



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

## کارایی روش‌های ترکیبی گندزدایی در غیرفعال سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس

حسن اصلانی<sup>۱</sup>، رامین نبی‌زاده<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به پیچیدگی، پرهزینه و زمان بر بودن روش‌های شناسایی ائوسبست‌های کریپتوسپورییدیوم و کیست‌های ژیا ردیا از اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس بعنوان شاخص میکروبی جایگزین این باکتری‌ها در مطالعات گندزدایی استفاده می‌شود. هدف این مطالعه بررسی امکان‌پذیری کاربرد ترکیب پراکسید هیدروژن به همراه یون‌های مس و نقره در غیرفعال‌سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس بوده است. همچنین تاثیر یک ترکیب گندزدای جدید با پایه گلو تار آلدئید که برای گندزدایی سطوح کاربرد دارد نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

**روش بررسی:** برای تهیه اسپورها، باکتری رویشی بر روی یک محیط ضعیف (عاری از مواد مغذی کافی) کشت داده و پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  اسپورهای رشد کرده از روی محیط شستشو داده شده و تلخیص گردید. از سوسپانسیون اسپورها برای تهیه نمونه‌های سنتتیک اولیه استفاده گردید. کارایی فرایند گندزدایی با مقایسه تعداد اولیه اسپور و تعداد آن در انتهای فرایند بصورت لگاریتم کاهش بیان گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که غلظت‌های پایین هیچ‌یک از ترکیبات قادر به غیرفعال سازی اسپورها نبوده است. بالاترین راندمان کاهش اسپورها با میزان  $1/48$  لگاریتم کاهش، مربوط به ترکیب  $\text{HP}/\text{Cu}^{+2}$  بوده و ترکیب  $\text{HP}/\text{Ag}^{+}$  با میزان کاهش  $1/03$  لگاریتم در رتبه دوم قرار داشته است. حداکثر میزان کاهش اسپورها توسط گندزدای با پایه گلو تار آلدئید برابر  $0/6$  لگاریتم بدست آمد. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت اسپورها حتی در برابر ترکیبی از چند گندزدا نیز بسیار بالا است. قدرت اسپورکشی عوامل گندزدای استفاده شده در این مطالعه به ترتیب،  $\text{HP}/\text{Cu}^{+2} < \text{HP}/\text{Ag}^{+} < \text{گندزدای گلو تار آلدئیدی بود}$ .

### اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

**واژگان کلیدی:** اسپور، باسیلوس سوبتیلیس، گندزدایی، پراکسید هیدروژن

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

Rnabizadeh@tums.ac.ir

## مقدمه

عوامل بیماری‌زای موجود در آب نظیر اووسیست‌های کریپتوسپوریديوم و کیست‌های ژیا‌ردیا مقاومت بسیار بالایی در برابر گندزدهای متداول در صنعت تصفیه آب نظیر کلر و مونوکلرامین از خود نشان می‌دهند (۱-۳). روش‌های مورد استفاده برای شمارش ژیا‌ردیا و کریپتوسپوریديوم پیچیده، گران قیمت و زمان بر بوده، بنابراین استفاده از آنها برای پایش متداول عملی نیست (۴). در مطالعات متعددی از شاخص‌های میکربی یا شاخص‌های جایگزین این عوامل بیماری‌زا برای بررسی کارایی فرایند گندزدایی در تصفیه آب استفاده شده است. اسپورهای هوازی گونه باسیلوس بعنوان جایگزین مناسبی برای ارزیابی کارایی فرایند گندزدایی پیشنهاد شده است (۴، ۵). برای ارزیابی کارایی فرایند ترکیبی پراکسید هیدروژن و یون‌های فلزی در غیرفعال‌سازی عوامل بیماری‌زا از اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس بعنوان شاخصی برای پارازیت‌های پروتوزوایی نظیر کریپتوسپوریديوم پاروم در این مطالعه استفاده گردید. مزایای استفاده از اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس در مطالعات شامل عدم بیماری‌زایی آن برای انسان و سادگی تشخیص و شمارش آنها است. این ویژگی‌ها سبب شده تا از آنها بعنوان شاخص مناسبی در مطالعات پایلوت استفاده شود (۱، ۶).

