

## Chitosan-oligosaccharides가 병원성 대장균의 疎水性에 미치는 영향

최현성 · 한호재 · 김희경\* · 김희선\* · 강문일

전남대학교 수의과대학, 생물공학연구소\*  
(1999년 4월 12일 접수)

### Effect of chitosan-oligosaccharides on hydrophobicity of pathogenic *Escherichia coli*

Hyun-sung Choi, Ho-jae Han, Hee-kyung Kim\*, Hee-sun Kim\*, Mun-il Kang

College of Veterinary Medicine, Biological Engineering Institute\*,  
Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

(Received Apr 12, 1999)

**Abstract** : The purpose of this study was to evaluate effect of chitosan-oligosaccharides (CHIOL) on hydrophobicity of pathogenic *E coli* including a field isolate from suckling piglet with diarrhea, *E coli*-O157 : H7, and *E coli*-O149 : K88ac. *E coli* field isolate appeared adhesion of 100% to n-hexadecane between 0.00125% and 0.05% CHIOL. *E coli*-O157 : H7 occurred adhesion of 69% and 64% under the level of 0.00125% and 0.025% CHIOL, respectively. *E coli*-O149 : K88ac showed adhesion of 100% in higher than 0.025% CHIOL. For cationic action, the adhesion of *E coli* isolate and *E coli*-O149 : K88ac to n-hexadecane were inhibited at level of higher than 10mM Ca<sup>2+</sup> but did not induce any difference among the concentrations used(p < 0.01). However, the adhesion of *E coli*-O157 : H7 to n-hexadecane was inhibited at level of higher than 50mM Ca<sup>2+</sup>.

In a field trial, control piglets showed average mortality of up to 58% during 3 days after the onset of diarrhea. In contrast, the prevalence of *E coli*-induced diarrhea in CHIOL-treated groups without mortality was dropped down to average 34% on the 1st day after the treatment of CHIOL, and average 2% on the 4th day. After then, piglets with diarrhea was not present. In conclusion, the low concentrations of CHIOL were most likely to associate with the enhancement of hydrophobicity to pathogenic *E coli*. Calcium inhibited the hydrophobicity of *E coli* by CHIOL. These results suggested that CHIOL could be played an efficient and reliable role in treating enteric colibacillosis of piglets.

**Key words** : chitosan-oligosaccharides, *E coli*, hydrophobicity, piglet diarrhea.

---

본 연구는 농진청 특정연구과제(가축의 생산성 저해질병 예방 및 치료용 항미생물질의 개발)의 일부 결과임을 밝힙니다.  
Address reprint requests to Dr. Ho-jae Han, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Republic of Korea.

## 서 론

키틴은 N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosamine이 직쇄형으로 결합(1 $\rightarrow$ 4)된 단순 염기성 다당류로서 갑각류, 곤충, 곰팡이 및 효모 등의 골격을 이루고 있으며<sup>1</sup> 이를 알칼리로 처리하여 탈아세틸화 시키면 키토산이 된다<sup>2,3</sup>. 최근에 수술후 창상치유<sup>4</sup>, 유방염 원인균<sup>5</sup> 및 자돈설사 유발 대장균<sup>6</sup>에 키토산이 효과가 있다고 알려진 바 있다. 그러나 키토산의 항균작용에 대한 기전은 아직 확실치 밝혀지지 않고 있으나 세균의 소수성에 미치는 효과가 항균성과 관련이 있다는 보고도 있다<sup>7</sup>. 따라서 키토산의 동물과 사람에 대한 임상적 응용을 확대하기 위해서 그 작용 기전을 밝히는 일은 매우 중요한 일이다.

