

## 리팜피신과 오픈로삭신에 내성인 *Enterococcus faecalis* 균주의 개발

이수화 · 김숙경 · 정영자 · 심미자\* · 김병각 · 최웅칠\*

서울대학교 약학대학, \*서울 시립대학교 생명과학과

(Received February 9, 1996)

### Development of *Enterococcus faecalis* Strains Resistant to Rifampicin and Ofloxacin

Soo-Hwa Lee, Sook-Kyung Kim, Young-Ja Chung, Mi-Ja Shim\*,

Byong-Kak Kim and Eung-Chil Choi\*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-743, Korea

\*Department of Life Science, Seoul City University, Seoul 130-743, Korea

**Abstract**—The preparation of *Enterococcus faecalis* RSI is used as a therapeutics for human intestinal disorders. However, the microbe in this preparation is usually very sensitive to rifampicin and fluoroquinolones. If this preparation is taken with rifampicin or fluoroquinolones, its therapeutic effect can not be expected. *E. faecalis* RFR11, containing resistance to rifampicin was obtained by MNNG mutation method. Serial passage of *E. faecalis* RFR11 produced *E. faecalis* OFR16 on agar with 2-fold minimal inhibitory concentration of ofloxacin produced. *E. faecalis* OFR16 was resistant to fluoroquinolones up to 8~256 fold higher than that for the original strain. *E. faecalis* OFR16 also exhibited identical characteristics with the parent strain when they were tested for lactic acid formation and growth inhibition of *E. coli* MB4-5737 and *Shigella sonnei* MB4-10411. From *in vitro* test, it was identified that rifampicin and ofloxacin is not inactivated by certain factors of *E. faecalis* OFR16. Conclusively, *E. faecalis* OFR16, rifampicin and fluoroquinolones resistant mutant, is an efficient strain that has insensitivity against rifampicin and fluoroquinolones and original biochemical characteristics of the parent strain.

**Keywords** □ *Enterococcus faecalis* OFR16, Rifampicin, Fluoroquinolones, Multi-step mutation.

유산을 생성하는 *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus bifidus*, *Lac. acidophilus*<sup>12)</sup>, 낙산을 생성하는 *Clostridium butyricum*<sup>5)</sup>, 그리고 *Bacillus mesentericus* 등은 소장이나 대장에서 유해균의 증식을 억제할 뿐만 아니라 유해균이 생성하는 유해물질(부패산물, 독소 등)을 감소시켜 정장 효과를 나타냄으로써 장내 건강을 유지시켜 준다.

특히 *E. faecalis* 균주는 타균주에 비해 증식이 매우 빨라 신속히 장내의 유해균이나 유해물을 억제하여 장내 환경을 유익한 쪽으로 바꿀수 있기 때문에 정장제 중의

비교적 성장이 늦은 균주인 *Lac. acidophilus*, *Cl. butyricum* 등과 같이 사용되고 있다.

결핵환자 및 나병환자가 항결핵제 또는 항나병제를 장기복용하는 경우에는 장내 정상 세균총이 파괴되어 흡수부진, 소화불량 등의 장질환을 일으킬수 있으므로 위의 약물과 정장용 생균제제를 병용하는 것이 바람직하다고 Gordon<sup>10)</sup> 등이 보고한 바 있다. 그런데 이때 사용되는 약물들이 정장용 균주를 사멸시키거나, 반대로 정장균주가 약물을 불활성화시키게 되면 정장제로서 유용하지 않게 된다. 따라서 본 연구에서는 정장균주인 *E. faecalis*를 항결핵제와 항나병제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 결핵 및 나병환자의 장내질환을 치료

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

또는 개선시킬수 있는 정상균주를 개발하고자 하였다.

