

## 갯방풍 지상부 정유 및 그 주성분의 항생제 감수성 및 내성 *Streptococcus pneumoniae* 균주에 대한 억제효과

신 승 원<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학

(Received June 16, 2005; Revised July 13, 2005)

### *In Vitro* Inhibitory Activities of Essential Oils from the Aerial Parts of *Glehnia littoralis* and its Main Components Against Antibiotic-Susceptible and -Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae*

Seungwon Shin<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Ssangmoondong 419, Dobongku, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — To develop a new natural antibiotics from Koran plant resources for dealing with the current situation regarding the rapid increase in antibiotic-resistant pathogen, the *in vitro* inhibitory activities of essential oils from the young leaves of *Glehnia littoralis* (Umbelliferae) as well as its main constituents were evaluated against susceptible and resistant species of *Streptococcus pneumoniae*. The essential oil fraction of *G. littoralis* and its main components,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, exhibited significant inhibitory activities against the antibiotic-susceptible and resistant strains of *S. pneumoniae*, with MICs (minimum inhibiting concentrations) ranging from 4.0 mg/ml to 16 mg/ml. No remarkable differences were shown between the susceptible and resistant strains. Moreover, the disk diffusion test disclosed that these inhibitory activities were dose-dependent. Furthermore, data from the checkerboard titer test with FICs (fractional inhibiting concentration indices) from 0.15 to 0.28 indicated synergisms between norfloxacin and  $\alpha$ - or  $\beta$ -pinene in activity against *S. pneumoniae* KCCM49629 and *S. pneumoniae* CCARM4059.

**Keywords** □ essential oil, *Glehnia littoralis*, *Streptococcus pneumoniae*, antibiotic-resistance, norfloxacin, combination,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene

전 세계적으로 급속히 증가하는 내성균의 출현은 인류의 미래를 위협하고 있으며, 과도한 항생제 사용에 따라 시간이 갈수록 가속화 되고 있다.<sup>1-3)</sup> 특히 다제내성(multi-drug resistance)을 나타내는 균주의 출현에 의해 이에 대응하는 새로운 전략이 더욱 절실히 요구되고, 새로운 치료제의 개발의 필요성을 가증시켰다.<sup>4,5)</sup>

식물에는 여러 계열의 향균성분이 존재하지만, 특히 정유에는 강력한 항균작용이 있는 성분들이 다수 함유 되어 있어서, 새로운 천연항균제 개발의 중요자원으로 여겨지고 있다.<sup>6-10)</sup>

갯방풍(*Glehnia littoralis* Bentham et Hook f.)은 한국 등 아시아 각국, 북미 등의 갯가 모래밭에 자생하는 미나리과

(Umbelliferae)의 다년생 초본으로, 한방에서는 이 식물 뿌리의 풍습을 제거하는 작용과 관련하여 두통, 해수, 신경통 등의 치료에 사용된다.<sup>11)</sup> 특히 근래에는 독특한 향미가 있는 지상부 어린 잎 부분의 생 약재로의 이용이 늘어서 제주도 등에서 다량 재배 되고 있다. 갯방풍의 뿌리의 성분으로는 bergapten의 수종의 furanocoumarin과 polyacetylene 등<sup>12)</sup>이 알려져 있으며, 정유성분의 경우, 함량 및 조성이 자생, 또는 재배지역에 따라 차이가 크지만 대체로 0.09~0.20% 정도가 함유되어 있는 것으로 보고 되어 있다.<sup>13,14)</sup> 저자가 이미 보고한 바와 같이 갯방풍 잎 정유는 정유의 80%가 주성분인  $\beta$ -pinene(57.83%)과  $\alpha$ -pinene (22.17%)으로 구성되어 있어서, 이들 주성분의 활성이 갯방풍 총 정유분획의 활성의 대부분을 차지할 것으로 예측된다.<sup>15)</sup>

본 논문에서는 여러 호흡기 질환의 주요 원인 균 중의 하나이며, 또한 균의 전파경로의 특성상 공기를 통한 내성균의 빠른 확

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8384 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) swshin@duksung.ac.kr

산이 우려되는 *Streptococcus pneumoniae*<sup>16-20)</sup> 내성균에 대한 억제제를 개발하기 위한 목적으로 갯방풍의 어린 잎에서 추출한 정유의 *S. pneumoniae*의 항생제 감수성 균주 및 내성균주에 대한 억제효과를 실험하고, 또한 checkerboard titer test로 실험한 결과, 잎 정유의 주성분인  $\beta$ - 및  $\alpha$ -pinene이 quinolone계 항생제인 norfloxacin과의 병용에 의해 현저한 synergism을 나타냄을 확인하였기에 그 결과를 보고한다.

