

ELEKTRO-AKTİVE ASİTLİ SUYUN BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALARIN STANDART SUŞLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF ELECTROLYZED ACID WATER ON
THE STANDARD STRAINS OF SOME PATHOGENIC MICROORGANISMS

Çiğdem İLERİ*, **Yavuz SEZEN***, **Anatoli DIMOGLO****

ÖZET: Yapılan birçok çalışmada, elektro-aktif edilmiş asidik su (EAAS)'yun güçlü bir mikrobisidal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, tarafımızdan tasarlanan cihaz ile elde edilen EAAS'yun değişik konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde (0, 10, 30 ve 60 saniye) *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Pseudomonas aeruginosa* standart suşları üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan EAAS, sodyum klorür (10 g/L) ve musluk suyu karışımından 15 dakika süresince doğru elektrik akımı (2 amper) geçirilmesiyle elde edilmiştir. Steril deiyonize su ile %100 (sulandırılmamış), %20, %10, %5, %2 ve %1'lik sulandırmaları hazırlanan EAAS, UNE-EN 1276 standardı kullanılarak *S.aureus* ATCC 29213, *C.albicans* ATCC 10231 ve *P.aeruginosa* ATCC 9027 suşlarının inaktivasyonundaki etkinliği yönünden membran filtrasyon tekniği ile değerlendirilmiştir. EAAS'yun farklı konsantrasyonlarında pH, oksidasyon-reduksiyon potansiyeli ve serbest klor miktarları ayrı ayrı belirlenmiş ve kontrol olarak da sadece steril deiyonize su kullanılmıştır. Sonuç olarak, EAAS'yun %1'lik sulandırımı hariç diğer konsantrasyonlarında tüm mikroorganizmaların 10 saniye içinde tamamen inaktif olduğu saptanmıştır. EAAS'yun %1'lik sulandırımında ise 60 saniye sonunda *S.aureus*, *C.albicans* ve *P.aeruginosa* canlılık oranları sırasıyla 4.09 log cfu/ml, 4.56 log cfu/ml ve 3.62 log cfu/ml olarak belirlenmiştir. Bulgularımız, EAAS'yun %2'lik sulandırımının bakterisid etkiye sahip olduğunu ve pratikte yüzey dezenfeksiyonunda kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Elektro aktif edilmiş asitli su, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, inaktivasyon.

ABSTRACT: Many of the studies have indicated that electrolyzed acid water (EAW) has a strong microbicidal activity. In this study, EAW was obtained by the exposure of NaCl (10 g/L) and tap water mixture to direct electric current (2 ampere) during 15 minutes, in an instrument designed by the study group. EAW

* Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gebze.

** Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze.

was tested for its inactivation efficacy on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* in different concentrations and for different periods (0, 10, 30 and 60 seconds). The EAW dilutions were prepared by using sterile deionized water in the rates of 100% (undiluted), 20%, 10%, 5%, 2% and 1%, while deionized water alone was used as control. The oxidation–reduction potency, pH, and free chloride amounts were separately measured in different concentrations of EAW. UNE–EN 1276 standard was used to investigate the inhibitory efficacy of EAW on *S.aureus* ATCC 29213, *C.albicans* ATCC 10231 and *P.aeruginosa* ATCC 9027 through the use of membrane filtration method. As a result, all of the microorganisms have been completely inactivated at the end of 10th second, in all of the EAW concentrations, except 1% dilution. However, after the treatment with 1% EAW during 60 seconds, it was determined that an average population of 4.09 log cfu/ml, 4.56 log cfu/ml, and 3.62 log cfu/ml survived, respectively for *S.aureus*, *C.albicans* and *P.aeruginosa*. Our data showed that 2% concentration of EAW had a bactericidal effect and may be used for the surface disinfection in practice.

Key words: Electrolyzed acid water, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, inactivation.

