

Comparación del crecimiento de *Malassezia furfur* y *Malassezia slooffiae* en los medios del exudado gomoso de *spondias dulcis* y dixon

*Comparison of the growth of *Malassezia furfur* and *Malassezia slooffiae* on *Spondias dulcis* gum exudate and Dixon media*

**Mesa C., Luz Mila¹; Díaz, Marynes²;
Ocampo, Paola²; Rodríguez de Valero, Sofía¹;
Larrazabal, Marvelys³; Guerra, Paula⁴;
y León de Pinto, Gladys³**

¹Laboratorio de Micología. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

²Escuela de Ingeniería Química Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo, Venezuela. ³Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación de la Universidad del Zulia. ⁴Gerencia de Soporte Científico. Coordinación de Investigación Aplicada. Empresas Polar. Caracas, Venezuela. E-mail: luzmila.mesa@gmail.com

Resumen

Las levaduras del género *Malassezia* son hongos que producen afecciones en la piel. El desarrollo de estos microorganismos requiere condiciones especiales. El medio Dixon es generalmente usado para su cultivo. Se ensayo el exudado gomoso de *Spondias dulcis* como sustrato para *Malassezia furfur* y *Malassezia slooffiae* en comparación con el medio Dixon. Se determino la cinética de crecimiento a un determinado rango de tiempo (0-120h), a diferentes concentraciones (1,2 %) y pH (4,0;6,0;7,0). La relativa alta biomasa obtenida para las dos levaduras probadas demostró que el sustrato preparado con el exudado gomoso de *S. dulcis* es adecuado para su desarrollo. *Spondias dulcis* especie localizada en Venezuela produce abundante goma. Este hecho, y los resultados obtenidos podría ser útil para preparar un nuevo sustrato que pueda competir con Dixon para el aislamiento y la caracterización de especies de *Malassezia*.

Palabras clave: *Malassezia furfur*, *Malassezia slooffiae*, Exudado gomoso de *Spondias dulcis*, sustrato.

Abstract

Malassezia yeasts are fungi that produce skin affections. Growth of these microorganisms requires specific conditions. The Dixon medium has generally been used for their culture and has been tested. The use of *Spondias* gum as a substrate for *Malassezia furfur* and *Malassezia slooffiae* was tried and compared with the Dixon medium. The growth kinetic for a given time range (0-120 h) was determined at different concentrations (1.2%) and pH levels (4,0; 6,0;7,0). The relatively high biomass obtained for the two tested yeasts demonstrated that the substrate prepared with *S. dulcis* gum exudate is suitable for their growth. *Spondias dulcis*, a species located in Venezuela, yields abundant gum. This fact and the results discussed above indicate that it could be used to prepare a substrate that could compete with Dixon for isolating and characterizing the *Malassezia* species.

Key words: *Malassezia furfur*, *Malassezia slooffiae*, *Spondias dulcis* gum exudate, substrate.

Introducción

El crecimiento eficiente de hongos filamentosos se ha observado en medios con base en los exudados gomosos de *Acacia glocumosa*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Laguncularia racemosa* (1, 2, 3). Estos hallazgos justifican la evaluación del crecimiento de levaduras en otras gomas. Se ha reportado la capacidad de producir gomas de varias especies diseminadas en Venezuela (4, 5).

Las levaduras del género *Malassezia*, forman parte de la flora normal de la piel, y bajo ciertas condiciones pueden causar diversas afecciones como dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor, foliculitis y psoriasis (6).

El género *Malassezia* comprende las especies *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. gloosa*, *M. restricta*, *M. pachydermatis*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis* (7). Estas especies, a excepción de *M. pachydermatis*, se caracterizan por ser lipofílicas, requieren de ácidos grasos de cadenas largas para el crecimiento. La dependencia de una fuente externa de ácidos grasos se atribuye a la incapacidad de sintetizar ácidos grasos saturados de cadenas largas (12 ó 14 átomos de carbono) como el ácido oleico y mirístico. Estos ácidos grasos son in-

dispensables para la formación de estructuras morfológicas de estas levaduras (8).