کلر زنی به سبب راندمان بالا، هزینه کم و ایجاد باقیمانده آزاد، از قدیمی‌ترین و متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای حذف میکروارگانیسم‌های موجود در آب و فاضلاب است (۹-۷). بزرگترین عیب کلر زنی آب افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (که بالقوه بیماری‌زا هستند) و نیز تولید ترکیباتی نظیر تری‌هالومتان‌ها و هالواستیک اسیدها است، که از نظر سلامت مصرف‌کنندگان بسیار خطرناک بوده و در طبقه‌بندی ترکیبات سرطانزا در گروه B2 و C (ترکیبات سرطان‌زای احتمالی برای انسان) قرار می‌گیرند (۱۰). لذا تلاش برای جایگزین نمودن کلر و سایر گندزدهای متداول از موضوعات مهم مطالعات سال‌های اخیر بوده است. امروزه در

مطالعات مختلف استفاده از فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته در گندزدایی آب مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶-۱۱). به کارگیری ترکیب پراکسید هیدروژن و یون‌های مس و نقره برای گندزدایی فاضلاب و کاهش کلی فرم‌های مقاوم به حرارت و باکتری‌های بیماری‌زا در مطالعات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج مطلوبی ارائه شده است (۱۷، ۱۸). مکانیسم اصلی گندزدایی با پراکسید هیدروژن تولید رادیکال‌های آزاد هیدروکسیدی است که با قدرت اکسیداسیون بالا (۲/۷ V) به دیواره سلولی و غشاء عوامل میکربی حمله کرده و آنها را از بین می‌برد. علاوه بر این انتشار ماده گندزدا به داخل سلول و غیرفعال کردن آنزیم‌ها، آسیب به اجزای داخل سلولی و ایجاد اختلال در سنتز پروتئین نیز می‌تواند در از بین بردن باکتری‌ها و ویروس‌ها توسط مواد اکسید کننده نقش داشته باشد. رادیکال هیدروکسید با اغلب ملکول‌های بیولوژیکی (با سرعت کنترل شده) وارد واکنش می‌شود. بنابراین، قدرت گندزدایی رادیکال هیدروکسیل احتمالاً بوسیله میزان انتقال جرم از طریق دیواره سلولی محدود می‌شود (۱۹). در این مطالعه امکان‌پذیری کاربرد ترکیب پراکسید هیدروژن به همراه یون‌های مس و نقره در غیرفعال‌سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر یک ترکیب گندزدا جدید با پایه گلو‌تار آل‌دئید که برای گندزدایی سطوح کاربرد دارد نیز در غیرفعال‌سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## تهیه اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس

سوش استاندارد باسیلوس سوبتیلیس (فرم رویشی باکتری ATCC 6633) از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و بر روی محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) به مدت ۲۴ h در دمای ۳۵ °C (داخل انکوباتور) رشد داده شد. برای تولید اسپور، کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط TSA در شرایط استریل بر روی یک محیط کشت ضعیف بنام Antibiotic

از رقت‌های مورد نظر ۱ mL را با استفاده از پمپ خلاء از روی فیلتر عبور داده و سپس فیلتر بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۰/۰۱۵ g/L تریپان بلو قرار داده شده و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h انکوبه گردید. پس از این مدت تعداد کلنی‌های رشد کرده شمارش شده و با واحد CFU/mL بیان شد.

#### آماده سازی نمونه و گندزدایی

برای تهیه نمونه آب حاوی اسپور از نمونه‌های سنتتیک استفاده گردید. به این ترتیب که ۱ الی ۲ mL از سوسپانسیون اسپور آماده شده را به ۱ L آب استریل (آب شهری اتوکلاو شده)، اضافه کرده و غلظت اسپورهای اولیه شمارش گردید.