## 실험재료 및 방법

### 정유추출

전보<sup>21)</sup>에서와 같이 제주도에서 재배하여 농협 하나로마트에서 유통되고 있는 갯방풍의 어린 잎 10 kg을 4~5월 중 구입하여 건조하지 않은 상태로 추출 flask당 500씩 나누어 넣고 simultaneous steam distillation-extraction apparatus(SDE) 장치에서 5시간 수증기 증류하여, 수집된 ether층과 수층을 ether로 추출한 것을 향하여, 감압농축하여 정유를 채취하였고, 수득율은 평균 0.09% (w/w)였다.

### 사용균주 및 배양

*S. pneumoniae* ATCC49619, *S. pneumoniae* CCARM 4009, *S. pneumoniae* CCARM 4010, *S. pneumoniae* CCARM 4059를 항생제내성 균주는행에서 분양 받아서 본 실험실에서 제조한 5% sheep blood agar plate 위에 접종하여 36°C에서 계대 배양하고, 이것을 5% sheep blood를 포함한 Müller-Hinton II(BD, USA) 액체배지에 현탁하여, McFarland 0.5 Standard와 같은 탁도로 조정된 균액을 제조하여 균의 농도가 약  $1 \times 10^4 \sim 10^5$  CFU/ml가 되게 만들어서 액체배지 희석법과 디스크법에 의한 항균력 실험에 사용하였다.

### 정유 표준품 및 항생제

$\alpha$ -pinene(98%),  $\beta$ -pinene(99%), oxacillin(O1002; oxacillin sodium salt monohydrate) 및 norfloxacin(N9890)은 Sigma-Korea Chemical Co.에서 구입하였고, Erythromycin은 한국애보트주식회사의 에리스로신 주사(500 mg/vial)를 사용하였다.

### 액체배지 희석법에 의한 MIC 및 MBC 측정

수증기 증류에서 얻은 갯방풍 정유와 주성분인  $\beta$ - 및  $\alpha$ -pinene을 에탄올과 소량의 Tween 80을 가하여 현탁시킨 후 syringe filter로 무균 여과하여, 최고농도 50 mg/ml에서 최저농도가 0.78 mg/ml에 이르도록 단계적으로 희석하여 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ 씩 주입한 후 균액을 100  $\mu$ 씩 첨가하였다. 이것을 shaking incubator(100 rpm)에 넣고 37°C에서 24시간 배양한 후, 육안으로 관찰하여 균의 생장이 억제된 최저농도(MIC)를 판별

하였다. Norfloxacin(Sigma)은 dimethylsulfoxide(DMSO)를 용매로 하여 2 mg/ml부터 8단계까지의 배수 희석액을 제조하여, 각각 한 농도의 sample을 각 well마다 5  $\mu$ 씩을 주입하고, 균액 100  $\mu$ , 배지 95  $\mu$ 를 첨가하고, 정유와 같은 조건에서 배양하였다. 사용한 용매와 Tween 80이 시료의 항균력에 영향을 미치지 않았음을 대조실험을 통해 확인하였다. 대조실험에서는 시료를 제외하고 균과 용매, Tween 80를 본 실험과 같은 조건에서 배양하여, 균만을 배양했을 때와 비교했을 때 균 생장에 차이가 관찰되지 않았다. 이어서 균의 생장이 저지된 각각의 well로부터 50  $\mu$ 를 취하고 액체배지 150  $\mu$ 를 가한 후 다시 24시간 배양하여 균의 생장이 관찰되지 않은 최소 농도를 minimal bactericidal concentration(MBC)로 하였다.

### 디스크법에 의한 항진균력 측정

각 정유와 항생제를 위의 실험에서와 같은 방법으로 배지 또는 DMSO에 현탁시켜 50 mg/ml 용액으로 제조한 후, 무균여과하여 각 시료마다 50  $\mu$ 씩을 취하여 항생물질 측정용 paper disc(Advantec, Toyo Ryoshi Kaisha, 8 mm)에 흡수시켜서, 4 mm 두께로 petri dish에 부어 제조한 5% sheep blood agar plate 위에 붙이고, 36°C에서 24시간 배양한 후 균 저지대의 폭을 disk 가장자리로부터 측정하였다. Tween 및 DMSO 50  $\mu$ 를 disk에 흡수시켜, 균 접종 배지 위에 부착하여, 위와 같은 방법으로 배양하여 이들 물질이 실험결과에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다.