El medio Dixon es usado específicamente para el cultivo de *Malassezia*. La preparación de este medio requiere de varios reactivos importados (Extracto de Malta, Peptona, bilis de buey, Glicerol, Ácido oleico y Tween 40), por lo tanto, es un medio muy costoso.

Spondias dulcis, conocida vulgarmente como Jobo de la India, es una especie localizada en Venezuela que produce una goma de color marrón claro, muy soluble en agua (9). La goma está constituida por carbohidratos, material proteínico y ácidos grasos. Se ha comprobado que el polisacárido, aislado de la goma de *S. dulcis* tiene una estructura muy compleja. La composición química mostró la presencia de galactosa, arabinosa, manosa, ramnosa, ácido glucurónico y su derivado ácido 4-O metil glucurónico (9, 10).

La utilización de un medio preparado con base en la goma de *Spondias dulcis* para el crecimiento de las levaduras del género *Malassezia* permite el uso de un recurso natural, nativo, económico, que podría competir con el medio Dixon.

Este trabajo reporta el estudio del crecimiento de *M. furfur* y *M. slooffiae* en un me-

dio novedoso con base en el exudado gomoso de *Spondias dulcis* en comparación con el medio Dixon.

Materiales y Métodos

Origen de las muestras

La goma de *Spondias dulcis*, conocida en Venezuela como jobo de la india, se colectó en época no lluviosa (Enero-Marzo, 2005) y fue suministrada por el Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales, Facultad de Humanidades y Educación. Las cepas de *Malassezia furfur* (MMA-98 espalda) y *Malassezia slooffiae* (CA-45 pabellón auricular) fueron obtenidas de piel sana de niños y se conservaron en el medio Dixon.

Preparación del medio de cultivo

El exudado gomoso de *Spondias dulcis* crudo y pulverizado, se disolvió en agua destilada (1% y 2% p/v) con agitación constante. Se filtró por gasa y se le adicionó peptona (0,6% p/v), extracto de malta (3,6 % (p/v) y Tween 40 (1% v/v) Se tomaron alícuotas del medio (pH 6,0) y se ajustaron a determinados pH (4,0 y 7,0). El medio de referencia, Dixon preparado por la técnica tradicional, está constituido por: Tween 40 (10 mL), Extracto de Malta (36g), Peptona (6g), Oxbile (20g) y Aceite de Oliva (20 mL). Estos reactivos se disuelven en agua destilada (hasta completar 1000mL). La esterilización de los medios se realizó en autoclave (15 lb, 15 min).

Preparación del inóculo

Las cepas de *M. furfur* y *M. slooffiae* se cultivaron en el medio Dixon Agar en tubos de ensayo (32°C, 5 días), se añadió agua destilada estéril (10 mL). El líquido se decantó en una fiola estéril (solución stock). El conteo de las esporas, en una cámara de Neubauer (3.612,50 x10⁶ cel/mL) permitió la prepara-

ción de la solución del inóculo (50 mL, 1x10⁶ cel/mL). Este inóculo se preparó adicionando agua destilada estéril (49,98 mL) a la solución stock (0,0138 mL).

Cinética de crecimiento

Se inocularon, por duplicado, alícuotas (2,5 mL) de la solución del inóculo preparado (1x10⁶ cel/mL) en matraces que contenían el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* (25 mL). Se ensayaron diferentes condiciones experimentales (pH 4,0; 6,0 y 7,0, concentración de la goma 1 y 2%). Los cultivos se incubaron (28°C) con agitación constante (200 rpm). La determinación de la biomasa se hizo por la técnica convencional (11).

Determinación de ácidos grasos

Los ácidos grasos de la goma de *S. dulcis*, se determinaron por extracción en hexano y posterior metilación con metóxido de sodio. El producto metilado se analizó por cromatografía de gas con un detector de ionización a la llama (GC-FID) (12).

Resultados

El diseño de los experimentos para evaluar el crecimiento de *Malassezia furfur* y *Malassezia slooffiae*, se hizo tomando en consideración las condiciones ensayadas previamente. Se evaluó un medio con base en la goma de *Spondias dulcis* a concentraciones variables (1 y 2%), en un determinado intervalo de pH (4,0-7,0) y con agitación constante (200 rpm). El comportamiento de las especies en estudio se comparó con el medio Dixon, sustrato empleado universalmente para el cultivo de estas levaduras.

