

## The Growth Inhibition Effect on the Bacterial Vaginosis Causative Bacteria by Citric Acid and Trisodium Phosphate

Nam-Woong Yang<sup>1\*</sup> and Wan-Jin Sihn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju; <sup>2</sup>Department of Alternative Complementary Medicine, Graduate School Chosun University, Gwangju Korea

Bacterial vaginosis (BV) is the most frequent vaginal disease being apt to relapse. The growth inhibition effect of the mixture of citric acid (CA) and trisodium phosphate (TSP) on BV causative bacteria and probiotics was measured. *Gardnerella vaginalis* was reduced to zero in WCCT-1 (CA 0.25% and TSP 0.55% in Wilkins-Chalgren broth),  $2.0 \times 10^4$ /ml in WCCT-2 (CA 0.5% and TSP 0.8% in WC), and  $3.3 \times 10^3$ /ml in WCCT-3 (CA 1.0% and TSP 2.6% in WC) comparing with  $1.3 \times 10^5$ /ml in WC after 48 h. *Bacteroides fragilis* was reduced to  $6.0 \times 10^3$ /ml in WCCA (CA 0.34% in WC),  $2.3 \times 10^2$ /ml in WCCT (CA 0.5% and TSP 0.2% in WC),  $7.0 \times 10^3$ /ml in WCHCl (HCl in WC) after 48 h. *Mobiluncus mulieris* was reduced to  $1.08 \times 10^4$ /ml in WCCA,  $1.03 \times 10^3$ /ml in WCCT, and 10 ea/ml in WCHCl after 48 h. *Peptostreptococcus asaccharolyticus* was completely inhibited in WCCA, WCCT, and WCHCl after 24 h. Probiotics, *Steroidobacter denitrificans* YH1 ( $3.4 \times 10^7$ /ml) and *Lactobacillus crispatus* YH2 ( $2.7 \times 10^6$ /ml), grew to  $1.25 \times 10^8$ /ml and  $2.6 \times 10^7$ /ml in MRSCA (CA 1.0% in MRS),  $1.8 \times 10^7$ /ml and  $4.6 \times 10^6$ /ml in MRSCT (CA 1.5% and TSP 0.58% in MRS),  $1.2 \times 10^8$ /ml and  $2.3 \times 10^7$ /ml in MRSHCl after 48 h, respectively. These results mean that the CA-TSP mixture can be used as the useful vaginal pH controller, growth inhibitor on BV causative bacteria, and an efficient means for settlement of probiotics.

**Key Words:** Bacterial vaginosis, Citric acid, Trisodium phosphate, Probiotics

### INTRODUCTION

세균성 질증(bacterial vaginosis)은 악취가 나는, 우유 빛의 균질한 냉, 대하를 주 증상으로 하며, 가임기 여성들에서 가장 흔한 질염으로 인생의 어느 시점에서 여성 3명 중 1명은 세균성 질증이 발병된다고 알려져 있다 (1, 2). 세균성 질증은 염증의 일반적인 징후가 없이 정상인보다 많은 악취를 풍기는 질 분비물의 증가로 인해 성

생활의 질을 떨어뜨리고, 여러 가지 산부인과적 합병증들을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다 (3). 세균성 질증의 악취는 질 내 정상 무리군들인 유산균과 비 병원성 사슬알균 같은 유산 생성 세균들이, 조건 무산소 세균인 *Gardnerella vaginalis*의 증가와 더불어 동시에 절대 무산소 세균들(*Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. etc.)로 교체되면서 발생한다 (4). 특히 조건 무산소 세균인 *G. vaginalis*는 세균성 질증 환자에서 그 수가 크게 증가하여 질 분비물

Received: May 30, 2015/ Revised: July 16, 2015/ Accepted: July 27, 2015

\*Corresponding author: Nam-Woong Yang, Department of Microbiology, College of Medicine, Chosun University, 309 Pilmun-daero Dong-gu Gwangju 501-759, Korea.

Phone: +82-62-230-6350, Fax: +82-62-232-3125, e-mail: nwyang@chosun.ac.kr

\*\*This study was supported by research fund from Chosun University, 2014.

© 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/>).

