

<원 저>

게르마늄 흑운모의 시험관 내에서의 *E. coli*와 *Salmonella* spp.에 대한 흡착력 및 성장 억제 효능 평가

정명환 · 차승빈 · 신승원 · 이원정 · 신민경 · 유안나 · 유한상*

서울대학교 수의과대학, BK21 수의과학인력양성 사업단

(접수: 2011년 10월 20일, 수정: 2012년 1월 16일, 게재승인: 2012년 1월 17일)

The effects of Germanium biotite on the adsorptive and inhibition of growth abilities against *E. coli* and *Salmonella* spp. *in vitro*

Myunghwan Jung, Seung Bin Cha, Seung Won Shin, Won-Jung Lee, Min-Kyoung Shin, Anna Yoo, Han Sang Yoo*

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and Brain Korea 21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received: October 20, 2011; Revised: January 16, 2012; Accepted: January 17, 2012)

Abstract : Germanium biotite, a natural mineral, has been used as a feed supplement to reinforce innate immune ability. The aim of the present study was to evaluate the effects of germanium biotite on the adsorptive and inhibition of growth abilities against *Escherichia (E.) coli* and *Salmonella* spp. *in vitro*. Two strains of enterotoxigenic *E. coli* and four strains of two *Salmonella* serotypes (*Salmonella* Derby and *Salmonella* Typhimurium), major bacterial diarrheal pathogens, were used for this experiment. The adsorptive ability of germanium biotite against most *Salmonella* used in present experiment was observed weakly. The germanium biotite, however, showed significant effect of bacterial growth inhibition in most experiment bacteria. These results suggest that the use of the germanium biotite as feed supplement could alleviate diarrhea following inhibition of bacteria growth. It is also presumed that antibiotics usage for farm animals, considered as causes of antibiotic residue in meat and emerging antibiotic resistance, could be reduced through the use of germanium biotite as a feed supplement, in place of antibiotics used for the prevention of diarrhea.

Keywords : adsorptive, enterotoxigenic *E. coli*, Germanium biotite, growth inhibition, *Salmonella* spp.

서 론

최근 식습관의 서구화로 인해 축산물의 소비가 증가함에 따라 축산물의 안정적인 공급과 식육의 안전성에 대한 관심이 커지게 되었다. 축산물의 안정적인 공급은 높은 생산성과 경제력을 통해 이룰 수 있는데, 축산업에서 생산성을 감소 시키고 경제적인 피해를 주는 질병으로는 호흡기계와 소화기계의 질병이 대표적이다. 이 중 소화기계 질병은 송아지나 이유자돈에서 주로 문제시 되는 질병으로 장독소형 대장균(*enterotoxigenic Escherichia (E.) coli*, ETEC)과 *Salmonella*가 대표적인 세균성 원인

체로 지목되어 왔다.

대장균은 돼지나 소의 장내에 존재하는 대표적인 정상 세균총이지만, ETEC의 경우 adhesin과 enterotoxin 등의 병원성 인자를 가진 소화기의 세균성 병원체로서 adhesin의 종류에 따라 숙주 특이성이 결정된다. 이러한 이유로 ETEC은 가금류에서 보다는 송아지 및 이유자돈에서 많은 문제를 일으키고 있으며 [13], 국내 축산업에 많은 경제적 피해를 주고 있는 병원체이다. 숙주가 ETEC에 감염되거나 숙주 장내의 정상 세균총인 대장균에 ETEC 병원성 인자 large plasmid가 삽입된 이후 ETEC이 과량 증식하게 되고, 정상 세균총이 파괴되어 이로

*Corresponding author

Tel: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738

E-mail: yoohs@snu.ac.kr

인해 ETEC에 의한 소화기성 질병이 유발되게 된다 [3]. 축산업에서 ETEC과 더불어 대표적인 소화기성 질병의 세균성 원인체인 *Salmonella*는 주로 경구를 통해 감염이 되며, 사람에게는 축산물에 잔류하는 *Salmonella*가 주된 감염원으로 작용해 공중보건상으로도 매우 중요한 세균성 인수공통 병원체이다 [8]. 또한 *Salmonella*는 감염 후 숙주의 면역 작용을 억제하여 2차 세균감염에 취약하게 하며, 숙주의 림프세장기관(lymphoreticular organ)에서 증식을 하여 가축의 폐사를 유발할 수 있다 [2, 8].

