

리팜피신에 내성인 *Streptococcus faecalis* 균주의 개발

최웅칠¹⁾ · 김승호 · 권애란 · 이미정 · 오정자 · 김병각

서울대학교 약학대학

(Received May 19, 1993)

Development of *Streptococcus faecalis* Strains Resistant to Rifampicin

Eung-Chil Choi, Seung-Ho Kim, Ae-Ran Kwon, Mi-Jeong Lee,
Jeong-Ja Oh and Byong-Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The preparation of *Streptococcus faecalis* RSI is used as a medicinal preparation for human intestinal disorders. But the microbe in this preparation is very sensitive to rifampicin. If this preparation is taken with rifampicin, its therapeutic effect can not be expected. To develop rifampicin resistant mutants, the rifampicin sensitive strain *S. faecalis* RSI was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG). Twelve strains of the MNNG-induced mutants showed distinct resistance to rifampicin and five mutants were selected for further studies. They also exhibited identical characteristics with the parent *S. faecalis* RSI when they were tested for lactic acid formation and growth inhibition of *E. coli*. From *in vitro* test, it was identified that rifampicin is not inactivated by certain factors of the rifampicin resistant mutants. Conclusively, the rifampicin resistant mutants are efficient strains that have insensitivity against rifampicin and original biochemical characteristics of the parent strain.

Keywords □ *Streptococcus faecalis* RSI, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), rifampicin resistant mutant

유산을 생성하는 *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus bifidus*, *Lac. acidophilus*, *Lac. sporogenes*¹⁾, 낙산을 생성하는 *Clostridium butyricum*²⁾, 그리고 *Bacillus mesentericus*등은 소장이나 대장에서 유해균의 증식을 억제할 뿐만 아니라 유해균이 생성하는 유해물질(부패산물, 독소등)을 감소시켜 정장효과를 나타냄으로서 장내 건강을 유지시켜 준다.

특히 *S. 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. bifidus*, *Lac. acidophilus*, *cl. butyricum* 등과 같이 사용되고 있다.

결핵 환자가 항결핵제를 장기 복용하는 경우에는 장내 정상균층이 파괴되어 흡수부전, 소화불량 등 장질환을 일으킬 수 있으므로 항결핵제와 정장제제를 병용하는 것이 바람직하다는 것을 Shapiro³⁾, Nechete⁴⁾ 등이 보고한 바 있다. 그런데 이때 사용되는 항결핵제가 정장균주를 사멸시키거나 정장균주가 항결핵제를 불활성화시키게 되면 본래 두 제제의 병용의미가 없게 된다.

따라서 본 실험에서는 정장균주인 *S. faecalis*를 항결핵제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 결핵환자의 장내질환을 치료 또는 개선시킬 수 있는 정장균주를 개발하고자 하였다.

본 실험에 앞서 정장제제에 사용되고 있는 *S. faecalis*에 대한 7종의 항결핵제의 최소저지농도(MIC)를

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

측정하여 감수성 여부를 검토한 결과 리팜피신에 대해서만 특이적으로 감수성을 나타냄이 밝혀졌다.

그래서 본 연구에서는 *S. faecalis* 모균주에 대해 돌연변이를 유발시켜 리팜피신에 내성을 갖는 균주를 개발하고자 하였다. 돌연변이 균주 개발에는 자외선, x선, γ선 등의 조사방법과 여러가지 변이 유도제로 처리하는 방법이 있으나, John⁵⁾ 등은 이러한 돌연변이 균주개발방법 중에서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)로 처리하는 것이 매우 높은 효율을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Adelberg⁶⁾ 등은 MNNG로 *E. coli*를 처리하여 돌연변이시킬 때의 최적 조건에 대해 보고하였고 Schwartz⁷⁾, Viadimir⁸⁾ 등도 이 방법을 이용하여 실험한 것을 보고한 바 있다.

따라서 MNNG처리에 의한 돌연변이 방법에 의해 리팜피신내성 돌연변이 균주를 분리하고 이들에 대해 정장균 제제로서 개발 가능성성을 검토해 보기 위하여 산생성능⁹⁾, 대장균 생육억제능 등의 생화학적 특성을 *S. faecalis* 모균주와 비교 검토하였다. 또한 리팜피신 내성균주에 의해 리팜피신이 불활성화된다면 항결핵제의 치료 목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험을 통해 그 가능성을 알아보았다.