키토산을 비롯한 poly-L-lysine, lysozyme 등과 같은 양이온성 폴리머들은 미생물이 여러가지 표면에 부착하는 것을 촉진한다고 알려졌다<sup>8-10</sup>. 이런 폴리머들은 낮은 농도에서도 미생물에게 소수성을 부여할 수 있는데 이들 효과는 hydrocarbons과 polystyrene 등의 부착실험에 의해 입증된 바 있다<sup>7</sup>. 미생물의 소수성은 응집, 부착, 탐식 및 불용성 기질에서의 성장 등에 중요한 역할을 하며<sup>11-13</sup> 생리학적인 환경 즉, 성장단계, 배지 및 항생제 등의 존재 여부에 따라 표면 소수성이 바뀌어지게 된다<sup>8</sup>. 한편 세균 표면에는 소수성을 증가시키는 성분과 감소시키는 성분이 공존하고 있으며<sup>14</sup> 항생제들도 세균의 소수성을 증가시키는 종류가 있는가<sup>15</sup>하면 감소시키는 종류가 있다<sup>16,17</sup>.

이에 본 연구에서는 chitosan-oligosaccharides(CHIOL)가 자돈의 조발성설사를 일으키는 대장균 야외분리주, *E coli*-O157:H7 및 *E coli*-O149:K88ac의 소수성과 포유자돈 설사에 미치는 효과를 알아보았다.

## 재료 및 방법

재료 : 본 실험에 사용된 CHIOL은 夜久<sup>18</sup>(1993)와 김<sup>6</sup>(1998)의 방법으로 만든 후 실험실 내에서 병원성 대장균에 대해 항균성을 확인하였다. 이 CHIOL은 수용성이며 FT-IR 분석법으로 확인한 결과 일반 키토산(C3646, Sigma)과 같은 물성을 지녔으며 탈아세틸화도는 96%, 평균분자량은 1,814, 7~10 당체가 54%, 11~14 당체가 46%를 차지하고 있다. 한편 실험에 사용한 대장균은 포유자돈 설사유발 대장균 야외분리주, *E coli*-O157:H

7(ATCC 43894) 그리고 *E coli*-O149:K88ac 등이었다. 대장균주는 냉동보관(-70°C)하면서 실험전 5% 혈액 한천 배지에 도말하여 집락의 성상을 확인한 후 단독집락을 골라 Tryptic soy broth(Difco)에 진탕배양(37°C, 24시간)시켜 사용하였다. n-Hexadecane은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

### 방법 :

1) Hexadecane과 대장균의 부착성에 대한 CHIOL 및 양이온의 효과검사 : Goldberg *et al*<sup>7</sup>(1990)의 방법을 변형하여 실시하였는데 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 야외분리주, *E coli*-O157:H7(ATCC 43894) 및 *E coli*-O149:K88ac를 PBS(pH 6.8)로 3회 원심분리(5,000rpm, 5분)하여 세정한 후 분광광도계를 이용하여 흡광도(400 nm)가 0.15가 되면서 최종용량이 3ml이 되도록 PBS(pH 6.8)로 희석하였다. 여기에 CHIOL을 최종농도가 0.00125, 0.025, 0.05, 0.075 및 0.1% 되도록 첨가하고 실온에서 30분동안 반응시킨 후 n-hexadecane을 0.4ml씩 첨가한 다음 1분간 잘 혼합하였다. 층이 분리되면 아래 수용액층의 흡광도를 측정하였고 결과는 n-hexadecane을 투여하기 전의 세균부유액의 흡광도(Ao)에 수용액층의 흡광도(Ai) 감소률 %로 나타내었다{100-[100(Ai/Ao)]}.

양이온의 효과를 보기 위해 각 농도의 CaCl<sub>2</sub>(0, 5, 10, 20, 35, 70mM)들을 희석액으로 사용하여 초기 흡광도를 0.15로 맞추었다. 0.025% CHIOL 존재하에 30분간 반응시킨 후 위의 방법대로 n-hexadecane을 첨가한 후 흡광도의 변화를 측정하였다.

