Microbiol. Biotechnol. Lett. (2022), 50(2), 211–217
http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2204.04014
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

산성 pH 조건에서 차아염소산나트륨의 항균 활성 향상

손현빈†, 배원빈†, 지광환*
금오공과대학교 응용화학과

Received: April 28, 2022 / Revised: May 26, 2022 / Accepted: May 31, 2022

Enhanced Antibacterial Activity of Sodium Hypochlorite under Acidic pH Condition

Hyeon-Bin Son†, Won-Bin Bae†, and Kwang-Hwan Jhee*
Department of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39177, Republic of Korea

Sodium hypochlorite (NaClO) is a disinfectant widely used in hospitals and food industries because of its antimicrobial activity against not only bacteria but also fungi and virus. The antibacterial activity of NaClO lies in the maintenance of a stable hypochlorous acid (HClO) concentration, which is regulated by pH of the solution. HClO can easily penetrate bacterial cell membrane due to its chemical neutrality and the antibacterial activity of NaClO is thought to depend on the concentration of HClO in solution rather than hypochlorite ions (ClO^-). In this study, we investigated the antibacterial activity of NaClO according to pH adjustment by means of time kill test and assays of Reactive Oxygen Species (ROS) and adenosine triphosphate (ATP) concentration changes before and after NaClO treatment. We also investigated that the degree of cell wall destruction through field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) exposed to 5 ppm NaClO at pH 5 exhibited 99.9% mortality. ROS production at pH 5 was 48% higher than that produced at pH 7. In addition, the ATP concentration in *E. coli* and *S. aureus* exposed to pH 5 decreased by 94% and 91%, respectively. As a result of FE-SEM, it was confirmed that the cell wall was destroyed in the bacteria by exposing to pH 5 NaClO. Taken together, our results indicate that the antibacterial activity of 5 ppm NaClO can be improved simply by adjusting the pH.

Keywords: **Antibacterial activity, FE-SEM, hypochlorous acid (HClO), ATP, reactive oxygen species**

서 론

최근 전 세계적으로 유행하는 전염성 질환으로 개인의 위생 관리의 중요성이 높아지고 있다. 이에 따라 항균 관련 제품 개발의 필요성이 대두되고 있다. 또한, 일상 생활에서 강력한 항균 성능을 갖는 대체 항생물질의 기술이 연구되고 있다[1]. 이는 과도한 항생제의 사용으로 항생제 내성균의 문제가 범세계적으로 심각하기 때문이다[2]. 이러한 항생제의 단점을 보완할 수 있는 대체 물질로 주목받고 있는 것이 차아염소산나트륨(NaClO)이다. 차아염소산나트륨은 락스의 주성분으로 수질 정화 및 식품 분야에서 사용되고 있다[3]. 1789년 Berthollet에 의해 제조되었으며[4], 1820년에는 차아염소산나트륨의 항균 활성 능력이 밝혀짐에 따라 소독제로 널리 사용되기 시작했다[4, 5]. 차아염소산나트륨(2%)은 메티실린 내성 황색 포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)과 같은 항생제 내성균도 1분 이내에 사멸시킬 수 있을 정도로 항균 활성이 뛰어나다[6].

차아염소산은 이온 형태인 ClO^-와 중성 분자 형태인 HClO가 존재하며 이들 중에서 HClO가 항균 활성에 주요 역할을 수행한다[16]. 이는 용액의 pH에 의해 형태가 결정된다. 차아염소산이 산성화되면 용액 내에 여분의 Cl^-의 농도가 증가하고 HClO와 Cl^-가 반응해 Cl_2(aq)가 형성되며, pH 4 이하에서는 Cl_2(g)가 생성된다[7, 8]. pH 4 이하에서 Cl_2(g)의 생성으로 용액 내 활성 염소 농도가 감소하고 결과적으로 HClO의 손실로 이어진다[9]. pH 6 이상에서는 ClO^-의 비율이 높아짐에 따라 HClO의 비율이 감소한다[10, 11]. 따라서 HClO 비율이 높은 차아염소산 용액의 최적 pH는 $4 < pH < 6$이다[9].

차아염소산나트륨과 HClO의 항균 활성은 미생물 내부에

***Corresponding author**
Tel.: +82-54-478-7837
E-mail: khjhee@kumoh.ac.kr
†These authors contributed equally to this work.

