

UVC-LED/自由餘氯消毒對於 MS-2 噬菌體與枯草桿菌孢子的抑制效果

*陳俊綸，**童心欣

*研究生，**教授

國立臺灣大學環境工程學研究所

摘要

紫外光發光二極體(UV-C LED)是新型的紫外光光源具有能夠選擇特定波長的能力，本研究利用紫外光發光二極體結合自由餘氯，評估其對於指標微生物 MS-2 噬菌體(coliphage)與枯草桿菌孢子(*Bacillus subtilis* spore)的抑制能力，探討在不同紫外光波長參與反應下對於殺菌能力的影響及自由基於反應中所扮演的角色，並以碘化丙啶即時定量聚合酶連鎖反應(PMA qPCR)檢視枯草桿菌孢子細胞膜在不同消毒方式下的損傷程度。由批次式殺菌實驗的結果可以發現將紫外光結 3 mg/L 之自由餘氯對 MS-2 coliphage 的抑制效果即有協同作用(synergistic)出現，而對於枯草桿菌孢子則需將初始自由餘氯提升到 6 mg/L 及 9 mg/L 才會有較明顯地協同作用(synergistic effect)出現，若以反應動力常數(k_{obs})進行比較，以 UV-C LED (275 nm)結合自由餘氯對於指標微生物的抑制效果皆會優於傳統低壓紫外汞燈(LPUV, 254 nm)，顯示以波長 275 nm 的紫外光更加適合作為 UV/chlorine 殺菌反應的紫外光光源使用。當在 UV/chlorine 反應中加入 t-BuOH 去除自由基後，LPUV/chlorine 和 UV-C/chlorine 對於抑制噬菌體生長能力的增強效果會分

別減少 69.2%與 84.4%，而枯草桿菌孢子在添加 t-BuOH 後，原本的增強效果更是幾乎消失，顯示 UV/chlorine 反應中自由基的生成與否確實是提升微生物抑制能力的關鍵。在碘化丙啶即時定量聚合酶連鎖反應的實驗結果發現，以 UV-C LED 在紫外光劑量 17.28 mJ/cm² 及初始餘氯濃度 6 mg/L 中暴露 12 分鐘下皆不會對枯草桿菌孢子細胞膜的通透性產生影響，但在相同反應時間下經 UV-C LED/chlorine 處理之 spo0A 功能性基因的濃度會由 10^{7.2} copy numbers/mL 下降至 10^{4.8} copy numbers/mL，顯示 UV-C LED/chlorine 能大幅地提昇對於枯草桿菌孢子細胞膜的破壞程度。

前言

消毒程序在現代自來水處理中扮演著重要角色以提供安全無虞的水源供民眾日常使用(WHO, 2006)，常見會透過添加化學消毒劑或以紫外光殺菌來抑制原水中細菌、病毒及真菌等微生物的生長。但隨著分子生物鑑定技術的日益進步，開始有研究認為傳統的淨水消毒方式並不一定能確保所有微生物真正死亡其中也包括了對人體健康有害之致病菌(Ramamurthy et al., 2014; H. Wang et al., 2013; S. Zhang et al., 2015)。

某些研究調查發現一些本身就對消毒劑具抵抗能力，或進入具活性但不可培養(Viable but nonculturable, VBNC)狀態的微生物，有機會於消毒程序中存活下來(García et al., 2007; Ramamurthy et al., 2014)，雖然自來水在輸送過程中依法規規定需維持一定餘氯濃度(0.2 ~ 1.0 ppm)來抑制微生物再次生長，但在我國大多數建物是以間接供水的方式進行供水，當自來水送達用戶端後，會先經由抽水機將水送至頂樓水塔儲存，再以重力的方式進行供水，若自來水於建物配管或水塔中停滯時間過久，水中的餘氯濃度就可能逐漸下降，可能提供微生物一個適合生長的環境(Lee et al., 2007)，讓這些仍具有活性的微生物有了再次生長的機會，且以傳統培養法檢測無法準確瞭解環境中 VBNC 狀態之可能致病菌的數量，若未經過妥善處理將可能增加人體健康的潛在風險(Oliver, 2000; Wingender et al., 2011)。因此，要如何有效提升這些對一般消毒程序具較高抵抗能力微生物的抑制效果，將會有一定挑戰。