본 실험에 앞서 *E. faecalis*에 대한 15종의 항결핵제 및 항나병제의 최소저지농도(MIC)를 측정한 결과 모균주가 rifampicin과 ofloxacin에 대해 감수성을 갖고 있음이 밝혀졌다. 본 실험에서는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 처리로 얻은 rifampicin 내성균주 *E. faecalis* RFR11<sup>3)</sup>을 다단계 자연돌연변이 방법으로 처리하여 fluoroquinolone계 항생제에도 내성을 나타내는 이중 내성균주인 *E. faecalis* OFR16을 얻었다. 이 균주에 대하여 정장용 생균제제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 산생성능, *E. coli*와 *Shigella sonnei* 등의 장내 세균 생육 억제능등의 생리적, 생화학적 특성을 모균주와 비교, 검토하였다. 또한 이중 내성균주에 의하여 rifampicin과 ofloxacin이 불활성화 된다면 항생물질의 치료 목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험을 통해서 그 가능성을 알아보았다.

### 실험방법

**실험균주** - 본 실험에서는 제일제당에서 분양받은 *Enterococcus faecalis* 균주를 변형시킨 rifampicin 내성균주 RFR11 균주<sup>3)</sup>를 사용하였다. 그 외의 균주로는 본 연구실에서 보관하고 있는 *E. coli* MB4-5737, *Shigella sonnei* MB4-10411, *E. coli* MB4-5376, *B. subtilis* ATCC 6633, *Serratia marcescens* ATCC 27117을 사용하였다.

**배지** - *E. faecalis* 생육 배지로는 GPY medium (Glucose 10 g, yeast extract 10 g, peptone 10 g, sodium acetate 10 g, B-salts 5 ml, dH<sub>2</sub>O q.s. : total vol. 1 l, pH 6.8)을 사용하였으며, 그 외의 균주의 생육 배지로는 Mueller-Hinton(MH medium, Difco Co.)을 사용하였다. 장내 세균 생육 억제 실험시 *E. coli* 선택 배지로는 EMB agar(Difco Co.) medium을 사용하였고, *S. sonnei* 선택 배지로는 MacConkey agar(Difco Co.) medium을 사용하였다.

**최소 저지 농도(MIC)의 측정** - 본 실험에서는 rifampicin, kanamycin, isoniazid, ethambutol, ofloxacin(OFLX), pefloxacin(PFLX), norfloxacin(NFLX), ciprofloxacin(CFLX), sparfloxacin(SFLX), rufloxacin(RFLX), lomefloxacin(LMFX) levofloxacin(LVFX), tosufloxacin(TSFX) 등의 항결핵제 및 항나병제를 사용하였다. GPY에 전 배양한 균액

을 10<sup>6</sup> CFU/ml로 희석하여 2-fold 액체 희석법으로 MIC를 측정하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

**이중 내성균주의 선발** - GPY에 보관 중인 rifampicin 내성균주인 *E. faecalis* RFR11을 37°C에서 배양한 후 다시 GPY에서 mid-log phase까지 배양하고 6000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 10<sup>10</sup> CFU/ml로 모아 10 µg/ml의 rifampicin과 2-fold MIC 농도의 ofloxacin을 함유한 고체 배지에 100 µl씩 가하여 37°C에서 39~48시간 배양하고 돌연변이 집락을 선발하였다. 선발된 돌연변이균주를 ofloxacin의 농도가 단계별로 높은 배지로 점차 옮기면서 배양하였다.

**돌연변이균주의 내성 유지 시험** - 2주에 한번씩 8개월간 계대하여 계대시마다 각 항생물질의 MIC를 측정하여 내성이 소실되는지의 여부와 초기의 MIC가 그대로 유지되는지 여부를 확인하였다.

**산도정량** - 37°C에서 하룻밤 전배양한 모균주와 돌연변이균주를 새로운 GPY에 2.5% 접종하고 37°C, 24시간 배양하였다. 배양액을 6000×g에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 멸균 증류수로 5배 희석하여 1% phenolphthalein 용액을 지시약으로 0.1 N NaOH 용액으로 적정하였다.

**장내 세균 생육 억제 시험** - *E. faecalis* 모균주와 돌연변이균주 및 *E. coli* MB4-5737를 전배양한 후, 모균주 또는 돌연변이균주와 *E. coli*를 10 : 1과 100 : 1의 비율로 37°C에서 혼합배양하고 대조로는 *E. coli*만을 배양하였다. 접종 후 0시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간 그리고 24시간 마다 균액을 취하여 일정 단계로 희석한 후 *E. coli* 선택 배지인 EMB agar 배지에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 성장한 균 집락을 세어 *E. coli*에 대한 생육 억제능을 측정하였다. *S. sonnei* MB4-10411에 대하여 *E. coli* 생육 억제 시험과 동일한 방법으로 실험하였다.