2) CHIOL의 포유자돈 대장균성 설사증 치료효과 : CHIOL이 대장균성 설사증에 치료효과가 있는지 알아보기 위해 전남 소재 1,000~1,500두 규모의 전업 양돈장중 전형적인 대장균성 설사증이 발생한 2개 농장을 선정하여 1~4 산차의 모돈에서 출생한 7일령 이내의 설사증상이 나타난 5복의 자돈을 사용하였다. 대조군은 분만후 1~2일령의 조발성 설사증상을 보이는 1복의 동복 자돈을 대상으로 하였다. 실험군으로 대조군과 마찬가지로 동일 모돈에서 출생한 동일 일령의 설사유발 자돈을 사용하였다. 실험군은 5% CHIOL을 기본으로 하여 CHIOL의 희석정도와 투여방법에 따라 4개 군으로 나누었다. 즉, 5% CHIOL을 20, 30, 50배로 희석하여 3ml씩 3일간(2회/1일) 경구투여한 군과 출생후 설사증상을 나타낸 동복자돈에게 100배로 희석하여 자유음수시킨 군으로 각각 나누었다. 대장균 설사증이 발생한 한 복은 CHIOL

처리없이 대조군으로 사용하였다.

통계처리 : 실험의 모든 결과는  $\text{means} \pm \text{standard error (SE)}$ 로 나타냈다. 통계처리는 Students' *t*-test를 이용하였고  $p < 0.01$  일때 유의성 있는 결과로 표시하였다.

## 결 과

Hexadecane과 대장균의 부착성에 대한 CHIOL 및 양이온의 효과 : 대장균 야외분리주는 CHIOL 0.00125~

0.05%에서 n-hexadecane에 100%의 부착률을 보였으며 *E coli*-O157 : H7은 0.00125%와 0.025%에서 69%와 64%를, 0.05%에서는 23%의 부착률을 보여 주었다. *E coli*-O149 : K88ac는 0.025% 이상에서 100%의 높은 부착률을 보여 주었다(Fig 1). Chitosan이 실험균주와 n-hexadecane과의 부착성에  $\text{Ca}^{2+}$ 이 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 실시해 보았다. 2가 양이온인  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가하였을 경우 야외분리주는 10mM 이상의  $\text{Ca}^{2+}$  농도에서는 78~56%의 억제율을 보였으나( $p < 0.01$ ) 그 이상의 농도에서는 억제력에 차이가 없었다. *E coli* O157 : H7은 50mM 이상의 농

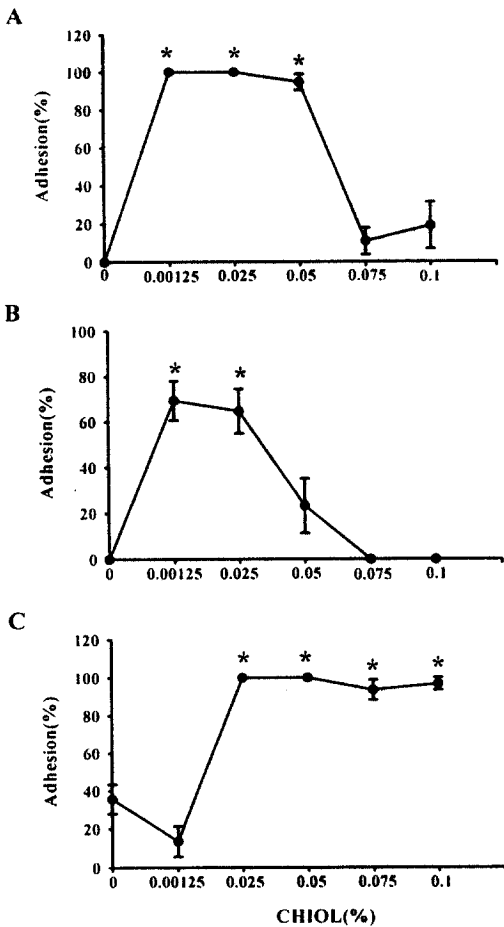


Fig 1. Adhesion of *E. coli* to n-hexadecane in the presence of chitosan-oligosaccharides(CHIOL). Adhesion of *E. coli* to n-hexadecane was evaluated from 0.00125% CHIOL. Adhesion was expressed as the decrease percentage in OD of the aqueous phase compared with the OD prior to mixing. Values were indicated the mean  $\pm$  SE( $n = 6$ ). \* $p < 0.01$  vs control. A : *E. coli* isolate, B : *E. coli*-O157 : H7, C : *E. coli*-O149 : K88ac.