실험방법

실험균주—본 실험에서는 제일제당 중앙연구소에서 분리된 원료정장제에서 분리된 *Streptococcus faecalis* 균주를 사용하였다. 그 외의 균주로 본 연구실에서 보관하고 있는 *E. coli* ATCC 10536과 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하였다.

배지—*S. faecalis*의 생육 배지로는 GPY 액체 배지를 사용하였으며, *B. subtilis*, *E. coli* 생육 배지로는 nutrient broth(NB, Difco, Co.) medium을 사용하였다. *E. coli* 생육 억제능 실험시 사용한 *E. coli* 선택 배지로는 EMB agar (Difco, Co.)를 사용하였다.

최소 저지농도의 측정—보관된 균을 배양 배지에 접종 후 37°C에서 하룻밤 배양하고, 배양액을 배양 배지로 200배 희석하여 MIC측정용 균액으로 하였다. MIC측정은 액체 2배 희석법을 사용하였으며, 먼저 8개의 시험판에 항생물질 용액을 계열 희석하여, 첫 번째 시험판에 800 µg/ml의 농도가 되게하고 그 이하의 2배씩 희석하였다. 마지막 시험판은 대조로 하

였다.

각 시험판에 균액을 첨가하여 37°C, 24시간 배양한 후, 균 성장이 없는 마지막 시험판의 항생물질 농도를 MIC로 하였다.

MNNG처리와 내성 균주 선별—*S. faecalis* 모균주를 37°C에서 하룻밤 배양한 후 새로운 배지에 접종하여 37°C에서 2시간 배양하였다. 대수기 초기 배양액을 3000 g에서 10분간 원심분리한 다음, 상동액을 버리고 균체를 50 mM 인산칼륨 완충액으로 세척하였다. MNNG용액 최종농도 50 µg/ml을 가한 후 혼탁시키고, 37°C에서 30분간 정치 배양하였다. 원심분리하여 MNNG용액을 제거하여 돌연변이 유발을 종말시키고 50 mM 인산칼륨 완충액으로 세척하였다. 배양 배지에 균체를 혼탁시킨 후 혼탁액을 10 µg/ml의 리팜피신을 함유한 배지에 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 접락중 12개를 취해 순수 분리하였다.

돌연변이 균주에 대한 최소 저지농도의 측정—고체배지 희석법을 적용하였다. 리팜피신을 각 농도별로 (8, 4, 2, 1 mg/ml) 조제한 후 각 4 ml씩 취하여 용해한 한천배지 36 ml과 혼합하고 petri dish에 부어 희석계 평판(800, 400, 200, 100 µg/ml)을 만들었다. 평판을 13등분하여 각 돌연변이 균주와 모균주의 전배양액을 접종하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 성장 여부를 관찰하여 균의 성장이 억제된 최소 항생물질 농도를 MIC로 정하였다.

이들 돌연변이 균주 중 MIC에 따라 5종의 균주를 선별하여 그 생화학적 특성(유산 생성능, *E. coli* 생육 억제능)을 모균주와 비교 검토하였다.

돌연변이 균주의 내성 유지 시험—10 µg/ml rifampicin을 함유한 배지에서 5주동안 5회에 걸쳐 계대 하였을 때, 복귀돌연변이가 일어나는지의 여부와 분리 초기의 MIC를 그대로 유지했는지를 확인하였다.

산도정량—37°C에서 *S. faecalis* 모균주 및 돌연변이 균주를 전배양한 후 새로운 배지에 접종하고 (2.5%) 12시간 37°C에서 정치 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻어진 상동액을 동량의 중류수로 희석한 다음, 1% phenolphthalein 용액을 지시약으로 0.1N NaOH용액으로 중화 적정하였다. 소비된 NaOH양을 유산의 양으로 환산하였다.

대장균 생육 억제 시험—*S. faecalis* 모균주와 돌연변이 균주 및 대장균을 전배양한 후 모균주 또는 돌

연변이 균주와 대장균을 10:1과 100:1의 비율로 37°C에서 혼합 배양하고 대조로는 대장균만을 접종하였다. 접종 후 3시간, 7시간, 11시간, 15시간, 19시간마다 균액을 취하여 일정단계로 흐석한 다음 대장균 선택배지인 EMB agar배지에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 성장한 대장균 접락을 세어 대장균에 대한 생육 억제능을 측정하였다.

