

신속한 항생제 감수성 테스트 법의 개발을 위한 Water-Soluble Tetrazolium Salt의 적용

황성돈 · 조동희* · 김광일 · 조미영 · 지보영 · 박명애 · 박찬일*†

국립수산과학원 수산생물방역과, *경상대학교 해양생명과학과

Application of water-soluble tetrazolium salt for development of rapid antimicrobial susceptibility testing methods

Seong Don Hwang, Dong Hee Jo*, Mi Young Cho, Bo Young Jee,
Myoung-Ae Park, and Chan-II Park*†

*Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research & Development Institute, 216
Gijanghaean-Ro, Gijang-Eup, Gijang-Gun, Busan, 619-705, Republic of Korea*

**Department of Marine Biology and Aquaculture, Institute of Marine Industry, College of Marine Science,
Gyeongsang National University, 38 Cheondaegukchi-Gil, Tongyeong, Gyeongnam 650-160, Republic of Korea*

In this study, we conducted to the development of a rapid antimicrobial susceptibility test method using WST-1 which is known to water-soluble tetrazolium salt, in order to rapidly response against bacterial diseases in fish. Eight of antibiotics which are permissioned for marine organism from government were used to rapid antimicrobial susceptibility testing using the WST-1. As a result, a similar tendency was verified compare to conventional antibiotic susceptibility test results. Generally, the antibiotic susceptibility test method required about 3 days (72 hours) for determine the effective antibiotics, however, we have confirmed that the our method using WST-1 was required at least 36 hours in this study. Consequentially, our method will contribute to development of rapid antimicrobial susceptibility testing for bacterial diseases in fish.

Key words: Antimicrobial susceptibility test, Tetrazolium salt, WST-1, MIC, Antimicrobial resistance

일반적인 어류양식은 어류를 제한된 장소나 특 정의 시설물 내에서 양식함으로써 자연 수계에 비 하여 서식환경이 부적절해지거나 영양 성분의 불 균형으로 인한 여러 가지 문제점 등이 발생하게 되어 양식 생물의 질병 감염에 의한 피해는 날로 늘어나고 있는 추세이다 (문 등, 2007). 양식 어류 에서 볼 수 있는 피해의 형태는 감염된 질병의 중

류에 따라서 다양하게 나타난다. 예를 들면 짧은 기간에 대량 폐사를 일으키는 급성형, 소수의 어류 가 장기간에 걸쳐 지속적으로 폐사하는 만성형, 감 염된 후 질병에서 회복되어도 성장이 둔화되거나 반흔이 남아 있어서 상품 가치를 잃게 되는 경우 등 여러 가지가 있다 (국립수산과학원, 2007). 이러 한 피해가 발생하게 되면 양식어민에게는 큰 경제 적 손실이 된다. 이러한 손실을 막기 위해서 각종 어류 질병의 예방과 치료를 목적으로 수산용 의약 품 및 화학약품의 사용빈도가 증가하고 있다 (이,

†Corresponding author: Chan-II Park
Tel: +82-55-772-9153, Fax: +82-55-772-9159
E-mail: vinus96@hanmail.net

2004). 이러한 수산용 의약품의 사용은 수산생물의 질병을 예방하고 치료하며, 건강한 수산생물의 생산성 증대에 크게 기여하고 있으나 어류 내에 흡수되지 않은 약제가 많아지고 그러한 여분의 약제가 함유된 사육수의 배출은 주변 수역에 대한 오염 유발 요인이 될 수도 있다 (장 등, 2011). 그리고 광범위한 항생제의 사용은 다제내성균의 발생을 초래하게 되었다 (Midvedt and Lingass, 1992; WHO, 1999). 양식장에서 항생제의 사용에 의해 발생한 어류 질병 내성균의 항생제 내성인자는 *Vibrio parahaemolyticus* (Hayashi et al., 1982)나 *Vibrio cholerae* (Nakjima et al., 1983)와 같은 인체병원균에 전이될 가능성이 있는 것으로 시사되었다.

양식어류에서 질병이 발생하게 되면 정확한 종류와 양의 항생제를 사용하기 위해 항생제 감수성 테스트를 실행하고 있다. 현재 사용되고 있는 항생제 감수성 테스트는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 승인한 표준 방식인 액체 배지미량희석법(Broth microdilution method)이 사용되고 있다 (CLSI, 2006). 그러나 CLSI에서 승인한 액체배지미량희석법은 병원성 세균의 항생제 감수성을 결정하기 위해 많은 시간이 필요하다고 보고되고 있다 (CLSI, 2006). 그러므로 양식장에서 질병이 발생하고 급성 감염으로 인한 대량폐사가 속출하고 난 뒤 항생제 감수성 테스트 결과가 확인되는 경우가 종종 발생하기도 한다.