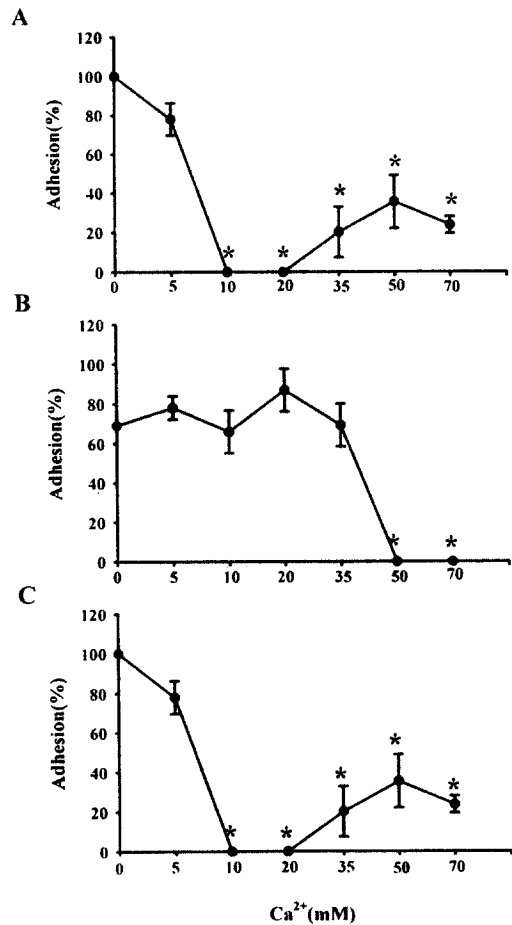


Fig 2. Effect of calcium on chitosan-oligosaccharides(CHIOL) mediated adhesion of *E. coli* to n-hexadecane. *E. coli* were washed by  $\text{CaCl}_2$  according to various concentrations and then added n-hexadecane in the presence of 0.025% CHIOL. Values were the mean  $\pm$  SE( $n = 6$ ). \* $p < 0.01$  vs 0mM  $\text{Ca}^{2+}$ . A ; *E. coli* isolate, B : *E. coli*-O157 : H7, C : *E. coli*-O149 : K88ac.

**Table 1.** Therapeutic effect of orally-treated chitosan-oligosaccharides(CHIOL) in piglets with diarrhea

Group	No. of diarrheal piglets	Dosage <sup>a</sup> (dilution)/ day	Day(s) after CHIOL treatment				
			1	2	3	4	5
Control	12	No treatment	9 <sup>b</sup> (75%)	6(50%)	5(42%)	5(42%)	5(42%)
	13	6ml(50)	4 <sup>c</sup>	3	0	0	0
CHIOL-treated	12	6ml(30)	9	6	4	1	0
	11	6ml(20)	0	0	0	0	0
	10	ad libitum(100)	3	2	1	0	0
	46		16/46(34%)	11/46(24%)	5/46(11%)	1/46(2%)	0/46(0%)

a: CHIOL(5%) was administered only for 3 days from the day of onset of diarrhea, b: No. of survivals, c: No. of diarrhea.

도에서 CHIOL에 대해 가장 강한 억제력을 보였다. 그러나 *E coli*-O149:K88ac의 경우 10mM 이상의 Ca<sup>2+</sup> 농도에서 억제력을 나타내었으나 농도간 차이는 인정되지 않았다(Fig 2).

