

Türkiye'nin Güney-Batı Anadolu Bölgesindeki Ilgın (Genus: *Tamarix* L.) Ağaçlarında *Cryptococcus neoformans* Kolonizasyonu Takibi[§]

Çağrı ERGİN, Mustafa ŞENGÜL, Özgün KİRİŞ SATILMIŞ

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Cryptococcus neoformans* Dünya'nın çeşitli bölgelerinde çürüyen ağaçlardan ve kovuklardan izole edilebilen bazidiyomycet bir maya mantarıdır. Anadolu'da yaygın bir cins olan ılgın (Genus: *Tamarix* L.) ağaçları turistik bölgelerde çevre düzenlemesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı ılgın ağaçlarında *C. neoformans* varlığını araştırmak ve varlığı durumunda kolonizasyonunun takibini yapmaktır.

Gereç ve Yöntem: Güney-batı Anadolu'nun Ege ve Akdeniz bölgelerinde 201 ılgın ağacı araştırmaya alındı. Kültür için bifenil ve antibiyotik içeren Staib agar kullanıldı. Çevresel örneklemede kullanılan eküvyonu içeren tüpler, oda sıcaklığında bekletildi ve düzenli olarak sub-kültür işlemi yapıldı.

Bulgular: *C. neoformans* yalnızca bir (%0.49) *Tamarix hispida* ağacından 280 koloni/eküvyon yoğunluğunda izole edildi. İlk izolasyonu takiben beş aylık süre boyunca aynı ağaçtan başarılı bir şekilde tekrarlayan izolasyonlar yapıldı. Dört aylık süre boyunca, laboratuvar ortamında bekletilen örneklerden de yoğunluğu giderek düşen sayıda tekrarlayan izolasyonlar yapıldı.

Sonuç: Ilgın ağaçlarının *C. neoformans* için yeni bir kolonizasyon kaynağı olabileceği düşünüldü. Mayaların, laboratuvar koşullarında, örnekleme tüpleri içinde canlı olarak kalabilmeleri muhtemeldir.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*, *Tamarix hispida*, ılgın, çevresel

SUMMARY

Colonization Survey of *Cryptococcus neoformans* in *Tamarix* Tree (Genus: *Tamarix* L.) in South-Western Anatolia, Turkey

Objective: *Cryptococcus neoformans* which is a basidio-myceteous fungus, is isolated from the decayed hollows and niches on trees in various parts of the world. *Tamarisk* (Genus: *Tamarix* L.) trees are common in Anatolia and mainly used for landscaping purposes. The aim of this study is to investigate the presence of *C. neoformans* in tamarisk tree and to follow its colonization in sampled materials.

Material and Methods: The samples were obtained from 201 *Tamarix* trees from Aegean and Mediterranean regions of South-Western Anatolia. Staib agar containing biphenyl and antibiotics were used for culture. During environmental survey period, sampling tubes with swabs were kept at laboratory and were regulary subcultured.

Results: *C. neoformans* was isolated from only one (0.49%) *Tamarix hispida* as 280 colonies/swab. Sequential isolations were done from the same colonized tree during the five-months period following the first isolation. During the four month period, although the number of the colonies exhibited a decreasing trend, *C. neoformans* was successfully re-cultured from the same sampling tube stored at room temperature.

Conclusion: *Tamarix* trees could be a new colonization niche for *C. neoformans*. These yeasts are likely to remain active in sampling tubes in laboratory conditions.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Tamarix hispida*, *Tamarix*, environmental

Alındığı tarih: 13.06.2015

Kabul tarihi: 23.10.2015

Yazışma adresi: Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı Kampüsü, Denizli
Tel: (0258) 296 24 91

e-posta: cagri@pau.edu.tr

[§] Bu araştırma, 7-11 Kasım 2010 tarihlerinde Girne, KKTC'de düzenlenen XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Cryptococcus neoformans farklı ekolojik odaklardan izole edilebilen, doğada yaygın bir insan ve hayvan patojeni maya mantarıdır. Özellikle immünoensefalit ve pnömoni etkeni olabilir. Bazı kanatlıların gübresi ile karışan ortamlarda ve farklı ağaçların mikroklima oluşturan gövdelerinde kolonize olarak, rüzgâr gibi çevresel faktörlerin de yardımıyla kolaylıkla konak tarafından solunan havaya karışır. Kolonize olduğu ortama ve biyotasına bağlı olarak, *C. neoformans*'ın doğada dış ortama dayanıklılığı ve virulansı değişir. Aynı zamanda mayanın genotipik özelliklerine dayanan eşeyli üreme karakteri, basidiyosporlarının enfeksiyöz eşeyli form oluşturmaları ve çoğalabilmesi de dış ortamda kolonize olduğu flora göre değişiklikler gösterir⁽¹⁻³⁾.