수산생물용의약품의 오남용으로 인한 가시적, 잠재적 위험성이 고조되고 있으나 당장 항생제의 사용을 전면적으로 줄이거나 제한할 수는 없으며 유효 항생제를 올바른 방법으로 적정량 사용하는 것이 최선의 방법이며 수산용 항생제 감수성 시험의 시간을 줄이는 것은 효율적인 방역 정책 실현에 매우 중요하나 현재로서는 그 방법이 아직 확립되지 않은 실정이다. 따라서 양식생물의 질병 원인을 분석함과 동시에 질병의 확산을 막기 위한 보다 신속하고, 보다 정확하며, 보다 효율적인 항생제 감수성 확인의 실용화 기술의 개발이 필요하다.

최근 다양한 식품에서 증식하는 병원성 세균의 신속한 검출을 위해서 여러 종류의 tetrazolium salt를 이용하여 신속하게 유효한 항생제 확인을 위한 시도들이 이루어지고 있다(백, 1998; 박과 류, 2001;

Tsukatani et al., 2012). 특히 Tetrazolium salt 중에서 세포생존율테스트와 관련하여 주로 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 가장 널리 사용되었으나, 불용성 formazan을 녹이기 위해 이용되는dimethyl sulfoxide (DMSO)의 처리로 인하여 실험과정이 번거로울 뿐만 아니라, DMSO를 처리한 배지의 제거 과정에서 세포 손실의 위험이 있음으로(Bruggisser et al., 2002), 조금 더 민감하고 간편한 방법으로 사용할 수 있는 tetrazolium salt가 요구되어 왔다. 그 결과, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfoph-enyl)-2H-tetraz-olium), XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylam-ino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), WST-1 (2-(4-Iodo-phenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 그리고 WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 등이 개발되었다. 이러한 수용성 tetrazolium salt (Water-soluble tetrazolium salt)는 formazan을 녹이는 과정과 배양액을 제거할 필요가 없어 suspension cell에 대해서도 간편하게 실험을 수행할 수 있는 장점이 있으며 점차 MTT를 대체하여 세포활성측정의 새로운 패러다임으로 자리매김하고 있다.

최근 WST-8을 이용한 인간 골수 기질세포 증식 측정 (임 등, 2012), MTS를 이용한 인간 뇌수막종 세포의 성장비교 (박 등, 2000) 그리고 WST-8을 이용한 Propofol이 인간 비장세포에 미치는 세포독성 평가 (유 등, 2008)등이 보고되었고, 대부분 포유류에서 세포활성 및 세포독성을 알아보기 위해 다양한 수용성 tetrazolium salts이유에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 WST-1을 이용하여 어류의 병원성 세균에 대한 항생제 감수성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

이번 연구에서는 다양한 종류의 tetrazolium salt 중 WST-1을 이용하여 양식생물의 질병 원인을 분석함과 동시에 질병의 확산을 막기 위한 보다 신속하고, 보다 정확하며, 보다 효율적인 항생제 감수성 확인을 위한 실용화 기술을 개발하고자 다양한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

약제 및 배지

발색시약으로는 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay (Takara Biochemicals, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 병원성 세균 배양과 실험에 사용한 배지는 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) / Broth (BHIB) (Bacto, USA), Mueller Hinton Agar (MHA) / Broth (MHB) (Difco, USA), Salmonella Shigella Agar (SS Agar) (BBL, USA), Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose Agar (TCBS agar) (Difco, USA)를 사용하였다.

이번 연구에서 이용된 항생제는 우리나라에서 수산생물용 항생제로 허가가 된 amoxicillin (AMX, Sigma, USA), ampicillin (AMP, Duchefa, The Netherlands), clindamycin (DA, TCI, Japan), erythromycin (E, TCI, Japan), flumequine (UB, TCI, Japan), florfenicol (FFC, TCI, Japan), oxolinic acid (OA, Sigma, USA), oxytetracycline (OT, Sigma, USA) 등 8종의 항생제를 이용하였다. 각각의 항생제들은 MH broth에 20 µg/ml의 농도가 되도록 희석시켜 사용하였다.