Las Tablas 1-4 y las Figuras 1-4 muestran el estudio comparativo de los valores obtenidos de biomasa y la cinética de crecimiento de *Malassezia furfur* y *Malassezia*

slooffiae en los medios con base en la goma de *Spondias dulcis* y Dixon.

Discusión

Los valores de biomasa obtenidos para *M. furfur* en el sustrato con base en la goma a una concentración determinada (1%), demostraron que el medio ensayado aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura (Tabla 1). El comportamiento observado de la levadura en el medio preparado con la goma es comparable con el exhibido en el medio Dixon, Figura 1. Se observó creci-

miento de la levadura *M. furfur* en el medio con base en la goma (1%) a todos los pH ensayados, sin embargo, el valor de la biomasa fue superior en el medio de referencia, pero, a las 72 h, a pH 4,0 el sustrato investigado mostró un mayor crecimiento (16,69 mg/mL). Por otra parte es importante destacar que a los pH 4,0 y 6,0 el crecimiento observado de dicha levadura mostró que el sustrato ensayado con base en la goma a la concentración mencionada, trabaja eficientemente en las condiciones mencionadas.

El experimento realizado en el medio con una mayor concentración de goma (2%)

Tabla 1. Comparación del crecimiento de *M. furfur* en el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* (1%) y Dixon.

| Sustratos | pH | Tiempo, h | | | | | |
|-------------------------------------|-----|----------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | | 16 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| Goma de <i>Spondias dulcis</i> , 1% | | Biomasa, mg/mL | | | | | |
| | 4,0 | 9,806 | 9,975 | 13,142 | 16,688 | 12,496 | 5,906 |
| | 6,0 | 12,748 | 10,118 | 7,81 | 13,708 | 11,342 | 8,224 |
| | 7,0 | 3,702 | 4,574 | 4,74 | 8,27 | 0,796 | 8,616 |
| Dixon | 6,0 | 15,95 | 17,76 | 24,58 | 14,01 | 12,20 | 11,34 |

Condiciones experimentales (28°C, 200 rpm).

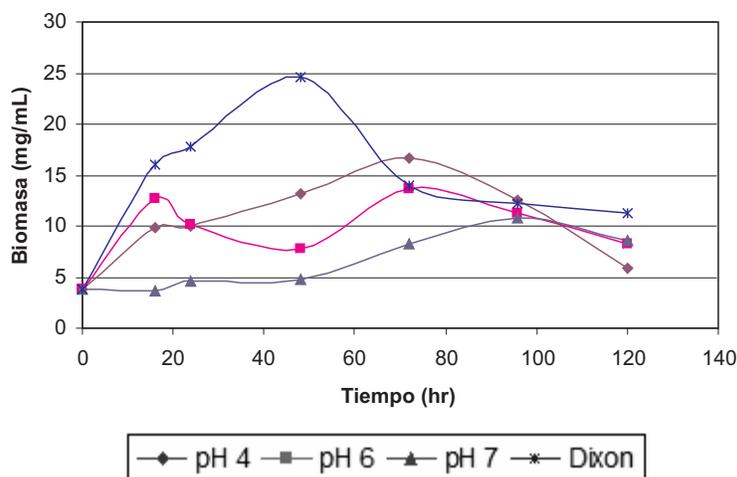
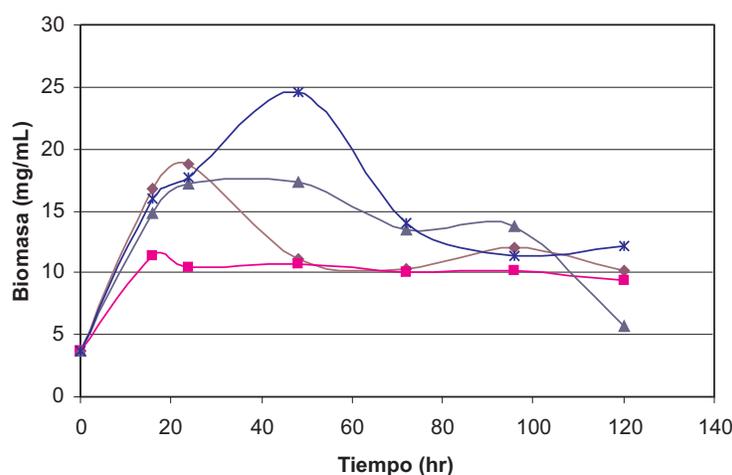


Figura 1. Comparación de la cinética de crecimiento de *M. furfur* en el medio con base en la goma de *S. dulcis* (1%) y en Dixon.