그 동안 축산업에서는 이러한 질병에 대한 예방과 더불어 생산성을 증가시키기 위해 항생제를 사료 첨가제로 사용하였나 [1, 12], 최근 항생제 사용에 따른 내성균의 출현과 식육 내 항생제 잔류에 따른 공중보건학적 문제로 인해 사료 첨가제로서의 항생제 이용은 국내를 비롯해 유럽연합 등에서는 금지되었으며 [10], 이에 따라 항생제를 대체할 새로운 예방, 치료 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

현재 항생제를 대체할 수 있는 사료 첨가제로서 많은 관심이 집중된 분야 중 하나는 천연 광물질이다. 그 중 게르마늄 흑운모(germanium biotite)의 경우 면역 증강제로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 사료 첨가제로도 이용되고 있는 천연 광물질이다. 게르마늄 흑운모는 칼륨(potassium), 마그네슘(magnesium), 알루미늄(aluminum), 규산염(silicate)로 이루어진 격자 규산염(phyllsilicate)로서 [18, 20], 규산염은 대식세포(macrophage)에 탐식되어 대식세포를 활성화하여 면역활동을 유발함이 밝혀진 물질로 [7], 이 후 마우스에서 경구 투여를 통해 면역세포의 분화에도 영향을 미치는 것이 연구되었다 [9]. 또한 돼지, 소, 닭에서 알루미늄규산염(aluminumsilicate)을 경구 투여하였을 때, 소화기 질병이 완화됨이 보고되었고 [16], 돼지에서 면역이 증강되어 항체 형성능이 증가하고 바이러스성 질병에 대해 저항성이 증가됨이 연구되었다 [9].

이에 본 연구에서는 천연 광물질로 면역증강, 증체율 향상 및 소화기성 질병 완화의 효과가 보고되고, 사료 첨가제로서 이용되고 있는 게르마늄 흑운모가 축산업에 큰 피해를 주고 있는 세균성 설사 원인체에 미치는 작용 효과를 규명하기 위해, 대표적인 설사 원인체인 ETEC과 *Salmonella*에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력 및 성장 억제 효능을 시험관 내 수준에서 조사하였다.

재료 및 방법

게르마늄 흑운모의 성분

게르마늄 흑운모는 이산화 규소(SiO_2), 이산화 알루미늄(Al_2O_3), 산화철(Fe_2O_3), 산화칼슘(CaO), 산화마그네슘(MgO) 및 산화티타늄(TiO_2)으로 이루어진 천연 광물질

로서 서봉 바이오베스텍(Korea)으로부터 제공받았다.

공시 균주

실험에 사용한 2종의 ETEC은 각각 설사 증상을 보이는 송아지 및 돼지에서 분리한 균주이며(*E. coli* K4, *E. coli* Hem), 3종의 *Salmonella*(*S.*) Typhimurium(09-2b, 09-51, Ia)과 1종의 *S. Derby*는 농림수산검역검사본부(Korea)를 통하여 제공받았다. ETEC 공시 균주인 *E. coli* K4와 *E. coli* Hem은 Lee 등 [11]의 방법으로 PCR을 통해 ETEC 병원성 인자를 확인하였다. 분리된 공시 균주는 37°C, 300 rpm의 조건으로 tryptic soy broth(TSB; Difco, USA)에 16시간 배양하여 실험에 이용하였다.

공시 균주의 집락 형성 세균수와 광학농도의 상관관계 분석

Hanzlicek 등 [5]의 방법으로 공시 균주의 광학농도(optical density, OD)와 집락 형성 세균수(colony forming unit, CFU)의 상관관계 그래프(standard curve)를 작성하여 흡착력 평가 및 성장 억제력 평가를 위한 균수 보정에 이용하였다. 상기의 방법으로 배양된 각각의 공시 균주의 배양액을 10진 단계희석 뒤, 3개의 희석 단계를 선택하여 3반복으로 MacConkey agar plate(Difco, USA)에 균질 도말하여 12시간 배양 후, 30~300개의 세균 집락이 형성된 MacConkey agar plate의 세균 집락수를 바탕으로 CFU를 산출하였다. 또한 공시 균주의 배양액 및 단계 희석된 배양액의 600 nm OD를 측정(ver. 2.4, GeneQuant pro; Biochrom, England) 하여, 산출된 공시 균주의 CFU와 OD 측정치와의 상관관계를 standard curve로 작성하였다.

