

研究報告

淀川流域の流下に伴うノロウイルスの分布と 水中ノロウイルスのオゾンによる不活化

摂南大学薬学部 中室 克彦、大阪府立公衆衛生研究所 山崎 謙治

要 旨 下水処理場放流水からは、ヒトの食中毒の原因となるノロウイルス Genogroup I および Genogroup II がいずれも検出され、ヒト糞便由来のノロウイルスが、活性汚泥法による下水処理後においても放流水に存在することが確認できた。この下水処理場放流水の影響を受ける桂川の宮前橋においては、ノロウイルス Genogroup I 及び Genogroup II がいずれも検出されることが認められた。

臨床株であるヒト糞便由来のノロウイルスに対しては初期オゾン濃度 0.174 mg/L 以上 (19℃) において 30 秒以内に 99.9 % 不活化することを示した。本研究から、ノロウイルスが FCV よりオゾンに対して抵抗性を示すことが認められた。

キーワード : ノロウイルス、河川水、オゾンによる不活化

1. はじめに

ノロウイルスは 1968 年にアメリカの小学校で集団発生した急性胃腸炎患者から発見されたウイルスで、1972 年に電子顕微鏡でウイルス粒子が確認され¹⁾、その形態から小型球形ウイルス (small round structured virus; SRSV) と呼ばれた。2002 年には正式名称がノロウイルスとなり、現在に至っている。ノロウイルスは主として経口感染し、小腸粘膜上で増殖し、嘔吐・下痢などの胃腸炎症状を示す。ノロウイルス感染患者の糞便中には 1 g 当たりおよそ 10^8 個のウイルスが排泄される。これら尿尿中に含まれる大量のウイルスが下水中へ流入する。ノロウイルスは他の病原ウイルスよりも塩素に対する抵抗性が高く²⁾、下水処理水中に一部が残存し河川を経由し、海域へ流入し二枚貝などに蓄積される。これら二枚貝などをヒトが摂食することによって再び感染の原因となる。従って水はノロウイルス伝播の重要な感染ルートである。

オゾンは非常に強い酸化作用を有する。この酸化力が病原体に対する有効な消毒効果をもち³⁾、日本以外の多くの国で飲料水の殺菌に用いられている。しかし、ノロウイルスに対するオゾンの殺菌効果についての報告は少ない^{4,5)}。また、ノロウイルスはヒトの腸管でのみ増殖が確認されており、感染系株を用いた実験を行うことは困難である。そのためアメリカ合衆国環境保護庁 (US EPA) においてネコカリシウイルス (feline calicivirus; FCV) をノロウイルスの代替として用いることが認められている。

本研究においては、下水処理場放流水中のノロウイルスの存在を確認するとともに、それらが淀川を流下し、大阪湾に流入するまでのノロウイルスの挙動について把握するための生態調査を行う目的で、ヒトの食中毒の原因となるノロウイルス Genogroup I および Genogroup II の測定を行った。さらに、オゾン処理によるノロウイルス不活化効果について、ノロウイルスと同じカリシウイルスに属する培養可能なネコカリシウイルス (FCV) を用いて検討し、ネコ腎臓細胞 (CRFK) を用いた感染価測定による評価、および RT-PCR 法を用いてウイルス RNA の検出を行った。感染価および PCR の結果から、FCV が真に破壊されているのか、あるいは感染に必要な表面蛋白のみが破壊されて内部の遺伝子は残存しているのかどうかを実証し、ウイルス不活化効果を評価した。また、下水処理場放流水におけるオゾン殺菌の有効性についての基礎的なデータを得ることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 河川水の採取

2007 年 12 月 20 日 (木) に図 1 に示す①下水処理場 (京都市鳥羽) の放流口から、②宮前橋 (桂川)、③淀川御幸橋 (宇治川)、④御幸橋 (木津川)、⑤磯島取水口 (村野浄水場原水、淀川左岸)、⑥磯島取水口対岸 (淀川右岸)、⑦枚方大橋 (淀川中央・枚方市) に至るおよそ 18 km の区間における 7 地点で、いずれも表層水 100 L を採取し、現地で濃縮した。