**내성균주에 의한 ofloxacin의 불활성화 가능성에 대한 시험** - *E. faecalis* OFR16을 전 배양한 후 ofloxacin이 25 µg/ml 함유된 GPY에서 18시간 배양하고 원심분리하여 상등액으로 5 µg/disc 농도의 ofloxacin 디스크를 만들어 *B. subtilis* ATCC 6633 균주를 함유하는 평판 위에 놓아 고정시키고 16시간 배양한 후 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 저지원의 크기와 비교하여 불활성화 여부를 확인하였다. 이때

대조균으로는 ofloxacin에 비감수성인 *E. coli* MB4-5376 균주를 사용하였다.

**실험결과**

***E. faecalis*에 대한 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도** - *E. faecalis* 모균주, RFR11, OFR16에 대한 15종의 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도를 Table I에 나타내었다. *E. faecalis* 모균주는 rifampicin에 대하여 비교적 큰 감수성을 나타내었고, fluoroquinolone계 항생제에 대하여 0.5~16 µg/ml로 다양한 MIC를 보였다. *E. faecalis* RFR11 균주에 대한 rifampicin의 MIC는 200배 이상 상승하였고, fluoroquinolone계 항생제의 MIC는 모균주와 같았다. *E. faecalis* OFR16 균주에 대한 fluoroquinolone계 항생제의 MIC를 측정한 결과 OFLX, RFLX는 8배, PFLX, LMFx, LVFX, RSFX, TSFX는 16배, CPFx는 32배, NFLX, SPFX는 64배 상승하였다.

**Table I**—Antimicrobial activity of antituberculosis agents against *E. faecalis* strains

Drug	MIC (µg/ml)		
	Parent	RFR11	OFR16
Rifampicin	4	>800	>800
Kanamycin	128	>256	>256
Isoniazid	>256	>256	>256
Ethambutol	>256	>256	>256
Pyrazinamide	>256	>256	>256
D-cycloserine	64	64	64
Ofloxacin	8	8	64
Pefloxacin	8	8	128
Norfloxacin	1	1	64
Ciprofloxacin	1	1	32
Sparfloxacin	0.5	0.5	32
Rufloxacin	8	8	64
Lomefloxacin	16	16	>256
Levofloxacin	4	4	64
Tosufloxacin	1	1	16

**Table II**—Maintenance test for rifampicin and ofloxacin resistance of *E. faecalis* strains

Strain	Subculture							after	
	0	1st	2nd	3rd	4~10th	11th	12 months		
	REP	OFLX					(MIC : µg/ml)		
Parent	4	8	-	-	-	-	RFP	OFLX	
OFR16	>800	64	+	+	+	+	>800	64	

+ : resistant  
- : susceptible

**내성균주의 분리** - rifampicin 내성균주 *E. faecalis* RFR11 균주에 대하여 spontaneous multi-step mutation 방법을 사용하여 rifampicin과 ofloxacin에 이중 내성인 돌연변이균주를 선발하여 *E. faecalis* OFR16, *E. faecalis* OFR17이라 명명하고, 이 중 ofloxacin의 MIC가 64 µg/ml인 *E. faecalis* OFR16에 대하여 산도정량, 장내 세균 생육 억제 시험을 진행하였다.

**내성균주의 내성 유지** - rifampicin과 fluoroquinolone계 항생제에 내성인 돌연변이균주를 8개월 동안 2주에 한번씩 계대하여 MIC를 측정 한 결과, MIC가 rifampicin이 >800 µg/ml, ofloxacin이 64 µg/ml로 내성이 유지됨을 알 수 있었다(Table II).