近年來有許多將紫外光高級氧化處理程序(UV-based advanced oxidation processes, UV-AOP)應用於廢水處理及回收程序的研究，其中 UV/chlorine 是藉由紫外光催化水中的自由餘氯(free chlorine)產生 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{Cl}\cdot$ 、 $\text{Cl}_2\cdot^-$ 與 $\text{ClO}\cdot$ 等高反應性自由基(Watts et al., 2007)，這些分子不僅可以有效地降解水中的有機汙染物(Fang et al., 2014; Gao et al., 2017)，也被認為能提升對一般消毒方式具抗性微生物的殺菌能力(Rattanukul et al., 2017)。將 UV/chlorine 應用在淨水處理的消毒程序中有諸多

優點，首先，自由餘氯本身就是消毒程序中會使用到的消毒劑，因此不必額外添加氧化劑，與 UV/H₂O₂ 相比 UV/chlorine 產生自由基的效率更高，研究指出能節省約 30~38% 的能源(Fang et al., 2014; Sichel et al., 2011)，並且還能在紫外光結束照射後於水體中保持一定的餘氯濃度來維持生物穩定性。

紫外光發光二極體(UV-LED)是新型的紫外光光源，相較於傳統紫外光光源除了不會產生含汞廢棄物及較長的生命週期外，能選擇特定紫外光波長更是一大優勢(Chen et al., 2017)。紫外光波長在 UV/chlorine 反應中扮演著至關重要的角色，會直接地影響到自由餘氯光解反應的效率及產物(Yin et al., 2018)，近期的一些研究認為 UV-C LED (275 nm)/chlorine 在中性及鹼性環境中相較於傳統低壓汞燈(low pressure mercury lamp, LPUV)有著更高自由餘氯光解速率(chlorine photodecay rates)(Yin et al., 2018)，這也意味著 UV-C LED (275 nm)/chlorine 具備更高的量子產率(radical yields)，能夠提升對於水體中汙染物的降解能力(Gao et al., 2019; Kwon et al., 2018; Zou et al., 2019)。

由於 UV-C LED (275 nm) 本身就被認為是一個能有效抑制微生物生長的紫外光光源，加上又具備催化自由餘氯產生自由基的能力，因此，本研究希望同時結合這兩項優點，探討以 UV-C LED 結合自由餘氯是否能提升對於一般消毒程序具有較強抵抗能力微生物的抑制效果並與傳統汞燈進行比較。

研究方法

- (1) 評估以紫外光發光二極體結合自由餘氯對於指標微生物的抑制能力是否有協同作用(synergistic effect)出現並與傳統低壓汞燈(LPUV)進行比較。
- (2) 以 UV fluence-based inactivation rate const (k, obs)探討 OH[·]對於微生物抑制能力之影響。

結果與討論

以紫外光結合自由餘氯 (UV/chlorine)

自由餘氯受到紫外光降解後會產生一系列具有高反應性的自由基包括 OH[·]、Cl[·]及 O⁽³⁾P 等，本節將評估以 UV-C LED 結合自由餘氯對於指標微生物的抑制效果並與傳統低壓汞燈(LPUV)進行比較。批次式 UV/chlorine 殺菌實驗是於 pH 7.0, 2 mM 之磷酸緩衝溶液中進行。

MS-2 噬菌體

由圖 1 可以發現在初始濃度 3.0 mg/L 自由餘氯及紫外光共同參與反應下，不論是 LPUV 或 UV-C LED 對於 MS-2 coliphage 之抑制效果皆與單獨使用紫外光皆有顯著地提升($p < 0.05$)；單獨使用 LPUV 在 33.24 mJ/cm² 紫外光劑量下，原本僅能達到 1.71 log inactivation，但在同時結合自由餘氯(LPUV/chlorine)後可以達到 3.22 log inactivation，反應動力常數 $k, LPUV/chlorine$ MS-2 coliphage 為 0.194 cm²/mJ 和原先單獨使用 LPUV ($k, LPUV$ MS-2 coliphage = 0.0991 cm²/mJ)相比對於 MS-2 coliphage 的抑

