

The Growth Inhibition Effect on the Causative Bacteria of Bacterial Vaginosis by Bacterial Strains Isolated from the Vagina of a Healthy Woman

Wan-Jin Sihn¹ and Nam-Woong Yang^{2*}

¹Department of Alternative Complementary Medicine, Graduate School Chosun University, Gwangju;

²Department of Microbiology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

Two Gram-positive rod strains isolated from the healthy vagina of a woman were tested for the possibility as probiotics. One strain was identified as *Steroidobacter denitrificans* (YH1) and the other as *Lactobacillus crispatus* (YH2) by 16S rRNA partial sequencing. The Casman agar and Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar were mixed in same quantity, supplemented with 5% human rbc lysate (CMB agar). The Wilkins-Chalgren agar and MRS agar were mixed in same quantity (WCM agar). *Gardnerella vaginalis* was cultured in Casman broth, supplemented with 5% human rbc lysate and 1,000 x-diluted with normal saline. *Bacteroides fragilis*, *Mobiluncus mulieris* and *Peptostreptococcus asaccharolyticus* were cultured in Wilkins-Chalgren anaerobe broth and 2,000x-diluted. *S. denitrificans* YH1 and *L. crispatus* YH2 were cultured in MRS broth anaerobically and 100x-diluted. The diluted suspensions of *B. fragilis*, *M. mulieris* and *P. asaccharolyticus* were inoculated on WCM agar and *G. vaginalis* on CMB agar by cotton swabs. Ten µl aliquots of YH1 and YH2 were inoculated on the center of WCM agar and CMB agar. The growth inhibition zone diameters of *B. fragilis*, *G. vaginalis*, *M. mulieris* and *P. asaccharolyticus* by YH1 were 35 mm, 35 mm, 25 mm and 60 mm. The inhibition diameters by YH2 were 25 mm, 30 mm, 20 mm and 40 mm, respectively. These results implicate that *S. denitrificans* YH1 can be the stronger probiotics for the treatment of bacterial vaginosis than *L. crispatus*, compared inhibition zone diameters by YH1 and YH2.

Key Words: Bacterial vaginosis, *Lactobacillus crispatus*, Probiotics, *Steroidobacter denitrificans*

INTRODUCTION

*Lactobacillus*는 현재 140여 종에 이르며, 미국 식품의약국에 의해서 중요한 GRAS (generally recognized as safe) food lactic acid bacteria로 인정되고 있으며 아직까지 주로 산업적인 용도로 사용되고 있다 (1). 세균성 질증은 질 내의 정상 균무리인 Lactic acid bacteria들이 *Gardnerella*

*vaginalis*와 무산소 세균들(*Mobiluncus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp. 등)로 교체되면서 무산소 세균 특유의 악취를 내는 질 분비물의 증가를 초래하는 흔한 질환이다 (2). 임상에서 세균성 질증을 치료하기 위해 metronidazole, clindamycin 등 무산소 세균에 효과적인 항생제나 요오드 계통 살균제 혹은 1% 유산용액 등을 사용하여 왔으나 완치가 어렵고 재발이 흔하여 뚜렷한 효과를 내는 약제의 개발이 아쉬운 실정이다. 이

Received: May 15, 2014/ Revised: July 22, 2014/ Accepted: July 24, 2014

*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, 2013.

©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/>).

에 새롭게 주목을 받고 있는 것은 probiotics인 유산 생균을 사용하는 방법이다 (3). 저자들은 과거에 질염을 앓은 적이 없는 건강한 질을 유지하고 있는 여성들에서 분리된 균주들이 probiotics로 사용될 수 있는 가능성을 염두에 두고, 출산 경험이 있고 병력 상 질염을 앓은 적이 없는 43세의 건강한 여성의 질에서 Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar를 사용하여 2가지 균주를 분리하였다. 이 균주들의 일반적인 배양 특성, 그람 염색성, 생화학적 성상 등을 파악하고 16S rRNA partial sequencing을 이용하여 동정한 다음, 이 균주들이 세균성 질증에서 흔히 분리되는 균종들 중에서 대표적인 4가지 표준 균주들에 대하여 성장 억제 효과를 나타내는지 알기 위하여 항생제 원판 확산법과 혼합 액체 배양법을 원용하여 실험하였다.