© 2022, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

침투하는 능력에 영향을 받는다. 미생물은 소수성인 지질이중층이 존재하므로 이온 형태인 ClO^-는 투과할 수 없어 미생물 외부에서만 산화작용이 일어나지만, HClO는 지질 이중층을 투과하여 미생물 내부에 침투할 수 있다[10]. 미생물 막으로 침투한 HClO는 균의 산화 방어 시스템을 비활성화시켜 내인적으로 생성된 ROS가 축적된다[12]. 축적된 ROS는 ATPase와 같은 단백질을 포함한 막 구성 성분들을 산화시켜 ATP의 합성을 저해하며 세포 내에서 단백질과 DNA의 합성을 방해, 황 함유 단백질의 비가역적 응집을 유도 및 DNA 이중나선 구조를 파괴 할 수 있다[13, 14]. 또한, HClO와 불포화 지방산의 acyl 사슬이 반응하여 chlorohydrin이 생성되며[15], chlorohydrin의 형성은 세포 용해를 일으켜 세포벽 및 세포막 손실을 유발한다[13, 16].

보고에 따르면, 차아염소산의 항균 활성은 10 ppm 이상에서 확인되었으나[17], 높은 농도의 차아염소산은 강한 산화력으로 인체에 미치는 영향을 무시할 수 없다[18]. 따라서 본 연구에서는 pH를 조절하여 5 ppm 수준의 저농도 차아염소산나트륨으로 최소한의 인체 독성을 나타내면서[19] Gram negative인 *Escherichia coli* (*E. coli*, 대장균)와 Gram positive인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, 황색포도상구균)에 대하여 높은 항균 활성을 갖는 차아염소산의 용액 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

N, N Diethyl-1,4 phenylenediamine sulfate (DPD), sodium thiosulfate, sodium chloride는 Daejung Chemicals & Metals (Korea)에서, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), glutaraldehyde, osmium tetroxide는 Sigma-Aldrich (USA)에서, BacTiter-Glo microbial cell viability assay는 Promega (USA)에서, yeast extract, tryptone은 BD biosciences (USA)에서, agar powder는 Duksan Chemicals (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

사용 균주 및 배양 조건

본 연구에서 사용된 균주는 한국미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양받은 *E. coli* (KCTC 2593), *S. aureus* (KCTC 3881)를 사용하였다. 모든 균주는 -80℃ 초저온 냉동고에서 50% glycerol stock 형태로 보관하였고, 멸균된 Luria Bertani broth (0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone with distilled water)를 사용하여 shaking incubator (SH-802F, LABOTECH, Korea)에서 37℃, 150 rpm 조건으로 배양하였으며, 3회 이상 계대 배양한 균주를 실험에 사용하였다.

항균 활성 측정

모든 균주는 LB 액체배지에 현탁하여($O.D_{600}$ = 0.1) 사용하였다. 차아염소산나트륨의 농도는 DPD 정량법으로 측정하였다[20]. 차아염소산나트륨의 항균 활성 실험은 생물안전작업대(biological safety cabinet, CHC LAB, Korea)에서 진행하였으며 time kill test로 측정하였다[21]. 간단히 설명하면, 각각 다른 pH 조건(pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)의 차아염소산나트륨(5 ppm)에 *E. coli*와 *S. aureus*를 10^6 CFU/ml 접종하여 30분간 배양하였다. 그리고 6% $Na_2S_2O_3$를 첨가하여 차아염소산의 살균력을 제거한 후, 100 mM PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 pH를 중성으로 만들었다. 각각 다른 pH 조건의 시료들은 LB agar medium에 100 µl를 spreading하고, incubator에서 37℃, 24시간 배양 후, 생성된 콜로니 수를 측정하였다. 항균 활성은 차아염소산나트륨 처리균과 비처리균(Untreated)의 log CFU 감소율과 항균활성(%)으로 표시하였다.

$$\text{항균 활성}(\%) = \left(1 - 10^{(\log \text{CFU})_{NaClO}} / 10^{(\log \text{CFU})_{Untreated}}\right) \times 100$$