برای مطالعه تاثیر گندزداها در غیرفعال سازی اسپورها از ترکیب پراکسید هیدروژن و یون‌های نقره و مس بعنوان عوامل گندزدا استفاده شد. علاوه بر این تاثیر یک گندزدای جدید با پایه گلو تار آلدئید (ترکیبی از آلدئید، آمونیوم چهارتایی و الکل) نیز مورد بررسی قرار گرفت. جزئیات ترکیب این گندزدا در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. برای غیرفعال سازی اسپورها غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن و یون‌های مس و نقره به کار برده شد. جدول شماره ۲ شرایط مختلف گندزدایی بکار برده شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. پس از سپری شدن زمان تماس مورد نظر برای شمارش

Assay Medium 32 (که همان Medium شماره ۱ حاوی ۰/۳ g/L سولفات منگنز است) انتقال داده شده و به مدت ۵ الی ۷ روز در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. پس از خارج نمودن محیط‌های کشت حاوی اسپور از داخل انکوباتور، اسپورهای رشد کرده با ۱۰ mL سرم فیزیولوژی به داخل لوله سانتریفوژ ۱۵ میلی لیتری شستشو داده شد. برای تغلیظ اسپورها از سانتریفوژ ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min استفاده گردید. برای تلخیص بهتر اسپورها، هر سوسپانسیون اسپور را سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شستشو داده و عمل سانتریفوژ مجدداً تکرار گردید و در هر مرتبه مایع رویی دور ریخته شد. برای اطمینان از غیرفعال شدن همه باکتری‌های رویشی، سوسپانسیون نهایی اسپورها به مدت ۱۰ الی ۱۵ min در حمام آب داغ ۸۰°C نگهداری شده و اسپورهای تهیه شده تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگهداری شد (۴).

#### شمارش اسپورها

برای شمارش اسپورها از روش ممبران فیلتر (متد شماره ۹۲۲۲) کتاب استاندارد متد، چاپ ۲۰۱۲ استفاده گردید (۲۰). روش کار به این صورت بود که ابتدا محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۰/۰۱۵ g/L تریپان بلو آماده شده سپس رقت‌های متوالی از نمونه خام با استفاده از سرم فیزیولوژی تهیه گردید.

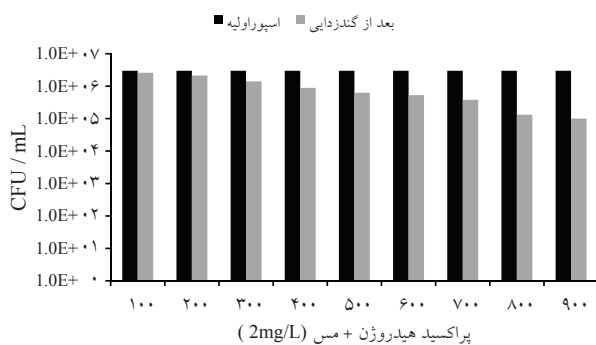
جدول ۱- درصد اجزاء تشکیل دهنده گندزدای گلو تار آلدئیدی در یک لیتر محلول

ردیف	نام ترکیب	درصد	ردیف	نام ترکیب	درصد
۱	دی دسیل دی متیل آمونیوم کلراید	۱۰	۴	گلی اکسال	۳/۲
۲	گلو تار آلدئید	۴	۵	ایزوپروپیل الکل	۵
۳	فرمالدئید	۳/۱۵	۶	عامل تثبیت کننده	۱۰۰mL

جدول ۲- شرایط گندزدایی استفاده شده

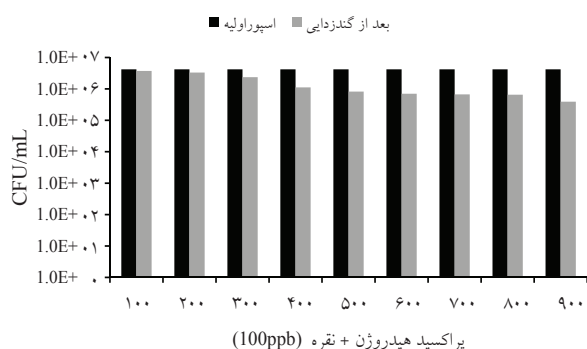
ترکیب گندزدا	HP+Cu <sup>2+</sup> (ppm)	HP + Ag <sup>+</sup>	گندزدای گلو تار آلدئیدی %
غلظت	۱۰۰ - ۹۰۰ + ۲	(۱۰۰ - ۹۰۰ ppm) + ۱۰۰ ppb	۰/۵-۲
زمان تماس (min)	۶۰	۶۰	۶۰

اسپورها نداشته است. بیشترین تاثیر ترکیب به کار برده شده در غلظت‌های ۸۰۰ و ۹۰۰ mg/L HP بوده که قادر به کاهش اسپورها به ترتیب به میزان ۱/۳۶ و ۱/۴۸ لگاریتم بوده است.



