

## Antibacterial Activity of Hydrogen-rich Water Against Oral Bacteria

Sung-Hoon Lee and Dong-Heon Baek\*

Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korea

(received April 11, 2013; revised May 9, 2013; accepted May 20, 2013)

There are estimated to be about 700 species of bacteria in the oral cavity. Based on epidemiological investigations, some of these strains have been proposed as the pathogens responsible for oral diseases such as dental caries, gingivitis and periodontitis. Since electrolyzed hydrogen-rich water has been shown to have beneficial effects on human immunity, its use has increased. In our study, the antibacterial activity of hydrogen-rich water for oral against bacteria associated with oral disease was evaluated. The bacterial strains *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* were cultured in specific growth medium. *S. mutans*, *F. nucleatum* and *P. gingivalis* were soaked to their both hydrogen water and tap water for 30 sec and then inoculated onto mitis-salivarius agar and brain heart infusion agar including supplemented with vitamin K and hemin, respectively. The numbers of bacterial colonies were then measured after cultivation for 48 hours. In the case of *T. forsythia*, which does not grow well on agar plates, inoculations into modified new oral spirochete (NOS) broth were performed and growth curve analysis was undertaken every day with a spectrophotometer. Hydrogen water showed antibacterial activity against all four bacterial strains in comparison with tap-water. We

conclude from this that hydrogen water may have a positive impact on oral hygiene by helping to remove cariogenic bacteria and periodontopathogens.

**Key words:** Hydrogen-rich water, Antibacterial activity, Oral bacteria

### 서 론

구강에서 세균성 질환은 치아우식, 치주질환으로 크게 나눌 수 있으며, 구강에 존재하는 700여종의 세균중에 이 질환과 관련된 세균을 조절하기 위해서 최근까지 많은 연구가 이루어지고 있다.

치아우식과 관련된 대표적인 세균으로는 *Streptococcus mutans*를 들 수 있으며, 이 세균은 글루코즈전이효소 (glucosyltransferase)와 프룩토스전이효소 (fructosyltransferase)를 이용하여 각각 글루칸과 프룩탄을 형성하여 구강내 바이오 필름을 성장시키며, 당 대사에 의해서 산을 생산한다[1,2]. 다른 세균과 다르게 *S. mutans*는 강한 산성환경에서도 죽지 않고 살 수 있다[3]. 이러한 특징으로 구강에서 바이오 필름을 형성하여 계속적으로 산을 생성하고 치아우식을 유발시킨다.

치주질환에 있어서 혐기성 그람 음성 세균이 관련이 있다고 여겨지고 있으며, 건강한 사람과 환자를 대상으로 역학조사 결과 치주질환 환자에서 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* 그리고 *Treponema denticola*가 많이 발견되었다[4]. 그래서 이 세균들을 위험군으로 red complex 세균군으로 지칭되었다[4,5]. 이들 세균들은 트립신 유사 효소를 분비하며, 이 효소로 치주조직을 파괴하며,

\*Correspondence to: Dong-Heon Baek, Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Dankook University, San 29 Anseo-dong, Dongnam-gu, Cheonan 330-714 Korea. Phone: +82-41-550-1997, Fax: +82-41-550-1859, E-mail: micro94@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과거에 치주질환이 진행되어 출혈되기 전에 미리 확인하기 위한 진단방법으로 이 효소와 benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA)를 이용하여 세균을 확인하였다[6]. *P. gingivalis*는 그람 음성 혐기성 세균으로 검정색 집락과 짧은 막대 모양이 특징이다[7]. 이 세균은 만성 치주질환으로 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지며, 치주병원균중 가장 많은 연구가 이루어지고 있다[8]. 특히, *P. gingivalis*의 병원성 요소로는 부착과 응집에 관련된 40 kDa의 외막단백질과 fimbriae A, 당지질 등이 있으며[9-11], 조직 침투와 관련된 트립신 유사 효소[12,13] 등이 있으며, 염증 유발 및 내독소인 lipopolysaccharide가 대표적이다[14]. *T. forsythia*의 경우 치주병원성 세균중 제일 연구가 안된 세균으로 방추모양(fusiform)이 특징이다. 이 세균은 당분해 미생물로서 여러 가지 글루코시아제를 생산한다[15]. 이는 프로테오글리칸이 풍부한 치은조직에 작용하여 치주조직을 파괴할 수 있다[7]. 또한 *T. forsythia*의 추출물을 숙주세포에 처리하면 세포사멸(apoptosis)이 발생하며[16]. Toll-like receptor 2와 T 세포의 반응에 의해서 치주골 파괴에 관여된다고 보고되었다[17].