Tabla 2. Comparación del crecimiento de *M. furfur* en el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* (2%) y Dixon.

| Sustratos | | Tiempo, h | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 16 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| Goma de <i>Spondias dulcis</i> , 2% | Biomasa, mg/mL | | | | | | |
| | pH | | | | | | |
| | 4,0 | 16,81 | 18,77 | 11,15 | 10,27 | 12,02 | 10,17 |
| | 6,0 | 11,35 | 10,47 | 10,67 | 9,99 | 10,14 | 9,42 |
| | 7,0 | 14,81 | 17,16 | 17,34 | 13,46 | 13,71 | 5,69 |
| Dixon | 6,0 | 15,95 | 17,76 | 24,58 | 14,01 | 12,20 | 11,34 |

Condiciones experimentales (28°C, 200 rpm).

**Figura 2.** Comparación de la cinética de crecimiento de *M. furfur* en el medio con base en la goma de *S. dulcis* (2%) y en Dixon.

corroboró los resultados descritos anteriormente. El crecimiento exponencial de 0 – 24 h en el sustrato ensayado y en Dixon fueron similares (Tabla 2). Es importante destacar que el crecimiento de la levadura a pH 7,0 es similar al observado en el medio Dixon (pH 6,0). Los resultados indican que el medio con una menor concentración (1%) funciona adecuadamente a pH 4,0, mientras que a una mayor concentración de la goma (2%) funciona eficientemente a pH neutro (7,0).

La especie *M. slooffiae* en el medio con base en la goma a la concentración determinada (1%) a pH ácido, mostró un crecimiento exponencial a las 24h (17,44 mg/mL de bio-

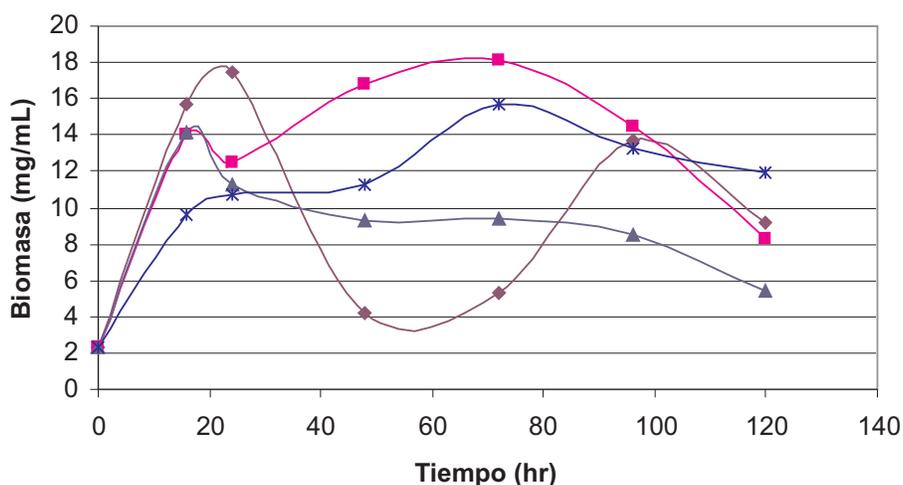
masa); este crecimiento fue mayor que el correspondiente en el medio Dixon. Por otra parte, en los medios neutro y débilmente ácido (pH 7,0 y 6,0) se observó el crecimiento exponencial a las 16 y 72h, respectivamente: El valor de biomasa (14,10 y 18,15 mg/mL) es mayor en el medio con base en la goma de *S. dulcis* (Tabla 3 y Figura 3).