동결보관 균주를 이용한 항생제 감수성 테스트 적용 실험

이번 연구에서 사용된 병원성 세균은 *Streptococcus iniae* (*S. iniae*), *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*)로서, 국립수산물학원 병리연구과에서 분양 받아 본 연구에 이용하였다. 동결보관된 균주들은 실험 수행 하루 전 BHIA에 접종하여 27°C에서 24시간 배양하였다. 그 후 전날 BHIA에 배양중인 *E. tarda*, *S. iniae*를 각각 BHIB 배지 5 ml에 접종하여 27°C에서 6시간 배양하였다. 배양된 세균들은 원심분리 (3,000 rpm, 10분)를 통하여 집균하였고, 집균된 세균은 MH broth에 재현탁시킨 후 흡광도 600 nm에서 OD값이 0.132 (McFaland standard No. 0.5)가 되도록 조정하였다.

8종의 항생제에 대한 최소억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration) 측정은 96 well plate에 MH broth 100 µl를 분주하였고, 전술한대로 준비된 각각의 항생제 stock을 2배씩 단계 희석하여 최종 농도를 20 µg/ml의 stock solution에 대한 2⁻¹배에서

2⁻¹²배로 희석배율을 조정하였다. 그리고 준비한 세균 부유액 100 µl를 각 well에 분주하여 27°C에서 24시간 배양한 후에 Victor 3 microplate reader (PekinElmer, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트는 MIC 측정과 같은 방법으로 96 well plate에 항생제 및 세균 부유액을 준비하였고 27°C에서 2.5시간 배양하였다. 그 후 WST-1를 10 µl씩 분주하여 1.5시간 재배양하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군(Negative control, NC)은 균을 접종하지 않았고 양성대조군(Positive control, PC)은 항생제를 첨가하지 않았다.

분리 세균을 이용한 항생제 감수성 테스트 기술 개발

실제 세균성 질병에 걸린 병어로부터 병원체를 순수 분리하여, WST-1을 이용한 새로운 항생제 감수성 테스트와 기존의 항생제 감수성 테스트와의 비교 분석을 위해서 연구를 수행하였다. 실험으로는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)을 사용하였고, 3마리(평균전장 20±0.8 cm, 평균체중 160±2.8 g)의 복강에 미리 준비된 세균 현탁액 200 µl를 주입하였다. 인위감염 시킨 조피볼락들은 에어레이션 공급 장치가 설치된 0.7톤의 자체 순환여과 사육수조에 수용하였으며, 사육 수온은 25°C로 유지시켰고, 먹이는 공급하지 않았다. 병원성 세균 주입 3일 이후부터 병성을 보이거나, 힘없이 유평하는 개체를 수거하여 해부를 실시하여 조피볼락의 신장으로부터 각 세균을 분리하였다. 이때, 사용한 배지는 BHIA, SS agar, TCBS agar를 사용하였으며, 24시간 후에 각 병원체를 순수분리 하여 실험에 이용하였다. 순수분리 후 BHIA에 배양중인 *E. tarda*, *S. iniae*를 각각 BHIB 배지 5 ml에 접종하여 27°C에서 6시간 배양하였고, 이후 항생제 감수성 테스트는 전술한대로 수행하였다. 모든 실험 조건은 국제규범인 CLSI법을 참고하여 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

이번 연구에 이용된 tetrazolium salt는 3개의 방

향족 고리(aromatic ring)가 연결된 헤테로고리 화합물(heterocyclic compound)의 통칭이다. 일반적으로 결합된 방향족 고리의 종류에 따라 수용액에서의 용해도와 흡광 스펙트럼이 달라진다. Tetrazolium salt의 4개의 질소로 이루어진 tetrazole의 일부는 탈수소효소 (dehydrogenase) 등에 의해 쉽게 환원되어 유색의 formazan으로 전환되며, 탈수소효소는 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하여 세포 대사활동 시 생성되는 NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)를 NADP⁺로 산화시키고 환원상태의 탈수소효소가 된다. 환원상태의 탈수소효소는 tetrazolium salt를 환원시키고 다시 산화된 탈수소효소가 되고 tetrazolium salt는 유색의 formazan으로 환원된다. 즉 세포가 손상을 입어 더 이상 대사활동을 할 수 없다면 NAD(P)H가 생성되지 않아 탈수소효소가 환원이 될 수 없고 그렇기 때문에 tetrazolium salt를 환원시킬 수 없기에 환원되는 formazan의 양이 감소한다 (Berridge and Tan, 1998). 그 결과는 Microplate reader로 측정하기 때문에 소량의 세포와 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있고 세포 독성과 세포활성의 측정에 적용되고 있다 (Tachon et al., 2009).