게르마늄 흑운모의 공시 균주에 대한 흡착력 평가

상기의 방법으로 배양된 공시 균주에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력을 평가하기 위하여 Herrera 등 [6]의 방법을 참고하여 균수를 5.0×10^8 cfu/mL로 보정하였다. 균수의 보정은 Hanzlicek 등 [5]의 방법으로 공시 균주의 OD 측정치와 CFU의 상관관계 standard curve를 바탕으로 공시 균주 배양액을 TSB로 희석하여 균수를 보정하였다. 이 후 게르마늄 흑운모를 0.05 g/mL의 농도로 세균 배양액에 혼합한 뒤 10시간을 상기의 방법으로 배양하면서 2시간마다 1 mL의 배양액을 채취하여 100 × g로 원심분리 후 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 10진 단계 희석한 뒤, 3개의 희석 단계를 선택하여 각각 MacConkey agar plate에 균질 도말하여 12시간 배양 후 30~300개의 세균 집락이 형성된 MacConkey agar plate의 세균 집락수를 바탕으로 CFU를 산출하였다. 측정은 모두 3반복하여 평균값을 CFU로 계산하였다.

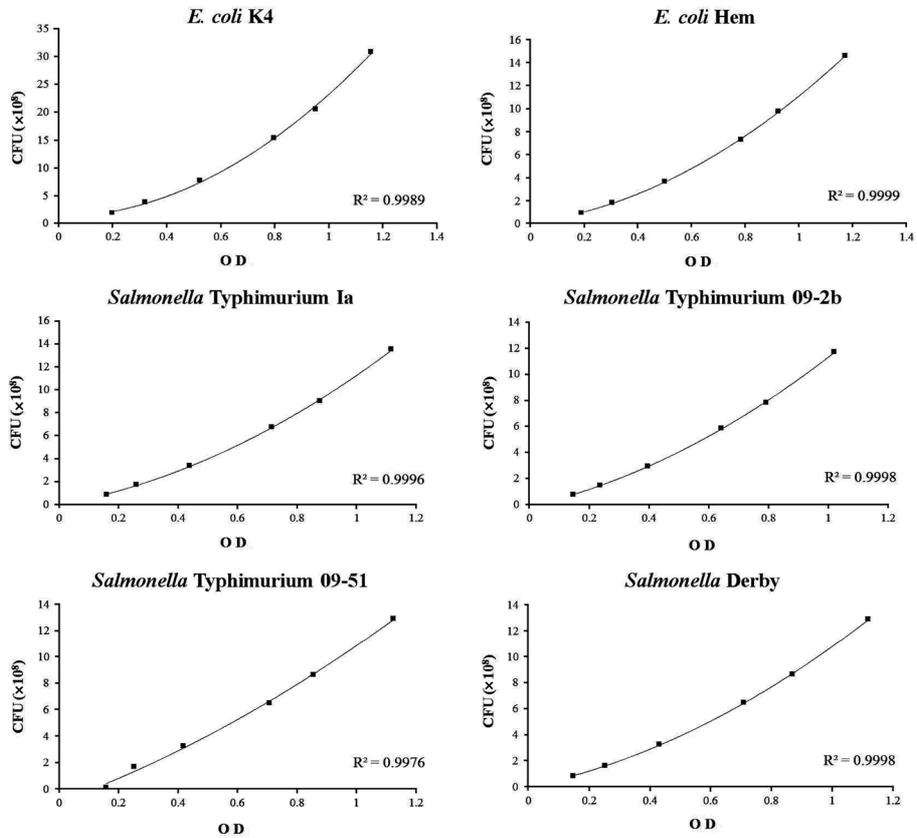


Fig. 1. Correlation between optical density (OD) and colony forming unit (CFU) of bacteria used in this experiment. All bacteria used in this experiment show respective correlation between OD and CFU significantly.

게르마늄 흑운모의 공시 균주에 대한 성장 억제력 평가

상기의 방법으로 배양된 공시 균주에 대한 게르마늄 흑운모의 성장 억제력을 평가하기 위하여 Herrera 등 [6]의 방법을 참고하여 균수를 2.0×10^2 cfu/mL로 보정하였다. 균수의 보정은 공시 균주의 OD 측정치와 CFU의 상관관계 standard curve를 바탕으로 공시 균주 배양액을 TSB로 희석하여 균수를 보정하였다. 이후 게르마늄 흑운모를 0.05 g/mL의 농도로 세균 배양액에 혼합한 뒤 10시간을 상기의 방법으로 배양하면서 2시간마다 1 mL의 배양액을 채취하여 $100 \times$ g로 원심분리 후 상층액을 수거하였다. 이후 진행된 실험 방법은 흡착력 평가의 방법과 동일하게 진행하였다.

