. [20].

Варіабельність стійкості *C. parvum oocysts* до інактивації діоксидом хлору ілюструється наступними даними. Всі три експериментальні набори ооцист штаму Айови інактивували при 20 °C і pH 10. У варіанті B спостерігалася більша резистентність ооцист, ніж у варіанті A. Ці відмінності, зазначені Rennecker et al. [20] для ооцист з різних джерел в експериментах з дезінфекцією озоном, ймовірно, випливали з комбінації факторів, включаючи відмінності в походження збудника, вираженості інфекції в кишечнику господаря та подальшій обробці ооцист.

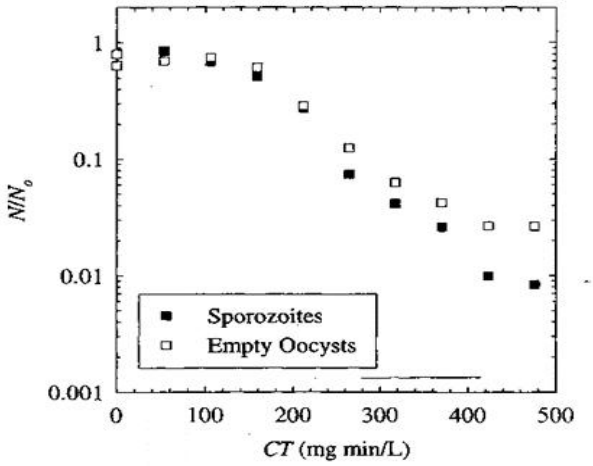

Рис. 4.2 Інактивація діоксидом хлору (pH = 8, T = 10 °C) *C. parvum oocysts*, оцінена методом зміненого ексцистування in vitro за індексами порожніх ооцист та ексцистованих спорозоїтів

Роль температури в інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору представлена на рис. 4.3. Отримані дані показують, що магнітуда лаг-фази збільшилася, а рівень інактивації зменшився зі зменшенням температури. Усі чотири криві, які представлені на рис. 4.3, були побудовані за моделлю *Chick-Watson*, описаною Rennecker et al. (1999) для озону [20].

Графік констант швидкості інактивації другого порядку згідно із законом Арреніуса представлений на рис. 4.4.

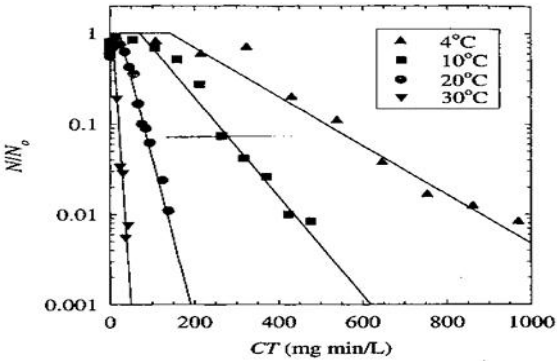

Рис. 4.3 Вплив температури на інактивацію *C. parvum oocysts* діоксидом хлору (pH = 8,0)

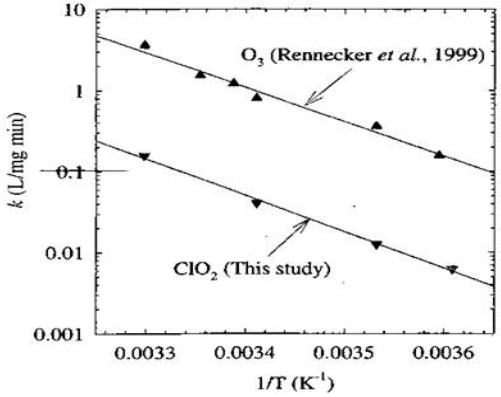

Рис. 4.4 Константи швидкості інактивації другого порядку згідно із законом Арреніуса відповідно до даних діоксиду хлору для цього дослідження (К = 1,09 х 10^{14} л/мг· хв, енергія активації = 86 300 Дж/М) та озону [20] (К = 3,3 х 10^{14} л/мг· хв; енергія активації = 81200 Дж/М).

Примітка. Константи швидкості інактивації другого порядку описуються законом Арреніуса як залежність

константи швидкості (k) від температури (T) через експоненційну функцію: $k = A \cdot \exp(-E_a/(RT))$, де E_a - енергія активації, A – множник, пов'язаний з частотою зіткнень, а R - універсальна газова стала.

Слід звернути увагу на очевидний факт, що енергія активації діоксиду хлору на шість одиниць перевищувала значення, раніше знайдені для озону [20].

Це спостереження дозволяє припустити, що рівні інактивації *C. parvum oocyst* діоксидом хлору і озоном можуть бути ідентичними.

Експериментальні результати, отримані в оцінці ролі pH в інактивації, показано на рис. 4.5.

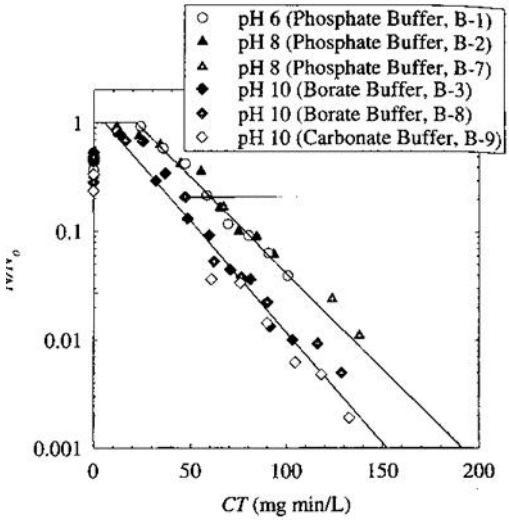

Рис. 4.5 Вплив pH на інактивацію *C. parvum oocysts* діоксидом хлору (T = 20 °C)

Як видно з отриманих даних, криві інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору при pH 6 і 8 значною мірою збігалися. Разом з тим, за pH 10 при використанні

боратного та карбонатного буферних розчинів спостерігалася більш коротка лаг-фаза та швидший подальший рівень інактивації. Рівень CT інактивації в діапазоні 90-99,9% був приблизно на 20-30% нижче за pH 10, ніж за pH 6-8. Ці відмінності, можливо, випливали з комбінації факторів, включаючи помилки через відхилення реакції першого порядку розпаду діоксиду хлору.

Додаткове можливе пояснення полягає в тому, що гетерогенні реакції, відповідальні за повну інактивацію, можливо, каталізувалася гідроксильним іоном. Слід також зазначити, що криві інактивації були практично однаковими навіть при тому, що початкові концентрації діоксиду хлору, 0,8 і 2,0 мг/л, відрізнялися в 2,5 рази.

Порівняння інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору в даному дослідженні [14] з іншими даними літератури [16-18] представлено на рис. 4.6.

Узагальнюючи порівняльний аналіз, автори відзначають прийнятність сумісності результатів, отриманих у цьому дослідженні, з даними щодо інфективності на експериментальних тваринах, яка спостерігалась і при інактивації *C. parvum oocysts озоном* [20].

У табл. 4.1 наведено мінімальні значення CT для інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору. Слід звернути увагу, що значення CT були обернено пропорційні температурі і збільшувалися в середньому в 3,4 рази для кожного зменшення температури на 10 °C.

Наприкінці автори [14] відзначають, що апробований ними метод сумісний з раніше повідомленими результатами для озону [20] і порівняний з опублікованими раніше даними щодо інфективності на тваринах для того ж штаму ооцист.

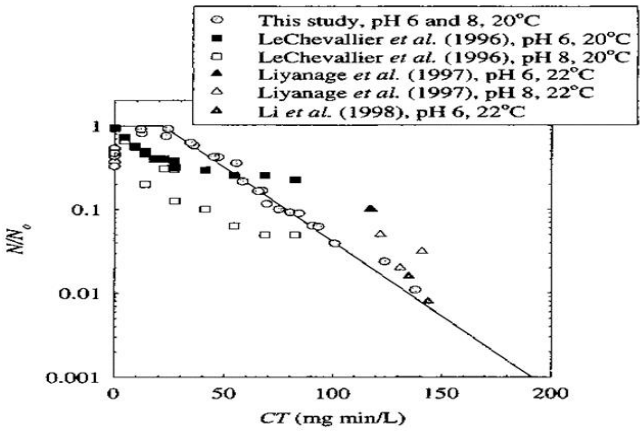

Рис. 4.6 Порівняння інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору в даному дослідженні [14] з іншими даними літератури [16-18]

Таблиця 4.1

Мінімальні значення CT для інактивації *C. parvum oocysts* (резистентний штам Айова) діоксидом хлору

Інактивація, (-log [N/N$_0$])	CT, мг/л·хв						
	0,5 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
0,5	566	306	159	83,9	45,4	25,1	14,1
1,0	888	480	249	132	71,2	39,3	22,1
1,5	1210	655	339	179	97,0	53,6	30,2
2,0	1530	829	429	227	123	67,8	38,2
2,5	1850	1000	519	275	149	82,0	46,2
3,0	2170	1180	609	322	174	96,3	54,2
3,5	2500	1350	699	370	200	111	62,2
4,0	2820	1520	789	418	226	125	70,3
4,5	3140	1700	879	465	252	139	78,3
5,0	3460	1870	969	513	277	153	86,3
5,5	3780	2050	1069	561	303	167	94,3
6,0	4100	2220	1150	608	329	182	102

Цей метод більш простий і точніший, ніж підходи інфективності на тваринах, що дозволяє його

рекомендувати як первинний для оцінки життєздатності ооцист щодо протозооцидної ефективності дезінфектантів. Використання цього методу дозволяє оперативно отримати значення CT та адекватно сформулювати відповідні інструкції щодо знезараження питної води.

Результати досліджень [22], заснованих на іншому, порівняно з двома попередніми роботами, методичному прийомі - впливі діоксиду хлору на чисті культури ооцист у воді (pH 8 і 21 °C) - показали, що резистентність ооцист, виділених з трьох різних джерел, варіює в досить широкій межі: критерій CT для 99 % (0,5 $\log_{10}$ и 2,0 $\log_{10}$) інактивації ооцист складав 75, 550 и 1,000 мг/л·хв.

У цій роботі [22] також порівнювали взаємовідносини між чутливістю до діоксиду хлору таких поширених індикаторів, як спорові форми мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* /аеробний/ і *Clostridium sporogenes*/анаеробний/) та *C. parvum oocysts*. Показано, що бактеріальні спори чутливіші до діоксиду хлору, ніж *C. parvum oocysts*. Таким чином, перші не можна розглядати як прямі індикатори інактивації *C. parvum* для цього дезінфікуючого засобу. Зазначено, що майбутні дослідження у цьому напрямі мають стосуватися проблем очищення зразків ооцист перед експериментом та врахування їхнього генетичного розмаїття, оскільки ці чинники можуть впливати на чутливість цих протозоа до дезінфекції.

На цій роботі [22], як і на попередній [14] доцільно зупинитися докладніше. Насамперед автори проаналізували результати попередніх досліджень і порівняли їх зі своїми (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Порівняльна оцінка результатів досліджень щодо інактивації *C. parvum oocysts* діоксидом хлору [22]

№	Резюме експерименту[a]	Ct (мг/л·хв)	log_{10} інактивації[c]	Оцінка мінливості або інфективності	Джерело[d]
1	2	3	4	5	6
1.	*C. parvum*, кімнатна температура, ВД ДХ 0,43 мг/л, ЗК 0,22 мг/л, експозиція 30 хв	12,9[b]	1,24 (1,0)	Інфективність для мишей	11
2.	*C. parvum*, 0,01 М фосфатний буфер, pH 7 , 25 °C, ВД ДХ 1,3 мг/л, ЗК 0,4 мг/л, експозиція 60 хв	789[b]	1,0 (2,0)	Інфективність для мишей	13
3.	*C. parvum*, 0,05 М фосфатний буфер, pH 8 , 22 ± 1 °C, ВД ДХ 2,0 мг/л, експозиція 30 хв	60[b]	0,99	Інфективність для мишей	23

Продовження табл. 4.2

1	2	3	4	5	6
4.	Див. п. 3, експозиція 61 хв	122[b]	1,57	Інфективність для мишей	23
5.	Див. п. 3, ВД ДХ 3,3 мг/л, експозиція 116 мин	383[b]	>3,22	Інфективність для мишей	23
6.	*C. parvum*, 0,05 М фосфатний буфер, pH 6 , 22 °C, 2 досліди	120	1,8 и 2,1	Інфективність для мишей	24
7.	*C. parvum* (ізолят Айова, генотип 2 [C] від телят, університет Аризони), 0,01 М фосфатний буфер, pH 8 , 20 °C	150	2,0[e]	Модифіковане ексцистування in vitro	14
8.	*C. parvum* (штам Айова PHF), ddH_2O, pH 8 , 21 °C	1000	2,0[e]	Культура MPN-клітин	22
9.	*C. parvum* (штам Айова PHF), ddH_2O, pH 8 ,	1000	0,5[e]	Ексцистування in vitro	22

	21 °C				

Продовження табл. 4.2

	2	3	4	5	6
10.	*C. parvum* (штам Айова Стерлінг), ddH_2O, pH 8 , 21 °C	550	2,0[e]	Культура MPN-клітин	22
11.	*C. parvum* (штам Айова, університет Альберта), ddH_2O, pH 8 , 21 °C	75	2,0[e]	Культура MPN-клітин	22

Примітки: [a] ddH_2O – деіонізована дистильована вода; PHF – музей штамів; ВД - вихідна доза; ЗК – залишкова концентрація; MPN - most-probable-number (найбільш ймовірне число); [b] - значення Ct - максимальний теоретичний Ct, обчислений шляхом множення вихідної дози дезінфектанта на експозицію. Слід зазначити, що Liyanage із співавт. [23] надали дані ВД та ЗК діоксиду хлору при інактивації *C. parvum oocyst* і у всіх випадках ЗК становила 60% або менше ВД; [c] - значення у круглих дужках – результат перерахунків [26]; [d] - представлено лише відібрані дані кожного посилання; [e] – орієнтовні значення.

Як показано на рис. 4.7, у цьому дослідженні використовували два різних музейних штаму *C. parvum oocysts* з PHF (музей штамів Pleasant Hill Farm, Troy, Idaho) (00-3 та 00-11).

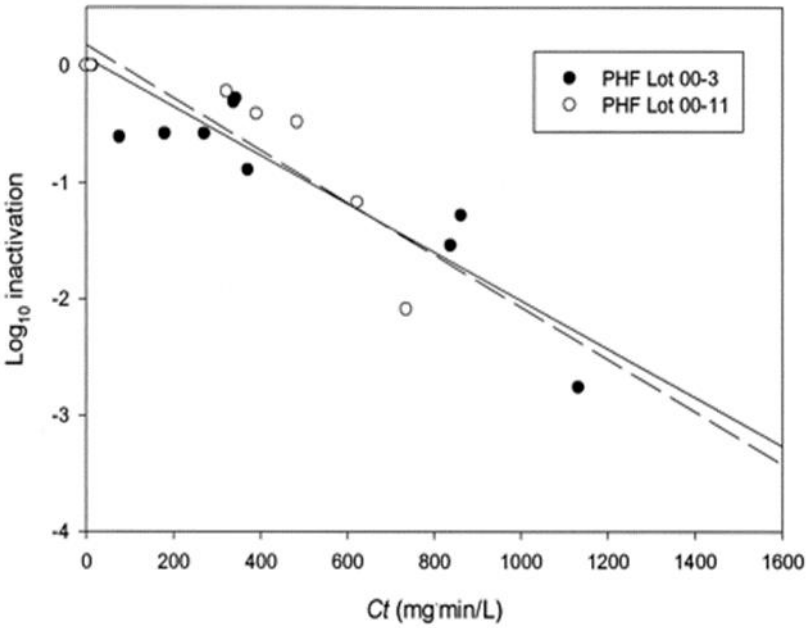

Рис. 4.7 Порівняння лінійної регресії інактивації діоксидом хлору двох різних штамів *C. parvum oocysts* із PHF. 18 січня 2000 р. був випробуваний штам 00-3 (суцільна лінія), 8 червня 2000 штам 00-11 (переривчаста лінія). Інактивація була виміряна методом інфективності для MPN-клітин і була виконана при 21 °C у деіонізованій дистильованій воді при pH 8,0

Штам 99-23 у попередніх експериментах служив контролем; два інші використовувалися в експериментах з інактивації діоксидом хлору.

18 січня 2000 р. було проведено експеримент із 00-3, 8 червня 2000 р. – з 00-11. Інактивація діоксидом хлору була виміряна методом інфективності для MPN-клітин і була виконана при 21 °C в деіонізованій дистильованій воді при pH 8,0. Попарне порівняння скоригованої середньої величини рівнів інактивації показало відсутність значних відмінностей (P <0,05) у чутливості до діоксиду хлору двох випробуваних штамів, що свідчить про хорошу відтворюваність методу.

На додаток до можливих змін залежно від джерела оцінили ефективність інактивації діоксидом хлору ооцист від трьох різних постачальників (PHF, лабораторія паразитології Стерлінга та університет Альберти). Результати показали різні рівні стійкості до діоксиду хлору (рис. 4.8).

Наприклад, для 2,0 log10 інактивації значення Ct становили 1 000, 550 та 75 мг/л·хв для ооцист з PHF, лабораторії паразитології Стерлінга та університету Альберти відповідно (табл. 4.2). Попарні порівняння скоригованої середньої величини рівнів інактивації показали, що ці відмінності були значущими для кожного постачальника (P < 0,05). Табл. 4.2 підбиває підсумок різних досліджень з інактивації діоксидом хлору *C. parvum*. У цьому дослідженні рівні інактивації ооцист з університету Альберти були порівняні з даними, раніше опублікованими цими дослідниками [24, 25].

Це дозволяє припустити, що з використанням тих самих ооцист, дані інактивації з інфективністю мишей і аналізом інфективності для MPN-клітин подібні (табл. 4.2).

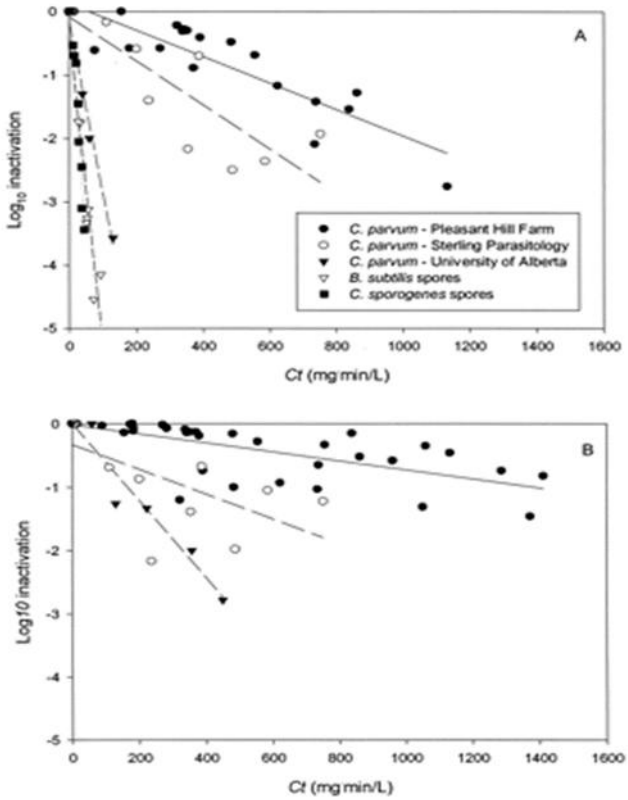

Рис. 4.8 Порівняння лінійної регресії інактивації діоксидом хлору *C. parvum* із трьох різних джерел (PHF, лабораторія паразитології Стерлінга та Університет Альберти). Інактивація була виконана в деіонізованій дистильованій воді (21 °C, pH 8,0) з визначенням ефективності MPN-клітин (A) та ексцистуванням in vitro (B). Порівнювали інактивацію діоксидом хлору (за тих же умов) *C. parvum oocysts*, спор *B. subtilis* та спор *Clostridium sporogenes* (A)

До цієї роботи [22] були відсутні дані щодо інактивації діоксидом хлору ооцист з PHF, що ускладнює прямі порівняння з іншими дослідженнями, оскільки вони були виконані з різними ооцистами.

Дані інактивації відповідали лінійній регресії першого порядку (табл. 4.3). У всіх наборів даних по інфективності на культурі MPN-клітин значення r^2 були більше 0,75, а значення у-точки перетину були мінімальні, що дозволяє припустити хорошу апроксимацію з моделлю Chick-Watson.

Значення r^2 для ексцистування in vitro були менше 0,50 для двох із трьох випадків, що свідчить про неадекватність даного методу вимірювання рівня інактивації через схильність отриманих даних до змін.

Заключна мета цього дослідження [22] полягала у оцінці повноцінності двох бактеріальних індикаторів: спор *B. subtilis* і *C. sporogenes*. Використовували лабораторні штами спор, які суспендували в деіонізованій дистильованій воді для експериментів інактивації діоксидом хлору. Обидва типи спор були значно більше (попарне порівняння скоригованої середньої величини рівнів інактивації $P<0,05$) схильні до інактивації діоксидом хлору, ніж *C. parvum oocysts* з PHF і лабораторії паразитології Стерлінгу в деіонізованій дистильованій воді: при pH 8 менш ніж 0,5 $\log_{10}$ інактивації *C. parvum* (PHF), тоді як інактивація спор перевищила 5,0 $\log_{10}$ одиниць для тих самих умов (рис. 4.8).

У роботі [25] досліджено кінетику інактивації діоксидом хлору цист *Naegleria gruberi* (непатогенні цисти ґрунту та водойм, які споріднені з паразитом людини *Naegleria fowleri*) у віці від 3 до 12 днів і вплив на цей процес pH від 5 до 9 і температури від 5 до 30.

Таблиця 4.3

Лінійна регресія результатів інактивації *C. parvum*

Поставщик ооцист	Ексцистування in vitro			Аналіз інфективності для MPN-клітин		
	r^2	k (л/мг· хв) [a]	у-точка перетину	r^2	k (л/мг· хв) [a]	у-точка перетигу
PHF	0,475	-0,0007	-0,0179	0,902	-0,00233	0,338
Лабораторія паразитології Стерлінга	0,3697	-0,0018	-0,398	0,752	-0,0035	-0.080
Університет Альберти	0,9622	-0,0058	-0,092	0,986	-0,0270	-0.160

[a] k - константа швидкості реакції первого порядка, взята як нахил лінійної регрессії даних

В результаті цього дослідження зроблено такі висновки:

1. Діоксид хлору – ефективний дезінфікуючий засіб щодо цист *N. gruberi*. При 25 °С і pH=7 середнє значення (CT) для 99% інактивації становить 5,5 мг/л·хв.

2. Цисти *N. gruberi* менш стійкі до інактивації діоксидом хлору у разі підвищення pH. При 25 °С значення CT, необхідне для 99% інактивації, зменшується від 6,4 мг/л·хв при pH 5 до 2,9 мг/л·хв при pH= 9.

3. Середнє значення CT для 99% інактивації подвоюється для кожних 10 °С підвищення температури води.

4. Стійкість цист *N. gruberi* до інактивації падає зі збільшенням віку.

5. Конгломерати цист стійкіші до дезінфекції, ніж ізольовані цисти.

Порівняльні дані ефективності діоксиду хлору та інших засобів дезінфекції по відношенню до *N. gruberi* свідчать, що діоксид хлору при pH=9 і 25°С наближається до озону по ефективності.

Література

1. Angus, K. W., Sherwood, D., Hutchinson, G., et al. (1982). Evaluation of the effect of 2-aldehyde-based disinfectants on the infectivity of faecal cryptosporidia for mice. *Research in Veterinary Science, 33*, 379–381. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32320-8
2. Campbell, I., Tzipori, S., Hutchison, G., et al. (1982). Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Veterinary Record, 111*, 414–415. https://doi.org/10.1136/vr.111.18.414

3. Pavlasek, I. (1984). Effect of disinfectants in infectiousness of oocysts of *Cryptosporidium* sp. *Ceská Epidemiologie, Mikrobiologie a Imunologie, 33*, 97–101
4. Weir, S. C., Pokorny, N. J., Carreno, S. U., et al. (2002). Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(5), 2576–2579. https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2576-2579.2002
5. Isaac-Renton, J. L., Fogel, D., Stibbs, H. H., et al. (1987). *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. *Lancet, 1*, 973–974. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90313-8
6. Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Effect of aqueous chlorine and oxychlorine compounds on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environmental Science & Technology, 31*(7), 1992–1994. https://doi.org/10.1021/es960815d
7. Możaryn, W. (1997). Korelacja pomiędzy jakością wody a jej zapotrzebowaniem na dwutlenek chloru do dezynfekcji [Correlation between water quality and chlorine dioxide requirement for disinfection]. *Ochrona Środowiska, 3*, 51–53.
8. Rubin, A. J., Engel, G. P., & Sproul, O. J. (1983). Disinfection of amoebic cysts in water with free chlorine. *Journal of Water Pollution Control Federation, 55*, 1174–1182.
9. Sproul, O. J., Chen, Y. S. R., Engel, G. P., et al. (1983). Comparison of chlorine and chlorine dioxide for the inactivation of an amoebic cyst. *Environmental Technology Letters, 4*, 335–342. https://doi.org/10.1080/09593338309384206

10. Cursons, R. T., Brown, T. J., & Keys, E. A. (1980). Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae in axenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology, 40*(1), 62–70. https://doi.org/10.1128/AEM.40.1.62-70.1980
11. Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., et al. (1989). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology, 55*(6), 1519–1522. https://doi.org/10.1128/AEM.55.6.1519-1522.1989
12. Gallaher, M. M., Herndon, J. L., Minis, L. J., et al. (1989). Cryptosporidiosis and surface water. *American Journal of Public Health, 79*(1), 39–42. https://doi.org/10.2105/AJPH.79.1.39
13. Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., et al. (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(5), 1423–1428. https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1423-1428.1990
14. Ruffell, K. M., Rennecker, J. L., & Marinas, B. J. (2000). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. *Water Research, 34*(3), 868–876. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00273-2
15. Finch, G. R., Liyanage, L. R. J., & Belosevic, M. (1995). Effect of chlorine dioxide on *Cryptosporidium* and *Giardia*. In *Chlorine Dioxide: Drinking Water, Process Water and Wastewater Issues*. Denver, CO: American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association.

16. Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Synergistic effects of sequential exposure of *Cryptosporidium* oocysts to chemical disinfectants. In C. R. Fricker, J. L. Clancy, & P. A. Rochelle (Eds.), *1997 International Symposium on Waterborne Cryptosporidium Proceedings* (p. 41). Denver, CO: American Water Works Association.
17. LeChevallier, M. W., Arora, H., Battigelli, D., et al. (1996). Chlorine dioxide for control of *Cryptosporidium* and disinfection by-products. In *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference, November 17–21, 1996, Boston, MA*. Denver, CO: American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association.
18. Li, H., Finch, G. R., Neumann, N., et al. (1998). Inactivation of *Cryptosporidium* by chlorine dioxide at 1 °C. In *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference, November 1–4, 1998, San Diego, CA*. Denver, CO: American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association.
19. Owens, J. H., Miltner, R. J., Slifko, T. R., et al. (1999). In vitro excystation and infectivity in mice and cell culture to assess chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. In *Proceedings of the 1999 American Water Works Association Water Quality Technology Conference*. Denver, CO: American Water Works Association.
20. Rennecker, J. L., Marinas, B. J., Owens, J. H., & Rice, E.W. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research, 33*(11), 2481–2488. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00432-8

21. Woodmansee, D. B. (1987). Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *Journal of Protozoology, 34*, 398–402. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03190.x
22. Chauret, C. P., Radziminski, C. Z., Lepuil, M., Creason, R., & Andrews R. C. (2001). Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(7), 2993–3001. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2993-3001.2001
23. Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Sequential disinfection of *Cryptosporidium parvum* by ozone and chlorine dioxide. *Ozone: Science & Engineering, 19*, 409–423. https://doi.org/10.1080/01919519708547292
24. Finch, G. R., & Li, H. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium* at 1°C using ozone or chlorine dioxide. *Ozone: Science & Engineering, 21*, 477–486. https://doi.org/10.1080/01919519908547229
25. Chen, Y. S. R., Sproul, O. J., & Rubin, A. J. (1985). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. *Water Research, 19*(6), 783–789. https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90214-9

РОЗДІЛ 5
СПОРОЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

5.1 Загальна характеристика

У роботі [1] діоксид хлору був ефективніший, ніж хлор, при інактивації спор *B. subtilis, B. mesentericus, B. megatherium*: 1-8 мг/л залишкового діоксиду хлору були потрібні для 99,9% інактивації.

Повідомлялося про ефективність діоксиду хлору по відношенню до спороутворюючих мікроорганізмів *B. cereus, B. stearothermilus* та *Clostridium perfringens* [2].

У цитованій вище статті М.М. Трахтман [3] наводяться дані про спороцидний ефект діоксиду хлору в дозі 1 мг/л при тривалості дії 30 хвилин. При порівнянні дії двоокису хлору та хлорного вапна відзначався швидший ефект у разі застосування двоокису хлору. У дослідах з *B. anthracoides* були отримані наступні результати: двоокис хлору в концентрації 50 мг/л при 15-хвилинному контакті мала бактерицидний ефект щодо 4-добової культури *B. anthracoides* у всіх дослідах без винятку. У паралельних дослідах із хлорним вапном бактерицидний ефект був отриманий лише при застосуванні дози активного хлору 250 мг/л протягом 30 хвилин. Скорочення часу контакту було можливим лише при збільшенні дози активного хлору до 750 мг/л.

Робота [4] присвячена вивченню ефективності двоокису хлору як дезінфектанта щодо спороутворюючих бактерій у воді. Досліди проводили на ставковій воді з високою кольоровістю, що містила спори *B. anthracoides* (штам 98) у кількості 10^7 спор/л. Дози двоокису хлору

становили 6; 12,5; 25; 80, 100 мг/л. Встановлено, що інтенсивність знищення спор підвищувалася зі збільшенням доз двоокису хлору та підвищенням температури, при цьому перше мало більш виражений вплив на спороцидну дію, ніж друге. Відзначено, що двоокис хлору приблизно в 5 разів активніша за хлор по дії на спорові форми мікроорганізмів.

Мета дослідження [5] полягала у визначенні повноцінності аеробних спор *B. subtilis* як мікробних індикаторів інактивації *G. lamblia* та/або *C. parvum*, а також оцінці впливу якості води, дози ClO_2 та температури на інактивацію спор.

Як показано на рис. 5.1, існує значна відмінність ($P < 0,05$) в рівні інактивації ClO_2 спор *B. subtilis* при 21,5°C у деіонізованій дистильованій воді при pH 6,0 і pH 8,0. Однак така відмінність при тій же температурі та значеннях pH не спостерігалася у воді з річки Оттави після фільтрації (рис. 5.2). У табл. 5.1 представлено порівняльну оцінку результатів досліджень з інактивації *C. parvum oocysts* і спор *B. subtilis* діоксидом хлору [5].

Ефективність дезінфекції ClO_2, як показано, залежить від pH. Noss та Olivieri [13] досліджували інактивацію ClO_2 бактеріофага f2 (15776-B ATCC) та представили докази, що ClO_2, а не його деривати хлорит та хлорат, є активним початком дезінфекції. У цій роботі f2 був інактивований діоксидом хлору у кислих, нейтральних та лужних значеннях pH. Рівень інактивації збільшувався із підвищенням pH. Продукти диспропорціонування діоксиду хлору (хлорит та хлорат) не були активними дезінфектантами. Оскільки діоксид хлору розпадався у лужних середовищах, показано зменшення віруліцидної ефективності, що підтверджує таке: діоксид хлору як вільний радикал є найактивнішою формою дезінфекції.