MATERIALS AND METHODS

건강한 여성에서 실험 균주의 분리

세균성 질증의 진단 기준인, Amsel's composite clinical criteria (4)와 Yang 등 (5)의 결과를 적용하여 세균성 질증이 없는 것으로 확인된 43세의 건강한 여성의 질에서 채취한 샘플을 MRS agar (MERCK, Germany)에 접종하고 5% 이산화탄소와 함께 일회용 무산소 배양기(Quick anaerobiosystem, Sindo Co., Gwangju, Korea)에서 48시간 무산소 배양을 하였다 (6).

분리된 균주들의 분자생물학적 동정

분리된 균주들을 무산소 상태로 한국미생물보존센터(KCCM)에 보내어 16S rRNA partial sequencing을 의뢰한 결과, 각각 *Steroidobacter denitrificans*와 *Lactobacillus crispatus*로 동정되었다(Gene Bank Data homology search results: 99%). 상기 균주들을 분리한 여성의 이름을 사용하여, 잠정적으로 전자는 *S. denitrificans* YH1, 후자는 *L. crispatus* YH2로 명명하였다. 분리 균주의 16S rRNA partial sequencing은 다음과 같은 방법으로 실행하였다. 상기 균주들의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용해 분리한 다음, 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGT-TTGATCATGGCTCAG-3') primer를 사용하여 MyCycler Thermal Cycler system (Bio-Rad)을 이용해 PCR 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega)을 이용하여 정제하였고, 정제된 산물은

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kits (Applied Biosystems Co.)를 사용하여 ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type)를 통해 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 BLASTN program을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 6 program을 이용하여 비교 분석하였다.

분리된 균주들의 생화학적 성상

분리된 두 균주를 대상으로 API 50 CHL kit (BIOMÉRIUX, France) 시험을 실시하였다(Table 1, 2). *S. denitrificans* YH1에 대하여 효소 활성 상태를 알기 위하여 API ZYM kit (BIOMÉRIUX, FRANCE) 시험을 추가로 실시하였다(Table 3). 두 균주 모두 무산소 상태에서 배양하였다.

사람 적혈구 용해액의 제조

농축 적혈구 혈액에 생리식염수를 첨가하여 이것을 냉장 원심분리기(Vision Scientific Co., VS-21SR, Seoul, Korea)에서 3,000 rpm으로 3차례 원침하여 세척한 다음, 상청액을 제거한 적혈구에 증류수를 부가하여 사람 전혈 용량으로 환원하였다. 이 적혈구 액을 유연한 플라스틱 용기에 넣고 -80℃ 냉동고에 30분 동안 동결하고 다시 꺼내어 즉시 해동하는 과정을 3회 반복하였다. 용혈된 적혈구 액을 다시 증류수로 2.5배 희석한 다음, 이를 냉장 원심분리기에서 15,000 rpm으로 원침하여 상청액만 수합하고 0.45 µm Millipore 일회용 여과기로 여과 멸균하여 -80℃에서 냉동 보관하면서 필요할 때 해동하여 사용하였다 (7).

실험에 사용된 세균성 질증의 원인 균주들

분리된 두 세균의 probiotics 효과측정은 *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Mobiluncus mulieris* (ATCC 35239), *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (KCTC 3321) 균주를 사용하여 측정하였다.

*G. vaginalis*에 대한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장 억제 효과

Casman agar base (BBL, USA)와 MRS agar를 동량 혼합하고 사람 적혈구 용해액을 5% 첨가하여 pH를 6.3으로 조정하고 이 배지를 CMB medium이라고 약칭하였다.

