

Güney-Batı Anadolu kökenli ökaliptüs sıvı besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* serotiplerinin üreme dinamikleri

The growth dynamics of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii serotypes on South-West Anatolian's Eucalyptus-based broths

Çağrı Ergin, Mustafa Şengül, İlknur Kaleli, Ergun Mete

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

İletişim / Correspondence: Çağrı Ergin Adres / Address: Posta Kutusu 119 Denizli Tel: 0258 2134030 / 1313, Fax: 0258 2132874
E-mail: cagri@pamukkale.edu.tr

ÖZET

Cryptococcus neoformans'ın doğal kaynağı olarak gösterilen *Eucalyptus camaldulensis* florası ülkemizde geniş bölgelerde bulunmasına rağmen çevresel *Cryptococcus neoformans* izolasyonu çok azdır. Bu çalışmada, *E.camaldulensis* tohumlarından hazırlanan sıvı besiyerinin *C.neoformans* ve *C.gattii* serotiplerini üretme dinamikleri incelenerek, değerlendirme için optimize şartlar saptanmıştır. Güney-Batı Anadolu bölgesinde on farklı merkezdeki ökaliptüslerden toplanan tohum yapılarından hazırlanan besiyerlerinde standart kriptomokok kökenlerinin üreme dinamikleri incelenmiştir. *C.neoformans* serotip A kökeninin tüm bölgelerden hazırlanan besiyerlerinde üreyebildiği saptanmıştır. Diğer standart kriptomokok kökenlerinde bazı bölgelerde üremenin kısmi inhibisyona uğradığı bulunmuştur. Sonuç olarak üremenin baskılandığı bölgelerdeki farklı kimyasal yapıların anti-kriptomokokal aktivitelerinin yeni çalışmalar ile ayrıntılı olarak tanımlanması gerektiğine karar verilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, çevresel, üreme dinamikleri, *Eucalyptus camaldulensis*

SUMMARY

Although wide *Eucalyptus camaldulensis* plantation as a natural niche of *Cryptococcus neoformans* has been present in our country, the isolation of the yeast is lower than expected. In this study, newer *Eucalyptus* seed-based broth has been studied and optimized for growth dynamics of *C.neoformans* and *C.gattii*. Standard cryptococci strains growth dynamics have been evaluated in broth mediums separately prepared from ten different South-West Anatolian localization's eucalypts. While *C.neoformans* serotip A has been growing all broth mediums, other strains have been partially inhibited some localizations' medium. As a result; further studies are required to better characterize the anti-cryptococcal activities of different chemical agents in growing inhibited localizations' eucalypt seeds.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, environmental, growth dynamics, *Eucalyptus camaldulensis*

GİRİŞ

Bazidiomycet genusundan insan patojeni mayalar *Cryptococcus neoformans* (önceki ismi ile *C.neoformans* serotip A ve D) ve *Cryptococcus gattii* (önceki ismi ile *C.neoformans* serotip B ve C) tropik ve subtropik bölgelerde sıklıkla *Eucalyptus camaldulensis* florasyndan izole edilebilmektedir (1-3). Ülkemizdeki geniş ökaliptüs floralarında

yapılan taramalarda beklenenin aksine çok az sayıda *C.neoformans* izole edilebilmiştir (4, 5). Ülkemizde az sayıda flora kökenli çevresel izolasyon yapılmasının nedeni; toprağın kimyasal özelliği ve yaygın çevresel antifungal maddelerin bulunabileceği şeklindeki hipotezler ile açıklanamamıştır (5, 6). Mayanın çevresel kolonize olduğu flora yapılarında üreyebilmeleri ve oradan hava

yolu ile insana bulaşması yayılımın temelini oluşturmaktadır (7). Bu çalışma Güney-Batı Anadolu'da yetişen farklı *E.camaldulensis* tohumlarından hazırlanan besiyerlerinde *C.neoformans* ve *C.gattii*'nin çoğalabilme yeteneklerini değerlendirmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma iki aşamada yapılmıştır: (1) kaynatılmış ökaliptüs sıvı (KOS) besiyerinin hazırlanarak *C.neoformans* ve *C.gattii*'in büyüme dinamiklerinin incelenmesi; (2) Ege ve Akdeniz bölgelerinde farklı noktalardan toplanan tohum yapılarından hazırlanan besiyerlerinde farklı serotiplerin üreme özelliklerinin araştırılması.

