

Eucalyptus debris Küf Mantarı Florasında Antikriptokokkal Aktivitenin Araştırılması

Çağrı ERGİN, Mustafa ŞENGÜL, İlknur KALELİ, Melahat GÜRBÜZ

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

ÖZET

Cryptococcus neoformans'ın doğal kaynağı olarak gösterilen *Eucalyptus camaldulensis* florası ülkemizde geniş bölgelerde bulunmasına rağmen çevresel *Cryptococcus neoformans* izolasyonu çok azdır. Bu çalışmada; *Eucalyptus camaldulensis* florasından izole edilen küflerin antikriptokokkal aktivitelerinin varlığı agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. İncelenen küflerde antikriptokokkal aktif madde varlığı bulunamamıştır. Sonuç olarak *Cryptococcus neoformans*'ın az oranda izole edilmesinin farklı nedenlerden kaynaklandığına karar verilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, antifungal, küf

SUMMARY

Investigation of Anticryptococcal Activity on Eucalyptus debris' Mould Flora

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, anticryptococcal activity of the mould isolated from *Eucalyptus camaldulensis* flora was investigated by agar diffusion method. No anticryptococcal activity had been found. It was concluded that another factor should be present for low isolation rate of the yeast.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, antifungal, mould

GİRİŞ

Eucalyptus camaldulensis florası *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından biridir (1). Akdeniz havzasında birçok bölgedeki *E. camaldulensis* florasında *C. neoformans* varlığı bildirilmiştir (2-7). Türkiye ve Ürdün'de yapılan taramalarda ise beklenenin aksine yoğun izolasyon yapılamamıştır (8, 9). Çevresel şartlardan olan kimyasal yapının *C. neoformans*'ın kolonizasyonunu etkileyen önemli bir faktör olabileceği belirtilmiştir (8). Çevresel ortamda antifungal madde salgılayan küflerin bulunması durumunda *C. neoformans*'ın ve diğer mayaların çoğalmasının inhibe olabileceği de belirtilmiştir (10-11).

Çevresel ortamlardan alınan örneklerde *C. neoformans*'ın varlığının kültür yöntemi ile taranması sırasında besiyeri yüzeyinde çok sayıda küf mantarları üremektedir. Bu küf mantarı kontaminasyonu inhibitör madde kullanılmasına rağmen engellenememektedir. Bu küflerin ve ortama salgıladıkları maddelerin *C. neoformans*'ın üremesine etkisi bilinmemektedir. Antikriptokokkal aktiviteye sahip mikofloranın bulunması besiyerinde daha az sayıda *C. neoformans* izolasyonuna yol açacaktır. Bu çalışmada, çevresel maya taramaları sırasında okaliptus debrislerinin doğal ortamından izole edilen küflerin antikriptokokkal aktivitelerinin varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan küfler 2004 yılı Haziran ayında izole edilmiştir. Muğla Gökova bölgesindeki *Eucalyptus camaldulensis* Dehn ağaçları hedef bölge olarak seçilmiştir. Bu bölge ülkemizdeki okaliptus florası kökenli çevresel *C. neoformans* var. *grubii* izolasyonunun yapıldığı bölgedir (8). Bölgedeki 70 farklı ağacın çiçek ve tohumlarından dökülen yapılar 3-5 gr olacak şekilde toplanarak steril kaplarda aynı gün içerisinde la-

boratuvara ulaştırılmıştır. Örneklerin üzerine 50 cc serum fizyolojik ilave edilmiştir. Şiddetli bir şekilde çalkalanan örnekler oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiştir. Süpernatant eküvyon yardımı ile %0.1 bifenil ve %1 kloramfenikol içeren Staib (=Guizotia abyssinica agar, Niger tohumu agar) besiyerine ekilmiştir. Karanlıkta 30°C'da 15 gün süre ile inkübe edilen örnekler gün aşırı küf mantarları ve *C. neoformans* varlığı yönünden değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda çok sayıda üreyerek besiyerine hakim olan küf kolonileri tarama amaçlı kullanılan Staib besiyerine subkültüre edilmiştir. Pasajı yapılan küf kolonileri laktofenol pamuk mavisi ve selofan bant yöntemi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Agar difüzyon testinde kullanılmak üzere taramanın yapıldığı bölgeden kuru okaliptüs tohumları toplanmıştır. Tohumların üzerine yüzeylerini örtecek kadar distile su ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle kaynatılmıştır. Solüsyon süzülerek kaba partiküller uzaklaştırılmıştır. Kuru yapı ağırlığının son konsantrasyonu %1 olacak şekilde distile su ile seyreltilen infüzyona, %1.5 oranında agar ve %0.1 oranında bifenil ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C'da 15 dakika süreyle steril edildikten sonra Petri kutularına yaklaşık 6 mm kalınlığında dökülmüştür. Steril cam Pasteur pipeti yardımı ile 5 mm çapında kuyucuk açılarak kuyucuğun dibi aynı besiyeri ile 1 mm kalınlığında kapatılmıştır.