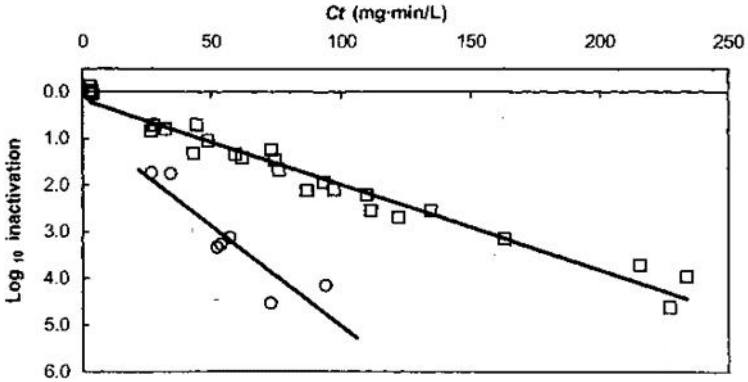

Рис. 5.1 Порівняння лінійної регресії інактивації ClO_2 при 21,4 °C спор *B. subtilis*, суспендованих у деіонізованій дистильованій воді при pH 6 (□) та pH 8 (о) [5]

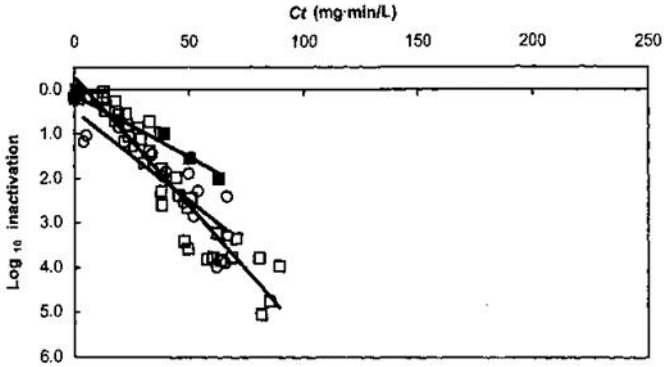

Рис. 5.2 Порівняння лінійної регресії інактивації ClO_2 при 21,4 °C спор *B. subtilis*, суспендованих у постфільтрованій воді ВОС на р. Оттава при pH 6 (□) та pH 8 (о). Дані інактивації в дослідній установці (■) (літо 1999 р.) для спор *B. subtilis* показані для порівняння [5].

Таблиця 5.1

Порівняльна оцінка результатів досліджень з інактивації *C. parvum oocysts* і спор *B. subtilis* діоксидом хлору [5]

№	Резюме експерименту[a]	Ct (мг/л · хв)	log_{10} інактивації	Джерело[d]
1	2	3	4	5
1.	*C. parvum*, кімнатна температура	12,9[b]	1,24 (1,0[c])	6
2.	*C. parvum*, 0,01 М фосфатний буфер, pH 7 , 25°C	78[b]	1,0 (2,0[c])	7
3.	*C. parvum*, 0,05 М фосфатный буфер, pH 8 , 22 ± 1 °C	60[b]	0,99	8
4.	*C. parvum*, 0,05 М фосфатний буфер, pH 6 , 22 °C, 2 опыта	120	1,8 и 2,1	8
7.	*C. parvum*, ddH_2O, pH 8 , 20 °C	150	2,0[e]	9

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
8.	*C. parvum* (штамм Айова, університет Альберта), ddH_2O, pH 8 , 21 °C	75	2,0[e]	10
8.	*G. lamblia*, фосфатний буфер, ddH20	15	3,0	11
9.	Спори *B. subtilis*, ddH_20-буферована до pH 8, 21 °C	25	2.0[d]	[5]
10.	Спори *B. subtilis*, ddH_20 буферована до pH 6, 21 °C	100	2.0[d]	[5]
12.	Спори *B. subtilis*, вода р. Оттава, буферована до pH 6, 21°C	40	2.0[d]	[5]

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
13.	Спори *B. subtilis*, вода р. Оттава, адаптована до pH 8, 21°C	40	2.0[d]	[5]

Примітки:
[a] ddH_2O – деіоінізована дистильована вода; ВД - вихідна доза; ЗК – залишкова концентрація; MPN - most-probable-number (найбільш ймовірне число); [b] - значення Ct - максимальний теоретичний Ct, обчислений шляхом множення вихідної дози дезінфектанта на експозицію. Слід зазначити, що Liyanage та ін. [12] надали дані ВД та ЗК діоксиду хлору при інактивації *C. parvum oocyst* і у всіх випадках ЗК становила 60% або менше ВД. c – результат перерахунків [8]. d - представлені лише відібрані дані кожного посилання. e – орієнтовні значення.

Це підтверджено у роботі [14], де повідомляється про інактивацію *B. subtilis*, а також вегетативних форм мікроорганізмів *E. coli, P. aeruginosa, Yersinia enterocolitica, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pyogenes* групи А, *Salmonella typhimurium* у фосфатному буфері (pH 7,0) при 23 °С с використанням «стабілізованого» водного розчину ClO_2 Purogene. Встановлено принаймні 4 log інактивації при дії Purogene у концентрації 0,75 мг/л.

Оскільки Purogene - стійка комплексна сполука, необхідно було забезпечити екологічну безпеку реагенту, змінюючи його pH від 3,5 до 8,6 (pH Purogene 8,6) при середній експериментальній константі pH 7,0. Результати показали, що Purogene найбільш ефективний при найнижчому перевіреному pH 3,5. Це показує: оскільки розчини діоксиду хлору відновлювалися до хлориту (який переважає при pH 8,6), їхня бактерицидна ефективність зменшувалася, тобто діоксид хлору є найактивнішим дезінфектантом у цьому випадку.

Також встановлено, що реакційна здатність ClO_2 значно не змінюється від зсуву pH у діапазоні 2,0 – 10,5, коли хімічний склад субстрату не змінюється [15]. Однак у літературі містяться суперечливі дані щодо впливу pH на ефективність ClO_2. Botzenhart et al. [16] повідомляли, що ефективність дезінфекції ClO_2 спор *B. subtilis* збільшилася, коли pH безперервного потоку в лабораторному реакторі був збільшений від 6,0 до 8,0 при температурах 5 °С або 15 °С.

До аналогічного висновку дійшли Berman і Hoff [17], які повідомили, що при 5 °С ротавірус SA11 швидше інактивується ClO_2 при pH 10,0, ніж при pH 6,0. Показано [18], що рівень інактивації ClO_2 цист *N. gruberi* у буферованій деіонізованій дистильованій воді збільшувався, коли pH зріс від 5,0 до 9,0. Автори

припустили, що це, ймовірно, було результатом змін поверхні цисти або збільшення ефективності дезінфектанта зі збільшенням pH. Noss та Olivieri [13] представили докази, що бактеріофаг f2 легше інактивується ClO_2 зі зростанням pH від 5,0 до 9,0. Коментуючи ці результати, автори пояснили їх реакцією між ClO_2 та вірусом, але відкинули ідею про зміну оксихлоркомпонентів у цьому дослідженні. Вони висунули гіпотезу про зміну хімічної структури вірусів та/або концентрації гідроксильних іонів у розчині, якщо гідроксильні іони були необхідні для реакції інактивації [13]. Так само C.A. Liyanage et al. [12], коментуючи свої дослідження з дезінфекції ClO_2 цист *G. lamblia*, зазначили, що зв'язок збільшення pH та ефективності ClO_2 може статися через можливі хімічні реакції або фізичні зміни в структурі цисти. До цих висновків про вплив pH можна також віднести результати дослідів зі спорами *B. subtilis* у цьому дослідженні [14]. Однак, оскільки на інактивацію спор у воді р. Оттави pH не впливало, можна припустити, що присутність фосфатного буфера (деіонізована дистильована вода з pH 6,0) обумовила непрямий або прямий захисний вплив на спори.

У табл. 5.1 [5] представлені експериментальні дані про рівні інактивації спор порівняно з такими для *C. parvum* та *G. lamblia*. Значення Ct для *G. lamblia* були отримані з Surface water treatment rule (SWTR) US EPA [11], для *C. parvum* представлені дані літератури. У даному дослідженні для 2,0 log10 інактивації спор *B. subtilis* значення Ct склали 100 і 25 мг/л·хв при pH 6 і 8 відповідно. Тому у *C. parvum oocysts* та спор *B. subtilis* спостерігаються подібні рівні інактивації, тоді як цисти *G. lamblia* більш чутливі до ClO_2 (табл. 5.1). Через очевидні загальні риси інактивації спор *B. subtilis* і *C. parvum*, автори прийшли до

рішення використовувати спори у пілотних випробуваннях для оцінки ефективності $C1O_2$ під час очищення води.

Ряд досліджень [9, 16, 20] показали, що зі збільшенням дози дезінфектанта зростає мікробна інактивація. Як очікувалося, подібна тенденція спостерігалася під час інактивації у пілотному масштабі спор *B. subtilis* (рис. 5.3) [20]. Рівні $C1O_2$ у воді для 1,5 та 2,0 $1og_{10}$ інактивації становили 1,0 та 1,25 мг/л відповідно. Концентрації хлориту були нижчими від максимального рівня забруднення (MCL) EPA [21] 1,0 мг/л і максимально допустимого рівня забруднення (MCLG) 0,8 мг/л для всіх вивчених рівнів інактивації (рис. 5.3).

У кількох дослідах спори були оброблені до, а не після фільтрації. Відмінностей у нормах інактивації не спостерігалося (табл. 5.2). Це дозволяє припустити, що будь-яка дія при фільтрації не підвищує чутливість спор до інактивації $C1O_2$. Рівні видалення спор при фільтрації і в холодних, і в теплих водах становили близько 2,0 $1og_{10}$ і подібні до результатів E.W. Rice et al. [23], які повідомляли про видалення спор на 1,68-2,75 log_{10} при фільтрації на чотирьох ВОС.

Swerfeger et al. [24] також повідомляли про подібні результати: спори були видалені фільтрацією на 1,48-2,37 log_{10}.

На закінчення автори [5] відзначають: як зазначено іншими дослідниками [23, 25, 26], бактеріальні спори можуть бути потенційними індикаторами (поряд з іншими параметрами) ефективності очищення води при інактивації *C. parvum*. Це пояснюється їхньою подібністю щодо стійкості до ClO_2 (дещо нижчої), а також через те, що вони не є патогенними для людини. Це суперечить даним Chauret et al. [10], які встановили десятикратне

перевищення чутливості спор *B. subtilis* і *C. sporogenes* у порівнянні з *C. parvum oocysts*.

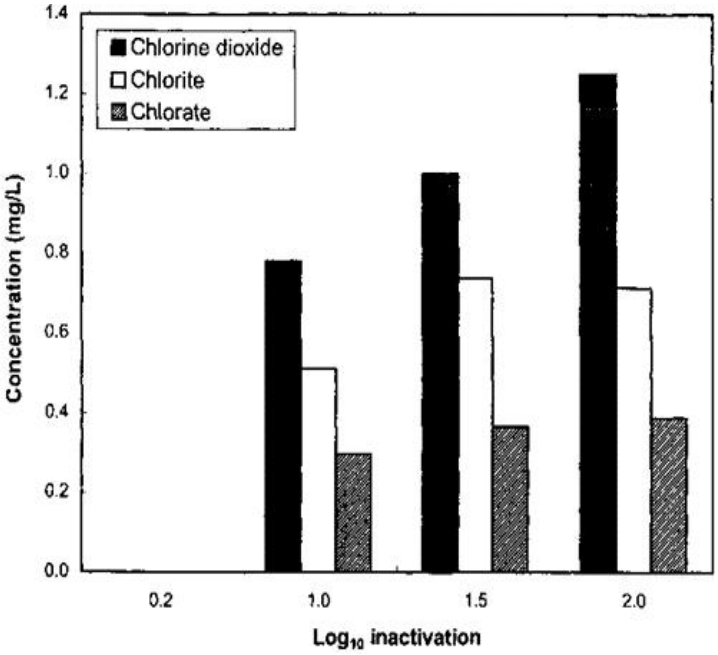

Рис. 5.3 Залишкові концентрації ClO_2, хлориту та хлорату у воді при інактивації спор *B. subtilis* у напівзаводському масштабі дослідження. Вісь X вказує log_{10} інактивації спор ClO_2. Межі чутливості методу (MDL) склали 0,017 мг/л для ClO_2 та 0,05 мг/л для хлориту та хлорату [22].

Таблиця 5.2

Резюме дослідів з інактивації та видалення спор *B. subtilis* на дослідній установці WTP (Канада) (1 та 2 - кінець 1998 р.; 3-10 літо 1999 р.)

№ досл.	Період	Стадія обробки	Доза ClO_2 (мг/л)	ЗК ClO_2 (мг/л)	Хлорит (мг/л)	Log_{10} видалення при фільтрації	Log_{10} інактивації	Ct (мг/л·хв)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Кінець 1998	Постфільт-рація	2,50	2,02	0,30	—	0,60	101,0
2	Кінець 1998	Префільт-рація	2,50	2,00	0,30	1,85	0,45	100,0
3	Літо 1999	Постфільт-рація	0	0	0	—	0,16	0
4	Літо 1999	Префільт-рація	0	0	0	2,15	0,27	0
5, 6, 7	Літо 1999	Постфільт-рація	2,42[a]	1,24[a]	0,77	—	1,70[a]	62,0[a]

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
8, 9	Літо 1999	Префільт-рація	2,54[b]	1,54[b]	0,61	2,40[b]	2,50[b]	77,0[b]
10	Літо 1999	Постфільт-рація	1,74	0,78	0,51	—	1,00	39,0

[a] - середня трьох дослідів; [b] – середня двох дослідів.

Автори роботи [27], досліджуючи механізми спороцидної дії гіпохлориту та діоксиду хлору, докладно аналізують проблему спороцидності. Насамперед, зазначається, що спори різних видів *Bacillus* і *Clostridium* є метаболічно бездіяльними, і тому надзвичайно стійкими до різних сильних впливів, включаючи високу температуру, радіацію і безліч токсикантів [28-30].

Спори є незмінно стійкішими, ніж їх вегетативні форми до таких обробок і, отже, ця стадія життєвого циклу бактерій є критичною метою для режимів деконтамінації. Цей факт, у поєднанні з патогенністю багатьох спороутворюючих мікроорганізмів, пояснює пильний інтерес до розуміння механізмів стійкості спор при їх інактивації.

Фактори, які ідентифіковано як важливі у стійкості спор, наступні:

- товста білкова оболонка спори, яка відіграє значну роль у стійкості спор до багатьох впливів [30-37];
- низький вміст води в центральній області або ядрі спори, що значною мірою визначає стійкість;
- насиченість ДНК спор групою малих, кислоторозчинних білків (SASP) типу α-β-, які захищають ДНК від пошкодження УФО, високою температурою та деякими генотоксикантами, такими як азотиста кислота [33, 34];
- низька проникність внутрішньої мембрани, що оточує ядро спори, до гідрофільних молекул [31, 33];
- репарація ДНК – пошкоджень у процесі проростання спори [38].

Механізми інактивації спор також різні і включають:

- пошкодження ДНК УФО та деякими генотоксикантами [33, 34];

- повне руйнування цілісності спори сильною кислотою, лугом або етанолом [39];
- інактивація одного або більше компонентів біосистеми проростання спори, включаючи підвищення активності ферментів, які викликають розпад пептидогліканів кори спори [39], руйнування деякого(их) білка(ків), необхідних для проростання спори [40] та інші, поки що невідомі механізми, які інактивують проростання;
- пошкодження внутрішньої мембрани спори хімічними речовинами, наприклад, пероксинітрит [37] або Sterilox® [35] таким чином, що при проростанні спори попередні серйозні мембранні пошкодження проникності плазматичної мембрани призводять до загибелі проросшої спори.

Зокрема, слід зазначити інтерес до методів інактивації патогенних спор *B. anthracis*, які небезпідставно розглядалися і розглядаються як можлива зброя біотероризму або як агент біологічної війни. Встановлено ефективну інактивацію спор *B. anthracis* гіпохлоритом та діоксидом хлору [10, 30, 41, 42]. Обмежена інформація про інактивацію спор гіпохлоритом включає такі позиції:

- оболонка спори є надзвичайно важливим фактором стійкості до гіпохлориту;
- оброблені гіпохлоритом спори проростають погано;
- у тих спор, що залишилися живими після обробки гіпохлоритом, відзначено очевидне пошкодження ДНК.

У зв'язку з цим запропоновано протекторну функцію протеїнів типу α-β- SASP при пошкодженні ДНК спор гіпохлоритом [43-45]. На відміну від цього, про механізми інактивації та резистентності спор до діоксиду хлору практично нічого не відомо.

Отже, мета цього дослідження [27] полягала у порівняльній оцінці інактивації спор *B. subtilis* діоксидом хлору та гіпохлоритом. У цій роботі автори зосередилися лише на початковому етапі 95%-ної інактивації спор. Є дані про повну альтерацію і навіть розчинення спор деякими агентами, такими як гіпохлорит та перекис водню [29, 46, 47]. Однак, цілком можливо, що такі грубі зміни у спорах мали місце набагато пізніше за початкову інактивацію.

За даними літератури, спори *Clostridium* та *Bacillus*, особливо *B. subtilis*, інактивуються гіпохлоритом [29, 30, 44]. У цій роботі [27] встановлено, що гіпохлорит у концентрації 2,5 г/л при pH 11 забезпечував 3 logs інактивації за 45 хвилин (рис. 5.4a).

Усі штами спор показали дуже подібні криві інактивації, хоча спори α-β- зазвичай дещо чутливіші до гіпохлориту при цьому pH, ніж ізогенні спори дикого типу (рис. 5.4a). Така відмінність раніше була відзначена [45] і, на думку [48], пояснюється дефіцитом гена recA, відповідального за репарацію ДНК *B. subtilis* (рис. 5.4a). Гіпохлорит у нейтральному pH 7 викликав ефективніше знищення спор дикого типу за 8 хвилин (рис. 5.4b). У цьому випадку спори α-β- були трохи більш чутливими до гіпохлориту і відсутність recA впливала на чутливість спор (рис. 5.4b). Спори у воді також інактивовані діоксидом хлору [10, 42] аналогічно до гіпохлориту при pH 7 (рис. 5.4b, c).

У цьому випадку спори дикого типу, α-β-, recA та α-β-recA показали подібну чутливість до діоксиду хлору, хоча α-β-спори були дещо чутливішими (рис. 5.4c).

Тут потрібна ремарка, яка має принципово важливе значення. У цій та інших діаграмах наводиться фраза про певні кількості діоксиду хлору (виділено нами), а в «Методах» міститься наступне посилання: діоксид хлору

отримували з стабілізованого комерційного розчину (Oxine) шляхом його активації і подальшого 400-кратного розведення з отриманням основного розчину який використовувався для інактивації з концентрацією діоксиду хлору 10-14 мг/л (pH 3-5). Чому для гіпохлориту представлені однозначні дози та pH, а для діоксиду хлору коливання у досить суттєвому діапазоні, пояснення за текстом статті відсутні.

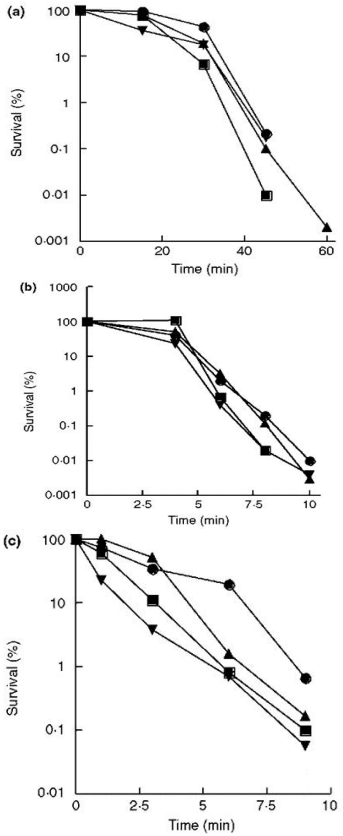

Рис. 5.4 Стійкість різних штамів спор *B. subtilis* до діоксиду хлору або гіпохлориту. (а) 2,5 г/л гіпохлориту

натрію (pH 11), (b) 50 мг/л гіпохлориту натрію (pH 7) або (c) діоксиду хлору. Символи позначають різні штами спор: ● - PS533 (дикий тип); ■ - PS578 (α - β-) ▲ - PS2318 (recA); ▼ - PS2319 (α - β - recA)

Результатом втрати протеїнів типу α-β-SASP є суттєве зменшення стійкості спор до незначного впливу генотоксичних агентів і цей ефект зростає із втратою цими спорами recA [33, 34, 49]. Оскільки відсутність α-β-SASP лише незначно збільшила чутливість спор до гіпохлориту та діоксиду хлору і втрата recA не мала жодного очевидного ефекту, ці два агенти, мабуть, не інактивують спори ушкодженням ДНК. Це підтверджується тим, що у життєздатних спор не виявлено значного підвищення мутацій у спор дикого типу з або без обробки гіпохлоритом або діоксидом хлору. У зв'язку з цим, на думку авторів [27], пріоритетним фактором стійкості є оболонка спори [29, 30, 32, 34, 35-37]. Це також, ймовірно, має місце для гіпохлориту та діоксиду хлору, оскільки деструкція оболонки спор дикого типу значно збільшила їхню чутливість до цих агентів (рис. 5.5a). Позбавлені оболонки спори були найменш стійкими до гіпохлориту та діоксиду хлору.

Подібний, хоча не ідентичний механізм руйнування оболонки пояснює зменшення стійкості спори до гіпохлориту у вигляді деструкції білка та/або матеріалу оболонки або обох факторів [29, 43, 44]. У спробі відокремити оболонку як відповідальну за чутливість спор до гіпохлориту та діоксиду хлору, автори [27] досліджували спори з мутацією в cotE, в якій закодовані білки оболонки [40] (рис. 5.5b). Спори cotE знову показали значно зменшену стійкість до гіпохлориту та діоксиду хлору, хоча мутація cotE мала більший вплив на стійкість до діоксиду хлору, ніж хімічна деструкція оболонки (рис. 5b). У попередніх роботах показано, що обробка спор

гіпохлоритом у лужних умовах видаляє деяку кількість білка оболонки спори, підвищуючи тим самим ступінь її інактивації [29, 40].

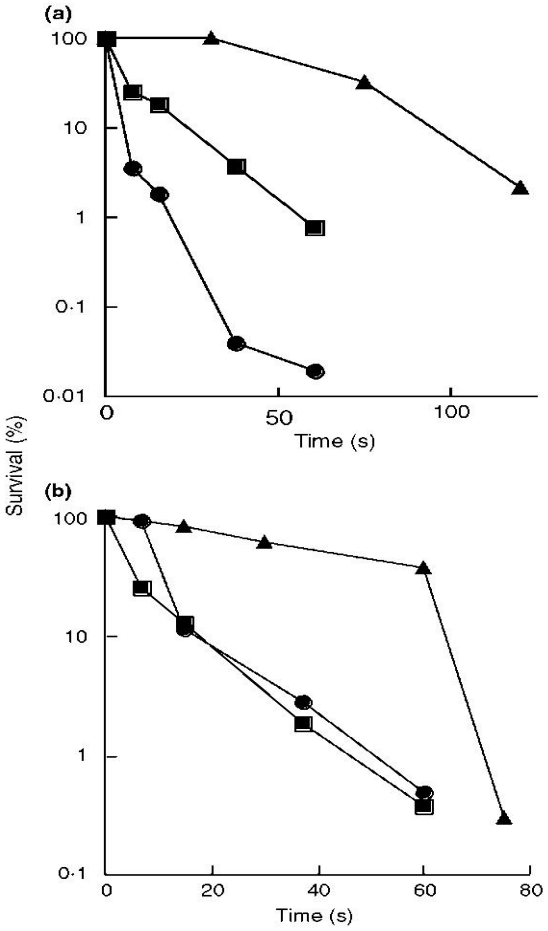

Рис. 5.5 Вплив втрати або видалення оболонок спор *B. subtilis* на їхню стійкість до гіпохлориту або діоксиду хлору. Позбавлені оболонки спори штамів PS533 (дикий

тип) (a) або спори штаму PS3394 (cotE) (b) під дією 2,5 г/л натрію гіпохлориту (pH 11) (●), 50 мг/л гіпохлориту натрію (pH 7) (■) або діоксиду хлору (▲) (певні кількості, як описано в «Методах») (див. ремарку автора)

Однак, якщо спочатку обробляли спори NaOH для видалення білка оболонки і потім визначали інактивацію спор гіпохлоритом у лужних умовах або діоксидом хлору, ефективність була ідентичною для неушкоджених спор. Видалення набагато більшої кількості білка оболонки шляхом застосування екстракції з детергентами [50, 51] може бути причиною відмінності у чутливості безоболонкових спор до обробки цими двома дезінфектантами.

Автори [27] проаналізували стійкість спор до гіпохлориту та діоксиду у широкому діапазоні температур (рис. 5.6a, b). Спори при 46 °C показали набагато більшу стійкість до гіпохлориту та діоксиду хлору, ніж за 25 і 37 °C (рис. 5.6a, b). У цьому експерименті спори при 37°C були інактивовані швидше гіпохлоритом і діоксидом хлору, ніж у попередньому експерименті, якщо порівняти дані для штаму PS533 на рис. 5.4a та рис. 5.6a, b. Це зумовлено різними методами пробопідготовки спор, що використовуються у цих двох експериментах: на чашках (рис. 5.4) та в рідині (рис. 5.6).

Для подальшого дослідження механізмів інактивації спор гіпохлоритом та діоксидом хлору проведено порівняльну візуальну морфологічну оцінку оброблених та необроблених спор. Спори після обробки діоксидом хлору та гіпохлоритом істотно відрізняється на вигляд від необроблених спор. Коричневий колір спорульованої *B. subtilis* у колонії або очищених спор значною мірою пояснюється присутністю білка CotA [50]. Очевидно, коричневий пігмент через CotA відбілений майже повністю гіпохлоритом і меншою мірою діоксидом хлору.

Ця реакційна здатність оболонки з гіпохлоритом та діоксидом хлору може бути одним із факторів захисту спори від цих агентів.

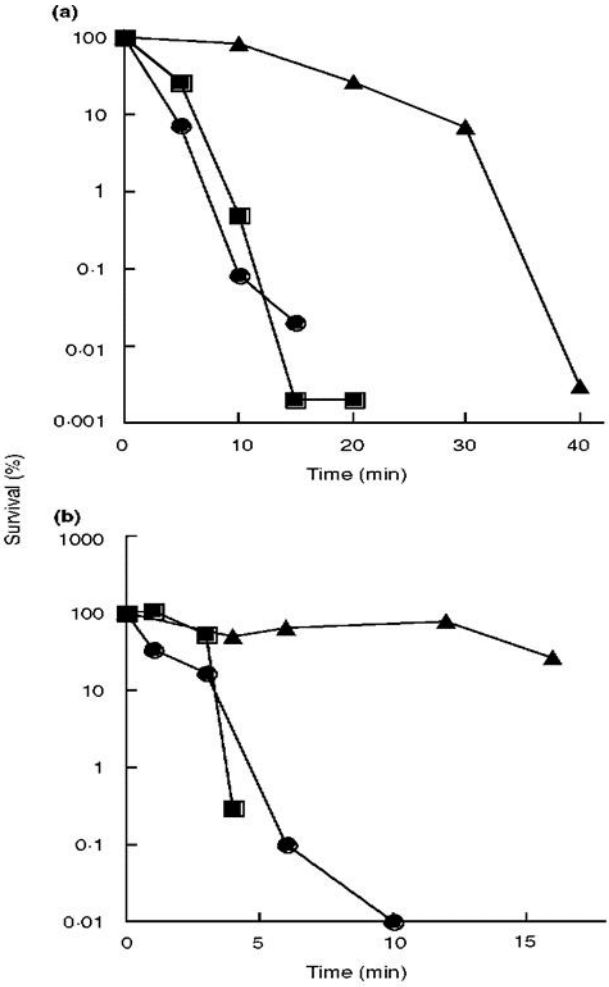

Рис. 5.6 Стійкість спор *B. subtilis* при різних температурах до діоксиду хлору або гіпохлориту. Штами спор PS533 (дикий тип) при температурах 25°C (●), 37°C

(■) або 46°C (▲), культивували з (a) 2,5 г/л гіпохлориту натрію (pH 11) або (b) діоксиду хлору (визначені кількості, як описано в «Методах»)

Разом з тим, ці агенти більшою мірою викликають розпад DPA (dipicolinic acid) при інкубації в сублетальних температурах [35, 37]. Це також мало місце зі спорами після обробки діоксидом хлору або гіпохлоритом (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Випуск DPA з необроблених та оброблених гіпохлоритом або діоксидом хлору спор*

Обробка	Інактивація (%)	Теплова обробка (°C)	Випуск DPA (%)
Відсутня	0	23	<3
NaOCl	92	23	<3
ClO_2	99	23	<3
Відсутня	0	80	<3
NaOCl	92	80	40
ClO_2	99	80	6
Відсутня	0	85	4
NaOCl	99	85	50
ClO_2	99	85	36

Примітка. *Спори штаму PS533 (дикий тип) не оброблені або після впливу гіпохлориту [2,5 г/л (pH 11)] / діоксиду хлору були екстенсивно вимиті і потім культивовані у воді протягом 30 хвилин при різних температурах, після чого визначали випущену DPA. Кількість DPA у необроблених спорах штаму PS533 становила 114 мкг/г сухих спор і це значення брали за 100 %. Інкубація спор дикого типу протягом 30 хвилин при 85 °C спричинила інактивацію спор на рівні ≤ 10 %.

Під час перевірки проникності бар'єрів спор автори [27] досліджували забарвлення їхньої нуклеїнової кислоти. Без втрати DPA після інактивації спор гіпохлоритом та діоксидом хлору <5% спор у 95%-ній популяції показали фарбування нуклеїнової кислоти в ядрі спори. На відміну від цих, необроблені та оброблені спори показали лише периферійне фарбування, як зазначено раніше для необроблених спор [39]. Це периферійне фарбування спори було інтенсивнішим після обробки гіпохлоритом, ніж діоксидом хлору, але периферійне фарбування істотно відрізнялося від міцного фарбування основної області у спор, які або проросли, або у яких була порушена внутрішня мембрана [39].

Інший механізм, за допомогою якого спори інактивовані, полягає в руйнуванні одного або більше компонентів у процесі проростання спори [30, 34, 36, 39, 53]. Крім цього, інактивовані діоксидом хлору спори, яких інкубували на живильному середовищі для проростання і які характеризувалися випуском DPA і гексозаміну, відрізнялися тим, що останній, як показовий при гідролізі кори спори, виявлений на рівнях, подібних до проростання необроблених спор. За даними літератури, випуск DPA та гексозаміну показовий на стадії II проростання оброблених діоксидом хлору спор [34, 39, 54]. На відміну від діоксиду хлору гіпохлорит знижував рівень проростання навіть після продовженої інкубації на відповідному середовищі. Це недостатнє проростання оброблених гіпохлоритом спор було зазначено раніше [43].

У процесі подальшого аналізу проростання інактивованих діоксидом хлору автори [27] оцінили рівень метаболічної активності у спорах, що несуть гени luxAB. Проростання необроблених спор супроводжувалося дуже раннім відновленням метаболізму (рис. 5.7) із супутньою

специфічною генерацією відновленого мононуклеотиду флавіна (FMN), що зазначено раніше [35, 37, 55, 56]. Однак цього не спостерігалося у інактивованих діоксидом хлору або гіпохлоритом luxAB спор (рис. 5.7).

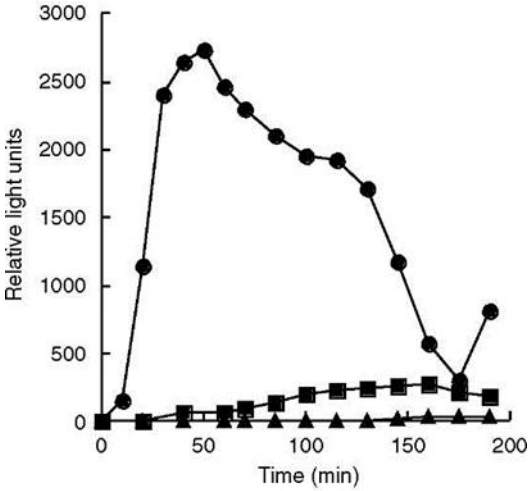

Рис. 5.7 Вплив попередньої обробки гіпохлоритом або діоксидом хлору на проростання спор *B. subtilis* із генами luxAB. Спори штаму PS3379 (luxAB) з або без попередньої обробки гіпохлоритом [2,5 г/л (pH 11)] або діоксидом хлору культивували на середовищі 2xYT з 8 мМ/л L-аланіну. Символи, що використовуються: ● - необроблені спори; ■ – спори, інактивовані гіпохлоритом 2,5 г/л (pH 11)] (96% інактивація); ▲ - спори, інактивовані діоксидом хлору (93% інактивація)

Автори відзначають, як несподіваний факт, таке явище для діоксиду хлору, оскільки для гіпохлориту, після якого спори проростають погано, це очікуваний результат. І далі продовжують. Пригнічення метаболізму в

проростаючих спорах після обробки діоксидом хлору ймовірно пов'язане з серйозним мембранним ушкодженням. Якщо у цьому справа, то ці спори повинні мати серйозний дефект проникності і бути повністю інактивованими («мертвими») при аналізі життєздатності, заснованому на дефіциті проникності живих, але не мертвих клітин по відношенню до пропідіум - йодиду. У цьому аналізі мертві клітини здаються червоними, тоді як живі клітини зеленими через сприйнятливість другої фарби. За даними [40], > 95 % необроблених спор, інкубованих для проростання, були зеленими у тому аналізі. Навпаки, дуже високий відсоток спор після обробки діоксидом хлору був червоним. Аналіз великої кількості пророслих спір після такого впливу (95% інактивація) показав, що число червоних проросших спор був > 35%. Експертиза інактивованих гіпохлоритом спор в цьому аналізі свідчить, що значна більшість спор добре не фарбувалася, оскільки вони, мабуть, не проросли, про що говорить слабке периферійне фарбування спор, що не діють.