사람 적혈구 용해액 5%를 첨가한 Casman broth (BBL)에서 5% 이산화탄소와 함께 48시간 무산소 배양한 *G. vaginalis*를 생리식염수로 1,000배 희석한 균액을 만들었다. 동시에 MRS broth (MERCK)에서 24시간 무산소 배양한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2를 생리식염수로 100배 희석한 균액을 만들었다. *G. vaginalis*의 희석 균액을 면봉으로 취하여 CMB agar 평판들에 도포 접종하였다. 이어서 그 위에 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 희석 균액 10 μ l씩을 평판들 정 중앙에 각각 투하 접종하였다.

B. fragilis, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*에 대한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장 억제 효과

Wilkins-Chalgren agar (DIFCO, USA)와 MRS agar를 동량 혼합하고 pH를 6.3으로 조정하여 이 배지를 WCM medium이라고 약칭하였다. Wilkins-Chalgren anaerobe broth (OXOID, England)에서 48시간 무산소 배양한 *B. fragilis*, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*를 생리식염수로 2,000배 희석한 균액을 만들었다. 동시에 상기와 동일하게 배양한

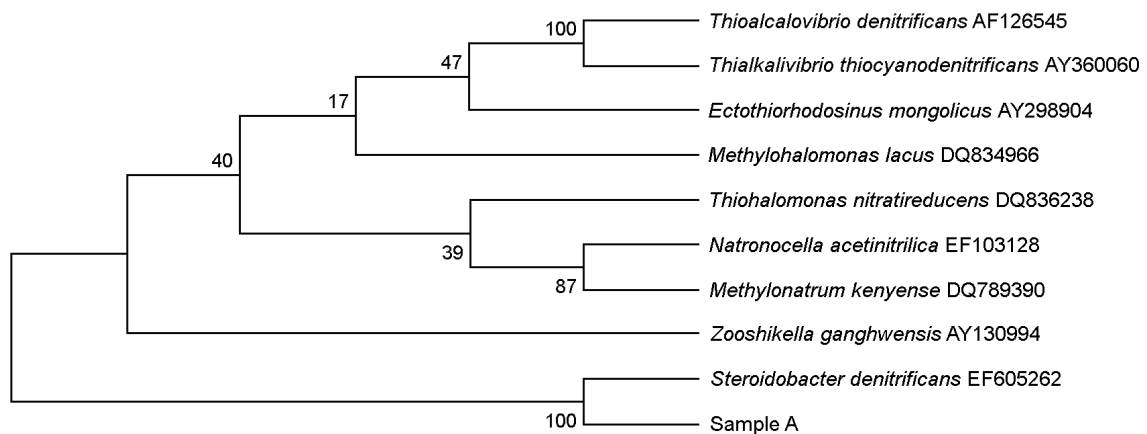


Figure 1. Sample A shows the 99% similarity to *Steroidobacter denitrificans* accession No. EF605262 in the unrooted neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence comparison.

