

*Malassezia spp.*의 최적 성장을 위한 Modified BHI Medium의 조성

조선대학교 의과대학 미생물학교실

양 남 웅[†]

= Abstract =

The Composition of Modified BHI Medium for Optimal Growth of *Malassezia spp.*

Nam-Woong Yang[†]

Department of Microbiology, Medical School, Chosun University, Gwangju, Korea

Background: There are several media for culture of *Malassezia spp.*, such as Leeming & Notman (LN) medium, modified Leeming & Notman (mLN) medium, Dixon's medium and modified Dixon's medium etc. It is known that *Malassezia spp.* grow well in these media in general, but the kind and amounts of their ingredients are various and un-uniform according to researchers. Author propose the new and transparent BHI based medium for the optimal growth of *Malassezia spp.*

Objectives: The purpose of this study was to design the simple and transparent BHI based medium and find essential ingredients for the growth of *M. globosa* and *M. obtusa*.

Methods: The colony size of eight standard strains (*M. dermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis*) on the modified BHI (mBHI) agar media with different ingredients was observed by naked eye after seven day culture. The compositions of mBHI medium were as follows; mBHI-1 was supplemented with 0.7% dextrose, 1.5% Tween 80, 1% glycerol to BHI medium, mBHI-2 was supplemented with 1.5% Tween 40 to mBHI-1 instead of Tween 80, mBHI-3 was supplemented with 1.5% Tween 60 to mBHI-1 instead of Tween 80, mBHI-4 was added with 0.8% bile salts to mBHI-1. mBHI-5 was supplemented with 1.5% Tween 60 to mBHI-4 instead of Tween 80, and mBHI-6 was supplemented with 1.5% Tween 40 to mBHI-4 instead of Tween 80. pH of six mBHI media was all adjusted to 6.5.

Results: *M. furfur* & *M. japonica* were grown well on mBHI-1 agar, but *M. globosa* & *M. obtusa* were not grown and others grown poorly. *M. globosa* & *M. obtusa* were not grown on mBHI-1 & mBHI-4 containing Tween 80 as lipid source, but others grown on all mBHI media. The media that all eight *Malassezia* strains grew well were slightly turbid mBHI-5 & transparent mBHI-6 medium.

Conclusions: *M. globosa* & *M. obtusa* need glycerol and bile salts as well as Tween 60 or 40 instead of Tween 80 for growth. *M. furfur* & *M. japonica* need not bile salts for growth. Author proposes the

Received: May 14, 2014, Revised: June 7, 2014, Accepted: March 16, 2015

[†]Corresponding author: Nam-Woong Yang, Department of Microbiology, Medical School, Chosun University Gwangju, 501-759, Korea.
Tel: +82-10-9474-6350, Fax: +82-62-232-3125, e-mail: nwyang@chosun.ac.kr

Copyright©2015 by The Korean Society for Medical Mycology (pISSN:1226-4709). All right 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. <http://www.ksmm.org>

transparent modified BHI medium supplemented with 0.7% dextrose, 1.5% Tween 40, 1% glycerol and 0.8% bile salts (mBHI-6) as new standard medium for culture of eight *Malassezia* species.

[Korean J Med Mycol 2015; 20(1): 1-5]

Key Words: BHI medium, *Malassezia*, Tween 40, Tween 60

서 론

1996년 Guého 등¹은 사람과 동물의 피부에 서식하는 *Malassezia* 효모균들을 형태학적, 생물학적으로 새로 분리하여 총 7개 균종 (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. sloofiae*, *M. sympodialis*)로 재분류 하였고, Sugita 등^{2,4}은 DNA 분석을 통해서 4개의 새로운 균종 (*M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*)들을 새로 *Malassezia* 속에 포함시켰고, Hirai 등⁸은 *M. nana*를, Cabanes 등^{9,10}은 *M. caprae*, *M. equine*, *M. cuniculi* 등을 새로 분류하여 *Malassezia* 효모균은 모두 14개 균종으로 분류되었다. 그 중에서 *M. pachydermatis*를 제외한 나머지 효모균들은 모두 지질친화성 효모들로서 성장을 위해서 long chain fatty acids를 필요로 한다. 따라서 *Malassezia* 효모균을 배양하기 위해 지질을 함유한 여러 가지 배지들이 고안되었다. Leeming & Notman (LN) 배지와 Modified LN (mLN) 배지는 그 성분 조성으로 인하여 배지의 혼탁도가 매우 커서 액체배지에서는 균의 성장을 육안으로 관찰하기 어렵다는 단점이 있고, 평판배지 역시 많은 기름으로 인하여 집락의 분리가 어렵다는 단점이 있다. Modified Dixon 배지나, 한국미생물보존센터 (KCCM)의 배지 197, 한국 미생물 자원센터 (KCTC) 배지 730도 뚜렷한 근거가 없이 그 조성들이 매우 다양하며, 각 성분들을 모두 구매하고 일일이 계량하여 배지를 만들어야 하는 번거로움이 있다. 따라서 모든 *Malassezia spp.*를 배양하면서도 비교적 단순하고 일관된 성분으로 구성되며 배지의 투명성이 보장되는 일정한 규격의 배지의 개발이 아쉽다고 하겠다. 본 연구자는 *Malassezia spp.*들이 공통적