El experimento efectuado con una mayor concentración de goma (2%) constató que los valores de biomasa obtenidos en el medio a pH 7,0 fueron superiores a los correspondientes en el medio de referencia (16 - 72h), (Tabla 4 y Figura 4). Cabe destacar que el crecimiento de las especies *M. furfur* y

Tabla 3. Comparación del crecimiento de *M. slooffiae* en el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* (1%) y Dixon.

| Sustratos | Tiempo | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 16 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | |
| Goma de <i>Spondias dulcis</i> , 1% | Biomasa, mg/mL | | | | | | |
| pH | | | | | | | |
| 4,0 | 15,69 | 17,44 | 4,22 | 5,36 | 13,68 | 9,12 | |
| 6,0 | 13,98 | 12,46 | 16,78 | 18,15 | 14,5 | 8,32 | |
| 7,0 | 14,11 | 11,25 | 9,25 | 9,43 | 8,55 | 5,41 | |
| Dixon | 6,0 | 15,95 | 17,76 | 24,58 | 14,01 | 12,20 | 11,34 |

Condiciones experimentales (28°C, 200 rpm).

**Figura 3.** Comparación de la cinética de crecimiento de *M. slooffiae* en el medio con base en la goma de *S. dulcis* (1%) y en Dixon.**Tabla 4.** Comparación del crecimiento de *M. slooffiae* en el medio con base en la goma de *Spondias dulcis* (2%) y Dixon.

| Sustratos | Tiempo, h | | | | | | |
|--|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 16 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | |
| Goma de <i>Spondias dulcis</i> , 2% pH | Biomasa, mg/mL | | | | | | |
| 4,0 | 5,96 | 5,87 | 10,04 | 5,44 | 5,08 | 12,66 | |
| 6,0 | 5,35 | 7,18 | 5,39 | 7,92 | 13,29 | 8,41 | |
| 7,0 | 12,59 | 9,70 | 12,27 | 19,68 | 10,39 | 7,01 | |
| Dixon | 6,0 | 15,95 | 17,76 | 24,58 | 14,01 | 12,20 | 11,34 |

Condiciones experimentales (28°C, 200 rpm).

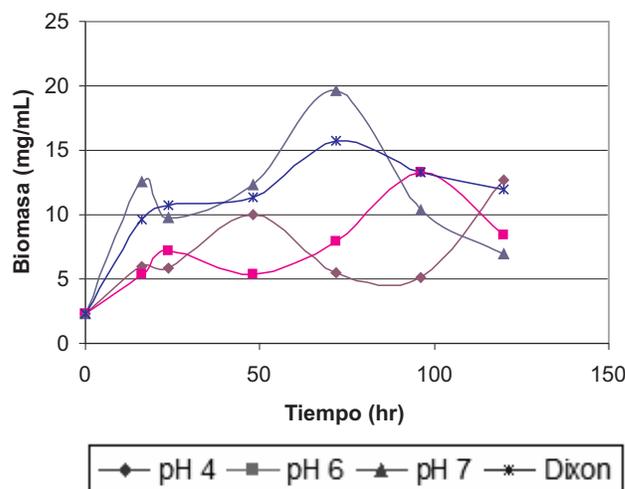


Figura 4. Comparación de la cinética de crecimiento de *M. slooffiae* en el medio con base en la goma de *S. dulcis* (2%) y en Dixon.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de la goma de *Spondias dulcis*.

| Ac. Graso | Cruda | | Liofilizada | |
|------------------------|----------------|------|----------------|------|
| | % Prom Desvest | | % Prom Desvest | |
| Saturados | | | | |
| Laúrico C12:0 | 1,56 | 0,19 | 5,91 | 1,08 |
| Mirístico C14:0 | 1,35 | 0,07 | 2,61 | 0,67 |
| Palmítico C16:0 | 10,34 | 0,81 | 34,27 | 0,17 |
| Esteárico C18:0 | 3,28 | 0,59 | 7,08 | 0,15 |
| Araquídico C20:0 | — | 7,50 | 0,81 | |
| Behínico C20:0 | 5,16 | 2,25 | — | — |
| Monoinsaturados | | | | |
| Miristoleico C14:1n9c | — | — | 16,90 | 1,03 |
| Palmitoleico C16:1n9c | — | — | 4,90 | 0,70 |
| Oleico C18:1n9c | 12,22 | 3,14 | 10,84 | 0,27 |
| Eurírico C22:1n9 | 43,76 | 4,77 | 1,16 | 0,18 |
| Poliinsaturados | | | | |
| Linoleico C18:2n6c | 8,45 | 0,54 | 6,62 | 1,02 |
| Linolénico C18:3n3 | — | — | — | — |