대장균성 자돈설사증에 대한 CHIOL의 치료 효과 : CHIOL의 대장균성 자돈설사증에 대한 치료효과를 측정하기 위해 설사증이 발생한 포유자돈에 대하여 투여량 및 투여방법을 달리하여 실험을 실시해 보았다(Table 1). CHIOL을 처리하지 않은 대조군에서는 분만후 7일 이내에 설사(100% 기준)가 나타나 설사후 1일이 경과시 생존률이 평균 75%, 2일 경과시는 50%, 3일이 경과시는 42%로 전체 설사증상이 발병한 자돈중 약 58%가 3일 이내에 폐사하였다. 그러나 CHIOL을 투여한 실험군은 실험군 모두(100% 기준)에서 폐사없이 1일이 경과시 설사증상을 나타내는 자돈은 평균 34%로 감소되었으며, 2일 후에는 24%로 크게 떨어졌고, 3일 후에는 11%, 4일 후에는 2% 밖에 나타나지 않았다. 본 실험에서 농도가 높을수록 비교적 설사 치료효과가 좋았다. CHIOL 치료후 5일이 지난 후에는 모든 군에서 설사가 나타나지 않아 대조군과 비교시 그 치료 및 생존효과가 뚜렷이 인정되었다(p < 0.01).

## 고 찰

천연항균제로서의 기능을 갖는 키토산은 아직 그 작용기전이 체계적으로 입증된 바 없다. 키토산의 항균기전에 대한 연구는 주로 대장균 및 살모넬라를 포함한 일반 장내세균, 효모 및 식물세포 등을 이용하여 이루어져

왔다. 현재 알려진 기전으로는 세포막에 작용하여 투과성 및 형태학적 변화<sup>19-24</sup>, 세포간 응집<sup>21</sup> 및 소수성을 증가시키는 것 등이 있다<sup>7</sup>. 실제로 소수성은 세균의 부착, 탐식, 집락화, 증식, 성장 및 활주에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>11-13,25</sup>. 세균의 특성에 따라 발현되는 소수성의 정도도 달라지는데 *E coli*-O157:H7과 태아돌연사 증후군의 원인체로 분리된 대장균 등은 낮은 표면 소수성과 함께 높은 병원성을 나타내고 있고<sup>26,27</sup> *Campylobacter jejuni*의 경우 세균표면이 음전하를 띠면서 낮은 표면소수성으로 장상피에 더 잘 부착하였다<sup>28</sup>. 이 실험에서 CHIOL의 농도에 따른 실험군의 n-hexadecane에 대한 부착능을 보았을 때 종간의 차이가 나타나긴 했지만 0.025-0.05%의 농도에서는 부착능을 증진시켰었고 그 이상의 농도에서는 억제하였다. 이는 n-hexadecane과 세균을 혼합할 경우 CHIOL이 세균표면과 흡착하여 세균들이 n-hexadecane에 잘 붙게 하여 n-hexadecane과 세균 부유액의 경계면으로 세균들이 이동하여 수용액층에는 세균들이 제거된 상태로 남아 있게 되기 때문에 n-hexadecane을 투여하기 전의 흡광도보다 투여 후의 흡광도가 감소하게 되고 이 감소된 비율만큼 세균의 소수성도 증가하였다고 볼 수 있다. 또한 고농도의 CHIOL에서는 오히려 억제하는 효과가 나타났는데 이는 세균과 작용하고 남은 CHIOL들이 오히려 세균과 n-hexadecane과의 작용을 방해하기 때문으로 생각된다<sup>7</sup>.

CHIOL에 의한 소수성 증진효과는 다른 양이온들에 의해 영향을 받는데 이는 세균의 외막성분내 lipopolysaccharides와 인성분이 음전하를 띠고 있기 때문에<sup>29</sup> 이들 양이온으로 처리시 세균의 표면을 둘러싸게 되어