일상생활에서 쉽게 접하는 음료수를 이용하여 치아우식균 및 치주질환 원인균에 대한 녹차, 우롱차, 보리차, 커피 등의 효과를 관찰하였다[18-20]. 이들 음용수는 *S. mutans*의 성장을 억제하거나 세균간 부착을 억제하여 구강 내 질병을 억제할 것이라 제안하였다. 또한 이들 음용수에 있는 폴리페놀이 구강의 치주질환에 관련된 IL-6 및 TNF의 생성을 억제하는 것으로 밝혀졌다[21].

최근 몇몇 전기분해 수소수가 신체 내 활성산소를 제거하여 건강에 좋다는 것과 세균을 제거한다는 효과로 사용이 늘어나고 있다. 특히, 피부질환 및 식중독 관련 세균인 *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 살균 효과가 있는 것으로 나타났다[22]. 또한 최근에는 전기분해 약알칼리수가 구강세균에 대한 항균효과를 나타내는 것으로 연구되었지만, 이 음용수는 약알칼리수로 이 연구에서 사용하려는 전기분해 수소수와 다르다[23]. 이러한 이유로 전기분해 수소수가 구강세균에 대하여 얼마나 효과가 있는지 대표적인 그람양성 및 그람 음성 병원성 세균인 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* 및 *T. forsythia*에 대해서 항미생물 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 수소수 준비

수돗물을 수소수생성기에(Hydro Health Inc., Kwangju, Kyunggi) 넣고 5분동안 실온에서 동작시켜 수소수를 생성시켰다. 수소수생성실은 양극과 음극이 분리되지 않은 상태이며,

수소수를 생성하고 10분내에 사용하였다.

### 세균 및 세균 배양

한 종의 치아우식균과 3종의 치주질환 관련 세균을 이 연구에 사용하였으며, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 및 *Tannerella forsythia* ATCC 43037를 American type culture collection에서 구매하였다. *S. mutans*는 brain heart infusion (BHI; BD bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) 액체배지에서 배양하였으며, *P. gingivalis* 및 *F. nucleatum*은 BHI 액체배지에 5 µg/ml의 헤민(hemin)과 0.2 µg/ml의 비타민 K를 첨가한 배지에서 배양하였으며, *T. forsythia*는 약간의 변형된 new oral spirochete (NOS) 액체배지에 0.2 µg/ml의 비타민 K와 0.01 µg/ml의 N-acetylmuramic acid[24]를 이용하여 혐기성 상태(5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 및 85% N<sub>2</sub>), 37°C에서 배양하였다.

### 구강 미생물에 대한 항미생물 효과 관찰

치아우식균인 *S. mutans* 및 치주질환 관련세균인 *F. nucleatum*, *P. gingivalis* 및 *T. forsythia*를 배양한 후, 4,000 × g에서 10분간 원심분리하여 세균을 얻었다. 상층액을 제거하고 흡광도계를 이용하여 흡광도가 (660 nm) 0.5되게 새로운 배지를 넣어주었다. 세균 부유액 1 ml을 취한 후 4,000 × g에서 10분간 원심분리하여 세균침전을 얻은 후에 전기분해 수소수 및 수돗물과 30초간 반응시켰다. 각각의 세균을 연속희석법에 의해서 10배씩 희석한 후에 *S. mutans*는 Mitis-salivarius (BD bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) 고체배지에 접종하였으며, *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*는 BHI에 비타민 K와 헤민이 들어간 고체배지에 접종하여 37°C 혐기상태에서 각각 48시간, 72시간 배양하였다. 고체배지에서 성장이 잘 안되는 세균인 *T. forsythia*는 NOS배지에 비타민 K와 N-acetylmuramic acid를 첨가한 액체배지에 접종하여 37°C, 혐기상태에서 배양하고 시간대별로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계학적 유의성

수소수, 수돗물 및 대조군과의 통계학적 유의성은 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 전체 수치에 대한 유의성은 Kruskal-wallis 검정으로 분석하였으며, 각각 그룹간의 유의성은 Mann-Whitney 검정을 이용하여 분석하였다. 통계학적 유의성은  $p < 0.05$ 로 결정하였다.