통계학적 분석

모든 실험의 결과치는 SPSS(ver 19.0; SPSS, USA) 프로그램을 이용하여 student's t-test를 실시하였고, $p < 0.05$ 일 경우 유의적 차이가 있다고 판단하였다.

결 과

본 연구에 사용된 모든 균주는 각각 OD와 CFU 사이에 R² 값이 0.99 이상의 높은 상관관계를 보였으며(Fig. 1), 이를 바탕으로 균수를 보정하여 흡착력 및 성장 억제력을 평가하였다. 게르마늄 흑운모의 설사 원인균에 대한 흡착력을 평가한 결과, 3종의 *S. Typhimurium*에서 8시간 이후 흡착력이 관찰되었으며($p < 0.05$, Fig. 2), *S. Derby*에서는 2시간째와 4시간째에 게르마늄 흑운모 균에서 각각 대조군 CFU의 79.5%와 79.9%의 CFU를 보였으나, 6시간 이후에는 흡착력이 관찰되지 않았다. 유의적인 흡착력이 관찰된 *S. Typhimurium*의 8시간째 배양에서 게르마늄 흑운모 균은 각각 대조군 CFU의 73.3%, 66.7%, 79.5%의 CFU를 보였다(Fig. 2). 특히 *S. Typhimurium* 09-2b의 경우, 2시간 이후부터 게르마늄 흑운모의 흡착력이 관찰되었으며, 10시간째에는 대조군의 CFU에 비해 54.9%의 CFU가 관찰되었다($p < 0.01$). 반면 실험에 사용한 *E. coli*에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력

은 관찰되지 않았다. 게르마늄 흑운모의 설사 원인균에 대한 성장 억제력 평가에서 실험에 사용한 모든 균주는 6시간 이전에는 CFU의 큰 변화가 없다가, 6시간에서 8

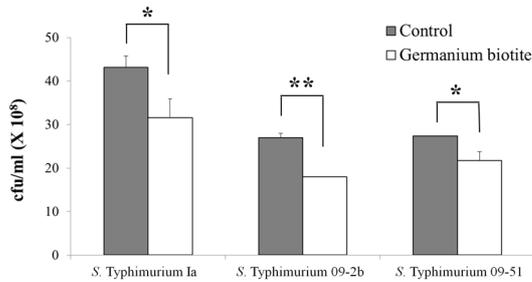


Fig. 2. The adsorptive ability of germanium biotite against *Salmonella* (*S.*) *Typhimurium* after 8 h incubation. The lower CFU than control is observed in germanium biotite group, showing CFU of 73.3%, 66.7%, and 79.5% compared with control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

시간 사이 CFU가 서서히 증가하여, 8시간 이후에 급격하게 CFU가 증가하는 양상을 보였다. *E. coli* K4의 경우 4시간 이후부터 게르마늄 흑운모 군에서 대조군에 비해 균의 성장이 억제되는 것이 유의성 있게 관찰되었으며, 10시간째에는 대조군 CFU에 비해 51.9%의 CFU가 관찰되었으나($p < 0.01$), *E. coli* Hem의 경우, 4시간째에 대조군 CFU에 비해 56.5%의 CFU가 유의적으로 관찰되고($p < 0.01$), 이후에는 성장이 억제되는 것이 관찰되지 않았다(Fig. 3). *S. Typhimurium Ia*의 경우 6, 8 및 10시간째에 대조군에 비해 게르마늄 흑운모 군에서 유의적으로 균주의 성장이 억제되는 것이 관찰되었으며(대조군 대비 각각 60.5%, 11.7%, 60.1%, Fig. 3), *S. Typhimurium 09-2b*는 6시간째에 게르마늄 흑운모 군에서 대조군 CFU의 31.4% CFU를 보이며 균주의 성장이 억제되는 것이 관찰되기 시작하였다($p < 0.01$). 이후 10시간째에는 게르마늄 흑운모 군은 대조군에 비해 5.6%의 CFU를 보이며 균주의 성장 억제가 확인되었다($p <$