2.2 河川水の濃縮

濃縮は矢野らの方法 (セルロース吸着・凝集法)⁶⁾ により行った。すなわち、下水処理場放流水と河川水いずれも 100 L あたり DEAE セルロースを乾燥重量で 30 g 添加し、よく攪拌した。これに 0.02 % アニオン系高分子凝集剤水溶液 30

mL を加えよく攪拌し、DEAE セルロースを凝集させた。凝集処理の終了した河川水を不織布バッグ（株）日研生物医学研究所）で濾過して DEAE セルロースを回収した。不織布バッグは水分を絞った後、 -20°C に保存した。DEAE セルロースを回収したバッグをビニール袋に入れ、50 mL の Beef Extract 液（1% NaCl、15% NaNO_3 、pH 9.5）を加え 5 分間、液をもみ出しウイルスを溶出した。溶出液は 1 N HCl で pH を 7 に調整した。

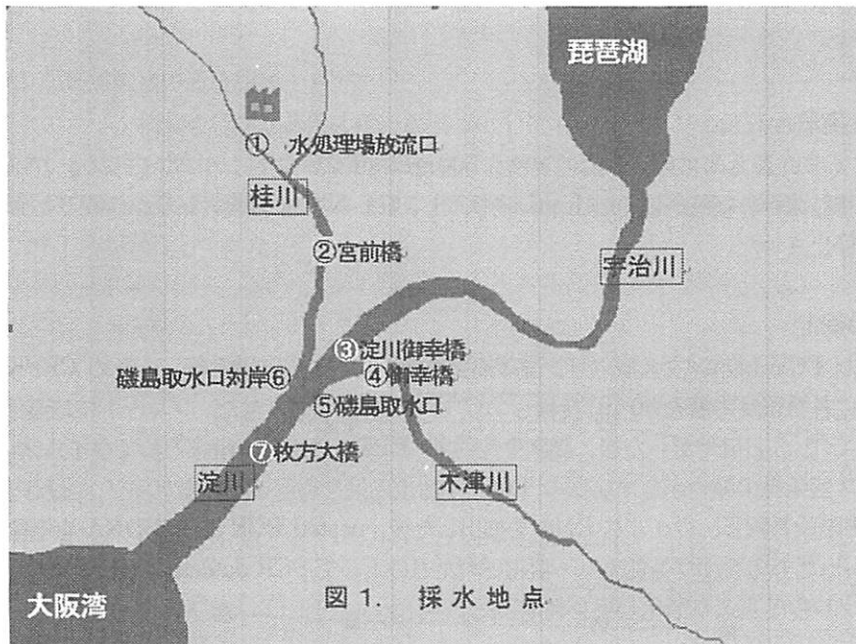


図 1. 採水地点

2.3 ノロウイルスの検出

ノロウイルスの検出には材料 0.2 mL から High pure viral RNA kit (Roche) を用いて 50 μL の RNA を抽出し、ウイルス性下痢症診断マニュアル⁷⁾ に準じた seminested PCR 法で Genogroup (G) I および II のそれぞれについて検出を行った。1st PCR にはプライマー G1-SKR (G I antisense; 5' CCA ACC CAR CCA TTR TAC A)、COG1F (G I sense; 5' CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA)、G2-SKR (G II antisense; 5' CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT)、COG2F (G II sense; 5' CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG) を用い、nested PCR には G1-SKR、G1SKF (G I sense; 5' CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA)、G2-SKR、G2-SKF (G II sense; 5' CNT GGG AGG GCG ATC GCA A) を用いた。逆転写用反応液 {DEPC 処理蒸留水 (和光純薬) 8 μL 、dNTP mix (TaKaRa; 各 2.5 mM) 4 μL 、10 \times Ex Taq 反応液 (TaKaRa) 2 μL 、G1-SKR (50 pmol) または G2-SKR (50 pmol) 1 μL 、MuLV 逆転写酵素 (Applied Biosystems; 50 U/ μL) 0.5 μL 、RNase inhibitor (TaKaRa; 40 U/ μL) 0.5 μL } に RNA を 4 μL 加え、ミネラルオイル (SIGMA) を 1 滴添加した後、 42°C で 30 分間反応させ cDNA を作成した。 94°C で 5 分間加熱し、逆転写酵素を不活化したあと 4°C に冷却し、1st PCR 反応液 {DEPC 処理蒸留水 70.5 μL 、10 \times Ex Taq 反応液 8 μL 、COG1F (50 pmol) または COG2F (50 pmol) 1 μL 、Ex Taq (TaKaRa; 5 U/ μL) 0.5 μL } を加えて軽く遠心した後、DNA thermal cycler (PERKIN ELMER) を用いてノロウイルス DNA を増幅した。