## 결 과

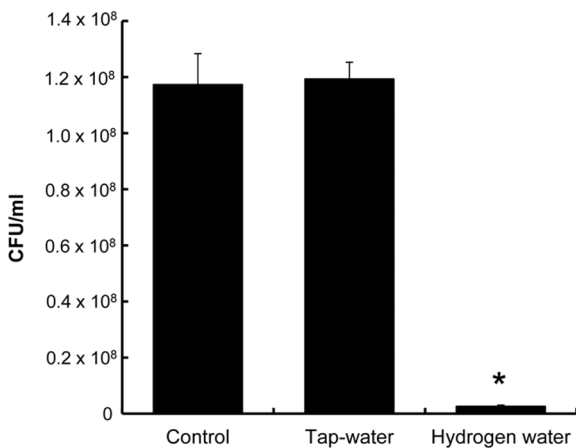
### 수소수 특징

전기분해한수소수에 대한 물질 특성을 알아보기 위해

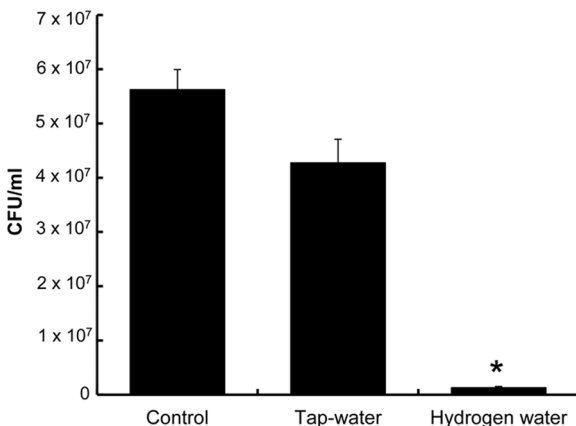
서 pH를 측정한 결과 수돗물의 경우  $\text{pH}7.24 \pm 0.06$ 이며 전기분해한수소수는  $\text{pH}7.21 \pm 0.04$ 로 나타났다. 수돗물과 수소수의 pH수치는 유의적인 차이가 없었다.

### 구강세균에 대한 수소수의 항균효과

전기분해 수소수의 항미생물 효과를 치아우식 관련 세균인 *S. mutans*에 대하여 먼저 조사해보았다. 수소수는 97% 정도의 세균을 제거하였으며, 수돗물은 아무런 효과를 보이지 않았다(Fig. 1). 다음으로 치주질환과 관련된 *F. nucleatum*, *P. gingivalis* 및 *T. forsythia*에 대해서 항균효과를 관찰하였다.

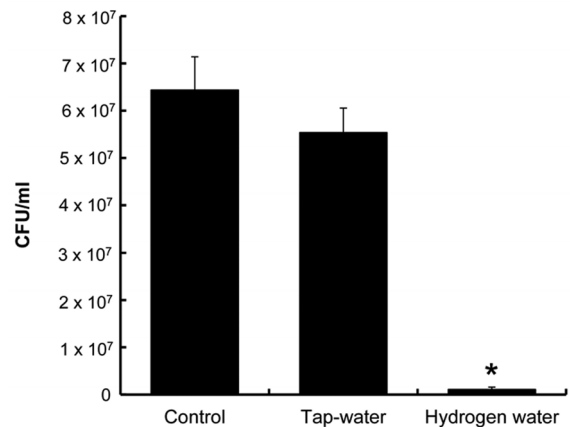


**Fig. 1.** Antibacterial activity of hydrogen water for *S. mutans*. *S. mutans* was cultured, soaked in hydrogen water and Tap-water for 30 sec and inoculated on MS agar medium. The graph showed means value after duplicated three times. \*significant difference was compared to control ( $p < 0.05$ ).