Besiyerinin hazırlanması ve üreme dinamiği modelinin değerlendirilmesi. Denizli merkezi yerleşim bölgesindeki bir *E.camalduensis* ağacının, ağaç üzerinde yere düşmeden kurumuş ve henüz kurumamış tohumları toplanmıştır. Yaş olarak toplanan tohumlar oda ısısında 2 ay süre ile kurutulmuştur. Yapılar rondo ile toz haline getirildikten sonra 50 gr/lt olacak şekilde distile su içinde 1 saat kaynatılmıştır. Süzgeçten geçirilerek kaba partikülleri uzaklaştırılan sıvılar otoklavda steril edilmesi yolu ile KOS besiyeri elde edilmiştir. KOS besiyerine 400-1100 nm arasındaki dalgaboyları ile spektral analiz (Shimadzu UV-1601) uygulanmıştır.

Üremeyi gösteren verilerin elde edilmesinde daha önceden tanımlanan hücre yoğunluğuna göre ölçüm yöntemi, sonuçların değerlendirilmesinde ise logistik regresyon modelleme yöntemi kullanılmıştır (8-10). Mikrotitrasyon plağında (Sarsstedt; düz taban) geometrik dilüsyonları yapılan KOS besiyerlerine *C.neoformans* serotip A (3 farklı köken; CDC 236, Ülkemizde *E.camalduensis*'den ve *Apis mellifera* kolonilerinden elde edilen kökenler), serotip B (CDC B237), serotip C (NIH 18C) ve serotip D (NIH 52D) ekimleri yapılmıştır (4, 11). Tüm ekimler çift kuyucuk ile çalışılmıştır. Kontrol (Ekim yapılmamış KOS besiyeri ve distile suya ekim yapılan kuyucuklar)

ve kör kuyucuklar (Distile su) hazırlanmıştır. Maya ekimi her kuyucuğa 100 maya/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekimler 30°C'da inkübasyona bırakılarak, 10 gün süreyle aynı saatte spektrofotometrik yöntemle okutulmuştur. Son ölçümden sonra kuyucuklardan bakteriyel ve mantar kontaminasyonu varlığını araştıran kontrol ekimleri yapılmıştır. Kontamine olan kuyucuklar çalışma dışı bırakılmıştır. *C.neoformans*'ın farklı serotiplerinden elde edilen spektrofotometrik ölçüm verileri bilgisayara aktararak incelenmiştir. Bu veriler için "doğrusal olmayan eğri uyumu" analizi yapılarak Boltzmann, Hill, Gompertz, Richards, Weibull büyüme modellerinin dönüşümü bilgisayar yardımı ile uygulanmıştır. Her bir köken için üreme eğrileri, parametrelerine göre düzenlenerek sonuçlar kendi arasında karşılaştırılmıştır. Farklı dalgaboylarında değişim katsayısı değerleri kaydedilmiştir. Üreme eğrilerinin istatistik analizleri için Origin Ver 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA) programı kullanılmıştır.

Dilüsyon faktörünü incelemek amacı ile, KOS besiyeri deney tüplerinde geometrik dilüsyon yapılar hazırlanmıştır. Tüplere *C.neoformans*'ın 4 farklı serotip kökeninin ekimi yapılmıştır. On gün süre ile 30°C'da inkübe edilen tüplerden her gün patatesli dektrozlu agar besiyerine ekim yapılmıştır.

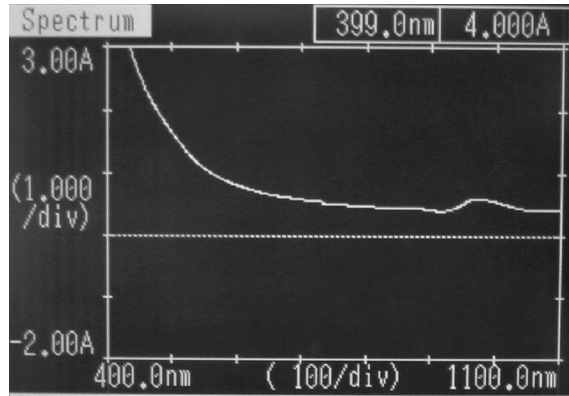
Bölge örneklerinin değerlendirilmesi. İncelemeye alınacak *E.camaldulensis* tohumları aralarında en az 70 km olan farklı 10 yerleşim noktasından; Antalya (Merkez, Belek, Adrasan), Denizli (Merkez), Aydın (Kuyucak, İncirliova, Kuşadası) ve İzmir (Merkez, Çeşme, Akçay)'den toplandı. Yukarıda açıklanan şekilde kuru ve yaş örneklerin kurutulmasından sonra *C.neoformans* serotiplerinin ekimleri yapılmıştır. Ekimler inkübasyon süresince hergün aynı saatte spektrofotometrik yöntemle 650 nm.de okutulmuştur. İstatistiksel değerlendirme için verilere Richards doğrusal olmayan eğri dönüşüm modeli uygulanmıştır.

