

## Прогнозирование сохранности клинически значимых коллекционных культур дрожжей на примере *Malassezia*

В. Г. Арзуманян\*, Т. И. Кабаева\*\*, О. В. Шелемех\*

\*ГУ НИИ Вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова РАМН

\*\*ГУ ЦНИ Кожно–венерологический институт им.Короленко МЗ РФ

## Integrity Forecast for Clinical Yeasts Collection Cultures by Example of *Malassezia* spp.

V. Arzumanian\*, T. Kabaeva\*\*, O. Shelemekh\*

\*Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

\*\*Korolenko Research Dermato–venerological Institute, Moscow

### Аннотация

В связи с расширением спектра оппортунистических дрожжевых грибов востребованы их типовые коллекционные штаммы. Дрожжи рода *Malassezia* имеют мировую репутацию плохо сохраняемых в сухом и замороженном виде. Проведена оценка физиологического состояния штаммов дрожжей в процессе роста и после высушивания. Показано, что даже активно растущие популяции дрожжей содержат до 47% мертвых клеток. Установлена корреляция между скоростью дыхания и содержанием живых клеток в культурах *Malassezia* разного возраста и вида ( $r=0,971$ ). Выявлена взаимосвязь между скоростью отмирания клеток в растущей популяции и скоростью их отмирания в сухом состоянии ( $r=0,896$ ). Предварительное определение доли живых клеток перед лиофилизацией дает возможность прогнозировать сохранение жизнеспособности культуры в коллекции. Для коллекционирования дрожжей рода *Malassezia* целесообразно использовать 24–48 часовые культуры, содержащие не менее 50% жизнеспособных клеток.

### Ключевые слова

Дрожжи, коллекционные культуры, жизнеспособность, *Malassezia*.

### Введение

В качестве одного из доминирующих компонентов микрофлоры кожных покровов человека дрожжи рода *Malassezia* (*Pityrosporum*) участвуют во многих патологических процессах, связанных со следующими нозологиями — пестрый лишай, себоррейный и атопический дерматит, фолликулит, и ранее считались безусловными их возбудителями [1]. Интерес к *Malassezia* в настоящее время у большинства клиницистов обусловлен социальной дезадаптацией у таких пациентов, в

### Summary

Owing to increase number of opportunistic yeast their type strains are now required. Among other yeasts the *Malassezia* spp. are reputed as bad preserved in different world collections. Evaluation of physiological status was done some yeast strains during growth and after lyophilization. Even actively growing populations have shown to contain up to 47% of dead cells. A correlation was found out between respiration rates and part of alive cells in *Malassezia* cultures of different species and age ( $r=0,971$ ). An interdependence was detected between cells death rates in growing and lyophilized cultures ( $r=0,896$ ). The preliminary counting of alive cells part in culture to be collect must assure a forecast of viability during conservation. For *Malassezia* spp. collection 24–48 hours age cultures are mostly appropriate, which consist more than 50% of alive cells.

### Keywords

Yeast, collection, integrity, viability, *Malassezia*.

связи с чем необходимо проведение исследований по выделению и идентификации *Malassezia*, и востребованы типовые штаммы этих дрожжей из коллекций. У нас в стране типовые культуры *Malassezia* пока имеются лишь в коллекции НИИВС им.Мечникова РАМН. В течение 8 лет исследования свойств *Malassezia* нам пришлось неоднократно сталкиваться с проблемой сохранности штаммов этих дрожжей: оказалось, что изоляты *Malassezia* отличаются низкой жизнеспособностью как при периодических пересевах, так и при

хранении в замороженном и лиофилизированном состоянии. При обмене опытом с зарубежными коллегами из национальных коллекций микроорганизмов NCAIM (Венгрия), CBS (Голландия) и JSM (Япония) наличие этой проблемы именно в отношении *Malassezia* подтвердилось. Многие коллекции в связи с указанными трудностями либо потеряли часть культур, либо вынуждены затрачивать дополнительное время и средства на еженедельные пересевы.

Целью настоящей работы явилась попытка составления прогноза сохранности коллекционных культур *Malassezia* на основе изучения их физиологических показателей в процессе старения.