내성 균주에 의한 리팜피신의 불활성화 가능성 시험—전배양한 균액을 50 µg/ml 농도의 리팜피신을 함유한 배지에서 하룻밤 동안 배양한 후 원심분리하였다. 상동액을 취하여 그 중의 리팜피신으로 추출하였다. 추출액으로 10 µg/disc 농도의 리팜피신 디스크를 만들어 리팜피신 역가 검정에 쓰이는 *B. subtilis* ATCC 6633 평판 디스크를 고정시키고 배양하였다. 이때 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 리팜피신 10 µg/디스크의 저지원의 크기와 비교하여 불활성 여부를 확인하였다.

실험결과

최소 저지 농도(MIC)의 측정—*S. faecalis* 모균주에 대한 7종의 항결핵제들의 최소 저지 농도 측정 결과를 Table I에 나타내었다. *S. faecalis* 모균주는 리팜피신에 대해서만 감수성을 보였고, 그 이외의 항결핵제에 대해서는 모두 내성을 나타내었다.

따라서 *S. faecalis* 모균주는 리팜피신과 병용 투여시 *S. faecalis*가 갖는 효과를 기대할 수 없다.

내성 균주 분리 및 최소 저지 농도의 측정—*S. faecalis* 모균주를 MNNG로 처리한 후 10 µg/ml 농도의 리팜피신을 함유한 고체 배지에서 배양하여 생성된 접락들 중 12개를 취하였다. 분리한 12종의 돌연변이 균주를 RfR1, RfR2, RfR3, RfR4, RfR5, RfR6, RfR7, RfR8, RfR9, RfR10, RfR11, RfR12로 명명하였다(Table II). 돌연변이 균주 중 MIC가 200 µg/ml이 3종(400 µg/ml이 1종, 800 µg/ml이 2종, 800 µg/ml 이상인 것이 6종이었으며, 이들 중 MIC에 따라 5종을 선발하여 정장균 제제의 생산용 균주들로서의 개발 가능성을 검토해 보기 위하여 모균주와 생화학적 특성을 비교 검토하였다.

내성 균주의 내성 유지 시험—MNNG 처리에 의해 얻어진 리팜피신 내성 돌연변이 균주가 리팜피신에

Table I—MIC of antituberculosis agents against *Streptococcus faecalis* RS1

Antituberculosis agent	MIC(µg/ml)
Cycloserine	25
Ethambutol	400<
INAH	400<
Kanamycin	100
Pyrazinamide	400<
Rifampicin	3.13
Streptomycin	50

Table II—MIC of rifampicin against MNNG induced mutants of *Streptococcus faecalis* RS1

MIC(µg/ml)	Mutant Strains
200	RfR1*, RfR2, RfR3
400	RfR4*
800	RfR5*, RfR6
>800	RfR7*, RfR8, RfR9, RfR10
	RfR11*, RfR12

* Selected mutant numbers for the future studies

대해 지속적으로 내성을 유지하는 지의 여부를 알아보기 위하여 5주동안 5회에 걸쳐 계대한 결과 모두 내성이 유지되었고, 6개월 후에도 처음의 MIC를 그대로 유지하였다(Table III).

산도 정량—모균주 및 5종의 돌연변이 균주에 의하여 생성되는 유산농도를 비교해 본 결과를 Table IV에 나타내었다. 모든 돌연변이 균주가 모균주와 비슷한(6.0 mg/ml) 유산 생성을 보았다.

대장균 생육 억제 시험—*S. faecalis* 균주들이 장내 유해균의 성장을 어느 정도 억제하는지를 알아보기 위하여 대장균을 대상균으로 하여 *S. faecalis* 모균주 및 돌연변이 균주에 의한 생육 억제능을 비교 검토하였으며 그 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다.

