

Evaluation of the Antibacterial Effects of *Phellinus baumii* Extract on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Using Broth Microdilution Based on a Colorimetric Method

Kyeong Seob Shin¹, Mi Young Jo¹ and Seung Bok Hong^{2,†}

¹Department of Laboratory Medicine, Chungbuk National University, College of Medicine, Cheongju 28644, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Chungbuk Health & Science University, Cheongju 28150, Korea

The broth microdilution technique used to measure the minimal inhibitory concentration (MIC) of natural compounds against bacteria is problematic: it is difficult to visualize bacterial growth due to the color of the natural compound. Therefore, the use of a colorimetric method with a redox indicator by broth microdilution can simplify it and increase its objectivity. This study evaluated the usefulness of the colorimetric method in measuring the MIC of *Phellinus baumii* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The inhibition in disc diffusion method was observed from 8,192 µg/mL *P. baumii* in all 10 MRSA isolates examined; however, the MIC ranges of the 10 MRSA isolates was 512~2,048 µg/mL by broth microdilution using a colorimetric method; with the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) indicator. In addition, the MIC of *P. baumii* by broth microdilution using MTT as indicator yielded excellent results. However, the 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) results could not be determined due to the color of the TTC indicator. The MICs of four antibiotics against MRSA using MTT or TTC were equal to those determined by visual interpretation. In conclusion, to evaluate the antibacterial effects of a natural compound, the broth microdilution technique is considered to be better than the disc diffusion method. Moreover, to resolve the problems caused by the colors of natural compounds, a colorimetric method such as that using MTT may be very valuable.

Key Words: Natural compound, Broth microdilution, Disc diffusion, MTT, TTC, *Phellinus baumii*

서 론

최근 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant Enterococci, extended-spectrum β-lactamase 생성균 및 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*와 같은 다제내성균의 증가로 인해 사용 가능한 항균제가 제한되어 이들 균에 의한 감염의 치료에 어려움을 야기하고 있다(Chamber, 2001; Courvalin, 2006; Uh et al., 2007; Rosenthal et al., 2010; Lee et al., 2011). 한편 항균제 내성균의 증가에

대한 대안으로 천연물에 존재하는 항균성 물질을 이용하고자 하는 연구가 증가하고 있다(Liu et al., 2000; Shimizu et al., 2001; Shiota et al., 2004; Mahady, 2005; Hemaiswarya et al., 2008). 상황버섯(*Phellinus baumii*)은 basidiomycetes Hymenochaetaeaceae family (Hwang et al., 2004)에 속하는 약효가 있는 버섯으로 한국을 포함한 여러 아시아 국가의 전통의학에서 수세기 동안 다양한 질환의 치료에 이용되어 왔다. 현재까지 항비만(Noh et al., 2011), 항산화(Lee et al., 2010), 혈당강하(Hwang et al., 2005), 알코올 독성 완화(Kim, 2016), 항혈소판(Karuzzaman et al., 2011) 그리고 항염효과

*Received: October 14, 2016 / Revised: November 8, 2016 / Accepted: November 14, 2016

†Corresponding author: Seung Bok Hong. Department of Clinical Laboratory Science, Chungbuk Health & Science University, Cheongju 28150, Korea.
Tel: +82-43-210-8308, Fax: +82-43-210-8289, e-mail: sbhong8646@hanmail.net

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Yayeh et al., 2012)가 있다는 보고가 있었으며, 최근에는 홍(Hong et al., 2016) 등에 의해 MRSA에 대한 항균효과와 β -lactam 항균제와 상승효과가 있다고 보고되었다.

미량액체배지희석법은 세균의 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 결정하는데 표준방법으로 사용되고 있다. 그러나 대부분의 세균에 대한 항균제의 MIC를 측정할 때는 적절하지만 진균 및 결핵균과 같이 천천히 자라는 균의 증식여부를 판독할 때는 문제가 발생할 수 있다. 살아있는 세균의 산화/환원 반응(redox indicator)에 의해 색소가 생성되는 원리를 이용한 비색법(colorimetric)이 균의 증식이 느려 판단하기 곤란한 경우 등에 이용될 수 있다(Summanem et al., 1992; Mshana et al., 1998; Shin et al., 2004). 따라서 비색법을 이용한 미량액체배지희석법은 주관적인 판단을 줄여주고 객관성을 높여줄 수 있다(Lee et al., 2007a).