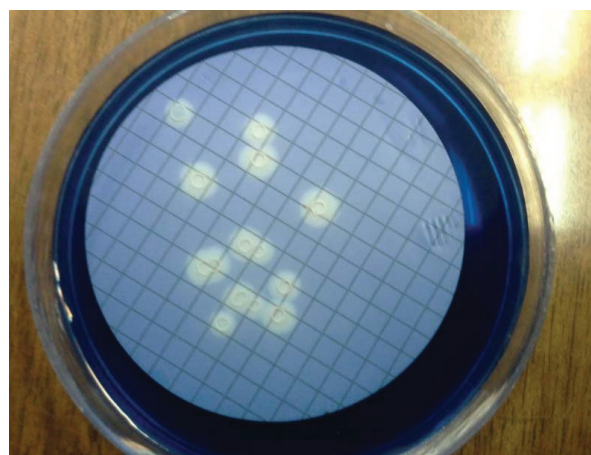
شکل ۲- تاثیر ترکیب  $HP+Cu^{2+}$  در غیرفعال سازی اسپورهای *B.Subtilis*

نتایج تاثیر ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره در غیرفعال سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس در شکل ۳ نشان داده شده است، همان طوری که ملاحظه می‌شود این ترکیب در غلظت‌های پایین‌تر از ۴۰۰ mg/L HP (ترکیب شده با ۱۰۰ppb یون نقره) تاثیری در غیرفعال سازی اسپورها نداشته و بیشترین تاثیر ترکیب به کار برده شده در غلظت‌های ۸۰۰ و ۹۰۰ mg/L HP بوده که قادر به کاهش اسپورها به ترتیب به میزان ۰/۸۱ و ۱/۰۳ لگاریتم بوده است.



شکل ۳- تاثیر ترکیب  $HP+Ag$  در غیرفعال سازی اسپورهای *B.Subtilis*

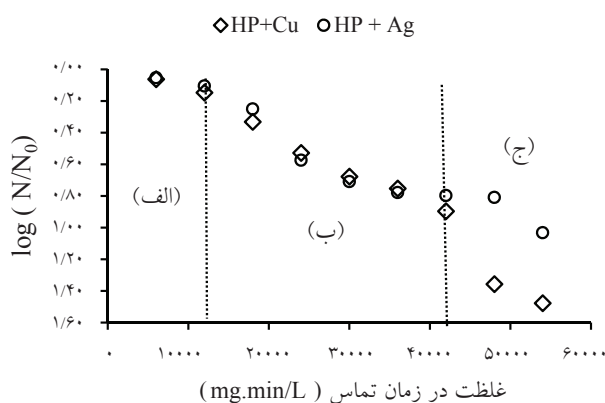
اسپورهای باکتری در نمونه آب گندزدایی شده، آن را با گرمای  $80^{\circ}C$  به مدت ۱۲ min تیمار نموده (این کار برای مطمئن شدن از نابود شدن همه باکتری‌های رویشی صورت می‌گیرد) و با استفاده از روش فیلتراسیون غشایی با فیلتر  $0.45 \mu m$  و بر روی محیط تریپان آگار کشت داده شد. حجم نمونه عبوری برای شمارش بعد از گندزدایی بسته به قدرت گندزدا و بار میکروبی اولیه متفاوت بوده اما بطور کلی در مورد گندزداهای ضعیف مقدار ۱ mL با رقت مناسب ( $10^{-3}$  تا  $10^{-5}$ ) مقدار مناسب‌تری است. کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط نوترینت آگار با هاله سفید و لبه‌های موجدار که در کنارها رو به بیرون رشد می‌کنند، قابل شناسایی است (شکل ۱). اختلاف تعداد اسپورها در نمونه اولیه و پس از گندزدایی برای تعیین میزان کارایی گندزداهای بکار برده شده مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱- اسپورهای رشد کرده بر روی محیط نوترینت آگار حاوی تریپان بلو