에서 특징적인 clue cell을 현미경으로 관찰할 수 있는데, 상기 절대 혐기성 세균들이 질 상피세포에 부착하여 성장하는 것을 도와서 절대 혐기성 세균들이 질 내 생태계에서 우위를 점하는데 결정적인 기여를 하는 것으로 알려져 있다 (5). 현재 세균성 질증에 사용되는 치료법은 무산소 세균에 감수성이 있는 항생제인 metronidazole 정제의 복용 혹은 metronidazole 질좌제, clindamycin 질좌제를 질 내에 삽입하여 혐기성 세균들을 억제하는 치료가 주를 이루고 있으나, 이는 질 내 이로운 정상 무리균들까지 죽이기 때문에 근본적인 대책이라고 할 수 없다. 환자 본인이 직접 투여하는 요오드 계통의 살균제는 질 내의 모든 세균의 사멸을 유도하기 때문에 마찬가지로 질 내 생태계의 파괴로 이어진다. 민간요법으로 1% 유산 용액, 초산 용액 등으로 질 내의 pH를 낮추어 건강한 여성의 질 내 pH인 4.5 이하로 유지하여 세균성 질증의 원인균들의 성장을 억제하고 정상 무리균들의 증가를 유도하거나, 썩과 질경이 등을 이용하는 40여 가지의 다양한 민간요법들이 사용되고 있으나 어느 것 하나 확실한 완치방법이 되지 못하고 있는 실정이다. 새로 시도되고 있는 치료법은 probiotics인 lactic acid 생성 세균들을 직접 환자에게 투여하는 것이다. 그러나 probiotics를 단독으로 질 내에 투여하여 질 내 세균 생태계를 바꾸는 효과는 연구자들의 주장에도 불구하고 세균성 질증 관련 세균들을 질 내 생태계에서 완전히 제거하는 효과는 뚜렷하지 않고 아직까지 제품화 되어 있지 않다. 저자는 질 내 pH를 4.5 이하로 유지할 수 있고, 세균성 질증 원인균들의 성장을 억제하면서도 Sihm 등 (6)이 분리한 probiotics인 *Steroidobacter denitrificans* YH1과 *Lactobacillus crispatus* YH2 균주들의 성장과 질 내 정착에 큰 영향을 주지 않는 성분들이 세균성 질증 완치의 새로운 수단이 될 것이라고 생각하였다. 구연산은 식품 및 의약품에서 방부제로 널리 사용되는 정균제로써, 식품 첨가물 공전에 따르면 방부제로 청량음료수 등에 0.1~0.3%, 과즙, 젤리, 잼, 빙과, 사탕 등에 1% 정도가 사용되고 있다. 제3인산나트륨은 냉장식품 진열대에서 가금류 고기의 유통 기간을 늘리기 위하여 미국 농림부의 승인 하에 1992년 이래 가금류 식품 위생 분야에서 널리 사용되고 있다. 이런 사실들에 근거하여 구연산을 단독으로 혹은 제3인산나트륨과 병합하였을 때 상기와 같은 효과를 얻을 수 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### Probiotics와 표준 균주

Sihm 등 (6)이 43세의 건강한 여성의 질에서 분리하고 한국미생물보존센터(KCCM)에서 *Steroidobacter denitrificans*와 *Lactobacillus crispatus*로 동정되어 probiotics 효과가 있는 것으로 확인된 *S. denitrificans* YH1, *L. crispatus* YH2 두 균주들과 세균성 질증의 원인 균종으로 *Gardereella vaginalis* (ATCC 14018), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Mobiluncus mulieris* (ATCC 35239), *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (KCTC 3321) 표준 균주들을 본 실험에 사용하였다.

### *G. vaginalis*의 배양을 위한 사람 적혈구 용해액의 제조

사람 농축 적혈구 혈액에 생리식염수를 넣어 냉장 원심분리기(Vision Scientific Co., VS-21SR, Seoul, Korea)에서 3,000 rpm으로 맑은 상청액이 보일 때까지 3차례 이상 원심 침적하였다. 상청액을 제거한 적혈구에 증류수를 부가하여 사람 전혈 용량으로 환원하여 혼합한 다음, 유연한 플라스틱 용기에 넣고 -80°C 냉동고에 넣어 동결시킨 후 꺼내어, 30°C 온수에서 즉시 해동하는 과정을 3회 반복하여 적혈구의 세포막이 파괴되게 유도하였다. 용혈된 적혈구 액을 다시 증류수로 2.5배 희석한 다음, 이를 냉장 원심분리기에서 15,000 rpm으로 30분 동안 원심하여 상청액만 수거하였다. 수거된 적혈구 용액은 0.45 µm Millipore 일회용 여과기로 여과 멸균하여 -80°C에서 냉동 보관하면서 필요할 때 해동하여 사용하였다 (7).