활성산소 생성 측정

ROS는 DCFH-DA 시약으로 측정하였으며[22], 형광 측정을 위해 형광 광도계(Spectrofluorophotometer, SHIMADZU, RF-5301PC, Japan)를 이용하였다. 모든 균주는 배양 배지로 3회 세척한 후, 10 mM DCFH-DA 시약을 배양 배지로 2,000배 희석(최종농도 5 µM)한 용액으로 shaking incubator에서 37℃, 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 배양 배지 만으로 2회 세척하여 균 외부의 DCFH-DA를 제거하였다. 균은 pH별 차아염소산나트륨에 30분 동안 노출시킨 후, 원심분리하여 PBS (100 mM, pH 7.4)로 재현탁하였다. 각 시료의 DCF의 형광 강도는 excitation: 488 nm, emission: 535 nm에서 측정하였다[23–27].

ATP 생성 측정

pH 별 차아염소산나트륨 처리 후, 미생물이 합성한 ATP 양의 변화[28]를 측정하였다. 균 접종량의 표준화를 위해 균을 현탁하여($O.D_{600}$ = 0.1) 사용하였으며, 10 ppm의 차아염소산나트륨 용액 100 µl에 현탁 된 균을 100 µl 첨가하여 실온에서 30분간 배양한 후, 균의 ATP 양을 BacTiter-Glo microbial cell viability assay (Promega) 방법[29]을 이용하여 발광 측정기(Microplate luminometer, Promega, GloMax Navigator, USA)로 측정하였다.

FE-SEM 분석

pH 별 차아염소산나트륨 처리에 의한 균의 세포벽 손상

http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2204.04014

여부를 관찰하기 위하여 LB broth에 *E. coli*와 *S. aureus*를 각각 접종하여 37℃, 150 rpm에서 16시간 배양하였다. 배양액에 pH 5, pH 7의 차아염소산나트륨(최종농도 5 ppm) 각각 첨가하여 실온에서 30분간 배양하였다. 배양액을 4℃, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 배지 성분을 제거하고 2.5% glutaraldehyde를 함유한 100 mM PBS로 전 고정시킨 후 동일 버퍼로 3회 세척하였다. 그리고 1% OsO_4로 1시간 고정시킨 후 증류수로 3회 세척하고 고정된 균을 에탄올로 탈수시켰다[30–32]. 균이 현탁 된 100% 에탄올을 carbon tape위에 drop하여 overnight 건조시키고 금속 코팅하여 전계방출형 주사 전자현미경(Field emission scanning electron microscopy, FE-SEM; Jeol Ltd., JSM-6500F, Japan)으로 세포벽의 손상 여부를 관찰하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과는 3회 이상 실험하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 결과는 Student's t-test로 분석하였으며 $p < 0.05$에서 유의미한 값을 나타낸다.

결과 및 고찰

pH 별 차아염소산나트륨의 항균 활성

차아염소산나트륨의 항균 활성을 time kill test로 측정하였다. pH 5에서 5 ppm의 차아염소산나트륨을 처리하면 *E. coli*, *S. aureus* 두 균에서 99.9%의 살균력을 보였으나, pH 5 이외의 조건에서 *E. coli*는 64.5–88.8%, *S. aureus*에는 12.9–49.9%의 살균력을 나타내었다(Fig. 1, Table 1). 이는