### یافته‌ها

شکل ۲ نتایج تاثیر ترکیب پراکسید هیدروژن و یون مس دو ظرفیتی در غیرفعال سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس را نشان می‌دهد، همان طوری که در شکل نشان داده شده است این ترکیب در غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ mg/L HP (ترکیب شده با ۲ mg/L یون مس) تاثیری در غیرفعال سازی



شکل ۴- میزان کاهش لگاریتمی اسپورها در برابر پارامتر C.T

روند کاهش لگاریتمی اسپورها در زمان تماس یک ساعته با گندزدهای  $HP+Cu^{2+}$  و  $HP+Ag^{+}$  در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ملاحظه می‌شود در غلظت‌های بالاتر پراکسید هیدروژن میزان اثر سینرژیستی یون مس در کارایی HP برای غیرفعال سازی اسپورهای *B.Subtilis* بیشتر از یون‌های نقره بوده است، بطوری‌که در نمودار ملاحظه می‌شود زمانی که غلظت  $HP$   $900 \text{ mg/L}$  با  $2 \text{ mg/L}$  یون مس ترکیب شده میزان تاثیر آن بر روی کاهش اسپورها در مقایسه با ترکیب HP با یون نقره حدود  $1/68$  برابر بوده است.

جدول ۳ نتایج آنالیز رگرسیونی متغیرهای پراکسید هیدروژن، یون مس و یون نقره را نشان می‌دهد. همان طوری که در این جدول دیده می‌شود هر سه متغیر ذکر شده بصورت معنی داری میزان کاهش اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس را تحت تاثیر قرار داده است.

جدول ۳- ضرایب مدل رگرسیونی متغیرهای مستقل

P-value	آماره t	خطای استاندارد	ضرایب	
$8/25E-05$	$-4/77023$	$0/08669$	$-0/413563$	عرض از مبدا
$7/39E-09$	$8/842156$	$0/000129$	$0/0011427$	پراکسید هیدروژن
$1/14E-06$	$6/535382$	$0/040869$	$0/267096$	یون مس
$4/52E-05$	$5/012485$	$0/817384$	$4/0971278$	یون نقره

رشد کرده بدلیل تراکم زیاد اسپورها تا رقت‌های  $10^{-3}$  وجود نداشت، که این امر نشان‌دهنده این موضوع است که باید از رقت‌های بالاتری استفاده شود. با انجام مجدد آزمایش ملاحظه می‌شود که محلول گندزدا در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد تعداد اسپورها را به ترتیب  $0/55$  و  $0/6$  لگاریتم کاهش داده است.

نتایج غیرفعال سازی اسپورهای *B.Subtilis* با استفاده از گندزدای گلو تار آلدئیدی (که اغلب برای گندزدایی سطوح مورد استفاده قرار می‌گیرد)، در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود، در غلظت‌های  $0/5$  تا  $2$  درصد گندزدای گلو تار آلدئیدی امکان شمارش اسپورهای

جدول ۴- نتایج غیرفعال سازی اسپوره‌های باسیلوس سوبتیلیس با گندزدای آلدئیدی

تعداد اسپور پس از گندزدایی				تعداد اولیه	غلظت
۱۰ <sup>-۴</sup>	۱۰ <sup>-۳</sup>	۱۰ <sup>-۲</sup>	۱۰ <sup>-۱</sup>	اسپور	گندزدای آلدئیدی %
—	غ ق ش	—	غ ق ش*	۲/۶E+۰۶	۰/۵
—	—	غ ق ش	غ ق ش	۲/۶E+۰۶	۱
—	—	غ ق ش	غ ق ش	۲/۶E+۰۶	۲
۱۱۲	—	—	—	۴/۰E+۰۶	۱
۹۹	—	—	—	۴/۰E+۰۶	۲