**산도 정량** - 모균주 및 돌연변이균주에 의하여 생성되는 유기산량을 측정, 비교한 결과 돌연변이균주의 유산 생성량은 모균주와 비교하여 99.2%로서 비슷한 생성량을 보였다(Table III).

**장내 세균 *E. coli* MB4-5373 생육 억제** - *E. faecalis* 균주가 장내 유해균의 생장을 어느 정도 억제하는가를 알아보기 위하여 임상 분리 *E. coli* MB4-5373을 대상으로 하여 *E. faecalis* 모균주 및 돌연변이균주에 의한 생육 억제능을 비교, 검토하였으며, 그 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다.

*E. coli*와 *E. faecalis*를 1 : 10의 비율로 혼합배양 시 6시간 경과 후부터 급격한 *E. coli* 생육 억제가 이루어졌고, 24시간 경과시에는 *E. faecalis* 모균주, 내성균주 모두 *E. coli* 단독 배양시보다 약 6 배 정도 *E. coli* 수의 감소를 보였다(Fig. 1). *E. coli*와 *E. faecalis*를 1 : 100의

**Table III**—The amounts of lactic acid produced by *Enterococcus faecalis* strains

Strains	Concentration (mg/ml)
Parent	7.01(100%)
OFR16	6.96(99.2%)

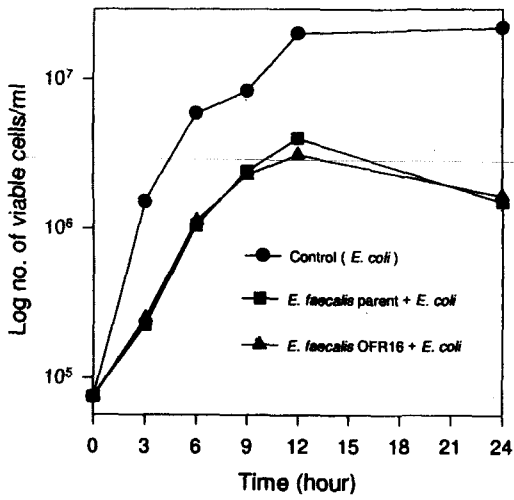


Fig. 1—Growth inhibition of *E. coli* MB4-5737 which was grown with *E. faecalis* strains. (*E. coli* : *E. faecalis* = 1 : 10)

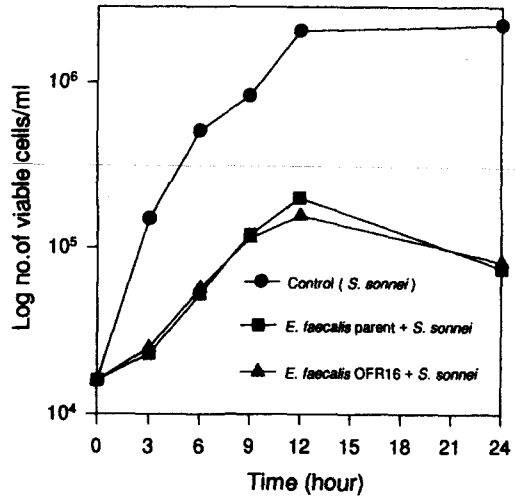


Fig. 3—Growth inhibition of *S. sonnei* MB4-10411 which was grown with *E. faecalis* strains. (*S. sonnei* : *E. faecalis* = 1 : 10)

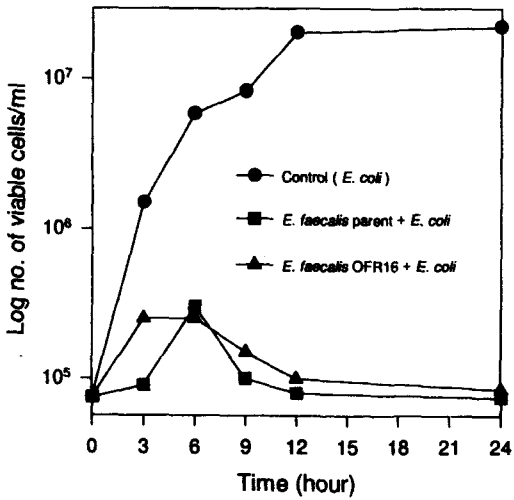


Fig. 2—Growth inhibition of *E. coli* MB4-5737 which was grown with *E. faecalis* strains. (*E. coli* : *E. faecalis* = 1 : 100)