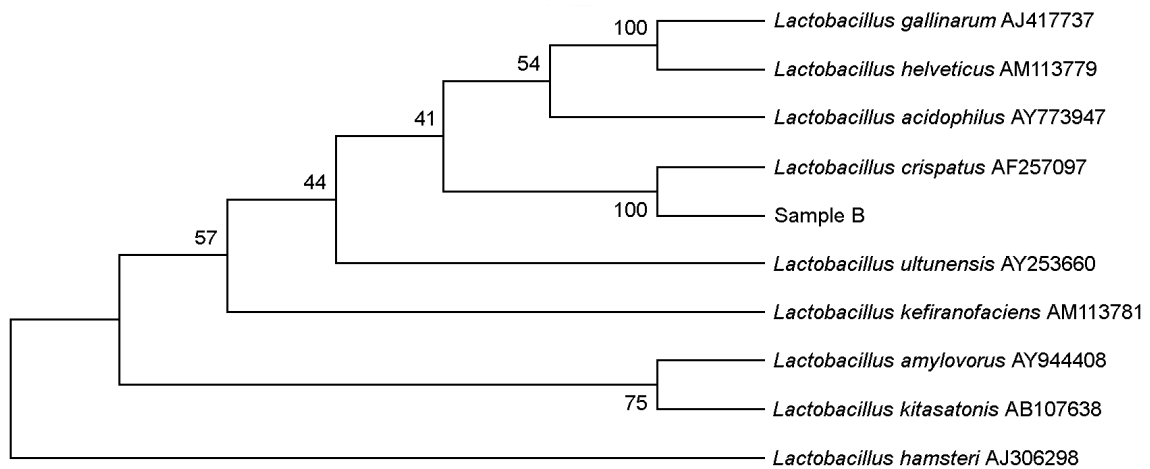


Figure 2. Sample B shows the 99% similarity to *Lactobacillus crispatus* accession No. AF257097 in the unrooted neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence comparison.

Table 1. Carbohydrate biochemical test results of *L. crispatus* YH2 by API CHL kit

<i>Lactobacillus crispatus</i> YH2			<i>Lactobacillus crispatus</i> YH2		
No		API CHL	No		API CHL
0	Control	–	25	Esculine	+
1	Glycerol	–	26	Salicine	–
2	Erythritol	–	27	Cellobiose	–
3	D-Arabinose	–	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	–	29	Lactose	+
5	Ribose	–	30	Melibiose	–
6	D-Xylose	–	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	–	32	Trehalose	–
8	Adonitol	–	33	Inuline	–
9	β-Methyl-xyloside	–	34	Melezitose	–
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	–
11	D-Glucose	+	36	Amidon	–
12	D-Fructose	+	37	Glycogen	+
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	–
14	L-sorbose	–	39	β-Gentiobiose	–
15	Rhamnose	–	40	D-Turanose	–
16	Dulcitol	–	41	D-Lyxose	–
17	Inositol	–	42	D-Tagatose	–
18	Mannitol	–	43	D-Fucose	–
19	Sorbitol	–	44	L-Fucose	–
20	α-ethyl-D-mannoside	–	45	D-Arabitol	–
21	α-Methyl-D-glucoside	–	46	L-Arabitol	–
22	N-acetyl glucosamine	+	47	Gluconate	–
23	Amygdaline	–	48	2-Keto-gluconate	–
24	Arbutine	–	49	5-Keto-gluconate	–

S. denitrificans YH1과 *L. crispatus* YH2를 생리식염수로 100배 희석한 균액을 만들었다. *B. fragilis*, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*의 희석 균액들을 면봉으로 취하여 WCM agar 평판들에 도포 접종하고 그 위에 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 희석 균액 10 µl씩을 평판들 정 중앙에 각각 투하 접종하고 48시간 무산소 배양을 하였다. 각 균주에 대하여 평판 3개를 사용하였다.

*G. vaginalis*를 *S. denitrificans* YH1 및 *L. crispatus* YH2와 혼합 액체 배양

2개의 CMB broth에 희석하지 않은 *G. vaginalis* 배양 원액 100 µl와 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 배양 원액 20 µl를 각각 48시간 혼합 무산소 배양한 후, 자동 피펫으로 100 µl씩 취하여 *G. vaginalis*를 분리하기 위하여 Casman's blood agar에 선상 도말하고, *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2를 분리하기 위하여 MRS agar에

선상 도달한 다음, 5% 이산화탄소와 함께 48시간 무산소 배양을 하였다.