구연산과 제3인산나트륨에 의한 세균성 질증의 원인균들과 probiotics에 대한 성장 억제 효과

### *G. vaginalis*에 대한 성장 억제

성장 억제 효과를 보기 위한 액체 배지로는 Wilkins-Chalgren anaerobe broth (Oxoid, UK)에 사람 적혈구 용해액을 5% 되게 첨가한 액체 배지를 기저 배지로 사용하였다. 기저 배지에 citric acid (CA) monohydrate를 0.25%, trisodium phosphate (TSP) 12 hydrate를 0.55% 되게 넣은 배지를 WCCT-1 (pH 6.27)로, CA 0.5%, TSP를 0.8% 되게 넣은 배지는 WCCT-2 (pH 6.27)로, CA 1.0%, TSP를 2.6% 되게 넣은 배지를 WCCT-3로 약칭하였다. 대조 배지는 기저 배지(pH 6.92)를 그대로 사용하였다. 상기 배지들을

screw cap tube에 5 ml씩 분주 멸균하고, 24시간 무산소 배양한 *G. vaginalis* 배양액 0.1 ml씩 접종하고 무산소 배양하였다. 배양 후 24시간, 48시간 후의 균액 0.1 ml씩 취하여 생리식염수로 10배 계단 희석하고, 각 희석액을 0.1 ml씩 취하여 희석액 당, 사람 농축 적혈구 액 5%를 첨가한 Casman agar base (BBL, USA) 평판 3개에 도포하여 48시간 무산소 배양한 후에 집락의 수를 계수하여 평균 값을 구하는 평판도포법(spread plate method)을 시행하였다. 본 연구 전반에 걸쳐서 무산소 배양을 위해 일회용 무산소 배양기(Quick anaerosystem, Sindo Co., Gwangju, Korea)를 사용하였다 (8).

*B. fragilis*, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*에 대한 성장 억제

Wilkins-Chalgren anaerobe broth를 기저 배지로 사용하고, 기저 배지에 CA를 0.34% 되게 넣은 배지는 WCCA (pH 4.22)로, CA 0.5%, TSP를 0.2% 되게 넣은 배지는 WCCT (pH 4.22)로, 2 N HCl만 넣은 배지는 WCHCl (pH 4.22)로 약칭하였다. 대조 배지는 기저 배지(pH 6.92)를 그대로 사용하였다. 상기 배지들을 screw cap tube에 5 ml씩 분주 멸균하고, 기저 배지에서 24시간 무산소 배양한 상기 3종의 무산소 균주들의 배양액 0.1 ml씩 접종하고 무산소 배양하였다. 배양 후 24시간, 48시간 후의 균액 0.1 ml씩을 취하여 *G. vaginalis*와 동일하게 처리하여 Wilkins-Chalgren agar에서 평판도포법을 시행하였다.

*S. denitrificans* YH1와 *L. crispatus* YH2에 대한 성장 억제

MRS broth (pH 5.7)를 기저 배지로 하고, CA를 1.0% 되게 넣은 배지는 MRSCA (pH 4.2)로, CA 1.5%, TSP를 0.58% 되게 넣은 배지는 MRSCt (pH 4.2)로, 5 N HCl만 넣은 배지는 MRSHCl (pH 4.2)로 약칭하였다. 대조 배지로는 기저 배지를 사용하였다. 상기 배지들을 screw cap tube에 5 ml씩 분주 멸균하고, 기저 배지에서 24시간 무산소 배양한 YH1과 YH2 균액 0.1 ml씩 접종하고 무산소 배양하였다. 배양 후 24시간, 48시간 후의 균액들을 0.1 ml씩 취하여 *G. vaginalis*와 동일하게 처리하여 MRS agar에서 평판도포법을 시행하였다.