Hindistan, Arjantin, Brezilya ve Kolombiya'da mayanın doğada uzun süre kolonizasyonunun takip edildiği ve iklimsel özelliklerden etkilendiğine ilişkin uzun süreli araştırmalar yapılmıştır⁽⁴⁻⁹⁾. Ülkemizde ağaç kovuklarındaki floradan yapılan *C. neoformans* kolonizasyonu ile ilgili araştırmalarda 2004'ten bugüne kadar *Eucalyptus camaldulensis*, *Punica granatum* (Nar) ve *Platanus orientalis* (Doğu çınarı) başarılı izolasyon yapılan türlerdir⁽¹⁰⁻¹²⁾. Gökova körfezindeki sürveyans araştırması dışında Japonya, Hindistan, ABD, Avustralya ve Kolombiya'da yapılanlara benzer şekilde *C. neoformans*'ın ülkemizdeki çevresel florada dağılımına yönelik benzer veriler bulunmamaktadır⁽⁹⁾.

Tamaricaceae ailesi Avrupa, Asya ve Afrika'nın doğal ve kuru iklimine uyum sağlayan, 1-15 arasında yoğun çalı formundan ağaç boyuna kadar olabilen sürekli yeşil bitkileri içerir. Genellikle tuzlu topraklarda yetişir⁽¹³⁾. Yaşına bağlı olarak, ağacın üzerinde büyük kovuklar oluşmaktadır. Anadolu'da ilgın olarak adlandırılır. Kumlu, çorak ve nemli topraklarda yayılım gösteren birçok türü bulunsa da en sık olarak

Tamarix smyrensis, *T. africana*, *T. aphylla*, *T. hampena*, *T. gallica*, *T. parviflora*, *T. tetrandra* ve *T. gracilis* vardır. Kereste değeri azdır. Kolay bakımı nedeniyle Güney-Batı Anadolu'da turizm bölgelerinde çoğunlukla çevre düzenlemesi yapılırken kullanılır.

Sunulan araştırmada, Güney-Batı Anadolu'da önemli turizm bölgelerimizde bulunan kovuklu ilgın florasında *C. neoformans*'ın varlığının araştırılması, varlığı hâlinde de kolonizasyonunun takibinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya, Antalya şehir merkezi, Belek turizm sahil şeridi ve Bodrum yarımadasında turizm aktivitelerinin yoğun olduğu bölgelerde yaygın olarak bulunan üzerinde kovuk bulunan 201 ilgın (*Tamarix sp.*) ağacı alındı (Şekil 1). Ağaçların kovuk ve çevrelerinde güvercin çıkartmaları ve yoğun organik kirlenme varlığı saptanması durumunda o ağaç araştırmaya alınmadı. Bu aşamada tür tanımlaması yapılmadı.



Şekil 1. Araştırmaya alınan Antalya (1), Belek sahil şeridi (2) ve Bodrum yarımadasında (3-7) örnekleme yapılan bölgeler.

Çevresel örnekleme Randhawa ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ tarif ettiği yöntemle benzer olarak alındı. Tahta pamuklu eküvyonlar 35-40 cm uzunluğunda hazırlandı

ve steril edildi. Her örnekleme için steril serum fizyolojik içinde ıslatılan eküvyon kullanıldı. Ağaçların gövdesinde bulunan büyük kovuklardan eküvyon ile örnekler alındı. Örnekleme sonrasında 2 ml hacimdeki steril serum fizyolojik içinde, aynı gün laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler %0.04 kloramfenikol ve %0.1 bifenil içeren Staib agara ekildi. Oda sıcaklığında 15 gün süre ile enkübasyona bırakılan Staib agarda nemli, kahverengi ve mukoid koloni varlığı araştırıldı. Şüpheli kolonilerden Gram boyama, üreaz testi, nitrat redüksiyonu, Dalmau agar morfolojisi, 37°C’de üreyebilme yeteneği ve farklı karbonhidratlar için asimilasyon testleri uygulandı. *Cryptococcus gattii*’den ayrımı amacı ile kanavanin-glisin-bromtimol mavisi agar besiyeri reaksiyonu değerlendirildi. Araştırma aşamasında üremenin saptandığı ağaçtan ikişer ay aralar ile alınan örnekler için de aynı yöntem uygulandı.