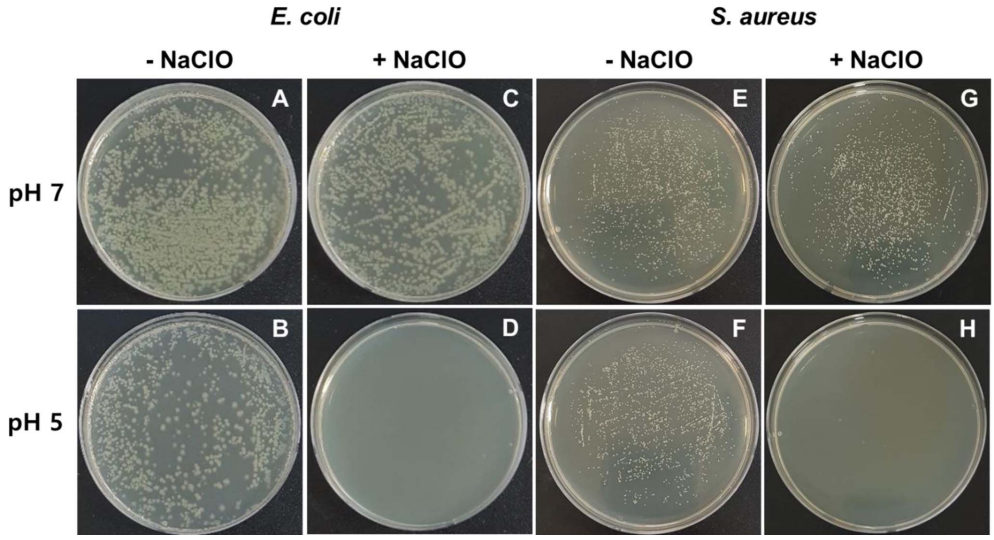

Fig. 1. Time kill test data of NaClO against *E. coli* (A~D) and *S. aureus* (E~H). Colonies were counted in following: (A, E) pH 7 controls (without NaClO treatment), (B, F) pH 5 controls (without NaClO treatment), (C, G) pH 7 samples (with NaClO treatment for 30 min), (D, H) pH 5 samples (with NaClO treatment for 30 min).

Table 1. Colony forming unit by time kill test after 5 ppm NaClO treatment against two strains.

	E. coli			*S. aureus*		
	Colony forming unit (log CFU/ml)		Antibacterial activity (%)	Colony forming unit (log CFU/ml)		Antibacterial activity (%)
pH	Untreated	NaClO		Untreated	NaClO	
3	6.71 ± 0.21	5.82 ± 0.18	87.12	6.80 ± 0.17	6.69 ± 0.16	22.38
4	6.88 ± 0.14	5.93 ± 0.12	88.78	6.81 ± 0.13	6.75 ± 0.13	12.90
5	7.02 ± 0.19	3.30 ± 0.09	99.98	6.85 ± 0.09	3.70 ± 0.05	99.93
6	7.26 ± 0.10	6.56 ± 0.09	80.05	6.87 ± 0.04	6.57 ± 0.04	49.88
7	7.39 ± 0.10	6.82 ± 0.09	73.08	6.90 ± 0.10	6.72 ± 0.09	33.93
8	7.38 ± 0.08	6.93 ± 0.07	64.52	6.86 ± 0.18	6.76 ± 0.18	20.57
9	6.97 ± 0.11	6.34 ± 0.10	76.56	6.85 ± 0.09	6.62 ± 0.09	41.12

The data are expressed as log means of three trials (mean ± SD, n = 3).

차아염소산나트륨의 pH에 따른 염소 종의 분포에 기인하는 것으로 사료된다. 또한, Gram negative 균인 *E. coli*에 대한 항균 활성이 Gram positive 균인 *S. aureus*보다 더 높았다. 이는 기존의 보고와 일치하며[17], 본 실험 결과는 HClO가 *S. aureus*보다 세포벽의 펩티도글리칸 층이 얇은 *E. coli*에 더 쉽게 침투할 수 있음을 의미한다.

차아염소산나트륨에 의해 생성된 균 내부의 ROS

차아염소산나트륨에 대한 항균 활성을 확인하기 위하여 DCFH-DA로 균 내부에 생성된 ROS를 확인하였다. DCFH-DA는 세포막을 투과하여 균 내부의 esterase 효소작용으로 DCFH가 되어 ROS와 반응하면 DCF가 되어 형광을 나타낸다[26]. 균이 HClO에 산화 스트레스를 받으면 산화 방어 시스템이 비활성화 되어 축적된 ROS의 양이 증가한다[12, 24]. 균은 일반적으로 낮은 pH에서 생존율이 감소하므로 pH의 영향을 배제하고자 차아염소산나트륨이 없는 pH 용액에 노출한 균을 대조군으로 사용하였다. 따라서 다른 pH 용액의 차아염소산나트륨에 노출시켰을 때, 생성된 ROS를 대조군에 비하여 얼마나 증가하였는가를 비교하였다. pH 3–9 조건에서 차아염소산나트륨을 처리하면, pH 5에서 대조군 대비 ROS 증가율이 *E. coli*가 52.9%, *S. aureus*가 25.1%로 가장 높았다(Fig. 2). 다른 pH에서 ROS 증가율은 *E. coli*가 1.0–19.0%, *S. aureus*가 0.5–7.0%였다. 따라서 본 실험결과는 차아염소산나트륨이 pH 5 조건에서 세포막을 쉽게 투과하는 HClO 형태로 존재하는 비율이 높기 때문에, 가장 많은 산화 스트레스를 유발하는 것으로 사료된다.