G İ R İ Ő

Elektrokimyasal tek kutuplu ve diyafram olan reaktörlerde (hücrelerde) anot ve katot bölgelerine elektrik potansiyali verilerek elde edilen suya “elektro–aktif asitli su” (EAAS) adı verilmektedir. Bu konularda ilk çalışmalar 1980 yıllarında Rusya’da başlamıştır ve 1995 yılından itibaren Amerika, Japonya, Avrupa ve diğer gelişmiş ülkelerde büyük bir ivme kazanarak devam etmektedir^{1,2}. Bunun nedeni EAAS’yun, sodyum klorür dışında hiç bir kimyasal madde kullanılmadan hazırlanan, düşük masraflarla üretilebilen, yüksek derecede aktif, ekolojik olarak temiz ve kolay elde edilen bir ürün olmasıdır. Genelde EAAS, düşük pH (yaklaşık 2.5) ve yüksek oksidasyon–redüksiyon potansiyeline (ORP; yaklaşık 1150 mV) sahip olup, artık klorür içerir¹. EAAS’yun birçok patojenik bakteriye karşı güçlü bir bakterisid etkiye sahip olduğu bildirilmektedir^{1–4}. EAAS, özellikle Japonya ve Rusya’da tıbbi ve endüstriyel alanlarda dezenfeksiyon amaçlı olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır^{4–8}.

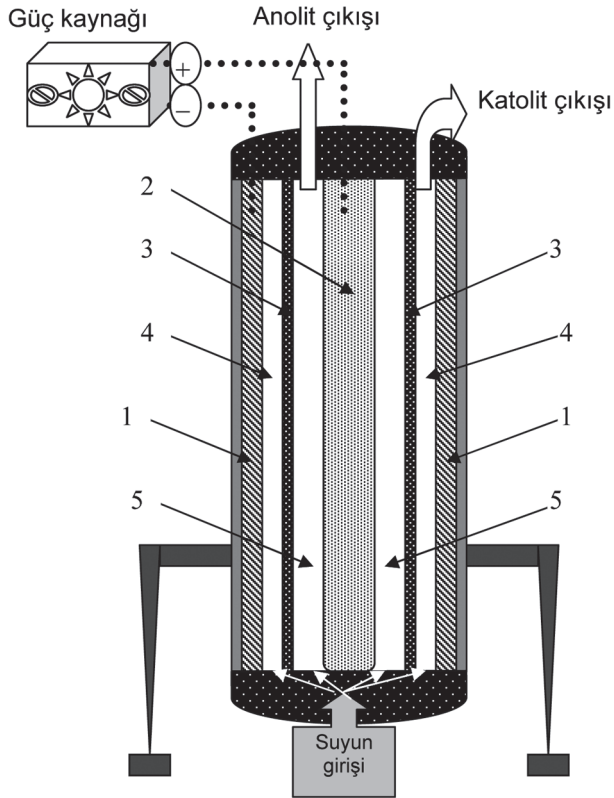
Bu çalışmada, tarafımızdan tasarlanan bir cihaz ile üretilen EAAS’yun, farklı zaman sürelerinde ve değişik konsantrasyonlarda, patojen mikroorganizmaların standart suşları üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Elektro–Aktif Asitli Su (EAAS)’yun Hazırlanması: EAAS kendi tasarımı olan cihaz kullanılarak üretilir. Tasarladığımız cihazın şeması Şekil 1’de görülmektedir. Görüldüğü gibi güç kaynağı kullanılarak sudan doğru akım geçirildi ve giren su, anot ve katot bölgesine geçerek aktif olduktan sonra anolit ve katolit olarak cihazdan alındı. Çalışmada kullanılan EAAS, sodyum klorür (NaCl, 10 g/L) ve musluk suyu karışımının, 15 dakika süresince 2 amper elektrik akımına

maruz bırakılmasıyla elde edildi. Daha sonra EAAS, steril deiyonize su ile 1:1 (%100), 1:5 (%20), 1:10 (%10), 1: 20 (%5), 1:50 (%2), 1:100 (%1) oranlarında sulandırıldı. Kontrol amacıyla ise yalnız steril deiyonize su kullanıldı. EAAS'yun farklı konsantrasyonlarında pH, ORP ve serbest klor miktarları ayrı ayrı saptandı. pH ve ORP değerleri, HANNA Microprocessor-based Bench pH/mV/°C Meters (HI 1131B glass-body combination) cihazı ile belirlendi. Serbest klor miktarı titrimetrik yöntem ile ölçüldü.