\* غیر قابل شمارش

## بحث

مطالعه لگاریتم کاهش اسپور در برابر C.T سه ناحیه متمایز را در نمودار نشان داد، همان طوری که در شکل شماره ۴ ملاحظه می‌شود در مقادیر C.T بین ۶۰۰۰ تا ۶۰۰۰۰ mg.min/L ۱۲۰۰۰ شیب کاهش برای هر دو ترکیب (نقره و مس) بسیار کند بوده، (قسمت الف در شکل شماره ۴)، بطوری که برای هر دو ترکیب پراکسید هیدروژن و نقره و پراکسید هیدروژن و مس میزان کاهش لگاریتمی اسپورها بین ۰/۰۵ تا ۰/۱ قرار داشته است. ملاحظه می‌شود که در این ناحیه علی‌رغم استفاده از دوزهای بالای پراکسید هیدروژن و زمان تماس بالا هیچ‌یک از ترکیبات بکار برده شده قادر نبوده تا کاهش قابل توجهی در تعداد اسپورها بوجود آورد. دلیل احتمالی این امر می‌تواند به وجود پوشش ضخیم لیپیدی در دیواره سلولی نسبت داده شود که مانع انتشار HP به داخل سلول می‌شود، علاوه بر این احتمالاً پروتئین‌های موجود در دیواره سلول قبل از اینکه HP به هسته اسپور برسد، آن را اکسید می‌کنند (۲۱). در مطالعه Mamane و همکاران در سال ۲۰۰۷، استفاده از ترکیب UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> قادر به کاهش اسپوره‌های باسیلوس سوبتیلیس از آب نبوده و نتایج با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۹). در

ناحیه (ب) تا C.T=۴۲۰۰۰ mg.min/L میزان کاهش لگاریتمی برای هر دو ترکیب تقریباً یکسان بوده و با افزایش C.T با شیب ملایمی افزایش پیدا کرده و در نهایت به میزان ۰/۹ لگاریتم کاهش رسیده است. در ناحیه (ج) برای دو ترکیب (HP+Ag<sup>+</sup> و HP+Cu<sup>+2</sup>) وضعیت متفاوتی وجود دارد. بطوری که در مورد ترکیب HP/Ag<sup>+</sup> با افزایش C.T از ۴۲۰۰۰ تا ۴۸۰۰۰ mg.min/L راندمان کاهش تغییری پیدا نکرده و ثابت باقی مانده است، اما پس از این نقطه تا انتهای زمان گندزدایی (C.T=۵۴۰۰۰ mg.min/L) کاهش لگاریتمی با شیب تندی افزایش پیدا کرده و به ۱/۰۳ لگاریتم کاهش رسیده است. در مورد ترکیب HP/Cu<sup>+2</sup> در ناحیه (ج) ملاحظه می‌شود که وضعیت در مقایسه با HP/Ag<sup>+</sup> متفاوت بوده و نمودار کاهش اسپورها با شیب تندتری کاهش پیدا کرده است. همچنین مقایسه دو ترکیب HP/Cu<sup>+2</sup> و HP/Ag<sup>+</sup> در این ناحیه نشان می‌دهد که قدرت اسپور کشی ترکیب اولی نسبت به دومی بالاتر بوده است، بطوری که در مقدار C.T برابر ۵۴۰۰۰ mg.min/L توانایی ترکیب HP/Cu<sup>+2</sup> در غیرفعال سازی اسپورها حدود ۱/۶۸ برابر بالاتر از ترکیب HP/Ag<sup>+</sup> بوده، که تایید کننده نتایج مطالعات قبلی است (۱۸، ۲۲، ۲۳).

### نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که مقاومت اسپورها در برابر گندزدهای متداول نظیر کلر و امثال آن بسیار بالا بوده است، انتظار می‌رفت استفاده از ترکیب چند عامل گندزدا قادر به غیرفعال سازی این عوامل در آب باشد، اما نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت اسپورهای باکتری باسیلوس سوبتیلیس بسیار بالا بوده و مواد گندزدا بکار برده شده قادر به کاهش موثر آنها نبوده است. حداکثر کاهش لگاریتمی بدست آمده برابر با  $1/48$  لگاریتم بود که به ترکیب  $HP/Cu^{2+}$  مربوط می‌شد. بالاترین میزان کاهش بدست آمده از ترکیب  $HP/Ag^+$  برابر با  $1/3$  لگاریتم بود. قدرت اسپور کشی عوامل گندزدا استفاده شده در این مطالعه به ترتیب،  $HP/Cu^{2+} < HP/Ag^+$  گندزدا گلاتار آلدئیدی بوده است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران در سال ۹۴ با کد ۲۸۴۶۸-۲۷-۰۱-۹۴ است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اجرا شده است.