### Материалы и методы

В работе использованы штаммы клинически значимых дрожжей коллекции НИИ Вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН. Пассирование культур нелипофильных дрожжей проводили на среде ГПД [2], а липофильных дрожжей рода *Malassezia* — на модифицированной среде Диксона [3].

Оценку относительного количества живых клеток (КЖК) в культурах дрожжей проводили путем окрашивания клеток бромкрезоловым пурпурным, проникающим через поры в цитоплазматической мембране нежизнеспособных клеток [4]. Раствором красителя 2 мМ в 0,5 М калий-фосфатном буфере рН 4,6 обрабатывали суспензии дрожжей в течение 1 часа при 32°C, затем центрифугировали их в течение 10 минут с угловой скоростью 3000 об/мин и микроскопировали полученный осадок клеток при 1750-кратном увеличении. Расчет КЖК (%) проводили по формуле:

$$\text{КЖК} = \text{H} * 100 / (\text{H} + \text{O}),$$

где O — число окрашенных (мертвых) клеток,  
H — число неокрашенных (живых) клеток.

Скорость дыхания культур *Malassezia* измеряли амперометрическим методом на полярографе LP-7 (Чехословакия) в ячейке Кларка с хлорсеребряным и платиновым электродами объемом 2 мл [5]. Суспензии клеток дрожжей готовили непосредственно перед измерением. Измерение проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере рН 6,5, содержащем 1% бычьей желчи, 1% Tween 40, 0,1% аспарагина. Скорость потребления кислорода выражали в нг-атомах O/мин\*ед.ОП (оптической плотности).

Скорость отмирания клеток в растущей культуре определяли следующим образом: в 2 суточной культуре, выращенной на агаризованной среде mD, определяли КЖК, затем дорастивали её в тех же условиях до 7 суток и вновь оценивали КЖК. Затем рассчитывали скорость отмирания V<sup>1</sup> по формуле:

$$V^1 = (\text{КЖК}_{\text{исх}} - \text{КЖК}_{\text{конеч}}) * 100 / (\text{КЖК}_{\text{исх}} * 5),$$

где КЖК<sub>исх</sub> — процент живых клеток в 2 суточной культуре,  
КЖК<sub>конеч</sub> — процент живых клеток в 7 суточной культуре.

Скорость отмирания клеток в лиофилизированной культуре определяли так: 2 суточную культуру, выращенную на плотной среде mD, суспендировали в инозитно-молочной смеси [6], вносили в стеклянные ампулы по 1 мл и лиофильно высушивали. Оценку количества живых клеток в популяции на следующий день после сушки и через 9 месяцев проводили путем 10-кратных разведений и высева на агаровую среду mD. Расчет скорости отмирания V<sup>2</sup> проводили по формуле:

$$V^2 = (\text{КОЕ}_{\text{исх}} - \text{КОЕ}_{\text{конеч}}) * 100 / (\text{КОЕ}_{\text{исх}} * 9),$$

где КОЕ<sub>исх</sub> — число колониеобразующих единиц в наиболее удачном разведении (т.е. 10–50 колоний) свежесушенной культуры;

КОЕ<sub>конеч</sub> — число колониеобразующих единиц культуры, хранившейся 9 месяцев, в том же по счету разведении, что и соответствующее КОЕ<sub>исх</sub>.

### Результаты и обсуждение

Традиционным способом консервации коллекционных культур дрожжей является их лиофильное высушивание. Как правило, для этого используются выращенные на плотных средах 48 — 120 часовые культуры, которые расцениваются как молодые [6, 7, 8]. При этом предельные сроки хранения дрожжевых культур находятся в пределах от 2 до 6 лет. Показателем физиологической активности культур, наряду со скоростью роста и дыхания, является количество живых клеток в популяции [9]. В таблице 1 представлены данные по КЖК в популяциях клинически значимых дрожжей некоторых видов/родов, выращенных на полноценных плотных питательных средах до конца экспоненциальной фазы. Для большинства представленных видов это 18–24 часа инкубации при 32°С, а для *M. globosa* — 43–48 часов.