BULGULAR

KOS besiyeri *C.neoformans* kökenlerini üretebilmektedir ve KOS besiyerinde *C.neoformans* kolonileri pigment meydana getirebilmektedir. Besiyerinin 10^3 kat ve yukarı seyreltilmelerinde 10 günlük süre ile inkübasyon süresinde besiyerinde pigment oluşumu göz ile ayırt edilememektedir.

Besiyeri içeriğindeki ilk hazırlanımında kullanılan 50 gr/lt tohum miktarı kriptokokların üretiminde

Şekil 1. KOS besiyerinin spektral analizi (Shimadzu UV-1601 ekran görüntüsü)



en iyi üremeyi sağlamıştır. Besiyerinin spektral analizine göre 500-1100 nm arası filtreler ile spektrofotometrik değerler veri okunması için uygun bulunmuştur (Şekil 1). Laboratuvar imkanlarına uygun olarak besiyeri ölçümleri öndeğerlendirme için 540 ve 630 nm olarak seçilmiştir.

Üreme eğrilerinin kuru ve yaş tohumdan hazırlanan KOS besiyerlerindeki üreme değişim katsayılarına göre yaş veya kuru tohumdan hazırlanan KOS besiyerlerinde 650 nm filtre ile ölçüm yapılmasının uygun olduğu bulunmuştur. Saptanan bu dalgaboyunda tüm serotipler için değişim katsayısı %20'nin altında hesaplanmıştır. Richards doğrusal olmayan eğri genişletme modeli dönüşümünün verilere en uygun yaklaşımı gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında besiyeri hazırlanması için kuru tohum örnekleri tercih edilmiştir. Farklı bölgelerde farklı serotiplerin üreme hızlarının değiştiği saptanmıştır. *C.neoformans* serotip A kökeninin tüm bölgelerden toplanan tohumlar-

dan hazırlanan besiyerlerinde ürettiği, *C.neoformans* serotip D kökeninin ise Antalya, Çeşme, İncirliova ve İzmir bölgelerinden toplanan tohumlardan hazırlanan besiyerlerinde üreyebildiği, diğer bölgelerin örneklerinde ise üremenin çok zayıf olduğu saptanmıştır. *C.gatti* serotip C kökeninin Belek, Denizli ve Kuyucak bölgelerinden, *C.gatti* serotip B kökeninin Denizli bölgesinden toplanan tohumlardan hazırlanan besiyerlerinde zayıf üreyebildiği bulunmuştur.

TARTIŞMA

Özellikle immünsüprese hastalarda hayatı tehdit eden *C.neoformans* ve immünesi sağlam konakta da infeksiyon meydana getirebilen *C.gattii* insana genellikle çevresel bir odaktan yayılarak bulaşmaktadır (1, 7). Çevresel odak olarak şimdiye kadar tanımlanan çok sayıda farklı odunsu bitki olmasına rağmen büyük bir çoğunluğunu ökaliptus cinsi ağaçlar oluşturmaktadır. Ülkemizdeki geniş ökaliptus floralarında yapılan taramalarda az sayıda *C.neoformans* izole edilebilmiştir (4, 5). Buna yol açan faktörün veya faktörlerin varlığının saptanması, izole edilerek saflaştırılması çevresel dekontaminasyonun sağlanması için önemlidir. Sunulan çalışmada *C.neoformans* ve *C.gattii* kökenleri ökaliptus tohumlarından hazırlanan ortamlarda üreme yetenekleri araştırılmıştır. Ulaşılabilen literatürde ilgili konuda veriye rastlanamamıştır. Ancak Avustralya Adelaide Üniversitesi'nin resmi internet sitesinde içine ökaliptus parçaları konulan agarda pigment yapan *C.gatti* kolonileri gösterilmektedir (12). Kriptokok kökenleri ile ökaliptus arasındaki ilişkinin yine Adelaide Üniversitesi'nde Pfeiffer ve Ellis tarafından ortaya konması, bu bölgede yetişen ağaçların yapısında mayanın kolonizasyonunu stimüle eden veya inhibe etmeyen maddelerin olabileceğini göstermektedir (7). Mayanın bulunması için en muhtemel yerler olan güvercin ve kanatlı dışkıları ile bulaşın olduğu bölgelerde bile *C.neoformans*'ın kolonize olamadığı da rapor edilmiştir. Benzer şekilde toprağın içerdiği karbon oranının da kolonizasyona etkili olabileceği belirtilmektedir. (5, 13).