RESULTS

건강한 여성의 질에서 분리된 균주들의 동정 결과

세균성 질증이나 다른 성인성 질환이 없는 43세 여성의 질에서 모양과 크기가 다른 2가지 집락이 분리되어 그람 염색을 시행한 결과, 둘 다 그람 양성 막대균이었으

며 두 균주의 현미경상 형태는 서로 달랐다. 분리된 두 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)에 보내어 16S rRNA partial sequencing에 의해서 각각 *Steroidobacter denitrificans* (Fig. 1)와 *Lactobacillus crispatus* (Fig. 2)로 동정되었으며 (Gene Bank Data homology search results: 99%), 분리한 여성 이름의 약자를 사용하여 잠정적으로 전자는 *S. denitrificans* YH1으로, 후자는 *L. crispatus* YH2로 균주들의 명칭을 정하였다. 두 균주들은 무산소 상태에서 최적 성장을 하였으며, 5~10% 산소의 존재 하에서도 성장을 하였으나 무

Table 2. Carbohydrate biochemical test results of *S. denitrificans* YH1 by API CHL kit

<i>Steroidobacter denitrificans</i>			<i>Steroidobacter denitrificans</i>		
No		YH1	No		YH1
API CHL			API CHL		
0	Control	–	25	Esculine	+
1	Glycerol	–	26	Salicine	+
2	Erythritol	–	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	–	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	–	29	Lactose	+
5	Ribose	–	30	Melibiose	–
6	D-Xylose	–	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	–	32	Trehalose	+
8	Adonitol	–	33	Inuline	–
9	β-Methyl-xyloside	–	34	Melezitose	–
10	Galactose	+	35	D-Raffinose	–
11	D-Glucose	+	36	Amidon	+
12	D-Fructose	+	37	Glycogen	+
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	–
14	L-sorbose	–	39	β-Gentiobiose	–
15	Rhamnose	–	40	D-Turanose	–
16	Dulcitol	–	41	D-Lyxose	–
17	Inositol	–	42	D-Tagatose	–
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	–
19	Sorbitol	–	44	L-Fucose	–
20	α-ethyl-D-mannoside	–	45	D-Arabitol	–
21	α-Methyl-D-glucoside	–	46	L-Arabitol	–
22	N-acetyl glucosamine	+	47	Gluconate	–
23	Amygdaline	–	48	2-Keto-gluconate	–
24	Arbutine	–	49	5-Keto-gluconate	–

산소 상태보다는 느리게 성장하였다. 두 균주는 최적 성장에 이산화탄소를 필요로 하지는 않았으며, 5% 저산소 상태에서 냉장 보관하였을 경우, 5일 후에 균 수가 감소하여 12일 후에는 모두 사멸하였다. 반면에 무산소 상태에서 냉장 보관하였을 경우, 24일 후까지도 균 수의 감소가 없었다. 이러한 결과로 미루어 두 균주는 호무산소, 내기성, 비호이산화탄소 상태에서 성장하는 균주들임을 알 수 있었다.

S. denitrificans YH1과 *L. crispatus* YH2의 생화학적 검사 결과

API CHL kit 검사에서 *S. denitrificans*는 galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, N-acetyl glucosamine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, lactose, saccharose, trehalose, amidon, glycogen을 가수분해 하였으며, *L. crispatus*는 galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetyl glucosamine, esculine, maltose, Lactose, saccharose, glycogen을 가수분해 하였으나 salicine, cellobiose, trehalose, amidon은 분해하지 못하였다(Table 1, 2). API zym kit 효소활성 검사에서 *S. denitrificans*는 alkaline phosphatase, trypsin, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase가 활성을 나타내었다(Table 3).

세균성 질증 원인균들에 대한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장 억제 효과

S. denitrificans YH1의 *B. fragilis*, *G. vaginalis*, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*에 대한 평판 3개의 억제대의 크기를 평균한 결과, 각각 35 mm, 35 mm, 25 mm, 60 mm 이었다(Fig. 3). *L. crispatus* YH2의 *B. fragilis*, *G. vaginalis*, *M. mulieris* 및 *P. asaccharolyticus*에 대한 평판 3개의 억제대의 크기를 평균한 결과 각각 25 mm, 30 mm, 20 mm, 40 mm 이었다(Fig. 4).

