

## Evaluating the disinfection power of chlorine dioxide solution in certain concentrations on spore- forming and non-spore- forming bacteria

Nima Rostami<sup>1</sup>, Vahid Tanhaei<sup>2</sup>, Zeynab Gholami<sup>3</sup>

1. Young Researchers and Elite Club, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

2. Department of biology, Faculty of Basic Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

3. Tabriz University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Hematology

### Abstract

**Aim and Background:** The Following outbreak of the corona virus pandemic on December 12, 2019 and the declaration of a state of emergency by the World Health Organization, all researchers and researchers focused on dealing with this virus. opinion to scientists, one of the solutions to deal with the spread of the corona virus was to cut off the chain of transmission through disinfection and disinfection of high-traffic places such as airports, passenger terminals, subway stations with chemicals. Therefore, the World Health Organization presented the disinfection of high-traffic places and urban gathering points in its guidelines. The purpose of this research project is to study the disinfection power of chlorine dioxide solution in the concentrations provided by the manufacturer on spore-bearing and non-spore-bearing bacteria in order to introduce a safe and efficient disinfectant to be used against the corona virus.

**Materials and Methods:** In this study, which is descriptive, the disinfection power of chlorine dioxide solution on *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria at concentrations of 1.100, 1.400, 1.800 and 1.1000 in 10 and 20 and 30 minutes were studied in three culture mediums: Blood agar, MHA and EMB. Also, the disinfecting power of the mentioned solution on *Bacillus subtilis* spore bacteria in concentrations of 1.400, 1.500, 1.600 and 1.700 for a period of 30 minutes and in tryptic broth medium was investigated. The results were analyzed by SPSS version 21 software.

**Results:** Based on the results, the chlorine dioxide solution in all the desired dilutions destroys *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria in 20 minutes. Also, chlorine dioxide only at a dilution of 1.400 and a duration of 30 minutes caused the destruction of *Bacillus subtilis* spore bacterium.

**Conclusion:** In this study, vital information was provided in the field of effective disinfection strategy of chlorine dioxide against spore-forming and non-spore-forming bacteria with different dilutions, which can be used in different dimensions for disinfection of high-traffic urban areas.

**Key words:** Chlorine Dioxide, spore- forming bacteria , non-spore- forming bacteria , disinfection Covid-19, Iau Science.

#### Corresponding author:

Young Researchers and Elite Club, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

**Email:** lueipastor3003@gmail.com

# ارزیابی قدرت ضد عفونی کنندگی محلول دی اکسید کلر در غلظت‌های معین

## بر باکتری‌های اسپورزا و غیر اسپورزا

نیما رستمی<sup>۱\*</sup>، وحید تنهایی مرند<sup>۲</sup>، زینب غلامی<sup>۳</sup>

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، تبریز، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** به دنبال وقوع پاندمی کرونا ویروس در ۱۲ دسامبر سال ۲۰۱۹ میلادی و اعلام وضعیت اضطراری توسط سازمان بهداشت جهانی، همه تمرکز پژوهشگران و محققان برای مقابله با این ویروس معطوف گردید. به عقیده دانشمندان یکی از راهکارهای مقابله با انتشار ویروس کرونا، قطع زنجیره انتقال از طریق گندزدایی و ضد عفونی اماکن پر تردد همچون فرودگاه‌ها، پایانه‌های مسافری، ایستگاه مترو با مواد شیمیایی بود. لذا سازمان بهداشت جهانی، گندزدایی اماکن پر تردد و نقاط تجمع شهری را در خط‌مشی خود ارائه نمود. هدف ما از اجرای این طرح تحقیقاتی مطالعه قدرت گندزدایی محلول دی اکسید کلر در غلظت‌های ارائه شده توسط شرکت سازنده بر روی باکتری‌های اسپوردار و فاقد اسپور به منظور معرفی یک ماده گندزدای ایمن و کارآمد برای استفاده بر علیه ویروس کرونا می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه که از نوع توصیفی می‌باشد قدرت گندزدایی محلول دی اکسید کلر بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۰، ۰/۱۰۰، ۰/۱۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰۰۰۰۰ در مدت زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ دقیقه در سه محیط کشت بلاآگار، مولر هینتون آگار و ائوزین متیلن بلو آگار مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. همچنین، قدرت ضد عفونی کنندگی محلول مذکور بر روی باکتری اسپورزای *Bacillus subtilis* در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۰، ۰/۱۰۰، ۰/۱۰۰۰، ۰/۱۰۰۰۰ در مدت زمان ۳۰ دقیقه و در محیط کشت تریپتیک سوی براث بررسی گردید. نتایج حاصل توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج حاصل، محلول دی اکسید کلر در تمام رقت‌های مورد نظر در مدت زمان ۲۰ دقیقه موجب نابودی باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه می‌شود. همچنین، دی اکسید کلر فقط در رقت ۰/۱۰۰ و مدت زمان ۳۰ دقیقه موجب نابودی باکتری اسپورزای *Bacillus subtilis* گردید.