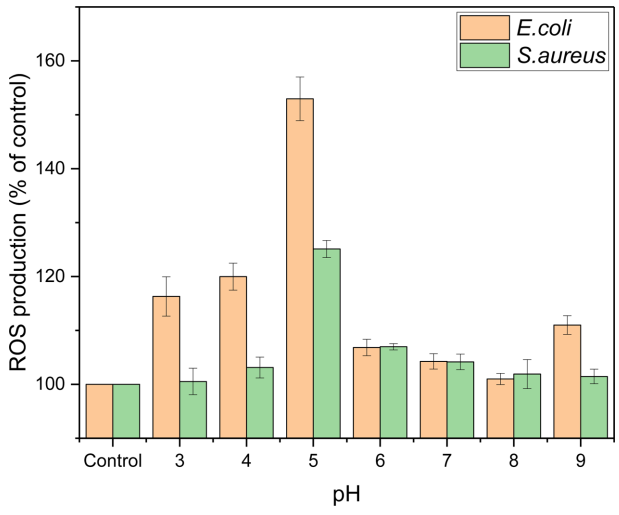

Fig. 2. ROS generation in bacterial cells treated with NaClO. Bacteria were pretreated for 30 min at 37℃ with 5 μM 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). And then each strain was incubated with 5 ppm NaClO for 30 min between pH 3 to 9. The fluorescence intensity was measured at an excitation/emission wavelength of 488/535 nm.

차아염소산나트륨에 노출된 균의 ATP 농도

살아있는 균은 ATP를 합성하므로 생균수가 많을수록 더 많은 ATP를 합성하고, Luminescent Cell Viability Assay kit 사용 시 발광 강도가 증가한다[33]. 균들을 다른 pH 조건의 5 ppm 차아염소산나트륨에 30분 노출한 후, 대조군과 비교하여 생성된 ATP 양으로 나타내었다(Fig. 3). pH 5의 차아염소산나트륨을 사용한 경우, 대조군 대비 ATP 양이 *E. coli*는 6%, *S. aureus*는 9%로 검출되었으며, pH 3, 4, 6, 7, 8, 9 차아염소산나트륨의 사용에서는 대조군 대비 *E. coli*의 ATP 생성율은 27–82%, *S. aureus*는 72–84%로 측정되었다. 즉 pH 5의 경우가 ATP 검출농도가 가장 적어 균이 많이 사멸되었다고 사료된다.

pH 5 조건에서, 두 균주(*E. coli, S. aureus*)에 대한 살균력이 99.9%였고(Table 1), ATP 감소율은 *E. coli*가 94%, *S. aureus*가 91%로 ATP 측정이 항균 활성과 관계가 있음을 보여준다[34]. 또한, time kill test 실험값 보다 ATP 측정값이 더 높게 나오는 것은 균이 죽기 전에 이미 합성되었던 ATP가 세포벽이 파괴되면서 용출되어 ATP 측정에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 즉 본 실험을 통하여 pH 5 차아염소산나트륨 용액의 항균효과가 다른 pH 보다 우수하며, Gram negative 균(*E. coli*)에 더 큰 항균효과가 있음을 알 수 있다[17].

ATP 실험 결과(Fig. 3)와 ROS 실험 결과(Fig. 2)를 비교하면, ROS 증가율과 ATP 감소율이 유사한 경향은 보이나 변화 정도가 정확히 일치하지는 않았다. 이는 실험에서 사용한