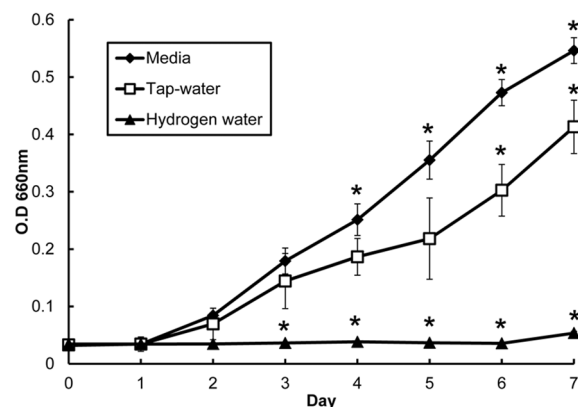


**Fig. 2.** Antibacterial activity of hydrogen water for *F. nucleatum*. *F. nucleatum* was cultured, soaked to hydrogen water and Tap-water for 30 sec and inoculated on BHI agar medium supplemented with vitamin K and Hemin. The graph showed means value after duplicated three times. \*significant difference compared with control ( $p < 0.05$ ).

*F. nucleatum*에 대해서도 수소수가 대략 98% 정도의 항미생물 활성을 나타내어  $5.6 \times 10^7$  CFU/ml에서  $1.3 \times 10^6$  CFU/ml로 유의적으로 감소시켰으며, 수돗물의 경우는 약간 감소하였지만 통계학적으로 유의하지 않았다(Fig. 2). Fig. 3에서와 같이 *P. gingivalis*의 경우도 마찬가지로 수소수에 대해서 감수성을 나타냈으며, 수소수가 *P. gingivalis*를 사멸시키는 것으로 나타났다. *T. forsythia*의 경우는 고체배지에서 배양이 잘 되질 않아, 액체배지의 성장곡선을 이용하여 수소수의 항균효과를 관찰하였다(Fig. 4). 수소수에 노출시킨 *T. forsythia*는 성장이 나타나지 않았으며,



**Fig. 3.** Antibacterial activity of hydrogen water for *P. gingivalis*. *P. gingivalis* was cultured, soaked to hydrogen water and Tap-water for 30 sec and inoculated on BHI agar medium supplemented with vitamin K and Hemin. The graph showed means value after duplicated three times. \*the significant difference was compared to non-treated bacteria ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Susceptibility of *T. forsythia* against hydrogen water. *T. forsythia* was cultured with modified NOS, exposed to hydrogen water and Tap-water for 30 sec and inoculated on NOS broth medium supplemented with vitamin K and N-acetylmuramic acid. The growth of bacteria was measured with spectrophotometer. The examinations were performed three times. \*the significant difference compared with control ( $p < 0.05$ ).

이는 *T. forsythia*가 수소수에 의해서 사멸되었다는 것을 의미한다. 수돗물도 항미생물 효과를 보였지만 수소수만큼 완벽하게 항균효과를 나타내지는 못하였다.

## 고 찰

구강 보건에 대한 관심은 삶의 질이 높아져 갈수록 사람들의 관심 대상이 되고 있어, 세균성 구강질환을 예방하기 위해 최근 구강양치액의 사용이 증가하고 있다[25]. 구강에는 정상세균총과 질병을 야기하는 병원성 세균이 존재하는데, 정상세균총은 구강 환경에 사람에게 질병을 일으키는 세균의 집락 형성을 억제하는 역할을 하지만, 특정한 환경의 변화에 의해서 질병을 야기하는 세균의 수가 늘어나면 치아우식이나, 치은염 및 치주질환 같은 질병이 발생한다[26,27]. 질병 유발 세균을 제거하기 위한 구강양치액은 대부분 소독제이어서 구강의 바이오필름 형성을 억제하는데 효과가 있다. 그러나 매일 사용하며 구강환경의 변화를 일으켜 구강내 세균의 생태계를 변화시킬 수 있다[28]. 그래서 최근 일상생활에서 쉽게 접하는 음료수에 대하여 연구가 많이 이루어지고 있으며, 현재까지 녹차, 우롱차, 보리차, 커피 등 일상생활에서 섭취하는 음용수에 대해서 연구 결과가 나왔다[18-20]. 이들 음용수는 구강세균의 성장을 억제하거나 세균간 부착을 억제하여 구강내 질병을 억제할 것이라 제시하였으며, 음용수에 포함된 폴리페놀이 구강의 치주질환에 관련된 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하는 것으로 밝혀졌다[21].