이번 연구에서 냉동보관 *E. tarda*를 대상으로 기존의 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 AMX에서 2⁻⁸, AMP에서 2⁻⁵, E에서 2⁻⁴, FFC에서 2⁻⁹, UB에서 2⁻¹², OA에서 2⁻¹², OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 항생제에 대한 감수성을 보였으며 DA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 1A, B). WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 AMX에서 2⁻⁴, E에서 2⁻⁴, FFC에서 2⁻¹⁰, UB에서 2⁻⁹, OA에서 2⁻¹¹, OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 감수성을 보였으며 AMP와 DA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 1C, D). 인위감염 후 분리된 *E. tarda*를 대상으로 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 E에서 2⁻⁵, FFC에서 2⁻⁹, UB에서 2⁻⁹, OA에서 2⁻¹¹, OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 감수성을 보였으며 AMX, AMP, DA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 1E, F). 기존 항생제 감수성 테스트 결과와 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트 결과를 비교한 결과 AMX, AMP, DA, E 4개의 항생제에서

항생제 감수성에 차이가 있음이 확인되었다. 그러나 그 외의 4가지 항생제에서는 유사한 경향의 항생제 감수성이 확인 되었다. 보관 균주와 분리 균주에 대한 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트 결과를 비교한 결과 비슷한 경향의 항생제 감수성 결과를 확인할 수 있었다.

냉동보관 *S. iniae*를 대상으로 기존의 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 AMX에서 2⁻¹², AMP에서 2⁻⁹, DA에서 2⁻⁷, E에서 2⁻¹², FFC에서 2⁻⁹, UB에서 2⁻³, OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 항생제에 대한 감수성을 보였으며 OA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 2A, B). WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 AMX에서 2⁻¹⁰, AMP에서 2⁻⁷, DA에서 2⁻⁶, E에서 2⁻¹², FFC에서 2⁻¹⁰, UB에서 2⁻⁵, OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 항생제에 대한 감수성을 보였으며 OA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 2C, D). 인위감염 후 분리된 *S. iniae*를 대상으로 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트를 수행한 결과는 AMX에서 2⁻¹⁰, AMP에서 2⁻⁷, DA에서 2⁻⁹, E에서 2⁻¹², FFC에서 2⁻¹⁰, UB에서 2⁻⁴, OT에서 2⁻¹² 희석 농도까지 항생제에 대한 감수성을 보였으며 OA에서는 감수성을 보이지 않았다 (Fig. 2E, F). 기존 항생제 감수성 테스트 결과와 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트 결과를 비교한 결과 감수성에서는 약간의 차이를 보였으나 양상은 유사한 것으로 확인되었다. 또한 보관 균주와 분리 균주에 대한 WST-1을 이용한 항생제 감수성 테스트 결과를 비교한 결과 비슷한 경향의 항생제 감수성 결과를 확인할 수 있었다.

이번 연구에서는 기존의 MIC 기법과의 비교 분석을 위하여 국내 수산용의약품으로 허가된 8종의 항생제를 대상으로 tetrazolium salt의 일종인 WST-1을 이용하여 신속항생제 감수성 테스트를 수행하였으며 냉동 보관 균주와 어류에 인위감염 후 순수 분리한 균주를 이용하여 신속항생제 감수성 테스트를 수행하였다. 그 결과, 기존의 항생제 감수성 테스트는 세균의 분리에 18~24시간, 실험 전 액체 배지 계대배양에 24시간, 테스트에 24시간이 소요되어 총 3일가량 소요(최 등, 2012)되는 것에 반해 이번 연구의 WST-1을 이용한 방법은 세균의 분리에 18~24시간, 실험 전 액체배지 계대배양에 6시