## RESULTS

*G. vaginalis*에 대한 성장 억제 효과

배양 24시간 후에 CA 0.25%, TSP 0.55%를 함유한

**Table 1.** Growth rate of *G. vaginalis* according to media supplements

Media	hr	24 <sup>1</sup>	48
WCCT-1 <sup>2</sup>		$6.0 \times 10^5/\text{ml}$	NG
WCCT-2 <sup>3</sup>		$4.2 \times 10^5/\text{ml}$	$2.0 \times 10^4/\text{ml}$
WCCT-3 <sup>4</sup>		$4.2 \times 10^5/\text{ml}$	$3.3 \times 10^3/\text{ml}$
Control <sup>5</sup>		$1.29 \times 10^8/\text{ml}$	$1.3 \times 10^5/\text{ml}$

1. Counts of initial bacterial inoculation are  $2.3 \times 10^6/\text{ml}$
2. WC broth containing 0.25% CA and 0.55% TSP, pH 6.27
3. WC broth containing 0.5% CA and 0.8% TSP, pH 6.27
4. WC broth containing 1% CA and 2.6% TSP, pH 6.27
5. WC broth control, pH 6.92

WCCT-1 배지는 더 많이 함유한 WCCT-2와 WCCT-3의 성장 억제 효과와 비슷하였다. 48시간 후에는 WCCT-1 배지에서는 전혀 성장하지 않았다(Table 1).

*B. fragilis*에 대한 성장 억제 효과

*B. fragilis*는 WCCA나 WCHCl 배지보다 CA 0.5%, TSP 0.2%를 혼합 함유한 WCCT 배지에서 24시간 후에  $1.6 \times 10^5/\text{ml}$ 에서 48시간 후에 균수가  $2.3 \times 10^2/\text{ml}$ 로 다른 배지에 비하여 현저히 감소하였다(Table 2).

*M. mulieris*에 대한 성장 억제 효과

*M. mulieris*는 24시간 후 WCCA에서  $7.6 \times 10^4/\text{ml}$ 이었고, 48시간 후  $1.08 \times 10^4/\text{ml}$ 로 감소하였다. WCCT에서 24시간 후  $1.5 \times 10^4/\text{ml}$ , 48시간 후  $1.03 \times 10^3/\text{ml}$ 로 WCCA보다 현저히 감소하였다. WCHCl에서는 24시간 후 30마리/ml, 48시간 후 10마리/ml로 WCCA와 WCCT보다 더 현저히 감소하였다(Table 3).

*P. asaccharolyticus*에 대한 성장 억제 효과

*P. asaccharolyticus*는 WCCA, WCCT 및 WCHCl에서 48시간 배양하였으나 전혀 성장하지 않았다. 대조 배지에서는 24시간 후  $5.5 \times 10^6/\text{ml}$ , 48시간 후  $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ 로 성장하였다(Table 4).

*S. denitrificans* YH1에 대한 성장 억제 효과

*S. denitrificans* YH1은 MRSCA에서 24시간 후, MRS 대

**Table 2.** Growth rate of *B. fragilis* according to media supplements

Media \ hr	24 <sup>1</sup>	48
WCCA <sup>2</sup>	1.6 × 10 <sup>5</sup> /ml	6.0 × 10 <sup>3</sup> /ml
WCCT <sup>3</sup>	1.3 × 10 <sup>4</sup> /ml	2.3 × 10 <sup>2</sup> /ml
WCHCI <sup>4</sup>	6.2 × 10 <sup>5</sup> /ml	7.0 × 10 <sup>3</sup> /ml
Control <sup>5</sup>	2.2 × 10 <sup>9</sup> /ml	1.4 × 10 <sup>9</sup> /ml

1. Counts of initial bacterial inoculation are 7.0 × 10<sup>8</sup>/ml
2. WC broth containing 0.34% CA, pH 4.2
3. WC broth containing 0.5% CA and 0.2% TSP, pH 4.2
4. WC broth controlled by 5 N HCl to pH 4.2
5. WC broth control, pH 6.92

**Table 3.** Growth rate of *M. mulieris* according to media supplements

Media \ hr	24 <sup>1</sup>	48
WCCA <sup>2</sup>	7.6 × 10 <sup>4</sup> /ml	1.08 × 10 <sup>4</sup> /ml
WCCT <sup>3</sup>	1.5 × 10 <sup>3</sup> /ml	1.03 × 10 <sup>3</sup> /ml
WCHCI <sup>4</sup>	30 ea/ml	10 ea/ml
Control <sup>5</sup>	3.6 × 10 <sup>8</sup> /ml	4.6 × 10 <sup>9</sup> /ml

1. Counts of initial bacterial inoculation are 3.2 × 10<sup>8</sup>/ml
2. WC broth containing 0.34% CA, pH 4.2
3. WC broth containing 0.5% CA and 0.2% TSP, pH 4.2
4. WC broth controlled by 5 N HCl to pH 4.2
5. WC broth control, pH 6.92