PCR 反応は 94°C で 3 分加熱した後、 94°C 1 分、 50°C 1 分、 72°C 2 分を 40 サイクル行った。nested PCR は 2 μL の 1st PCR 産物を nested PCR 反応液 {DEPC 処理蒸留水 77.5 μL 、10 \times Ex Taq 反応液 10 μL 、dNTP mix (各 2.5 mM) 8 μL 、G1SKR (50 pmol) または G2SKR (50 pmol) 1 μL 、G1SKF (50 pmol) または G2SKF (50 pmol) 1 μL 、Ex Taq (5 U/ μL) 0.5 μL } に加え、ミネラルオイルを 1 滴添加した後、DNA Thermal cycler を用いてノロウイルス DNA を増幅した。PCR 反応は 94°C で 3 分加熱した後、 94°C 0.5 分、 51°C 1 分、 72°C 1 分を 35 サイクル行った。増幅されたノロウイルス DNA はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりバンドの確認を行った。

2.4 不活化実験供試ウイルス

被検ウイルスとして ATCC (American Tissue Culture Collection) より購入したネコカリシウイルス (feline calicivirus; FCV) およびノロウイルスを用いた。FCV はネコ腎臓 (CRFK) 細胞で増殖させたものを、またノロウイルスは急性胃腸炎患者糞便 10% 乳剤を用いた。両ウイルスともに 3,000 rpm で 30 分間遠心した上清を透析チューブに入れ、リン酸緩衝稀釈液中で 4°C 、2 日間透析を行った後実験に供した。

2.5 オゾン処理実験水の調製

オゾン水は精製水器 DC-210 (オルガノ社) で生成した精製水 (TOC : 0.29 mg/mL) を原水とし、電解式オゾン水生成器 AOD-TH (アイ電子工業株) を用いて生成した。オゾン水を蒸留水 (和光純薬 pH 6.1) で 5 ~ 50 倍程度に希釈し、1 L のビーカーに入れ、マグネチックスターラーで攪拌を行い、オゾンモニター EG/EL-550 (荏原実業 (株) 製) に通水しながらオゾン濃度を測定した。試料水が 500 mL になったところのオゾン濃度をオゾン処理実験水の初期濃度とした。

2.6 ウイルス不活化実験

2.5 で調製した 19 °C または 8 °C のオゾン処理実験水 500 mL に FCV または ノロウイルスを 1/1,000 量加えて攪拌し、オゾンモニターに通水しながら経時的にその 1 mL を採取し、0.1 N チオ硫酸ナトリウム液 0.1 mL を入れた試験管に入れオゾンの作用を停止させた。

2.7 ウイルス力価の測定

オゾンと反応させた FCV はハンクス液 (リン酸緩衝食塩液) で 10 倍階段希釈し、予め CRFK 細胞を培養した 96 穴マイクロプレートに各希釈反応液を 50 μ L 接種し、37 °C で 1 時間吸着させた。プレートに培養液 (イーグル MEM) 100 μ L を加え、37 °C で 5 日間培養した後、細胞変性効果 (CPE) の出現を指標としてウイルスの感染価 (TCID₅₀) を測定した。ウイルス感染価の減少からオゾンの FCV 不活化効果を判定した。またオゾンと反応させた ノロウイルスはハンクス液で 10 倍階段希釈し、ウイルス RNA を抽出した後、nested PCR により DNA を増幅し、電気泳動により DNA が検出されなかったものをオゾンにより不活化されたものとして PCR detection unit (PDU) を測定した。PDU の減少からオゾンの ノロウイルス不活化効果を判定した。