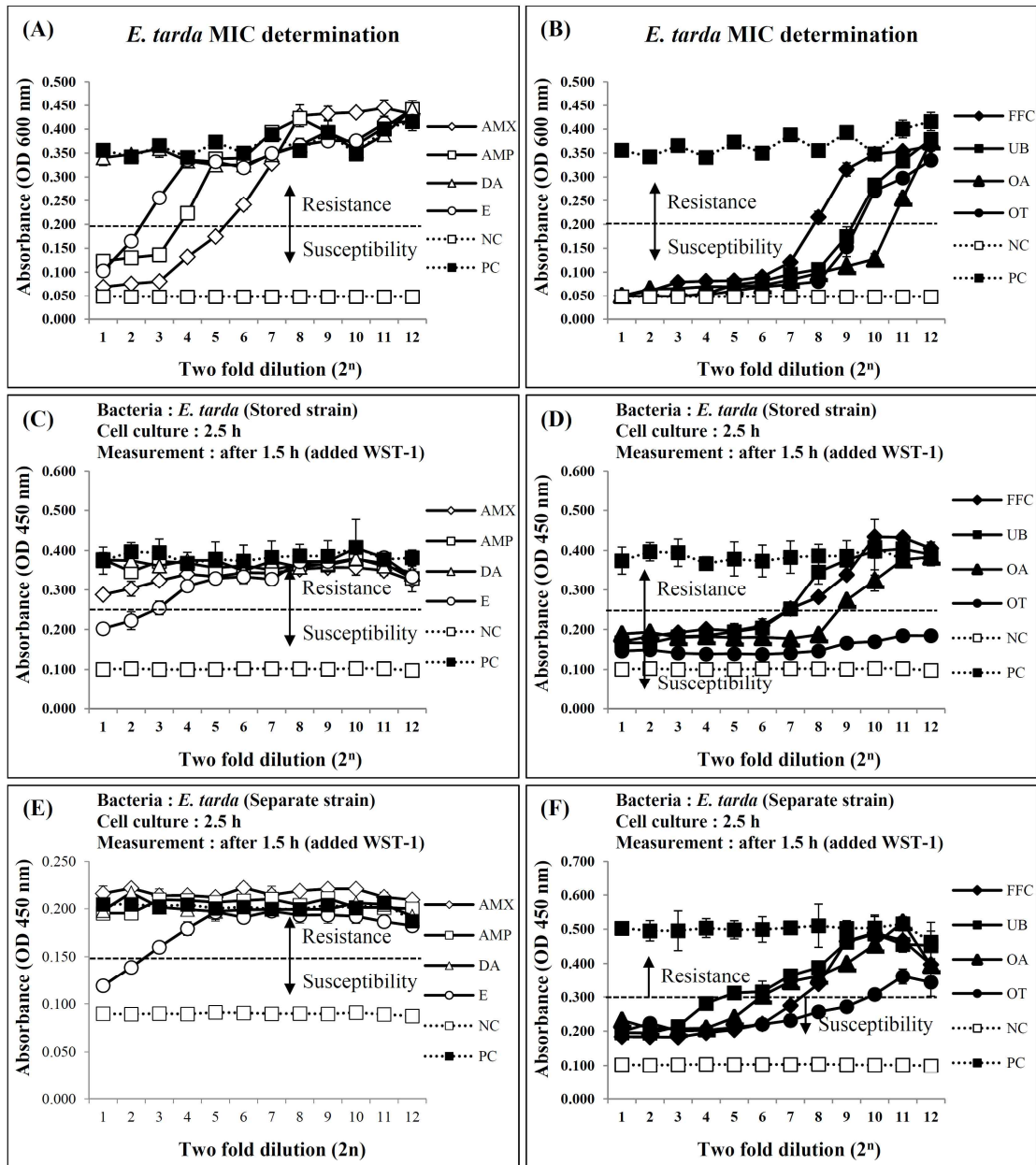


Fig. 1. Antibiotic susceptibility test results for *E. tarda*. Conventional antibiotic susceptibility testing results (A, B). Antibiotic susceptibility test results using the WST-1 (C, D). Antibiotic susceptibility test results using the WST-1 to separate strain from artificially infected fish (E, F). The antibiotic susceptibility and resistance were indicated with dot line and arrow.