현재 표준화된 항균제의 항균력 측정에 비하여 천연물의 항균력 측정은 표준화 없이 저자들마다 다른 방법으로 측정하여 보고하고 있다(Heo et al., 2008; Kim et al., 2011). 천연물은 항균제보다 항균력이 낮아 고농도를 이용해야 하고 대부분이 색소를 가지고 있어 항균력 측정의 표준방법인 액체배지희석법에서 균의 증식여부를 육안으로 판독하는데 어려움이 있다. 따라서 여러 연구에서 디스크 확산법 등으로 억제대 생성여부 정도만 보고하는 실정이며 항균력을 정량적으로 알 수 없어 연구들 간에 자료의 비교가 어렵다. 이에 본 연구에서는 CLSI 기준을 이용한 디스크 확산법과 미량액체배지희석법을 이용하여 MRSA에 대한 상황버섯추출물의 항균효과를 측정하여 비교하였으며, 육안판독이 어려운 상황버섯 추출물의 MIC 측정에 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염료를 이용한 비색법을 이용하여 보았다.

재료 및 방법

대상 균주 및 항균제 감수성 검사

충북지역 3차 의료기관에서 분리된 10개의 MRSA 균주를 실험에 사용하였다. 디스크 확산법으로 메치실린 내성 균주를 선별하였으며 최종적으로 *mecA* gene에 대한 PCR로 메치실린 내성을 확인하였다(Lee et al., 2007b). 메치실린 디스크 확산법의 정도관리를 위해 *S. aureus* ATCC 25923을 정도관리 균주로 사용하였다. 액체배지희석법은 CLSI 기준(CLSI, 2012)에 의해 시행하였으며 *S. aureus*

ATCC 29213을 정도관리 균주로 사용하였다.

Phellinus baumii 추출물과 항균제의 준비

상황버섯 추출물은 고려약업사(Cheonan, Korea)에서 구입하여 분쇄한 후 70% 에탄올로 추출하였다. 추출된 분말은 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co.)에 녹여 100 mg/mL로 만든 후 각 실험농도를 조정하여 사용하였다. 사용한 항균제 디스크는 oxacillin (BBL, Becton Dickinson, Co., Sparks, MD, USA), vancomycin (BBL), ciprofloxacin (BBL), gentamicin (BBL), penicillin (BBL), erythromycin (BBL), tetracycline (BBL)이었으며, 액체배지희석법에 사용된 항균제는 cefoxitin (JW Pharmaceutical Co., Seoul, Korea), ciprofloxacin (Bayer Korea Co., Seoul, Korea), oxacillin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) 및 vancomycin (CJ Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)이었다.

디스크 확산법을 이용한 항균력 검사

CLSI 기준(CLSI, 2012)에 따라 혈액천천배지(BAP)에 배양된 균을 McFarland 0.5관(1.5×10^8 CFU/mL) 농도로 맞춘 후 Muller-Hinton 한천배지(Asan Co, Seoul)에 접종하였다. 디스크를 올려놓은 후 상황버섯 추출물 각각 512 μ g/mL, 1,024 μ g/mL, 2,048 μ g/mL, 4,096 μ g/mL, 8,192 μ g/mL, 16,384 μ g/mL 및 32,768 μ g/mL의 농도를 20 μ L씩 디스크에 분주하였다. 분주 후 시료가 디스크에 스며들도록 30분 방치 후 35°C에서 18시간 배양하여 억제대의 크기를 측정하였다. DMSO의 영향 유무를 확인하기 위해 10% DMSO를 시료와 동일한 조건으로 사용하였다.