Слід зазначити, що багато пророслих спор після обробки діоксидом хлору також показали яскраве периферійне фарбування з реактивом BacLite, на відміну від набагато слабкішого периферійного фарбування, відміченого для бездіяльних або оброблених гіпохлоритом спор. Це дозволяє припустити, що діоксид хлор інгібує деяку проміжну ланку проростання. Однак причина периферійного фарбування спор не ясна, хоча це може статися через деяке фарбування кори спори [39].

На додаток до викликаного нутрієнтом проростання, спори *B. subtilis* можуть також прорости альтернативним шляхом, який викликаний Ca^{2+}-DPA. Цей шлях обходить деякі з компонентів нутрієнт-індукованого шляху проростання, особливо нутрієнт - рецептори, і

використовує лише один із двох ферментів, що викликають лізис кори спори - CwlJ [57, 58]. Тому, цікавило дослідження проростання спор після обробки діоксидом хлору та гіпохлоритом в Ca^{2+}-DPA. Встановлено, що в обох випадках спори не проростали у Ca^{2+}-DPA. Автори пояснюють це тим, що фермент CwlJ набагато чутливіший до діоксиду хлору, ніж інший фермент, що лізує кору, SleB, оскільки наявність будь-якого такого ферменту достатньо для проростання спори з нутрієнтами [59]. Якщо це так, то sleB - спори повинні бути більш чутливими до діоксиду хлору, ніж спори дикого типу, і це дійсно мало місце (рис. 5.8).

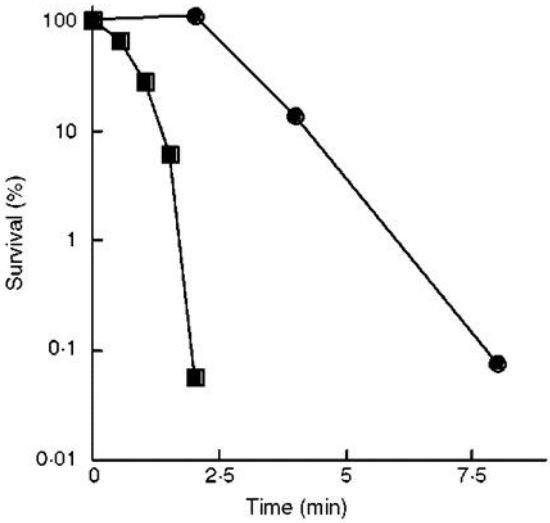

Рис. 5.8 Інактивація діоксидом хлору спор *B. subtilis* дикого типу (PS533) та FB112 (DsleB). Використовувані символи: (•) PS533 та (■) FB112

При іншій оцінці механізму інактивації спор діоксидом хлору та гіпохлоритом з визначенням дефекту у

проростанні спори, викликаному цими агентами, була досліджена здатність лізоциму регенерувати життєздатні спори. Спори були позбавлені оболонки при дії детергентів та дитіотреїтолу при лужному pH та інактивовані на 95 % діоксидом хлору або гіпохлоритом. У той час, як обробка лізоцимом викликала хороше відновлення спор, оброблених сильним лугом [39], ні діоксид хлор-, ні гіпохлорит-оброблені безоболонкові (decoated) спори суттєво не регенерували (<50% збільшення життєздатності). Це узгоджується з даними попередніх робіт, де показано, що спори, інактивовані гіпохлоритом при нейтральному pH, як і спори після обробки іншими хімічними сполуками, не регенеруються лізоцимом [29, 34, 36, 43, 53].

Наприкінці автори [27], зокрема, зазначають таке. У спор, інактивованих діоксидом хлору спостерігається інгібування процесу проростання, про що можна судити з випуску DPA та гідролізу кори спори. Це було також відзначено для спор, оброблених Sterilox і peroxynitrite [35, 37], багато з яких не були життєздатними. Оскільки бактеріальний аналіз життєздатності залежить від втрати проникності плазматичної мембрани клітини, це дозволяє припустити, що головний механізм інактивації діоксидом хлору бактеріальних спор полягає у пошкодженні внутрішньої мембрани спори. Це зумовлює порушення проникності плазматичної мембрани пророслої спори, попередником якої є внутрішня мембрана спори. Дійсно, діоксид хлору, як показано раніше на вегетативних формах бактерій, має першорядний вплив на проникність плазматичної мембрани *E. coli* з такими змінами, які, ймовірно, є першопричиною повної інактивації [60]. Мембранне пошкодження було запропоновано раніше як механізм, за допомогою чого Sterilox та peroxynitrite інактивують спори [35, 37]. Дійсно, інактивація спор

Sterilox і peroxynitrite пов'язана зі значною втратою бар'єрної функції проникності внутрішньої мембрани спори, що доводиться випуском DPA при звичайній сублетальній термічній обробці, як було також зазначено для оброблених діоксидом хлору спор. Однак, інактивація спор цими двома агентами відрізняється від такої для діоксиду хлору, який не ініціює метаболізм при проростанні оброблених спор, тоді як перші два, навпаки, ініціюють метаболізм [35, 37]. У цьому відношенні спори, оброблені діоксидом хлору, нагадують спори, оброблені перекисом водню [40]. Однак проростілі оброблені перекисом водню спори не характеризуються бактеріальним забарвленням життєздатності BacLite або навіть загальними забарвленнями нуклеїнової кислоти, такими як DAPI, а ядро не розширюється під час проростання цих спор [40]. Альтернативне пояснення полягає в тому, що в інактивованих діоксидом хлору спорах дійсно фактично змінюється метаболізм і проростання за рахунок інгібування ферментів LuxA і/або B. Автори посилаються на відсутність в даний час (2003 рік) даних, які виключили б цю можливість, оскільки попередні роботи показали, що декілька перекисей можуть инактивувати ферменти у межах спор [61, 62]. На думку авторів [27], немає нічого несподіваного в тому, що гіпохлорит та діоксид хлору ушкоджують мембрани спори чи окислюють жирні кислоти або мембранні білки, або й те, й інше. На жаль, поки що відсутня інформація про певне пошкодження мембран спори цими агентами або будь-яким іншим окисуювачем, які інактивують спори. Це залишається головним вакуумом у знанні точних механізмів, через що такі агенти знищують бактеріальні спори.

Література

1. Ridenour, G. M., Ingols, R. S., & Armbruster, E. H. (1949). Sporicidal properties of chlorine dioxide. *Water & Sewage Works, 96*(8), 279–286.
2. Hemstapat, V., & Foegeding, P. M. (1985). Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores and involvement of the spore coat in resistance. *Proceedings of the 45th Annual IFT Meeting*, 35–40.
3. Trachtman, N. N. (1946). Dvuokis' khlora v dezyinfektsii vody [Chlorine dioxide in water disinfection]. *Gihiiena i sanitariia, 10*, 10–13.
4. Sokolova, N. F., Troitsky, I. I., & Shultsova, N. K. (1969). Effektivnost' dvuokisi khlora kak dezinfektanta v otnoshenii sporobrazuyushchikh bakterii v vode [Effectiveness of chlorine dioxide as a disinfectant against spore-forming bacteria in water]. *Trudy Tsentral'nogo nauchno-issledovatel'skogo dezinfektsionnogo instituta, 20*, 179–186.
5. Radziminski, C., Ballantyne, L., Hodson, J., Creason, R., Andrews, R. C., & Chauret, C. (2002). Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: A bench-scale and pilot-scale study. *Water Research, 36*, 1629–1639. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00392-1
6. Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., de Maturana, V. M., & Debacker, E. (1989). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology, 55*(6), 1519–1522. https://doi.org/10.1128/AEM.55.6.1519-1522.1989
7. Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., & Sterling, C. R. (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on

Cryptosporidium parvum oocyst viability. https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1423-1428.1990 *Applied and Environmental Microbiology, 56*(5), 1423–1428.

8. Finch, G. R., & Li, H. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium* at 1°C using ozone or chlorine dioxide. *Ozone: Science & Engineering, 21*, 477–486. https://doi.org/10.1080/01919519908547229
9. Ruffell, K. M., Rennecker, J. L., & Marinas, B. J. (2000). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. *Water Research, 34*(3), 868–876. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00273-2
10. Chauret, C. P., Radziminski, C. Z., Lepuil, M., Creason, R., & Andrews, R. C. (2001). Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(7), 2993–3001. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2993-3001.2001
11. U.S. Environmental Protection Agency (1995). *Guidance manual: Surface water treatment rule* (106 pp.). https://doh.wa.gov/sites/default/files/legacy/Documents/Pubs//331-085.pdf
12. Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Sequential disinfection of *Cryptosporidium parvum* by ozone and chlorine dioxide. *Ozone: Science & Engineering, 19*, 409–423. https://doi.org/10.1080/01919519708547292
13. Noss, I., & Olivieri, V. P. (1985). Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. *Applied and Environmental Microbiology, 50*(5), 1162–1164. https://doi.org/10.1128/AEM.50.5.1162-1164.1985

14. Harakeh, S., Illescas, A., & Matin, A. (1988). Inactivation of bacteria by Purogene. *Journal of Applied Bacteriology, 64*(5), 459–463. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb05135.x
15. Hoigné, J., & Bader, H. (1994). Kinetics of reactions of chlorine dioxide (OClO) in water—I. Rate constants for inorganic and organic compounds. *Water Research, 28*(1), 45–55. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90172-4
16. Botzenhart, G. M., Tarcson, G. M., & Ostruschka, M. (1993). Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. *Water Science & Technology, 27*, 363–370.
17. Berman, D., & Hoff, J. C. (1984). Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, ClO2, and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology, 48*, 317–323. https://doi.org/10.1128/AEM.48.2.317-323.1984
18. Chen, Y. S. R., Sproul, O. J., & Rubin, A. J. (1985). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. *Water Research, 19*(6), 783–789. https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90214-9
19. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Li, L. X. , Fun, S. R., & Guanle, Y. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae, and animal planktons in water. *Water Research, 31*(3), 445–460. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00276-7
20. Sobsey, M. D. (1989). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science & Technology, 21*, 179–195.
21. U.S. Environmental Protection Agency (1998a). *National primary drinking water regulations: Disinfectants and disinfection byproducts; final rule*. *Federal Register, 63*, 69389–69476.

22. Hofmann, R., Andrews, R. C., & Ye, Q. (1998). Comparison of spectrophotometry methods for measuring ClO2 in drinking water treatment. *Environmental Technology, 19*, 761–773.
23. Rice, E. W., Fox, K. R., Miltner, R. J., Lytle, D. A., & Johnson, C. H. (1996). Evaluating plant performance with endospores. *Journal of the American Water Works Association, 88*(9), 122–136.
24. Swerfeger, J., Metx, D. H., DeMarco, J., Braghetta, A., & Jacangelo, J. G. (1999). Effect of filter media on cyst and oocyst removal. *Journal of the American Water Works Association, 91*(9), 90–100.
25. Nieminski, E. C., Bellamy, W. D., & Moss, L. R. (2000). Using surrogates to improve plant performance. *Journal of the American Water Works Association, 92*(3), 67–78.
26. Payment, P., & Franco, E. (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology, 59*, 2418–2424. https://doi.org/10.1128/AEM.59.8.2418-2424.1993
27. Young, S. B., & Setlow, P. (2003). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology, 95*, 54–67. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01847.x
28. Russell, A. D. (1990). The bacterial spore and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews, 3*, 99–111. https://doi.org/10.1128/CMR.3.2.99
29. Bloomfield, S. F. (1999). Resistance of spores to chemical agents. In A. D. Russell, W. B. Hugo, & G. A. J. Ayliffe (Eds.), *Principles and practice of disinfection,*

preservation and sterilization (pp. 303–320). London: Blackwell Science Ltd.

30. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews, 12*, 147–179. https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147
31. Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Molecular Biology and Microbiology Reviews, 64*, 548–572. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000
32. Riesenmann, P. J., & Nicholson, W. L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar radiation. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 620–626. https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.620-626.2000
33. Setlow, P. (2000). Resistance of bacterial spores. In G. Storz & R. Hengge-Aronis (Eds.), *Bacterial stress responses* (pp. 217–230). Washington, DC: American Society for Microbiology.
34. Tennen, R., Setlow, B., & Davis, K. L., Loshon, C. A., & Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology, 89*, 330–338. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01120.x
35. Loshon, C. A., Melly, E., Setlow, B., & Setlow, P. (2001). Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox®. *Journal of Applied Microbiology, 91*, 1051–1058. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01432.x
36. Cabrera-Martinez, R.-M., Setlow, B., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of the killing of spores of *Bacillus*

subtilis by orthophthalaldehyde. *Journal of Applied Microbiology, 92*, 675–680. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01584.x

37. Genest, P. C., Setlow, B., Melly, E., & Setlow, P. (2002). Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxynitrite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology, 148*, 307–314. https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-307
38. Gerhardt, P., & Marquis, R. E. (1989). Spore thermoresistance mechanisms. In I. Smith, R. A. Slepecky, & P. Setlow (Eds.), *Regulation of prokaryotic development* (pp. 68–74). Washington, DC: American Society for Microbiology.
39. Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C., Setlow, P., (2002). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology, 92*, 362–375. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01542.x
40. Melly, E., Cowan, A., & Setlow, P. (2002a). Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology, 93*, 316–325. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01706.x
41. Boyce, N. (2001a). Bleach, gas or foam. *US News and World Report, 54*, 131.
42. Coates, D. (2001). An evaluation of the use of chlorine dioxide (Tristel One-Shot) in an automated washer/disinfector (Medivator) fitted with a chlorine dioxide generator for decontamination of flexible endoscopes. *Journal of Hospital Infection, 48*, 55–65. https://doi.org/10.1053/jhin.2001.0962
43. Wyatt, L. R., & Waites, W. M. (1975). The effect of chlorine on spores of *Clostridium bifermentans, Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Journal of*

General Microbiology, 89, 337–344. https://doi.org/10.1099/00221287-89-2-337

44. Waites, W. M., & Bayliss, C. E. (1979). The effect of changes in spore coat on the destruction of *Bacillus cereus* spores by heat and chemical treatments. *Journal of Applied Biochemistry, 1*, 71–76.
45. Sabli, M. Z. H., Setlow, P., & Waites, W. M. (1996). The effect of hypochlorite on spores of *Bacillus subtilis* without small acid soluble proteins. *Letters in Applied Microbiology, 22*, 405–407. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01171.x
46. King, W. L., & Gould, G. W. (1969). Lysis of bacterial spores by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Bacteriology, 32*, 481–490. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1969.tb01718.x
47. Kulikovsky, A., Pankratz, H. S., & Sadoff, H. L. (1975). Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology, 38*, 39–46. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1975.tb00519.x
48. Yasbin, R., Cheo, D., & Bol, D. (1993). DNA repair systems. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, & R. Losick (Eds.), *Bacillus subtilis and other Gram positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics* (pp. 529–538). Washington, DC: American Society for Microbiology.
49. Setlow, B., & Setlow, P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology, 178*, 3486–3495. https://doi.org/10.1128/JB.178.12.3486-3495.1996
50. Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* spore coat. *Molecular Biology and Microbiology Reviews, 63*, 1–20. https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.1-20.1999

51. Nicholson, W. L., & Setlow, P. (1990). Sporulation, germination and outgrowth. In C. R. Harwood & S. M. Cutting (Eds.), *Molecular biological methods for Bacillus* (pp. 391–450). Chichester: John Wiley and Sons.
52. Russell, A. D. (1982). *The destruction of bacterial spores*. London: Academic Press.
53. Williams, N. D., & Russell, A. D. (1993). Revival of *Bacillus subtilis* spores from biocide-induced injury in the germination process. *Journal of Applied Bacteriology, 75*, 76–81. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02767.x
54. Setlow, B., Melly, E., & Setlow, P. (2001). Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage in spore germination. *Journal of Bacteriology, 183*, 4894–4899. https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4894-4899.2001
55. Hill, P. J., Hall, L., Vinicombe, D. A., Soper, C. J., Setlow, P., Waites, W. M., Denyer, S., & Stewart G. S. (1994). Bioluminescence and spores as biological indicators of inimical processes. *Journal of Applied Bacteriology, 76*, 129S–134S.
56. Ciarciaglini, G., Hill, P. J., Davies, K., McClure, P. J., Kilsby, D., Brown, M. H., & Coote, P. J. (2000). Germination-induced bioluminescence, a route to determine the inhibitory effect of a combination preservation treatment on bacterial spores. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 3735–3742. https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3735-3742.2000
57. Paidhungat, M., & Setlow, P. (2000). Role of Ger proteins in nutrient and non-nutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology, 182*, 2513–2519. https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2513-2519.2000

58. Paidhungat, M., & Setlow, P. (2001). Localization of a germinant-receptor protein (GerBA) to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology, 183*, 3982–3990. https://doi.org/10.1128/JB.183.13.3982-3990.2001
59. Ishikawa, S., Yamane, K., & Sekiguchi, J. (1998). Regulation and characterization of a newly deduced cell wall hydrolase gene (CWLJ) which affects germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology, 180*, 1375–1380. https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1375-1380.1998
60. Berg, J. D., Roberts, P. V., & Matin, A. (1979). Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions in *E. coli*. *Journal of Applied Bacteriology, 47*(3), 234–245.
61. Palop, A., Rutherford, G. C., & Marquis, R. E. (1996). Hydroperoxide inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *FEMS Microbiology Letters, 142*, 283–287. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08432.x
62. Palop, A., Rutherford, G. C., & Marquis, R. E. (1998). Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by hydroperoxides. *Canadian Journal of Microbiology, 44*, 465–470.https://doi.org/10.1139/w98-030.

5.2 Інактивація діоксидом хлору спор *Bacillus* і *Clostridium*

Метою дослідження [1] було оцінити різницю в чутливості до ClO_2 серед бактеріальних спор різних родів, видів та штамів, включаючи вплив концентрації ClO_2 та pH середовища, а також визначити вплив процедури підготовки спор та роль їх оболонки у захисті від ClO_2.

Оскільки обробка ClO_2 може інактивувати та/або пошкодити спори, була потрібна процедура, яка б дозволила перерахувати пошкоджені спори. Якщо ClO_2 реагував із зовнішньою частиною спори, зокрема зі споровою оболонкою, спори можуть бути життєздатними, але нездатними проростити в середовищі, яке зазвичай підтримує проростання, проте можуть проростити в присутності лізоциму [2]. Інші дослідники вказували на переваги середовищ з додаванням пірувату або манітол-жовткового поліміксинового агару та відмінності між зазвичай використовуваними неселективними середовищами для виділення пошкоджених спор [3]. Спочатку було протестовано кілька середовищ для виділення спор *B. cereus* T. Відновлення *B. cereus* T, обробленого ClO_2, було по суті ідентичним для кожного досліджуваного середовища. Дані вказують на те, що пошкодження спор обробкою ClO_2 було малоймовірним.

На рис. 5.9 зображено репрезентативні криві виживання для спор, оброблених ClO_2, та криві, отримані за допомогою моделі Вейбулла. Для всіх даних криві, отримані за цією моделлю, добре узгоджувалися та вважалися адекватним відображенням даних. Наступні рисунки ілюструють, а всі використані порівняння ілюструють лише змодельовані криві.

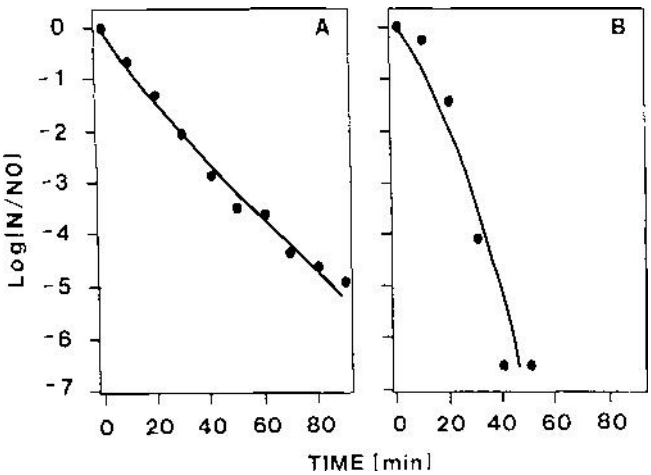

Рис. 5.9 Репрезентативні криві виживання, що показують ступінь відповідності кривих, отриманих за допомогою моделі Вейбулла, фактичним даним. Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t / початкова популяція). (A) *B. stearothermophilus* ATCC 1518, оброблена 20 мг/л ClO_2 при pH 4,5; (B) *B. cereus*, спорульована у збагаченому поживному агарі (препарат $1,8 \cdot 10^5$ спор/мл), оброблена 50 мг/л ClO_2 при pH 8,5.

Для оцінки варіації між популяціями спор, підготовленими за однією процедурою, було використано статистичне порівняння вісімнадцяти кривих виживання (2 препарати спор x 3 значення pH x 3 концентрації ClO_2) спор *B. cereus* T, підготовлених двічі з використанням однієї й тієї ж процедури споруляції (споруляція FNA). Хоча три з дев'яти парних кривих виживання (що порівнюють дві популяції) мали плечі різної довжини, загалом не було практичної або статистично значущої різниці в часі інактивації 99,9% популяцій. Тому подальше порівняння між родами, видами, штамами та обробками базувалося на часі інактивації 99,9% популяцій. Для

полегшення порівнянь у цій статті [1] представлені репрезентативні дані. Усі криві виживання представлені Hemstapat [4].

Резистентність до $C1O_2$ спор одного й того ж штаму, спорульованого за двома процедурами, суттєво відрізнялася ($p < 0,001$) (рис. 5.10).

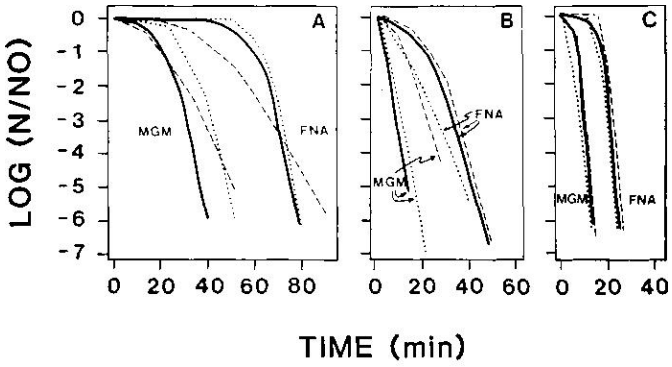

Рис. 5.10 Вплив середовища споруляції на стійкість *B. cereus* T до $C1O_2$ та вплив концентрації на ефективність $C1O_2$. Дані відображають спори *B. cereus* T на збагаченому поживному агарі (FNA, препарат $1,5 \cdot 10^6$ спор/мл) та в модифікованому середовищі G (MGM, $2 \cdot 10^6$ спор/мл). A, B та C ілюструють вплив 20, 50 або 80 мг $C1O_2$ відповідно. Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t / початкова популяція). Значення pH 4,5, 6,5 та 8,5 представлені як (_____), (- - - -) та (. . . . .) відповідно.

Спорульований *B. cereus* T у модифікованому середовищі G був значно чутливішим до $C1O_2$, ніж при споруляції на збагаченому поживному агарі. Час існування «плеча» (період затримки перед швидкою інактивацією) більше вплинув на різницю в стійкості, ніж швидкість інактивації після припинення утворення «плеча».

Модифіковане середовище G - це мінімальне бульйонне середовище, що складається з дріжджового екстракту, $(NH_4)_2SO_4$, глюкози та мінеральних солей, тоді як FNA є більш складним і повноцінним агаровим середовищем. Ці результати підтвердили попередні висновки про те, що спори, які утворюються на різних середовищах, можуть проявляти різну стійкість до нагрівання або хімічних речовин [5, 6]. Дослідження зі спорами *C. bifermentans*, спорульованими на різних середовищах, показали різні реакції на інактиваційні обробки, що, ймовірно, пов'язано зі структурою спор [6-9]. Наприклад, спори, стійкіші до H_2O_2, мали товстішу кору та менший протопласт [8].

ClO_2 був ефективним спорицидом. Значні ($p < 0,001$) ефекти спостерігалися для всіх комбінацій обробки (штам х концентрація х pH). Як показано на рис. 5.10 для спор *B. cereus* T, ClO_2 ефективно інактивував бактеріальні спори за випробуваних умов. Наприклад, ClO_2 при концентрації 50 мг/л, pH 6,5 зменшив популяції великих спор (приблизно $1,6 \cdot 10^6$ спор/мл) на 99,9% приблизно за 15-38 хв та 55 хв для *Bacillus* та *C. perfringens* відповідно. Вищі концентрації ClO_2 швидше інактивували популяції спор. У санітарній обробці харчових рослин популяції спор, значно менші за 10^6/мл, викликали б занепокоєння та були б знижені до прийнятно низького рівня за коротший час, якби бактеріальне та небактеріальне органічне навантаження було достатньо низьким.

Інактивація досліджуваних популяцій спор *Bacillus* діоксидом хлору суттєво не зазнала впливу pH. Хоча спостерігалися відмінності, зумовлені pH, для інактивації спор *Bacillus*, ці відмінності не були послідовними між концентраціями для жодної популяції, а також не були суттєвими і статистично значущими. Репрезентативні дані, що ілюструють незначний вплив pH, представлені на рис. 5.11, де показані криві інактивації для *B. cereus* F4810/72 та

B. stearothermophilus ATCC 1518 концентрацією 50 мг/л ClO_2 при pH 4,5, 6,5 та 8,5. Це також проілюстровано на рис. 5.10 для популяцій *B. cereus* T. Подібні результати, що документують незначний вплив pH, були отримані з кожною досліджуваною популяцією спор *Bacillus* та при кожній концентрації ClO_2 (20, 50 та 80 мг/л).

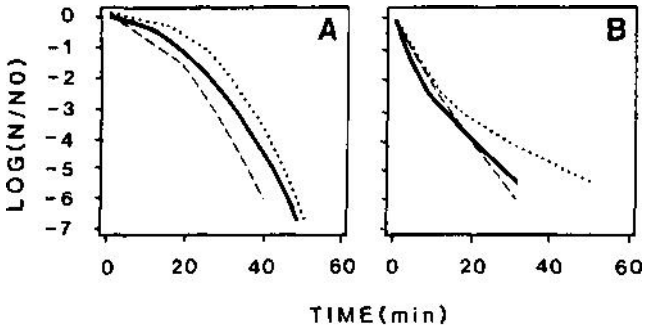

Рис. 5.11 Незначний вплив pH (4,5, 6,5, 8,5) на інактивацію спор *Bacillus cereus* F4810I72 (4-8 · 10^6 спор/мл) (A) та *B. stearothermophilus* ATCC 1518 (B) 50 мг/л ClO_2. Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t/початкова популяція). Значення pH 4,5, 6,5 та 8,5 представлені як (____), (- - - -) та (. . . . .) відповідно.

Однак, спостерігався значний вплив pH ($p < 0,001$) для спор *C. perfringens* NCTC 8798 (рис. 5.12), де швидша інактивація була досягнута при pH 8,5, ніж при pH 6,5 або 4,5 при кожній концентрації ClO_2.

Не було виявлено суттєвої різниці в інактивації спор *C. perfringens* NCTC 8798 між обробкою ClO_2 при pH 4,5 та 6,5. Вивчаючи вегетативні клітини бактерій, Ridenour та Ingols [10] повідомили про постійну бактерицидну активність у діапазоні pH 6-10.

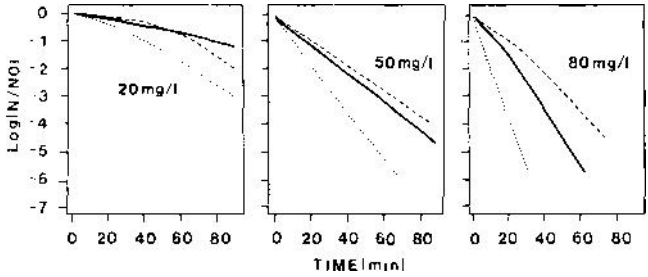

Рис. 5.12 Вплив pH (4,5, 6,5, 8,5) на інактивацію *C. perfringens* NCTC 8798 ClO_2 у дозі 20, 50 та 80 мг/л. Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t/початкова популяція). Значення pH 4,5, 6,5 та 8,5 представлені як (_____), (- - - -) та (. . . . .) відповідно.

Benarde et al. [11] не повідомили про зміни в спектрах поглинання $C1O_2$ при pH 4,0, 6,45 та 8,42. Це вказує на те, що дисоціація $C1O_2$ у цьому діапазоні pH не відбувалася. Однак Benarde et al. [11] спостерігали швидшу інактивацію *E. coli* при pH 8,5, ніж при pH 6,5. Дані щодо інактивації $C1O_2$ поліовірусу 1 та коліфагу f2 вказували на швидшу інактивацію при pH 9, ніж при pH 7 та pH 5 [12].

Оскільки $C1O_2$ не гідролізується в досліджуваному діапазоні pH і не було виявлено впливу pH на інші спори, pH повинен впливати на саму спору. Відмінності в захисному механізмі або зовнішній структурі спор можуть спричиняти спостережуваний вплив pH на інактивацію. Є можливість приписати спостережувану різницю узагальненій різниці в аеробних та анаеробних спорах. Однак було протестовано лише один штам анаеробних та два види аеробних спор, тому спостережуваний вплив pH ґрунтується на дуже обмежених даних.

Результати t-критерію Waller-Duncan для визначення середнього часу інактивації 99,9% популяцій

спор вказали на три різні групи щодо чутливості до ClO_2 (рис. 5.13).

B. stearothermophilus ATCC 1518 та спорульований MGM *B. cereus* T були значно чутливішими до ClO_2, ніж спорульований FNA *B. cereus* T (два препарати спор) та *B. cereus* F4810/72. Кожна популяція спор *Bacillus* була чутливішою до ClO_2, ніж протестована популяція спор *C. perfringens*. Позначення груп не залежало від pH, як показано на рис. 5.13, де показано дані для інактивації при pH 4,5 та 8,5.

Виражена чутливість до ClO_2, що спостерігалася для спор *B. stearothermophilus* ATCC 1518, суперечила даним Odlaug та Pflug [13], які вказують на те, що з шести видів *Bacillus*, які порівнювалися, термофіл *B. stearothermophilus* унікальний своєю надзвичайною стійкістю до гіпохлористої кислоти (активної сполуки Cl_2 або гіпохлориту).

Оскільки середовище споруляції суттєво впливатиме на чутливість спор, слід враховувати умови споруляції при порівнянні стійкості різних штамів. З огляду на це обмеження для досліджуваних штамів та умов популяції спор *Bacillus* були значно чутливішими до ClO_2, ніж популяція спор *C. perfringens* NCTC 8798.