Kriptokokların olası çevresel kolonizasyonu ve insana bulaşı; mayanın kolonize olarak çoğaldığı çiçeklerden veya lignin aktivitesi ile yaşamını sürdürebildiği odunsu yapılardan, rüzgar gibi hava hareketleri ile insana geçebildiği şeklindedir (7). Sunulan çalışma, ülkemizde yetişen ökaliptüs tohum yapılarında kriptokokların çoğalabildiğini göstermektedir. Farklı yapısal özelliklere sahip bölgelerimizden toplanan tohum yapılarındaki farklılıklar kriptokokların üremelerine önemli etki yapmamakla birlikte bazı bölgelerimizde kökenlerin daha yavaş üreme gösterebildiği görülmektedir. Genel olarak bitkiler çevresel ortamın içerdiği maddeleri hem hava yolu ile hem de topraktan alarak tüm yapılarında konsantre halde bulundurmaktadır. Ökaliptüs yapılarında kriptokokların üreyebilmeleri ülkemizde ökaliptüste kolonize olarak bulaşan infeksiyonların meydana gelebileceğinin de göstergesidir. Ulaşılan veriler mayanın kolonizasyonu için kriptokokların varlığını inhibe edebilecek, kolonizasyonunu zorlaştıracak maddelerin varlığını düşündürmüştür. İleri çalışmalar ile yapılacak kimyasal analizlerde, kriptokokların üremesini baskılayan ortak kimyasal maddelerin bulunması ve saflaştırılarak anti-kriptokokkal etkilerinin incelenmesinin, kriptokokların çevresel kolonizasyonunun engellenmesinde önemli olduğunu düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya sırasında standart kökenler konusunda Dr.Şinasi Taner Yıldırım, Dr.Mehmet Ali Saraçlı ve Dr.Süleyha Hilmioğlu-Polat'a, spektral analiz konusunda Dr.Yaşar Enli'ye ve verilerin saptanması konusunda Dr.Erol Atalay'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Casadevall A, Perfect JR. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. In Casadevall A, Perfect JR (eds): *Cryptococcus neo-*

formans, Amerikan Society of Microbiology, Washington, DC 1998: 41.

2. Kwon-Chung K, Boekhout JT, Fell JW, Diaz M. Proposal to converse the name *Cryptococcus gattii* against *C.hadriani* and *C.bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.

3. Chaturvedi S, Ren P, Narasipura SD, Chaturvedi V. Selection of optimal host strain for molecular pathogenesis studies on *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia* 2005; 160: 207-15.

4. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, Kaleli İ, Gülbaba, G, Demirci M, Kaya S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia* 2004; 158: 43-7.

5. İlkit M, Ateş A, Turaç Biçer A, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microb* 2006; 56: 97-9.

6. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Gürbüz M. Eucalyptus debris küf mantarı florasında antikriptokokkal aktivitenin araştırılması. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35: 256-9.

7. Pfeiffer T, Ellis D: Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 1990; 336: 923-5.

8. Zhao L, Chen Y, Schaffner DW. Comparison of the logistic regression and linear regression in modeling percentage data. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2129-35.

9. Meletiadi J, Dorsthorst DTA, Verweij PE. Use of turbidimetric growth curves for early determination of antifungal drug resistance of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4718-25.

10. Wacheheim DE, Patterson JA, Ladish MR. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Biosour Tech* 2003; 86: 157-64.

11. Ergin Ç, İlkit M, Kaftanoğlu O. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses* 2004; 47: 431-4.

12. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Cryptococcus/C_gattii.html

13. Hamasha AM, Yıldırım ŞT, Gönüm A, Saraçlı MA, Gün H. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 2004; 158: 195-9.