CHIOL이 세균에 작용할 수 있는 부위를 차단하게 되며 또한 CHIOL이 흡착제로서의 성격이 강하기 때문에 세균부유액 내에 있는 칼슘과 같은 양이온들과 먼저 결합하게 되어 세균에 작용할 수 있는 CHIOL이 줄어들기 때문으로 생각된다. CHIOL과 흡착제로서의 성격이 비슷한 항생제인 nitroxoline을 대장균에 적용할 경우 세균막에 작용하여 표면소수성을 증가시킴으로써 세균의 부착성을 억제함으로써 항균효과를 나타낸다. 그러나 nitroxoline에 마그네슘(50mM)과 칼슘(10mM)을 투여할 경우 작용이 감소되는데<sup>30</sup> 이는 nitroxoline이 CHIOL처럼 흡착효과가 있기 때문이다. 본 실험에서도 칼슘은 50mM 이상의 농도에서 억제력이 크게 나타났다. 결국 표면 소수성이 낮은 특성으로 인하여 병원성을 나타내는 세균은 CHIOL을 이용하여 표면소수성을 높임으로써 병원성 발현을 차단할 수 있다고 생각된다. 이러한 기초성적을 토대로 병원성 대장균에 대한 포유자돈 설사증에 대하여 일반 야외농장에서 적용하였을 경우 일반 항생제에 비금가는 치료효과가 확인되었다. 축산현장에서 가축질병 치료 및 예방을 위해 일반 항생제를 사용할 경우 일부 약제들은 세균의 표면소수성을 증가시킴으로 체내의 탐식작용에 대해 저항성을 가지게 함으로써 약제 내성이 생기게 되는 원인이 될 수 있는데<sup>16</sup> CHIOL의 경우 세균의 표면특성으로나 유전적으로나 내성이 발현되지 않아<sup>6</sup> 향후 유용하게 사용할 수 있는 물질로 판단된다.

결론적으로 CHIOL은 세균막에 작용하여 세균의 표면소수성을 증진시킴으로써 항균작용을 나타내고 아울러  $Ca^{2+}$  같은 양이온들이 CHIOL의 작용을 상쇄시켰다. 또한 야외농장에서 포유자돈에서 발생하는 대장균성 설사증에 적용시, 설사치료 능력이 매우 뛰어나 유용한 항균물질로 판단되었다.

## 결 론

갑각류유래 키토산에 올리고당을 붙여 제조한 CHIOL이 대장균의 소수성에 미치는 영향을 조사하였다. 검사 대상 병원성 대장균은 포유자돈에서 설사원인균으로 분리된 야외분리주와 *E coli*-O157:H7, *E coli*-O149:K88ac를 사용하였다.

CHIOL을 이용하여 n-hexadecane에 대한 이들 병원성 대장균의 부착성은 야외 대장균 분리주의 경우 0.00125~0.05% CHIOL에서 100%의 부착률을 보였고 *E coli*-O157:

H7의 경우 0.00125%, 0.025% CHIOL에서 각각 69%와 64%의 부착률을 보였으며 *E coli*-O149:K88ac는 0.025% 이상의 CHIOL 농도에서 부착률이 100%까지 소수성이 증진되었다( $p < 0.01$ ).  $Ca^{2+}$ 은 농도의존적으로 CHIOL에 의해 대장균이 탄화수소에 부착하는 것을 억제하였다.

야외에서 대장균성 설사를 보이는 포유자돈을 선정하여 5% CHIOL을 20, 30, 50배 희석하여 3일간(2회/1일) 경구투여한 군, 100배 희석하여 자유음용시킨 군과 대조군을 비교하였을 때 대조군은 설사발생후 3일 이내에 58%까지 폐사하였으나 CHIOL을 투여한 실험군 모두 (100% 기준)에서 폐사없이 투여후 1일째에 설사두수가 평균 34%까지 감소하기 시작하여 5일째부터는 설사가 보이지 않았다.

## 참 고 문 헌

1. Carolyn RA, Hadwiger LA. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exper Mycol*, 3:285-287, 1979.
2. Hong K, Samuel PM. Preparation and characterization of chitin and chitosan-A review. *J Aqua Food Prod Technol*, 4(2):27-52, 1995.
3. Sylvia TH, Saul R, Harold JB. The precipitation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation. *J Am Chem Society*, 79:5046-5049, 1957.
4. Minami S, Okamoto Y, Eguch H, et al. Effect of chitosan as wound healing acceleator-application to dirty wounds in veterinary practice. *Japan Soci for Chitin and Chitosan*, 37-38, 1992.
5. 문진산, 주이석, 구복경 등. 젖소 유방염에 대한 키토산의 효능에 관한 연구. *대한수의학회지*, 38(1): 71-76, 1998.
6. 김희경. 키토산 올리고당의 제조 및 병원성 대장균에 대한 항균효과. 부경대 박사학위논문, 142-150, 1998.
7. Goldberg S, Doyle RJ, Mel R. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *Bacteriol*, 5650-5654, 1990.
8. Champluvier B, Kamp B, Rouzhet PG. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase retained in yeast: adhesion of the cells on a support. *Appl Microbiol Biotechnol*, 27:464-