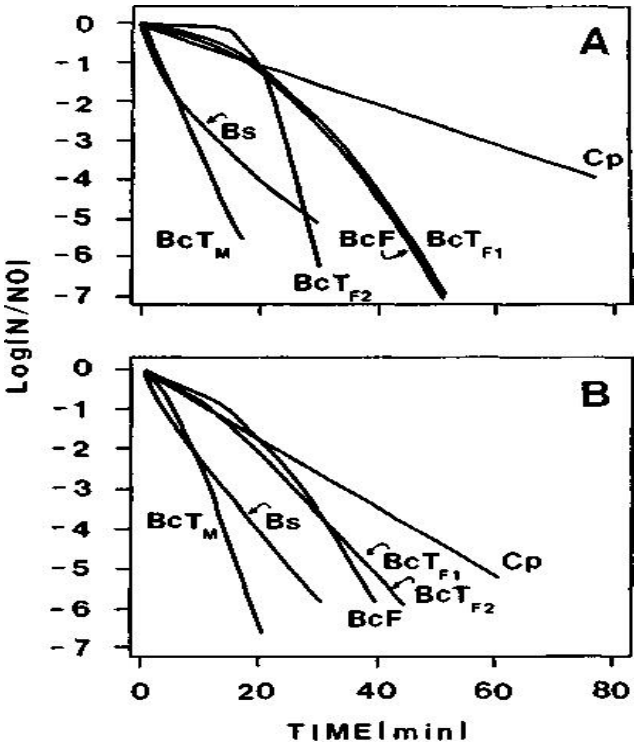

Рис. 5.13 Порівняльна чутливість популяцій спор *Bacillus* та *Clostridium* до 50 мг/л ClO_2 при значеннях pH 4,5 (рис. 5.14A) та 8,5 (рис. 5.14B). Показані дані для наступних популяцій спор: *B. cereus* T [препарати FNA 1 (BcT_{F1}), 5 · 10^5 спор/мл та 2 (BcT_{F2}), *B. cereus* T[Спорульований MGM (BcT_M), 3,5 · 10^6 спор/мл], *B. cereus* F4810I72 (BcF, 6 · 10^6 спор/мл), *B. stearothermophilus* ATCC 1518 (Bs) та C. perfringens NCTC 8798 (Cp). Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t / початкова популяція). При pH 8,5 дані для препаратів *B. cereus* 1 (BcT_{F1} та 2 (BcT_{F2}) з FNA-спорульованими сполуками по суті ідентичні та накладені на цьому рисунку.

Це суперечить більшості опублікованих літературних даних щодо інактивації спор *Bacillus* та *Clostridium* гіпохлоритом [13-15], які вказують на те, що спори *Clostridium* чутливіші, ніж спори *Bacillus*. Однак, порівняння знову ж таки обмежені, оскільки умови споруляції та обробки в цих дослідженнях відрізнялися від тих, що описані в літературі. Отримані дані [1] свідчать про те, що з досліджуваних штамів *C. perfringens* NCTC 8798, спорульований у D-середовищі, був би найкращим тестовим мікроорганізмом для досліджень з метою визначення ефективності обробки ClO_2.

Відсутність оболонок спор або відсутність цілісності оболонки значно збільшувала ефективність ClO_2 порівняно з інактивацією спор з неушкодженими оболонками (рис. 5.14). Ці дані вказують на важливу роль оболонки в захисті спор від ClO_2. Для спор *B. cereus* T, у яких не було оболонки або цілісності оболонки характерні криві виживання без плечей порівняно з інтактними спорами.

Дані свідчать про те, що оболонка може бути відповідальною за наявність та розмір плеча; однак на сьогоднішній день точна причина частої присутності плечей не досліджена. На кривих виживання були помітні «хвости», які вказують на те, що <1% популяції мала вищу стійкість до ClO_2. Це, здавалося, відповідало початковій стійкості, що спостерігалася для батьківського штаму за цих умов. Резистентна популяція, ймовірно, є часткою популяції *C. perfringens* з оболонкою та відповідає невеликому відсотку популяції, яка була здатна утворювати колонії на TSC без лізоциму.

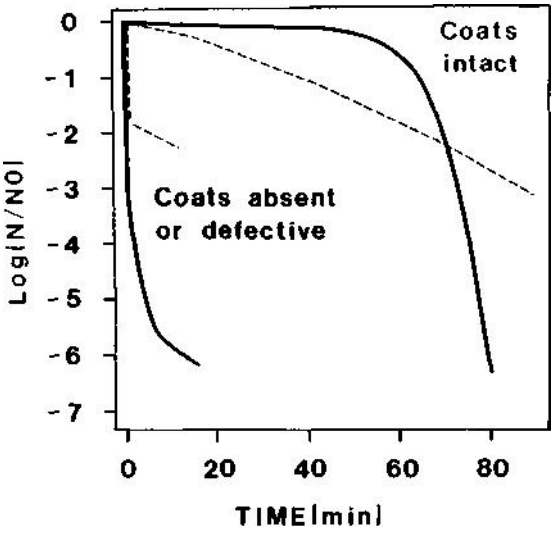

Рис. 5.14 Вплив оболонки на інактивацію ClO_2 (20 мг/л, pH 8,5) спор *Bacillus cereus* (____) та *Clostridium perfringens* (- - - -). Дані представляють популяції спор *B. cereus* T (NO = 10^6 КУО/мл), *B. cereus* T, оброблених для видалення білків оболонки (NO = 10^6 КУО/мл), *C. perfringens* NCTC 8798 (NO = 10^6 КУО/мл) та *C. perfringens* 8-6 ($N_0 = 5 \cdot 10^5$ КУО/мл). Штам 8-6 є безпокровним мутантом NCTC 8798. Log (N/N_0) = Log (популяція на момент часу t / початкова популяція).

Спорова оболонка важлива для захисту спор від інактивації гіпохлоритом та перекисом водню [16, 17]. Оболонка, ймовірно, діє як бар'єр проникності для хлору та інших агентів. Ефективність оболонки у виключенні ClO_2 може бути відповідальною за ступінь «плеча», що спостерігається на кривих виживання. Видалення білків оболонки спори не впливає на життєздатність спор, але робить спори більш чутливими до проростання з лізоцимом при дії перекису водню та гіпохлориту [2, 5-8,

17]. Ці дані свідчать про те, що двоступенева спороцидна обробка, включаючи один крок для послаблення оболонки (наприклад, обробка лугом, як свідчить спостережуваний вплив pH на інактивацію *C. perfringens* за допомогою ClO_2), а потім обробка ClO_2 може бути дуже ефективною для обробки. Коли спори *Bacillus* обробляли NaOH (pH приблизно 13), який солюбілізував лугорозчинний білок, ймовірно, з оболонки спори, вони були ще чутливішими до обробки лізоцимом та перекисом водню [18]. Було показано, що NaOH змінює структуру оболонки спори [19, 20]. Література показує, що існують принаймні два визначені компоненти спори (білок, багатий на дисульфіди, та лугорозчинний білок), які беруть участь у проникності. Це може пояснити посилену інактивацію *C. perfringens* NCTC 8798 при pH 8,5 (рис. 5.12). Підвищена активність ClO_2 при лужних значеннях pH може бути пов'язана з лужним гідролізом або депротонуванням білків оболонки *C. perfringens*. Автори [1] виявили, що спори як *Bacillus*, так і *Clostridium*, які не мали оболонки або мали пошкоджену оболонку, значно чутливіші до ClO_2, ніж спори з неушкодженою оболонкою. Дослідження з іншими дезінфікуючими засобами показали, що оболонка спор може створювати захисний бар'єр в одному спороутворювачі, але не в іншому [21, 22].

Це дослідження [1] документує ефективну інактивацію спор як *Bacillus*, так і *Clostridium* за допомогою ClO_2. В практичних застосуваннях зустрічаються менші популяції спор, ніж досліджувалися в цій роботі, однак присутні інші органічні або неорганічні залишки. ClO_2 наразі успішно використовується для очищення води та інших ситуацій, хоча інформація щодо інактивації спор була обмеженою.

Література

1. Foegeding, P. M., Hemstapat, V., & Giesbrecht, F. G. (1986). Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Journal of Food Science, 51*(1), 197-201. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10898.x
2. Foegeding, P. M., & Busta, F. F. (1983). Proposed mechanism for sensitization by hypochlorite treatment of *Clostridium botulinum* spores. *Applied and Environmental Microbiology, 45*, 1364–1372. https://doi.org/10.1128/AEM.45.4.1364-1372.1983
3. Johnson, K. M., Nelson, C. M., & Busta, F. F. (1982). Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. *Journal of Food Science, 47*, 1268. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb07654.x
4. Hemstapat, V. (1985). *Inactivation of Bacillus and Clostridium spores by chlorine dioxide and the importance of the bacterial spore coat to resistance* (M.S. thesis, North Carolina State University, Raleigh).
5. Waites, W. M., Stansfield, R., & Baylis, C. E. (1979). The effect of sporulation medium on the structure and heat resistance of *Clostridium bifermentans*. *FEMS Microbiology Letters, 5*, 365. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1979.tb03470.x
6. Bayliss, C. E., Waites, W. M., & King, N. R. (1981). Resistance and structure of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology, 50*, 379. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb00892.x
7. Waites, W. M. (1982). Microbial resistance. C. Resistance of bacterial spores. In A. D. Russell, W. B. Hugo, & G. A. J. Ayliffe (Eds.), *Principles and*

practices of disinfection, preservation and sterilization (p. 207). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

8. Waites, W. M., Bayliss, C. E., & King, N. R. (1980). The effect of sporulation medium on spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal of General Microbiology, 116*, 271. https://doi.org/10.1099/00221287-116-2-271
9. Waites, W. M., & Bayliss, C. E. (1980). In *Microbial growth and survival in extremes of environment* (G. E. Gould & J. E. L. Corry, Eds., p. 169). London & New York: Academic Press.
10. Ridenour, G. M., & Ingols, R. S. (1947). Bactericidal properties of chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 39*, 561.
11. Benarde, M. A., Israel, B. M., Olivieri, V. P., & Granstrom, M. L. (1965). Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. *Applied Microbiology, 13*, 776. https://doi.org/10.1128/am.13.5.776-780.1965
12. Taylor, G. R., & Butler, M. (1982). A comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride, and iodine. *Journal of Hygiene, 89*, 321. https://doi.org/10.1017/S0022172400070826
13. Odlaug, T. E., & Pflug, I. J. (1976). Sporicidal properties of chlorine compounds: applicability to cooling water for canned foods. *Journal of Milk and Food Technology, 39*, 493. https://doi.org/10.4315/0022-2747-39.7.493
14. Ito, K. A., & Seeger, M. L. (1980). Effects of germicides on microorganisms in can cooling waters. *Journal of Food Protection, 43*, 484. https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.6.484
15. Dye, M., & Mead, G. C. (1972). The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. *Journal of Food*

Technology, 7, 173. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb01692.x

16. Wyatt, L. R., & Waites, W. M. (1973). The effect of hypochlorite on the germination of spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal of General Microbiology, 78*, 383. https://doi.org/10.1099/00221287-78-2-383
17. Wyatt, L. R., & Waites, W. M. (1975). The effect of chlorine on spores of *Clostridium bifermentans, Bacillus subtilis,* and *Bacillus cereus*. *Journal of General Microbiology, 89*, 337. https://doi.org/10.1099/00221287-89-2-337
18. Gould, G. W., Stubbs, J. M., & King, W. L. (1970). Structure and composition of resistant layers in bacterial spore coats. *Journal of General Microbiology, 60*, 347. https://doi.org/10.1099/00221287-60-3-347
19. Duncan, C. L., Labbe, R. G., & Reich, R. (1972). Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *Journal of Bacteriology, 109*, 550. https://doi.org/10.1128/JB.109.2.550-559.1972
20. Waites, W. M., Wyatt, L. R., King, N. R., & Bayliss, C. E. (1976). Changes in spores of *Clostridium bifermentans* caused by treatment with hydrogen peroxide and cations. *Journal of General Microbiology, 93*, 388. https://doi.org/10.1099/00221287-93-2-388
21. Bayliss, C. E., & Waites, W. M. (1976). The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal of General Microbiology, 96*, 401. https://doi.org/10.1099/00221287-96-2-401
22. Waites, W. M., & Bayliss, C. E. (1979). The effect of changes in spore coat on the destruction of *Bacillus cereus* spores by heat and chemical treatments. *Journal of Applied Biochemistry, 1*, 71.

РОЗДІЛ 6
АЛЬГАЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

Діоксид хлору показав ефективність для запобігання росту морських водоростей [1]. Констатовано його більшу ефективність, ніж сульфату міді, при порівнянній вартості обробки води басейнів. Як вважають автори, діоксид хлору руйнує пірольне кільце хлорофілу. Продукти реакції діоксиду хлору з морськими водоростями не мають запаху.

Технологія обробки передбачала введення діоксиду хлору у воду басейну вночі, щоб запобігти розпаду діоксиду хлору сонячним світлом. Оптимальна доза діоксиду хлору становила 1 мг/л.

У роботі [2] проведено лабораторну оцінку ефективності інактивації ClO_2 у порівнянні з хлором морських мікроводоростей (дози 2-6 мг/л, pH=7, епкспозиція 30 хвилин). Встановлено, що ClO_2 має порівнянні ефекти з рідким хлором щодо інактивації мікроводоростей *Chlamydomonas*, *Phorimidum, Ulothrix*, *Microphorimidium* та *Ankistrodesmus і* дещо вищі для *Chlorella* та *Prismatic desmids*.

У роботі [3] вивчено ефекти хлору, озону та діоксиду хлору на культуру мікроводорості *Scenedesmus sp*. Конспективний виклад показує, що життєздатність клітин водорості та концентрація хлорофілу зменшилися паралельно зі збільшенням концентрації розчинених органічних речовин у разі зростання концентрації окислювача. Попередня обробка діоксидом хлору (1, 3 або 5 мг/л) або озоном (2,6; 4,6; 8,1 мг/л) культури водорості підвищували ефективність коагуляції, тоді як прехлорування дозами 10 або 20 мг/л збільшувало

необхідну дозу коагулянту на 15%. Перегляд електронних мікрофотографій окислених клітин показав виражений несприятливий вплив на архітектуру поверхні клітини: на додаток до окислення неклітинних органічних матеріалів окиснювачі ушкоджували структури поверхні клітини і внутрішньоклітинні компоненти. Авторами [3] було запропоновано модель, яка пояснює вплив різних окиснювачів на мікроводорості.

Оскільки окиснювачі широко використовуються в процесах водопідготовки, а мікроводорості поширені як біологічні контамінанти поверхневих вод, автори передують викладу результатів своїх досліджень короткий аналіз робіт своїх попередників [4-7].

Преозонування мікрофлори в річковій воді значно скорочує каламутність і кількість завислих частинок при подальшій хімічній коагуляції [7]. Про використання озону як ефективного окислювача стічних вод повідомляли Betzer et al. (1980) [6], а преозонування стічних вод збільшувало ефективність коагуляції та подальшу сепарацію морських мікроводоростей. Masschelein (1979) [5] показав, що діоксид хлору полегшує коагуляцію стічних вод разом з дезінфекційною активністю при мінімальній кількості хлорованих побічних продуктів. Як відомо, хлорування суспензії мікроводоростей послаблює здатність катіонних поліелектролітів до пластівців морських мікроводоростей [8]. Використання окиснювачів у видаленні морських мікроводоростей зі стічних вод супроводжується виходом клітинних компонентів, що виражається в накопиченні розчинених органічних багатих вуглецем речовин (DOC) [8, 9]. У дослідженні [10] автори повідомляють про ефекти трьох окиснювачів на коагуляцію морських мікроводоростей.

На рис. 6.1 представлено вплив збільшених концентрацій окиснювачів на життєздатність *Scenedesmus*,

концентрацію хлорофілу та DOC у суспензіях водорості порівняно з необробленими клітинами. Як видно з представлених даних, культури водорості показали зразок дози - відповіді на кожен з трьох окиснювачів: зі збільшенням дози скорочувалася життєздатність клітин і концентрації хлорофілу паралельно з розширеним виходом клітинних органічних сполук, судячи з УФ - абсорбції при 254 нм і рівнем DOC.

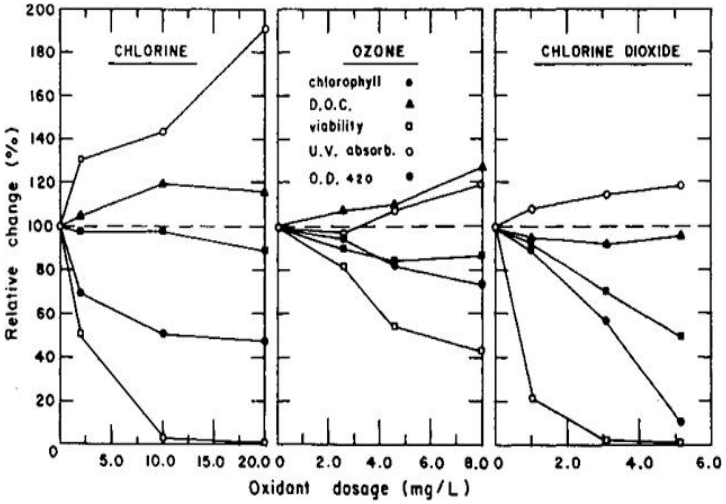

Рис. 6.1 Вплив Cl_2, O_3 та $C1O_2$ на життєздатність *Scenedesmus sp*., концентрацію хлорофілу, оптичну щільність культури та розчинені органічні сполуки

Крім цього, оптична щільність культури при 420 нм, яка позначає концентрацію клітин водорості, знижувалася зі збільшенням концентрацій застосованого окиснювача. Незважаючи на загальний якісний ефект окиснювачів, відзначені кількісні відмінності щодо змін, викликаних ними. На життєздатність клітин та концентрацію хлорофілу менше впливав озон, ніж хлор або діоксид

хлору, проте останній спричиняв найбільш значну деструкцію (<5 мг/л зменшував індекси життєздатності до <1%). Концентрація біомаси під впливом хлору або озону була зменшена до 85-90 %, тоді як попередня обробка діоксидом хлору (5 мг/л) призвела до 50% скорочення.

Накопичення DOC у вільному від водоростей середовищі збільшилося максимально з підвищенням концентрації хлору. Залежність між DOC та УФ-поглинанням відрізнялася серед цих окиснювачів. Збільшення концентрації хлору викликало різке збільшення УФ - поглинання поряд з помірним збільшенням DOC. Для озону характерно майже паралельне підвищення обох змінних. Це можна пояснити високою окислювальною реакційною здатністю озону у впливі на системи подвійного зв'язку, які призвели до зменшення УФ – поглинання як результат сумації збільшення міжклітинного витоку та зменшення їх подальшого окислення. Діоксид хлору викликав збільшення УФ - поглинання, проте DOC, як це не дивно, зменшувався на 5-10%. Це відбувалося, очевидно, через реакції між діоксидом хлору і клітинними полісахаридами як джерелами летких сполук і низькомолекулярних органічних кислот [11]. Підсумкові результати збільшення концентрацій окиснювачів у процесі видалення мікроводоростей при коагуляції сірчанокислим алюмінієм представлені на рис. 6.2. Ефективність видалення виражена як відношення між біомасою культури перед введенням коагулянту.

Табл. 6.1 висвітлює концентрації коагулянту для 50 і 90% видалення біомаси мікроводорості після передокислення порівняно з контролем. Як видно з отриманих даних, за найнижчої дози хлору (2 мг/л) ефективність практично нульова. Більш високі концентрації хлору (10 і 20 мг/л) уповільнювали

коагуляцію, оскільки дози коагулянту для 50 і 90% видалення були вищими на 20 і 15% відповідно в порівнянні з контролем. Попередня обробка озоном та діоксидом хлору прискорювали коагуляцію, судячи з менших доз коагулянту порівняно з контролем.

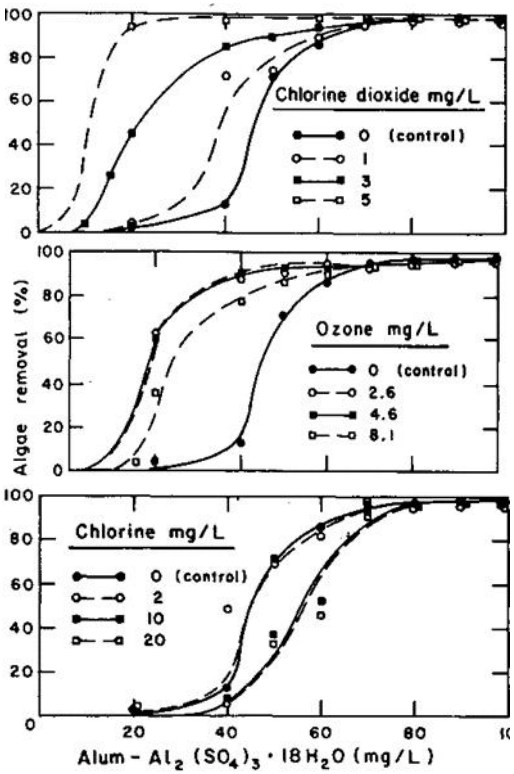

Рис. 6.2 Вплив передокислення Cl_2, O_3 та $C1O_2$ на коагуляцію *Scenedesmus sp*. $A1_2\ (SO_4)_3 \cdot 18H_2O$

Архітектура зовнішньої поверхні різних видів *Scenedesmus sp*. була описана Staehlin і Pickett-Heaps (1975)

[12], тому їх термінологія була прийнята в цьому дослідженні [3].

Типовою картиною за умов даного експерименту є чотири- або восьмиклітинний цінобій з двома спинними хребтами. Усі чотири клітини приблизно ідентичні за розмірами (близько 9 х 3 мкм). Клітини оточені оболонкою, яка називається сітчастим шаром. Структурними рисами поверхні *Scenedesmus sp.* є бородавки, розетки та соти. Бородавки безладно розпорошені на поверхні клітини і формують одну паралель кромки з поздовжньою віссю клітини. Дві круглі розетки з поздовжньою смугастістю знаходяться на поверхні кожної з внутрішніх клітин. Соти формують довгі (і іноді короткі) зовнішні межі.

Таблиця 6.1

Взаємозв'язок передокислення Cl_2, O_3 та $C1O_2$ з дозами коагулянту, необхідними для 50 і 90% видалення мікроводоростей

Окиснювач, мг/л		$A1_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, необхідний для видалення мікроводоросле й			
		50 %		90 %	
		мкМ	рівень	мкМ	рівень
Контроль	0	68	1,00	95	1,00
Cl_2	2	68	1,00	95	1,00
	10	83	1,22	108	1,14
	20	83	1,22	108	1,14
O_3	2,6	29	0,32	60	0,63
	4,6	29	0,32	60	0,63
	8,1	38	0,59	83	0,87
$C1O_2$	1	59	0,87	89	0,93
	3	33	0,49	75	0,79
	5	17	0,25	27	0,28

Найбільш очевидним результатом впливу хлору на поверхню клітини було множення та збільшення інтенсивності сітчастих витків. Цей ефект був залежний від дози та збільшувався із зростанням концентрацій окиснювача. Кільцева форма розеток поряд із поздовжньою смугастістю збережена.

Експертиза клітин після озонування показала дві закономірності. Перша характеризувалася хорошим збереженням структури поверхні клітин із мінімальними витками сітчастого шару (як у клітинах контролю). Друга показала відкриті поверхневі витки з виразним ушкодженням сітчастого шару між сусідніми клітинами, які виглядали роз'єднано.

В обох групах рядність бородавок не зберігалася, у другому випадку вони були безладно розподілені. Розетки також не уникли руйнівних змін. Ефект озону був дозо-залежним у тому сенсі, що при його найнижчій концентрації в популяціях клітин був переважним добре збережений тип поверхні клітини, тоді як його найвища концентрація викликала переважання пошкодженого типу поверхні. При проміжній концентрації пропорція становила 50:50.

Три концентрації ClO_2 також викликали руйнування поверхні клітини за дозо-залежним типом до появи поверхневих зарубок та утворення складок поряд з поступовим спотворенням організації низки бородавок. Були однорідно розсіяні бородавки та явно непошкоджені розетки.

Обговорюючи отримані результати, автори [3] наголошують, що ці три окиснювачі впливають і на структури захисного покриття клітини, і на внутрішньоклітинні компоненти. Знебарвлення хлорофілу після окислення ясно вказує на пошкодження фотосинтетичного апарату та супроводжується

збільшенням DOC (рис. 6.1), що відображає екстрацелюлярне виведення внутрішньоклітинного вмісту.

Узгодження хімічного та ультрамікроскопічного доказів свідчить про моделювання послідовності подій від передокислення клітин водоростей до утворення пластівців при коагуляції. Оскільки окиснювач впливає на поверхню мікроводорості та вміст клітини, компоненти останньої (макромолекули), такі як мембранні полісахариди, білки та нуклеїнові кислоти, виводяться з клітини та накопичуються в середовищі (поряд із клітинними низькомолекулярними сполуками). Таке накопичення стикається із взаємодією між коагулянтом та водоростевими клітинами і, таким чином, уповільнює випадання пластівців [13, 14]. Це ілюструвалося попередньою обробкою хлором, коли 10 або 20 мг/л спричинили збільшення дози коагулянту (рис. 6.2, табл. 6.1).

У присутності сильніших окиснювачів, а саме ClO_2 і O_3, DOC далі окислювався і розщеплювався до менших молекул [11, 15]; при цьому останні не випадали пластівцями [12]. Однак, підвищення коагуляції не може пояснюватись виключно як результат розщеплення позаклітинних органічних речовин. Автори [3] припускають, що зміна оболонки мікроводоростей редукує їхню колоїдну стабільність і посилює утворення пластівців (рис. 6.2). Природу цього явища можна пояснити після уточнення хімічної структури оболонки клітин *Scenedesmus sp.* та механізму реакцій окиснювачів з її компонентами.

У роботі [16] оцінювали ефективність інактивації мікроводоростей у воді.

Зразки води були відібрані в різних місцях ставка Хей Юйпао та негайно оброблені ClO_2 та рідким хлором в лабораторії. Встановлено, що окрім *Chlamydomonas* та

Phorimidum, $C1O_2$ мав кращу ефективність на *Ulothrix*, *Microphorumidium* та *Ankistrodesmus*, ніж рідкий хлор.

Додаткові експерименти показали більший або рівний у порівнянні із рідким хлором інактивуючий вплив $C1O_2$ на *Chlorella, Prismatic desmids, який* посилювався зі збільшенням дози.

Проведено [17] лабораторні випробування для вивчення впливу окислення діоксидом хлору (ClO_2) на цілісність клітин, деградацію токсинів та утворення побічних продуктів дезінфекції *Microcystis aeruginosa*. Модельовану суспензію ціанобактерій готували в концентрації $1{,}0\times10^6$ клітин/мл, а цілісність клітин вимірювали за допомогою проточної цитометрії. Результати показали, що ClO_2 може пригнічувати фотосинтетичну здатність клітин *M. aeruginosa*. Після окислення ClO_2 при дозі 1,0 мг/л майже не залишалося цілісних клітин. Загальний токсин розкладався швидше зі збільшенням дози ClO_2 від 0,1 мг/л до 1,0 мг/л. Крім того, пошкодження структури клітин після окислення призвело до вивільнення внутрішньоклітинної органічної речовини, що сприяло утворенню тригалометанів (ТНМ) та галооцтових кислот (HAA) як побічних продуктів дезінфекції. Тому використання ClO2 як окиснювача для обробки води, багатої на водорості, слід ретельно розглянути.

Досліджено [18] вплив та характер реакції видалення ClO_2 мікроцистину MC-RR. Результати показали ефективність видалення. За температури реакції 10°C та pH 7,0, 96,03% MC-RR зі 100 мкг/л було видалено за допомогою 2,5 мг/л ClO_2 через 60 хвилин. Показано, що на ефект видалення більше впливали дози ClO_2 та час, і менше - pH та температура реакції. Загальний порядок реакції визначено як другий. Константа швидкості реакції становила 583,15 л/(моль-хв); енергія активації 53,01

кДж/моль. Це означає, що ClO_2 можна використовувати для видалення MC-RR з питної води.

Вивчено [19] ефективність інактивації діоксидом хлору мікроводоростей *Chlamydomonas, Microcystis aeruginosa, Cylindrospermopsis, Chlorella* і *Tetraedron*. Визначено порядки та константи швидкості реакцій окислення діоксидом хлору. Результати показують, що ці водорості можуть бути ефективно еліміновані діоксидом хлору в сирій воді. Ефективність інактивації *M. aeruginosa*, *Cylindrospermopsis* і *Tetraedron* становила 89,44% — 92,48% протягом 10-15 хвилин; *Chlamydomonas* — 98,26%, *Chlorella* — 60,90%. Порядки реакцій *Chlamydomonas, M. aeruginosa, Cylindrospermopsis, Chlorella* і *Tetraedron* становили 1,3; 2; 2,5; 6 та 2 відповідно. Розраховано константи швидкості інактивації: $2{,}1\times10^{-3}$мкг$^{-0,3}$л$^{-0,3}$с$^{-1}$, $5{,}6\times10^{-3}$мкг$^{-1}$лс$^{-1}$, $8{,}3\times10^{-4}$мкг$^{-1,5}$л$^{-1,5}$с$^{-1}$, $1{,}0\times10^{-5}$мкг$^{-5}$л^{5}с$^{-1}$ та $3{,}8\times10^{-3}$ мкг$^{-1}$лс$^{-1}$ відповідно.

Діоксид хлору інактивує водорості, руйнуючи структури клітинних стінок, проникаючи в клітину та розкладаючи хлорофіл-а. Цей процес окислення є дуже ефективним проти ціанобактерій, таких як *M. aeruginosa*. Однак кінетика реакції значно варіюється залежно від виду, причому порядок реакції коливається від (n = 1,3) до (n = 6,0).

Механізми інактивації водоростей наступні.

1. Пряме окислення: ClO_2 діє як сильний селективний окиснювач, який безпосередньо атакує клітинні стінки водоростей.
2. Розпад хлорофілу-а: молекула активно реагує з пірольним кільцем у хлорофілі-а, ефективно позбавляючи водорості їхньої здатності до фотосинтезу та виживання.
3. Розпад токсинів: у випадку ціанобактерій ClO_2 не тільки лізує клітину, але й здатний розкладати

внутрішньоклітинні токсини водоростей (наприклад, мікроцистин).

Кінетика реакції

Реакція між ClO_2 та клітинами водоростей є багатоступеневою та зазвичай відповідає закону загальної швидкості другого порядку. Оскільки водорості є складними багатоклітинними або високоструктурованими одноклітинними організмами, кінетика реакції залежить від виду.

Загальне кінетичне рівняння швидкості інактивації (окислення) водоростей діоксидом хлору описується рівнянням другого порядку $-dC_{alg}/dt = k \cdot C_{ClO2} \cdot C_{alg}$, де C_{alg} — концентрація життєздатних клітин водоростей (або біомаси), моль/л; C_{ClO2} — концентрація діоксиду хлору у воді, моль/л; k — уявна константа швидкості реакції другого порядку, $M^{-1}\ c^{-1}$.

Дослідження [20] мало на меті вивчити ефективність ClO_2 для обробки баластних вод нафтового терміналу в районі порту Далянь (Китай) за різних експериментальних параметрів. Для цього експерименту використовували *Cylindrospermopsis raciborskii* (CR), *Gymnodinium catenatum* (GC) та *Gymnodinium cf. mikimotoi* (GCM). Результати показали, що за певних умов випробування швидкість видалення пропорційна дозі ClO_2 та часу реакції, і обернено пропорційна значенню pH, вмісту гумінової кислоти та аміачного азоту. Відповідно, при роботі з оптимальним дозуванням ClO_2 та параметрами експерименту, цей процес виявився ефективною технологією для видалення цих трьох водоростей та органічних сполук у баластних водах. Ця здатність була менш чутлива до значення pH, вмісту гумінової кислоти та аміачного азоту, ніж до дози ClO_2 та часу реакції. Видалення GC, GCM та CR за допомогою ClO_2 пояснюється реакцією другого порядку. Дослідження

ефективності такого процесу може допомогти розробити стратегії управління, які дозволять пом'якшити вплив шкідливих речовин та допоможуть покращити та забезпечити якість баластних вод.

На думку авторів [20], механізм кінетики інактивації мікроводоростей ClO_2 полягає у наступному.

Табл. 6.2 показує інтегральну залежність між часом реакції t та концентрацією Ct для різних порядків.

Реакція між водоростями та ClO_2 виглядає наступним чином:

	Algae + ClO_2 →	Product
$t=0$	C_o C_o	0
$t=t$	C_o-C_t C_o-C_t	C_t
$t=t.$	C_oC_∞ C_o-C_∞	C_∞

Експерименти з видалення водоростей проводилися за таких умов: значення pH зразків води становили 7, температура води – 20°C, концентрація ClO_2 – 0,5 мг/л, концентрації GC та GCM – 1,0 x 10^9 клітин/л, концентрація хлорофілу-а з CR – 55,94 мкг/л відповідно.

Апроксимація зв'язку між 1/(C_o-C_t) та t для видалення GC, GCM та CR наведена в табл. 6.3.