**نتیجه‌گیری:** خاصیت گندزدایی محلول دی اکسید کلر در غلظت‌های مورد مطالعه در مقایسه با محلول‌های مشابه در نابودسازی باکتری‌های اسپورزا و غیر اسپور بسیار موثرتر بوده و محدودیت‌های استفاده از محلول‌هایی مانند پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و سایر گندزداها را نیز ندارد. در این مطالعه اطلاعات حیاتی در زمینه استراتژی ضد عفونی موثر دی اکسید کلر در برابر باکتری‌های اسپورزا و فاقد اسپور با رقت‌های مختلف فراهم گردید که می‌تواند در ابعاد مختلف جهت گندزدایی اماکن پر تردد شهری به کار برده شود.

**واژگان کلیدی:** دی اکسید کلر، باکتری‌های اسپورزا، باکتری‌های غیر اسپورزا، قدرت ضد عفونی کنندگی، کووید-۱۹، Iau.

Science

### مقدمه

دی اکسید کلر ( $\text{ClO}_2$ ) یک اکسیدان قدرتمند با طیف گسترده‌ای از فعالیت میکروبی است. بنابراین به عنوان یک ضد عفونی کننده در صنایع غذایی کاربرد قابل توجهی پیدا کرده است. در ضد عفونی آب آشامیدنی و فاضلاب، ثابت شده است که یک فناوری جایگزین عالی برای کلرینگ معمولی در

نویسنده مسئول:

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند، ایران

پست الکترونیکی: lueipastor3003@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰



در هر ۲ محیط کشت TSB حاوی اندیکاتور تیمار شده با ضدعفونی کننده در غلظت های اشاره شده در آب شهری و سرم فیزیولوژی استریل رشد اسپور مورد بررسی قرار گرفت که هر ۲ لوله منفی بودند. جهت کنترل صحت آزمایش، در یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت TSB یک اندیکاتور بیولوژیکال قرار داده شده (کنترل) و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد که پس از طی این مدت باکتری اسپور دار در محیط کشت رشد یافته و کاملاً محیط کشت را کدر کرده بود.

در مرحله دوم از آب شهری و سرم فیزیولوژی استریل رقت-های ۱ به ۵۰۰ و ۱ به ۶۰۰ و ۱ به ۷۰۰ تهیه شد. اندیکاتور باکتری اسپوردار در داخل لوله‌ها قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه تیمار گردید. سپس زیر هودلامینار تحت شرایط استریل به محیط کشت TSB انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس انتقال داده شد نتایج حاصل در این مرحله رشد باکتری اسپور دار در کلیه لوله‌ها با غلظت های اشاره شده را نشان داد.

در مرحله سوم، برای بررسی قدرت ضدعفونی محلول باید برای رقت های بالاتر غلظت ۲ به ۴۰۰ و ۲ به ۵۰۰ تهیه شد. از دو محلول آب شهری و سرم فیزیولوژی استریل غلظت ۲ به ۴۰۰ و ۲ به ۵۰۰ تهیه شد و سپس اندیکاتور باکتریایی حاوی اسپور داخل لوله آزمایش انداخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه با این رقت محلول ضدعفونی کننده تیمار داده شد سپس در شرایط استریل و زیر هود و کنار شعله به محیط کشت TSB انتقال داده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. تمام مراحل فوق، برای رقت های مد نظر تکرار شد و نتایج آن در قالب نمودارها و جداول مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

در این پروژه تحقیقاتی که با حمایت مالی شرکت طراحان فرایند شیمی سبز انجام گرفت، قدرت گندزدایی و ضدعفونی کنندگی محلول دی اکسیدکلر در محیط های کشت مختلف و در رقت‌های معین تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل از تست‌های آزمایشگاهی، محلول دی اکسیدکلر در تمام رقت‌های تعیین شده سبب غیرفعال شدن باکتری‌های E.Coli، کلبسیلاپنومونیه و باکتری اسپوردار باسیلوس سوبتیلیس شد. قدرت گندزدایی کلرین دی اکساید در جدول شماره (۱) نشان داده شده است.