Araştırmanın diğer aşamasında, üremenin saptandığı örneklerin bulunduğu süspansiyonlar oda ısısında, güneş ve kuvvetli ışıktan uzakta bekletildi. Her örnekten aylık olarak Staib agara ekim ve değerlendirme işlemleri yinelendi. Şüpheli kolonilerden tanımlama işleminde yukarıda anlatılan yöntem uygulandı.

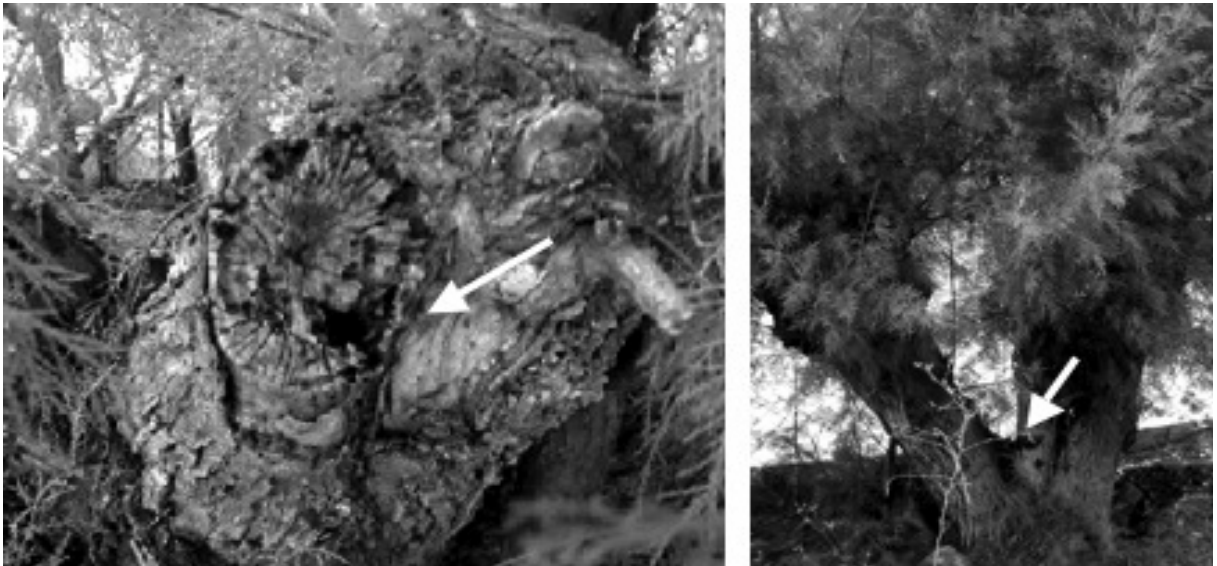
SONUÇLAR

Araştırmaya alınan 201 *Tamarix* sp. ağacından yalnızca 1 (%0.49)’inde *C. neoformans* üremesi, 280 koloni/eküvyon yoğunluğunda bulundu. Kolonize olarak bulunan ağaç *T. hispida* olarak değerlendirildi (Şekil 2).

Aynı kolonize ağaçtan yineleyen izolasyonların yoğunluğu takip edildiği zaman boyunca azalarak sekiz aylık örnekleme süresince devam etti (Tablo 1).

Tablo 1. *Cryptococcus neoformans*’ın ilk izole edilen örneklem tüpünde (*) ve laboratuvar ortamında bekletilen tüplerde yoğunluğu (koloni/eküvyon).

Örnekleme yapılan ay (Sıcaklık °C; Nem %)	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık
Nisan (20:60)	280*	200	120	10	-	-	-	-	-
Haziran (28:44)			200*	150	120	20	-	-	-
Ağustos (30:70)					80*	70	50	-	-
Ekim (22:72)							-	-	-
Aralık (14:60)									-



Şekil 2. Yineleyen izolasyonunun yapıldığı *Tamarix hispida* üzerinde derinlik oluşturan kovuklu bölge (ok örnekleme yapılan ürmenin olduğu çürüyen oyuğu göstermektedir).