미량액체배지희석법에 의한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration)의 측정

CLSI 기준(CLSI, 2012)에 따라 미량액체배지희석법으로 최소억제농도를 측정하였으며 방법을 요약하면 다음과 같다. 96 well microplate에 상황버섯 추출물 256~4,096 μ g/mL 범위의 농도를 각각 100 μ L를 넣은 후 1×10^7 CFU/mL의 농도의 균액 5 μ L를 접종하여 최종 균 농도가 5×10^5 CFU/mL가 되게 하였다. 매 검사마다 *S. aureus* ATCC 29213을 정도관리 균주로 사용하였으며, 35°C에서 18시간 배양 후 최소억제농도를 판독하였다.

미량액체배지희석법에 비색법의 적용

상황버섯의 최소억제농도 측정에 육안 판독과 TTC와 MTT 염료를 이용한 방법을 비교하였다. 상황버섯의 MIC

Table 1. The characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibacterial activity of *Phellinus baumii* against MRSA

No.	Specimen	<i>mecA</i>	Antimicrobial susceptibility							Antibacterial activity of <i>P. baumii</i>	
			OX	VA	CIP	GM	PG	E	TE	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) of inhibition in DD*	MIC ($\mu\text{g/mL}$) by BmD†
1	WB	+	R	S	R	S	R	R	R	8,192	1,024
2	WB	+	R	S	S	S	R	S	R	8,192	1,024
3	WB	+	R	S	R	S	R	R	S	8,192	512
4	WB	+	R	S	S	S	R	S	S	8,192	1,024
5	WB	+	R	S	R	R	R	R	R	8,192	512
6	WB	+	R	S	S	I	R	S	R	8,192	1,024
7	CP	+	R	S	R	S	R	R	R	8,192	2,048
8	JF	+	R	S	S	S	R	S	S	8,192	1,024
9	OP	+	R	S	S	S	R	S	S	8,192	1,024
10	JF	+	R	S	S	S	R	S	S	8,192	1,024
C	ATCC	-	R	S	S	S	S	S	S	8,192	1,024

Abbreviations: C, control strain (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213); WB, whole blood; CP, closed pus; JF, joint fluid; OP, open pus; OX, oxacillin; VA, vancomycin; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamicin; PG, penicillin G; E, erythromycin; TE, tetracycline, DD, disc diffusion; BmD, broth microdilution; R, resistance; S, susceptible.

*Concentrations of *P. baumii* extract showing the inhibition zone in disc diffusion. The inhibition zone diameter of disc observed in range of 8,192 $\mu\text{g/mL}$ to 32,768 $\mu\text{g/mL}$ of *P. baumii* extract revealed the no difference.

†MIC of *P. baumii* against MRSA measured by broth microdilution using MTT as indicator.

판독은 색소로 인한 육안 판독이 어려워 비색법을 이용하게 되었는데, MTT 염료를 10 μL 첨가하고 30분 방치 후 색 변화(보라색: 증식을 의미)를 육안으로 확인하여 증식 유무를 판독하였다. 즉 색의 변화가 나타나지 않은(균 미 증식) 최소농도를 최소억제농도로 판독하였다(Mshana et al., 1998). 한편 TTC 염료방법은 균의 접종과 동시에 염료를 넣고 16~18시간 배양 후 색의 변화를 판단하였다(Lee et al., 2007a).

육안 판독방법과 비색법을 이용한 항균제의 MIC 측정 비교

4종의 항균제(cefazolin, ciprofloxacin, oxacillin, vancomycin)의 최소억제농도 측정에 MTT 및 TTC를 이용한 방법과 육안 판독법을 비교하였다.

결 과

대상 균주의 특성

실험에 이용한 10개 균주의 임상적 특징 및 감수성 양상은 Table 1과 같다.

상황버섯 추출물의 항균효과 측정

디스크 확산법을 이용한 항균력 측정: DMSO에 의해 억제대는 모든 균주에서 관찰되지 않아 상황버섯 추출물의 용매제로 사용하였다. MRSA 10 균주는 상황버섯 추출물 8,192 $\mu\text{g/mL}$, 16,384 $\mu\text{g/mL}$ 및 32,768 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 디스크에서 억제대가 관찰되었으나 농도 증가에 따른 억제대 크기의 증가는 관찰되지 않았다(Table 1, Fig. 1).