Таблиця 6.2

Інтегральна залежність між часом реакції t та концентрацією Ct для різних порядків

Orders	Type	Integral form	Linear relationship
0	A→P	$k_t=C_t$	$(a-C_t)-t$
1	A→P	$k_t = ln\frac{a}{a-C_t}$	$\ln(a-C_t)-t$
2	A+B→P (a=b)	$k_t = \frac{1}{a-C_t}-\frac{1}{a}$	$\frac{1}{a-C_t}-t$
2	A+B→P (a≠b)	$k_t = \frac{1}{a-b}ln\frac{b(a-C_t)}{a(b-C_T)}$	$ln\frac{b(a-C_t)}{a(b-C_T)}-t$
3	A+B+C→P (a=b=c)	$k_t = \frac{1}{2}\left[\frac{1}{(a-C_t)^2}-\frac{1}{a^2}\right]$	$ln\frac{b(a-C_t)}{a(b-C_T)}-t$
n (n≠1)	A→P	$k_t = \frac{1}{n-1}\left[\frac{1}{(a-C_t)^{n-1}}-\frac{1}{(a-C_t)^2}\right]$	$\frac{1}{(a-C_t)^2}-t$

де a, b, c – початкові концентрації реагентів відповідно, а Ct – концентрація продукту.

Таблиця 6.3

Результати підбору порядків реакцій для цих трьох водоростей

Параметр	GC	GCM	CR
Результати підгонки	*y=ax+*	*a=1/(Co-Ct)*	
Порядок реакції *n*	2	2	2
a	4.37474	0.50394	0.15555
b	0.14259	0.43645	0.01683
R^2	0.92156	0.946	0.93537

Результати показують, що зі збільшенням концентрації ClO_2 швидкість видалення цих трьох водоростей збільшувалася. Коли вміст ClO_2 перевищував 0,9 мг/л, швидкість видалення цих трьох водоростей практично не змінювалася. Як тільки концентрація хлорофілу-а перевищувала 7 мкгл, ефективність видалення менше залежала від початкової концентрації. Чим нижче значення pH, тим вищий потенціал ClO_2, тим вища

ефективність окислення та видалення. Зі збільшенням концентрації гумінової кислоти та амонійного азоту в баластних водах ефективність видалення водоростей знижувалась. Таким чином, використання ClO_2 як дезінфікуючого засобу може ефективно видаляти мікроводорості шляхом розумного контролю параметрів під час реакції.

Література

1. Ringer, W. C., & Campbell, S. J. (1955). Use of chlorine dioxide for algae control at Philadelphia. *Journal AWWA*, *47*(8), 740–747.
2. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Li, L.X., Fun, S. R., Guanle, Y. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Research*, *31*(3), 445–460. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00276-7
3. Sukenik, A., Teltch, B., Wachs, A. W., Shelef, G., Nir, I., Levanon D. (1987). Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Water Research*, *21*(5), 533–539. https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90061-3
4. Diaper, E. W. J. (1970). A new method of treatment for surface water supplies. *Water and Sewage Works*, *117*, 373–378.
5. Masschelein, W. G. (1979). *Chlorine dioxide: Chemistry and environmental impact of oxychlorine compounds.* Ann Arbor Science.
6. Betzer, N., Argaman, Y., & Kott, Y. (1980). Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation. *Water Research*, *14*, 1003–1013. https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90133-8
7. Saunier, B. M., Selleck, R. E., & Trussell, R. R. (1983). Preozonation as a coagulant aid in drinking water

treatment. *Journal American Water Works Association*, *75*, 239–246.

8. Echelberger, W. F., Pavoni, J. L., Singer, P. C. (1971). Disinfection of algae-laden waters. *Journal of the Sanitary Engineering Division, American Society of Civil Engineers*, *172*, 721–730.
9. Betzer, N., & Kott, Y. (1969). Effect of halogens on algae. *Water Research*, *3*, 237–264. https://doi.org/10.1016/0043-1354(69)90058-6
10. Shelef, A., Sukenik, A., & Green, M. (1985). Separation and harvesting of marine microalgal biomass. In W. Barclay (Ed.), *Algal biomass technology: An interdisciplinary perspective* (pp. xx–xx). Cramer.
11. Rav-Acha, C. (1984). The reactions of chlorine dioxide with aquatic organic materials and their health effects. *Water Research*, *18*, 1329–1341. https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90041-4
12. Staehlin, L. A., & Pickett-Heaps, J. D. (1975). The ultrastructure of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). I. Species with the "reticulate" or "warty" type of ornamented layer. *Journal of Phycology*, *11*, 163–185. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1975.tb02756.x
13. Bernardt, H., & Wilhelms, A. (1978). Der Einfluss algenbürtiger organischer Verbindungen auf den Flokungsprozess bei der Trinkwasseraufbereitung. In *Organische Verunreinigungen in der Umwelt.* Schmidt.
14. Narkis, N., & Rebhun, M. (1975). The mechanism of the flocculation process in the presence of humic substances. *Journal American Water Works Association*, *67*, 101–104.
15. Narkis, N., & Rotel, M. (1980). Evaluation of ozone biodegradability of wastewater treatment plant effluent. *Water Research*, *14*, 929–935.

https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90220-4

16. Junli, H., Li, W., Nenqi, R., Li, L., Fun, S.R., & Guanle, Y. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae, and animal planktons in water. *Water Research*, *31*(3), 445–460. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00320-X
17. Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Li, L., Deng, J., Zhu, M., & Zhu, S. (2014). Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. *Science of the Total Environment, 482–483*, 208–213. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.007
18. Wu, M.-S., Ji, Y., Huang, J.-L., Fu, J., Zhang, Y.-L., & Tian, Y. (2009). Effects and kinetics of chlorine dioxide removal of microcystin-RR. In *Proceedings of the 2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE 2009)* (Beijing, China, June 11–13, 2009). IEEE. https://doi.org/10.1109/ICBBE.2009.5162728
19. Li, S. X., Zhao, D. J., Xia, W. Q., & Yuan, X. L. (2013). The effect of killing algae with chlorine dioxide and reaction kinetics. *Applied Mechanics and Materials, 295–298*, 1398–1401. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.295-298.1398
20. Jia, L., Jiao, D., Yue, Y., & Shi, X. (2019). Mechanism and influence of removing algae with chlorine dioxide treatment for ship ballast water. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 631*(2), 022002. https://doi.org/10.1088/1757-899X/631/2/022002

РОЗДІЛ 7
МІКОЦИДНА ДІЯ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

Останнім часом все більше уваги приділяється наявності грибів у водному середовищі. Кілька дослідників повідомили про наявність нитчастих грибів у воді [1-6]. Одна дослідницька група [2] описала широке поширення нитчастих грибів у норвезьких системах питної води та виявила, що гриби стійкі до очищення води. Повідомляється, що гриби широко поширені в різних джерелах води, включаючи поверхневі [7], ґрунтові [8] та джерельні води [4]. Більше того, їх також можна виявити в системі водопостачання [9], водопровідній воді [10] і навіть у бутильованій мінеральній воді [11]. Що стосується видів грибів, то найпоширенішими є *Aspergillus spp., Cladosporium spp., Penicillium spp.* та *Candida spp.* [4, 7].

Масове поширення нитчастих грибів у воді може спричинити низку проблем, головним чином (1) зі смаком та запахом [10]; (2) з мікотоксинами, що викликають токсичну реакцію, шкірну алергію, астму та гіперчутливий пневмоніт [12]; (3) з утворенням зважених частинок та високої каламутності [13]; та (4) з утворенням біоплівки,

що вимагає вищої концентрації дезінфікуючих засобів [14].

Про виявлення грибів у воді повідомляється часто [1-6]; однак, існує лише кілька повідомлень про їх контроль у воді [15-19]. Наприклад, одна група дослідників [19] протестувала ефективність двох хімічних коагулянтів (сульфату алюмінію та хлориду заліза) та трьох фільтрувальних середовищ (піску, активованого вугілля та керамічних гранул) для контролю *Aspergillus flavus* у поверхневих водах. Виявлено, що загальний ступінь видалення грибів був недостатнім, оскільки дуже низька кількість грибкових клітин, що залишалася в обробленій воді, могла знову виростати у великій кількості у вигляді біоплівок у водних системах. Інші дослідники [15] досліджували ефективність вільного хлору в інактивації різних видів грибів (*Cladosporium tenuissimum, Cladosporium cladosporioides, Phoma glomerata, Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus, Penicillium griseofulvum* та *Penicillium citrinum*) і виявили, що різні види демонструють різну стійкість до хлору. Зазвичай хлорування вважається недостатньо ефективним для інактивації грибів у концентрації, що використовується для очищення питної води [18, 20]. Деякі дослідники [16] вивчали ефективність інактивації ультрафіолетовим (УФ) опроміненням *Aspergillus spp.* та виявили, що 4-логарифмічна інактивація *A. fumigatus, A. niger* та *A. flavus* при щільності 1000 КУО/мл досягається при УФ-флюенсі 12,45, 16,6 та 20,75 мДж/см^2 відповідно. Це вказує на те, що УФ-опромінення може ефективно інактивувати спори *Aspergillus* у воді. Встановлено, що комбінація УФ та хлору є ефективнішою, ніж лише УФ або хлорування [21]. Озонування для інактивації грибів у концентрації 60 мкмоль/мл було випробувано для різних періодів контакту. Виявлено, що обробка озоном була ефективною в інактивації грибів [17].

У різних дослідженнях повідомлялося, що діоксид хлору є ефективним дезінфікуючим засобом для інактивації бактерій, вірусів та найпростіших [22-24]. Однак, бракує повідомлень про інактивацію грибів діоксидом хлору [25]. Крім того, існуючі дослідження інактивації грибів за допомогою різних дезінфікуючих засобів в основному зосереджені на ефективності та кінетиці інактивації, тоді як інформація про механізм інактивації грибів повідомлялася рідко.

Загалом, цілями дослідження [26] було 1) дослідити ефективність та кінетику діоксиду хлору при інактивації трьох домінантних родів спор грибів, виділених з питних підземних вод; 2) дослідити вплив кількох робочих параметрів, таких як концентрація діоксиду хлору, pH, температура, гумінові кислоти та хімічні характеристики води; 3) визначити механізм інактивації грибкових спор під дією діоксиду хлору, шляхом моніторингу витоку внутрішньоклітинних речовин та спостереження за морфологічними змінами.

7.1 Поширеність видів грибів у джерелах питних підземних вод

Для визначення поширеності грибів у джерелах питних підземних вод було зібрано 226 зразків води з джерел питних підземних вод на північному заході Китаю. Після культивування та морфологічного аналізу було ідентифіковано вісімнадцять родів грибів. Різні види грибів та їхня чисельність у підземних водах представлені на рис. 7.1.

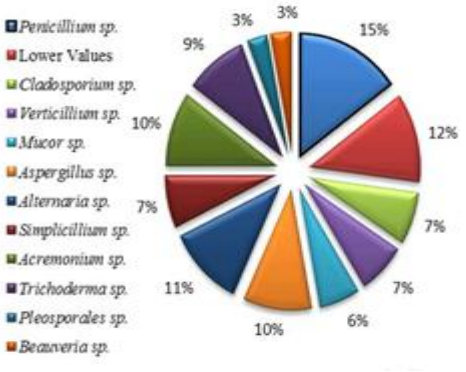

Рис. 7.1 Різні види грибів, знайдених в джерелах питних підземних вод (n=226).

Результати показали, що *Penicillium sp.* (15%), *Aspergillus sp.* (10%), *Alternaria sp.* (11%), *Trichoderma sp.* (9%) та *Acremonium sp.* (10%) були домінуючими видами грибів. Щоб з'ясувати ефективність інактивації видів грибів, для проведення експериментів з інактивації в цьому дослідженні було обрано два роди грибів *Penicillium sp.* і *Trichoderma sp.*) та рід грибів з більшим розміром спор (*Cladosporium sp*.). Дані види грибів також були виділені з джерел води та описані в інших дослідженнях [4, 10].

7.2 Кінетика інактивації спор грибів за допомогою діоксиду хлору

Ефективність інактивації трьох родів грибів діоксидом хлору в розчині PBS представлена на рис. 7.2. Ефективність інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* становила 100%, 99,6% та 70% відповідно для часу контакту 60 секунд.

Кінетичний аналіз показав, що модель Чіка-Ватсона краще відповідає результатам з коефіцієнтом кореляції (R^2)

0,99. Константи швидкості інактивації (k) *Penicillium sp., Trichoderma sp., Cladosporium sp.* та *E. coli* становили 1,182, 0,615, 0,398 та 2,125 л·мг·хв відповідно, що вказує на різну стійкість різних видів грибів до діоксиду хлору. Стійкість до діоксиду хлору була в такому порядку: *Cladosporium sp. > Trichoderma sp. > Penicillium sp.*

Різниця в константі швидкості інактивації спор грибів пов'язана з їхніми властивостями, включаючи гідрофобність та розмір спор. Повідомлялося, що *Cladosporium sp.* має найбільший розмір спор серед трьох родів [27], що запобігає проникненню діоксиду хлору в спори грибів. Тому, *Cladosporium sp.* є більш стійким, ніж *Penicillium sp.* та *Trichoderma sp.* Розмір спор *Penicillium sp.* та *Trichoderma sp.* подібний, але гідрофобність значно відрізняється. Гідрофобні білки спор можуть зменшити втрату води спорами та підвищити їх стійкість до діоксиду хлору [28]. Гідрофобність *Trichoderma sp.* вища, ніж у *Penicillium sp.*; тому діоксиду хлору важче дістатися до поверхні *Trichoderma sp.* та інактивувати спору [27].

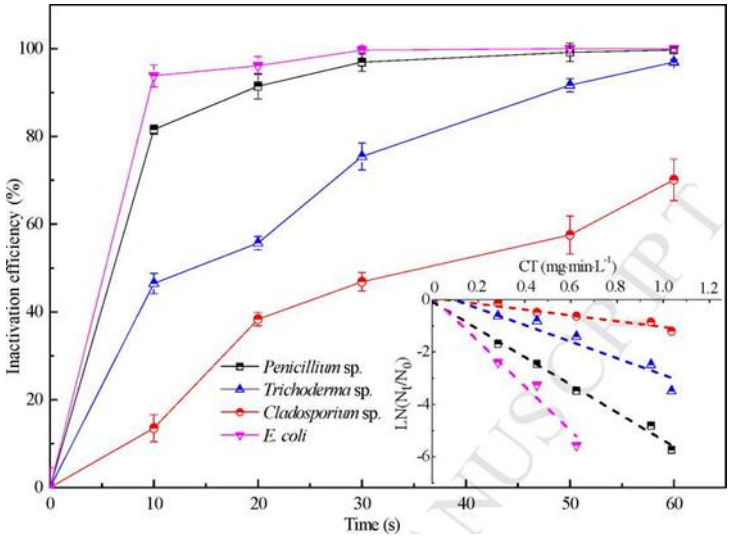

Рис. 7.2 Ефективність інактивації трьох спор грибів та *E. coli* діоксидом хлору. Вставка показує кінетику інактивації трьох спор грибів та *E. coli* діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація бактерій: 8±0,5 · 10^6 КУО/мл, початкова концентрація спор грибів: 5±0,5 · 10^6 КУО/мл.

Вищу стійкість грибів порівняно з бактеріями (*E. coli*) можна пояснити відмінностями в структурі клітин, складі клітинної стінки та розмірі клітин. По-перше, гриби мають складнішу структуру клітин, ніж бактерії [29]. Наприклад, гриби мають неушкоджене ядро клітини, загорнуте в ядерну мембрану, що ускладнює інактивацію клітини. По-друге, основним компонентом клітинної стінки бактерій є пептидоглікан, тоді як у грибів це хітин, який запобігає інактивації спор грибів [30, 31]. І останнє, але не менш важливе: розмір клітин двох видів мікроорганізмів досить різний, розмір *E. coli* зазвичай набагато менший, ніж у грибів [29].

7.3 Фактори, що впливають на ефективність інактивації

7.3.1 Вплив концентрації діоксиду хлору

Вплив концентрації дезінфікуючого засобу на ефективність інактивації досліджували шляхом проведення експериментів з інактивації при різних концентраціях діоксиду хлору (0,5, 1,0, 2,0 та 3,0 мг/л). Як показано на рис. 7.3, константи швидкості інактивації трьох родів спор грибів збільшуються зі збільшенням концентрації діоксиду хлору. Константа швидкості інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* збільшилася в 11,0, 9,0 та 4,6 раза відповідно зі збільшенням концентрації діоксиду хлору від 0,5 до 3,0 мг/л. Чим вища стійкість до діоксиду хлору, тим менше збільшення константи швидкості інактивації. Вплив концентрації діоксиду хлору на інактивацію *Penicillium* був більш значним, ніж вплив на інші роди.

7.3.2 Вплив pH та температури

Експерименти з інактивації проводилися за різних температур та рівнів pH, а результати представлені на рис. 7.4.

Як показано на рис. 7.4, ефективність інактивації була дещо нижчою при pH 7,0, ніж при pH 6,0 для всіх трьох родів грибкових спор.

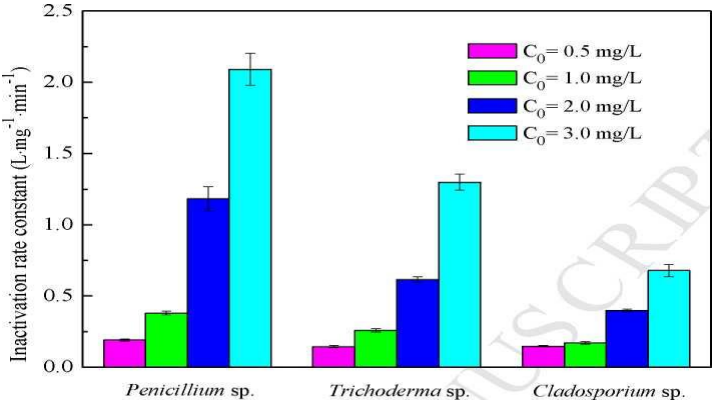

Рис. 7.3 Константи швидкості інактивації трьох грибкових спор у PBS з різною концентрацією діоксиду хлору. Умови реакції: ClO_2 = 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 мг/л, pH=7,0, T=27 °C, початкова концентрація грибкових спор: $5\pm0,5 \cdot 10^5$ КУО/мл.

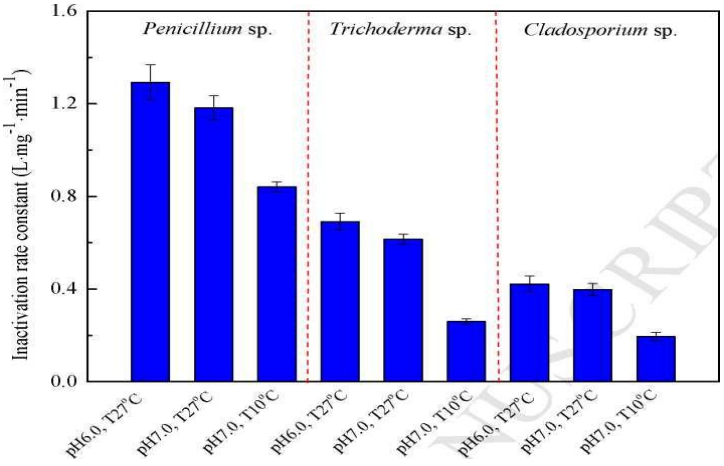

Рис. 7.4 Вплив pH (6,0 та 7,0) та температури (10 °C та 27 °C) на константи швидкості інактивації трьох різних спор грибів у PBS з діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 6,0, 7,0, T = 10, 27 °C, початкова концентрація спор грибів: $5\pm0,5 \cdot 10^5$ КУО/мл.

Константи швидкості інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* зменшилися на 8,6%, 11,0% та 5,7% зі збільшенням pH від 6,0 до 7,0. Ймовірною причиною є те, що окислювальна здатність ClO_2 залежить від кислотності розчину. Загалом, чим сильніша кислотність розчину, тим вища окислювальна здатність ClO_2 [31].

Результати показали, що температура є важливим фактором, що впливає на ефективність інактивації. Константи швидкості інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* збільшувалася в 1,4, 2,4 та 2,0 рази зі збільшенням температури від 10 до 27 °C. Константи швидкості інактивації, k, отримані за різних температур (5-30 °C), підігнані до виразу Арреніуса:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT$$

де A – коефіцієнт частоти зіткнень у л·мг·хв, E_a – енергія активації в Дж/моль, R – ідеальна газова стала, тобто 8,314 Дж/(моль·K), а T – абсолютна температура в K.

Параметри, отримані методом найменших квадратів підгонки до цього рівняння, становлять E_a =12,8 кДж/моль для *Penicillium sp*., E_a=19,8 кДж/моль для *Trichoderma sp*. та E_a=40,3 кДж/моль для *Cladosporium sp*. Ці результати вказують на те, що спори грибів, які є більш стійкими до діоксиду хлору, мають вищі значення E_a.

7.3.3 Вплив гумінової кислоти

Для розуміння впливу органічних речовин були проведені експерименти з інактивації при різних концентраціях гумінової кислоти (0, 0,5, 2,0 та 4,0 мг/л, типовий діапазон концентрацій, що відповідає ґрунтовим водам). Вплив гумінової кислоти на ефективність інактивації показано на рис. 7.5. Константа швидкості інактивації всіх трьох родів грибкових спор зменшувалася

зі збільшенням концентрації гумінової кислоти. Константа швидкості інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* зменшувалася в 3,3, 3,2 та 2,6 раза зі збільшенням концентрації гумінової кислоти від 0 до 4,0 мг/л. Результат можна пояснити наступним чином: гумінова кислота у воді може конкурентно споживати діоксид хлору, що робить менше дезінфікуючого засобу доступним для інактивації грибів.

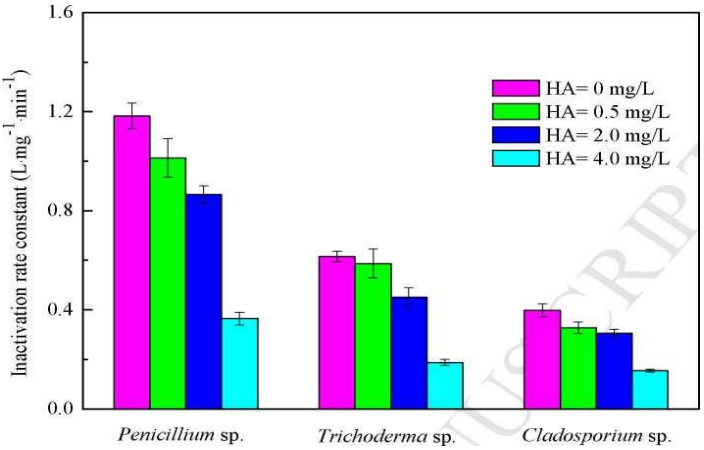

Рис. 7.5 Вплив концентрації гумінової кислоти (ГК) на константи швидкості інактивації трьох різних спор грибів діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація спор грибів: 5±0,5 · 10^5 КУО/мл, концентрація ГК: 0, 0,5, 2,0, 4,0 мг/л.

7.3.4 Вплив водних матриць

Експерименти з інактивації були проведені у реальних ґрунтових водах для дослідження впливу водних матриць. На рис. 7.6 показано порівняння константи швидкості інактивації, отриманої в розчині PBS, та у

реальних ґрунтових водах.

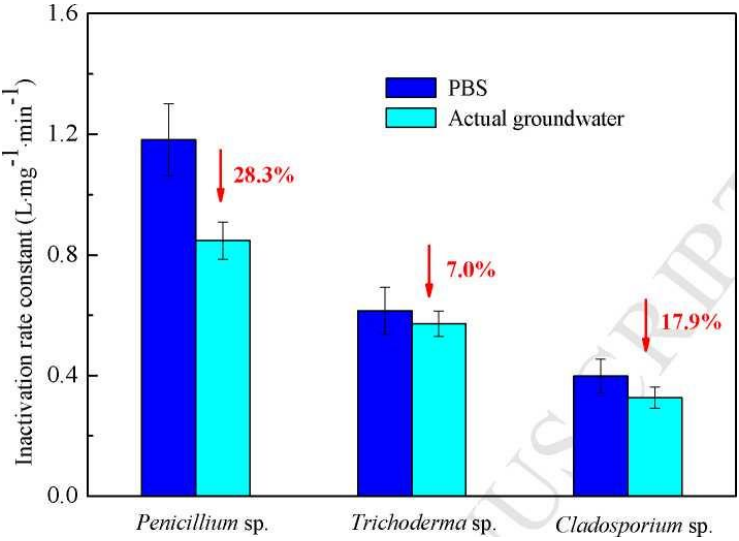

Рис. 7.6 Константи швидкості інактивації трьох грибкових спор у PBS та фактичних ґрунтових водах з діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація спор грибів: $5\pm0,5 \cdot 10^5$ КУО/мл

Результати показали, що у розчині PBS досягається вища ефективність інактивації. Константи швидкості інактивації *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosprium sp.* у реальних ґрунтових водах зменшилися на 28,3%, 7,0% та 17,9% порівняно з PBS. Це явище можна пояснити конкурентною реакцією компонентів води з діоксидом хлору, що захищає гриби від інактивації. Результати, отримані в цьому дослідженні, узгоджуються з висновками іншого дослідження [15], яке показало, що у воді лабораторного класу досягається вища константа швидкості інактивації хлору порівняно з відстояною

природною водою.

7.3.5 Механізми інактивації спор грибів за допомогою діоксиду хлору

7.3.5.1 Витік азотистих органічних сполук

Азотисті органічні сполуки (TN) у спорах грибів (білки та нуклеїнові кислоти) витікають, коли клітинна стінка руйнується [27, 29, 32]. На рис. 7.7 показано внутрішньоклітинні та позаклітинні зміни TN у спорах грибів до та після інактивації діоксидом хлору. Результати показали, що після інактивації діоксидом хлору внутрішньоклітинні рівні TN знизилися, тоді як позаклітинні рівні TN значно зросли. Іншими словами, рівні TN залишалися стабільними, але внутрішньоклітинний TN вивільнявся та перетворювався на позаклітинний TN. Найбільш значне збільшення позаклітинної концентрації TN спостерігалося у *Cladosporium sp.*, друге місце посідав *Penicillium sp*., а останнім був *Trichoderma sp.*

Ці результати пояснюються різницею в об'ємі спор грибів. Встановлено, що позаклітинні рівні ДНК та білка всіх трьох видів спор грибів збільшилися після інактивації діоксидом хлору. Наприклад, позаклітинна ДНК *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* збільшилася на 22,2%, 8,93% та 24,1% відповідно. Результати показали, що діоксид хлору руйнує клітинну стінку спор грибів та викликає вивільнення внутрішньоклітинних азотистих органічних сполук, що призводить до інактивації спор грибів.

7.3.5.2 Зміни загального та позаклітинного АТФ

АТФ є ключовим носієм енергії, який може служити показником життєздатності, а рівень АТФ також може відображати концентрацію грибів [24] (рис. 7.8).

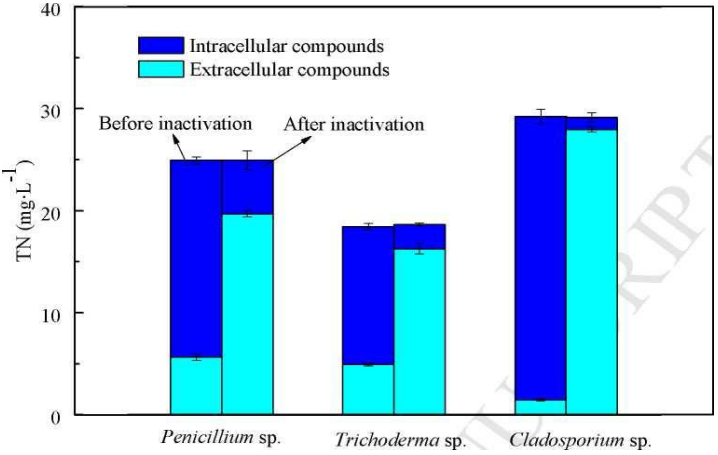

Рис. 7.7 Внутрішньоклітинна та позаклітинна зміна загального азоту спор грибів до та після інактивації діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація спор грибів: $5\pm0,5 \cdot 10^5$ КУО/мл, час реакції: 3 хв.

Як показано на рис. 7.8, загальна концентрація АТФ показала незначну різницю або взагалі не мала її після інактивації.

Натомість, позаклітинний АТФ значно збільшився після інактивації діоксидом хлору. Збільшення позаклітинної концентрації АТФ *Cladosporium sp.* було найбільш значним. Збільшення позаклітинного рівня АТФ *Penicillium sp., Trichoderma sp.* та Cladosporium sp. становило 0,20, 0,27 та 1,09 нмоль відповідно. Результати підтверджують, що клітинна стінка грибка руйнується після інактивації, внаслідок чого вивільняється АТФ.

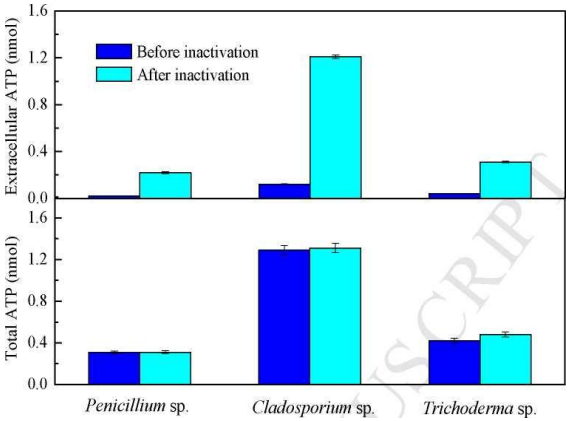

Рис. 7.8 Зміна позаклітинного та загального рівня АТФ у спорах грибів до та після інактивації діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація спор грибів: 5±0,5 · 10^5 КУО/мл, час реакції: 3 хв.

7.3.5.3 Спостереження морфології за допомогою SEM

Рис. 7.9 показує SEM-фотографії спор грибка до та після інактивації діоксидом хлору. Як показано на рис. 7.9, поверхня спор грибка була гладкою до інактивації. Спори *Penicillium sp.* та *Trichoderma sp.* мають сферичну, тоді як спори *Cladosporium sp.* еліпсоїдну форму. Спори всіх трьох родів були певною мірою зруйновані після інактивації, а поверхня всіх спор стала шорсткою та складчастою, і навколо спор можна було виявити кілька сполук. Результати безпосередньо підтвердили, що клітинна мембрана та клітинна стінка руйнуються діоксидом хлору. Це призводить до вивільнення внутрішньоклітинних

сполук, що призводить до інактивації спор грибка. Крім того, *Penicillium sp.* зазнав серйознішої шкоди своїй клітинній структурі і більшість спор *Penicillium sp.* зменшилися. Для порівняння, деякі спори *Trichoderma sp.* та *Cladosporium sp.* виглядали цілими після інактивації. Це підтверджує, що два роди грибкових спор є більш стійкими до інактивації діоксидом хлору порівняно з *Penicillium sp.*

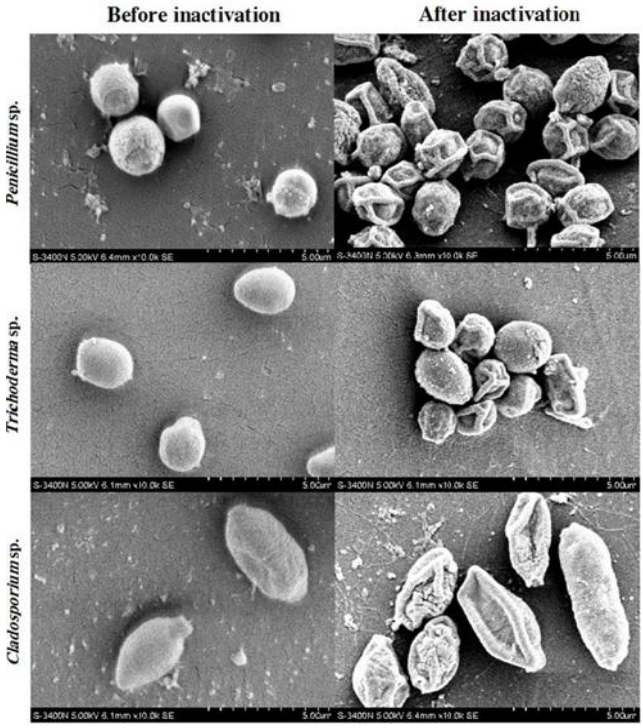

Рис. 7.9 Фотографії спор грибів, отримані за допомогою скануючої електронної мікроскопії (10000 разів), до та після інактивації діоксидом хлору. Умови реакції: ClO_2 = 2,0 мг/л, pH = 7,0, T = 27 °C, початкова концентрація спор грибів: $5\pm0,5 \cdot 10^5$ КУО/мл, час реакції:

3 хв.