간, 테스트에 4시간으로 단축시킬 수 있기 때문에 총 2일도 소요되지 않는다. 이로써 신속하고 정확한 항생제 감수성 테스트 방법으로 premix WST-1

을 이용한 방법이 적용 가능할 것으로 생각된다. 그러나 이번 연구 결과에서 각각의 실험군에서는 전체적으로 유사한 경향의 항생제 감수성이 확인

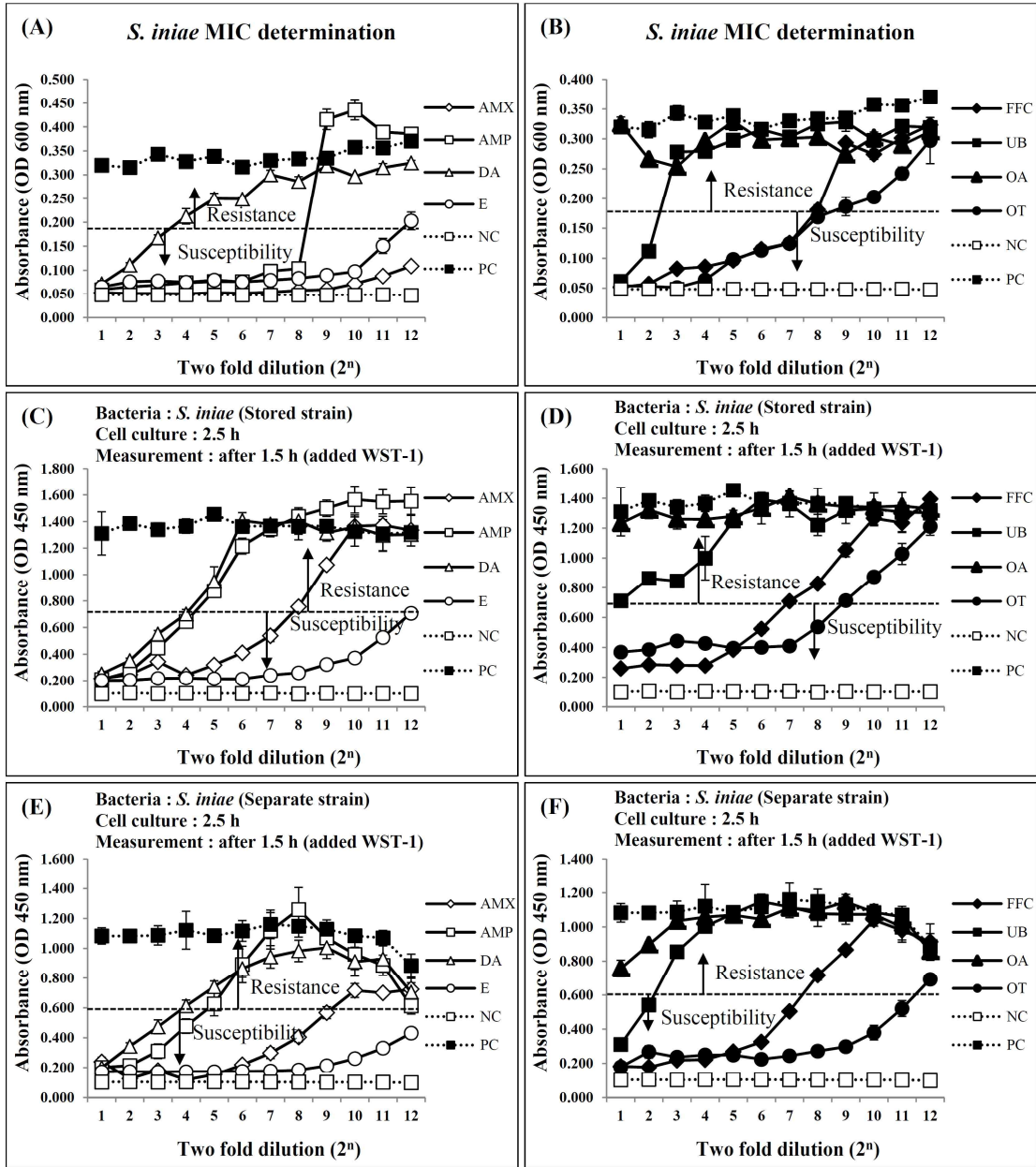


Fig. 2. Antibiotic susceptibility test results for *S. iniae*. Conventional antibiotic susceptibility testing results (A, B). Antibiotic susceptibility test results using the WST-1 (C, D). Antibiotic susceptibility test results using the WST-1 to separate strain from artificially infected fish (E, F). The antibiotic susceptibility and resistance were indicated with dot line and arrow.

되었지만, 희석된 항생제 농도값에는 다소 차이가 있는 결과를 보여주었다. 이는 세균의 배양시간의 차이(WST-1, 4시간; MIC, 24시간)에서 비롯된 결

과로 추정되었다.