TARTIŞMA

Cryptococcus neoformans'ın doğaya yayılmasında birçok kaynağın odak olabileceği rapor edilmiştir. Özellikle üzerinde büyük kovuk bulduran ağaçlar, nemli ve sıcak iklim ortamlarında uygun mikroklimayı oluşturup, mayanın enfeksiyöz partiküllerinin gelişmesine olanak sağlamaktadır⁽¹⁾. Ülkemizde yapılan araştırmalarda, diğer ülkelerden bildirilen oranlardan daha az izolasyon yapılabildiği bildirilmiştir^(10,12,15-17). Fitokimyasal farklılıklar, yaygın antifungal aktivite ve ekolojik farklılıklar gibi farklı etkenler araştırılmış ise de, bu az izolasyonun nedeni açıklanamamıştır^(18,19). Sürekli izolasyon yalnızca Gökova-Akyaka bölgesinde yapılabilmektedir⁽¹¹⁾. Bu özellikteki yerler Nawange ve ark.⁽²⁰⁾ tarafından "sıcak nokta" olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde ülkemizde güvercin çıkartılarında *C. neoformans* varlığına yönelik yapılan taramalarda da beklenenden daha az oranda maya varlığı görüldüğü bildirilmiştir^(15,16). Hindistan'da Randhawa ve ark.'nın⁽²¹⁾ uzun süreli takip çalışmaları sonucunda ileri sürdüğü hipoteze göre mevsimsel değişimlerin oluşturduğu ekolojik değişimler, *C. neoformans*'ın ağaç kovuklarında kolonizasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Bu hipoteze göre, planlanacak olan çevresel *C. neoformans* tarama araştırmaları yerel iklim özelliklerine göre düzenlenmelidir.

Sunulan raporda, ılgın ağaçlarında *C. neoformans* izolasyonu yapılması, yeni bir çevresel odak olarak tanımlamasını desteklemektedir. Laboratuvar ortamında içine herhangi bir koruyucu veya katkı maddesi konulmadan örnekleme tüpünde bekleyen mayalar uzun süre canlı kalabilmektedir. Laboratuvarda bekleyen örnek tüpü içinde mayanın yoğunluğu azalsa bile, maya canlılığını devam ettirmiş, dört ay süre ile izolasyonu yapılabilmektedir. Kolombiya'da 2003 ve 2009 arasında çevresel örnekler, toplandıkları sıvı içerisinde laboratuvar ortamında bekletilmiş ve on yıllık süre sonunda örneklerin yarısında kriptokoklar üremiştir⁽²²⁾. Bu durum, çevresel kriptokok taramalarında toplanan örneklerin laboratuvar ortamına hızlı aktarıl-

masına önerildiği kadar gereksinim duyulmayacağı düşünmüştür.

Ilgın ağaçları çevresel şartlara bağlı olarak farklı coğrafyalarda farklı dağılım özellikleri gösterirler. Asya, Afrika ve Avrupa'da yaygın olarak görülmekle birlikte, bazı toplumlarda mitolojik (Sümer, Yunan ve Mısır) ve dinsel nedenlerle koruma altındadır. Etnofarmakolojik olarak antiseptik özelliği vardır. Geleneksel Mısır ve Hint tıbbında birçok uygulamada kullanılır. Konak olma potansiyeli olan ılgın ağaçları ile insan toplulukları geniş bir coğrafyada içiçedir^(13,23-25).

C. neoformans'ın ağaç türleri arasında konak seçiciliği bulunmadığı yönünde görüşler bulunmaktadır^(7,8). Farklı ağaçlardan yapılan üremeler bu görüşleri desteklemektedir. Birçok araştırma fitokimyasalların kriptokokkaların yaşam siklusunda önemli olduğunu belirtmektedir. Araştırmaya konu olan ılgın ağaçlarında, türler arasında farklılıklar olmakla birlikte, flavonoidlerin, fenolik yapılu bileşiklerin, kumarinlerin, taninlerin ve serbest alkollerin yoğun bulunabildiği rapor edilmiştir⁽¹³⁾. Farklı yapılarında antiseptik özelliği bulunmasına karşılık, bazı basidiyomiset ve askomiyet mantarlar ılgın ağaçlarında çoğalabilmektedir⁽²⁶⁾.

Ülkemizde çevresel kaynaklı kriptokokkoz hakkında yeterli bilgimiz yoktur. Bildirilen olgu sunumlarında hastaların klinik durumları ve sağaltımları hakkında detaylı bilgi verilmektedir. Hastaların yaşadıkları ortam ve yapmış oldukları seyahat öykülerinin de bildirilmesi çevresel kriptokok odaklarının belirlenmesinde yardımcı olabilir. Bununla birlikte, ülkemizden bildirilen insan kriptokokkozu sayısı da beklenenden azdır⁽²⁷⁾. Ülkemizden yapılacak olan olgu sunumlarında, hastanın anamnezinde bulunduğu ve gezdiği çevre hakkında bilgi verilmesi; *C. gattii*'nin doğal kaynağının epidemiyolojik olarak tahmin edilmesi gibi, *C. neoformans* için yeni doğal kaynakların saptanmasına da yardımcı olabilir⁽²⁸⁾. Ülkemizde insan patojeni mantarların doğal yayılımları ile ilgili araştırma-