미량액체배지희석법을 이용한 최소억제농도(MIC) 측정: 상황버섯 추출물에 대한 MRSA의 최소억제농도 범위는 512~2,048 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, MIC₉₀은 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 그리고 대조 균주로 사용한 ATCC 25913 *S. aureus*의 MIC는 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 1).

미량액체배지희석법을 이용한 상황버섯의 최소억제농도 판독에 비색법의 적용

상황버섯 추출물에 대한 MRSA의 최소억제농도를 측정하는데 사용된 TTC 염료와 MTT 염료를 이용한 결과는 Fig. 2에 보여지고 있다. 상황버섯 추출물이 노란색 색소를

때며 균이 증식 시 TTC 염료는 열은 핑크색을 띄므로 증식 유무를 육안으로 판단하는데 부적합하였다(Fig. 2). 즉 연한 핑크색은 상향추출물의 열은 노란색과 섞여 균증식 여부의 육안적 구별이 쉽지 않았다. 반면 MTT 염료는 균

이 증식되었을 때 남색으로 발색되어, 열은 노란색의 상황버섯과 쉽게 대비되어 최소억제농도를 육안으로 판정하는데 적합하였다(Fig. 2).

항균제의 최소억제농도 측정에서 육안판독 방법과 비색법을 이용한 판독법 비교

4종의 항균제(cefoxitin, ciprofloxacin, oxacillin, vancomycin)에 대해 육안 판독법과 TTC 및 MTT 판독법을 이용한 MIC 값을 비교한 결과는 서로 일치하였다(Table 2).

고찰

검사실에서 디스크 확산법은 액체배지희석법에 비해 검사과정이 간편하다는 장점이 있지만, MIC를 측정할 수 없는 단점을 가지고 있다. 한편 이 방법은 CLSI (CLSI, 2012)에서 표준화된 방법을 제시하고 있지만 균의 농도가 0.5 McFarland (1×10^8 CFU/mL)로 액체배지희석법 (1×10^5 CFU/mL)보다 1,000배 가량 높다. 게다가 천연물의 추출물이 항균제보다 항균효과가 매우 낮거나 배지에서 확산성이 좋지 않으면 억제대가 관찰되지 않을 가능성이 높으므로 표준방법이 아닌 저자들마다 다른 방법을 사용하는 경우가 대부분이다. 한편 항균력의 측정에 균의 농도가 중요하지만 디스크 확산법을 이용한 천연물의 항균력을 측정하는 대부분의 논문은 정확한 균의 농도 표기가 없으며, 방법간의 표준화도 되지 않아 자료의 비교도 어렵다(Heo

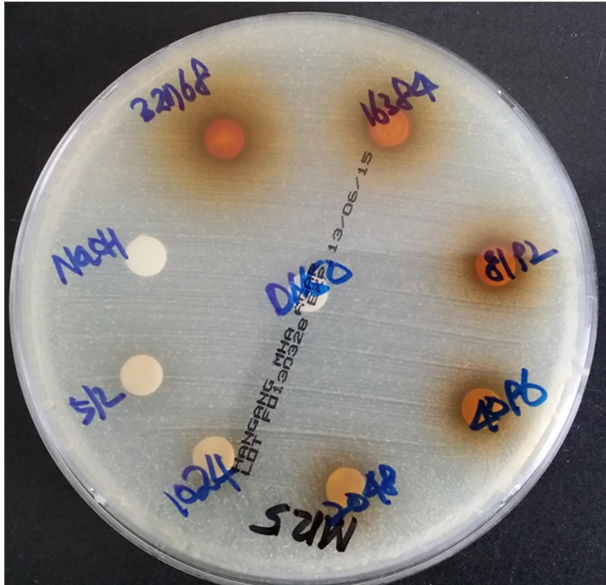


Fig. 1. Antimicrobial susceptibility testing of clinical MRSA isolate by disc diffusion containing various concentration (512~32,768 µg/mL) of *P. baumii* extract. Weak inhibition was observed from 8,192 µg/mL of *P. baumii* but inhibition zone diameters were similar in 8,192, 16,384 and 32,768 µg/mL concentration.