3. 結果

3.1 河川水からの ノロウイルス検出

表 1 に示すように、①下水処理場放流口および②~⑦地点の河川水 6 検体中②宮前橋、③淀川御幸橋、⑤磯島取水口、⑦枚方大橋地点の河川水 4 検体からヒトの食中毒の原因となる ノロウイルスが検出され、ノロウイルス Genogroup I は①下水処理場放流口、②宮前橋、⑤磯島取水口および⑦枚方大橋の 4 検体から、また ノロウイルス Genogroup II は前者の 4 検体に加え、さらに③淀川御幸橋地点の河川水から検出された。

表 1. 河川水からの ノロウイルス検出

採水場所	ノロウイルス	
	Genogroup I	Genogroup II
①下水処理場放流口	陽性	陽性
②宮前橋 (桂川)	陽性	陽性
③淀川御幸橋 (宇治川)	陰性	陽性
④御幸橋 (木津川)	陰性	陰性
⑤磯島取水口 (淀川左岸)	陽性	陽性
⑥磯島取水口対岸 (淀川右岸)	陰性	陰性
⑦枚方大橋 (淀川中央・枚方市)	陽性	陽性
陰性対照	陰性	陰性
陽性対照	陽性	陽性

これらの結果から、①下水処理場放流口からは、ヒトの食中毒の原因となる ノロウイルス Genogroup I および Genogroup II がいずれも検出され、ヒト糞便由来の ノロウイルスが、活性汚泥法による下水処理後においても放流水に存在することが確認できた。この下水処理場放流水の影響を受ける②宮前橋においては、ノロウイルス Genogroup I および Genogroup II がいずれも検出されることが認められた。また、④御幸橋 (木津川) では、ノロウイルスが検出されなかったが、宇治川、三川 (桂川、宇治川、木津川) 合流後の⑤磯島取水口および⑦枚方大橋地点の淀川においては、ノロウイルスがいずれも検出された。今回の調査において、大阪府営水道の取水地点である⑤磯島取水口でノロウイルス

スが検出されたが、水道水 (200 L) からはノロウイルスが検出されていない (data not shown)。

3.2 オゾンによるウイルス不活化

低濃度オゾンによるノロウイルスに対するより正確な不活化濃度を決定する目的で、用いる精製水、ウイルス添加による培地由来のオゾン消費を把握するとともに FCV およびノロウイルスに対するオゾンの不活化実験を行った。

3.2.1 低濃度オゾン処理実験水の減衰曲線

実験に用いる精製水のオゾン消費を把握するために、水温 20 °C におけるオゾンの減衰曲線を検討した。図 2 にウイルスを添加せず初期オゾン濃度 0.26 および 0.114 mg/L を有するオゾン処理実験水の水温 20 °C における減衰曲線を示した。初期オゾン濃度が 0.26 mg/L の実験水では 5 分後に 92.3 % のオゾンが残存した。同様に初期濃度 0.114 mg/L の実験水では 5 分後に 87.7 % が残存していた。