*E. coli*와 *S. faecalis*를 1:10의 비율로 혼합 배양시 7시간 동안 경과 후 부터 급격한 대장균 생육 억제가 이루어졌고, 15시간 경과시에는 *S. faecalis* 모균주, 내성균주 모두 *E. coli* 단독 배양시 보다 약 50배 정도 대장균수의 감소를 보였다.(Fig. 1) *E. coli*와 *S. faecalis*를 1:100의 비율로 혼합배양시에는 3시간 경과한 후 부터 급격한 대장균 생육 억제가 이루어졌고, 15시간 경과시에는 모균주의 경우 1900배, 내성균주의 경우는 800배 정도 대장균수의 감소를 보였다(Fig. 2).

Table III—Maintenance test for rifampicin resistance of *Streptococcus faecalis* RS1

Strains	Subculture*	0	1st	2nd	3rd	4th	5th	after	6 moths	(MIC : µg/ml)
Parent		3.13	—	--	--	—	—	—	—	3.13
RfR7		>800	+	+	+	+	+	+	+	>800
RfR1		200	+	+	+	+	+	+	+	200
RfR5		800	+	+	+	+	+	+	+	800
RfR4		400	+	+	+	+	+	+	+	400
RfR11		>800	+	+	+	+	+	+	+	>800

* Maintenance test was performed on plates containing 10 µg/ml rifampicin

+ : resistance, - : no resistance

Table IV—Lactic acid concentration in culture of *Streptococcus faecalis* RS1 and its mutants

Strains	Lactic acid concentration(mg/ml)
Parent	6.0(100%)
RfR7	5.7(95%)
RfR1	5.8(97%)
RfR5	6.0(100%)
RfR4	6.1(102%)
RfR11	6.0(100%)

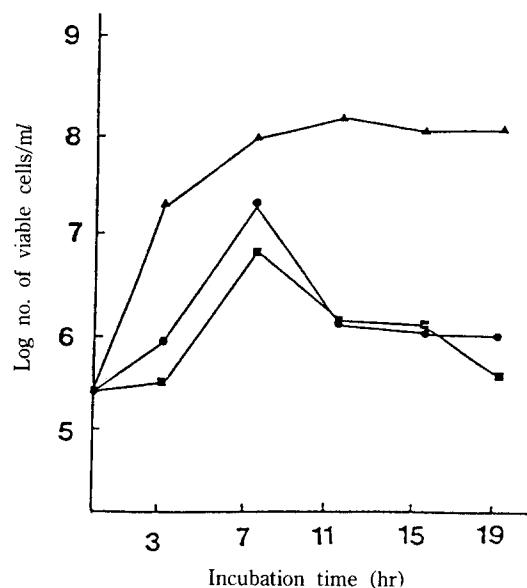
Table V—The possibility of in vitro inactivation of rifampicin by culture of the rifampicin resistant mutants of *Streptococcus faecalis* RS1

Strains	Inhibition zone(nm)*	Inactivation
Standard**	15.0	No
RfR7	14.8	No
RfR1	14.0	No
RfR5	13.8	No
RfR4	14.5	No
RfR11	14.0	No

* The size of the inhibition zone against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 by rifampicin extracted from the filtrated culture of rifampicin resistant mutants of *Streptococcus faecalis* RS1

** Standard inhibition zone by disc containing 10 µg rifampicin

내성 균주에 의한 리팜피신 불활성화 시험—내성균 주를 리팜피신을 50 µg/ml 농도로 함유한 배지에서 배양한 후 배양액중에 잔존하는 리팜피신의 활성을 시험균의 생육 저지원의 직경을 이용해 측정하고 표준 검량 곡선과 비교시 거의 차이가 없었다. 따라서, 리팜피신에 내성인 *S. faecalis* 돌연변이 균주의 배양액에 존재하는 리팜피신이 불활성화 되지 않는 것으로 사

**Fig. 1**—Changes in the numbers of *E. coli* which was grown with *Streptococcus faecalis* RS1 and its mutant.

(*E. coli* : *Streptococcus faecalis* = 1 : 10)

■ : Parent + *E. coli*

● : *S. faecalis* RfR11 + *E. coli*

▲ : Control(*E. coli*)

료된다.