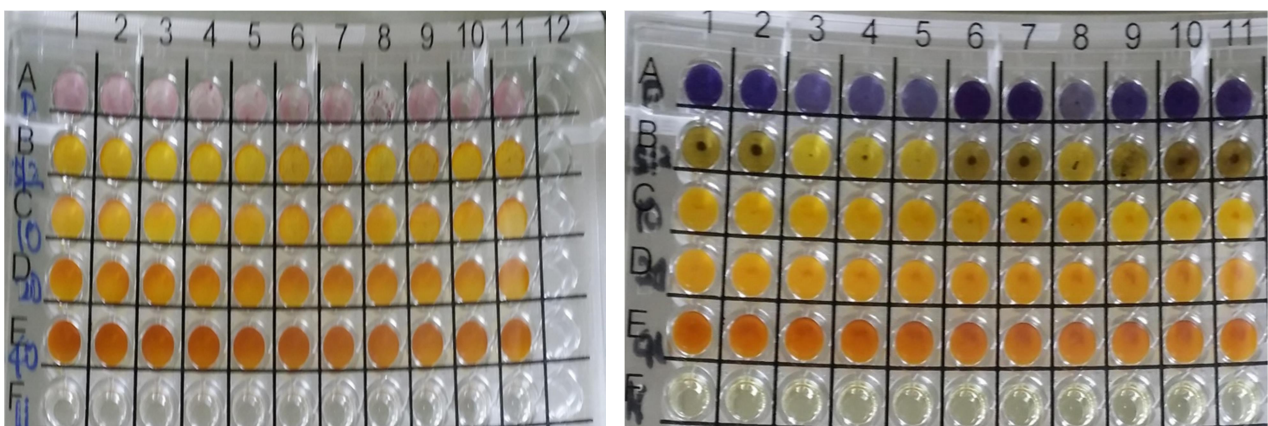


Fig. 2. Broth microdilution method of *Phellinus baumii* using TTC (left) or MTT (right) redox indicator. Horizontal line: lanes 1~10, clinical MRSA isolate; lane 11, *S. aureus* ATCC 25913. Vertical line is a concentration of *P. baumii* (µg/mL): lane A, control; B, 512; C, 1,024; D, 2,048. E, 4,096. MICs against 10 MRSA isolates could not be interpreted in TTC method (left) but MICs were clearly readable in MTT method (right). The MICs of 11 *P. baumii* are presented in Table 1.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of 10 MRSA isolates tested by three broth microdilution methods (MHA only, MTT method and TTC method)

MRSA	Cefoxitin (µg/mL)		Ciprofloxacin (µg/mL)		Oxacillin (µg/mL)		Vancomycin (µg/mL)	
	MHA	MTT & TCC	MHA	MTT & TCC	MHA	MTT & TCC	MHA	MTT & TCC
1	≥32	≥32	≥32	≥32	≥128	≥128	1	1
2	≥32	≥32	8	8	≥128	≥128	1	1
3	≥32	≥32	16	16	≥128	≥128	1	1
4	≥32	≥32	16	16	≥128	≥128	1	1
5	≥32	≥32	≥32	≥32	≥128	≥128	1	1
6	≥32	≥32	32	32	≥128	≥128	1	1
7	≥32	≥32	32	32	≥128	≥128	1	1
8	≥32	≥32	8	8	≥128	≥128	1	1
9	4	4	4	4	≥128	≥128	1	1
10	16	16	4	4	≥128	≥128	1	1

Abbreviations: MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MHA, broth microdilution (BmD) method using Mueller Hinton agar only; MTT, BmD method using MTT; TCC, BmD method using TCC.

et al., 2008; Kim et al., 2011; Hong et al., 2015). 그러나 액체배지희석법은 CLSI 표준법을 사용하며 최소억제농도를 측정할 수 있기 때문에 자료를 비교할 수 있어 천연물의 항균력 측정에 보다 적절할 것으로 사료된다. 이 연구에서도 디스크 확산법은 8,192 µg/mL, 16,384 µg/mL 및 32,768 µg/mL의 상황 농도에서 미약한 억제대가 관찰되었으나 농도의 증가에 따른 억제대의 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 액체배지희석법에서 MIC는 512~2,048 µg/mL이었다. 다만 디스크 확산법은 간편하다는 장점도 있기 때문에 균의 농도를 더 낮추는 등 표준화 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다(Hong et al., 2015).