### Checkerboard microtiter test에 의한 병용효과 실험

96 well plate의 각 well의 가로 방향으로 최고농도 50 mg/ml에서 최저농도가 0.78 mg/ml에 이르도록 2% Tween 80을 포함한 배지로 단계적으로 희석한  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -pinene 50  $\mu$ 를 넣고 세로방향으로는 이와 유사한 방법으로 norfloxacin을 DMSO(99%)에 녹인 배수 희석액을 제조하여, 각각 한 농도의 sample을 각 well마다 5  $\mu$ 씩 첨가하였다. 여기에 Mcfarland 0.5의 탁도로 조절된 *S. pneumoniae* 각 strain의 현탁액 145  $\mu$ 를 가하고, 위와 같은 조건으로 배양한 후 균이 억제된 최소농도의 배합비율을 관찰하였다. 가장 효율적으로 나타난 배합농도의 결과를 Table III의 각주에 기록된 공식에 대입하여 fractional inhibiting concentration(FIC)를 산출하여 FIC index가 0.5보다 작거나 같을 때 synergistic effect가 있는 것으로, 0.5와 4 사이면 indifferent 또는 additive로, 4보다 클 때 antagonistic effect로 판정하였다.<sup>22)</sup> 이어 실험한 96 well plate 상에서 균 생장을 억제 시킨 최소한의 배합농도 각각의 수치로 isobologram을 그려 곡선의 휘어진 상태로 병용효과를 판정하였다.

### 통계처리

Disk 확산법에서의 균 성장저지 폭(mm)은 3번 반복 실험결과

의 평균±표준편차로 표시하였고, 위 data의 유의성은 Student's t-test의 결과( $P < 0.05$ )로 판정하였다.

### 실험결과 및 고찰

현재 가장 문제되는 호흡기 감염 내성균 중 하나인 *S. pneumoniae* 내성균 억제 물질을 개발하기 위하여 norfloxacin, oxacillin 및 erythromycin에 대해 각기 다른 감수성을 지닌 *S. pneumoniae* ATCC49619, *S. pneumoniae* CCARM 4009, *S. pneumoniae* CCARM 4010, *S. pneumoniae* CCARM 4059에 대한 갯방풍의 어린 잎 정유 분획과 이의 80% 정도를 차지하고 있는 주성분  $\beta$ - 및  $\alpha$ -pinene의 항균 효과를 실험한 결과는 다음과 같다.

Micro broth dilution test로 *S. pneumoniae* 4종 strain에 대해 MIC와 MBC를 측정된 결과를 Table I에 정리하였다. 실험에 사

용된 균주의 각 항생제에 대한 감수성은 전보에 보고한 바와 같다.<sup>10)</sup>

실험한 균주는 각기 다른 양상의 항생제 내성을 갖고 있었고, norfloxacin에 대해서는 모두 감수성을 나타냈다. 이 실험에서 갯방풍의 어린 잎 정유분획과 그 주성분인  $\beta$ - 및  $\alpha$ -pinene은 4~16 mg/ml의 MIC, 16~32 mg/ml의 MBC를 나타냈고, 항생제에 대한 감수성 균주에 대해서 뿐만 아니라 내성 균주에 대해서도 뚜렷한 억제효과를 보였다. 실험한 정유 중에서는 예상대로  $\alpha$ -pinene의 MIC가 4~16 mg/ml로 가장 강력한 항균력을 나타냈으며,  $\beta$ -pinene과 갯방풍 정유 분획의 활성은 MIC가 8~32 mg/ml로 상대적으로 완만하였다. 실험한 sample의 MBC는 대부분의 경우 MIC의 2배 정도를 나타냈으나 oxacillin의 경우는 MIC, MBC가 같았다. 각 strain에 따른 MIC 및 MBC의 현저한 격차는 관찰되지 않았다.