نیم مک فارلند تهیه شد. سپس غلظت سوسپانسیون حاصل با کدورت نیم مک فارلند مقایسه و جذب نوری آن در دستگاه فتومتر اندازه‌گیری گردید. عدد ۰/۰۰۸ به‌عنوان جذب نوری ثبت گردید. پس از تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی با رقت‌های مدنظر، از سوسپانسیون‌ها با سمپلر ۲۰ که دارای سرسمپلر استریل می‌باشد به مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشت شد و در محیط کشت‌های بلاآگار، مولر هینتون آگار و ائوزین متیلن بلوآگار (EMB) تلقیح و کشت داده شد. لازم به ذکر است کنترل کیفی محیط کشت‌ها جهت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شدند و سپس از نظر رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. همین روند برای باکتری کلبسیلا پنومونیه نیز انجام گرفت. به منظور اطمینان و دقت نظر در فرایند انجام آزمایش‌ها، از نمونه شاهد نیز استفاده شد. در نمونه شاهد تیمار با محلول ضدعفونی انجام نشده و رشد باکتری در محیط کشت های شاهد، بیانگر صحت فرایند انجام آزمایش‌ها می‌باشد. جهت کنترل و بررسی قدرت ضدعفونی کنندگی دی اکسیدکلر بر روی باکتری‌های اسپورزا، از اندیکاتور بیولوژیکال کاغذی حاوی باکتری اسپوردار باسیلوس سوبتیلیس واریته ATCC9372 و محیط کشت تربیتیک سوی برات (TSB) استفاده شد. پس از آماده شدن محیط کشت مایع آماده مصرف TSB عملکرد ماده ضدعفونی کننده به شرح زیر بررسی گردید:

ابتدا، در دو لوله استریل از آب شهری (مطابق استاندارد ۱۰۱۱ سازمان استاندارد تحقیقات صنعتی ایران) و سرم فیزیولوژی استریل در غلظت ۱ به ۱۰۰ و ۱ به ۴۰۰ با محلول پایه ضدعفونی کننده تهیه شد. جهت نمونه برداری از آب شهری موازین استاندارد نمونه‌گیری با آب شهری مطابق پروتکل سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به شماره ۴۲۰۸ رعایت گردید. پس از تهیه رقت ۱ به ۱۰۰ و ۱ به ۴۰۰ از محلول ضدعفونی کننده، اندیکاتور کاغذی حاوی باکتری اسپوردار به داخل لوله های آزمایش اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد (تصویر شماره ۴). پس از گذشت ۳۰ دقیقه زیر هودلامینار کلاس II و در کنار شعله با پنس استریل اندیکاتورهای تیمار شده از محلول ضدعفونی کننده برداشته شد و به محیط کشت مایع TSB انتقال داده شدند. سپس محیط کشت حاوی اندیکاتور به دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شد و در این مرحله بعد از ۲۴ ساعت

جدول شماره (۱) نتایج اثربخشی کلرین دی اکساید بر روی باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه

	۱/۴۹۹	۱/۵۹۹	۱/۶۹۹	۱/۷۹۹	۱/۸۹۹	۱/۹۹۹
اشرشیاکلی	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
کلبسیلاپنومونیه	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

اطمینان بخش جهت نبود سازی باکتری مورد نظر، میزان غلظت محلول دی اکسیدکلر را دو برابر کرده و استراتژی گندزدایی تغییر داده شد. بنابراین رقت های دو برابر و سه برابر مورد بررسی قرار گرفت. جدول شماره (۲) نتایج قدرت گندزدایی کلرین دی اکساید در رقت‌های معین را نشان می‌دهد.

قدرت گندزدایی کلرین دی اکساید بر روی باکتری اسپورزای باسیلوس سوبتیلیس در رقت‌های ۱ به ۴۰۰، ۱ به ۵۰۰، ۱ به ۶۰۰، ۱ به ۷۰۰ در محیط TSB مورد مطالعه قرار گرفت. در تمامی رقت های یاد شده به جز رقت ۱ به ۴۰۰، شاهد رشد کلنی باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت بودیم. لذا به منظور دست یابی به یک دز یا غلظت

جدول (۲) نتایج حاصل از رشد و عدم رشد باکتری اسپوردار باسیلوس سوبتیلیس در رقت های مختلف

	۱/۴۰۰	۱/۵۰۰	۱/۶۰۰	۱/۷۰۰	۲/۴۰۰	۲/۵۰۰	۲/۶۰۰	۲/۷۰۰	۲/۸۰۰	۳/۶۰۰	۳/۷۰۰
آب شهری	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative
نرمال سالین	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative