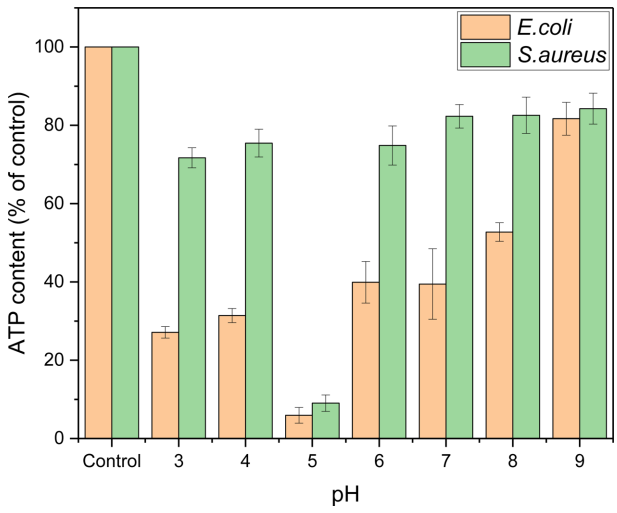

Fig. 3. pH effects for ATP generation of bacteria after 30 min treatment with 5 ppm NaClO. Bioluminescence of intracellular ATP was evaluated by the luciferin-luciferase reagent and measured by microplate reader with advanced detection capabilities.

http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2204.04014

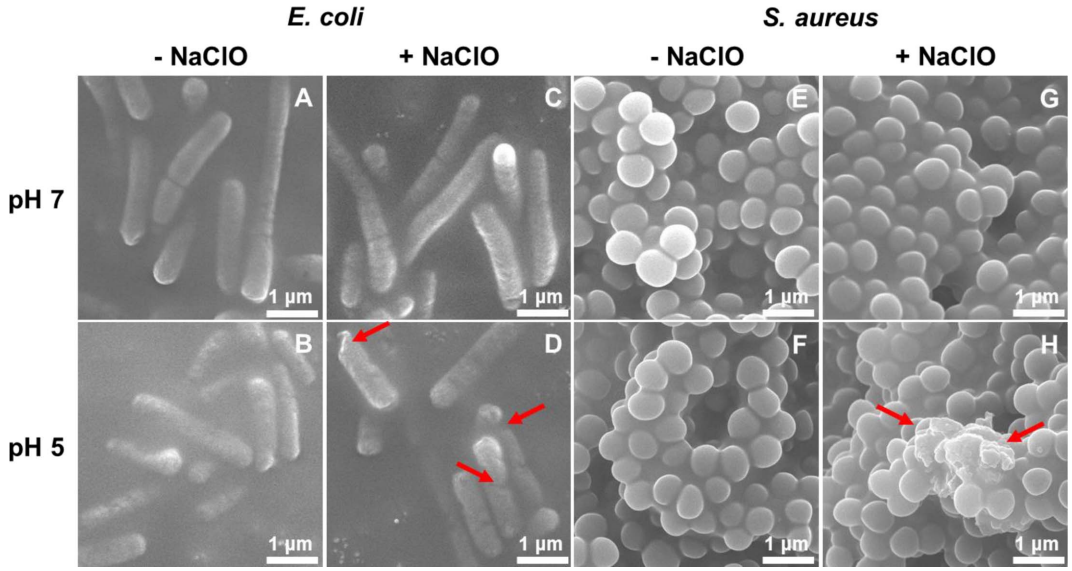

Fig. 4. Morphological changes of *E. coli* (A~D) and *S. aureus* (E~H) were observed by field emission scanning electron microscopy after treatment with 5 ppm NaClO. (A, E) pH 7 controls (without NaClO treatment), (B, F) pH 5 controls (without NaClO treatment), (C, G) pH 7 samples (with NaClO treatment for 30 min), (D, H) pH 5 samples (with NaClO treatment for 30 min). Red arrows exhibit the cell wall pores.

DCFH-DA 시약이 H_2O_2, superoxide ($\cdot O_2^-$) [35], singlet oxygen ($^1O_2$) [36], nitrogen dioxide ($\cdot NO_2$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) [37]와 같은 ROS와 모두 반응하는데, 이러한 ROS가 균의 대사과정에서 형성되어[38] 대조군과 시료군의 ROS 생성량이 모두 증가하여 대조군 대비 ROS 생성 비율의 차이가 감소했기 때문으로 사료된다.