갯방풍 정유의 5% sheep blood agar plate 상에서의 균 억제

**Table I** - MICs (minimum inhibitory concentrations) and MBCs (minimum bactericidal concentrations) of the *G. litralis* oil fraction against antibiotics susceptible and resistant strains of *S. pneumoniae*

Sample (mg/ml)		Strains of <i>S. pneumoniae</i>			
		ATCC 49619	CCARM 4009	CCARM 4010	CCARM 4059
<i>G. litralis</i> oil	MIC	8.00	16.00	16.00	16.00
	MBC	32.00	16.00	16.00	16.00
$\alpha$ -Pinene	MIC	4.00	4.00	16.00	8.00
	MBC	16.00	16.00	32.00	16.00
$\beta$ -Pinene	MIC	16.00	16.00	8.00	8.00
	MBC	32.00	32.00	16.00	16.00
Norfloxacin*	MIC	2.00	2.00	1.00	4.00
	MBC	4.00	4.00	2.00	8.00
Oxacillin*	MIC	4.00	>16.00	>16.00	4.00
	MBC	4.00	>16.00	>16.00	4.00
Erythromycin**	MIC	16.00	>1024	>1024.00	>1024.00
	MBC	32.00	>1024	>1024.00	>1024.00

The values are the means from the triplicate experiments. \* $\mu\text{g/ml}$ . \*\* $\text{ng/ml}$ .

**Table II** - Antibacterial activities of *G. litralis* oil against *S. pneumoniae* strains as estimated by the disk diffusion tests

Sample dose/disk		Strains of <i>S. pneumoniae</i>			
		ATCC 49619	CCARM 4009	CCARM 4010	CCARM 4059
<i>G. litralis</i> oil	50 mg	4.3±1.52	5.0±1.00	9.3±1.53	5.3±1.53
	25 mg	2.0±0.33	2.3±0.50	3.0±0.00	4.0±0.50
$\alpha$ -Pinene	50 mg	10.6±1.52	12.0±1.00	9.6±1.52	12.3±1.52
	25 mg	3.3±1.52	5.3±0.57	3.3±0.57	3.6±0.57
$\beta$ -Pinene	50 mg	3.6±0.57	5.0±1.00	8.3±1.15	5.3±0.57
	25 mg	2.0±0.00	2.3±0.5	3.3±1.52	4.0±0.00
Norfloxacin*	100 $\mu\text{g}$	9.7±1.15	11.0±1.00	15.0±1.73	10.0±3.46
	50 $\mu\text{g}$	8.3±1.53	9.0±0.00	11.7±0.58	9.0±3.46
Oxacillin*	100 $\mu\text{g}$	12.3±0.58	6.3±1.53	11.3±1.53	14.3±2.52
	50 $\mu\text{g}$	10.7±0.58	4.7±1.15	6.0±3.61	12.0±3.00
Erythromycin**	100 $\mu\text{g}$	16.0±0.00	0.0±0.00	2.5±0.71	7.0±0.00
	50 $\mu\text{g}$	15.0±0.00	0.0±0.00	1.5±0.71	4.7±0.58

The values are the means±SD of triplicate data. The width (mm) of growth inhibition of bacteria was measured from the outline of the disks wetted with samples.

반경을 비교한 결과(Table II)는 대부분 MIC 실험의 결과와 유사하게 나타나서 3종 정유 중 특히  $\alpha$ -pinene이 감수성 및 내성 균주 모두에 대해 현저히 큰 폭의 억제를 보였다.

부분적으로는 앞의 MIC, MBC 측정 결과와 일치하지 않는 결과가 있으나, 이런 현상은 이 두 실험 방법에서의 sample과 배지의 물리적 상태가 다르므로 흔히 나타나고 있다.<sup>23)</sup> 두 실험이 각기 장단 점이 있는데 특히 항생제 내성 균주에 있어서는 MIC가 비교될 수 없는 경우가 많아서 내성 정도의 차이를 알 수 없었으나, disk 법의 결과에서는 내성 정도에 따라 균 저지폭의 차이가 명확히 구분되었다. 또한 실험결과는 농도 의존적으로 나타났다(Table II).