7.3.5.4 Короткий опис механізму інактивації

Механізм інактивації грибкових спор діоксидом хлору в цьому дослідженні [26] вивчався шляхом вимірювання витоку внутрішньоклітинних речовин і був підтверджений за допомогою SEM. Результати показують, що завдяки своїй сильній окислювальній здатності діоксид хлору може руйнувати клітинну стінку та змінювати проникний тиск, що призводить до витоку внутрішньоклітинних сполук та зміни форми грибкових спор. Механізм інактивації грибкових спор діоксидом хлору подібний до механізму інактивації бактерій, вірусів та найпростіших. Наприклад, деякі дослідники [33] повідомили, що діоксид хлору пошкоджує плазматичну мембрану *Candida albicans* головним чином шляхом пермеабілізації (процес збільшення проникності клітинної мембрани для певних речовин, що зазвичай не можуть легко проходити через неї). Інша група [34] виявила, що діоксид хлору може викликати у спорах витік білків, ДНК, полісахаридів, іонів калію та кальцію.

7.4 Порівняння ефективності інактивації спор грибів хлором та діоксидом хлору

Хлор є найпопулярнішим дезінфікуючим засобом, який застосовується в усьому світі. Було виявлено, що діоксид хлору ефективніший в інактивації бактерій, ніж хлор [35]. Тим не менш, порівняння інактивації грибів хлором та діоксидом хлору досі не опубліковане. Встановлено [26], що константа швидкості інактивації діоксиду хлору значно вища, ніж у хлору, що вказує на те, що діоксид хлору ефективніший в інактивації грибів, ніж

хлор, для трьох родів спор грибів, що використовувалися в дослідженні. Опубліковане дослідження інактивації спор грибів хлором [15] показало, що значення Ct, необхідне для досягнення 80% інактивації в реальних поверхневих водах, становить 60 мг/л·хв. У попередньому дослідженні [36] також було перевірено ефективність інактивації грибів хлором і отримано аналогічний результат: значення Ct, необхідне для досягнення 99% інактивації у фактичних ґрунтових водах, становило 70,4 мг/л·хв. Для порівняння, значення Ct, необхідне для досягнення такої ж ефективності інактивації діоксидом хлору, становить 1,845 мг/л·хв, що значно нижче, ніж у хлору. Ці результати чітко показують, що діоксид хлору ефективніший в інактивації грибів, ніж хлор.

Причини, чому діоксид хлору ефективніший за хлор, можуть бути наступними: по-перше, діоксид хлору має вищий окисно-відновний потенціал (1,51 В), ніж хлор (1,36 В). Вищий окислювальний потенціал призведе до швидшої реакції з внутрішньоклітинними матеріалами, такими як білки та нуклеїнові кислоти. По-друге, діоксид хлору може легко дифундувати через клітинну стінку та клітинну мембрану, оскільки він існує у воді як нейтральна молекула [32]. Навпаки, хлор реагує з утворенням вільних форм хлору гіпохлорнуватистої кислоти (HOCl) та іона гіпохлориту (OCl^-), коли розчиняється у воді [37], і на ці реакції легко впливає pH. Можна зробити висновок, що вищий потенціал окислення та проникність клітинних мембран діоксидом хлору призводять до ефективнішої інактивації спор грибів порівняно з хлором.

Діоксид хлору є ефективним дезінфікуючим засобом у набагато ширшому діапазоні pH, ніж хлор [38]. Використання діоксиду хлору може зменшити утворення хлорованих побічних продуктів дезінфекції [39]. Тим не менш, діоксид хлору нестабільний при високих

концентраціях, тому його необхідно генерувати на місці [40].

Висновки.

Діоксид хлору є ефективним дезінфікуючим засобом проти спор грибів і є більш ефективним в інактивації грибів, ніж хлор. Значення Ct, яке досягло 99% ефективності інактивації у ґрунтових водах, становило 1,845 мг/л·хв.

Інактивація грибів діоксидом хлору досить добре відповідає моделі Чіка-Ватсона. Різні види грибів демонструють різну стійкість до діоксиду хлору. Стійкість до діоксиду хлору знаходиться в такому порядку: *Cladosporium sp.>Trichoderma sp.> Penicillium sp*., що значно вище, ніж у бактерій.

Результати показують, що в тестованих діапазонах вплив концентрації діоксиду хлору та температури є позитивним, тоді як вплив гумінових кислот та водних матриць є негативним щодо інактивації грибів.

Після інактивації діоксидом хлору спостерігається витік внутрішньоклітинних речовин, збільшення вмісту АТФ, ДНК та білків, а також зміни морфології спор. Діоксид хлору має сильну окислювальну здатність та руйнує клітинну стінку та мембрану спор грибів, що призводить до їх інактивації.

Література

1. Gottlich, E., van der Lubbe, W., Lange, B., Fiedler, S., Melchert, I., Reifenrath, M., Flemming, H. C., & de Hoog, S. (2002). Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 205*(4), 269–279. https://doi.org/10.1078/1438-4639-00158

2. Hageskal, G., Knutsen, A. K., Gaustad, P., de Hoog, G. S., & Skaar, I. (2006). Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Applied and Environmental Microbiology, 72*(12), 7586–7593. https://doi.org/10.1128/AEM.01628-06.
3. Hinzelin, F., & Block, J. C. (2008). Yeasts and filamentous fungi in drinking water. *Environmental Science and Technology, 6*(1–11), 101–106. https://doi.org/10.1080/09593338509384324
4. Pereira, V. J., Basilio, M. C., Fernandes, D., Domingues, M., Paiva, J. M., Benoliel, M. J., Crespo, M. T., & Romão, M. V. S. (2009). Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Water Research, 43*(15), 3813–3819. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.024
5. Oliveira, B. R., Barreto Crespo, M. T., San Romão, M. V., Benoliel, M. J., Samson, R. A., & Pereira, V. J. (2013). New insights concerning the occurrence of fungi in water sources and their potential pathogenicity. *Water Research, 47*(16), 6338–6347. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.050
6. Gonçalves, A. B., Paterson, R. R., & Lima, N. (2006). Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 209*(3), 257–264. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.12.001
7. Pereira, V. J., Fernandes, D., Carvalho, G., Benoliel, M. J., Romão, M. V. S., & Crespo, M. T. B. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research, 44*(17), 4850–4859. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.060

8. Oliveira, H. M., Santos, C., Paterson, R. R., Gusmão, N. B., & Lima, N. (2016). Fungi from a groundwater-fed drinking water supply system in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 13*(3), 304. https://doi.org/10.3390/ijerph13030304
9. Sammon, N. B., Harrower, K. M., Fabbro, L. D., & Reed, R. H. (2010). Incidence and distribution of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 7*(4), 1597–1611. https://doi.org/10.3390/ijerph7041597
10. Hageskal, G., Lima, N., & Skaar, I. (2009). The study of fungi in drinking water. *Mycological Research, 113*(2), 165–172. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.11.002
11. Cabral, D., & Pinto, V. E. F. (2002). Fungal spoilage of bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology, 72*(1–2), 73–76. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00689-0
12. Curtis, L., Lieberman, A., Stark, M., Rea, W., & Vetter, M. (2004). Adverse health effects of indoor molds. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 118*(3), 767–768. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.06.046
13. Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2005). Fungal contamination of drinking water. In *Water encyclopedia*. https://doi.org/10.1002/047147844X.wq1516
14. Siqueira, V. M. (2011). *Characterising filamentous fungal biofilm in drinking water distribution systems using microscopic and molecular techniques* (Doctoral dissertation, Universidade do Minho, Portugal).
15. Pereira, V. J., Marques, R., Marques, M., Benoliel, M. J., & Barreto Crespo, M. T. (2013). Free chlorine

inactivation of fungi in drinking water sources. *Water Research, 47*(2), 517–523. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.034

16. Nourmoradi, H., Nikaeen, M., Stensvold, C. R., & Mirhendi, H. (2012). Ultraviolet irradiation: An effective inactivation method of *Aspergillus* spp. in water for the control of waterborne nosocomial aspergillosis. *Water Research, 46*(18), 5935–5940. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.034
17. Savi, G. D., & Scussel, V. M. (2014). Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium, Aspergillus,* and *Penicillium* genera. *Ozone: Science & Engineering, 36*(2), 144–152. https://doi.org/10.1080/01919512.2013.833851
18. Sisti, M., Brandi, G., De Santi, M., Rinaldi, L., & Schiavano, G. F. (2012). Disinfection efficacy of chlorine and peracetic acid alone or in combination against *Aspergillus* spp. and *Candida albicans* in drinking water. *Journal of Water and Health, 10*(1), 11–19. https://doi.org/10.2166/wh.2011.127
19. Al-Gabr, H. M., Zheng, T., & Yu, X. (2014). Efficacy of two chemical coagulants and three different filtration media on removal of *Aspergillus flavus* from surface water. *Journal of Environmental Sciences, 26*(2), 274–280. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60418-5
20. Kanzler, D., Buzina, W., Paulitsch, A., Haas, D., Platzer, S., Marth, E., & Mascher, F. (2008). Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses, 51*(2), 165–169. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01456.x
21. Al-Gabr, H. M., Zheng, T., & Yu, X. (2013). Inactivation of *Aspergillus flavus* in drinking water

after treatment with UV irradiation followed by chlorination. *Science of the Total Environment, 463–464*, 525–529. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.079

22. Vicuna-Reyes, J. P., Luh, J., & Marinas, B. J. (2008). Inactivation of *Mycobacterium avium* with chlorine dioxide. *Water Research, 42*(6–7), 1531–1538. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.033
23. Lim, M. Y., Kim, J. M., & Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Research, 44*(10), 3243–3251. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.003
24. Chauret, C. P., Zhou, R., Lepuil, M., Creason, R., & Andrews, R. C. (2001). Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(7), 2993–3001. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2993-3001.2001
25. Ma, J. W., Huang, B. S., Hsu, C. W., Peng, C. W., Cheng, M. L., Kao, J. Y., Way, T. D., Yin, H. C., & Wang, S. S. (2017). Efficacy and safety evaluation of a chlorine dioxide solution. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 14*(3), 329. https://doi.org/10.3390/ijerph14030329
26. Wen, G., Xu, X., Huang, T., Zhu, H., & Ma, J. (2017). Inactivation of three genera of dominant fungal spores in groundwater using chlorine dioxide: Effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Water Research, 125*, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.019
27. Wen, G., Zhu, H., Huang, T. L., Zhao, J. C., Ren, W., & Xu, X. Q. (2016). Inactivation efficiency and

mechanism of three dominant fungal spores in drinking groundwater by chlorine. *Environmental Science, 37*(11), 4228–4234. (In Chinese)

28. Hazen, K. C., & Glee, P. M. (1994). Hydrophobic cell wall protein glycosylation by the pathogenic fungus *Candida albicans. Canadian Journal of Microbiology, 40*(4), 266–272.
29. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Prentice Hall.
30. Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays, 28*(8), 799–808. https://doi.org/10.1002/bies.20441
31. Huang, J. (2000). *Analytical technology for chlorine dioxide.* China Environmental Science Press. (In Chinese)
32. Dalrymple, O. K., Stefanakos, E., Trotz, M. A., & Goswami, D. Y. (2010). A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental, 98*(1), 27–38. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.01.023
33. Wei, M. K., Wu, Q. P., Huang, Q., Wu, J. L., & Zhang, J. M. (2008). Plasma membrane damage to *Candida albicans* caused by chlorine dioxide (ClO_2). *Letters in Applied Microbiology, 47*(2), 67–73. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02314.x
34. Wang, Z., Liao, F., Lin, J., Li, W., Zhong, Y., Tan, P., & Huang, Z. (2010). Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombycis. Journal of Invertebrate Pathology, 104*(2), 134–139. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.007

35. Huang, J., Ren, N., Wang, L., Ma, F., & Juli. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research, 31*(3), 607–613. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8
36. Zhao, J. C., Huang, T. L., Ren, W., Wen, G., & Liu, L. (2017). Study on fungi inactivation by chlorine in drinking groundwater. *China Water & Wastewater, 33*(3), 54–57. (In Chinese)
37. Scarlett, K., Collins, D., Tesoriero, L., Jewell, L., van Ogtrop, F., & Daniel, R. (2016). Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. *European Journal of Plant Pathology, 145*(1), 27–38. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0836-7
38. Gagnon, G. A., Rand, J. L., O'Leary, K. C., Rygel, A. C., Chauret, C., & Andrews, R. C. (2005). Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Research, 39*(9), 1809–1817. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.030
39. Gray, N. F. (2014). *Microbiology of waterborne diseases.* Elsevier.
40. American Water Works Association (AWWA). (2011). *Water quality & treatment: A handbook on drinking water* (6th ed.). McGraw-Hill.

РОЗДІЛ 8
ДІОКСИД ХЛОРУ
ЯК ЗАСІБ ВИДАЛЕННЯ БІОПЛІВОК

Як відомо, головною причиною незадовільного санітарно-технічного стану водорозвідних мереж є утворення біоплівок на поверхні водопровідних труб. Їхня присутність може призвести до збільшення корозії та гідравлічного опору. Біоплівки є також причиною погіршення смаку та запаху і можуть впливати на інші, пов'язані з поверхнею процеси (наприклад, іонний обмін, мембранний діаліз та тепловий обмін) [1].

Результати експериментальних робіт [2, 3] свідчать, що прикріплення бактерій до поверхонь забезпечує найбільше збільшення резистентності до дезінфекції. Прикріплення неінкапсульованих *K. pneumoniae*, вирощених у середовищі з високими рівнями поживних речовин, викликало ріст цих мікроорганізмів, ідентичний 150-кратному збільшенню резистентності до дезінфекції. Інші механізми, що пояснюють цей процес, включали вік біоплівки, бактеріальне інкапсулювання та попередні умови росту, наприклад, середовище та температура. Ці фактори збільшили резистентність до хлору від 2 до 10 разів. Залежно від хімічної природи дезінфекційного засобу констатовано різний тип механізму резистентності. Так, при дезінфекції вільним хлором мали значення характер поверхні, вік біоплівки, інкапсулювання та середовище зростання, тоді як при дезінфекції монохлораміном єдиним був фактор поверхні. Важливість отриманих результатів полягає у констатації

мультиплікативності механізмів резистентності (тобто, резистентність, викликана одним може бути помножена на резистентність, зумовлену другим механізмом).

Порівняльній оцінці бактеріальної флори в двох різних за довжиною і структурою мереж водопостачання (м. Мец /1/ і південний сектор м. Парижа /2/) присвячена робота [4]. У 1-му випадку вивчали просторові особливості поширення бактерій (3-разовий протягом доби відбір проб у 100 точках мережі протягом 6 міс.). У 2-му випадку оцінювали тимчасові варіації при розмноженні мікроорганізмів (тижневий відбір проб у 6 точках мереж протягом 2 років). Отримані результати дозволили запропонувати гіпотезу про принципи поширення бактеріальної флори в мережах водопостачання у просторі та часі.

Вивчення особливостей утворення біоплівок на різних поверхнях показало наступне [5].

Поверхні нержавіючої сталі та стабілізованого полівінілхлориду (ПВХ) знаходились у потоці муніципальної питної води (10 см/сек) протягом 167 днів. Відзначено експоненційний ріст бактерій з подвоєнням їх числа кожні 11 днів між першим та 122 днями з деяким спадом між 123-м та 167-м днями. Автор припускає, що після 122 днів у біоплівці розмножуються мікроводорості та найпростіші, що надають інгібуючу дію на ріст бактерій.

В іншій роботі цього автора [6] наведено результати досліджень щодо розвитку біообростань на стінках поліетиленових та полівінілхлоридних труб при контакті з водопровідною водою. Після 33 діб експозиції при швидкості потоку 10 см/сек кількість біообростань у поліетиленовій трубі перевищувала в 100 разів (10^6 КУО/см^2), а в полівінілхлоридній - у 10 разів (10^5 КУО/см^2) у порівнянні із відповідною кількістю біообростань у мідній та скляній трубах.

Показано, що поверхня залізної труби, на відміну від полівінілхлориду, у присутності хлору впливає на склад, ріст і резистентність бактерій біоплівки [7].

Як свідчить низка досліджень, склад бактерій біоплівок надзвичайно різноманітний. Крім нітрифікуючих, сульфатредукуючих бактерій, сіркуредукуючих *E. coli*, залізобактерій [6] ідентифіковані бактерії родів *Nitrospira*, *Planctomyces, Acidobacterium* та *Pseudomonas* [8], нетуберкульозні мікобактерії [9], плісняві та дріжджові гриби [10].

На думку авторів публікації [11], контроль води в системах водопостачання повинен включати визначення мікроорганізмів, які мають найбільшу резистентність до дезінфекції (*P. fluorescens, C. perfringens*) і можуть бути використані як індикатори біообростань мереж.

У роботі [12] представлені результати ідентифікації дев'ятнадцяти видів домінуючих гетеротрофних бактерій у прісноводній біоплівці шляхом встановлення послідовності гена 16S ДНК та його впливу на коагрегацію. Філогенетична оцінка показала, що як віддалені, так і близькі коагрегації характерні всередині генерацій, між генераціями і всередині видів. Наприклад, *Blastomonas natatoria* 2,1 може коагрегувати з іншими 18 мікроорганізмами і функціонувати як передавальна ланка при розвитку біоплівки.

Вивчено динаміку розвитку повної структурної морфології та складу біоплівок у віці від 1 дня до 3 років, сформованих у моделі системи водорозподілу [8]. Візуалізація та подальша кількісна оцінка показали, що біоплівка розвивалася від початкового прикріплення клітин через утворення незалежних мікроколоній товщиною близько 30 мм до заключної, більш вільної структури із середньою товщиною 14,1 мм, що покривала 76 % поверхні. Аналіз показав, що із старінням біоплівки

поступово наростало популяційне розмаїття мікроорганізмів.

Відділення мікроорганізмів від біоплівок, що має важливе значення у контамінації систем водопостачання, найменш вивчено. Використання цифрової мікроскопії дозволило чітко уявити локалізований приріст і відділення клітин у сформованих змішаних різновидах біоплівок. Відділення ранжується від одиночних клітин до агрегатів діаметром приблизно 500 мм. Отримані результати становлять певне значення щодо інфекційної дози водних біологічних контамінантів та оцінки їх ризику здоров'ю споживачів [13].

Використання комбінації експериментальних та теоретичних підходів у дослідженні ролі відсутності поживних речовин як причини відокремлення біоплівки на чистих культурах *P. aeruginosa* дозволило висловити гіпотезу, що саме «голодування», а не акумуляція метаболічних продуктів є причиною цього процесу [17]. Це, з погляду авторів, є своєрідним екологічним поштовхом до звільнення мікроорганізмів з біоплівки.

Результати дослідження систем водопостачання показали, що погіршення якості питної води викликано діяльністю мікроорганізмів [15]. У ньому констатовано такі чинники.

Утворення на стінках труб.

Ріст бактерій на стінках труб систем водорозподілу призводить до збільшення вмісту у воді гідроксидів заліза, що сприяють утворенню відкладень оксидів алюмінію, кремнезему, вуглекислого кальцію та інших неорганічних речовин. У цих відкладеннях мікроорганізми можуть розвиватися, харчуючись адсорбованими органічними речовинами. Відкладення перешкоджають видаленню продуктів окислення, змінюють гідравлічний режим

потоку води, впливають на процеси розчинення кисню і баланс іонів заліза.

Нітрифікація та зниження вмісту розчиненого кисню.

За наявності в сирій або очищеній воді іонів амонію, розвиваються колонії нітрифікуючих бактерій, які зумовлюють дефіцит кисню і надлишок вуглекислого газу у воді.

Кальцинування.

Випадає і накопичується осад $CaCO_3$, утворюючи неоднорідну кристалічну структуру, що відшаровується.

Локальне зниження pH.

Наслідком цього є посилення корозії.

Редистрибуція (перерозподілення) кисневого потенціалу.

Кисень концентрується у вільних від відкладень зонах, що призводить до появи мікроелектричних струмів, що сприяють корозії.

Сульфатредукція.

У воді, насиченій вуглекислим газом, розмножуються сульфатредукуючі мікроорганізми, внаслідок чого сульфати відновлюються до сірководню. Сульфат - перетворюючі реакції, що відбуваються на поверхні труби після відшарування відкладень, подвоюють кількість іонів заліза (на 1 мг/л сульфатів – 2 мг/л іонів заліза), що призводить до утворення нових залізистих відкладень і, як наслідок, посилення корозії.

Зміни смаку та запаху води.

Можуть бути результатом накопичення у системах водорозподілу таких металів, як залізо, мідь та свинець, а також пояснюватись наявністю у воді кінцевих продуктів життєдіяльності бактерій.

Хімізм цих процесів полягає у перебігу наступних хімічних реакцій:

Корозія залізної труби під дію гіпохлорит – іона чи кисню, розчиненого у воді

$Fe + ClO^- + H_2O = Fe^{+2} + 2\ OH^- + Cl^-$ (1)

Окислення катіону двовалентного заліза до катіону тривалентного заліза

$4\ Fe^{+2} + O_2 + 2H_2O = 4Fe^{+3} + 4\ OH^-$ (2)

Гідроліз катіону тривалентного заліза та утворення бурого осаду гідроксиду заліза

$Fe^{+3} + 3H_2O = Fe(OH)_3\downarrow + 3\ H^+$ (3)

Відновлення сульфат-аніону до сульфід-аніону під дією сульфатредукуючих бактерій

$SO_4^{-2} + 4H_2O + 8e^- = S^{-2} + 8OH^-$ (4)

Утворення чорного осаду сульфіду заліза

$Fe^{+3} + S^{-2} = Fe_2S_3\downarrow$ (5)

Утворення осаду карбонату кальцію внаслідок насичення води вуглекислим газом – продуктом окислення органічних речовин бактеріями.

$Ca^{+2} + H_2O + CO_2 = CaCO_3\downarrow + 2\ H^+$ (6)

Вивчення корозійної активності водопровідної води при контакті з ділянками металу, покритими шаром оксидів, показало, що в результаті протікання електрохімічних процесів відбувається відновлення оксидів заліза і перехід заліза у форму розчинного двовалентного іона. Відзначено стабілізуючий вплив діоксиду хлору на цей процес [16].

Розроблено математичну модель формування біоплівки з урахуванням одночасного транспорту субстратів, дезінфектантів та мікроорганізмів [17]. Модель складається з ряду рівнянь балансу органічних речовин, амонійного азоту, оксидів азоту, розчиненого кисню, лужності, біомаси та дезінфектанту у воді та в межах біоплівки за умов ламінарного та турбулентного потоку. Встановлено, що реологічні властивості та поглинання

дезінфектанта у стінці труби відіграють значний вплив на якість питної води у розподільчій системі.

Встановлено, що сульфатредукуючі бактерії (SRB) відіграють значну роль у корозії, прискорюючи електрохімічні процеси [18]. У цьому дослідженні проведено тести поляризації та подвійного осередку для кращого фундаментального розуміння корозії під впливом SRB. Тест поляризації показав, що вплив SRB на анодну або катодну деполяризацію при корозії був незначним за наявності 1,5 мМ $CaCO_3$. Миттєві швидкості корозії сталевих зразків, занурених у SRB-іннокульований розчин, були в 1,5-2,5 рази більшими, ніж у стерильному розчині. Криві поляризації, отримані в SRB - іннокульованому розчині з 0,5 мМ сульфату, показали наявність і анодної, і катодної деполяризації на сталевих зразках. Однак, при концентрації сульфату 0,1 мМ відбувалася лише катодна деполяризація через низьке виробництво сірководню.

У роботі [19] вивчено бактеріальний ріст у розподільчих системах питної води в експериментальному реакторі, розробленому для моделювання реологічних властивостей водопровідної магістралі. Вимірювали числа клітин, що ростуть на стінках труби (клітини біоплівки) та клітин, суспендованих у водній фазі (планктонні клітини) для визначення відносного вкладу біоплівки в накопичення бактеріальної популяції в мережі водорозподілу. Експерименти були виконані на заводі очищення води з водою без хлору та хлорованою. Результати показують, що ріст біоплівки та подальше відщеплення бактерій є основним джерелом планктонних клітин у водорозвідній системі, що містить вільний хлор. Хлор впливає на накопичення та просторовий розподіл біоплівки.

Дослідження формування біоплівок у чавунних трубах розподілу питної води показали залежність від експозиції, сезону, температури води та швидкості її

перебігу [20]. Певні відмінності між сезонами були обумовлені температурою води, кількістю гетеротрофних бактерій та залишковою концентрацією дезінфектанту. Найвищі рівні формування біоплівки спостерігалися за температури води 15-25 °С.

Повідомлялося [21] про результати дослідження мікробного післяросту після обробки води з гуміновими кислотами хлоруванням, УФО та озонуванням у дослідній установці протягом 20 місяців. Післяріст визначали як біоплівку в трубах із поліетилену довжиною 2,6 м. Біоплівки не виявлені у хлорованій воді з залишковим вільним хлором у концентрації 0,4-0,5 мг/л. Найбільше формування біоплівки було знайдено в озонованій воді, що можна порівняти з контролем. УФО - оброблена вода показала значно менше утворення біоплівки, що може бути пов'язано зі зменшенням біологічного споживання кисню (БСК) у порівнянні з контролем. Вища БСК в озонованій воді свідчить про збільшення вмісту органіки, що легко деградується, яка була ідентифікована хроматографічно. Електронна мікроскопія біоплівки показала вищий вміст і спектр різновидів бактерій в озонованій воді, ніж у контролі, що вказує на нижчу мікробну активність в останньому. Рівень формування біоплівки був тісно пов'язаний із сезонними коливаннями температури води. Бактерицидний ефект УФО – опроміненої води знижувався наприкінці експерименту. Показано, що зазначені концентрації залишкового вільного хлору у хлорованій воді достатні для запобігання формуванню біоплівки протягом усього періоду експерименту.

Акумуляція та загибель модельних мікробних «патогенів» були досліджені у природно вирощених біоплівках, сформованих у нових пілотних системах водорозподілу хлорованої та УФО-обробленої води [22]. Протягом 38-денного моніторингу контролювали ріст та

інактивацію гідрофільних та гідрофобних мікросфер (діаметром 1 ммк), бактеріофагів *Salmonella* 28B та бактерій *L. pneumophila*. Показано, що обидва дезінфекційні режими (хлорування та УФ - обробка) не мають істотного впливу на акумуляцію та інактивацію вивчених мікробних моделей.

Згідно з даними літератури, діоксид хлору є високоефективним засобом руйнування, видалення та запобігання утворенню біоплівок, що забезпечує оптимальний контроль мікробіологічних параметрів у комунальних та промислових системах водопостачання та охолодження, особливо там, де є великий вміст органічних речовин та аміаку.

Повідомляється [23], що обробка діоксидом хлору теплообмінників є ефективною, а стоки не мають токсичності по відношенню до гідробіонтів.

Діоксид хлору використовується для усунення слизу у промивній воді консервних заводів [24]. Ця обробка усуває всі запахи, спричинені хлоруванням, та відрізняється економією води у зв'язку з оборотними циклами.

У роботі [25] обговорено результати застосування діоксиду хлору для боротьби з біоплівками для підприємства; описані методи контролю. Представлено дані про уповільнення бактеріального росту в системах, оброблених діоксидом хлору, а також інформацію про інші випадки позитивного ефекту від застосування цього універсального окислювача.

Встановлено, що діоксид хлору є ефективним бактерицидним реагентом у боротьбі проти біовідкладень у водоводах під час виробництва паперу [36]. Зазначено, що ефективне практичне застосування діоксиду хлору вимагає попереднього визначення ряду параметрів: природи мікроорганізмів, допустимого порога

забрудненості води, типу та витрати води, ступеня її рециркуляції, спорідненості з технологічними добавками, необхідного ступеня обробки, кількості та місця розташування точок введення діоксиду хлору в систему. Ці параметри визначаються експериментально у кожному конкретному випадку, що дозволяє виробити режим застосування діоксиду хлору. Експлуатаційний досвід показує, що витрати діоксиду хлору можуть становити 70 - 100 г на 1 т паперу, при цьому експлуатаційні витрати, порівняно з іншими реагентами, знижуються в 5-8 разів. Витрати використання діоксиду хлору окупаються за 1-2 роки.

Оцінка порівняльної ефективності застосування хлору (Cl_2) та діоксиду хлору (ClO_2) для боротьби з біообростаннями в теплообмінниках представлена у роботі [27]. Вивчали 8 режимів експлуатації: I – безперервна обробка Cl_2 (доза Cl_2 0,15 мг/л); II-періодична подача Cl_2 протягом 1 год/добу (доза Cl_2 1 мг/л); III-періодична подача Cl_2 4 рази на добу протягом 15 хв (доза Cl_2 1 мг/л); IV-періодична обробка Cl_2 за режимом II у комбінації з диспергувальним агентом Naisperse (доза 2-4 мг/л), введення якого здійснювалося протягом 15 хв. через 15-20 хв після хлорування; V-обробка ClO_2 за режимом I; VI-подача ClO_2 за режимом II; VII-подача ClO_2 за режимом III; VIII контрольний - без обробки. Встановлено, що зразки металу, оброблені біоцидами, обростали значно менше контрольного. Зниження ефективності використання Cl_2 відзначалося під час переходу від режиму I→II→III. Застосування ClO_2 у комплексі з диспергувальним агентом не дало будь-яких значних змін у кількісному складі біообростань, хоча й спостерігалися деякі якісні відмінності. При роботі установки в режимах V-VII отримані порівняні результати.

У дослідженні [28] представлено порівняльну оцінку ефективності хлорит – іону (хлориту) (ClO_2^-) та діоксиду хлору ($C1O_2$) по відношенню до біоплівок. Хлорити використовувалися у зв'язку з тим, що вони зазвичай спостерігаються в розподільчих системах як побічний продукт первинної або вторинної дезінфекції води діоксидом хлору. Попереднє дослідження цих авторів показало, що хлорит знижує нітрифікацію у розподільчих системах. Використовували кільцеві реактори (ARs) з полікарбонату та чавуну для моделювання якості води у розподільчій системі. Після 4-тижневого періоду акліматизації в кожен AR паралельно вводили високі (0,25 мг/л) і низькі (0,1 мг/л) дози хлориту і високі (0,5 мг/л) і низькі (0,25 мг/л) дози діоксиду хлору. Контролем служили AR без дезінфектантів. Отримані дані свідчать, що хлорит у низьких рівнях неефективний· по відношенню до гетеротрофних бактерій. Скорочення log реєстрації приєднаних гетеротрофних бактерій для низької та високої доз хлориту коливалося від 0,20 до 0,34. Для діоксиду хлору у високій дозі ці цифри знаходилися в межах від 0,52 до 1,36. Найбільш високі рівні редукції суспендованих гетеротрофних бактерій відзначені для високої дози $C1O_2$ або на чавуні або полікарбонаті (1,77 і 1,55). Ці дані показують необхідність підтримки залишкової концентрації діоксиду хлору в розподільчих системах для контролю мікробіологічного післяросту.

Цій статті, на наш погляд, слід приділити більше уваги, хоча б тому, що таких досліджень проведено дуже мало.

Eisnor і Gagnon (2004) [29] виявили, що ClO_2^- мають дуже низьку корозійну активність у чавунних трубах порівняно з $C1O_2$, вільним хлором, хлорамінами або контролем без дезінфектанту. Крім цього, McGuire et al. (1999) [30] зробили висновок, що $C1O_2$ інактивує

аммоніфікуючі бактерії (AOB), які, як відомо, викликають нітрифікацію в розподільчих системах. Зокрема це стосувалося заміни хлораміну на хлорит. У цьому дослідженні [28] для ClO_2^- знайдено сильний потенціал інактивації суспендованих AOB. Однак, дані про пролонгований вплив на гетеротрофні мікроорганізми представлені не були. Тому, головна мета цього дослідження [28] полягала в оцінці ступеня біоцидного ефекту ClO_2 та ClO_2^- на гетеротрофи (суспендовані і в біоплівці) в лабораторному експерименті.

Отримано наступні результати.