### منابع

1. Radziminski C, Ballantyne L, Hodson J, Creason R, Andrews RC, Chauret C. Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study. *Water Research*. 2002;36(6):1629-39.
2. Hayes J, Kirf D, Garvey M, Rowan N. Disinfection and toxicological assessments of pulsed UV and pulsed-plasma gas-discharge treated-water containing the waterborne protozoan enteroparasite *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Microbiological*

با توجه به اینکه در استفاده از ترکیب پراکسید هیدروژن و فلزاتی نظیر آهن و مس (فرایند فتون و شبه فتون) تولید رادیکال‌های هیدروکسیدی اصلی‌ترین عامل از بین بردن عوامل میکروبی هستند (۱۷، ۱۸)، بنابراین چنین بنظر می‌رسد که یون‌های  $Cu^{2+}$  در مقایسه با  $Ag^+$  رادیکال‌های آزاد بیشتری تولید کرده و کارایی بیشتری در غیرفعال‌سازی اسپورها از خود نشان داده است.

با دقت در جدول ۳ ملاحظه می‌شود که ترکیب گندزدا گلاتار آلدئیدی در غلظت‌های بیش از یک درصد قادر به غیرفعال‌سازی اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس بوده است. ماده موثر دی‌سیل دی‌متیل آمونیم کلراید جدیدترین ترکیب از خانواده آمونیم چهارتایی بوده و به علت فقدان حلقه بنزنی نسبت به سایر ترکیبات این گروه پایدارتر است. این ترکیب با تاثیر بر دیواره سلولی باعث رسوب سیتوپلاسم شده، همچنین ورود آلدئیدها را به سلول میکروارگانیسم تسهیل می‌نماید. ترکیبات آلدئیدی موجب اختلال در سنتز RNA و DNA سلول میکروارگانیسم شده و باعث کوآگولاسیون و تخریب پروتئین میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. گروه الکل در این ترکیب اثر آنتی‌سپتیک و دترجنت داشته و باعث کامل شدن اثرات این ضدعفونی کننده می‌گردد (۲۴).

- Methods. 2013;94(3):325-37.
3. Choi Y, Cho M, Lee Y, Choi J, Yoon J. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores during ozonation in water treatment plant: Influence of pre-treatment and consequences for positioning of the ozonation step. *Chemosphere*. 2007;69(5):675-81.
  4. Rice EW, Fox KR, Miltner RJ, Lytle DA, Johnson CH. Evaluating plant performance with endospores. *Journal-American Water Works Association*. 1996;88(9):122-30.
  5. Nieminski EC, Bellamy WD, Moss LR. Using surrogates to improve performance. *Journal-American Water Works Association*. 2000;92(3):67-77.
  6. Driedger A, Staub E, Pinkernell U, Mariñas B, Köster W, von Gunten U. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Water Research*. 2001;35(12):2950-60.
  7. Gyürék LL, Finch GR. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*. 1998;124:783-93.
  8. Liberti L, Lopez A, Notarnicola M, Barnea N, Pedahzur R, Fattal B. Comparison of advanced disinfecting methods for municipal wastewater reuse in agriculture. *Water Science and Technology*. 2000;42(1-2):215-20.
  9. Luna-Pabello V, Rios MM, Jimenez B, Orta De Velasquez M. Effectiveness of the use of Ag, Cu and PAA to disinfect municipal wastewater. *Environmental Technology*. 2009;30(2):129-39.
  10. Liberti L, Notarnicola M. Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture. *Water Science and Technology*. 1999;40:235-45.
  11. de Velasquez MTO, Yanez-Noguez I, Jimenez-Cisneros B, Pabello VML. Adding silver and copper to hydrogen peroxide and peracetic acid in the disinfection of an advanced primary treatment effluent. *Environmental Technology*. 2008;29(11):1209-17.
  12. Debowski M, Krzemieniewski M. The influence of Fenton's reagent on the raw sludge disinfection. *Environment Protection Engineering*. 2007;33(1):65-76.
  13. Ragab-Depre NJ. Water disinfection with the hydrogen peroxide-ascorbic acid-copper (II) system. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982;44(3):555-60.
  14. Omidbakhsh N. A new peroxide-based flexible endoscope-compatible high-level disinfectant. *American Journal of Infection Control*. 2006;34(9):571-77.
  15. Pedahzur R, Shuval HI, Ulitzur S. Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: Their bactericidal effects and possible modes of action. *Water Science and Technology*. 1997;35(11-12):87-93.
  16. Selvakumar A, Tuccillo ME, Muthukrishnan S, Ray AB. Use of Fenton's reagent as a disinfectant. *Remediation Journal*. 2009;19(2):135-42.
  17. Ramin N, Mahmood A, Hasan A, Alireza M, Kazem N, Reza N, et al. Comparative study of Fenton's reagent performance in disinfection of raw wastewater and activated sludge effluent. *Desalination and Water Treatment*. 2012;37(1-3):108-13.
  18. Aslani H, Nabizadeh R, Alimohammadi M, Mesdaghinia A, Nadafi K, Nemati R, et al. Disinfection of raw wastewater and activated sludge effluent using Fenton like reagent. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):149.
  19. Mamane H, Shemer H, Linden KG. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;146(3):479-86.
  20. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington DC: American Public Health Association; 2005.
  21. Riesenman PJ, Nicholson WL. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(2):620-26.
  22. Mohammad K, Ramin N, Kazem N, Hassan I, Zeinab Y, Mehdi A. Disinfection of aerated lagoon effluent using Hydrogen peroxide and silve complex. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2012;14(3):39-46.
  23. Nabizadeh Nodehi R, Aslani H, Alomohammadi M, Nemati R, Naddafi K, Ghany M. Performance Comparison of Fenton and Fenton Modified with Copper in Raw Wastewater Disinfection for reuse in Agriculture. *Iranian Journal of Health and Environ-*