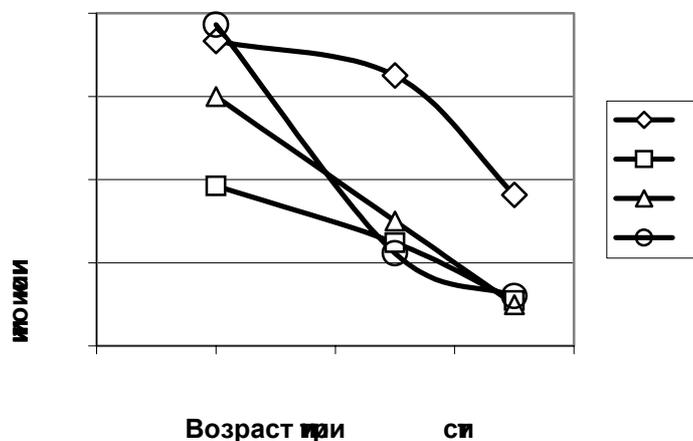
Как видно из табл. 1 к указанному возрасту активно растущие популяции дрожжей содержат до 47% мертвых клеток. Очевидно, что в более старых культурах (фазы замедления роста и стационарной фазы) число жизнеспособных особей еще ниже.

Оценка снижения КЖК в популяциях 4 штаммов дрожжей *M. sympodialis* представлена на рис. 1. Данный показатель в течение последующих 5 суток после фазы активного роста снижался в 4 — 7,5 раз, что подтверждает наличие обратной зависимости между возрастом культуры и процентом живых клеток. Таким образом, использование 48–120 часовых культур *Malassezia*, а возможно и прочих дрожжей, для коллекционирования заведомо нецелесообразно, поскольку снижает вероятность их успешного хранения и последующего использования.

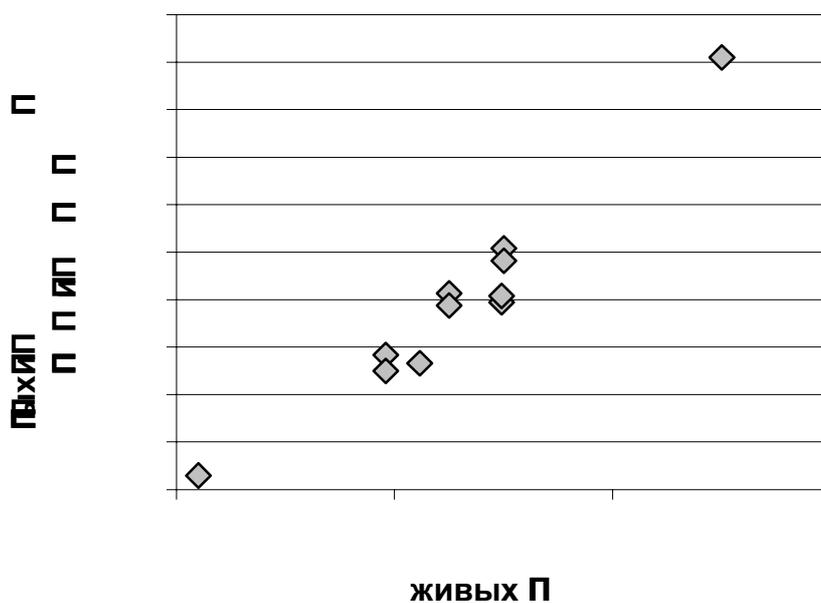
Нами были оценены примерный возраст клеток *M. sympodialis* N2 и N4, полученных путем смыва непосредственно с кожи соответствующих носителей. Интересно отметить, что КЖК в изоляте N2 составило 23,1%, что соответствует возрасту данной культуры примерно 8 суток при выращивании на агаризованной среде, а в изоляте N4 — 46,2%, т.е. около 3 суток (см. рис. 1). Можно

**Таблица 1**  
**Жизнеспособность клеток дрожжей в активно растущих культурах**

Род / Вид дрожжей	КЖК в культуре конца экспоненциальной фазы — начала замедления роста, %
<i>Candida albicans</i> N 1135	95.6 ± 0.7
<i>Geotrichum sp.</i> N 1206	79.1 ± 2.3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> N 132	87,4 ± 4.0
<i>Cryptococcus albidus</i> N 975	64.3 ± 1.7
<i>Trichosporon ovoides</i> N 18	52.9 ± 0.9
<i>Malassezia furfur</i> N 607	67.9 ± 1.5
<i>Malassezia globosa</i> N VS	69.5 ± 0.7



**Рис. 1.** Снижение жизнеспособности популяций *M. sympodialis* в процессе культивирования на плотной среде mD (2,3,4 и 5 – номера штаммов).