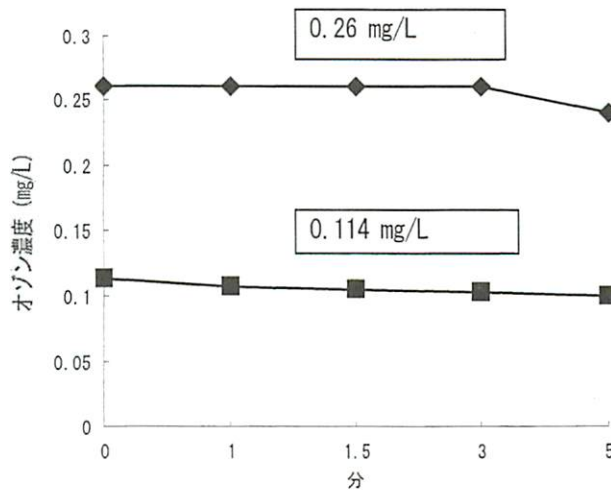


図 2. オゾン濃度の減衰曲線

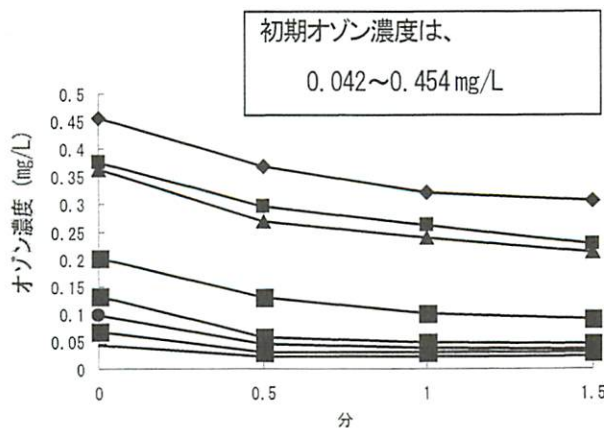


図 3. FCV 添加時のオゾン濃度の減衰曲線 (19 °C)

3.2.2 ウイルス添加低濃度オゾン処理実験水の減衰曲線

オゾン処理実験水にウイルスを添加した時のウイルスおよび培地によるオゾン消費を検討した。図 3 に示すように供試 FCV 液を 1/1,000 量の割合で加えた水温 19 °C の初期オゾン濃度 0.042 ~ 0.454 mg/L を含有する実験水のオゾン濃度は 30 秒以内にいずれも急激な減衰を示し、その後緩やかに減少した。オゾン初期濃度が低いほど減衰率が高い傾向が見られた。同様に水温 8 °C の実験水ではウイルス添加後のオゾン濃度減衰はやや緩やかであり、オゾン初期濃度にかかわらずオゾン減衰率はほぼ一定であった (図 4)。

これらの結果は、精製水のみによるオゾン消費に基づく減衰よりもはるかに大きく、とくに反応初期の減衰が大であることを認めた。この原因は、供試ノロウイルスをリン酸緩衝液で透析することによって、培地組成成分を除去したにもかかわらず、オゾン消費が大きいことから、減衰の大きい初期のオゾン消費はノロウイルスとオゾンが接触することによるノロウイルス自身によるオゾン消費に起因することが考えられた。

以上の検討結果から、ノロウイルス添加によってオゾンが消費される状態を解析した結果、オゾンの最終濃度が約3割以上減少する傾向を示した。

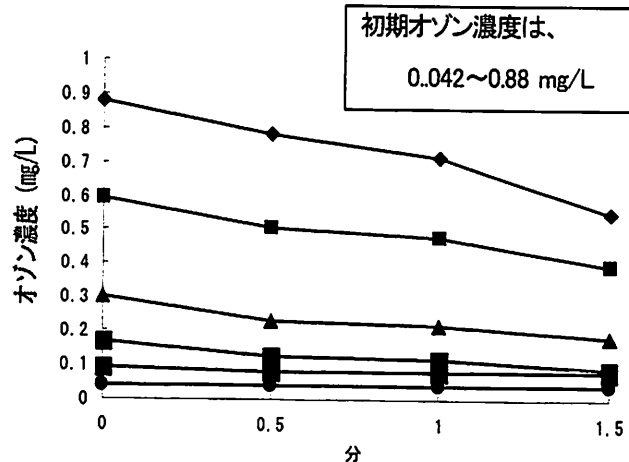


図4. FCV添加時のオゾン濃度の減衰曲線(8°C)

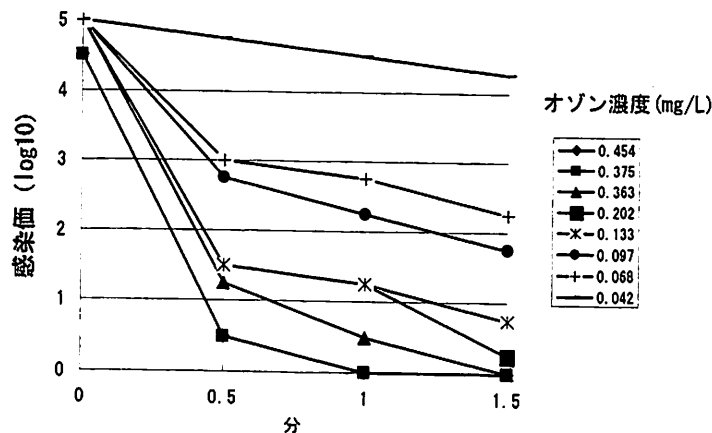


図5. オゾンによるFCV不活化効果(19°C)