Кільцеві реактори (ARs) експлуатувалися протягом чотирьох тижнів до дезінфекції для акліматизації та забезпечення стаціонарних умов біоплівки. Повна середня кількість суспендованих гетеротрофних бактерій (HPC) у воді у всіх ARs становила $8,98 \cdot 10^4 \pm 4,18 \cdot 10^4$ КУО/мл, повна середня кількість загальних індексів бактеріальних клітин (AODC) у воді – $8,8 \cdot 10^5 \pm 3,78 \cdot 10^5$ КУО/мл під час періоду акліматизації. У трубах із чавуну відзначені нижчі індекси суспендованих HPC, ніж полікарбонатних (ПК) ($7,57 \cdot 10^4 \pm 3,65 \cdot 10^4$ і $1,04 \cdot 10^5 \pm 4,59 \cdot 10^4$ КУО/мл відповідно), проте статистично значущі відмінності не спостерігалися. Однак, констатовано значну різницю між чавуном і ПК для AODC ($p = 0,0455$).

Середнє та стандартне відхилення HPC у біоплівці до дезінфекції було $8,59 \cdot 10^6 \pm 2,46 \cdot 10^6$ та $1,14 \cdot 10^6 \pm 5,0 \cdot 10^5$ КУО/см^2 для чавуну та ПК відповідно. Біоплівка на чавуну мала статистично вищу кількість HPC, ніж на полікарбонаті ($p = 0,00266$). Під час акліматизації спостерігалася значна відмінність для HPC між AODC та біоплівкою ($p = 0,00633$), при цьому було значно більше бактерій, приєднаних на металеву поверхню, ніж у зваженому стані.

Крім НРС та AODC були також визначені індекси нежиттєздатних та життєздатних бактерій. Середня кількість нежиттєздатних бактерій у воді та біоплівці була $3,17 \cdot 10^5 \pm 1,37 \cdot 10^5$ КУО/мл та $2,13 \cdot 10^6 \pm 1,54 \cdot 10^6$ КУО/см^2. Відповідне число життєздатних бактерій для води було $5,63 \cdot 10^5 \pm 2,63 \cdot 10^5$ КУО/мл і $2,29 \cdot 10^6 + 1,34 \cdot 10^6$ КУО/см^2 для біоплівки. Без урахування матеріалу була значна різниця між нежиттєздатними ($p = 0,10$) та життєздатними ($p = 0,0831$) бактеріями у воді та біоплівці.

Середнє відношення культурабельних бактерій у воді було 0,12±0,05, у біоплівці – 0,29±0,12, що вказує на більш високу культурабельність приєднаних бактерій. Також відзначено різницю між вмістом бактерій у воді та біоплівці ($p = 0,0673$).

Середнє відношення у воді для ПК було 0,10±0,03, для чавуну 0,14±0,06 без значних відмінностей ($p=0,30$).

При дезінфекції $C1O_2$ та ClO_2^- за 50-денний період контролювали НРС у воді та біоплівці. Тенденція до зменшення була відзначена у всіх випадках для бактерій, суспендованих у воді та приєднаних у біоплівці, особливо при дезінфекції $C1O_2$.

Незалежно від дезінфектанту та матеріалу відзначено значну відмінність між середніми числами бактерій у суспензії та біоплівці ($p = 0,0268$) ($0,90 \pm 0,51$ і $0,50 \pm 0,50$ відповідно), що узгоджується з попередніми дослідженнями [31, 32].

Значне зменшення суспендованих НРС було знайдено протягом дезінфекції, якщо порівнювати дані до та після дезінфекції ($p = 1,54 \times 10^{-4}$). Не було значних відмінностей між суспендованими гетеротрофними бактеріями в полікарбонаті або в чавуні поза залежністю від обробки ($p = 0,391$, чавун $= 2,59 \cdot 10^4 \pm 2,2 \cdot 10^4$, полікарбонат $= 1,46 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^4$). Для зразків води вихідне число НРС (день 0) було приблизно 1×10^5

КУО/мл. Індекси після дезінфекції на 0 днів зменшилися до $4,32 \cdot 10^4$ та $3,18 \cdot 10^4$ КУО/мл для полікарбонату та чавуну, що відповідає скороченню на 0,47 та 0,34 log. Після дезінфекції зменшення ранжувалося від $6,18 \cdot 10^2$ до $5,62 \cdot 10^4$ КУО/мл (log 0,27 – 1,77) незалежно від матеріалу та дезінфектанту.

Не спостерігалося значного зменшення кількості гетеротрофних бактерій у біоплівці при дезінфекції ($p = 0,106$) у всіх ARs, за винятком $C1O_2$ у високій дозі (0,5 мг/л), так само, як і HPC у біоплівці між полікарбонатом і чавуном незалежно від обробки ($p = 0,645$). Рівні HPC на день 0 коливалися від $1 \cdot 10^6$ до $1,5 \cdot 10^7$ КУО/мл. Для контрольних AR було зменшення HPC до $9,55 \cdot 10^5$ та $7,90 \cdot 10^6$ КУО/мл для полікарбонату та чавуну відповідно, що відповідає log скорочення 0,11 та 0,07. Подібна тенденція до зменшення спостерігалася для ARs з обробкою, де рівні HPC зменшувалися від $9,4 \cdot 10^4$ до $4,52 \cdot 10^6$ КУО/мл з log скорочення в межах від 0,20 до 0,73. У чавуну та полікарбонату для високих доз $C1O_2$ були великі та порівняні log скорочення 1,36 та 1,33 відповідно.

Після 50-денного періоду дезінфекції було визначено повні індекси бактерій AODC для кожного типу обробки та матеріалу із середнім індексом $3,85 \cdot 10^5 \pm 8,94 \cdot 10^4$ для води та $3,62 \cdot 10^6 \pm 1,64 \cdot 10^6$ для біоплівки. Середні log скорочення для води були більшими, ніж для біоплівки: $0,33 \cdot 0,19$ і $0,12 \cdot 0,25$ для біоплівки.

Була значна різниця між середніми концентраціями у воді та біоплівці ($p = 2,03 \cdot 10^3$); однак, не було жодної значної різниці між заключним log скорочення AODC ($p = 0,138$) незалежно від матеріалу та обробки.

Відзначено значне зменшення індексів загальної кількості бактерій у питній воді після дезінфекції ($p = 0,000966$). Порівняння полікарбонату і чавуну незалежно від обробки не показало значних відмінностей для індексів

загальної кількості бактерій (p = 0,485). Рівні контролю після 50-денного періоду дезінфекції були $3,7 \cdot 10^5$ і $3,74 \cdot 10^5$ КУО/мл для полікарбонату і чавуну, що відповідає log скорочення 0,53 і 0,27. Під час дезінфекції зменшення індексів загального числа бактерій коливалися від $2,64 \cdot 10^5$ до $5,57 \cdot 10^5$ КУО/мл з log скорочення в межах від 0,04 до 0,59 незалежно від матеріалу та обробки.

Не виявлено значного зменшення індексів загальної кількості бактерій після дезінфекції (p = 0,388). Так у контрольних полікарбонатних ARs в біоплівці індекс становив $3,17 \cdot 10^6$ КУО/см^2. Цей рівень відповідав log скорочення AODC 0,07. У AR після дезінфекції AODC коливалися в межах від $1,14 \cdot 10^6$ до $5,39 \cdot 10^6$ КУО/см^2 з log скорочення від 0,02 до 0,49 залежно від комбінації дози дезінфектанту.

Загалом кількість життєздатних суспендованих бактерії було зменшено після обробки $C1O_2$. Однак, для біоплівки не було значного зменшення числа нежиттєздатних і життєздатних бактерій (p = 0,638 для середніх $1,75 \cdot 10^6 \pm 7,6 \cdot 10^5$ нежиттєздатних бактерій; p = 0,658 для середніх $1,88 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$ життєздатних бактерій). Не виявлено значної різниці між полікарбонатом і чавуном для води у нежиттєздатних або життєздатних бактерій (p = 0,395 нежиттєздатних і p = 0,913 життєздатних).

Значного зменшення для AODC у біоплівці після дезінфекції не виявлено (p = 0,388), що можна порівняти з даними Gagnon et al. (2004) [31]. Відношення HPC/AODC у воді значно зменшилося в середньому від 0,12±0,05 до дезінфекції до 0,05±0,04 після дезінфекції. Це відповідає результатам, представленим Gagnon et al. (2004) [31] та Volk et al. (2002) [33], де відношення HPC/AODC зменшилися після обробки діоксидом хлору. Відношення HPC/AODC у біоплівці також зменшилося від 0,29±0,12 до

0,16±0,12 під час дезінфекції, хоча це зменшення не було статистично значущим (p=0,127).

Встановлено значну різницю між відношенням HPC/AODC у воді та біоплівці (p = 0,018) і її відсутність між водою в полікарбонаті та чавуні (p = 0,536) і типом дезінфектанта (p = 0,147).

В обговорення отриманих результатів автори [28] зазначають наступне. При порівнянні матеріалу поверхні (чавун та полікарбонат) для біоплівок гетеротрофних бактерій до дезінфекції зазначено: для чавуну були статистично більш високі індекси, що узгоджується з попередніми дослідженнями [31, 32]. Найбільше зменшення гетеротрофних бактерій спостерігалося для полікарбонату. Однак високий рівень $C1O_2$ забезпечував статистично значуще скорочення і для полікарбонату, і для чавуну. Нижчі log скорочення спостерігалися для полікарбонату при низьких та високих дозах хлориту. Хлорит був менш ефективним, ніж діоксид хлору, незалежно від матеріалу, проте особливо неефективний в ARs з чавуну. Iaturu і Knocke (1992) [34] вказували, що ClO_2^- може окислити Fe^{2+} у Fe^{3+} за реакцією окислення-відновлення:

$$4Fe^{2+} + ClO_2^- + 10H_2O \rightarrow 4Fe(OH)_3 + Cl^- + 8H^+$$

Хоча залишкова концентрація хлориту підтримувалася на рівні 0,1 або 0,25 мг/л, в чавунних ARs хлорит окислював залізо, а не інактивував гетеротрофні бактерії.

Найбільший log скорочення суспендованих гетеротрофних бактерій спостерігався за високої дози ClO_2 і чавуні, і полікарбонаті (1,77 і 1,55). Як і передбачалося, не зазначено фактично жодного скорочення HPC для двох контрольних ARs (0,27-0,56). Це свідчить, що реагенти забезпечували дезінфекцію.

Скорочення log реєстрації для хлориту на полікарбонаті становило приблизно 1 log, але в чавуні 0,5. Тому концентрація хлориту 0,1 або 0,25 мг/л не може ефективно впливати на суспендовані гетеротрофні бактерії у розподільчих системах. Це можна порівняти з результатами лабораторних і польових експериментів McGuire et al. (1999) [30], згідно з якими хлорит інактивував не гетеротрофні бактерії, а амоніфікуючі (AOB). Хлорити проникають через мембрану AOB, реагують з H^+ з подальшим окисленням аміаку. Згідно з цією гіпотезою, діоксид хлору може бути активним агентом для інактивації AOB. Оскільки гетеротрофні бактерії не окислюють аміак і менш імовірно зменшили рівень pH у мембрані клітини, діоксид хлору не може бути джерелом ClO_2^- у цих мікроорганізмах. Фактично, ці дані McGuire et al. (1999) [30] дозволяють припустити, що хлорит має більшу антимікробну специфіку, ніж звичайні вторинні дезінфекційні засоби, і може більш ефективно використовуватися в комбінації з іншими дезінфектантами (наприклад, хлорамінами).

Для $C1O_2$ було характерно більше, порівняно з хлоритом, скорочення суспендованих і прикріплених у біоплівці гетеротрофних бактерій. У полікарбонаті при високій дозі $C1O_2$ був найбільший (2,0) log скорочення бактерій у біоплівці. Чавун і полікарбонат з низькою дозою $C1O_2$ мали нижчі log скорочення (0,52 і 0,73 відповідно), ніж при високій дозі. Однак log скорочення при низькій дозі $C1O_2$ був більшим, ніж будь-яка доза хлориту.

Таким чином, встановлено неефективність хлориту в інактивуванні гетеротрофних бактерій, суспендованих і у біоплівці, незалежно від матеріалу труб. Діоксид хлору в низькій концентрації 0,25 мг/л забезпечував інактивацію гетеротрофних бактерій на рівні 1,6-1,8 log для суспендованих бактерій та на 1 log у біоплівці. Практична

реалізація цих даних полягає в необхідності забезпечення залишкової концентрації діоксиду хлору у питній воді з водорозподільних систем [28].

Література

1. Walker, G. S., Lee, T., & Aieta, E. M. (1986). Chlorine dioxide for taste and odor control. *Journal AWWA, 78*(3), 84–93. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1986.tb05723.x
2. LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., & Lee, R. G. (1988a). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and Environmental Microbiology, 54*(3), 649–654. https://doi.org/10.1128/AEM.54.3.649-654.1988
3. LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., & Lee, R. G. (1988b). Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 54*(12), 2492–2499. doi: 10.1128/aem.54.10.2492-2499.1988.
4. De Constantin, S., Pascal, O., Block, J. C., et al. (1986). La flore bacterienne dans les reseaux de distribution: comparaison de deux etudes. *Water Supply, 4*(3), 199–215.
5. Pedersen, K. (1990). Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research, 24*(2), 239–243. https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90154-M
6. Pedersen, K., Brandstrom, L., & Olsson, A.-K. (1986). Gynnar vissa rorledningsmaterial vidhaftning och tillvaxt av bagterier i dricksvatten? *Vatten, 42*(1), 21–24.
7. Norton, C. D., & LeChevallier, M. W. (2000). A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and*

Environmental Microbiology, 66(1), 268–276. https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.268-276.2000

8. Martiny, A. C., Jørgensen, T. M., Albrechtsen, H.-J., et al. (2003). Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology, 69*(11), 6899–6907. https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6899-6907.2003
9. September, S. M., Brözel, V. S., & Venter, S. N. (2004). Diversity of nontuberculoid *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(12), 7571–7573. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7571-7573.2004
10. Doggett, M. S. (2000). Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(3), 1249–1251. https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1249-1251.2000
11. Fransolet, G., & Masschelein, W.-J. (1996). Evolution bacterienne et germes tests des eaux en reseau: Redefinition de l'objectif sanitaire. *Techniques, Sciences, Méthodes*, (6), 316–329.
12. Rickard, A. H., Leach, S. A., Hall, L. S., et al. (2002). Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(7), 3644–3650. https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3644-3650.2002
13. Stoodley, P., Wilson, S., Hall- Stoodley, L., et al. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(12), 5608–5613.https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5608-5613.2001

14. Hunt, S. M., Werner, E. M., & Huang, B., et al. (2004). Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(12), 7418–7425. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004
15. Ekspress-informatsiya. (1990). Ukhudshenie kachestva pit'yevoy vody. Seriya "Vodosnabzhenie i kanalizatsiya", Institut ekonomiki zhilishchno-kommunal'nogo khozyaystva AKh im. K. D. Pamfilova, (10[23]), 5 p. Deterioration of drinking water quality. (1990). *Express Information. Series "Water Supply and Sewerage"* (Issue 10 [23]). Institute of Economics of Housing and Communal Services named after K. D. Pamfilov.
16. Kuch, A., & Sontheimer, H. (1980). Instationäre Korrosion – Eine Ursache der Rostwasserbildung in Wasserverteilungsnetzen. *GWF Wasser/Abwasser, 127*(12), 621–629.
17. Lu, C., Biswas, P., & Clark, R. M. (1995). Simultaneous transport of substrates, disinfectants and microorganisms in water pipes. *Water Research, 29*(3), 881–894.https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00154-R
18. Peng, C.-G., & Park, J. K. (1994). Electrochemical mechanisms of corrosion influenced by sulfate-reducing bacteria in aquatic systems. *Water Research, 28*(8), 1681–1692. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90228-3
19. van der Wende, E., Characklis, W. G., & Smith, D. B. (1989). Biofilms and bacterial drinking water quality. *Water Research, 23*(10), 1313–1322. https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90193-0
20. Donlan, R. M., Pipes, W. O., & Yohe, T. L. (1994). Biofilm formation on cast iron substrata in water

distribution systems. *Water Research, 28*(6), 1497–1503. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90357-3

21. Lund, V., & Ormerod, K. (1995). The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems. *Water Research, 29*(4), 1013–1021. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00144-7
22. Långmark, J., Storey, M. V., Ashbolt, N. J., et al. (2005). Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(2), 706–712. https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.706-712.2005
23. Kemp, P. J., & Okimoto, N. (1982). Subtoxic chlorine dioxide treatment to prevent fouling in once-through seawater cooled surface condensers. *Proceedings of the International Water Conference, Pittsburgh*, 234–240.
24. Welch, J. L., & Folinazzo, J. F. (1959). Use of chlorine dioxide for cannery sanitation and water conservation. *Food Technology, 3*, 231–236.
25. Simpson, G. D. (1997). Biofilm: Removal and prevention with chlorine dioxide. In *Proceedings of the International Symposium "Chlorine Dioxide: Drinking Water, Process Water and Wastewater Issues"* (pp. 123–135). AWWA–AWWARF.
26. Gautier, J. P., & Pouillot, M. (1989). Un bactéricide efficace pour le traitement des slimes en papeterie: le bioxyde de chlore. *Eru. Ind. Nuisances, 127*, 45–47.
27. Mayack, L. A., Soracco, R. J., Wilde, E. W., et al. (1984). Comparative effectiveness of chlorine and chlorine dioxide biocide regimes for biofouling control. *Water Research, 18*(5), 593–599. https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90205-3

28. Gagnon, G. A., Rand, J. L., O'Leary, K. C., et al. (2005). Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Research, 39*(9), 1809–1817. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.030
29. Eisnor, J. D., & Gagnon, G. A. (2004). Impact of secondary disinfection on corrosion in a model water distribution system. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA, 53*(7), 441–452.
30. McGuire, M. J., Lieu, N. I., & Pearthree, M. S. (1999). Using chlorite ion to control nitrification. *Journal AWWA, 91*(10), 52–61. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1999.tb08720.x
31. Gagnon, G. A., O'Leary, K. C., Volk, C. J., et al. (2004). Comparative analysis of chlorine dioxide, free chlorine and chloramines on bacterial water quality in model distribution systems. *ASCE Journal of Environmental Engineering, 130*(11), 1269–1279. https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2004)130:11(1269)
32. Camper, A. K. (1996). *Factors limiting microbial growth in distribution systems: Laboratory and pilot-scale experiments*. AWWA Research Foundation.
33. Volk, C. J., Hofmann, R., Chauret, C., et al. (2002). Implementation of chlorine dioxide disinfection: Effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *Journal of Environmental Engineering and Science, 1*(5), 323–330. https://doi.org/10.1139/s02-022
34. Iaturu, A., & Knocke, W. R. (1992). Removing chlorite by the addition of ferrous iron. *Journal AWWA, 84*(11), 63–68. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1992.tb07327.x

РОЗДІЛ 9
МЕХАНІЗМИ БІОЦИДНОЇ ДІЇ ДІОКСИДУ ХЛОРУ

Механізми біоцидної дії ClO_2 досліджуються з 1960-х років. Дослідники зосереджувались на таких мішенях, як нуклеїнові кислоти, білки, бактерії, віруси та дріжджі. На відміну від великих кінетичних баз даних, механізми мікробної інактивації менш чітко визначені. Це пояснюється тим, що, навіть якщо зосередитися на одному мікроорганізмі, шляхи, що призводять до інактивації мікробної клітини або пригнічення росту та розмноження, є складними та різноманітними [1]. Задокументовано бактерицидний механізм ClO_2 проти бактерій, грибів і вірусів, але його конкретна летальна мішень потребує подальшого дослідження. У статті [2] вибрано три репрезентативні типи звичайних мікроорганізмів, бактерій, грибів і вірусів, щоб з'ясувати та проаналізувати механізми ClO_2 під час дезінфекції.

9.1 Бактерицидна дія

9.1.1 Зміна проникності клітинної мембрани

Як відомо, традиційні хлорні дезінфікуючі засоби, такі як Cl_2 і NaClO, суттєво впливають на морфологію та структуру бактерій. Під дією діоксидом хлору такий вплив не настільки виражений [3, 4]. Wei et al. (2023) [5] провели дослідження інгібуючої дії ClO_2 на *Salmonella* та пов'язані з цим фізіологічні метаболічні процеси в клітинах. Були проведені наступні експерименти. При 25 °C 0,25 мл розчину діоксиду хлору з концентрацією 0,25 мг/л було додано до 99,75 мл робочого розчину *Salmonella* з концентрацією $1{,}50 \cdot 10^7$ - $2{,}50 \cdot 10^7$ КУО/мл і поміщено під магнітне перемішування зі швидкістю 400 об/хв протягом 5 хв. Низька концентрація (0,25 мг/л) ClO_2 безпосередньо не пошкоджувала структуру мембран клітинної стінки *Salmonella*, але мала значний вплив на склад внутрішньоклітинних речовин. Цілісність клітинної мембрани підтримується нековалентними взаємодіями між іонними, водневими та гідрофобними зв'язками, які є необхідними для нормального функціонування бактерій. ClO_2, як молекула-окиснювач, може порушити ці взаємодії [6], що призведе до значного витоку ключових молекул та іонів із клітинної мембрани та, зрештою, до загибелі бактерій. У своєму дослідженні, присвяченому дослідженню впливу ClO_2 на цілісність клітинної стінки та мембрани *Escherichia coli*, Bridges et al. (2020) [7] спостерігали значне зниження кількості бактерій після обробки 2,5 та 5 мг/л ClO_2, але не відбулося значних змін у проникності мембрани. Після обробки 10 мг/л ClO_2 клітинна стінка відокремилася від цитозольного золю, але сама залишилася інтактною. Ці результати свідчать про те, що мішенню інактивації ClO_2 *E. coli* є не клітинна стінка. Дослідження Min et al. (2010) [8] показали, що більш

високі концентрації ClO_2 спричиняють більшу деструкцію клітинних мембран *E. coli*. Ofori et al. (2017) [6] виявили, що вплив ClO_2 на *E. coli* змінює цілісність зовнішньої клітинної мембрани, що призводить до витоку плазматичних компонентів, включаючи білки та олігосахариди, у клітинне середовище. Зміна проникності клітинних мембран і спричинення витоку ключових речовин, таких як іони натрію, калію, білки, нуклеїнові кислоти тощо, може бути основною мішенню для діоксиду хлору при інактивації бактерій.

9.1.2 Інгібування синтезу білка

Бактерії не мають органел. Тому багато ферментних систем розташовані на їх клітинних мембранах. Отже, пошкодження мембрани призводить не тільки до підвищення проникності, але також до інактивації ферментів і подальшої втрати фізіологічної функції. Нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH) є відновленим коферментом, який переважно бере участь у клітинному метаболізмі речовин та енергії. Він утворюється в циклі лимонної кислоти як гліколізу, так і клітинного дихання і служить переносником і донором електронів для біогенного водню. Усередині внутрішньої мембрани мітохондрій NADH передає енергію за допомогою окисного фосфорилювання, сприяє синтезу АТФ і відіграє центральну роль у підтримці клітинного росту, диференціювання, енергетичного метаболізму та захисту клітин [9]. NADH швидко окислюється ClO_2 з константами швидкості реакції другого порядку $3,9 \cdot 10^6$ $M^{-1}c^{-1}$ при 24,6 °C [10]. Окислення NADH ClO_2 серйозно порушує клітинне дихання та синтез АТФ, що зрештою призводить

до втрати фізіологічних функцій бактерій.

Перекисне окислення ліпідів є критичним процесом у метаболізмі бактерій. Коли окислювальний баланс бактерій порушується, що призводить до ланцюгової реакції вільних радикалів, це може спричинити багато метаболічних розладів, включаючи денатурацію білка та інактивацію ферментів, нездатність синтезувати метаболіти або перетворювати енергію, що призводить до втрати дихальної активності, метаболічної дисфункції та, зрештою, загибелі клітин [11]. Wang et al. [12, 13] продемонстрували, що обробка ClO_2 призводить до інактивації перекисного окислення ліпідів і робить *Salmonella* нежиттєздатною. Це свідчить про те, що перекисне окислення ліпідів є ще одним механізмом, за допомогою якого ClO_2 інактивує бактерії [14].

9.1.3 Деструкція генетичного матеріалу

Встановлено, що ClO_2 може порушувати кон'югований подвійний зв'язок між піримідином і пурином. В результаті ДНК втрачає свою початкову структуру, що безпосередньо проявляється у зменшенні її вмісту більш ніж наполовину [15]. Однак, цих даних недостатньо щодо твердження про деструкцію ДНК під впливом ClO_2.

Таким чином, при інактивації бактерій ClO_2 безпосередньо впливає на клітинну мембрану, руйнує її структуру та підвищує проникність, потім окислює білки та ферменти з порушенням перекисного окислення ліпідів і, зрештою, нормального метаболізму клітин. Руйнування ДНК ClO_2, вірогідно, слід розглядати як другорядний механізм інактивації бактерій. Механізм інактивації бактерій ClO_2 показано на рис. 9.1.

9.2 Мікоцидна дія

Гриби — це одноклітинні або багатоклітинні гетеротрофні еукаріотичні мікроорганізми без фотосинтетичних пігментів із клітинними стінками, що складаються з хітину та целюлози. На відміну від бактерій та інших мікроорганізмів, лише гриби мають справжнє ядро та повний набір органел, тому їх також називають еукаріотичними мікроорганізмами [16]. Гриби мають різноманітні способи розмножування, включаючи нестатеве та статеве, тоді як бактерії в основному розмножуються безстатевим способом за допомогою бінарного поділу.

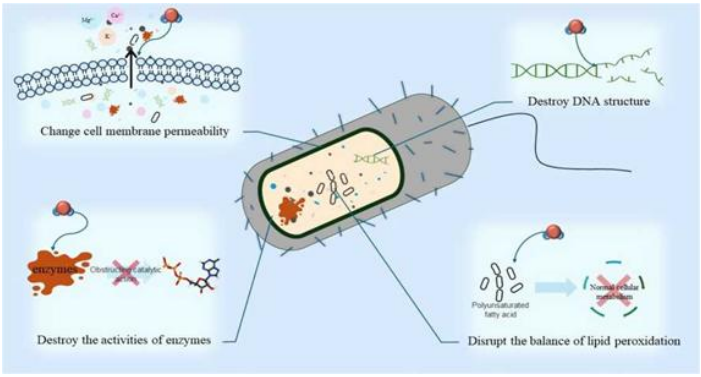

Рис. 9.1 Механізм інактивації бактерій ClO_2

Клітинна стінка гриба є дуже динамічною та складною структурою, що складається переважно з полісахаридів, включаючи β-глюкан, хітин і манан, а також глікопротеїнів [17]. Хітин виконує надійну захисну функцію і значно підвищує структурну міцність клітин грибів [18]. В результаті гриби виявляють підвищену

стійкість до ClO_2 і більш стійкі до інактивації порівняно з бактеріями.

Сучасні дослідження механізму ClO_2-індукованої грибкової інактивації показують, що він значною мірою відповідає механізму бактеріальної інактивації ClO_2. Це в першу чергу досягається шляхом зміни проникності клітинної мембрани, що призводить до витоку іонів назовні клітини. Активність певних ферментів у грибах пригнічується, порушуючи їхні метаболічні шляхи та фактично інактивуючи їх. Zhu et al. (2013) [19] обробили пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* ClO_2, що призвело до порушення цілісності клітинної мембрани та різного ступеня витоку іонів, таких як K^+, Ca^{2+} та Mg^{2+}. Крім того, ClO_2 значно пригнічував активність ключових ферментів у дріжджових внутрішньоклітинних метаболічних шляхах. Fu et al. (2019) [20] використовували фумігацію діоксидом хлору для ліквідації сірої плісняви на поверхнях зеленого перцю і виявили, що ClO_2 спричиняє втрату цілісності плазматичної мембрани, значно пригнічує ріст гіф, проростання спор і зменшення довжини насіннєвих трубок. Так само Bhattacharjee (2012) [21] і Sharma et al. (2012) [22] повідомили, що ClO_2 підвищує активність ліпоксигенази, що призводить до порушення перекисного окислення ліпідів у мембранах грибів і подальшої їх загибелі.

Як відомо, гриби можуть розмножуватися розривом, брунькуванням або утворенням спор [23]. Спори проростають за відповідних умов, утворюючи гіфи, ділячись і розмножуючись. Якщо зовнішнє середовище не підходить, вони можуть залишатися в стані спокою і виживати протягом тривалого часу [24].

Тому інактивація шкідливих грибкових спор також є важливою проблемою. Wen et al. [25] повідомили, що ClO_2 порушує клітинну стінку грибкових спор, що

призводить до витоку азотовмісних органічних сполук із клітин та інактивації спор. Wang et al. [26] встановили втрату ліпідів і зниження рівня АТФази в оболонках спор *Nosema bombycis* після обробки ClO_2. Згодом вміст спор, включаючи білки, ДНК, полісахариди та іони, швидко втрачався протягом короткого періоду часу, що призводило до інактивації спор.

Встановлено, що діоксид хлору проявляє генотоксичність по відношенню до *Saccharomyces cerevisiae* D7 лише тоді, коли його концентрація в 5-10 разів перевищує фактичну концентрацію для обробки води [27].

Як показано на рис. 9.2, на основі сучасних досліджень механізм інактивації ClO_2 грибів та їх спор подібний до його впливу на бактерії. Зокрема, ClO_2 порушує функцію клітинного бар'єру, що призводить до значного пошкодження клітинних стінок, мембран і внутрішніх структур. Це призводить до різного ступеня витоку внутрішньоклітинних речовин, таких як іони металів, і значного пригнічення активності ключових ферментів, які беруть участь у життєво важливих метаболічних шляхах. Слід зазначити, що геномна ДНК грибкової клітини не є значною мішенню для ClO_2.

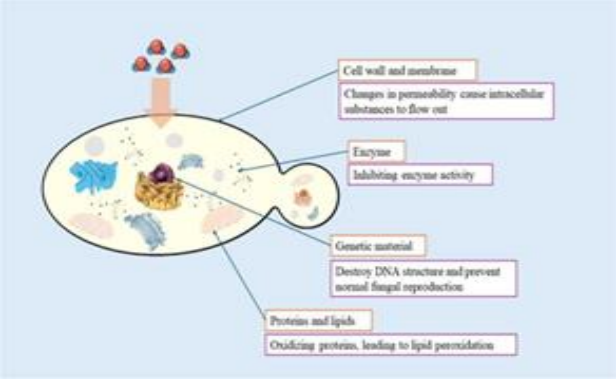

Рис. 9.2 Механізм мікоцидної дії ClO_2

9.3 Механізм інактивації вірусів діоксидом хлору

Структура вірусів відрізняється від структури бактерій і грибів, характеризуючись невеликим розміром, простотою структури та наявністю або ДНК, або РНК. Ці неклітинні організми є облігатними паразитами живих клітин господаря для реплікації та подальшого розповсюдження [28]. Сьогодні ретельно вивчається інактивація вірусів ClO_2, включаючи віруси без оболонки (бактеріофаги, ентеровіруси, аденовіруси, каліцівіруси, ротавіруси, парвовіруси) і віруси з оболонкою (віруси грипу, кору, герпесу та собачої чуми) [29]. Віруси з оболонкою структурно відрізняються від вірусів без оболонки через наявність двошарової ліпідної мембрани, що оточує білковий капсид вірусу. Ця мембрана часто має білки або глікопротеїни, що надає оболонковим вірусам унікальну зовнішню поверхню. Різні функціональні групи, присутні на цій зовнішній поверхні, можуть впливати на стратегії виживання та розмноження вірусів з оболонкою в їхньому середовищі, відрізняючи їх від вірусів без оболонки [30].

9.3.1 Порушення зовнішньої білкової оболонки вірусу

Вивчення спільного між різними оболонками вірусів COVID-19, грипу та герпесу показало, що ліпіди є основним компонентом. Ці ліпіди ефективно захищають вірус, сприяючи його проникненню в клітини господаря та підвищуючи при цьому стабільність вірусної структури. Однак, як тільки ці віруси з оболонкою залишають своїх

хазяїв і піддаються впливу зовнішніх умов, їх оболонки стають вразливими для руйнування дезінфікуючими засобами. Як наслідок, оболонка служить основною «мішенню» для дезінфікуючих засобів, призначених для нейтралізації вірусів з оболонкою [31]. Тому віруси з оболонкою, як правило, більш чутливі до хімічних дезінфікуючих засобів, ніж віруси без оболонки. Ogata і Shibata (2008) [32] показали, що ClO_2 ефективно денатурує ключові білки оболонки (гемагглютинін і нейрамінідазу) вірусу грипу А, які необхідні для його інфекційності. У подальших дослідженнях вони продемонстрували, що інактивація вірусу грипу А ClO_2 була зумовлена окисленням залишку триптофану (W153) у вірусному білку гемаглютиніну, що порушувало його здатність зв'язуватися з клітинами господаря [33]. Спалах COVID-19 у 2019 році спричинив величезні руйнування. Слід зазначити подібність білків оболонки COVID-19 і вірусу грипу, які містять 54 залишки тирозину, 12 триптофану та 40 цистеїну [34]. Тому, Kaly Kullai et al. (2020) [35] висловили думку, що ClO_2 може інактивувати COVID-19 і його слід розглядати як багатообіцяючий неспецифічний віруліцидний засіб.