محلول دی اکسیدکلر به میزان ۱ به ۴۰۰ کفایت لازم را برای نابودسازی باکتری‌های پاتوژن روده‌ای شامل اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه دارا می‌باشد. لیکن در خصوص باکتری‌های اسپورزا غلظت های مورد نیاز متفاوت می‌باشند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، میزان کمترین میزان غلظت محلول دی اکسیدکلر در آب برای نابودسازی کامل باکتری اسپورزای باسیلوس سوبتیلیس ۱ به ۴۰۰ می باشد. این عدد به این معناست که، حداقل غلظت لازم دی اکسیدکلر در آب برای نابودسازی باکتری مذکور ۱ لیتر در ۴۰۰ لیتر آب می‌باشد. با توجه به لزوم گندزدایی نقاط پرتردد شهری و اماکن عمومی همچون ایستگاه های اتوبوس شهری، فرودگاه ها، ایستگاه های قطار و مترو به منظور قطع زنجیره انتقال ویروس کرونا، اطمینان از اثربخشی محلول‌های گندزدا می‌تواند بسیار تعیین کننده باشد. بنابراین ضریب اطمینان بالایی برای استفاده از محلول دی اکسیدکلر برای نابودسازی میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته می‌شود. لذا به‌منظور دست‌یابی به یک دز

## بحث

به رغم اینکه استفاده از کلرین دی اکساید در گندزدایی منابع آبی در تصفیه خانه‌های فاضلاب شهری یک روش مرسوم می‌باشد، افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماریزا میزان اثربخشی آنرا تحت تاثیر قرار داده است. نتایج آزمایش‌های این تحقیق نشان داد که، میزان رقت‌های تهیه شده برای نابودسازی باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونه با رقت‌های تهیه شده برای نابودسازی باکتری‌های اسپورزا کاملا متفاوت می‌باشد. باکتری‌های اسپورزا از زوتوکسین‌های قوی تولید می‌کنند که در صورت ورود به بدن، سبب مرگ انسان می‌شوند. در بعضی از منابع معتبر علمی، وجود یک شیشه از ازوتوکسین کلسترییدیوم بوتولینوم عامل مولد سم بوتولیسیم برای کشته شدن تمام ساکنان کره زمین کافی است. بنابراین حذف عوامل میکروبی از منابع آب شرب، یکی از مهمترین راهبردهای دست یابی به امنیت پایدار در حوزه سلامت به‌شمار می‌رود. به استناد نتایج حاصل از این تحقیق، کمترین غلظت از

سطح ۳ و اخذ مجوزهای متعدد می‌باشد، برای انجام این تحقیق از باکتری‌های مهاجم و اسپوزا که به مراتب قویتر و مقاومتر از ویروس‌ها می‌باشند استفاده گردید. لذا اگر محلولی بتواند باکتری‌های بیماریزا را نابو کند، قطعاً توانایی نابودسازی ویروس‌ها را نیز دارد. با اینکه، در حال حاضر، قرنطینه بیماران مشکوک، استفاده از ماسک و شستشوی مداوم دست‌ها با آب و صابون مورد تاکید وزارت بهداشت ایران می‌باشد، لیکن ضدعفونی اماکن پرتدد شهری و روستایی به دلیل احتمال بالای تردد مبتلایان بدون علامت در جامعه که عامل انتقال بیماری به افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای و افزایش مرگ و میر ناشی از کووید ۱۹ می‌باشد، امری ضروری و اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد عملیات گندزدایی و ضدعفونی با محلول دی اکسید کلر در غلظت‌های مورد مطالعه ضمن مقرون به صرفه بودن به لحاظ اقتصادی، کفایت لازم برای نابودسازی باکتری‌های مهاجم روده ای و باکتری اسپوزا را دارا می‌باشد. لذا چنانچه در تهیه غلظت-های مد نظر دقت کافی به عمل آید، می‌توان با ضریب اطمینان قابل قبولی نسبت به گندزدایی اماکن پرتدد شهری و روستایی اقدام کرد.

### سپاسگزاری

لازم است از زحمات جناب آقای دکتر برقی مدیرعامل محترم شرکت طراحان فرایند شیمی سبز و جناب آقای مهندس نوروزی مدیرعامل محترم شرکت کیلین این پلاس بخاطر حمایت‌های مادی و معنوی از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری نمایم.