최근 전기분해 수소수가 활성산소를 제거하여 건강을 증진시키는 것과 피부 염증 및 식중독 관련 세균에 대한 살균 효과가 있어 사용이 늘어나고 있다. 이러한 이유로 이번 연구에서는 전기분해 수소수가 구강세균에 대하여 얼마나 효과가 있는지, 구강양치액을 대체할 수 있는지 치아우식원성 세균인 *S. mutans*와 치주질환 관련 세균인 *F. nucleatum*, *P. gingivalis* 및 *T. forsythia*에 대해서 항미생물 효과를 조사하였다.

본 실험에 사용된 수소수생성기로 수돗물을 전기분해 할 때, 다른 전기분해 수돗물들은 약산이나 약알칼리인 반면에 pH7.2의 중성을 띠고 있는 것으로 나타났다[23]. 이러한 차이점에도 불구하고 이번 실험에 사용된 전기분해 수소수는 통계학적으로 유의하게 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* 및 *T. forsythia*에 대해서 전기분해 하지 않은 수돗물과 비교할 때 항균효과가 있는 것으로 나타났다.

항균과 관련된 전기분해 물은 양극과 음극사이를 분리한 막이 있는 물통에 NaCl을 전기분해 하여 개발되었다[29]. 음극쪽의 산성 전기분해 물은 항균효과가 강력하게 나타나서 의료부분과 음식에 적용되었다[30,31]. Tanaka

등(1996)은 높은 산화-환원 능이 있는 강한 산성용액인 과산화 물을 0.1% NaCl이 포함된 수돗물을 전기분해 하여 얻었으며, 이 물은 여러 종의 그람음성 및 그람양성 세균에 대해서 항균활성을 보였다[29]. 산성 전기분해 물은 메치실린 내성 *Staphylococcus aureus*에 대해서 항균효과를 나타냈으며[30], 또한 닭에 존재하는 *Campylobacter jejuni*를 사멸시키는 효과를 나타냈다[31]. 이 산성 전기분해 물의 항균효과에 대한 메커니즘으로 높은 산화-환원능과 수소농도가 세균에 작용하여 사멸시키는 것으로 제안하였으며, 또한 과염산(HOCl)도 관련이 있다고 제안하였다[29,31,32]. 그러나 이번 연구에 사용된 전기분해 수소수의 pH는 중성이었으며, 항균효과에 대한 결과는 다르지 않았다. Zeng X 등(2010)은 전기분해 물은 세균막을 약하게 만들어 세균내에 존재하는 DNA나 K<sup>+</sup>이온을 외부로 유출시켜 세균을 사멸시키는 것을 전자현미경과 전기영동 및 흡광반응을 통해서 밝혀냈다[33]. 하지만 세균막을 약하게 만들거나 파괴시키는 메커니즘은 확실히 밝혀지지 않았다. 또한 Nakajima 등(2004)은 자유 염소는 세균을 사멸시키는 요소중 하나이며 자유 염소의 농도 및 노출 시간에 따라서 항균효과가 증가하는 것으로 나타났다[34].