S. denitrificans YH1과 *L. crispatus* YH2를 *G. vaginalis*와 각각 혼합 액체 배양

*G. vaginalis*와 *S. denitrificans* YH1을 CMB broth에 혼합 배양한 후, 전상 도말법에 의해서 Casman's blood agar에서 *G. vaginalis*를 분리 배양하였으나 *G. vaginalis*의 집락은 전혀 분리되지 않았고, MRS agar에서는 *S. denitrificans* YH1이 대량으로 배양되었다. *G. vaginalis*와 *L. crispatus* YH2를 CMB broth에 혼합 배양한 후, 동일한 방법으로

Table 3. Enzyme activity results of *Steroidobacter denitrificans* YH1 by API ZYM kit

No	Analysis items	Results
0	Control	-
1	Alkaline phosphatase	+
2	Esterase (C4)	-
3	Esterase Lipase (C8)	-
4	Lipase (C14)	-
5	Leucine arylamidase	-
6	Valine arylamidase	-
7	Crystine arylamidase	-
8	Trypsin	+
9	α -chymotrypsin	-
10	Acid phosphatase	-
11	Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	-
12	α -galactosidase	-
13	β -galactosidase	+
14	β -glucuronidase	-
15	α -glucosidase	+
16	β -glucosidase	+
17	N-acetyl- β -glucosaminidase	-
18	α -mannosidase	-
19	α -fucosidase	-

분리 배양하였으나, 마찬가지로 *G. vaginalis*의 집락은 전혀 분리되지 않았으며, MRS agar에서 *L. crispatus* YH2가 대량으로 배양되었다.

DISCUSSION

세균성 질증은 질 내의 유산 생산 균들이 감소 또는 사멸하고 조건 무산소 혹은 절대 무산소 세균들이 생태학적 우위를 점하여서 오는 현대 여성들의 가장 흔한 질환이다 (8). 세균성 질증을 유발하는 유인들에 대해서는 논란이 많으나 조건 무산소 균인 *G. vaginalis*의 증가로 인하여 질 내 pH의 상승에 따른 절대 무산소 세균의 증가 유발이 주된 이유라고 하였다 (9). 최근에는 *L. crispatus*가 biofilm에 이미 부착되어 있는 상태에서도 세균성 질증 관련 균종들 중에서 *G. vaginalis*가 가장 큰 부

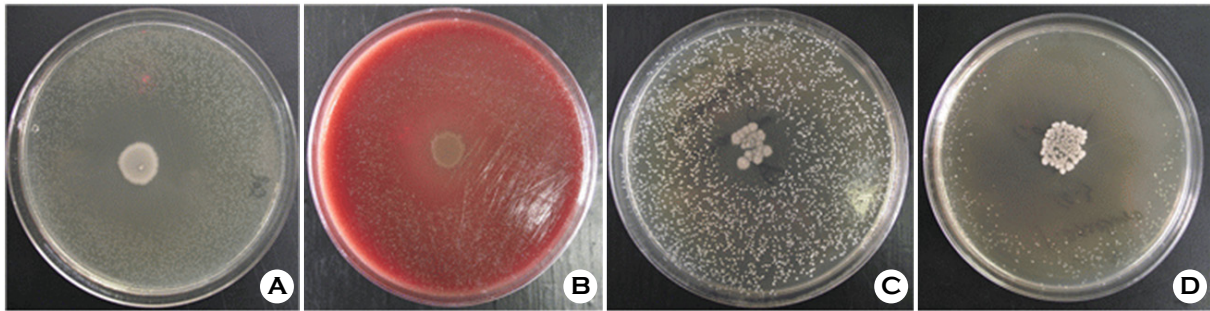


Figure 3. Growth inhibition zones by *S. denitrificans* YH1. A, B, C, and D is *B. fragilis*, *G. vaginalis*, *M. mulieris*, and *P. asaccharolyticus* in regular order.