으로 필요로 하는 지질이 Tween 40, 60, 80 중에서도 어느 것인지 알기 위하여, 또한 물에 녹기 어려운 glycerol monostearate와 olive oil들을 넣지 않아도 되는지를 알기 위하여, 6종류의 배지 조성을 선택하였고 어느 미생물학 실험실이나 있는 BHI 배지를 기저배지로 사용하여 배지의 투명성이 보장되는 일정한 규격의 배지를 개발하기 위하여 본 연구를 시작하였다.

재료 및 방법

1. 표준 균주

인체의 피부에서 흔히 분리되는 지질친화성 *M. dermatis* (KCTC 17610), *M. furfur* (KCCM 12679), *M. globosa* (KCTC 7846), *M. japonica* (KCTC 17611), *M. obtusa* (KCTC 7847), *M. sloofiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985), *M. yamatoensis* (KCTC 17656) 등 총 8균주를 본 실험에 사용하였다.

2. BHI 배지를 기저배지로 한 modified BHI media의 조성

Brain heart infusion 배지 (BBL, France)를 기저배지로 한 mBHI-1의 조성으로 modified Leeming & Notman 배지의 dextrose 1%를 맞추기 위해서 0.3%의 dextrose가 함유된 BHI 배지에 0.7%의 dextrose를 추가하고, 1.5% Tween 80, 1% glycerol을 첨가하였다. mBHI-2의 조성으로 mBHI-1의 조성 중에서 Tween 80을 Tween 40으로 대체하였다. mBHI-3의 조성으로 mBHI-1의 조성 중에서 Tween 80을 Tween 60으로 대체하였다. mBHI-4는 mBHI-1의 조성에 0.8% bile salts를 추가하였다. mBHI-5는 mBHI-4의 조성 중에서 Tween 80을 Tween 60으로 대체하였다. mBHI-6는 mBHI-4의

Table 1. Growth evaluation of *Malassezia spp.* on BHI based media

	mBHI-1	mBHI-2	mBHI-3	mBHI-4	mBHI-5	mBHI-6
<i>M. dermatis</i>	+	++	++	+++	+++	+++
<i>M. furfur</i>	+++	+++	++	+++	++	++
<i>M. globosa</i>	NG	+	+	NG	++	++
<i>M. japonica</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>M. obtusa</i>	NG	+	+	NG	+++	++
<i>M. slooffiae</i>	+	++	++	+++	+++	++
<i>M. sympodialis</i>	+	++	+	+++	+++	+++
<i>M. yamatoensis</i>	+	++	++	+++	++	+++

+, ++, +++: colony size measurement by naked eye

mBHI-1: BHI medium supplemented with 0.7% dextrose, 1.5% Tween 80 and 1% glycerol (pH 6.5)

mBHI-2: same as mBHI-1 medium except substituting 1.5% Tween 40 for Tween 80

mBHI-3: same as mBHI-1 medium except substituting 1.5% Tween 60 for Tween 80

mBHI-4: same as mBHI-1 medium except adding 0.8% bile salts

mBHI-5: same as mBHI-4 medium except substituting 1.5% Tween 60 for Tween 80

mBHI-6: same as mBHI-4 medium except substituting 1.5% Tween 40 for Tween 80

NG: no growth

조성 중에서 Tween 80을 Tween 40으로 대체하였다. 여섯 가지 mBHI 배지들의 pH는 모두 6.5로 조정하였다.

3. mBHI 배지들에서 육안에 의한 *Malassezia spp.* 집락의 크기 평가

지질친화성이 큰 *Malassezia spp.*는 모두 액체배지에서 서로 엉기어서 성장하므로 집락계수법이 나 UV spectrometer를 사용하여 성장의 정도를 측정하기 어렵다. 따라서 8균주 모두 mBHI 고체배지에서 7일간 배양하여 집락의 크기를 육안으로 평가하였다.