일반적으로 정유는 합성항균제에 비하여 독성이 적고 안전한 항균제이고, 현재 임상에서 사용되는 항생제와는 전혀 다른 구조의 화합물이므로 내성균에 대한 새로운 항생제 개발의 대상으로 기대되나, 기존 항생제에 항균활성이 상대적으로 떨어지는 약점이 있어서, 정유분획이나 단일 정유 성분차원에서 실제 임상 사용 가능한 항생제로 개발된 것은 극소수에 불과하다. 이에 정유와 기존항생제의 병용에 의한 효과상승을 유도하여, 안전하고 강력한 항균제를 개발 하는 방법이 연구되고 있다. 본 연구에서 checkerboard microtiter test로 갯방풍 정유 주성분인  $\alpha$ - 및  $\beta$ -pinene과 3종 항생제와의 병용효과를 실험했을 때, 정유와 oxacillin 또는 erythromycin과의 병용에서는 별다른 상승효과가 관찰되지 않았으나, Table III에 정리된 바와 같이  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -pinene과 norfloxacin의 병용에서는 현저한 synergism이 확인되었다. 이것은 다수 정유가 균 세포막에 작용하여 항균작용을 나타내는데,<sup>24)</sup> norfloxacin등의 quinolone계 항생제의 주된 내성기전 또한 균 세포막의 약물 투과성 및 reflux에 관련되어 있는 사실<sup>25)</sup>과 연관될 것으로 추정되나, 확실한 결론을 위하여는 작용 및 내성기전에 관한 심층적인 연구가 필요하다. 또한  $\alpha$ -pinene보다 MIC는 2~4배 높으며 상대적으로 항균력이 약한  $\beta$ -pinene

**Table III** – Fractional Inhibiting Concentrations (FICs) and FIC Indices (FICI) against norfloxacin-susceptible and -resistant strains of *S. pneumoniae*

Combinations	KCCM49619		CCARM4059	
	FIC	FICI	FIC	FICI
1. $\alpha$ -pinene-norfloxacin	0.03	0.28	0.03	0.28
2. $\beta$ -pinene-norfloxacin	0.03	0.15	0.03	0.15
	0.12		0.12	

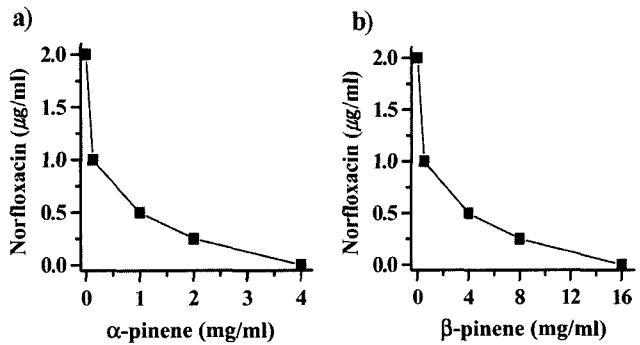
FIC of oil ( $\alpha$ - or  $\beta$ -pinene)

$$= \frac{\text{MIC of oil in combination with norfloxacin}}{\text{MIC of oil alone}}$$

FIC of norfloxacin

$$= \frac{\text{MIC of norfloxacin in combination with oil}}{\text{MIC of norfloxacin alone}}$$

FICI = FIC of oil + FIC of antibiotics.



**Fig. 1** – Isobolograms plotted with the MICs of norfloxacin and  $\alpha$ -pinene (a) or  $\beta$ -pinene (b) at concentration of most effective combinations against *S. pneumoniae* ATCC 49619 in checkerboard titer tests.

의 FICI가 0.15로  $\alpha$ -pinene의 FICI 0.28보다 낮아 병용에 의한 더욱 강한 synergism을 보여주었고, *S. pneumoniae* ATCC 49619의 checkerboard microtiter test 결과를 이용하여 그려진 isobologram(Fig. 1)에서도 norfloxacin과  $\beta$ -pinene 병용실험 결과의 곡선이 같은 조건에서 실험한 norfloxacin,  $\alpha$ -pinene 병용의 결과보다 더욱 뚜렷하게 graph의 x-축을 향해 휘어서 이들의 병용에 의한 강한 synergism<sup>22)</sup>이 확인되었다. *S. pneumoniae* CCARM4059의 isobologram도 같은 pattern의 곡선을 나타내었다.

결론적으로 주로 식용되는 갯방풍 어린 잎 정유와 그 주성분인  $\alpha$ - 및  $\beta$ -pinene은 본 실험에 사용한 *S. pneumoniae* 항생제 감수성 및 내성 균주 모두에 항균작용을 나타냄을 확인하여, 이 정유의 *S. pneumoniae* 항생제 내성 균주 억제 및 균확산 방지에의 이용 가능성을 제시하였다. 또 한편 norfloxacin 감수성 *S. pneumoniae* 균주에서 갯방풍 잎의 정유에 다량 함유된  $\beta$ -pinene과 quinolone계 항생제인 norfloxacin의 병용은 강한 synergism을 나타내서, 이들의 병용에 의해 정유의 비교적 완만한 항균작용을 상승시킬 수 있음을 확인하였다. 그러나 이 방법이 실용화되기까지는 내성 및 작용기전 등에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2004-041-E00386)에 의하여 연구되었음.