고 찰

경구로 장기 복용하는 항결핵제 리팜피신에 감수성을 나타내는 *Streptococcus faecalis* RS1에 내성을 부여하기 위해 MNNG 50 µg/ml로 30분간 처리하여 리팜피신 내성균주 12종을 선별하였다. 그리고, 이들

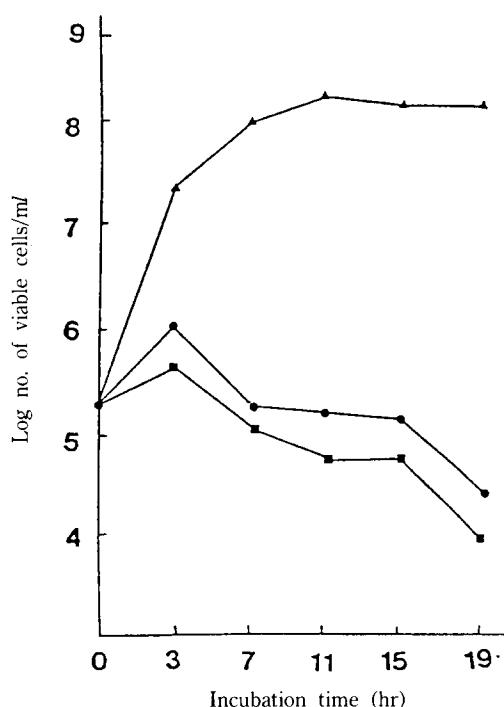


Fig. 2 - Changes in the numbers of *E. coli* which was grown with *Streptococcus faecalis* RS1 and its mutant.

(*E. coli* : *Streptococcus faecalis* = 1 : 100)

- : Parent + *E. coli*
- : *S. faecalis* RfR11 + *E. coli*
- ▲ : Control(*E. coli*)

의 리팜피신에 대한 MIC를 측정한 결과 모균주와 비교시 30~250배 이상 MIC가 상승되었음을 확인하였다. 또한, 내성균주에 대해 내성 유지시험을 실시한 결과, 초기의 MIC를 그대로 유지했음을 알 수 있었다. 따라서 복귀돌연변이에 의한 내성 소실은 없을 것으로 사료된다.

생화학적 특성인 유산 생성능, 대장균 생육 억제 능을 측정하여 내성균주와 모균주를 비교, 검토하여 보았다. 유산 생성능을 측정한 결과, 모균주에 의해 생성되는 유산 농도는 6.0 mg/ml이었고, 내성균주도 거의 비슷한 결과를 나타냈다. 본 실험실의 연구 결과에 의하면 *Lactobacillus sporogenes*의 경우¹⁾, 7.4 mg/ml로 본 실험에서의 *S. faecalis*의 모균주와 내성균주가 *Lac. sporogense*보다 더 적게 유산생성을 하는 것으로 나타났다. 유산은 장내의 pH를 저하시켜 장

내에 유해한 세균들의 성장을 억제하여 장내 세균총의 균형 개선에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 유산 생산력 향상을 목적으로 균주를 개발하기 위해 균주를 돌연변이 시킨 후, β -galactosidase의 생성 증가로 말미암아 유산 생성이 우수해진 균주를 선별하는 연구도 많이 진행되고 있다.¹⁰⁾ 모균주 및 내성균주의 대장균 생육 억제에 관한 실험결과 *E. coli*와 *S. faecalis*를 1 : 10의 비율로 혼합 배양했을 경우, 대장균 단독 배양보다 모균주, 내성균주 모두 약 50배 정도 대장균 수의 감소효과를 보였으며, 1 : 100의 비율에서는 모균주의 경우 1900배, 내성균주의 경우 800배 정도 대장균 수의 감소를 보였다. 유산 생성균에 의한 대장균 생육 억제 효과는 수소 이온 농도, 유기산의 작용, 항생제 생성, H_2O_2 생성 및 펩타이드 구조로 된 bacteriocin에 의해 나타난다고 보고된 바 있는데,^{11~13)} 본 실험에서는 대장균에 대한 억제효과가 유기산, pH등이 복합적으로 작용함으로써 나타나는 것으로 사료된다.

Tramer¹⁴⁾등은 *Lac. acidophilus*의 경우 pH 4.2 이상에서는 *E. coli* 억제능이 거의 없다고 보고한 바 있다. 따라서, 본 실험에서 혼합 배양 초기에 나타난 억제 효과는 pH보다는 그 외 다른 요인에 의해 나타난 것으로 생각된다.