- 469, 1988.
9. Rosenberg M, Regimov N, Zosim Z, *et al.* Separation of amphipathic proteins based on adsorption to hexadecane: Water interfaces. *Prep Biochem*, 16:133-141, 1986.
  10. Tellefson LM, Germaine GR. Adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. *Infect Immun*, 51: 750-759. 1986.
  11. Bar-Ness R, Avrahamy N, Matsuyama T, *et al.* Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. *J Bacteriol*, 170(9):4361-4364, 1988.
  12. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*, 50:97-101, 1985.
  13. Smit G, Straver MH, Lugtenberg BJ, *et al.* Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Appl Environ Microbiol*, 58(11): 3709-3714, 1992.
  14. Mallick SA. Cell surface hydrophobicity and its relation to outer membrane proteins of *Serratia marcescens*. *Indian J Exp Biol*, 34(2):107-110, 1996.
  15. Majtan V, Majtanova L. Influence of subinhibitory concentration of antibiotics on surface hydrophobicity of *Salmonella enteritidis*. *Arzneimittelforschung*, 8(6):697-700, 1998
  16. Salami JO, Bassey E. Hydrophobic response of *Escherichia coli* exposed to subminimal inhibitory concentrations of ampicillin and chloramphenicol. *Afr J Med Med Sci*, 22(4):53-6, 1993.
  17. Savoia D, Malcangi A, Martinetto P. The effect of subinhibitory concentration of some antibiotics on the hydrophobicity of gram-negative bacteria. *J Chemother*, 2(1):20-25, 1990.
  18. 夜久 富美子, キチン,キトサンオリコ糖の分離技術と分析技術. 月刊フットケミカル, 2, 91-97, 1993.
  19. Young DH, Kohle H, Kauss Heinrich. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells, *Plant Physiol*, 70:1449-1454, 1982.
  20. Lueba JL, Stossel P. Chitosan and other polyamines: Antifungal activity and interaction with biological membranes. *In Chitin In Nature and Technology*, 215-222, 1985.
  21. Ralston GB, Tracey MV, Ramela MW. The inhibition of fermentation in baker's yeast by chitosan. *Biochim Biophys Acta*, 93:652-655, 1964.
  22. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol*, 6(3):257-272, 1992.
  23. Ueno K, Nishi N, Tokura S. Antimicrobial activity of chitosan and its mechanism. *Chitosan Research of Japan*, 2(2):112-113, 1996.
  24. Muzzarelli M, Tarsi M, Filippini O, *et al.* Antimicrobial properties of N-Carboxylbutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2019-2023, 1990.
  25. Gilbert P, Evans GJ, Evans E, *et al.* Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol*, 71(1):72-77, 1991.
  26. Bettelheim KA, Chang BJ, Elliott SJ, *et al.* Virulence factors associated with strains of *Escherichia coli* from cases of sudden infant death syndrome. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 18(3):179-188, 1995.
  27. Sherman P, Soni R, Petric M, Karmali M. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia Coli*, O157: H7. *Infect Immun*, 55(8):1824-1829, 1987.
  28. Walan A, Kihlstrom E. Surface charge and hydrophobicity of *Campylobacter jejuni* strains in relation to adhesion to epithelial HT-29 cells. *APMIS*, 96(12): 1089-1096, 1988.
  29. Nikiso H. The outer membrane. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. Fredric CN, *et al.* 2nd edition. ASM Press 29-36, 1996.
  30. Bourloux P, Karam D, Amgar A, *et al.* Relation of the chelating property of nitroxoline, the surface hydrophobicity and the inhibition of bacterial adherence. *Pathol Biol (Paris)*, 37:600-604, 1989.