### 문헌

- 1) Karlowsky, J. A. and Sahm, D. F. : Antibiotic resistance - is resistance detected by surveillance relevant to predicting resistance in the clinical setting? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2(5),

- 487 (2002).
- 2) Heinemann, A. J. : How antibiotics cause antibiotic resistance. *Drug Discov Today* 4(2), 27 (1999).
  - 3) Baird, R. D. and Kaye, S. B. : Drug resistance reversal? are we getting closer? *Eur. J. Cancer* 39, 2450 (2003).
  - 4) Kim, J. Y., Shakow, A., Mate, K., Vanderwarker, C., Gupta, R. and Farmer, P. : Limited good and limited vision: multidrug-resistant tuberculosis and global health policy. *Soc. Sci. Med.* 61, 847 (2005).
  - 5) Mera, R. M., Miller, L. A., Daniels, J., Weil, J. G. and White, A. R. : Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States over a 10-year period: Alexander Project B. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 5, 195 (2005).
  - 6) Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S. and Topham, D. K. : Phytochemicals as bioactive agents, Technomic Publishing Company, Lancaster, p. 106 (2000).
  - 7) Giampieri, L., Fraternali, D. and Ricci, D. : The *in vitro* action of essential oils on different organisms. *J. Essent. Oil Res.* 14, 312 (2002).
  - 8) Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V. and Radonić, A. : Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. *Fitoterapia* 75, 733 (2004).
  - 9) Arnal-Schnebel, B., Hadji-Minaglou, F., Peroteau, J.-E., Ribeyre, F. and Billerbeck, V. G. : Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int. J. of Aromather.* 14, 192 (2004).
  - 10) Shin, S. : *In vitro* inhibitory activities of essential oils from *Oenanthe javanica* DC against *Candida* and *Streptococcus* species. *Natural Product Sciences* 10, 325 (2004).
  - 11) 배기환 : 한국의 약용식물, 교학사, 서울 p. 376 (2000).
  - 12) Matsuura, H., Saxena, G., Farmer, S. W., Hancock, R. E. and Towers, G. H. : Antibacterial and antifungal polyene compounds from *Glehnia littoralis* ssp. *leiocarpa*. *Planta Med.* 62, 256 (1996).
  - 13) Miyazawa, M., Kurose, K., Itoh, A., Hiraoka, N. and Kameoka, H. : Components of the essential oil from *Glehnia littoralis*. *Flavour Frag. J.* 16, 215 (2001a).
  - 14) Miyazawa, M., Kurose, K., Itoh, A. and Hiraoka, N. : Comparison of the essential oils of *Glehnia littoralis* from northern and southern Japan. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5433 (2001b).
  - 15) Shin, S. : Antifungal activities of essential oils from *Glehnia littoralis* alone and in combination with ketoconazole *Natural Product Sciences* 11, 92 (2005).
  - 16) Esposito, S. and Principi, N. : Emerging resistance to antibiotics against respiratory bacteria; impact on therapy of community-acquired pneumonia in children. *Drug Resist. Update* 5, 73 (2002).
  - 17) Fumiyo, K. and Tomemori, T. : Current topics of antibiotic-resistant *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, recent major pathogens causative of infantile acute otitis media. *International Congress Series* 1254, 513 (2003).
  - 18) Subramanian, D., Sandoe, J. A. T., Keer, V. and Wilcox, M. H. : Rapid spread of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among high-risk hospital inpatients and the role of molecular typing in outbreak confirmation. *J. Hosp. Infect.* 54, 99 (2003).
  - 19) Martin, J. M. : Erythromycin-resistant Group A streptococcus. Book review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 266 (2002).
  - 20) Tomasz, A. : New faces of an old pathogen: emergence and spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Med.* 107, 55 (1999).
  - 22) White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M. and Bosso, J. A. : Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents and Ch.* 40, 1914 (1996).
  - 23) Davidson, P. M. and Parish, M. E. : Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol-Chicago* 99, 148 (1989).
  - 24) Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. and Wyllie, S. G. : The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170 (2000).
  - 25) Dougherty, T. J., Beatlieu, D. and Barrett, J. F. : New quinolones and the impact on resistance. *DDT* 6, 529 (2001).