Для необолонкових вірусів капсид — це олігомер, утворений субодиницею білка вірусного капсиду, який використовується для інкапсуляції генетичного матеріалу (нуклеїнової кислоти) вірусу. Hauchman et al. (1986) [36] встановили, що хоча інфекційність бактеріофага F2 зникає після інактивації ClO_2, його нуклеїнова кислота залишається активною; тобто, мішенню ClO_2 на бактеріофазі F2 є вірусний капсид. Sigstam et al. (2014) [37] показали, що пошкодження білків капсиду під час впливу ClO_2 позитивно корелює з інактивацією бактеріофага MS2. Вони також виявили, що білки капсиду сильно окислюються під час дезінфекції, що свідчить про їх

важливість як мішеней для інактивації вірусу.

9.3.2 Деградація фрагментів РНК

Alvarez і O'Brien (1982) [38] під час вивчення інактивацію поліовірусу типу I (PV1) ClO_2 виявили зміну ізоелектричної точки та коефіцієнту седиментації вірусного капсидного білка. Незважаючи на те, що PV1, оброблений ClO_2, зберіг здатність прилипати до клітин і проникати в них, а також піддаватися виділенню, його нуклеїнова кислота була незворотно пошкоджена, що робило його нездатним до реплікації. Це свідчить про те, що ClO_2 переважно інактивує вірус, руйнуючи його нуклеїнову кислоту. Li et al. (2002) [39] повідомили, що ClO_2 ефективно усуває інфекційність і антигенність вірусу гепатиту А, а також порушує 5' NTR його геному. ClO_2 не тільки пригнічує реплікацію вірусу гепатиту А, пошкоджуючи його геном, але також взаємодіє з вірусним капсидним білком, тим самим перешкоджаючи виділенню або проникненню вірусу в клітини-хазяїни. Jin et al. [2012] [40] повідомили, що ClO_2 деградував 40-80 нуклеотидних ділянок у 5' NTR геному PV1 із наступною інактивацією.

Сучасні дослідження показують, що механізм інактивації ClO_2 вірусів головним чином включає руйнування капсиду вірусного білка, деградацію фрагментів РНК та інгібування синтезу молекули РНК. Як показано на рис. 9.3, для вірусів з оболонкою ClO_2 реагує безпосередньо з білковими амінокислотними залишками, розташованими на поверхні оболонки вірусу; для вірусів без оболонки ClO_2 діє на вірусний капсид і геном, порушуючи реплікацію вірусної РНК в клітинах.

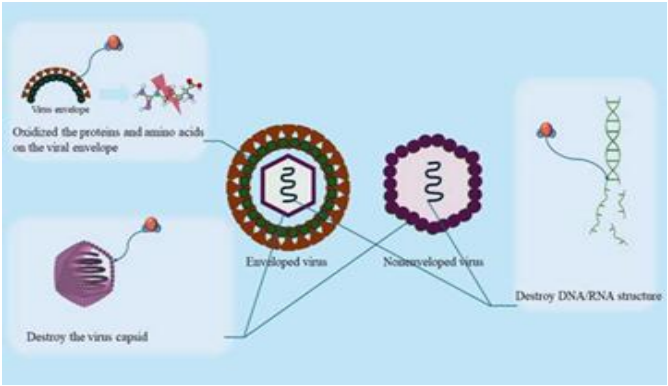

Рис. 9. 3 Механізм інактивації вірусів ClO_2

Таким чином, діоксид хлору має різні механізми інактивації різних видів мікроорганізмів, зважаючи на їх різну структурну морфологію, клітинний склад, об'єм і стійкість. Для бактерій і грибів летальною мішенню діоксиду хлору є руйнування структури клітинної мембрани, зміна її проникності для внутрішньоклітинних речовин, пошкодження перекисного окислення ліпідів і генетичного матеріалу. Летальною мішенню діоксиду хлору для вірусів є руйнування капсиду вірусного білка та розкладання фрагментів РНК.

Література

1. Tao, M., Ao, T., Mao, X., Yan, X., Javed, R., Hou, W., Wang, Y., Sun, C., Lin, S., Yu, T., & Ao, Q. (2021). Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. *Bioactive Materials, 6*(9), 2927–2945. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.010
2. Yu, J., Qiao, Y., Jin, R., Jia, M., Liu, J., He, Z., & Liu, Z. (2024). Application of chlorine dioxide and its

disinfection mechanism. *Archives of Microbiology, 206*, 400. https://doi.org/10.1007/s00203-024-04137-7

3. Shuai, Z., Yue, W., Ji, L., Zhigang, Y., Hailiang, S., Philip, L. B., & Jianhua, G. (2021). Chlorine disinfection facilitates natural transformation through ROS-mediated oxidative stress. *The ISME Journal, 15*(10), 2969–2985. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00980-4
4. Mir, J., Morato, J., & Ribas, F. (2010). Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology, 82*(1), 7–18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03292.x
5. Wei, L., Jie, T., Beibei, W., Di, W., Jinqiu, W., Lei, C., & Fang, G. (2023). The potential mechanism of low-power water bath ultrasound to enhance the effectiveness of low-concentration chlorine dioxide in inhibiting *Salmonella Typhimurium*. *Food Chemistry: X, 20*, 100901. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100901
6. Ofori, I., Maddila, S., Lin, J., & Jonnalagadda, S. B. (2018). Chlorine dioxide inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in water: The kinetics and mechanism. *Journal of Water Process Engineering, 26*, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.09.001
7. Bridges, D. F., Lacombe, A., & Wu, V. C. H. (2020). Integrity of the *Escherichia coli* O157:H7 cell wall and membranes after chlorine dioxide treatment. *Frontiers in Microbiology, 11*, 888. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00888
8. Min, C., Kim, J., Kim, J. Y., Yang, J., & Kim, J.-H. (2010). Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research, 44*(11), 3410–3418. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017

9. Feher, J. J. (2017). ATP production II: The TCA cycle and oxidative phosphorylation. In *Biology*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00021-5
10. Bakhmutova-Albert, E. V., Margerum, D. W., Auer, J. G., & Applegate, B. M. (2008). Chlorine dioxide oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Inorganic Chemistry, 47*(6), 2205–2211. https://doi.org/10.1021/ic7019022
11. Sokmen, M., Candan, F., & Sumer, Z. (2001). Disinfection of *E. coli* by the Ag–TiO_2/UV system: Lipid peroxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 143*, 241–244. https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00497-X
12. Wang, A., Qiao, Y., Zhang, Y., Jin, R., Liu, J., He, Z., Jia, M., Gao, J., & Guo, C. (2023a). Performance and mechanism of chlorine dioxide on BTEX removal in liquid and indoor air. *Molecules, 28*(11), 4342. https://doi.org/10.3390/molecules28114342
13. Wang, W., Smith, D. J., Ngo, H., Jin, Z. T., Mitchell, A. E., & Fan, X. (2023b). Lipid oxidation and volatile compounds of almonds as affected by gaseous chlorine dioxide treatment to reduce *Salmonella* populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71*(13), 5345–5357. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00267
14. Kato, Y. (2014). The formation of lipid hydroperoxide-derived amide-type lysine adducts on proteins: A review of current knowledge. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 77, pp. 21–39). https://doi.org/10.1007/978-94-007-7920-4_2
15. Napolitano, M. J., Stewart, D. J., & Margerum, D. W. (2006). Chlorine dioxide oxidation of guanosine 5′-monophosphate. *Chemical Research in Toxicology, 19*(11), 1451–1458. https://doi.org/10.1021/tx060124a

16. Baudy, P., Zubrod, J. P., Konschak, M., Kolbenschlag, S., Pollitt, A., Baschien, C., Schulz, R., & Bundschuh, M. (2021). Fungal–fungal and fungal–bacterial interactions in aquatic decomposer communities: Bacteria promote fungal diversity. *Ecology, 102*(10), e03471. https://doi.org/10.1002/ecy.3471
17. Alcazar-Fuoli, L., Bayry, J., & Aimanianda, V. (2020). Editorial: The role of the fungal cell wall in host–fungal interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10*, 392. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00392
18. Dai, J., Qu, H., Yu, Z., Yang, J., & Zhang, H. (2015). Computational analysis of AnmK-like kinase: New insights into the cell wall metabolism of fungi. *Journal of Theoretical Biology, 379*, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.05.004
19. Zhu, C., Chen, Z., & Yu, G. (2013). Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology, 63*, 495–502. https://doi.org/10.1007/s13213-012-0494-8
20. Fu, M., Zhang, X., Jin, T., Li, B., Zhang, Z., & Tian, S. (2019). Inhibitory effect of chlorine dioxide fumigation on gray mold of green pepper and winter jujube and its mechanisms. *LWT, 100*, 335–340. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.092
21. Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany, 2012*, 985298. https://doi.org/10.1155/2012/985298
22. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany, 2012*, 217037. https://doi.org/10.1155/2012/217037

23. Wan, Q., Wen, G., Cui, Y., Cao, R., Xu, X., Wu, G., Wang, J., & Huang, T. (2023). Occurrence and control of fungi in water: New challenges in biological risk and safety assurance. *Science of the Total Environment, 860*, 160536. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160536
24. Calhim, S., Halme, P., Petersen, J. H., Iläs, T., Bässler, C., & Heilmann-Clausen, J. (2018). Fungal spore diversity reflects substrate-specific deposition challenges. *Scientific Reports, 8*(1), 5356. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23292-8
25. Wen, G., Xu, X., Huang, T., Zhu, H., & Ma, J. (2017). Inactivation of three genera of dominant fungal spores in groundwater using chlorine dioxide: Effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Water Research, 125*, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.038
26. Wang, Z., Liao, F., Lin, J., Li, W., Zhong, Y., Tan, P., & Huang, Z. (2010). Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology, 104*(2), 134–139. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.11.007
27. Buschini, A., Carboni, P., Furlini, M., Poli, P., & Rossi, C. (2004). Sodium hypochlorite-, chlorine dioxide- and peracetic acid-induced genotoxicity detected by the Comet assay and *Saccharomyces cerevisiae* D7 tests. *Mutagenesis, 19*(2), 157–162. https://doi.org/10.1093/mutage/geh012
28. Scalabrin, S., Becco, A., Vitale, A., & Nuzzi, R. (2022). Corrigendum: Ocular effects caused by viral infections and corresponding vaccines: An overview of varicella-zoster virus, measles virus, influenza viruses, hepatitis B virus, and SARS-CoV-2. *Frontiers in Medicine, 9*, 1081686. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1081686

29. Ge, Y., Zhang, X., Shu, L., & Yang, X. (2021). Kinetics and mechanisms of virus inactivation by chlorine dioxide in water treatment: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 106*(4), 560–567. https://doi.org/10.1007/s00128-021-03137-3
30. Verma, J., Subbarao, N., & Rajala, M. S. (2020). Envelope proteins as antiviral drug targets. *Journal of Drug Targeting, 28*(10), 1046–1052. https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1792916
31. Sinha, A., Singh, A. K., Kadni, T. S., Mullick, J., & Sahu, A. (2021). Virus-encoded complement regulators: Current status. *Viruses, 13*(2), 208. https://doi.org/10.3390/v13020208
32. Ogata, N., & Shibata, T. (2008). Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection. *Journal of General Virology, 89*(1), 60–67. https://doi.org/10.1099/vir.0.83393-0
33. Ogata, N. (2012). Inactivation of influenza virus haemagglutinin by chlorine dioxide: Oxidation of the conserved tryptophan 153 residue in the receptor-binding site. *Journal of General Virology, 93*(12), 2558–2563. https://doi.org/10.1099/vir.0.044263-0
34. Lu, R., Niu, P., Zhao, L., et al. (2020). Sequencing the complete genome of COVID-19 virus from clinical samples using the Sanger method. *China CDC Weekly, 2*(25), 447–452. https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.088
35. Kaly-Kullai, K., Wittmann, M., Noszticzius, Z., & Rosivall, L. (2020). Can chlorine dioxide prevent the spreading of coronavirus or other viral infections? *Physiological International, 107*(1), 1–11. https://doi.org/10.1556/2060.2020.00015

36. Hauchman, F. S., Charles, I. N., & Vincent, P. O. (1986). Chlorine dioxide reactivity with nucleic acids. *Water Research, 20*(3), 357–361. https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90084-9
37. Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M., & Kohn, T. (2014). On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. *Water Research, 48*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.023
38. Alvarez, M. E., & O'Brien, R. T. (1982). Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Applied and Environmental Microbiology, 44*(5), 1064–1071. https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1064-1071.1982
39. Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(10), 4951–4955. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.021
40. Jin, M., Zhao, Z. G., Wang, X. W., Shen, Z. Q., Xu, L., Yu, Y. M., Qiu, Z. G., Chen, Z. L., Wang, J. F., Huang, A. H., & Li, J. W. (2012). The 40–80 nt region in the 5′-NCR of the genome is a critical target for inactivating poliovirus by chlorine dioxide. *Journal of Medical Virology, 84*(3), 526–535. https://doi.org/10.1002/jmv.23221

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Впродовж довгого 20-річного періоду вивчення діоксиду хлору автору не раз спадала на думку тією чи іншою мірою більш виражена штучність оцінки ефективності інактивації мікроорганізмів дезінфектантами перш за все внаслідок надзвичайної мінливості їх концентрацій в динаміці впливу на структури того чи іншого мікроба. Це має безпосереднє відношення до практики водопідготовки, оскільки, будь яка природна вода, не кажучи вже про забрудненні поверхневі водойми, це система чисельних факторів мінімізації знезаражуючої

дії дезінфектанта. В цьому сенсі чудова нагода постала після ознайомлення із теоретичним дослідженням [1], яке мало на меті моделювання динамічної кінетики інактивації мікроорганізмів розсіювальними (леткими) хімічними дезінфектантами, дози і концентрації яких перманентно мінливі в процесі дезінфекції.

Автор ретельно проаналізував існуючі статичні і динамічні версії моделей інактивації і прийшов до висновку

щодо усунення їх математичних проблем шляхом заміни динамічною версією моделі Weibull. Результатом є звичайне диференціальне рівняння (ЗДР), яке можна розв'язати чисельно для майже кожного можливого реалістичного профілю концентрації.

Подібні моделі дезінфекції можна побудувати на основі альтернативних базових функцій розподілу. Прикладом є розподіл Фермі, який може враховувати криві виживання, що нагадують ступінчасту функцію та/або мають значний час затримки з логарифмічно-лінійним продовженням.

Той самий підхід до моделювання можна використовувати для режиму поповнення дезінфікуючого засобу та для врахування того, що відбувається, поки він не досягне своєї початкової концентрації. Незважаючи на складність результуючих рівнянь швидкості, вони також є звичайними диференціальними рівняннями (ЗДР) і можуть бути швидко розв'язані чисельно.

Особливо слід відзначити практичну привабливість цієї роботи [1], оскільки всі розрахунки можна робити з використанням програмного забезпечення, яке є у вільному доступі. Наприклад, зацікавлений читач може згенерувати власні динамічні криві виживання, як модель залежності від концентрації, використовуючи вільно завантажувану інтерактивну демонстрацію Wolfram

https://demonstrations.wolfram.com/MicrobialSurvivalWithDissipatingDisinfectant/.

Надзвичайно важливим аспектом інактивації бактерій діоксидом хлору (як і будь яким іншим хімічним дезінфектантом), безпосередньо пов'язаним з динамічною інактивацією, конспективно розглянутою вище, є відмінності у чутливості мікроорганізмів, обумовлені впливом попередніх умов їх розмноження у навколишньому середовищі.

З точки зору авторів роботи [2], на чутливість *E. coli* до діоксиду хлору впливають чотири екологічні параметри росту: 1) характер живильного середовища, 2) ступінь поживного обмеження, 3) температура, 4) щільність культури. Це підтверджують результати дослідження [3]: за тих самих умов CT дорівнює приблизно 0,10 мг/л·хв для *E. coli*, вирощеної в пакетному режимі, тобто при звичайному культивуванні, та приблизно 0,75 мг/л·хв для культур, вирощених у хемостаті (на збідненому поживному середовищі, яке моделює умови екологічної водної матриці, наприклад, водопровідної води).

Суттєвою вадою попередніх публікацій автора по мікробіології діоксиду хлору була їх певна поверхневість. Це була констатація без прийнятної аналітики. Тому в даній книзі автор приділив максимально багато уваги розгляду механізмів інактивації мікроорганізмів. Для цього був доцільним певний історичний екскурс.

Наприклад, у роботі Benarde et al. (1967) [4] розглядаються чотири гіпотетичні варіанти бактерицидної дії діоксиду хлору: 1) інгібування утворення аміноациладенілату або активації амінокислот; 2) на рівні рибосом; 3) інактивації матричної РНК; 4) структурне руйнування рибосом. Автори висловлюють думку, що інактивація синтезу білка є найбільш імовірною.

У цьому контексті є дуже цікавою робота Ofori et al.

(2018) [5], яка присвячена аналізу кінетики і механізмів інактивації діоксидом хлору таких актуальних бактеріальних контамінантів води, як *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*.

Показано, що швидкі реакції діоксиду хлору з цистеїном, тирозином та триптофаном є місцями для ініціювання реакцій з цитоплазматичною мембраною. Також було продемонстровано, що діоксид хлору піддається надзвичайно швидким реакціям окислення з нікотинамідаденіндинуклеотидом (НАДН), який є ключовим коферментом у багатьох біологічних окисно-відновних реакціях, а також у синтезі аденозинтрифосфату (АТФ).

Висловлено думку, що діоксид хлору інактивує бактеріальні клітини не шляхом лізису, а шляхом дифузії через зовнішні та цитоплазматичні мембрани, збільшуючи їхню проникність та викликаючи вивільнення життєво важливих компонентів клітин, що, по суті, призводить до їхньої інактивації.

Отримані в даній роботі [5] результати кореспондуються із власними дослідженнями автора [6] щодо високого біоцидного ефекту діоксиду хлору по відношенню до актуальних збудників нозокоміальних інфекцій (*P. aeruginosa, S. aureus* та гриби роду *Candida*) при їх циркуляції у воді із систем водопостачання лікарняних закладів [6].

Характеризуючи механізм синергії низького рівня діоксиду хлору на інактивацію *E. coli* хлором автори [7] описують його як послідовну процедуру. По-перше, низький рівень діоксиду хлору реагує з компонентами клітинної стінки *E. coli*, що призводить до збільшення її проникності. По-друге, підвищена проникність клітинної стінки прискорює проникнення хлору та залишкового діоксиду хлору у цитоплазму, а потім дезінфікуючий засіб

реагує з цитоплазмою та викликає загибель клітин. Крім того, співіснування залишкового діоксиду хлору та вільного хлору також відіграє активну синергетичну роль.

Висновки цієї роботи [7] є передбаченням ідей, проаналізованих у книзі, присвяченій хімії діоксиду хлору [8]. Мова іде про монографію Mischa Jütte (2023 рік) «Fundamental reaction mechanisms of chlorine dioxide during water treatment - Reactions with phenols and biomolecules during inactivation mechanisms» [9]. Це не що інше, як логічний взаємозв'зок хімії і мікробіології діоксиду хлору при інактивації бактерій. Суть ідеї полягає у тому, що в процесі інактивації бактерій діоксидом хлору утворюється вільний активний хлор як вторинний окиснювач. Їх сумісна синергічна дія полягає в тому, що діоксид хлору головним чином відповідає за пошкодження мембрани, завдяки чому утворений FAC, як вторинний окиснювач, викликає пошкодження цитоплазми.

Прикладами ефективності бактерицидної дії діоксиду хлору є видалення небезпечних опортуністичних мікробів *Legionella ssp.* та *Mycobacterium ssp.*

При порівнянні діоксиду хлору з хлором та іншими дезінфектантами з'ясувалось, що тільки діоксид хлору був єдиним дезінфікуючим засобом, здатним знизити концентрацію легіонелл у застійних зонах системи водопостачання нижче рівня виявлення після початку промивання [10].

Значення CT, розраховані за різних температур показали, що водоочисні споруди можуть досягти адекватного контролю *M. avium* за допомогою діоксиду хлору в межах очисної споруди або свердловини, забезпечуючи необхідний час контакту [11].

Робота [12] мала на меті представити огляд кінетики та механізмів інактивації вірусів діоксидом хлору. Ефективність інактивації сильно відрізняється для різних

видів вірусів. Швидкість інактивації для різних серотипів вірусів може відрізнятися більш ніж на 284%. Як правило, для досягнення 4-log видалення вірусів (значення Ct як множення концентрації на час контакту) доза діоксиду хлору варіюється в діапазоні 0,06-10 мг/л · хв. Кінетика інактивації вірусів має дві фази: початкову фазу швидкої інактивації, за якою слідує фаза хвоста. Швидкість інактивації вірусів зростає зі збільшенням pH або температури, але демонструє різні тенденції зі збільшенням концентрації розчиненої органічної речовини (DOM). Пошкодження вірусних білків та 5'-некодуючої області в геномі сприяють інактивації вірусу після дезінфекції діоксидом хлору.

Головна мета роботи [13] полягала в оцінці рівнів інактивації *C. parvum oocyst* діоксидом хлору. Встановлено, що енергія активації діоксиду хлору на шість одиниць перевищувала значення, раніше знайдені для озону [14]. Це спостереження дозволяє припустити, що рівні інактивації *C. parvum oocyst* діоксидом хлору і озоном можуть бути ідентичними.

Порівняльні дані ефективності діоксиду хлору та інших засобів дезінфекції по відношенню до *N. gruberi* свідчать, що діоксид хлору при pH=9 і 25°C наближається до озону по ефективності [15].

Головний механізм інактивації діоксидом хлору бактеріальних спор полягає у пошкодженні внутрішньої мембрани спори. Це зумовлює порушення проникності плазматичної мембрани пророслої спори, попередником якої є внутрішня мембрана спори [16].

За даними [17] альгацидна дія діоксиду хлору полягає у впливі і на структури захисного покриття клітини, і на внутрішньоклітинні компоненти. Знебарвлення хлорофілу після окислення ясно вказує на пошкодження фотосинтетичного апарату та

супроводжується збільшенням розчиненого органічного вуглецю, що відображає екстрацелюлярне виведення внутрішньоклітинного вмісту.

Результати показують, що завдяки своїй сильній окислювальній здатності діоксид хлору може руйнувати клітинну стінку, що призводить до витоку внутрішньоклітинних сполук та зміни форми. Механізм інактивації грибкових спор діоксидом хлору подібний до механізму інактивації бактерій, вірусів та найпростіших. Наприклад, діоксид хлору пошкоджує плазматичну мембрану *Candida albicans* головним чином шляхом пермеабілізації (процес збільшення проникності клітинної мембрани для певних речовин, що зазвичай не можуть легко проходити через неї). За іншими даними, діоксид хлору може викликати у спорах витік білків, ДНК, полісахаридів, іонів калію та кальцію [18].

Дослідження ефективності діоксиду хлору і хлориту на гетеротрофні бактерії, суспендовані і у біоплівці, незалежно від матеріалу [19] продемонструвало, що хлорит неефективний в інактивуванні. Діоксид хлору забезпечував інактивацію на рівні log 1,6-1,8 для суспендованих бактерій та тільки на 1 log інактивації для гетеротрофних бактерій у біоплівці при низькій концентрації 0,25 мг/л. Практична реалізація цих даних полягає в необхідності забезпечення залишкової концентрації діоксиду хлору, а не покладатися на знезаражуючу активність хлориту у зменшенні росту гетеротрофних бактерій у питній воді з водорозподільних систем.

Аналізуючи дезінфекційні механізми діоксиду хлору, автори роботи [20] висловлюють певні думки, які після їх переосмислення слід сформулювати у вигляді перспективи подальших досліджень.

Потрібні подальші дослідження для повного

розуміння механізмів інактивації діоксидом хлору патогенних мікроорганізмів, генів антибіотикорезистентності (ARG) та токсинів.

Діоксид хлору нестабільний і має тенденцію розкладатися при нагріванні або під дією світла, що вимагає підготовки на місці для негайного використання. Розробка дезінфікуючих засобів із повільним вивільненням діоксиду хлору привернула значну увагу дослідників, але залишаються та потребують подальшого вирішення проблеми досягнення стабільної швидкості вивільнення.

Оскільки ClO_2 є неспецифічним окисним дезінфікуючим засобом, численні дослідження вивчали бактерицидний механізм ClO_2. Однак недостатньо досліджень його впливу на клітини тварин і рослин. Тому при використанні ClO_2 для цілей дезінфекції та стерилізації потенційний вплив на здоров'я людей і тварин залишається критичною сферою, яка потребує подальших досліджень.

Слід визнати необхідним продовження досліджень впливу реальних концентрацій діоксиду хлору та його похідних (хлоритів і хлоратів), які виникають у процесі очищення та знезараження питної води, на стан здоров'я споживачів із врахуванням реальних умов споживання води для пиття.

Саме це буде предметом аналітичних досліджень у наступній книзі під назвою «Токсикологія».

Література

1. Peleg, M. (2021). Modeling the dynamic kinetics of microbial disinfection with dissipating chemical agents: A theoretical investigation. *Applied Microbiology and Biotechnology, 105*, 539–549. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11042-8

2. Benarde, M. A., Snow, W. B., & Olivieri, V. P. (1967). Chlorine dioxide disinfection: Temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology, 15*(1), 159–165.
3. Berg, J. D., Matin, A., & Roberts, P. V. (1982). Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology, 44*(4), 814–819.
4. Berg, J. D., Hoff, J. C., Roberts, P. V., & Matin, A. (1988). Resistance of bacterial subpopulations to disinfection by chlorine dioxide. *Journal of the American Water Works Association, 80*(9), 115–119. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1988.tb03016.x
5. Ofori, I., Maddila, S., Lin, J., & Jonnalagadda, S. B. (2018). Chlorine dioxide inactivation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in water: The kinetics and mechanism. *Journal of Water Process Engineering, 26*, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.09.001
6. Mokienko, A. V. (2009). *Ekologo-gigienicheskie osnovy bezopasnosti vody, obezzarazhennoi dioksidom khlora* [*Ecological and hygienic principles of the safety of water disinfected with chlorine dioxide*] (Dissertation for the degree of Doctor of Medical Sciences, specialty 14.02.01). State Institution "A. N. Marzeev Institute of Hygiene and Medical Ecology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine". Kyiv. 348 p.
7. Yang, W., Yang, D., Zhu, S.-Y., Chen, B.-Y., Huo, M.-X., & Li, J.-W. (2012). The synergistic effect of Escherichia coli inactivation by sequential disinfection with low-level chlorine dioxide followed by free chlorine. Journal of Water and Health, 10(4), 557–564. https://doi.org/10.2166/wh.2012.067

8. Mokiienko, A. *Dioksyd khloru. Tom 1. Khimiia.* Monograph. [Chlorine Dioxide. Vol. 1. Chemistry. Monograph]. 2026. 424 c. URL https://eprints.oa.edu.ua/id/eprint/9664/1/Dioksyd_hloru_T.1.pdf
9. Jütte M. Fundamental reaction mechanisms of chlorine dioxide during water treatment - Reactions with phenols and biomolecules during inactivation mechanisms. Darmstadt, Technische Universitat Darmstadt. 2924. 252 p. P. 7-42. ISSN0721-5282 ISBN 978-3-940897-75-6 URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-241973 URI: https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/24197
10. Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F., & Levi, Y. (2005). Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *Journal of Water and Health, 3*(4), 423–434. https://doi.org/10.2166/wh.2005.047
11. Vicuna-Reyes, J. P., Luh, J., & Marinas, B. J. (2008). Inactivation of *Mycobacterium avium* with chlorine dioxide. *Water Research, 42*(6–7), 1531–1538. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.035
12. Ge, Y., Zhang, X., Shu, L., & Yang, X. (2021). Kinetics and mechanisms of virus inactivation by chlorine dioxide in water treatment: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 106*(4), 560–567. https://doi.org/10.1007/s00128-021-03137-3
13. Ruffell, K. M., Rennecker, J. L., & Marinas, B. J. (2000). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. *Water Research, 34*(3), 868–876. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00273-2
14. Rennecker, J. L., Marinas, B. J., Owens, J. H., &Rice, E.W. (1999). Inactivation of *Cryptosporidium parvum*

oocysts with ozone. *Water Research, 33*(11), 2481–2488. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00432-8

15. Chen, Y. S. R., Sproul, O. J., & Rubin, A. J. (1985). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. *Water Research, 19*(6), 783–789. https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90214-9
16. Young, S. B., & Setlow, P. (2003). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology, 95*, 54–67. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01847.x
17. Sukenik, A., Teltch, B., Wachs, A. W., et al. (1987). Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Water Research*, *21*(5), 533–539. https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90061-3
18. Wen, G., Xu, X., Huang, T., Zhu, H., & Ma, J. (2017). Inactivation of three genera of dominant fungal spores in groundwater using chlorine dioxide: Effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Water Research, 125*, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.019
19. Gagnon, G. A., Rand, J. L., O'Leary, K. C., et al. (2005). Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water Research, 39*(9), 1809–1817. 1817. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.030
20. Yu, J., Qiao, Y., Jin, R., Jia, M., Liu, J., He, Z., & Liu, Z. (2024). Application of chlorine dioxide and its disinfection mechanism. *Archives of Microbiology, 206*, 400. https://doi.org/10.1007/s00203-024-04137-7

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРА

Андрій Вікторович Мокієнко, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, доцент кафедри громадського здоров'я та фізичного виховання Національного університету «Острозька академія», м. Острог, Рівненська область; старший науковий співробітник Державної наукової установи «Центр морської геології, геоекології та осадового рудоутворення Національної академії наук України», м. Київ; доцент кафедри медсестринства і громадського здоров'я Приватного вищого навчального закладу «Медико-природничий університет», м. Миколаїв.

Основні напрямки наукових досліджень: гігієнічні, біологічні, технологічні, токсикологічні, епідеміологічні, медико-екологічні аспекти водопостачання і водовідведення об'єктів комунального господарства і транспорту, використання і охорони природних лікувальних ресурсів; експертиза поверхневих, мінеральних, питних вод, водоочисного устаткування; питання регламентації технологій обробки, розливу, контролю і нормування якості фасованих мінеральних і питних вод; проблеми лікарняних інфекцій.

Автор і співавтор понад 900 наукових праць, у тому числі 27 монографій, 9 фрагментів монографій, підручника (у двох томах), 5 навчальних, 3 учбових посібників, 2 курсів лекцій, присвячених основним питанням гігієни та медичної екології, зокрема водопостачання та водовідведення, використання природних лікувальних ресурсів, лікарняних інфекцій.

Автор фундаментальних та прикладних концепцій та гіпотез: персистувально-мультиваріантного ризику патогенів питної води; формування мультиантибіотикобіоцидорезистентності на основі принципів супрамолекулярної хімії; обґрунтування важливості гормезісу як ключової ланки формування резистентності мікроорганізмів до хлору; гіпотези щодо трансформування бактерій під впливом наднизького впливу факторів довкілля; переформатування ролі біоплівок від антагонізма до синергізму з людиною; механізму формування у водному середовищі органомінеральних комплексів ціанотоксинів із катіонами важких металів як нового класу ксенобіотиків; математичного моделювання впливу води поверхневих

водойм як фактора ризику на здоров'я населення; пропозиції щодо скасування аграгованого нормування кремнію та магнію у питній воді; концепції токсико-, пато- та соціогенезу; нових підходів щодо визначення детермінант здоров'я як системоутворювальних чинників громадського здоровья; обгрунтування перегляду нормативів вмісту хлоритів і хлоратів у питній воді після очищення та знезараження діоксидом хлору.

Співзасновник (із проф. С.Е. Шибановим) нового наукового напрямку «Рекреаційна екогігієна».

Засновник та науковий редактор журналу «Вода: гігієна та екологія» (видавався із 2013 по 2019 рр.).