3.2.3 オゾンによるFCVの不活化効果

一般にFCVの不活化効果には、RT-PCRによる方法で測定されることが多い。しかし、この方法では死滅したウイルスに由来するDNAも測定するため、正確さに欠けると言われている。そのため今回は、ウイルス感染価を用いて測定することによって評価した。また、ヒト糞便由来のノロウイルスに対する不活化効果については、不活化の判定をウイルス由来のDNAの存在の有無を nested-PCR により測定し、検出しないことを確認して PCR detection unit (PDV) の減少からオゾンのノロウイルス不活化効果を判定した。図5に示すように水温19°Cにおいてオゾンの初期濃度0.042~0.454 mg/Lの実験水に添加されたFCVはオゾン濃度0.133 mg/L以上では30秒以内に99.9%以上感染価が減少した。またオゾン濃度0.097 mg/Lでは99.9%以上不活化されるのに1.5分間を必要とした。それ以下のオゾン初期濃度ではFCVの有効な不活化は見られなかった。また反応時間を5分まで延長してもオゾンによる不活化効果が上昇することはなかった(図6)。同様に水温8°Cにおいてオゾンの初期濃度0.042~0.88 mg/Lの実験水に添加されたFCV

はオゾン濃度 0.17 mg/L 以上では 30 秒以内に 99.9 %以上感染価が減少した。またオゾン濃度 0.092 mg/L では 99.9 %以上不活化されるのに 1 分間を必要とした。それ以下のオゾン初期濃度では FCV の有効な不活化は認められなかった (図7)。

以上の FCV に対するオゾンによる不活化に関する検討結果から、オゾンの初期濃度が 0.097 mg/L (19 °C) で 1.5 分後および 0.092 mg/L (8 °C) で 1 分後に FCV を 99.9 %以上不活化することを認めた。

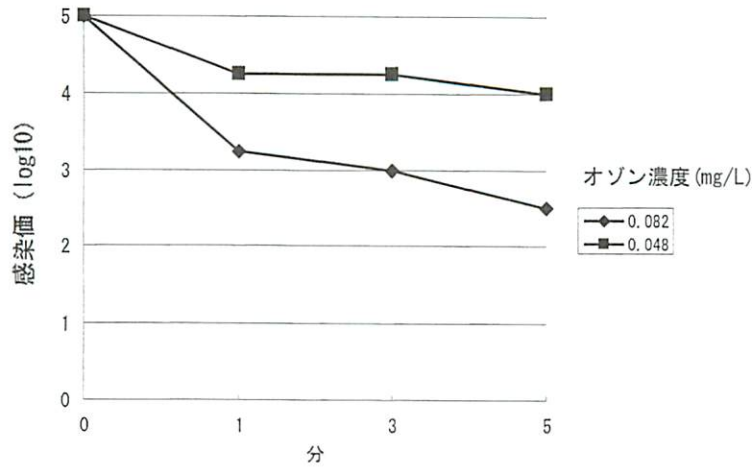


図6. オゾンによるFCV不活化効果 (19 °C)

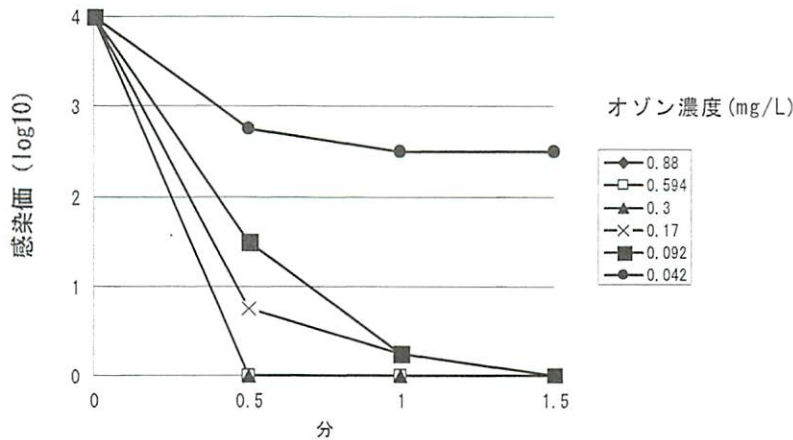


図7. オゾンによるFCV不活化効果 (8 °C)