制效果提升約 2 倍；而以 UV-C LED 作為紫外光光源結合自由餘氯之反應動力常數($k, UV-C$ MS-2 coliphage)為 0.316 cm²/mJ 和單獨使用 UV-C LED 相比更是提升了 3.3 倍。

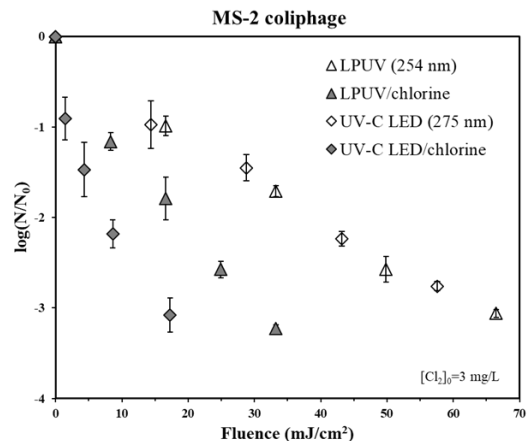


圖 1 紫外光結合自由餘氯(3 mg/L)對於 MS-2 coliphage 之抑制效果

為進一步驗證 UV/chlorine 對於 MS-2 coliphage 的抑制效果具有協同作用(synergistic effect)的出現，實驗分別以單獨使用紫外光(UV only)、單獨使用自由餘氯(chlorine only)以及同時結合紫外光與自由餘氯(UV/chlorine)三組，於相同反應時間下對於 MS-2 coliphage 之抑制效果(log inactivation)進行比較。在圖 2 中 LPUV/chlorine 於 120 秒的反應時間下能達到 3.22 log inactivation，而單獨使用紫外光(UV only)及單獨使用自由餘氯(chlorine only)則僅分別達到 1.7 log inactivation 及 0.66 log inactivation。由於同時結合紫外光與自由餘氯之 log inactivation 大於單獨使用紫外光與自由餘氯之總和，因此可以認定具有協同作用(synergistic effect)出現。而 UV-C LED/chlorine 在反應時間 720 秒下可達到 3.01 log reduction，單獨使用紫外光(UV only)

及單獨使用自由餘氯(chlorine only)則分別為 1.01 log reduction 及 0.86 log reduction，由於同時結合紫外光與自由餘氯之 log inactivation 依然大於單獨使用紫外光與自由餘氯之總和，因此也可以認定具有協同作用 (synergistic effect) 出現。

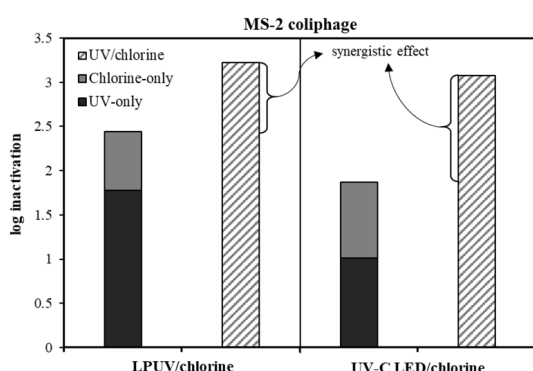


圖 2 評估 UV/chlorine 對於 MS-2 coliphage 抑制能力是否有 synergistic effect 出現

Bacillus subtilis 孢子

在初始自由餘氯濃度 3 mg/L 下 UV/chlorine 對於 *Bacillus subtilis* 孢子抑制能力並沒有顯著地提升 ($p > 0.05$)，與單獨使用紫外光殺菌相比幾乎相同。Cortezzo et al. (2004) 認為 *Bacillus subtilis* 在進入內生孢子 (endospore) 型態後，孢子外層結構中主要由蛋白質所構成的 coat 以及 inner membrane 會形成 permeability barrier 能大幅地提升 *Bacillus subtilis* 對於消毒劑的耐受性 (Setlow et al., 2000)。故推測本研究以 3 mg/L 自由餘氯結合紫外光的反應條件下，所產生之自由基可能並不足以能有效破壞孢子的外層結構，使自由餘氯依舊難進入孢子體內。