**Table 4.** Growth rate of *P. asaccharolyticus* according to media supplements

Media \ hr	24 <sup>1</sup>	48
WCCA <sup>3</sup>	NG <sup>2</sup>	NG
WCCT <sup>4</sup>	NG	NG
WCHCI <sup>5</sup>	NG	NG
Control <sup>6</sup>	5.5 × 10 <sup>6</sup> /ml	1.0 × 10 <sup>7</sup> /ml

1. Amounts of initial bacterial inoculation are 3.0 × 10<sup>6</sup>/ml
2. No growth
3. WC broth containing 0.34% CA, pH 4.2
4. WC broth containing 0.5% CA and 0.2% TSP, pH 4.2
5. WC broth controlled by 5 N HCl to pH 4.2
6. WC broth control, pH 6.92

**Table 5.** Growth rate of *S. denitrificans* YH1 according to media supplements

Media \ hr	24 <sup>1</sup>	48
MRSCA <sup>2</sup>	6.8 × 10 <sup>6</sup> /ml	1.25 × 10 <sup>8</sup> /ml
MRSC <sup>3</sup>	6.7 × 10 <sup>5</sup> /ml	1.8 × 10 <sup>7</sup> /ml
MRSHCI <sup>4</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup> /ml	1.2 × 10 <sup>8</sup> /ml
MRS <sup>5</sup>	1.9 × 10 <sup>8</sup> /ml	2.0 × 10 <sup>8</sup> /ml

1. Counts of initial bacterial inoculation are 3.4 × 10<sup>7</sup>/ml
2. MRS broth containing 1% CA, pH 4.2
3. MRS broth containing 1.5% CA and 0.6% TSP pH 4.2
4. MRS broth controlled to pH 4.2 by 5 N HCl
5. MRS broth control, pH 5.72

**Table 6.** Growth rate of *L. crispatus* YH2 according to media supplements

Media \ hr	24 <sup>1</sup>	48
MRSCA <sup>2</sup>	2.5 × 10 <sup>3</sup> /ml	2.6 × 10 <sup>7</sup> /ml
MRSC <sup>3</sup>	3.5 × 10 <sup>5</sup> /ml	4.6 × 10 <sup>6</sup> /ml
MRSHCI <sup>4</sup>	1.33 × 10 <sup>6</sup> /ml	2.3 × 10 <sup>7</sup> /ml
MRS <sup>5</sup>	3.0 × 10 <sup>7</sup> /ml	7.0 × 10 <sup>6</sup> /ml

1. Amounts of initial bacterial inoculation are 2.7 × 10<sup>6</sup>/ml
2. MRS broth containing 1% CA, pH 4.2
3. MRS broth containing 1.5% CA and 0.6% TSP pH 4.2
4. MRS broth controlled by 5 N HCl to pH 4.2
5. MRS broth control, pH 5.7

조 배지(pH 5.7)의 1.9 × 10<sup>8</sup>/ml에 비하여 6.8 × 10<sup>6</sup>/ml로 다소 감소하였으나, 48시간 후에 1.25 × 10<sup>8</sup>/ml로 대조 배지와 큰 차이가 없이 성장하였다. CA 1.5%, TSP 0.58%를 함유한 MRSC (pH 4.2)에서 24시간 배양 후, 6.7 × 10<sup>5</sup>/ml로 접종량인 3.4 × 10<sup>7</sup>/ml보다 크게 감소하였으나, 48시간 후에는 1.8 × 10<sup>7</sup>/ml로 접종량에 근접하게 회복되었다. MRSHCI (pH 4.2)에서는 24시간과 48시간 후, 1.2 × 10<sup>8</sup>/ml로 대조 배지와 큰 차이가 없이 성장하였다 (Table 5).

*L. crispatus* YH2에 대한 성장 억제 효과

*L. crispatus* YH2는 MRSCA에서 배양 24시간 후 접종량인 2.7 × 10<sup>6</sup>/ml보다 2.5 × 10<sup>3</sup>/ml로 현저히 감소하였으

나 48시간 후에는  $2.6 \times 10^7/\text{ml}$ 로 대조 배지와 차이 없이 성장하였다. MRSCT에서는 24시간 후,  $3.5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 접종량에 비해 다소 감소하였으나 48시간 후에  $4.6 \times 10^6/\text{ml}$ 로 접종량을 상회하여 성장하였다. MRSHC1에서는 대조 배지보다 다소 느리게 성장하였으나 48시간 후 대조 배지와 비슷하게 성장하였다(Table 6).