Elektroliz sırasında elektrotlarda oluşan polarizasyon enerjisi (potansiyel enerjisi) su ortamına geçtiğinden dolayı suyun fiziko-kimyasal özellikleri değişmektedir. Bu özelliklerin bazıları şunlardır: a) EAAS metastabil bir durumda bulunmaktadır ve farklı fiziko-kimyasal özellikler göstermektedir; b) çevre ortamı ile bir enerji değişimi olmadığı sürece, EAAS'yun metastabil durumu uzun zaman korunmaktadır; c) EAAS, kimyasal reaksiyonun hızını ve bazı durumlarda yönünü değiştirmektedir. Su çözeltilerini metastabil duruma getiren faktörlerden bazıları ise şöyledir: a) suyun kimyasal ve fiziksel olarak uyarılmaları; b) maddenin yüksek oksitlenmiş ve indirgenmiş formları; c) suda bulunan serbest radikaller-iyon-solvatasyon yapılar, vb.



Şekil 1: Aktive suyu üreten reaktörün şeması (1: Katot, 2: Anot, 3: Membran, 4: Katot bölgesi, 5: Anot bölgesi).

Unipolar elektrokimyasal işlemin sonucunda elektrot ve su arasında elektron değişimi gerçekleşir. Aynı zamanda su potansiyel enerji kazanır ve bu enerji sonraki kimyasal olaylarda büyük bir önem taşır. Anolit, anot bölgesinde oluşur ve bu suyun pH'sı 1 ile 5, ORP'i ise 0 ile 1260 mV arasındadır. Katolit ise katot bölgesinde oluşur ve bu suyun pH'sı 9 ile 14, ORP'i ise 0 ile -960 mV arasındadır.

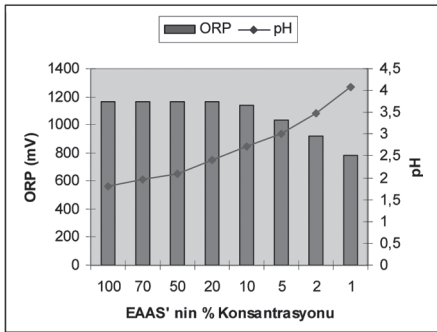
Standart Suşların Kültürlerinin Hazırlanması: Çalışmada kullanılan *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 9027 triptik soy agar (TSA)'da, *C.albicans* ATCC 1213 ise patates dekstrozu agar (PDA)'da 37°C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültürleri hazırlandı.

EAAS'nin etkinliği UNE-EN 1276'ya⁹ göre hesaplandı. Taze kültürlerden 0.5 McFarland bulanıklık standardına uygun olarak hazırlanan bakteri ve maya solüsyonları kullanıldı. Bu solüsyonların 1 ml'si, içerisinde 1 ml steril deiyonize su bulunan cam tüplere transfer edildi. Tüplere 8 ml steril EAAS ilave edildi ve kronometre çalıştırıldı. Bekleme süresi içerisinde tüpler vorteks yardımı ile karıştırılarak karışımın homojen olması sağlandı. İşlemler oda sıcaklığında ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) gerçekleştirildi. Kontrol grubunda EAAS yerine deiyonize su kullanıldı. Bu işlemlerin her biri farklı bekleme sürelerinde, farklı mikroorganizma türleri ile ve farklı EAAS konsantrasyonları için ayrı ayrı iki kez tekrarlandı.