UV/chlorine 反應中自由基生成的速率主要和紫外光波長、pH 與自由餘氯劑量有關 (Kwon et al., 2018)，為進一

步提升光解反應中自由基的生成量將初始自由餘氯濃度由 3mg/L 分別提升至 6 mg/L 與 9 mg/L。當自由餘氯之初始濃度增加後，可發現 UV/chlorine 對於 *Bacillus subtilis* 孢子的抑制能力開始有增強效果出現；在初始自由餘氯濃度 6 mg/L 下反應動力常數 $k_{LPUV/chlorine, spore}$ 與 $k_{UV-C/chlorine, spore}$ 分別為 $0.381 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ 和 $0.472 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ ，而在初始自由餘氯濃度 9 mg/L 下反應動力常數 $k_{LPUV/chlorine, spore}$ 與 $k_{UV-C/chlorine, spore}$ 則會再提升至 $0.408 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ 及 $0.491 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ ，皆與單獨使用紫外光相比有著顯著提升 ($p < 0.05$)。

以 LPUV/chlorine 於 120 秒反應時間下以 3 mg/L 之自由餘氯結合紫外光並沒有協同作用 (synergistic effect) 的出現，需要將初始自由餘氯濃度增加至 6 mg/L 及 9 mg/L 後才會出現；而使用 UV-C/chlorine 在 3 mg/L 下也並沒有協同作用 (synergistic effect) 的出現，必須將初始餘氯濃度提升至 6 mg/L 以上才會出現 (圖 3)。

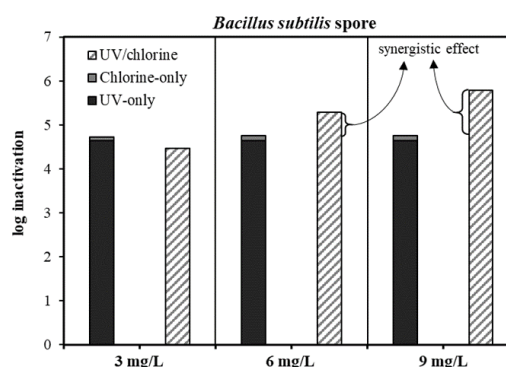


圖 3 評估以 UV-C/chlorine 對於孢子抑制能力是否有 synergistic effect 出現 (紫外光劑量 $17.28 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

比較不同紫外光光源結合自由餘氯之抑制能力

在 pH 7.0 的環境下，以 UV-C LED (275 nm) 結合自由餘氯抑制指標微生物生長的反應動力常數(k_{obs})皆會優於 LPUV (254 nm) 並有顯著地差異出現，這代表著在本研究中 275 nm 的紫外光可能更適合作為 UV/chlorine 反應中的紫外光光源來使用，與近期探討以 UV-C LED/chlorine 提升對於水中污染物降解能力的研究結果相似(Gao et al., 2019; Kwon et al., 2018; Wang et al., 2017; Zou et al., 2019)。在 UV/chlorine 反應中自由基的生成量(radical yields)與自由餘氯受紫外光的降解速率($k_{chlorine}$)有關，當自由餘氯的降解速率越快，也意味著反應中自由基生成量(radical yields)越高(Kwon et al., 2018)，代表著反應中自由餘氯受紫外光降解產生自由基速率越快，確實能增加 UV/chlorine 對於污染物去除的能力。

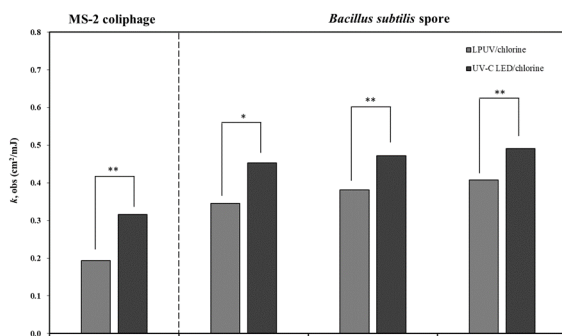


圖 4 不同紫外光光源結合自由餘氯對於指標微生物抑制能力(k_{obs})之比較

* $p < 0.05$ (雙尾檢定) ** $p < 0.01$ (雙尾檢定)