미량액체배지희석법에서 MIC의 측정은 균의 혼탁도를 육안으로 판정하기 때문에 주관적일 수 있으며 균의 증식 정도가 적을 경우 검출하기 어려울 수 있다. 이를 해결하기 위해 산화-환원 지시약인 TTC, MTT, alamar blue 등을 이용할 수 있다(Summanen et al., 1992; Mshana et al., 1998; Shin et al., 2004; Lee et al., 2007a). 위와 같은 지시약은 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소화효소(dehydrogenase)에 의한 환원 반응으로 색이 변화되어 균의 증식여부를 판단하게 된다. 이로 인해 균의 증식여부를 객관적으로 판정할 수 있고 적게 자란 경우도 검출이 용이하여 결핵(Summanen et al., 1992)이나 진균(Mshana et al., 1998)과 같이 천천히 자라거나 잘 자라지 않은 균의 MIC 측정에 일부 이용되어 왔다. 한편 대부분의 천연물은 색소를 갖

고 있어 미량액체배지희석법에서 육안으로 균의 혼탁도를 판정하기가 어려울 수 있다. 이 연구에서 사용한 상황추출물도 노란색을 띠고 있어 균의 성장이 많지 않은 경우에는 혼탁도 판정이 어려웠다. 따라서 천연물의 항균효과를 측정할 때 비색법을 이용하게 되면 이 단점을 해소할 수 있는데 이때 천연물이 갖는 색소와의 관계가 중요하다. 본 연구의 상황추출물은 옅은 노란색을 띠며 TTC는 살아있는 세포에서 옅은 핑크색으로 변하기 때문에 두 가지 색의 혼합으로 나타나는 색의 변화를 육안으로 판단하기 어려웠다(Fig. 2). 그러나 MTT는 원래 옅은 노란색을 띠는데 살아있는 세포의 환원작용에 의해 짙은 푸른색 또는 남색으로 변하므로 노란색의 상황 추출물의 색과 대비를 이루어 증식여부를 명확히 판단할 수 있었다(Fig. 2). 결국 천연물의 색소에 따라 적절한 산화-환원 지시약을 선택할 수 있으며 옅은 노란색에서 갈색을 띠는 천연물이 많기 때문에 MTT 염료를 이용하는 것이 유리할 것이다. 한편 항균제를 이용한 미량액체배지희석법에서 균의 증식여부를 판단하는데 MTT와 TTC를 이용한 방법은 육안 판독과 일치하였다. 즉 항균제와 같이 색소를 띠지 않는 물질의 항균효과에서 두 가지 비색법의 성적은 우수하였다. 다만 일부 보고에서 MTT 염료는 TTC 염료보다 균에 대한 독성이 있을 수 있다고 알려져 있으나(Rahman et al., 2004) 본 연구에서 MRSA에 대한 MTT의 독성은 미미하였다.

결론적으로 상황추출물은 MTT를 이용한 미량액체배지 회석법에 의해 MRSA에 의미 있는 항균효과를 보였으나 디스크 확산법으로는 항균효과를 보이긴 하였으나 정량적 자료를 제공할 수 없었다. 따라서 천연추출물의 항균효과 측정에는 디스크 확산법보다 미량액체배지회석법이 적절하고, 색소로 인한 미량액체배지회석법의 관독에 발생하는 문제의 해결을 위해 MTT와 같은 비색법의 적용이 유용할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