이번 연구 결과는 추후 더욱 신속하고 정확한 항생제 감수성 기법을 개발하기 위한 직접 조직을

이용하는 방법이나 흡광도 측정 기기 없이 가시적 판단이 가능하도록 심도 있는 연구에 도움이 될 수 있으며 더 나아가 Kit 제작할 시에도 이용 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 국립수산물과학원 수산과학 연구사업(R2015071)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드리며, 2012년도 경상대학교 연구년제연구교수 연구지원비에 의하여 수행되었음.

References

- Ahn, H.J., Kim, E.S., Kim, J., Kim, D.W., Kim, K.Y., Lee, C.Y. and Lee, S.J.: Evaluation of the viability of periodontal ligament cell in rat teeth using slow cryopreservation method with magnetic field. The Korean academy of conservative dentistry, 33(4), 2008.
- Berridge, M. V. and Tan, A. S.: Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma*, 205: 74-82, 1998.
- Bruggisser, R., Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W. and Tullberg-Reinert, H.: Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*, 68: 445-448, 2002.
- Choi, H.S., Jun, L.J., Kim, S.M., Jeong, H.D., Kim, Y.K., Lim, H.Y., Yeo I. K. and Jeong, J.B.: Clinical features of fish with pathogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol*, 25(2): 67-76, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-7th edition M7-A7. Wayne, PA, USA, 2006.
- Hayashi, R., Harada, K., Mitsuhashi, S. and Inoue, M.: Conjugation of drug resistance plasmids from *Vibrio anguillarum* to *Vibrio parahemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 26: 479-485, 1982.
- Jang, E.H., Lim, S.J. and Kim, T.H.: Distribution of antibiotic resistant microbes in aquaculture effluent and disinfection by electron beam irradiation. Korean society of environmental engineers, Original Paper 492-500, 2011.
- Leem, Y.H., Nam, T.S., Kim, J.H., Lee, K.S., Lee, D.H., Yun, J. and Chang, J.S.: The effects of extracellular pH on proliferation and differentiation of human bone marrow stem cells. *Korean Journal of Bone Metabolism*, 19(1), 2012.
- Midvedt, T. and Lingass, E.: Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria. Office International de Epizooties, Paris, France, pp. 302-314, 1992.
- Moon, D.Y., Kim, B.Y., Park, J.J., Jeung, J.B., Song, J.H., Kwon, T.H., Kim, Y.J., Jin, S.Y., Kwack, M.J. and Cho, C.W.: The Study of the Reuse of small-scale Pisciculture wastewater. Industrial Waste Analysis Division, 2007.
- Nakjima, T., Suzuki, M. Harada, K., Inoue, M. and Mitsuhashi, S.: Transmission of R plasmids in *Vibrio anguillarum* to *Vibrio cholerae*. *Microbiology Immunology*, 27: 195-198, 1983.
- Park Y.J. and Ryu, J.W.: Chemosensitivity Test in Human Breast Cancer. *Journal of Korean Breast Cancer Society*, 5(1), 2001.
- Park, Y.S., Koo, T.H., Lee, J.H., Lee, Y.B., Lee, K.C., Mok, J.H. and Kim, H.S.: The Effects of Lipoxygenase and Cyclooxygenase Inhibitors to Meningioma Cell Proliferation in vitro. *J Korean Neurosurg Soc*, 29: 28-34, 2000.
- Stevens, M. G., Kehrl, M. E. and Canning, P. C.: A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Veter. Immunol. Inununopath*, 28: 45-56, 1991.
- Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Cantonnet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R. and Yvon, M.: Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 155: 2941-2948, 2009.
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T. and Matsumoto, K.: Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 90: 160-166, 2012.
- World Health Organization (WHO): Joint FAO/NACA/WHO Study Group on food safety issues associated with products from aquaculture. WHO Technical Report Series No. 883. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999.

You, J.H., Song, H.K., Jeong, D.C., Ryu, K.H. and Chin, Y.S.: The Inhibitory Effect of Propofol on Splenocytes Proliferations to Lipopolysaccharide in BALB/c

Mice: Based on the Measurement of BrdU Incorporation in vitro. Korean J Anesthesiol, 54: 74-80, 2008.

Manuscript Received : May 10, 2015

Revised : Aug 14, 2015

Accepted : Aug 17, 2015