探討自由基對於 UV-C/chlorine 抑制微生物生長能力之影響

為了更進一步了解 UV/chlorine 反應所產生之自由基在抑制微生物生長能力中所扮演的角色，本節將藉由添加 t-BuOH 探討在缺少自由基參與反應下對於 UV/chlorine 殺菌能力的影響；第三丁醇又稱為叔丁醇(Tert-butanol, t-BuOH)能迅速地與 UV/chlorine 產生之自由基 OH^\cdot 及 Cl^\cdot 進行反應($k, \text{OH}^\cdot = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k, \text{Cl}^\cdot = 1.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)，經常被作為高級氧化處理研究中的 radical scavenger 使用(Gilbert et al., 1988; Wang et al., 2016)。在圖 5 中可發現 UV-C/chlorine 於添加 t-BuOH 後對於 MS-2 coliphage 的抑制效果也有明顯地下降，未添加 t-BuOH 之組別依反應常數計算在 28.8 mJ/cm^2 紫外光劑量下可達到 5.16 log inactivation，但添加 t-BuOH 之組別則僅能達到 2.78 log inactivation，添加 t-BuOH 後 UV-C LED/chlorine 的反應動力常數(k_{obs})也從原先的 0.408 (cm^2/mJ)減少至 0.159 (cm^2/mJ)對於抑制 MS-2 coliphage 存活的增強效果約減少 84.4%。

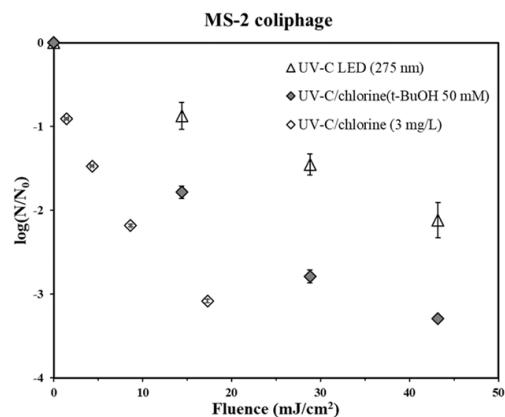


圖 5 添加 t-BuOH 對於 UV-C LED/chlorine 抑制 MS-2 coliphage 存活之影響

在圖 6 中可以發現當 UV-C/chlorine 反應中添加 t-BuOH 後，對於抑制 *Bacillus subtilis* 孢子生長的增強效果更是幾乎消失，未添加 t-BuOH 的組別在 17.28 mJ/cm² 紫外光劑量原本能達到 3.5 log inactivation，但當反應中添加 t-BuOH 去除自由基後，於相同紫外光劑量下則僅能達到 2.8 log inactivation。

由本節實驗結果顯示當缺少 UV/chlorine 反應所生成的自由基參與下，確實會大幅地降低 UV/chlorine 對於微生物的抑制能力。反應中所生成氫氧自由基具有很高的氧化力(Lester et al., 2010)，除了能夠有效地降解環境中的有機物染料外，也被認為能夠提升微生物對於消毒劑的敏感程度(Min Cho et al., 2006; Dunlop et al., 2008; Rattanukul et al., 2014)，且對於 *Bacillus subtilis* 孢子這類本身能夠抵抗消毒劑的微生物來說影響更為顯著(Li et al., 2018)。在 Forsyth et al. (2013) 研究中發現 UV/chlorine 反應中所產生之自由基能通過降解孢子 coat 上的蛋白質造成結構破損讓孢子本身的通透性增加，使自由餘氯可以更有效地進入孢子內部進而提升殺菌效果。