## DISCUSSION

세균성 질증은 세계적으로 가장 흔한 질 질환이며 조기 진통, 조기 분만 (9), 산후 자궁 내막염 (10), 불임 (11) 등과 관계가 있다고 보고되어 있다. *G. vaginalis*는 재발성 질증에서는 100% 분리되며 (11), 세균성 질증 환자의 질 내 생태계에서 가장 우위를 점하는 세균이다 (12). 본래 건강한 질에는 각 종 *Lactobacillus* spp.들과 유산 생산 사슬알균들이 생태학적 우위를 점하고 있으며, 이들이 질 내의 pH를 3.0~4.5 미만으로 유지함으로써 건강한 질 생태계를 유지하는 반면 (2), 세균성 질증에서는 유산 생성 세균(lactic acid bacteria)들이 조건 무산소 세균인 *G. vaginalis*의 증가와 더불어 절대 무산소 세균(*Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. 등)들과 *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* 등으로 균 교대가 일어나서 (2, 3, 13), 무산소 세균들이 생산하는 휘발성 물질들의 복합적인 악취가 나는 회백색의 균질한 냉, 대하가 주 증상이 되고 있다 (4). 세균성 질증의 치료에 무산소 세균용 항생제, 질 세정제, 유산 및 초산액, 기타 각종 민간요법들이 사용되고 있으나 재발이 빈번하여 세균성 질증을 완치시키는 치료법은 아직까지 개발되지 않고 있다 (6). 그 대안으로 probiotics를 이용하여 세균성 질증을 치료하려는 연구들이 이루어져왔다. Skarin 등은 *in vitro*에서 9종의 유산균들이 *Mobiluncus*, *G. vaginalis*, *Bacteroides*에 대하여 성장 억제 효과가 있음을 확인하였고 (14), Sethi 등은 과산화수소를 생산하는 유산균들이 *G. vaginalis*의 성장 억제에 더 효과가 있다고 보고하였다 (15). Atassi 등은 건강한 여성에서 분리한 *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* 및 *L. crispatus*의 배양 상청액을 *G. vaginalis*와 *Prevotella bivia*의 배양액에 첨가할 경우 각각 정도는 다르지만, 두 균의 생존율을 크게 떨어뜨릴 수 있음을 확인하였으며, 그 기작은 낮은 pH, lactic acid에 기인하는 것이 아니라, 상청액 내의 과산화수소와 단백질분해효소에 내성을 갖는 미지의 화합물에

기인하는 것이라고 Skarin 등 및 Sethi 등과 다른 견해를 제시하였다 (13). Anukam 등은 5일간 각 20명의 환자 군에게 *L. rhamnosus* GR-1과 *Lactobacillus reuteri* RC-14 건조 분말 캡슐을 질 내 투여한 군과 metronidazole gel을 투여한 군에서 전자는 18명이 후자는 11명이 치료되어 상기 두 균이 probiotics으로서 우수한 균주라고 보고하였고 (16), Saunders 등은 *in vitro* 실험에서 *G. vaginalis* biofilm의 감소 효과가 과산화수소를 생산하지 않는 *L. reuteri* RC-14와 적게 생산하는 *L. rhamnosus* GR-1이 과산화수소를 많이 생산하는 *L. crispatus* 등보다 더 크며, 이는 과산화수소나 pH가 질 내의 *G. vaginalis*를 *Lactobacillus*로 대체하는데 있어서 일차적인 요인이 아니고 더 중요한 다른 요인들에 의한다고 보고하여 Atassi 등의 견해를 지지하였다 (17). Sihn 등은 건강한 여성에서 분리한 *S. denitrificans* YH1 균주와 *L. crispatus* YH2 균주가 *G. vaginalis*, *B. fragilis*, *M. mulieris*, *P. asaccharolyticus* 등과 같은 세균성 질증 원인 균들에 대하여 상당한 성장 억제 능력이 있음을 보고하였다 (6). 상기의 여러 문헌들은 유산균 계열의 생균들 혹은 그 배양 상청액은 세균성 질증을 치료하고, *G. vaginalis*를 죽이고 질 내 정상 세균총을 회복할 수 있는 probiotic 효과가 있음을 입증하고 있다. 그러나 probiotics 단독으로 *G. vaginalis*를 질 내에서 근절시키는 결과를 보고한 연구자는 아직 없다. 최근 세균성 질증 발생의 가장 확실한 유발 요인으로 보고되는 것은 질 내 *G. vaginalis*의 수적 증가이다. *G. vaginalis*는 질 내 pH를 상승시키고 (5), 다른 세균 종들의 질 내 부착을 증가시켜 절대 무산소 세균의 수적 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다 (18). 따라서 질 내에서 *G. vaginalis*의 수적 우위를 크게 감소시키거나 아예 근절할 수 있다면, 세균성 질증의 완치를 기대할 수 있다고 생각한다. 저자는 Sihn 등이 probiotic 효과가 있는 것으로 보고한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장에 큰 영향을 주지 않으면서, 세균성 질증의 원인균들의 성장을 선택적으로 억제하고, 질 내의 pH를 4.5 미만으로 낮추는 pH 조절제로 유효하게 사용이 가능하면서도, 인체에 해롭지 않은 성분들로 세균성 질증 환자의 질을 전 처치한다면, probiotics의 질 내 정착율을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 생각하였다. 구연산은 청량음료나 과즙, 젤리, 잼, 빙과, 사탕 등의 식품이나 각 종 의약품 등에 0.1~1.0% 정도가 방부제로 사용되고 있다. Ray 등은 초산, 유산, 프로피온 산이 낮은 pH와 해리 및 비해리 산 분자들 때문에 그람 음성 세균