차아염소산나트륨의 세포벽 파괴 확인

물리적 항균 효과를 확인하기 위해 5 ppm 차아염소산나트륨에 30분 간 노출시킨 균을 FE-SEM을 이용하여 관찰하였다. 콜로니 수(Fig. 1)와 FE-SEM 결과(Fig. 4)의 균 수는 유의성이 있었으며, 차아염소산나트륨을 처리하지 않은 pH 5와 pH 7 조건에서 두 균주의 대조군은 모두 세포벽의 파괴가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 그리고 차아염소산나트륨을 처리한 pH 7 조건에서는 세포벽이 파괴되지 않았지만, pH 5 조건에서는 두 균주(*E. coli*, *S. aureus)* 모두에서 세포벽의 파괴가 관찰되었다. 따라서 pH 5 조건의 차아염소산나트륨은 균의 세포벽을 파괴하여 항균 활성을 나타냄을 알 수 있다.

요 약

차아염소산나트륨(NaClO)은 병원 및 식품산업 분야에서 널리 사용되는 소독제로 세균, 곰팡이, 바이러스에 대해서도 항균 활성이 있다. 차아염소산나트륨의 항균 활성은 용액의 pH에 의해 조절되는 안정적인 HClO 농도의 유지에 있다. 차아염소산(HClO)은 화학적으로 중성이므로 세균의 막에 쉽게 침투할 수 있으며 차아염소산나트륨의 항균 활성은 차아염소산염 이온(ClO^-)보다는 용액 내 HClO 농도에 의존하리라 사료된다.

본 연구에서 pH 조절에 따른 차아염소산나트륨의 항균 활성을 time kill test와 차아염소산나트륨 처리 전후의 활성산소종(ROS) 및 ATP 농도 변화로 조사하였다. 또한 전계방출형 주사 전자 현미경(FE-SEM)을 통하여 세포벽의 파괴 정도를 확인하였다. pH 5 조건에서 5 ppm 차아염소산나트륨은 *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 균에 대하여 99.9%의 항균 활성을 나타내었고, ROS 생성량은 pH 7 조건보다 48% 증가하였다. 또한, pH 5 조건의 차아염소산나트륨에 노출된 *E. coli*와 *S. aureus*의 ATP 농도가 각각 94%와 91% 감소하였다. FE-SEM 결과, pH 5 조건에 노출된 균의 세포벽이 파괴된 것을 확인하였다. 본 연구결과를 종합해보면, pH를 조절하는 것 만으로 5 ppm 농도의 차아염소산나트륨의 항균 활성을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