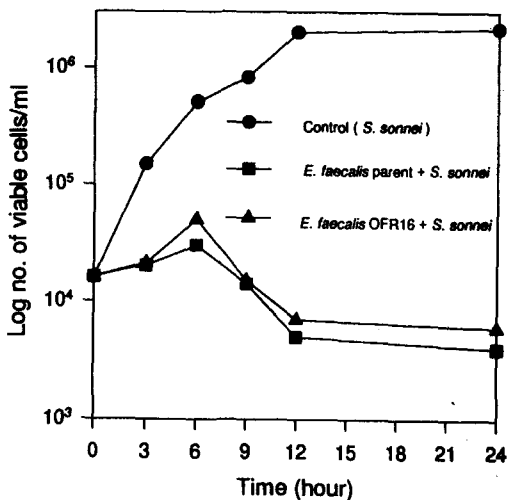


Fig. 4—Growth inhibition of *S. sonnei* MB4-10411 which was grown with *E. faecalis* strains. (*S. sonnei* : *E. faecalis* = 1 : 100)

비율로 혼합 배양시에는 3시간 경과 후부터 급격한 *E. coli* 생육 억제가 이루어졌고, 24시간 경과시에는 모균주의 경우 300배, 내성균주의 경우에는 260배 정도 *E. coli* 수의 감소를 보였다(Fig. 2).

**장내 세균 *Shigella sonnei* MB4-10411 생육 억제는** - *S. sonnei*와 *E. faecalis*를 1 : 10의 비율로 혼합 배양 시 6시간 경과 후부터 급격한 *S. sonnei*의 생육 억제가 이루어졌고, 24시간 경과시에는 *E. faecalis* 모균주, 내성균주

모두 *S. sonnei* 단독 배양시보다 약 30배 정도 *S. sonnei* 균수의 감소를 보였다(Fig. 3). *S. sonnei*와 *E. faecalis*를 1 : 100의 비율로 혼합 배양시에는 3시간 경과후부터 급격한 *S. sonnei*의 생육 억제가 이루어졌고, 24시간 경과 시에는 모균주의 경우 600배, 내성균주의 경우에는 400배 정도 *S. sonnei* 균수의 감소를 보였다(Fig. 4).

**내성균주에 의한 ofloxacin의 불활성화 가능성** - Rifampicin과 ofloxacin에 내성인 *E. faecalis* OFR

**Table IV**—Inactivation test of rifampicin and ofloxacin by *E. faecalis* mutants

Strain	Inhibition zone (mm) <sup>a</sup>		Inactivation	
	RFP	OFLX	RFP	OFLX
Standard	18 <sup>b</sup>	24.5 <sup>c</sup>	No	No
Control	16.5 <sup>d</sup>	23.5 <sup>c</sup>	No	No
OFR16	16.5	23.0	No	No

- a. the size of inhibition zone against *B. subtilis* ATCC 6633 by rifampicin and ofloxacin from the filtered culture of *Enterococcus faecalis* mutants  
 b. Inhibition zone by disc containing 10 µg/disc rifampicin  
 c. Inhibition zone by disc containing 5 µg/disc ofloxacin  
 d. Strain : *Serratia marcescens* ATCC 27117  
 e. Strain : *Escherichia coli* MB4-5376

16을 rifampicin 100 µg/ml, ofloxacin 25 µg/ml이 함유된 배지에서 각각 배양 후, 배양액 중에 남아 있는 ofloxacin의 활성을 측정하여 불활성화 여부를 검토한 결과, 내성균 배양액에서 얻은 rifampicin과 ofloxacin에 의해 생긴 각각의 저지원의 크기는 대조균의 배양액에서 생긴 저지원의 크기 및 표준 디스크의 저지원의 크기와 큰 차이가 없었다(Table IV). 따라서 내성균에 의해 ofloxacin이 불활성화 되지 않았다.