들에 대하여 정균 효과를 갖는다고 하였다 (19). 제3인산나트륨은 식품 진열대에서 가금류 고기의 유효 기간을 늘리기 위하여 1992년 이래 널리 사용되고 있다. Capita 등은 *L. monocytogenes*에 대하여 1.5% 농도에서 현저한 성장 억제 효과를 갖는다고 보고하였다 (20). 그 외 다수의 연구자들이 1~2%의 초산 혹은 유산 용액에 일정 시간 가금류 사체를 적시고 이어서 2~12%의 제3인산나트륨 용액에 다시 적시면 가금류 사체에 오염된 균들을 크게 제거할 수 있다고 보고하고 있다 (21). 이러한 실험적 보고들에 근거하여 본 연구에서 구연산과 제3인산나트륨을 선택하여 실험하였다. 그 결과 *G. vaginalis*의 경우 pH 6.27인 WCCT-1 배지에서 48시간 후에 균의 성장이 완전히 억제되었다. 구연산 자체는 산도가 매우 높기 때문에 구연산만 사용할 수 없고 알칼리 성분인 제3인산나트륨과 혼합하면 원하는 pH를 조성할 수 있어서 두 가지 혼합물은 이상적인 항균 및 pH 조절제로 사용할 수 있다고 생각한다. 본 실험에서 *B. fragilis*는 WCCT 배지에서 WCCA 및 WCHCl 배지, 대조 배지에 비교하여 현저히 억제되었는데 WCCT는 WCCA보다 구연산과 제3인산나트륨의 상승적 정균 효과와 낮은 pH가 함께 작용한 결과인 것으로 생각한다. *M. mulieris*는 배양 24시간 후와 48시간 후에 WCCT 배지에서 WCCA 배지보다 약 10배 정도 더 억제되었다. HCl로 pH를 낮춘 WCHCl 배지에서는 거의 완전히 억제되는 결과를 보였다. 그러나 HCl을 사람에게 사용할 수는 없으므로 구연산과 제3인산나트륨을 사용하는 것이 더 안전할 것이다. *P. asaccharolyticus*는 WCCA (pH 4.2), WCCT (pH 4.2), WCHCl (pH 4.2) 배지, 모두에서 48시간까지 완전히 억제되었는데, *P. asaccharolyticus*는 pH에 민감한 세균인 까닭으로 생각한다. Probiotics인 *S. denitrificans* YH1은 MRSCA (pH 4.2) 배지에서 24시간 후에 접종량의 20%까지 감소하였으나, 48시간 후에는 대조 배지(pH 5.7) 균 수의 63%까지 회복되었다. MRSCCT (pH 4.2) 배지에서도 24시간 후 접종량의 20%까지 감소하였으나, 48시간 후에는 접종량의 53%까지 회복되었다. MRSHCl (pH 4.2)에서는 24시간과 48시간 후 대조 배지와 큰 차이가 없이 성장하였다. *L. crispatus* YH2는 MRSCA에서 24시간 후 접종량의 0.1%로 감소하였다가 48시간 후에는 접종량의 96%까지 회복되었다. MRSCCT에서는 접종량의 13%로 감소하였다가 48시간 후에는 접종량의 170%로 회복되었다. MRSHCl에서는 대조 배지보다 다소 느리게 성장하였으나 48시간 후 대조 배지와 비슷하게 성장