Acknowledgments

This work was supported by the Kumoh National Institute of Technology (202002250001).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Periyasamy T, Asrafali S, Shanmugam M, Kim S-C. 2021. Development of sustainable and antimicrobial film based on polybenzoxazine and cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **170**: 664-673.
2. Song J-H. 2011. Antimicrobial resistance in Gram-positive cocci: Past 50 years, present and future. *Infect. Chemother.* **43**: 443-449.
3. Kerkaert B, Mestdagh F, Cucu T, Aedo PR, Ling SY, De Meulenaer B. 2011. Hypochlorous and peracetic acid induced oxidation of dairy proteins. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 907-914.
4. Coates D. 1985. A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. *J. Hosp. Infect.* **6**: 31-40.
5. Topić F, Marrett JM, Borchers TH, Titi HM, Barrett CJ, Friščić T. 2021. After 200 years: The structure of bleach and characterization of hypohalite ions by single-crystal X-ray diffraction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**: 24400-24405.
6. Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M, *et al.* 2009. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. *FEMS Microbiol. Lett.* **291**: 241-246.
7. Gerritsen CM, Margerum DW. 1990. Non-metal redox kinetics: hypochlorite and hypochlorous acid reactions with cyanide. *Inorg. Chem.* **29**: 2757-2762.
8. Wang TX, Margerum DW. 1994. Kinetics of reversible chlorine hydrolysis: temperature dependence and general-acid/base-assisted mechanisms. *Inorg. Chem.* **33**: 1050-1055.
9. Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, *et al.* 2007. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J. Burns Wounds.* **6**: e5.
10. Fukuzaki S. 2006. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci.* **11**: 147-157.
11. Severing A-L, Rembe J-D, Koester V, Stuermer EK. 2018. Safety and efficacy profiles of different commercial sodium hypochlorite/hypochlorous acid solutions (NaClO/HClO): antimicrobial efficacy, cytotoxic impact and physicochemical parameters in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**: 365-372.
12. Dukan S, Belkin S, Touati D. 1999. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**: 311-316.
13. da Cruz Nizer WS, Inkovskiy V, Overhage J. 2020. Surviving reactive chlorine stress: responses of Gram-negative bacteria to hypochlorous acid. *Microorganisms* **8**: 1220.
14. Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderón JL, *et al.* 2015. Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. *Braz. Dent. J.* **26**: 519-524.
15. Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszyńska T, *et al.* 2000. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim. Pol.* **47**: 889-899.
16. Dever G, Wainwright CL, Kennedy S, Spickett CM. 2006. Fatty acid and phospholipid chlorohydrins cause cell stress and endothelial adhesion. *Acta Biochim. Pol.* **53**: 761-768.
17. Kim NH, Park TH, Rhee MS. 2014. Enhanced bactericidal action of acidified sodium chlorite caused by the saturation of reactants. *J. Appl. Microbiol.* **116**: 1447-1457.
18. Feldman C, Anderson R, Kanthakumar K, Vargas A, Cole PJ, Wilson R. 1994. Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium. *Free Radic. Biol. Med.* **17**: 1-10.
19. Kim HJ, Lee J-G, Kang JW, Cho H-J, Kim HS, Byeon HK, *et al.* 2008. Effects of a low Concentration hypochlorous acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. *Laryngoscope* **118**: 1862-1867.
20. Moberg L, Karlberg B. 2000. An improved N,N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) method for the determination of free chlorine based on multiple wavelength detection. *Anal. Chim. Acta* **407**: 127-133.
21. Foerster S, Unemo M, Hathaway LJ, Low N, Althaus CL. 2016. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol.* **16**: 216.
22. Castro-Alférez M, Polo-López MI, Fernández-Ibáñez P. 2016. Intracellular mechanisms of solar water disinfection. *Sci. Rep.* **6**: 38145.
23. Dasgupta N, Ramalingam C. 2016. Silver nanoparticle antimicrobial activity explained by membrane rupture and reactive oxygen generation. *Environ. Chem. Lett.* **14**: 477-485.
24. Hong Y, Zeng J, Wang X, Drlica K, Zhao X. 2019. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**: 10064-10071.
25. Rajneesh JP, Chatterjee A, Singh SP, Sinha RP. 2017. Detection of reactive oxygen species (ROS) in cyanobacteria using the oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). *Bio Protoc.* **7**: e2545.
26. Gomes A, Fernandes E, Lima JL. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **65**: 45-80.
27. Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Al-Khedhairy AA. 2014. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. *PLoS One* **9**: e111289.
28. Solana C, Ruiz-Linares M, Baca P, Valderrama MJ, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. 2017. Antibiofilm activity of sodium hypochlorite and alkaline tetrasodium EDTA solutions. *J. Endod.* **43**: 2093-2096.
29. Lara HH, Ayala-Núnez NV, Turrent LdCI, Padilla CR. 2010. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 615-621.
30. Bhattacharya R, Saha S, Kostina O, Muravnik L, Mitra A. 2020. Replacing critical point drying with a low-cost chemical drying

provides comparable surface image quality of glandular trichomes from leaves of *Millingtonia hortensis* L. f. in scanning electron micrograph. *Appl. Microsc.* **50**: 15.
31. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. 2012. Scanning electron microscopy. *Curr. Protoc. Microbiol.* **25**: 2B.2.1-2B.2.47.
32. Al Shehadat S, Gorduysus MO, Hamid SSA, Abdullah NA, Samsudin AR, Ahmad A. 2018. Optimization of scanning electron microscope technique for amniotic membrane investigation: A preliminary study. *Eur. J. Dent.* **12**: 574-578.
33. Romanova N, Brovko LY, Moore L, Pometun E, Savitsky A, Ugarova N, *et al.* 2003. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6393-6398.
34. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Marín MJ, Figuero E, León R, Blanc V, *et al.* 2013. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **18**: e86.
35. Afri M, Frimer AA, Cohen Y. 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids* **131**: 123-133.
36. Daghastanli NA, Itri R, Baptista MS. 2008. Singlet oxygen reacts with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2,7'-dichlorofluorescein. *Photochem. Photobiol.* **84**: 1238-1243.
37. Kim H, Xue X. 2020. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *J. Vis. Exp.* doi: 10.3791/60682.
38. Borisov VB, Siletsky SA, Nastasi MR, Forte E. 2021. ROS Defense systems and terminal oxidases in bacteria. *Antioxidants* **10**: 839.