리팜피신 내성균주가 리팜피신을 불활성화 시킨다면 이 균을 재제화하여 리팜피신과 병용 투여시에 리팜피신 본래의 치료 목적을 달성할 수 없으므로, *in vitro* 실험으로 불활성화 가능성 여부를 시험해 보았다. 실험결과 리팜피신을 함유한 배지에 내성균을 배양한 후에도 리팜피신의 활성이 유지되었다. 따라서, 내성균주에 의해 리팜피신이 불활성화 될 가능성은 없는 것으로 사료된다.

리팜피신에 대한 내성 기전은 본 항생제의 작용부위인 DNA-dependent RNA polymerase¹⁵⁾의 β -subunit의 변화,^{16~17)} 세포막 투과성의 변화^{18~19)}에 의한 것이다.

본 실험을 통해 얻은 내성균주들의 리팜피신에 대한 내성 기전을 알아보는 것도 바람직한 연구과제라고 사료된다.

결 론

리팜피신에 감수성을 나타내는 *Streptococcus faeca-*

lis RS1을 MNNG처리하여 리팜피신에 내성인 돌연변이균주 12종을 선별하고 각각의 리팜피신의 MIC를 측정해 본 결과 MIC가 현저히 상승했음을 확인하였다. 이를 내성균주들 중 MIC농도에 따라 5종의 균주를 선별하여 모균주와 그 생화학적 특성인 유산생성능, *E. coli* 생육억제능을 비교해 본 결과 유산생성능은 비슷하게 나타났으며, *E. coli* 생육억제능은 약간 감소하거나 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 리팜피신내성균주에 대해 내성 유지 시험을 실시한 결과 복귀돌연변이에 의한 리팜피신의 불활성화 여부를 실험한 결과 불활성화되지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 본 실험을 통해 개발한 내성균주는 리팜피신에 내성이면서도 *S. faecalis* 모균주 고유의 기능과 특성을 갖는 우수한 정장균주로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발 연구 센터의 지원, 보건사회부의 신약개발연구비에 의해 수행된 것으로, 지원에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- 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. *K. J. Microbiol.* **27**, 155 (1989).
- Choi, S.S. : Development of *Clostridium butyricum* resistant of rifampicin. M. Sc. Thesis, Seoul Natl. Univ. (1988).
- Shapiro, S. : *Clinical medicine* 7, 295 (1960).
- Necheles, H. and Beok, C. : *Applied Therapeutics* 1965, 465 (1965).
- John, B.J. : *Genetics* Houghton Mifflin Co. 352 (1975).
- Adelberg, E.A., Mandell, M. and Chen, G.C.C. : Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 788 (1965).
- Schwartz, A.C. and Stadtman, T.C. : Small colonies of *Clostridium stricklandii* resulting from nitroso-guanidine treatment and exhibiting defects in catabolic enzymes. *J. Bacteriol.* **104**, 1241 (1970).
- Vladimir, D., David, A., Hopwood and Eric J. : Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Res.* **9**, 167 (1970).
- 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.
- Kim, Y.M., Lee, J.C., Choi, Y.J. and Yang, H.C. : Studies on production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 185 (1985).
- 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).
- Susan, F.B. and klaehammer T.R. : Detection and activity of lactacin b, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808 (1983).
- Roth, L.A. and Keenan : Acid injury of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 1005 (1971).
- Tramer, J. : Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature* **211**, 204 (1966).
- Burgess, R.R. : RNA Polymerase. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 716 (1971).
- Rabussay, D. and Zilling, W. : A rifampicin resistant RNA Polymerase from *E. coli* altered in the β -subunit. *FEBS Lett.* **5**, 104 (1969).
- Linn, T., Losick, R. and Sonenshein, A.L. : Rifampicin resistance mutation of *Bacillus subtilis* altering the electrophoretic mobility of the beta subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **122**, 1387 (1975).
- Hui, J., Gordin, N. and Kajioka, R. : Permeability barrier to rifampicin in *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother* **11**, 773 (1977).
- Kohno, K., Oizumi, K. and Oka, S. : Mode of action of rifampicin on *Mycobacteria*. *Ann. Rev. Resp. Dis.* **107**, 1006 (1973).
- Riva, S. and Silvestri, L.G. : Rifamycins : a general view. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**, 199 (1972).