결 과

*M. furfur*와 *M. japonica*는 mBHI-1 agar에서 최적으로 성장하였다. *M. globosa*와 *M. obtusa*는 mBHI-1 배지에서 전혀 성장하지 않았고, 나머지 균주들의 성장도 좋지 않았다. *M. globosa*와 *M. obtusa*는 지질 성분으로 Tween 80을 함유한 mBHI-1

agar와 mBHI-4에서 전혀 성장하지 않았다. 그러나 *M. globosa*와 *M. obtusa*를 제외한 나머지 균주들은 Tween 80을 함유한 mBHI-4 배지에서 최적 성장을 보였다. 모든 균주들이 최적 성장을 보인 배지는 약간 불투명한 mBHI-5 배지와 투명한 mBHI-6였다 (Table 1).

고 찰

지질친화성 *Malassezia* 효모균을 배양하기 위해 지질을 함유한 여러 가지 배지들이 고안되었다. 1987년에 고안된 Leeming & Notman (LN) 배지는 최근까지 다수의 연구자들이 이를 사용하고 있다^{6,8} (1% peptone, 0.5% dextrose, 0.4% bile salts, 0.01% yeast extract, 0.1% glycerol, 0.05% glycerol monostearate, 0.05% Tween 60, 1% high-fat cow's milk). 그러나 LN 배지는 1% 고지방 우유를 첨가함으로써 배지의 혼탁도가 매우 커서 액체배지에서는 균의 성장을 육안으로 관찰하기 어렵다는 단점이 있다. Modified LN (mLN) 배지 역시

여러 연구자들이 사용하고 있으며^{11,12}, LN 배지의 고지방 우유 대신에 2% olive oil을 사용하고 있고 다른 성분들의 양을 확실한 근거가 없이 증가시키고 있다 (1% peptone, 1% dextrose, 0.8% bile salts, 0.2% yeast extract, 1% glycerol, 0.05% glycerol monostearate, 0.5% Tween 60, 2% olive oil). mLN 배지는 glycerol monostearate가 잘 녹지 않으며, 2% olive oil이 배지에서 균일하게 섞이지 않아서 평판배지에서는 배지 표면에 기름기가 범벅이 되어 선상도말 후에 집락들이 서로 엉기어서 성장하는 단점이 있다. 액체배지는 olive oil이 액체배지 표면에 모두 떠오름으로써 배양 후에는 모든 지질친화성 *Malassezia spp.*들이 액체배지 표면에서만 엉기어서 성장하는 현상을 보인다. 따라서 액체배지로 연구해야 할 실험에서는 사용하기 매우 불리한 조건이 아닐 수 없다. Modified Dixon 배지도 최근까지 여러 연구자들이 이용하고 있다^{13,14}. 이 배지는 지질 성분이 적게 함유되어 비교적 균일한 고체 및 액체배지를 만들 수 있으나 malt extract를 3.6%나 첨가하고 있고 bile salts도 2%나 함유하고 있다 (0.6% peptone, 2% bile salts, 0.2% glycerol, 1% Tween 40, 0.2% glycerol, 0.2% oleic acid, 3.6% malt extract). 한국 미생물 자원센터 (KCTC)는 배지 730의 조성으로 0.1% peptone, 1% dextrose, 2% bile salts, 0.002% glycerol, 0.01% Tween 40, 5% malt extract를 제시하면서 이를 mLN 배지라고 소개하고 있다. 배지 730은 modified Dixon 배지의 0.2% oleic acid를 사용하지 않고 있는데 그럼에도 불구하고 *Malassezia spp.*들이 성장하는 것으로 보아 modified Dixon 배지의 0.2% oleic acid는 Tween 80의 한 성분으로서 *M. furfur*와 *M. japonica*에게는 필요한 성분이나 다른 *Malassezia spp.*들의 성장에는 불필요한 성분일 것으로 생각된다 (Table 1). 또한 극소량의 glycerol (0.002%)과 Tween 40 (0.01%)이 균의 성장에 어떤 도움이 되는지 의문스럽다. 특히 malt extract를 5%나 사용하는 것은 이 배지가 mLN 배지를 근거로 하기보다는 modified Dixon 배지를 근거로 하고 있음을 알 수 있다. 한국미생물보존센터