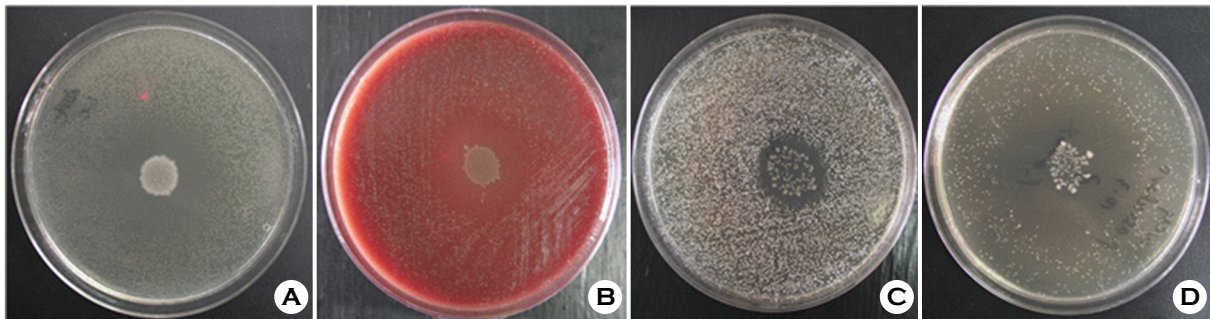


Figure 4. Growth inhibition zones by *L. crispatus* YH2. A, B, C, and D is *B. fragilis*, *G. vaginalis*, *M. mulieris*, and *P. asaccharolyticus* in regular order.

착 능력을 갖고 있으며, 다른 세균성 질증 관련 균종들의 부착을 증진시킨다는 사실이 입증되었다 (10). 이와 같이 *G. vaginalis*가 세균성 질증의 중요한 유인이라는 사실은 여러 연구자들의 보고들에 의하여 거의 확실시 되고 있다. 따라서 세균성 질증의 치료를 위해서는 *G. vaginalis*의 수적 우위를 감소시켜서 세균성 질증 관련 균종들의 증가를 억제하고, 세균성 질증 관련 균종들을 직접 선택적으로 억제하는 probiotics의 개발이 세균성 질증의 궁극적인 치료 방법이라는 것을 시사하고 있다. *G. vaginalis*는 과거에 *Hemophilus vaginalis*로 명명된 적이 있는 호혈성 박테리아로 최적 성장을 위해서는 혈액이 필요하다. 그러나 액체 배양의 경우에는 적혈구 자체를 사용하면 배양액의 혼탁도를 관찰하기 어렵고 균의 회석 등에서 불편하기 때문에 적혈구 용해액을 사용하는 것이 편리하다. 따라서 본 연구는 저자의 이전 보고의 방법으로 적혈구 용해액을 제조하여 일관되게 사용하였다 (7). 현재 임상에서 세균성 질증을 치료하기 위해 주로 사용하는 방법

은 여전히 무산소 세균에 효과적인 항생제를 질좌제 형태로 처방하거나, 살균소독제 혹은 질 내 pH를 증가시키기 위해 1% 유산용액을 처방하는 정도에 머무르고 있다. 세균성 질증을 치료하기 위하여 항생제를 사용하는 것은 세균성 질증 관련 균종들의 항생제 내성을 증가시킬 뿐, 근본적인 완치를 기대하기 어렵기 때문에 바람직하지 않다고 생각한다. 또한 지역 약국에서 쉽게 구입하여 자가 치료하는 요오드 화합물 계열의 살균제는 유익한 균까지 모두 사멸시킨다는 점에서 역시 바람직하지 않다. 2003년의 보고에 의하면 *G. vaginalis*에 대한 clindamycin의 MIC 평균은 0.16 µg/ml로 감수성이 있었으나, metronidazole의 MIC 평균은 25.8 µg/ml로 높은 내성을 보였다 (7). 현재 *G. vaginalis*와 무산소 세균들에 대한 두 항생제의 내성은 더 증가하였을 것으로 생각한다. 따라서 세균성 질증의 치료를 위해서는 *G. vaginalis*의 수적 우위를 감소시켜서 세균성 질증 관련 균종들의 증가를 억제하고, 이들 균종을 직접 선택적으로 억제하는 probiotics의 개발이 세균성