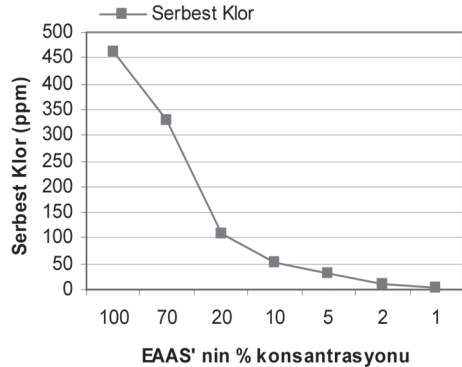
Seçilen temas süresi sonunda (0, 10, 30 ve 60 saniye) deney karışımından 0.1 ml'lik iki örnek pipetle alındı ve her biri membran yerleştirilmiş ve 50 ml yıkama sıvısı (steril deiyonize su) içeren ayrı membran filtrasyon cihazlarına konuldu. Hemen filtre edilen örnekler, ilave edilen 100 ml'lik yıkama sıvısıyla tekrar yıkandı. Daha sonra membranlar besiyerlerinin yüzeyine (*S.aureus* ve *P.aeruginosa* TSA'a *C.albicans* ise PDA'a) aktarıldı. Besiyerleri $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklar sayıldı ve koloni oluşturan birim sayısı (cfu) belirlendi.

BULGULAR

Çalışmada her tür için ve her bir sulandırım oranındaki pH, ORP ve serbest klor miktarları Şekil 2a ve 2b'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 2: EAAS konsantrasyonunun (a) ORP ve pH ve (b) serbest klor miktarı ile ilişkisi.

Her üç mikroorganizma suşunun, EAAS'yun farklı konsantrasyonlarında 10, 30 ve 60 saniye süre ile muamelesi sonucu alınan veriler Tablo I'de sunulmuştur.

Tablo I: *S.aureus*, *C.albicans* ve *P.aeruginosa* Standart Suşlarının Farklı EAAS Konsantrasyonları ile 23°C'de Muamelesi Sonunda Elde Edilen Veriler

EAAS Konsantrasyonu	Mikroorganizma	Zamana göre canlı mikroorganizma popülasyonu (log cfu/ml)			
		0 sn.	10 sn.	30 sn.	60 sn.
%100	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
%20	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
%10	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
%5	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8.16	0	0	0
%2	<i>C. albicans</i>	6.53	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8.16	4.71	4.54	4.09
	<i>C. albicans</i>	6.53	6.02	5.11	4.56
%1	<i>S. aureus</i>	8.16	8.16	8.16	8.16
	<i>C. albicans</i>	6.53	6.53	6.53	6.53
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	7.47	7.47	7.47
	<i>S. aureus</i>	8.16	8.16	8.16	8.16
Kontrol	<i>C. albicans</i>	6.53	6.53	6.53	6.53
	<i>P. aeruginosa</i>	7.47	7.47	7.47	7.47
	<i>S. aureus</i>	8.16	8.16	8.16	8.16

Kontrol grubunda tüm zaman dilimlerinde mikroorganizma sayıları değişmezken, EAAS'yun %1'lik konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarında 10 saniyede 6 log cfu/ml'den fazla azalma gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Elektro-aktif asitli su (EAAS)'yun antimikrobiyal etkisi, yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur^{1-4,10,11}. EAAS'yun hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler üzerinde bakterisidal etki gösterdiği ve çeşitli sebze ve besinlerin yüzeylerindeki patojen bakteri sayısını önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir^{5,6,8,12-14}. Venkitanarayanan ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmasında, EAAS'yun mutfakta kullanılan plastik kesme gereçlerinin yüzeylerindeki bakterileri inaktive ettiği ve beş dakika içinde tüm mikroorganizmaları öldürdüğü tespit edilmiştir. Suzuki ve arkadaşları¹⁶ da, *Aspergillus parasiticus*'un üremesi ve aflatoksin üretmesi üzerinde EAAS'yun inhibitör etkisini göstermişlerdir. Okull ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, EAAS'yun *Penicillium expansum* sporlarında 4 log'dan fazla bir azalma meydana getirdiği