lar devam ettirilmeli, insan sağlığı için risk oluşturabilecek bölge ve özellikler saptanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60:69-105.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
2. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 2007; 1:263-73.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.05.005>
3. Botes A, Boekhout T, Hagen F, Vismer H, Swart J, Botha A. Growth and mating of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* on woody debris. *Microb Ecol* 2009; 57:757-65.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9452-1>
4. Granados DP, Casta-eda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol* 2005; 49:282-90.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-004-0236-y>
5. Granados DP, Casta-eda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. *FEMS Yeast Res* 2006; 6:636-44.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00090.x>
6. Reimão JQ, Drummond ED, Terceti Mde S, Lyon JP, Franco MC, De Siqueira AM. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. *Mycoses* 2007; 50:261-4.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01374.x>
7. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, et al. The expanding host tree species spectrum of tанд *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol* 2008; 46:823-33.
<http://dx.doi.org/10.1080/13693780802124026>
8. Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Med Mycol* 2009; 47:177-84.
<http://dx.doi.org/10.1080/13693780802227290>
9. Mitchell TG, Casta-eda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra MS. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (Eds). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM, Washington, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1128/9781555816858.ch18>
10. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioglu S, et al. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia* 2004; 158:43-7.
<http://dx.doi.org/10.1023/B:MYCO.0000038431.72591.7e>
11. Ergin Ç. Gökova bölgesinde eküvyon tekniği ile yüksek oranda çevresel *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2010; 40:163-8.
12. Ergin Ç, Kaleli İ. Denizli şehir merkezinde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:79-85.
13. Aykaç A, Akgül Y. A new analogue of fatty alcohol from *Tamarix hampeana* L. *Nat Prod Res* 2010; 24:34-9.
<http://dx.doi.org/10.1080/14786410802386302>
14. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Med Mycol* 2005; 43:67-71.
<http://dx.doi.org/10.1080/13693780410001712025>
15. İlkit M, Ateş A, Turaç-Biçer A, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microbiol* 2006; 56: 97-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF03174988>
16. Karaca Derici Y, Tümbay E. İzmir İli'nde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. *İnfeksi Derg* 2008; 22:53-8.
17. Erdem F, Akıdan M, Duman B, Ergin Ç. Denizli-Karahayıt bölgesindeki *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması. *Pam Tıp Derg* 2009; 2:256-9.
18. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Gürbüz M. *Eucalyptus debris* küf mantarı florasında antikriptokokkal aktivitenin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35:256-9.
19. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Mete E. Güney-Batı Anadolu kökenli ökaliptüs sıvı besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gatti* serotiplerinin üreme dinamikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37:94-7.
20. Nawange SR, Shakya K, Naidu J, Singh SM, Jharia N, Garg S. Decayed wood inside hollow trunks of living trees of *Tamarindus indica*, *Syzygium cumini* and *Mangifera indica* as natural habitat of *Cryptococcus neoformans* and their serotypes in Jabalpur City of Central India. *J Med Mycol* 2006; 16:63-71.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2006.02.004>
21. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Prakash A, Khan ZU, Xu J. Seasonal variations in the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in North-western India: a retrospective study. *Med Mycol* 2011; 49:320-3.
<http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.516457>
22. Escandón P, Casta-eda E. Long-term survival of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in stored environmental samples from Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2014; pii: S1130-1406(14)00082-5.
23. Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. Glossary of Indian medicinal plants. Council of Scientific and Industrial Research; New Delhi, 1986.
24. Sultanova N, Makhmoor T, Abilov ZA, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J Ethnopharmacol* 2001; 78:201-5.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00354-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00354-3)
25. Hassan LE, Ahamed MB, Majid AS, et al. Correlation of antiangiogenic, antioxidant and cytotoxic activities of some Sudanese medicinal plants with phenolic and flavonoid contents. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:406.
<http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-406>
26. Middelhoven WJ. The yeast flora of some decaying mushrooms on trunks of living trees. *Folia Microbiol (Praha)* 2004; 49:569-73.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02931535>
27. Akçağlar S, Sevgican E, Akalın H, Ener B, Töre O. Two cases of cryptococcal meningitis in immunocompromised patients not infected with HIV. *Mycoses* 2007; 50:235-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01347.x>
28. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-4.