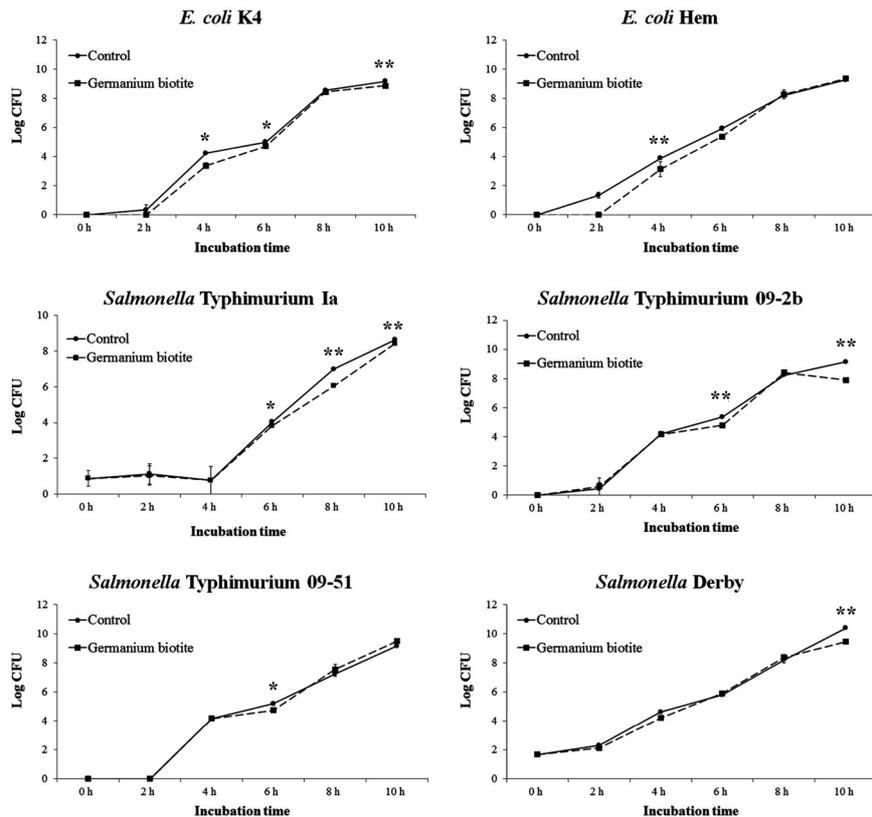


Fig. 3. The growth inhibition effects of the germanium biotite against bacteria used in this experiment. The growth of *E. coli* K4, *Salmonella Typhimurium Ia*, *Salmonella Typhimurium 09-2b*, and *Salmonella Derby* is inhibited significantly by co-culture of the germanium biotite. All bacteria used in this experiment show significant increase of CFU after 8 h of incubation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

0.01, Fig. 3). *S. Typhimurium* 09-51은 게르마늄 흑운모 균에서 대조군에 비해 36.4%의 CFU를 보이며 6시간째에 성장이 억제되었지만($p < 0.05$), 이후에는 게르마늄 흑운모의 성장 억제력은 관찰되지 않았다. *S. Derby*는 2시간째부터 게르마늄 흑운모 균에서 대조군에 비해 성장이 억제되는 것이 확인되었으나 유의적이지 않았고, 이후 10시간째에 대조군에 비해 12.1%의 CFU를 보이며 성장이 억제됨이 확인되었다($p < 0.01$, Fig. 3).

고 찰

ETEC과 *Salmonella*에 의한 소화기성 질병은 국내의 축산업에 큰 피해를 주는 질병으로 주로 어린 개체가 감염 및 발병에 취약하여 생산성 저하를 유발하고, 이로 인해 많은 경제적 피해를 주는 질병이다 [2, 3, 13, 15]. 특히 원인체인 ETEC과 *Salmonella*는 감염 후 병원체 배출 기간이 길고, 항생제 치료로 치료를 하더라도 1~6%의 경우는 완치가 되지 않고 보균 개체가 되기 때문에 박멸이 매우 어려워 한번 문제시 되는 농가에 지속적으로 발생하게 된다 [19]. 그럼에도 불구하고 항생제의 사용은 소화기계의 세균성 질병 예방 및 치료와 더불어 증체율의 증가 효과가 있어, 사료 첨가제로 많이 사용되어 왔다 [1, 12]. 하지만 새로운 항생제 내성균의 출현 및 항생제의 식육 내 잔류 등의 공중보건상의 문제 등으로 사료 첨가제로의 항생제 이용은 금지되어 가고 있으며 [10], 항생제의 과도한 사용은 장내 정상 미생물총을 변화 [4, 14, 17, 21] 시켜 다른 질병을 유발 시킬 수 있다.