(KCCM)의 배지 197은 *M. furfur*의 배지로 추천되고 있는데, 이 배지의 조성으로 0.5% peptone, 1% dextrose, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 1% olive oil을 제시하고 있다. 1%에 달하는 olive oil은 mLN 배지와 같은 단점들을 갖고 있다. 이와 같이 *Malassezia spp.*의 최적 성장을 보장하는 다양한 배지들이 추천되고 있으나, 그 조성들이 매우 다양하며, 각 성분들을 모두 구매하고 일일이 계량하여 배지를 만들어야 하는 번거로움이 있다. 따라서 모든 *Malassezia spp.*를 배양하면서도 비교적 단순하고 일관된 성분으로 구성되며 배지의 투명성이 보장되는 일정한 규격의 배지의 개발이 아쉽다고 하겠다. 저자들은 어느 미생물학 실험실에나 있는 BHI 배지를 기저배지로 하여 공시된 8가지 균주들 모두가 잘 성장하는 배지의 조성을 찾았으며 그 조성은 BHI 기저배지에 0.7% dextrose, 1.5% Tween 60, 1% glycerol, 0.8% bile salts (mBHI-5) 또는 1.5% Tween 60 대신에 1.5% Tween 40을 사용하는 mBHI-6 배지의 조성이었다 (Table 1). mBHI-5는 함유된 Tween 60의 특성상 약간 혼탁하므로 Tween 40을 대신 넣어 투명도가 뛰어난 mBHI-6가 고체 및 액체배지를 만드는데 더 적합할 것으로 생각한다. mBHI-5 혹은 mBHI-6 배지가 LN 배지 및 mLN 배지와 크게 다른 점은 yeast extract를 첨가하지 않으며 Tween 60 혹은 40의 양을 1.5%로 늘리고 대신 높은 불용성을 보이는 glycerol monostearate를 제거하고, 고지방 우유나 olive oil을 넣지 않은 것이다. Glycerol monostearate는 bile salts와 더불어 *M. globosa*와 *M. obtusa*의 성장에 반드시 필요하나 Tween 40 (polyoxyethylene sorbitan monopalmitate)이나 Tween 60 (polyoxyethylene sorbitan monostearate)을 충분히 넣어줌으로써 이를 대체할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 Tween 40을 넣은 mBHI-6은 고체 배지나 액체배지 상태에서 투명성이 가장 좋고, 일반 배지들처럼 4℃ 냉장고에서 1달 정도까지는 보관이 가능하였다. *M. furfur*와 *M. japonica*는 bile salts가 없는 mBHI-2와 mBHI-3 배지에서도 비교적 잘 성장하였으나, 다른 균주들은 bile salts

가 첨가되었을 때 더 잘 성장하였다. 이로 미루어 bile salts는 지질 성분의 유화에 관련이 있고 *Malassezia spp.*들이 지질을 더 잘 사용할 수 있게 해 주는 것으로 추정된다.

결 론

사람의 피부 질환 중에서 전풍, 지루성 피부염, 아토피성 피부염, 건선, 말라세지아 모낭염 등을 일으키는 것으로 알려진 대표적인 8가지 *Malassezia* 균종들이 모두 잘 성장하고, 비교적 단순 간편하게 제조할 수 있는 modified BHI based media (mBHI-5 or 6)의 조성을 결정하였으며 그 조성은 BHI 배지에 0.7% dextrose, 1.5% Tween 40 혹은 60, 1% glycerol, 0.8% bile salts를 첨가하는 것이다. 아울러 배지의 투명성을 떨어뜨리는 glycerol monostearate와 olive oil은 8가지 *Malassezia* 균종들의 성장에 필수적인 성분은 아닌 것으로 밝혀졌다.

REFERENCES

1. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;69:337-355
2. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1363-1367
3. Sugita T, Nishikawa A. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2004;45:55-58
4. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005;61: 281-284
5. Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol* 1987;25:2017-2019
6. Lim SH, Kim SM, Jung BR, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. A mycological and molecular biological study of *Malassezia dermatis* isolated from Korean. *Korean J Dermatol* 2007;45:1020-1030
7. Lee YW, Byun HJ, Kim BJ, Kim DH, Lim YY, Lee JW, et al. Distribution of *Malassezia* species on the scalp in Korean seborrheic dermatitis patients. *Annals of Dermatol* 2011;23:156-161
8. Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:623-627
9. Cabanes FJ, Theelen B, Castella G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 2007;7:1064-1076
10. Cabanes FJ, Vega S, Castella G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol* 2011;49:40-48
11. Miranda KC, de Araujo CR, Costa CR, Passos XS, de Fatima LFO, do Rosario RSM. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:281-284
12. Lim SW, Shin MG, Lim JY, Yun SJ, Kim SJ, Lee SC, et al. Nested PCR for detection of *Malassezia* species from patient skin scales and clinical strains. *Korean J Dermatol* 2008;46:446-452
13. Nijima M, Kano R, Nagata M, Hasegawa A, Kamata H. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Vet Microbiol* 2011;149:288-290
14. Kaur M, Narang T, Bala M, Gupte S, Aggarwal P, Manhas A. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tertiary Care Hospital, Punjab. *Indian J Med Microbiol* 2013;31:270-274