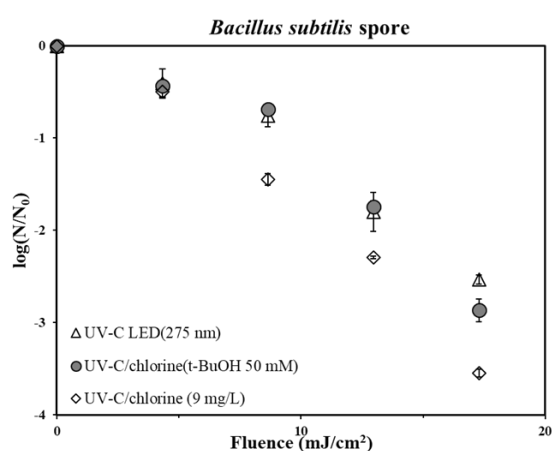


圖 6 添加 t-BuOH 對於 UV-C LED/chlorine 抑制孢子生長之影響

結論

1. 由批次式實驗結果可以發現不論是使用 LPUV 或是 UV-C LED 在結合 3 mg/L 自由餘氯之下對於 MS-2 coliphage 皆有 synergistic effect 效果出現，但對於 *Bacillus subtilis* 孢子需將起始自由餘氯提升到 6 mg/L 以上才可有較明顯的增強效果出現；若以反應動力常數進行比較 (k_{obs}) 使用 UV-C LED (275 nm) 結合自由餘氯對於指標微生物的抑制能力皆優於 LPUV，顯示以波長 275 nm 的紫外光更適合做為 UV/chlorine 應用於殺菌程序上的紫外光光源使用。
2. 在 UV/chlorine 反應中添加 t-BuOH 做為 radical scavenger 後，LPUV/chlorine 及 UV-C/chlorine 抑制 MS-2 coliphage 生長能力的增強效果會分別減少 62.9% 與 84.4%，對於 *Bacillus subtilis* 孢子，在缺少自由基共同參與反應下，原本 UV/chlorine 的增強效果更是幾乎完全消失，表示反應所生成之自由基確實是能否提升微生物抑制效果的重要關鍵。

參考文獻

1. Banihashemi, A., Van Dyke, M. I., & Huck, P. M. (2012). Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(4), 863-873. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05382.x
2. Bounty, S., Rodriguez, R. A., & Linden, K. G. (2012). Inactivation of adenovirus using low-dose UV/H₂O₂ advanced oxidation. *Water Research*, *46*(19), 6273-6278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.036>
3. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1988). Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$) in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *17*(2), 513-886. doi:10.1063/1.555805
4. Cheng, F.-C., Jen, J.-F., & Tsai, T.-H. (2002). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *Journal of Chromatography B*, *781*(1), 481-496. doi:[https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00620-7)
5. Cho, M., Gandhi, V., Hwang, T. M., Lee, S., & Kim, J. H. (2011). Investigating synergism during sequential inactivation of MS-2 phage and *Bacillus subtilis* spores with UV/H₂O₂ followed by free chlorine. *Water Res*, *45*(3), 1063-1070. doi:10.1016/j.watres.2010.10.014
6. 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.042>
7. Cortezzo, D. E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., & Setlow, P. (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(4), 838-852. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02370.x
8. Driedger, A., Staub, E., Pinkernell, U., Mariñas, B., Köster, W., & Gunten, U. v. (2001). Inactivation of *bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Water Research*, *35*(12), 2950-2960. doi:[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00577-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00577-7)
9. Dunlop, P. S. M., McMurray, T. A.,

- Hamilton, J. W. J., & Byrne, J. A. (2008). Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* spores on TiO₂ electrodes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 196(1), 113-119. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.11.024>
10. Fang, J., Fu, Y., & Shang, C. (2014). The roles of reactive species in micropollutant degradation in the UV/free chlorine system. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1859-1868. doi:10.1021/es4036094
11. 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. doi:10.1111/j.1365-2621.1986.tb10869.x
12. Forsyth, J. E., Zhou, P., Mao, Q., Asato, S. S., Meschke, J. S., & Dodd, M. C. (2013). Enhanced inactivation of *Bacillus subtilis* spores during solar photolysis of free available chlorine. *Environmental Science & Technology*, 47(22), 12976-12984. doi:10.1021/es401906x
13. Gao, Z.-C., Lin, Y.-L., Xu, B., Pan, Y., Xia, S.-J., Gao, N.-Y., . . . Chen, M. (2017). Degradation of acrylamide by the UV/chlorine advanced oxidation process. *Chemosphere*, 187, 268-276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.085>
14. Gao, Z.-C., Lin, Y.-L., Xu, B., Xia, Y., Hu, C.-Y., Zhang, T.-Y., . . . Gao, N.-Y. (2019). Effect of UV wavelength on humic acid degradation and disinfection by-product formation during the UV/chlorine process. *Water Research*, 154, 199-209. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.004>
15. Gilbert, B. C., Stell, J. K., Peet, W. J., & Radford, K. J. (1988). Generation and reactions of the chlorine atom in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 84(10), 3319-3330. doi:10.1039/F19888403319
16. Kwon, M., Yoon, Y., Kim, S., Jung, Y., Hwang, T.-M., & Kang, J.-W. (2018). Removal of sulfamethoxazole, ibuprofen and nitrobenzene by UV and UV/chlorine processes: A comparative evaluation of 275 nm LED-UV and 254 nm LP-UV. *Science of The Total Environment*, 637-638, 1351-1357. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.080>
17. Lester, Y., Avisar, D., & Mamane, H. (2010). Photodegradation of the antibiotic sulphamethoxazole in water with UV/H₂O₂ advanced