**Рис. 2.** Взаимосвязь между скоростью дыхания и содержанием живых клеток в культурах *Malassezia* разного возраста и вида.

Таблица 2

Взаимосвязь между скоростью отмирания клеток в растущей и лиофилизованной культурах *Malassezia*

Номер штамма	Скорость отмирания клеток в лиофилизованной к-ре ( $V^2$ ), % клеток /месяц	Скорость отмирания клеток в растущей к-ре ( $V^2$ ), % клеток/сут
1*	0	3,6
2	5,6	10,0
3	5,6	14,3
4	5,6	16,7
5	8,9	16,0
6	10,0	17,1
7	10,4	17,7
8	10,0	16,9
9	8,9	16,5

\*Штамм N1 — *M. furfur*, остальные — *M. sympodialis*.

предположить, что КЖК культур в условиях *in vivo* зависит от частоты использования моющих средств, а также состава сального и потового секрета.

На рис.2 представлены данные о взаимосвязи между скоростью дыхания и содержанием живых клеток в культурах *Malassezia* разного возраста (от 1 до 35 суток) и вида. Максимальная скорость дыхания отмечена у самой молодой культуры, а минимальная — у самой старой. Коэффициент Пирсона, указывающий на наличие линейной корреляционной зависимости между приведенными на рис.2 показателями, равен  $r=0,971$ . То есть, определяя КЖК методом окрашивания можно установить процент не только живых, но и наиболее физиологически активных клеток.

Для 9 штаммов дрожжей *Malassezia* были оценены скорость отмирания клеток растущих и лиофилизованных культур (таблица 2). Видно, что самой

устойчивой при хранении в течение 9 месяцев и медленно стареющей в течение 5 суток после фазы активного роста культурой была *M. furfur*. Сравнение двух приведенных скоростей отмирания —  $V^2$  и  $V^2$  — у 9 штаммов показало наличие высокой степени линейной корреляции ( $r=0,896$ ). Иными словами, предварительное определение КЖК и скорости отмирания клеток перед лиофилизацией дает возможность прогнозировать сохранение жизнеспособности культуры в коллекции.

Таким образом, сохранность клеток лиофилизованных культур можно повысить, если:

- использовать экспоненциально растущие культуры дрожжей (не старше 48 часов);
- перед консервацией определять процент живых клеток в популяции методом окрашивания (он должен быть не менее 50%).

## Литература

- Ingham E, Cunningham A.C. *Malassezia furfur* [Review] // J. of Medical and Veterinary Microbiology. — 1993. — V.31. — P.265–288.
- Арзуманян В.Г. Дрожжевая микрофлора кожи и респираторного тракта человека при аллергических заболеваниях // Дисс...докт.биол.наук. — Москва. — 2002.
- Gueho E., Midgley G., Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 1996. — V.69. — P.337–355.
- Kurzweilova H., Sigler K. Fluorescent staining with bromocresol purple: a rapid method for determining yeast cell dead count developed as an assay of killer toxin activity // *Yeast*. — 1993. — V.9. — P.1207–1211.
- Шольц К.Ф., Островский Д.Н. Полярнографическая ячейка для количественного определения растворенного кислорода // *Лабораторное дело*. — 1965. — N 6. — С.375–378.
- Фатеева М.В., Никитина Т.Н., Шерман Ф.Б. Выживаемость и диагностические свойства дрожжей после лиофилизации и хранения // *Известия Академии Наук СССР. — Серия биологическая*. — 1976. — N 4. — С.611–617.
- Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей // Москва. — Пищевая промышленность. — 1979. — С.52.
- Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского Государственного Университета // *Микробиология*. — 1997. — Т.66. — N 2. — С.283–288.
- Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток // Изд-во Мир. — Москва. — 1978. — С.87.