belirlenmiştir. Deza ve arkadaşları⁶ ise EAAS'yun *E.coli* O157:H7, *S.enteritidis* ve *L.monocytogenes*'in saf kültürlerinde beş dakikada 6 log cfu/ml⁻¹'den fazla azalmaya neden olduğunu ve aynı bakterilerle kontamine edilmiş domates yüzeylerinin EAAS ile yıkanmasıyla tam eliminasyonun sağlandığını bildirmişler ve taze meyve ve sebzelerin bu suyla yıkanmasının organik özelliklerini bozmadan dekontaminasyon sağlayacağını vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada da, en dayanıklı olduğu bilinen *Bacillus cereus* sporlarının bile EAAS ile 120 saniye muamele edildiğinde 3 log'dan fazla azaldığı rapor edilmiştir¹⁸. Bizim çalışmamızda, EAAS'yun %2–100 konsantrasyonlarında 10. saniyede mikroorganizmalara göre değişmek kaydıyla yaklaşık 6.5–8.2 log cfu/ml azalma saptanmış, %1'lik dilüsyondaki azalma ise 60. saniyede *S.aureus* için 4.07 log, *P.aeruginosa* için 3.857 log, *C.albicans* için de 1.97 log olarak belirlenmiştir.

EAAS'yun bu mikrobisidal etkileri, suda oluşan radikaller ve iyonlar nedeniyledir; zira anot ve katot bölgesinde farklı elektrokimyasal reaksiyonlar meydana gelmektedir¹⁹. Anot bölgesinde meydana gelen reaksiyonlarda, bakterisidal etki bakımından en aktif olan ClO^- , Cl , $\text{HO}^\bullet$ serbest radikalleri oluşmaktadır. Kimyasal oksidan olarak “aktif oksijen”, mikrobiyal hücrelerde redoks fermentlerinin çalışmasını, aktif merkezlerinde bulunan katalitik grupları oksitleyerek engeller ve yüksek bakterisid etki ortaya çıkar. Katot yüzeyinde ise suyun indirgenme reaksiyonları gerçekleşmektedir. Suda oluşan hidroksit iyonun ayrışması sonucu serbest $\text{HO}^\bullet$ radikalleri oluşur. Katottan hidronyum iyonu üzerine geçen elektron serbest hidrojen radikali vermekte ve bu reaksiyonun devamında aktif maddeler ortaya çıkmaktadır^{19,20}.

Çalışmamızda, EAAS'yun iki kat sulandırıldığında ORP değerinin değişmediği görülmüş, beş kat sulandırıldığında bu değerin düşmeye başladığı izlenmiş ve 100 kat sulandırıldığında ise ORP değerinin 1162'den 780'lere düştüğü saptanmıştır (Şekil 2a). Yüz kat sulandırmada aynı zamanda pH değeri de 1.8'den 4.2'ye yükselmiştir. Ayrıca, konsantre (%100'lük konsantrasyon) EAAS'yun serbest klor miktarı 461.5 ppm iken, 100 kat (%1'lik konsantrasyon) sulandırıldığında 5.02 ppm'e gerilemiştir (Şekil 2b).