## 고 찰

*E. faecalis* 모균주에 대한 15종의 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도를 측정한 결과 rifampicin에 대해서는 MIC가 4 µg/ml로 비교적 높은 감수성을 나타내었고, 최근 임상에서 널리 사용되고 있는 fluoroquinolone계 항생제에 대해서도 0.5~16 µg/ml로 비교적 높은 감수성을 나타내었다. 따라서 결핵 및 나병 치료의 목적으로 위 항생제를 장기 경구 복용하는 환자에게 *E. faecalis* 모균주 제제를 병용 투여하면 본래의 정장 효과를 기대할 수 없으므로 본래의 정장 효과를 그대로 유지하면서 rifampicin과 fluoroquinolone계 항생제에 동시에 내성을 갖는 균주의 개발이 필요하다. 그 목적으로 본 실험실에서 보유하고 있는 rifampicin 내성균주 *E. faecalis* RFR1<sup>13)</sup>을 spontaneous multi-step mutation 방법으로 처리하여 ofloxacin에도 내성인 이중 내성균주 *E. faecalis* OFR16 균주를 선발하였다. *E. faecalis* OFR16에 대한 rifampicin의 MIC는 >800 µg/ml로 RFR11 균주와 마찬가지로 200배 이상 상승하였고, ofloxacin을 포함한 fluoroquinolone계 항생제의 MIC

는 16~256 µg/ml로 8~64배 상승하였다. Rifampicin은 이미 항결핵제와 항나병제로 널리 사용되고 있으며, fluoroquinolone계 항생제는 broad spectrum 항생제로 그 임상적 사용이 광범위하다. 특히 ofloxacin과 pefloxacin은 항나병제로도 임상적 연구가 집중되고 있다.<sup>8,9)</sup> MIC치로 볼 때 *E. faecalis* OFR16은 위 두가지 항생제를 포함한 대부분의 항결핵제 및 항나병제와 병용 투여 시에도 정장 효과를 기대할 수 있으리라 생각되어진다. *E. faecalis* OFR16에 대한 생화학적 특성은 유산 생성능, 장내 세균 생육 억제능을 측정하여 모균주와 비교, 검토하였다. 모균주는 유산을 7.01 mg/ml 생성하였고, 내성 돌연변이균주는 6.96 mg/ml로 유사한 양의 유산을 생성하였으므로 돌연변이로 인한 유산 생성의 변화는 관찰되지 않았다. 장내 세균이 생성하는 유기산은 장내의 pH를 저하시켜 각종 유해 세균의 성장을 억제하고, 장내 정상 세균총을 유지하는데 중요한 역할을 하고 있음이 입증되고 있다.<sup>7,14)</sup> 모균주 및 내성 돌연변이균주의 장내 세균 *E. coli*에 대한 *in vitro* 생육 억제 실험 결과, *E. coli*와 *E. faecalis*를 1 : 10의 비율로 혼합 배양했을 경우, *E. coli* 단독 배양시보다 모균주, 내성균주 모두 약 6배 정도 대장균 수의 감소를 보였으며, 1 : 100의 비율로 혼합 배양시에는 모균주의 경우 약 300배, 내성균주의 경우 260배 정도의 대장균 수의 감소를 보였다. 또한 모균주와 내성 돌연변이균주의 장내 세균 *Shigella sonnei*에 대한 *in vitro* 생육 억제 실험 결과도 같은 현상을 보였다. 이로써 모균주와 내성 돌연변이균주들은 유사한 장내 세균 억제능을 가지고 있었다. 유산균에 의한 세균의 생육 억제 효과는 유산균이 생성하는 유기산에 의한 pH 저하와 유기산 분자의 작용, 항생제 생성, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 및 polypeptide 구조로 된 항균성 물질 bacteriocin에 의해 나타난다고 보고된바 있다.<sup>1,7,13,14,16)</sup> 본 실험에서의 *E. coli*와 *S. sonnei*에 대한 생육 억제 효과도 pH 저하 때문만이 아닌 여러 복합적인 요소에 의한 것이라고 생각되어진다. Tramer<sup>17)</sup> 등은 *Lac. acidophilus*의 경우 pH 4.2 이상에서는 *E. coli* 억제능이 거의 없다고 보고한 바 있다. 따라서, 본 실험에서 혼합배양 초기에 나타난 억제 효과는 pH보다는 그 외 다른 요인에 의해 나타난 것으로 생각된다.