축산업계에서 항생제의 사용이 제한됨에 따라 항생제를 대체할 물질에 대한 연구가 활발해지고 있고, 이중 게르마늄 흑운모는 면역 증강제로 많은 연구가 되어져 왔다 [7, 9, 18, 20]. 하지만 게르마늄 흑운모의 소화기 질병의 세균성 원인체에 대한 직접적인 작용은 연구되지 못한 실정이다. 이에 본 연구에서는 게르마늄 흑운모의 세균성 설사 원인체에 대한 작용 효과를 규명하는 기초 연구로서, 소화기계 질병의 대표적인 세균성 원인체인 ETEC 및 *Salmonella*에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력 및 성장 억제력을 시험관 수준에서 평가하였다.

공시 균주에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력 평가는 Herrera 등 [6]의 방법을 참고하여 균수를 5.0×10^8 cfu/mL로 보정하였는데, 이는 흡착력 평가를 하는 배양시간 동안의 최대 균수가 최소 균수의 20배를 넘지 않도록 하여 균주의 성장에 따라 발생할 수 있는 다른 요소를 배제하기 위해서이다. 반면 공시 균주에 대한 게르마늄 흑운모의 성장 억제력 평가는 2.0×10^2 cfu/mL로 균수를 보정하여 실시하였는데, 이는 초기 낮은 CFU의 공시 균주가 성장 억제력을 평가는 배양 시간 동안 급격하게 증

가하는 시점에서 게르마늄 흑운모가 균 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해서이다. 상기의 내용을 바탕으로 게르마늄 흑운모의 공시 균주에 대한 흡착력 및 성장 억제력을 평가한 결과, ETEC에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착력은 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 얻지 못하였으며, *Salmonella*의 경우 *S. Derby*에서 유의적이지는 않지만 흡착에 의해 대조군 보다 낮은 CFU가 관찰되었고, *S. Typhimurium*의 경우 모두 8시간째에서 유의적인 흡착효과를 공통적으로 나타내었다. 또한 *Salmonella*에 대한 게르마늄 흑운모의 흡착효과는 대조군과 비교하여 전체적으로 대조군의 $71.0 \pm 5.7\%$ 정도의 CFU가 관찰되었다. 반면 흡착력과는 달리, 게르마늄 흑운모는 모든 공시 균주에서 성장 억제능을 보여 주었다. 일부 공시 균주(*E. coli* Hem, *S. Typhimurium* Ia, *S. Typhimurium* 09-51)에서 급격한 CFU의 증가가 나타나기 전인 4시간과 6시간에서 게르마늄 흑운모의 성장 억제가 관찰되었을 뿐만 아니라, 성장 억제력을 평가한 모든 공시 균주의 성장이 게르마늄 흑운모 균에서 억제되는 것이 관찰되었다. 또한 게르마늄 흑운모 균에서 *E. coli* K4, *S. Typhimurium* Ia, *S. Typhimurium* 09-2b, 및 *S. Derby*의 8시간 이후 급격히 CFU가 증가되는 현상이 대조군에 비해 크게 억제되는 것이 관찰되었다. 더불어 성장이 억제된 공시 균주에서 게르마늄 흑운모 균은 대조군과 비교하여 대조군의 $46.8 \pm 6.2\%$ 수준의 CFU가 관찰되었으며, 이는 흡착력이 대조군의 $71.0 \pm 5.7\%$ 정도의 CFU로 측정된 것에 비교해 보면 공시 균주에 대한 성장 억제능이 흡착력에 비해 크게 작용함을 추론할 수 있었다.