اطمینان بخش جهت نبود سازی باکتری مورد نظر، میزان غلظت محلول دی اکسید کلر را دو و در ادامه سه برابر کرده و استراتژی گندزدایی تغییر داده شد. قدرت گندزدایی محلول دی اکسید کلر در آب در غلظت‌های ۲ لیتر در ۴۰۰ لیتر، ۲ لیتر در ۵۰۰ لیتر، ۲ لیتر در ۶۰۰ لیتر، ۲ لیتر در ۷۰۰ لیتر و ۲ لیتر در ۸۰۰ لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها نشان داد، حداقل غلظت محلول کلرین دی اکساید در آب برای نابودسازی باکتری اسپوزا، ۲ لیتر در ۵۰۰ لیتر می‌باشد. این بدان معناست که، افزایش دو برابری غلظت کلرین دی اکساید در ۵۰۰ لیتر آب، کفایت لازم برای نابودسازی باکتری اسپوزا را دارا می‌باشد. در ادامه غلظت‌های ۳ به ۶۰۰ لیتر و ۳ به ۷۰۰ لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. به استناد نتایج حاصل، باکتری اسپوزا در هر دو غلظت مورد نظر واجد خاصیت میکروبیوساید می‌باشد و ضریب اطمینان بالایی به منظور استفاده بر علیه ویروس کرونا در اماکن پرتدد دارد. تمام مراحل آزمایش در این تحقیق بر روی آب شهری و نرمال سالین انجام شد که نتایج در هر دو نمونه مشابه گزارش گردید. نظر به اینکه، خواص میکروبیوساید محلول دی اکسید کلر در تمام آزمایش‌ها مورد نظر بوده است و رشد حتی یک کلنی از باکتری‌های اشیرشیاکلی، کلبسیلاپنومونیه و باکتری اسپوزای باسیلوس سوبتیلیس موجب رد اثربخشی صددرصدی محلول گندزدا می‌شود، لذا، انجام آنالیز آماری برای داده‌های گزارش شده امکان پذیر نبود. این تحقیق با هدف تعیین کفایت ضدعفونی‌کنندگی محلول کلرین دی اکساید برای نابودسازی ویروس کرونا در اماکن پرتدد شهری و روستایی انجام پذیرفت. اما باتوجه به اینکه انجام آزمایش بر روی ویروس کرونا نیازمند زیرساخت‌های آزمایشگاهی مانند دسترسی به آزمایشگاه

## منابع

1. Amyes SGB (2010) *Antibacterial Chemotherapy. Theory, Problems and Practice*. Oxford: Oxford University Press.
2. Daniel FB, Condie LW, Robinson M, Stober JA, York RG et al. (1990) Comparative 90-day subchronic toxicity studies on three drinking water disinfectants, chlorine, monochloramine and chlorine dioxide in the
3. Sprague-Dawley rats. *J Am Water Works Assoc* 82: 61–69.
4. Spellberg B (2009) *Rising Plague. The Global Threat from Deadly Bacteria and Our Dwindling Arsenal to Fight Them*. Amherst, NY:Prometheus Books.
5. Sanekata, T. Fukuda, T. Miura, T. Morino, H. Lee, C. Maeda, K. Araki, K. Otake, T. Kawahata, T.;Shibata, T. 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 Sci*. 2010, 15, 45–49.
6. Evans BA, Hamouda A, Amyes SGB (2013) The rise of carbapenemresistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Pharm Des* 19(2): 223-238.
7. De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez- Aguilar, G.A. (2010). *Fruit and Vegetable Phytochemicals:Chemistry, Nutritional Value and Stability*. Wiley- Blackwell: Hoboken, New Jersey, USA.
8. Andrew.J.,and Hammond . P.J. Hydrodynamic and water quality simulation of fecal coliforms in the Lower Appomattox River. Virginia. Blacksburg. VA the faculty of Virginia polytechnic Institute and State University . 2004.
9. Baetis : Environmental Services INC . chicago., TMDLs and Implementation Plans for TargetWatersheds . Illinois Environmental Protection Agency . 2004.
10. Devic, E., Guyot, S., Daudin, J., Bonazzi, C.(2010). Effect of temperature and cultivar on polyphenol retention and mass transfer during osmotic dehydration of apples. *J. Agr. Food Chem.*, 58, 606-616.
11. Ison A, Odeh IN, Margerum DW (2006) Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorg Chem* 45: 8768–8775. doi:10.1021/ic0609554. PubMed:17029389.
12. Department of Health and Nutrition Biotechnology, College of Health Science, Asia University, No. 500, Lioufeng Road, Wufeng District, Taichung 41354, Taiwan