3.2.4 オゾンによるノロウイルスの不活化効果

図8に示したように水温 19 °Cにおいてオゾンの初期濃度 0.086 ~ 0.612 mg/L の実験水に添加されたノロウイルスはオゾン濃度 0.174 mg/L では 30 秒以内に 99.9 %以上 PDU が減少し、0.408 mg/L と 0.612 mg/L においては 100 % PDU が減少した。またオゾン初期濃度 0.113 mg/L 以下ではノロウイルスの有効な不活化は認められなかった。

以上の検討結果から、臨床株であるヒト糞便由来のノロウイルスに対しては初期オゾン濃度 0.174 mg/L 以上 (19 °C) において 30 秒以内に 99.9 %不活化することを示した。この事実は、ノロウイルスが FCV よりオゾンに対して抵抗性を示すことが認められた。

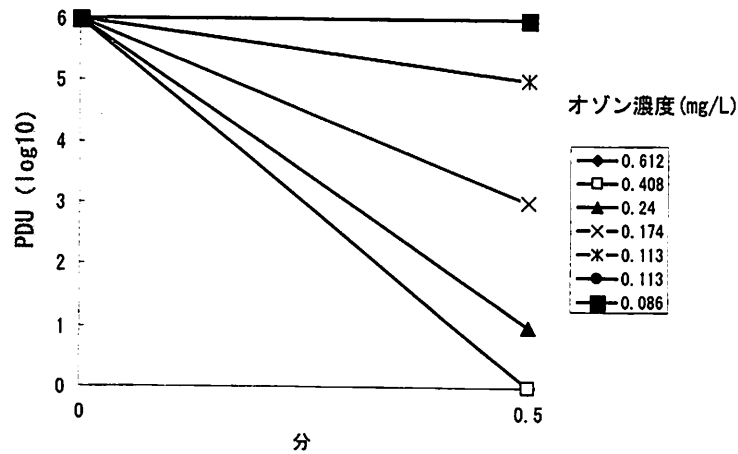


図8. オゾンによるノロウイルス不活化効果 (19°C)

4. 考察

河川水からのノロウイルスの検出は、イギリス^{8,9)}、オランダ¹⁰⁾ および日本^{11,13)} などで報告されているが、まだまだ報告例が少ない。淀川水系で行った本調査においても下水処理場放流水の放流地点から下流およそ 18 km までのほとんどの地点でノロウイルスが検出された。水中におけるノロウイルスは 4°C、20°C いずれの温度でも 2 ヶ月間は活性が保持されたという報告がなされている。本調査においても下水処理場放流水中にノロウイルスの存在を確認するとともに、下水処理場放流水から河川に排出されたノロウイルスは長時間活性を保ったまま移動することが明らかになった。河川水中のノロウイルス量は 1 L あたり数個から数千個であると考えられており^{10,13)}、特に、冬期にウイルス量が多いことが報告されている¹³⁾。このような結果から、河川がノロウイルスの主要な伝播経路になっていることが推測されるので、下水処理場放流水の塩素消毒からオゾン消毒への変更が必要であることが考えられた。

オゾンによるウイルス不活化効果が初めて報告されたのは 1953 年のことであり¹⁴⁾、それ以後多くのウイルスについて調べられているがノロウイルスについてはほとんど報告されていない。ノロウイルスの代替であるネコカリシウイルス (FCV) は水温の変化にもかかわらずオゾン初期濃度がほぼ 0.1 mg/L 以上あれば 30 秒以内に 99.9% 以上不活化されることが考えられた。低温の方が不活化効果の高いことが A 型肝炎ウイルス、ポリオウイルスで報告されている¹⁵⁾。土井ら¹⁶⁾ はわれわれと同じオゾン原水およびオゾンモニターを用いた研究で、レジオネラ属菌で FCV と同等の効果を得るにはオゾン初期濃度 0.017 mg/L が必要であると報告した。彼らの用いた実験水は pH 7.2 であり、われわれは pH 6.1 であったが、pH 6 から 8 の間でオゾンの効果に差は見られないと考えられる¹⁷⁾。従って FCV はレジオネラ属菌よりも 5 倍程度オゾンに抵抗性を有することが考えられた。