본 연구에서 선발한 이중 내성균주 *E. faecalis* OFR16의 rifampicin과 ofloxacin에 대한 내성 유지 실험에서 12개월이 경과한 후에도 MIC가 >800 µg/ml (rifampicin), 64 µg/ml (ofloxacin)로 유지되어 복귀

돌연변이로 인한 내성 소실의 가능성은 없었다. 내성균주가 rifampicin과 ofloxacin을 불활성화시킨다면 이 균주를 제제화하여 병용 투여시에 항생제 본래의 효과를 얻을 수 없으므로, *in vitro* 상에서 이중 내성균주에 의한 rifampicin과 ofloxacin의 불활성화 여부를 검토한 결과 rifampicin과 ofloxacin의 활성이 그대로 유지되어 불활성화 되지 않음을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과로써 *E. faecalis* OFR16은 rifampicin과 fluoroquinolone계 항생제에 동시에 내성이면서 모균주와 유사한 생화학적 특성들을 갖는 우수한 정장균주로 여겨진다.

### 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발 연구 센터와 서울대학교 약학대학 교육연구재단의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Anand, S. K., Srinivasna, R. A. and Rao, L. K. : Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-11. *Cultured Dairy Prod. J.* **20**, 21 (1985).
- 2) Chan, G. P., Garia-Ignacio, B. Y., Chavez, V. E., Jimenez, C. L., Parrilla, M. L. R. and Franzblau, S. G. : Clinical trial of sparfloxacin for lepromatous leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 61 (1994).
- 3) Choi, E. C., Kim, S. H., Kwan, A. R., Lee, M. J., Oh, J. J. and Kim, B. K. : Development of *Streptococcus faecalis* strains resistant to rifampicin. *Yakhak Hoeji* **37**, 350 (1993).
- 4) Choi, E. C., Ko, S. Y., Kim, H. S., Choi, S. S., Kim, S. K. and Kim, B. K. : Development of *Bifidobacterium bifidum* strains resistant to rifampicin. *Yakhak Hoeji* **37**, 483 (1993).
- 5) Choi, S. S. : Development of *Clostridium butyricum* resistant to rifampicin. M. Sc. Thesis, Seoul Natl. Univ. (1988).
- 6) Chung, Y. J., Jeon, M. I., Kang, C. Y., Kim, B. K. and Choi, E. C. : Development of *Bifidobacterium bifidum* strains resistant to rifampicin and ofloxacin. *Yakhak Hoeji* **38**, 763 (1994).
- 7) Deklerk, H. C. and Coetzee, J. N. : Antibiosis among lactobacilli. *Nature* **192**, 340 (1961).
- 8) Frantz, S. G. and White K. E. : Comparative *in vitro* activities of 20 fluoroquinolones against *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 229 (1990).
- 9) Gelber, R. H., Iranmanesh, A., Murry, L., Siu, D. and Tsang, M. : Activities of various quinolone antibiotics against *Mycobacterium leprae* in infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 2544 (1992).
- 10) Gordon, D., Macrae, J. and Wheeler, D. M. : Lactobacillus preparation for use with antibiotics I-II-III. *Lancet* **1**, 899 (1987).
- 11) James, H. T., Richard, W. M. and Gwynn, R. C. : Rapid selection of organisms with increasing resistance on subinhibitory concentration of norfloxacin in agar. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**, 188 (1983).
- 12) Kim, H. S., Choi, S. S., Choi, E. C., Kim, B. K., Lee, J. C. and Kim, T. H. : Development of *Lactobacillus sporogenes* resistant to rifampicin, an antituberculosis agent. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 155 (1989).
- 13) Metha, A. M., Patel, K. A. and Dave, P. J. : Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus*. *AC. Microbios.* **37**, 37 (1983).
- 14) Roth, L. A. and Keenan. : Acid injury of *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 1005 (1970).
- 15) Sneath, P. U. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1418 (1986).
- 16) Suaan, F. B. and Klaehammer, T. R. : Detection and activity of lactacin b, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808 (1983).
- 17) Tramer, J. : Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature* **211**, 204 (1966).
- 18) William, H. : Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Association of official analytical chemist. Benjamin Franklin Station. Washington D.C., 245