This work was supported by the KAQACL research fund of 2013 (No. 9).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001. 7: 178-182.
- The clinical and laboratory standards institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI. 2012. 32: M07-A9.
- Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 2006. 42: S25-34.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine. 2008. 15: 639-652.
- Heo YN, Lee IS, Moon HY. Antioxidant and antimicrobial activities of plum extracts. Biomed Sci Lett. 2008. 14: 1-6.
- Hong SB, Lee CH. Antimicrobial activity of *Houttuynia cordata* ethanol extract against major clinical resistant microorganisms. Korean J Clin Lab Sci. 2015. 47: 140-146.
- Hong SB, Rhee MH, Yun BS, Lim YH, Song HG, Shin KS. Synergistic anti-bacterial effects of *Phellinus baumii* ethyl acetate extracts and β -lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Lab Med. 2016. 36: 111-116.
- Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW, Yun JW. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. J Appl Microbiol. 2004. 96: 1296-1305.
- Hwang HJ, Kim SW, Lim JM, Joo JH, Kim HO, Kim HM. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci. 2005. 6: 3069-3080.
- Kamruzzaman SM, Endale M, Oh WJ, Park SC, Kim TH, Lee IK. Antiplatelet activity of *Phellinus baumii* methanol extract is mediated by cyclic AMP elevation and inhibition of collagen-activated integrin- α (IIb) β 3 and MAP kinase. Phytother Res. 2011. 25: 1596-1603.
- Kim HJ, Kim SW, Baek SA, Kim JW, Yoo M. Antibacterial activity of Puer tea extract on pathogenic microorganisms. Biomed Sci Lett. 2011. 17: 21-25.
- Kim SS. Effects of *Phellinus* spp. Extract on alcohol metabolic enzymes in alcohol-treated Rats. Biomed Sci Lett. 2016. 22: 53-59.
- Lee DD, Lee EY, Jeong SH, Chang CL. Evaluation of colorimetric broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Korean J Clin Microbiol. 2007. 10: 49-53.
- Lee Y, Kim CK, Kim M, Yong D, Lee K. Detection of *mecA* in strains with oxacillin and cefoxitin disk tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus*. Ann Lab Med. 2007. 27: 276-280.
- Lee IK, Han MS, Lee MS, Kim YS, Yun BS. Styrylpyrones from the medicinal fungus *Phellinus baumii* and their antioxidant properties. Bioorg Med Chem Lett. 2010. 20: 5459-5461.
- Lee K, Kim MN, Kim JS, Hong HL, Kang JO, Shin JH. Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study. Yonsei Med J. 2011. 52: 793-802.
- Liu IX, Durham DG, Richards RM. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* other β -lactam resistant strain of *S. aureus*. J Pharm Pharmacol. 2000. 52: 361-366.
- Mahady GB. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. Curr Pharm Des. 2005. 11: 2405-2427.
- Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1998. 36: 1214-1219.
- Noh JR, Lee IK, Ly SY, Yang KJ, Gang GT, Kim YH. A *Phellinus baumii* extract reduces obesity in high-fat diet-fed mice and absorption of triglyceride in lipid-loaded mice. J Med Food. 2011. 14: 209-218.
- Rahman M, Kuhn I, Olsson-Liljequist B, Mollby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility

- testing of gram-negative fermentative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2004, 70: 2398-2403.
- Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008. *Am J Infect Control.* 2010. 38: 95-104.
- Shimizu M, Shiota S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T. Marked potentiation of activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. 45: 3198-201.
- Shin JH, Choi JC, Lee JN, Kim HH, Lee EY, Chang CL. Evaluation of a colorimetric antifungal susceptibility test by using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 4457-4459.
- Shiota S, Shimizu M, Sugiyama J, Morita Y, Mizushima T, Tsuchiya T. Mechanisms of action of coriligan and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 2004. 48: 67-73.
- Summanen P, Wexler HM, Finegold SM. Antimicrobial susceptibility testing of *Biophila wadsworthia* by using triphenyl-tetrazolium chloride to facilitate endpoint determination. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992. 36: 1658-1664.
- Uh Y, Hwang GY, Kwon O, Yoon KJ, Kim HY. Isolation frequency of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species and *Proteus mirabilis*. *Korean J Clin Microbiol.* 2007. 10: 119-122.
- Yayeh T, Oh WJ, Park SC, Kim TH, Cho JY, Park HJ. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells. *J Nat Med.* 2012. 66: 49-54.
-