질증의 궁극적인 치료 방법이라는 것을 시사하고 있다. 이러한 시도의 예로 여성의 질에서 분리된 *L. crispatus*가 질 내 정상 무리균을 회복하여 세균성 질증을 치료할 수 있다고 보고된 바 있다 (11). Antonio 등은 과산화수소를 생산하는 *L. crispatus*, *L. jensenii*와 *L. gasseri* 중에서 세균성 질증을 예방하는 균은 *L. crispatus*이며 과산화수소의 생산 능력과 무관한 다른 요인들에 의한 것이라는 견해를 보고하였다 (3). 본 연구에서 분리한 *L. crispatus* YH2도 세균성 질증 관련 세균 종들의 성장을 억제시킨다는 사실을 확인하였다(Fig. 4). 한편 동시에 분리된 *S. denitrificans* YH1의 세균성 질증 관련 세균 종들에 대한 성장 억제 능력은 *L. crispatus* YH2보다 더 우세하였다. *S. denitrificans*는 자연 생태계에 버려지는 스테로이드 화합물들에 의한 환경오염이 동물들의 내분비계를 교란하여 생태계에 큰 위협이 되고 있다는 생태학적 연구들로 인하여 새롭게 주목을 받게 되었다. 스테로이드 화합물을 생태계에서 제거하는 여러 세균 종들이 발견되었으며 그 중에서 denitrifying γ -proteobacterium이 새로운 속과 종의 지위를 받아 *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov.로 명명되었다 (12). *S. denitrificans*는 특히 무산소 상태에서 testosterone 및 그와 관련된 steroid 호르몬들을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있다는 사실이 보고되었다 (13, 14). 저자들에 의하여 분리된 *S. denitrificans* YH1이 testosterone의 무산소 분해와 어떤 관계가 있는지는 현재로서는 알 수 없으나 세균성 질증 관련 세균 종들에 대하여 강력한 성장 억제 효과를 나타낸다는 사실은 분명하다(Fig. 3). *S. denitrificans* YH1의 이러한 효과에 대해서 향후 더 구체적인 연구가 필요하지만, *S. denitrificans* YH1이 *L. crispatus* YH2보다 세균성 질증의 치료에 더 효과적인 probiotics로 활용될 가능성이 있다는 사실은 분명하다고 생각한다.

REFERENCES

- 1) Singh S, Goswami P, Singh R, Heller KJ. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Lwt-Food Sci Tech* 2009;42:448-57.
- 2) Joesoef MR, Schmid G. Bacterial vaginosis. *Clin Evid* 2005; 13:1968-78.
- 3) Antonio M, Petrina M, Meyn L, Hillier S. *Lactobacillus crispatus* colonisation reduces risk of bacterial vaginosis (BV) acquisition. *Sex Transm Infect* 2011;87:A304-5.
- 4) Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22.
- 5) Yang NW, Sin SH, Chang JS. Diagnosis of bacterial vaginosis with relation to isolation of *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol Virol* 2002;32:109-14.
- 6) 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.
- 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) Dawson SG, Harris JR. *Gardnerella vaginalis* and nonspecific vaginitis. *Br J Hosp Med* 1983;29:28-37.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Chang CE, Kim SC, So JS, Yun HS. Cultivation of *Lactobacillus crispatus* KLB46 isolated from human vagina. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2001;6:128-32.
- 12) Fahrback M, Kuever J, Remesch M, Huber BE, Kämpfer P, Dott W, et al. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading γ -proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:2215-23.
- 13) Chiang YR, Fang JY, Ismail W, Wang PH. Initial steps in anoxic testosterone degradation by *Steroidobacter denitrificans*. *Microbiology* 2010;156:2253-9.
- 14) Wang PH, Leu YL, Ismail W, Tang SL, Tsai CY, Chen HJ, et al. Anaerobic and aerobic cleavage of the steroid core ring structure by *Steroidobacter denitrificans*. *J Lipid Res* 2013;54: 1493-504.