また、ヒト糞便由来のノロウイルスは FCV よりもおよそ 2 倍のオゾン抵抗性を示した。PCR によるウイルス不活化効力測定においてしばしば問題にされるのはウイルス外被タンパク質による核酸の保護、および short target PCR (300 bp 以下) により分解された核酸の PCR による増幅³⁾ である。オゾンによるウイルス核酸の攻撃はウイルスタンパク質と同等もしくはより直接的であるとされている¹⁸⁾ こと、また本研究で用いたプライマーは 300 bp 以上を増幅 (G I: 381 bp, G II: 387 bp) することから、本研究においてはオゾンによってノロウイルス RNA が破壊されているため、あるいは破壊された断片 RNA が存在しても、この断片 RNA から DNA を増幅することはなかったと考えられた。ポリオウイルスを用いた実験で PDU の減少よりも TCID₅₀ の減少の方が早いと報告された⁴⁾ ことから、FCV とノロウイルスのオゾン抵抗性の差は、オゾン濃度に依存しているよりは反応時間に依存していることが考えられた。

上水処理過程における塩素処理は、発がん性を有するトリハロメタンなどの塩素消毒副生成物を発生することによる人体影響や環境汚染が問題となっている。しかし、オゾン処理では、オゾン反応副生成物の毒性はほとんどなく、安全であるため、ヨーロッパ諸国では古くから水道の浄水処理に用いられており、大阪府営水道でも平成 10 年からオゾン処理を含む高度浄水が供給されている。今後、下水処理においてもオゾン処理を導入することが、ノロウイルス感染症などの防止対策として有効であることが考えられた。

5. 謝辞

本研究は、平成19年度 河川整備基金助成事業（助成番号 19-1214-003）によって実施した。ここに深謝いたします。また、日本医療・環境オゾン研究会のオゾン水研究会の助成を受けたことに対し深謝いたします。

6. 文献

- 1) Kapikian AZ, et al (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, **10**, 1075-1081.
- 2) Keswick BH, et al (1985) Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 261-264.
- 3) Sobsey MD. (1989) Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.*, **21**, 179-195.
- 4) Shin GA, et al (2003) Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3975-3978.
- 5) Hudson JB, et al (2007) Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J Hosp Infect.*, **66**, 40-45.
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005, 水中ウイルス試験法, 132-133, 金原出版.
- 7) 国立感染症研究所ウイルス第二部編：ウイルス性下痢症診断マニュアル（第3版）, 平成15年.
- 8) Wyn-Jones AP, et al (2000) The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Methods*, **87**, 99-107.
- 9) Laverick MA, et al (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-viruses) in water and sewage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 127-136.
- 10) Lodder WJ, et al (2005) Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1453-1461.
- 11) 入谷展弘, 他 (2002) 河川水からのNorwalk virusの検出, *生活衛生*, **46**, 137-143.
- 12) Ueki Y, et al (2005) Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.*, **39**, 4271-4280.
- 13) Haramoto E, et al (2005) Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2403-2411.
- 14) Ngazoa ES, et al (2008) Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *J Appl Microbiol.*, **104**, 707-715.
- 15) Smorodintseva OA (1953) Experimental data on application of chloridation of air in influenza. *Tr Akad Med Nauk Sssr Mosc Inst Grudn Khir*, **28**, 231-241.
- 16) 土井 均, 他 (2008) 低濃度オゾン水の*Legionella*に対する殺菌効果, 日本医療・環境オゾン研究会, 第13回研究講演要旨集, 東京.
- 17) Herbold K, et al (1989) Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2949-2953.
- 18) Roy D, et al (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 718-723.