결론적으로 이번 연구에 사용된 전기분해 수소수는 치아우식균 및 치주질환 관련 세균에 대하여 항균효과를 갖고 있으며, 이는 최근까지 사용된 구강양치액을 대체할 수 있는 구강 보건관련 음용수로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (NRF-2011-0009305)

## 참고문헌

1. Kim JH, Kim KK. A study on the adherence of *Streptococcus mutans* to glucans formed in situ in salivary pellicle. International Journal of Oral Biology. 1990;14(2): 143-9.
2. Rozen R, Bachrach G, Zachs B, Steinberg D. Growth rate and biofilm thickness of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* on hydroxapatite. Apmis. 2001;109(2): 155-60.
3. Denepitiya L, Kleinberg I. A comparison of the acid-base and aciduric properties of various serotypes of the bacterium *Streptococcus mutans* associated with dental plaque. Archives of oral biology. 1984;29(5):385-93.
4. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. Periodontology 2000. 2005;38:9-12.

5. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38:135-87.
6. Watson MR, Bretz WA, Loesche WJ. Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. *Journal of dental research*. 1994;73(10):1636-40.
7. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38:72-122.
8. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol*. 1985;12(8):648-59.
9. Budu CE, Luengpailin J, Reyes G, Doyle RJ, Cowan MM. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* are modified by polyphenol oxidase and asparaginase. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):313-7.
10. Levesque C, Lamothe J, Frenette M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):333-7.
11. Lee YH, Jeong SY, Na HS, Jeoung SH, Park HR, Chung J. Comparison of Cytokine Gene Induction in RAW 264.7 Cells by *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* Lipopolysaccharide. *International Journal of Oral Biology*. 2010;35(3):121-8.
12. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun*. 1999;67(7):3248-56.
13. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990;25(3):156-63.
14. Diya Z, Lili C, Shenglai L, Zhiyuan G, Jie Y. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*. 2008;14(2):99-107.
15. Beighton D, Radford JR, Naylor MN. Glycosidase activities in gingival crevicular fluid in subjects with adult periodontitis or gingivitis. *Arch Oral Biol*. 1992;37(5):343-8.
16. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2000;68(8):4611-5.
17. Myneni SR, Settem RP, Connell TD, Keegan AD, Gaffen SL, Sharma A. TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. *J Immunol*. 2011;187(1):501-9.
18. You SQ. [Study on feasibility of Chinese green tea polyphenols (CTP) for preventing dental caries]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1993;28(4):197-9, 254.
19. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Res*. 1999;33(6):441-5.
20. Anila Namboodiripad P, Kori S. Can coffee prevent caries? *J Conserv Dent*. 2009;12(1):17-21.
21. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T. Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*;54 Suppl 2:S151-8.
22. Horiba N, Hiratsuka K, Onoe T, Yoshida T, Suzuki K, Matsumoto T, et al. Bactericidal effect of electrolyzed neutral water on bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(1):83-7.
23. Lee SH, Choi BK. Antibacterial effect of electrolyzed water on oral bacteria. *J Microbiol*. 2006;44(4):417-22.
24. Lee SH, Jun HK, Lee HR, Chung CP, Choi BK. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;35(2):138-45.
25. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*. 2003;134(6):699-704.
26. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;36:14-26.
27. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S14.
28. Kononen E. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med*. 2000;32(2):107-12.
29. Tanaka H, Hirakata Y, Kaku M, Yoshida R, Takemura H, Mizukane R, et al. Antimicrobial activity of superoxidized water. *J Hosp Infect*. 1996;34(1):43-9.
30. Miyamoto M, Inoue K, Gu Y, Hoki M, Haji S, Ohyanagi H. Effectiveness of acidic oxidative potential water in preventing bacterial infection in islet transplantation. *Cell Transplant*. 1999;8(4):405-11.
31. Park H, Hung YC, Brackett RE. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int J Food Microbiol*. 2002;72(1-2):77-83.
32. Nakagawara S, Goto T, Nara M, Ozawa Y, Hotta K, Arata Y. Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity of the Aqueous Chlorine Solution. Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity 1998;14:691-8.
33. Zeng X, Tang W, Ye G, Ouyang T, Tian L, Ni Y, et al. Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci*. 2010;75(5):M253-60.
34. Nakajima N, Nakano T, Harada F, Taniguchi H, Yokoyama I, Hirose J, et al. Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis. *J Microbiol Methods*. 2004;57(2):163-73.