Günümüzde iki çeşit elektroliz çözümü kullanılmaktadır. Bunlar elektro zayıf asitli su (EZAS) ve elektro güçlü asitli su (EGAS)'dur. EZAS, tek kaptaki NaCl'in elektrolizi ile elde edilir. EGAS ise katyonik membran ile ayrılmış kaplarda pozitif ve negatif elektrot kullanılarak yapılan NaCl çözünmesinin elektrolizinde pozitif elektrotun olduğu kaptan elde edilir²⁰. Düşük ve yüksek konsantrasyonlu serbest klor içeren elektro NaCl çözeltileri sırasıyla, EGAS–L (elektro güçlü asitli su–düşük tuz konsantrasyonu) ve EGAS–H (elektro güçlü asitli su–yüksek tuz konsantrasyonu) olarak gösterilmektedir. EGAS–H birçok insan patojenine (*B.cereus*, *Mycobacterium tuberculosis*, vb) karşı güçlü bir etkiye sahiptir^{1,21,22}. Ancak tıbbi aletler üzerinde korozif etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca EGAS–H'nin yüksek konsantrasyonu serbest klor içerir ve ikincil ürünlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olabileceği ifade edilmiştir^{23,24}. Buna karşın EGAS–H'ye göre daha az korozif olan ve daha düşük sitotoksik etki gösteren EGAS–L'nin son yıllarda antibakteriyel ve antiviral etkisi onaylanmıştır^{25–27}. EGAS–L'nin endoskopi cihazlarının dezenfeksiyonu için

kullanılabileceği de belirtilmektedir^{26,28}. Kiura ve arkadaşları²⁷ EGAS–L'nin bakterisidal aktivitesini mikobakteriler ve *B.cereus* sporları kullanarak araştırmışlar ve etkinin EGAS–H'ye göre biraz daha zayıf olduğunu, ancak yine de bir dezenfektan olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, EGAS–L ile muamele edilen *P.aeruginosa*'nın dış membranında elektron mikroskopi ile saptanabilen çatlak ve kırık şeklinde harabiyetin oluştuğunu ve ayrıca bakterinin sitoplazmik enzimlerinin inaktive edildiğini saptamışlardır²⁷.

Çalışmamızda, pH'sı 4.2 olan ve 5.02 ppm gibi düşük serbest klor içeren %1 konsantrasyondaki EAAS'yun, çalışılan mikroorganizmaları beş dakikada inaktive ettiği saptanmıştır. Suyun aktif olmasındaki temel neden ORP'nin 780 mV gibi yüksek değerlerde olmasıdır. Tagawa ve arkadaşlarının²⁵ örneklerde hepatit B virus (HBV) modelinde yaptıkları çalışmada, pH'sı 2.34 ve ORP 1053 mV olan EAAS'yun, HBV yükünü ilk bir dakikada 10^1 – 10^3 ID₅₀ ve sonraki altı dakikada $<10^{0.5}$ ID₅₀ azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, EAAS'yun etkisini HBV yüzey proteinlerini geri dönüşümsüz olarak denatüre etmek ve viral DNA polimeraz fonksiyonunu bozmak suretiyle gösterdiğini düşündürmektedir^{21,25}. Morita ve arkadaşları²⁹ da, HIV–1 rekombinant revers transkriptaz (RT) ve HIV–1 partikülleri ile yaptıkları in vitro çalışmada, EAAS'yun zamana ve konsantrasyona bağlı olarak RT aktivitesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar EAAS'yun, çıplak viruslar da dahil olmak üzere birçok virus üzerinde virüsidal etkisinin olması beklendiğini ifade etmektedirler^{25,29}.

Sonuç olarak, tasarımı yaptığımız cihaz ile üretilmiş olan EAAS'yun *S.aureus*, *C.albicans* ve *P.aeruginosa* üzerine olan inhibisyon etkisinin saptanması ve literatürde bu etkiyi kanıtlayan çok sayıda yayın olması, EAAS'yun düşük (en az %2) sulandırılmalarda dahi yüzey dezenfeksiyonunda kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Iwasawa A, Nakamura Y, Mizono T. Bactericidal activities of aqua oxidation water against clinically isolated strains. J Jpn Environ Infect 1993; 8: 11–6.
2. Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4276–9.
3. Hayashibara T, Kadowaki A, Yuda N. A study of the disinfection/microbiocidal effects of electrolyzed oxidizing water. Jpn J Med Technol 1994; 43: 555–61.
4. Nakajima N, Nakano T, Harada F, et al. Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis. J Microbiol Methods 2004; 57: 163–73.
5. Izumi H: Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. J Food Sci 1999; 64: 536–9.
6. Vorobjeva NV, Vorobjeva LI, Khodjaev EY. The bactericidal effects of electrolyzed oxidizing water on bacterial strains involved in hospital infections. Artif Organs 2004; 28: 590–2.
7. Kim C, Hung Y C, Brackett R E. Roles of electrolyzed oxidation–reduction potential in electrolyzed oxidizing water and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. J Food Prot 2000; 63: 19–24.
8. Liu C, Duan J, Su YC. Effects of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. Int J Food Microbiol 2006; 106: 248–53.