하였다. 이러한 결과는 상기 probiotics들이 낮은 pH의 영향을 받기보다는, 구연산과 제3인산나트륨의 영향을 받아 초기에는 성장이 억제되지만 시간이 지남에 따라 이를 극복하는 것으로 보인다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, probiotics들을 구연산과 제3인산나트륨의 혼합물과 함께 세균성 질증의 치료에 사용하면, probiotics 단독으로 사용하는 경우보다 probiotics들이 세균성 질증 환자의 질 내에 보다 용이하게 정착할 수 있다고 생각한다. 구체적으로 말하자면, 구연산과 제3인산나트륨 혼합물의 정제 혹은 gel을 세균성 질증 환자의 질 내에 일정기간 반복 투여한 다음, *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2를 동결 건조하여 vial로 만든 후, 사용 직전에 수화하여 환자의 질 내에 투여한다면 probiotics들의 질 내 생태계 생착율이 증가하고, 궁극적으로 세균성 질증의 완치도 기대할 수 있다고 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Dawson SG, Harris JR. *Gardnerella vaginalis* and nonspecific vaginitis. Br J Hosp Med 1983;29:28-37.
- 2) Joesoef MR, Schmid G. Bacterial vaginosis. Clin Evid 2005; 13:1968-78.
- 3) Sobel JD. Bacterial vaginosis --an ecologic mystery. Ann Intern Med 1989;111:551-3.
- 4) Spiegel CA. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev 1991; 485-502.
- 5) Borchardt KA, Adly BS, Smith RF, Eapen J, Beal CB. Importance of *Gardnerella vaginalis* as an aetiological agent in bacterial vaginosis. Genitourin Med 1989;65:285.
- 6) Sihm WJ, Yang NW. The growth inhibition effect on the causative bacteria of bacterial vaginosis by bacterial strains isolated from the vagina of a healthy woman. J Bacteriol Virol 2014;44:244-51.
- 7) Yang NW, Lim Y, Sin SH. Drug-resistant profiles of clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* on Columbia agar base supplemented with human erythrocyte lysate and horse serum. Infect chemother 2003;35:86-90.
- 8) Yang NW, Kim JM, Choi GJ, Jang SJ. Development and evaluation of the quick anaero-system: A new disposable anaerobic culture system. Korean J Lab Med 2010;30:133-7.
- 9) Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, et al. Association between bacterial vaginosis

- and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The vaginal infections and prematurity study group. *N Engl J Med* 1995; 333:1737-42.
- 10) Watts DH, Eschenbach DA, Kenny GE. Early postpartum endometritis: the role of bacteria, genital *mycoplasmas*, and *Chlamydia trachomatis*. *Obstet Gynecol* 1989;73:52-60.
  - 11) Mania-Pramanik J, Kerkar SC, Salvi VS. Bacterial vaginosis: a cause of infertility? *Int J STD AIDS* 2009;20:778-81.
  - 12) Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, *et al.* High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010;115:134-40.
  - 13) Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin AL. *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48:424-32.
  - 14) Skarin A, Sylwan J. Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 1986;94:399-403.
  - 15) Sethi S, Das A, Sharma M. Inhibition of *Gardnerella vaginalis* by *lactobacilli*. *Int J Gynecol Obstet* 2006;93:158-9.
  - 16) Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect* 2006;8:2772-6.
  - 17) Saunders S, Bocking A, Challis J, Reid G. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;55:138-42.
  - 18) Machado A, Jefferson KK, Cerca N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *Int J Mol Sci* 2013;14:12004-12.
  - 19) Ray B, Sandine WE. Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. *In* B. Ray and M. Baeschel (eds). Boca Raton, FL, USA.: CRC Press, 1991.
  - 20) Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M, García-Fernández Mdel C, Moreno B. Effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes* on excised and non-excised chicken skin. *J Food Prot* 2003;66:61-4.
  - 21) Ismail SA, Dea T, Abd El-Rahman H, Yassien MA, Beuchat LR. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *Int J Food Microbiol* 2001;64:13-9.