ment. 2012;5(2):189-200 (in Persian).

24. Kimiafaam Pharmaceutical Co. KIMIA DESPAC DAC FORTE. Tehran: Kimiafaam Pharmaceutical Co.; 2015 [cited 2016 Jul 13]. Available from: <http://www.kimiafaam.com/a/allp/dis1/6.php>.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Effect of combined disinfection techniques for inactivation of *B. Subtilis* spores

H Aslani<sup>1</sup>, R Nabizadeh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 9 November 2015;

**Accepted:** 11 January 2016

**Key words:** Spore, *Bacillus Subtilis*, disinfection, hydrogen peroxide.

**\*Corresponding Author:**

*Rnabizadeh@tums.ac.ir*

**Mob:** +9888951582

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** Considering the complexity, cost, and time-consuming techniques of detecting *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, *B. subtilis* spores have been introduced as microbial indicators of these pathogens to evaluate the efficacy of disinfection studies. The present study was aimed to investigate the feasibility of *B. subtilis* spores inactivation using hydrogen peroxide combined with copper and silver ions. A new glutaraldehyde based compound used for surface disinfection was also tested.

**Materials and Methods:** In order to sporulation, vegetative bacteria were allowed to grow on a medium with insufficient nutrients, and after 5 days incubation at 37°C, spores were washed and purified. Spore suspension was used to prepare synthetic water. Disinfection efficiency was reported as logarithmic decrease of initial spore count.

**Results:** This research found that none of the disinfection compounds was able to spore inactivation in low initial concentration. The highest spore reduction efficiency was related to HP/Cu<sup>+2</sup> with 1.48 log inactivation, and HP/Ag<sup>+</sup> compound placed in the second rank with 1.03 log reduction. Maximum spore reduction of 0.6 log was achieved when glutaraldehyde based disinfectant was used in disinfection process.

**Conclusion:** According to the results, it can be concluded that spores are very resistant even to combination of disinfectants. Spore reduction potential of the studied compounds was as follows: HP/Cu<sup>+2</sup> > HP/Ag<sup>+</sup> > glutaraldehyde based compound.

Please cite this article as: Aslani H, Nabizadeh R. Effect of combined disinfection techniques for inactivation of *B. Subtilis* spores. Iranian Journal of Health and Environment. 2016;8(4):481-90.