9. Anonymous. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements. 1998, European Standard UNE-EN 1276. Phase 2, step 1. Madrid: AENOR.
10. Shimizu Y, Hurusawa T. Antiviral, antibacterial, and antifungal actions of electrolyzed oxidizing water through electrolysis. *Dental J* 1992; 37: 1055–62.
11. Fabrizio KA, Cutter CN. Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2003; 66: 1379–84.
12. Deza MA, Araujo M, Garri MJ. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37: 482–87.
13. Bari M L, Sabina Y, Isobe S, Uemura T, Isshiki K. Effectiveness of electrolyzed oxidized water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *J Food Prot* 2003; 66: 542–8.
14. Park CM, Hung YC, Lin CS, Brackett RE. Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *J Food Prot* 2005; 68: 986–90.
15. Venkitanarayanan K, Ezeike GOI, Hung YC, Doyle MP. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *J Food Prot* 1999; 62: 857–60.
16. Suzuki T, Noro T, Kawamura Y, et al. Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed NaCl anode solution. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 633–41.
17. Okull DO, Demirci A, Rosenberger D, LaBorde LF. Susceptibility of *Penicillium expansum* spores to sodium hypochlorite, electrolyzed oxidizing water, and chlorine dioxide solutions modified with nonionic surfactants. *J Food Prot* 2006; 69: 1944–8.
18. Kim C, Hung YC, Brackett RE. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) water and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2000; 61: 199–207.
19. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2001, 2nd ed. Wiley, New York.
20. Kumon K. What is functional water? *Artif Organs* 1997; 21: 2–4.
21. Abe S, Miya Y, Okuda R. Inactivation of hepatitis B virus by high oxidation potential water. *Jpn J Conserv Dent* 1994; 37: 1616–23.
22. Iwasawa A, Nakamura Y. Bactericidal effect of acidic electrolyzed water—comparison of chemical acidic sodium hydrochloride (NaOCl) solution. *Kansenshogaku Zasshi*. 1996; 70: 915–22.
23. Daniel FB, Meier JR, Deangelo AB. Advances in research on carcinogenic and genotoxic by products of chlorine disinfection: chlorinated hydroxyfuranones and chlorinated acetic acids. *Ann Ist Super Sanita* 1993; 29: 279–91.
24. Morita C, Sano K, Morimatsu S, et al. Disinfective potential of electrolyzed solution containing sodium chloride at low concentration. *J Virol Methods* 2000; 85: 163–74.
25. Tagawa M, Yamaguchi T, Yokosuka O, Matsutani S, Maeda T, Saisho H. Inactivation of a hepatitis virus by electrolyzed acid water. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 363–8.
26. Tsuji S, Kawano S, Oshita M, et al. Endoscope disinfection using acidic electrolytic water. *Endoscopy* 1999; 31: 528–35.
27. Kiura H, Sano K, Morimatsu S, et al. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. *J Microbiol Methods* 2002; 49: 285–93.
28. Machado AP, Fischman O, Geocz S. Microbiological evaluation of gastroscop decontamination by electrolysed acid water (Clentop WM-1). *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 60–2.
29. Morita C, Sano K, Morimatsu S, et al. Disinfection potential of electrolyzed solution containing sodium chloride at low concentrations. *J Virol Methods* 2000; 85: 163–74.