- oxidation process. *Environmental Technology*, 31(2), 175-183. doi:10.1080/09593330903414238
18. Li, G.-Q., Huo, Z.-Y., Wu, Q.-Y., Lu, Y., & Hu, H.-Y. (2018). Synergistic effect of combined UV-LED and chlorine treatment on *Bacillus subtilis* spore inactivation. *Science of The Total Environment*, 639, 1233-1240. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.240>
 19. Moan, J., & Peak, M. J. (1989). Effects of UV radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 4(1), 21-34. doi:[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(89\)80099-5](https://doi.org/10.1016/1011-1344(89)80099-5)
 20. Oliver, J. D. (2000). The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In R. R. Colwell & D. J. Grimes (Eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment* (pp. 277-300). Boston, MA: Springer US.
 21. Oncu, N. B., Menciloglu, Y. Z., & Balcioglu, I. A. (2011). Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone, and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 14(2), 196-203. Retrieved from <http://research.sabanciuniv.edu/17891/>
 22. Rattanukul, S., & Oguma, K. (2017). Analysis of hydroxyl radicals and inactivation mechanisms of bacteriophage MS2 in response to a simultaneous application of UV and Chlorine. *Environmental Science & Technology*, 51(1), 455-462. doi:10.1021/acs.est.6b03394
 23. Rattanukul, S., Oguma, K., Sakai, H., & Takizawa, S. (2014). Inactivation of viruses by combination processes of UV and chlorine. *Journal of Water and Environment Technology*, 12(6), 511-523. doi:10.2965/jwet.2014.511
 24. Riesenman, P. J., & Nicholson, W. L. (2000). 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*, 66(2), 620. doi:10.1128/AEM.66.2.620-626.2000
 25. Sichel, C., Garcia, C., & Andre, K. (2011). Feasibility studies: UV/chlorine advanced oxidation treatment for the removal of emerging contaminants. *Water Research*, 45(19), 6371-6380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.025>
 26. Wang, W.-L., Wu, Q.-Y., Huang, N., Wang, T., & Hu, H.-Y. (2016). Synergistic effect between UV and chlorine (UV/chlorine) on the

- degradation of carbamazepine: Influence factors and radical species. *Water Research*, 98, 190-198.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.015>
27. Wang, W.-L., Wu, Q.-Y., Li, Z.-M., Lu, Y., Du, Y., Wang, T., . . . Hu, H.-Y. (2017). Light-emitting diodes as an emerging UV source for UV/chlorine oxidation: Carbamazepine degradation and toxicity changes. *Chemical Engineering Journal*, 310, 148-156.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.097>
28. Watts, M. J., & Linden, K. G. (2007). Chlorine photolysis and subsequent OH radical production during UV treatment of chlorinated water. *Water Research*, 41(13), 2871-2878.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.032>
29. Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417-423.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
30. Yin, R., Ling, L., & Shang, C. (2018). Wavelength-dependent chlorine photolysis and subsequent radical production using UV-LEDs as light sources. *Water Research*, 142, 452-458.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.018>
31. Zou, X.-Y., Lin, Y.-L., Xu, B., Zhang, T.-Y., Hu, C.-Y., Cao, T.-C., . . . Gao, N.-Y. (2019). Enhanced ronidazole degradation by UV-LED/chlorine compared with conventional low-pressure UV/chlorine at neutral and alkaline pH values. *Water Research*, 160, 296-303.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.072>