이러한 결과를 통해 게르마늄 흑운모가 다량의 세균수에 노출되었을 때 기존의 세균수에 대한 흡수력은 크지 않아 전체 세균 수에는 큰 영향을 미치지 않지만, 갑자기 짧은 시간에 다량 증식하는 세균에 대해서는 성장 억제할 수 있음을 추론할 수 있었다. 장내 세균총을 고려할 경우, 세균총이 형성된 이후 게르마늄 흑운모가 장내 세균총에 노출되었을 때, 일정한 수를 유지하는 세균총에는 큰 변화를 주지 않지만, 정상 세균총이 아니거나, 장내에 낮은 수준으로 존재하는 ETEC이나 *Salmonella*와 같은 병원성 세균이 특정 환경에서 급격히 증식하는 것을 막아 세균성 소화기계 질병을 예방 혹은 완화 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

게르마늄 흑운모가 사료 첨가제로 가축에 투입되었을 경우, 정상 세균총의 변화를 유발하는 특정 균의 급작스런 증식이나, ETEC 또는 *Salmonella* 같은 세균성 소화

기 질병 원인체의 감염 후 증식을 억제하여 소화기성 질병에 대한 예방 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 예방 효과를 바탕으로 게르마늄 혹은 흑운모는 소화기성 질병을 예방 및 치료하기 위해 사용되는 항생제의 대체제로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물식품기술기획평가원 과제에 의해 수행되었으며(No. 109003-2), BK21 수의과학연구인력양성사업단 및 서울대학교 수의과학연구소의 지원이 있었습니니다.

References

1. **Cromwell GL.** Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotechnol* 2002, **13**, 7-27.
2. **Curtiss R III, Kelly SM, Hassan JO.** Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Vet Microbiol* 1993, **37**, 397-405.
3. **DeRoy C, Maddox CW.** Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev* 2001, **2**, 129-140.
4. **Floch MH.** Bacteria, absorption and malabsorption. *Am J Clin Nutr* 1967, **20**, 1244-1248.
5. **Hanzlicek GA, White BJ, Mosier D, Renter DG, Anderson DE.** Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced *Mannheimia haemolytica* pneumonia in postweaned calves. *Am J Vet Res* 2010, **71**, 359-369.
6. **Herrera P, Burghardt RC, Phillips TD.** Adsorption of *Salmonella enteritidis* by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays. *Vet Microbiol* 2000, **74**, 259-272.
7. **Holian A, Uthman MO, Goltsova T, Brown SD, Hamilton RF Jr.** Asbestos and silica-induced changes in human alveolar macrophage phenotype. *Environ Health Perspect* 1997, **105** (Suppl 5), 1139-1142.
8. **Iovine NM, Blaser MJ.** Antibiotics in animal feed and spread of resistant *Campylobacter* from poultry to humans. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**, 1158-1159.
9. **Jung BG, Toan NT, Cho SJ, Ko JH, Jung YK, Lee BJ.** Dietary aluminosilicate supplement enhances immune activity in mice and reinforces clearance of porcine circovirus type 2 in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 2010, **143**, 117-125.
10. **Kamphues J.** [Antibiotic growth promoters for the view of animal nutrition]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1999, **112**, 370-379.
11. **Lee SI, Rayamahji N, Lee WJ, Cha SB, Shin MK, Roh YM, Yoo HS.** Genotypes, antibiogram, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Escherichia coli* strains from piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest* 2009, **21**, 510-516.
12. **Muhl A, Liebert F.** Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phyto-genic feed additive. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2007, **91**, 411-418.
13. **Nagy B, Fekete PZ.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2005, **295**, 443-454.
14. **Naka K, Watarai S, Tana, Inoue K, Kodama Y, Oguma K, Yasuda T, Kodama H.** Adsorption effect of activated charcoal on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 2001, **63**, 281-285.
15. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**, 142-201.
16. **Rodríguez-Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedré B.** Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites* 1997, **19**, 441-448.
17. **Sanders CC, Sanders WE Jr, Harrowe DJ.** Bacterial interference: effects of oral antibiotics on the normal throat flora and its ability to interfere with group A streptococci. *Infect Immun* 1976, **13**, 808-812.
18. **Sarker MSK, Kim GM, Yang CJ.** Effect of green tea and biotite on performance, meat quality and organ development in ross broiler. *Egypt Poult Sci* 2010, **30**, 77-88.
19. **Trusalu K, Mikelsaar RH, Naaber P, Karki T, Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M.** Eradication of *Salmonella* Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. *BMC Microbiol* 2008, **8**, 132.
20. **van den Bogaard AE, Stobberingh EE.** Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* 1999, **58**, 589-607.
21. **Yamazaki H, Fujieda M, Togashi M, Saito T, Preti G, Cashman JR, Kamataki T.** Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life Sci* 2004, **74**, 2739-2747.