M. slooffiae, requieren un tiempo relativamente mínimo (16 a 24h) para producir una biomasa similar o superior a la observada en el medio Dixon (Tablas 2 y 4). El crecimiento de las especies *M. furfur* y *M. slooffiae*, sugiere que aprovecharon como fuente de carbono

algunos de los monosacáridos (galactosa, arabinosa, ramnosa, ácidos urónicos) constituyentes del polisacárido presentes en la goma de *S. dulcis* (9). Los residuos constituyentes de las ramificaciones estructurales (10) tienen una mayor probabilidad de parti-

cipar en el proceso enzimático necesario para el aprovechamiento de los monosacáridos como fuente de energía.

La goma de *S. dulcis* contiene también diferentes ácidos grasos: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Tabla 5). La presencia de estos ácidos grasos en el medio es probablemente un factor coadyuvante para la fácil asimilación de los carbohidratos en el crecimiento de la levadura.

La fácil producción y obtención de la goma de *S. dulcis*, una especie botánica localizada en Venezuela, la fácil preparación del medio de cultivo y el rápido crecimiento de las levaduras estudiadas demuestran las bondades de este sustrato para la caracterización de *M. furfur* y *M. slooffiae*.

Los factores discutidos anteriormente evidencian que el medio de cultivo con base en la goma de *S. dulcis* puede competir con el medio Dixon para el aislamiento y caracterización de *M. furfur* y *M. slooffiae*. Es importante ensayar el crecimiento de otras especies de *Malassezia*, así como de otras levaduras, en la goma de *Spondias dulcis*.

Agradecimiento

Las autoras expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humánico de La Universidad del Zulia (CONDES) por el soporte financiero del proyecto CC-530-06 "Comportamiento de algunas especies de *Malassezia* en sustrato con base en el exudado gomoso de *Spondias dulcis*"

Referencias Bibliográficas

(1) Mesa L, Rodríguez S, Romero M, Semprúm G, León de Pinto G. Exudados gomosos de

Acacia glomerosa y *Enterolobium cyclocarpum* : sustrato para el cultivo de hongos. *Kasmera* 2000; 28:149-161.

- (2) Graterol E, Mesa L, Rodríguez- Valero S, Ortega J, Ávila D, León de Pinto G. Comportamiento de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en la goma de *Acacia glomerosa*. Aislamiento y caracterización de dos oligosacáridos. *Afinidad* 2005; 62:302-306.
- (3) Mesa L, León de Pinto G. Exudado gomoso de *Laguncularia recemosa*(mangle blanco) como medio de cultivo para hongos. *Invest Clin* 1993; 34:85-89.
- (4) Clamens C, León de Pinto G, Rincón F, Vera A. Exudados gomosos de plantas localizadas en Maracaibo, Venezuela. *Rev Facult Agronomía, La Plata* 1998; 103: 119-125.
- (5) Clamens C, Rincón F, Vera A, Sanabria L, León de Pinto G. Species widely disseminated in Venezuela which produce gum exudates. *Food Hydrocol* 2000; 14: 253-257.
- (6) Gupta A K, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51:785-98.
- (7) Ashbee H R. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; 45: 287-303.
- (8) Carrillo M A, Brio. S S, Género *Malassezia*. Estado de su situación como patógeno. *Activ Dermatol.* 2004; 40:321-329.
- (9) León de Pinto G, Martínez M, Sanabria L, Rincón F, Vera A, Beltrán O, et al. The composition of two *Spondias* gum exudate. *Food Hydrocol* 2003; 14: 259- 263.
- (10) Martínez. M, León de Pinto G, Sanabria L, Beltrán O, Igartuburu J M, Bahsas A. Structural features of an arabinogalactan gum exudates *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). *Carbohydr Res* 2003; 338: 619-624.
- (11) Pirt S J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. London (UK); 1975.
- (12) Kenneth J and Ulrich JF Corn plant and Products with improved oil composition. United States Patent N° 6248939, 2001.