Çalışma başlangıcında Sabouraud dekstroza agar besiyerine *C. neoformans* ATCC 90112 kökeninden pasaj alınmıştır. 30°C'de 3 gün süreyle inkübe edilen *C. neoformans* ATCC 90112 serum fizyolojik içinde 1.0 Mac Farland ($\approx 10^6$ maya/ml) bulanıklık standardında hazırlanmıştır. Süspansiyon eküvyon yardımı ile hazırlanan kuyucuklar haricindeki besiyerlerinin yüzeylerine yayılmıştır.

Yukarıda tarif edilen okaliptüs tohumu infüzyon solüsyonundan agar ve bifenil içermeyen sıvı besiyeri haliyle 5 cc. hacimde tüplerde hazırlanarak aynı yöntemle steril edilmiştir. Test edilecek çevreden elde edilen saf küf kolonilerinden tüpteki besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 30°C'de 5

gün süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda yüzeyde oluşan küf üreme tabakası besiyerinden alınmış ve santrifüj edilerek kaba partiküller uzaklaştırılmıştır. Her küf kökeninin üretildiği besiyerindeki süpernatandan 75 µl hacim steril pipet yardımı ile açılan kuyucuklara aktarılmıştır. Bir hafta süre ile 30°C'de inkübe edilen besiyerlerinde *C. neoformans* ATCC 90112 kökeninde üreme inhibisyonunun varlığı araştırılmıştır.

BULGULAR

İncelenen bölgede okaliptüs ağaçlarından *C. neoformans* izolasyonu yapılamamıştır. Antikriptokokkal tarama için 70 farklı debrisden elde edilen 154 küf mantarı kökeni çalışmaya alınmıştır. Taranan 70 adet tohum debrisinden 60 köken *Cladosporium* sp, 22 köken *Alternea* sp, 16 köken *Exophiala* sp, 9 köken *Penicillium* sp, 9 köken *Ulacladium* sp, 6 köken *Aspergillus* sp, 3 köken *Stemphilum* sp, 3 köken *Rhizopus* sp, 3 köken *Aureobasidium* sp olarak tanımlanmıştır. İzole edilen küflerden 19 farklı çevresel köken için cins düzeyinde tanımlama yapılamamıştır. Bu kökenler de çalışmaya dahil edilmiştir. Doğal ortamlarından ayrılan küf kökenleri tanımlanan okaliptüs sıvı besiyerinde kolaylıkla üreyebilmiştir. Test edilen küf mantarlarının hiçbirinde *C. neoformans* ATCC 90112'nin üreme bölgelerinde inhibisyon alanı görülmemiştir.

TARTIŞMA

Cryptococcus neoformans özellikle immünsüprese hastalarda hayatı tehdit eden infeksiyonlar oluşturmaktadır. Mayanın yaşam döngüsü ile yapılan çok sayıda araştırmanın önemli bir kısmını da çevresel ortamlarda kolonizasyon için risk faktörü araştırmaları kapsamaktadır. Bilinen en önemli risk faktörleri güvercin dışkısı ile bulaşmış ortamlar ve bitki kaynaklı yapılarıdır (12). Ancak dünyanın çeşitli ülkelerinden benzer sonuçlar bildirilirken, farklı bölgelerden çok sayıda örnek ile yapılan farklı çalışmalarda da risk faktörü olarak kabul edilen ortamlarda kolonizasyonun bulunmadığına dair veriler elde edilmiştir (9, 13). Ülke-

mizde yapılan ökaliptus florası ilişkili *C. neoformans* var *grubii* izolasyonu, 1175 ağacın tarandığı sahalar içinde en düşük pH aralığına sahip (6.4-7.0) olan Gökova bölgesinden tek köken olarak izole edilebilmiştir (8, 14).

Alkalin yapı yanında farklı faktörlerin de bulunması *C. neoformans*'ın çoğalmasında baskılayıcı rol oynayabilmektedir. Taramalar için kullanılan bifenil içeren Staib besiyerinin aynı zamanda çeşitli küflerin üremesini engelleyememesi taramalar sırasında besiyerinde yoğun üreyebilen küf kolonilerinden anlaşılmaktadır. Besiyeri yardımı ile yapılan bu taramalarda küflerin ortama antifungal salgılama ihtimali, zaten alkalin doğal yapı nedeni ile az kolonizasyonun bekleneyeceği doğal ortamdan *C. neoformans*'ın izolasyonunu olumsuz etkileyecektir. Bu çalışmada kullanılan besiyerini oluşturan okaliptüs tohum içeriği *C. neoformans* ve çevresel küfler için besleyici faktörleri sağlamaktadır (15).

Bu çalışmada, küf kolonilerinde antikriptokokkal maddelerin varlığı bulunamamıştır. Farklı bir hipotez olarak, çevresel küflerin kriptokokların varlığını farketmeleri (quorum sensing) ve antikriptokokkal aktivite göstermeleri şeklinde olabilir. Ancak hedef alınan okaliptüs alanının büyüklüğü, ortamın tuz, pH ve nem gibi değişimleri benzer mekanizmaların tüm alan üzerinde "quorum sensing" mekanizmasına engel oluşturacaktır.

Bugün için kabul edilen veriler *C. neoformans*'ın ekolojik odaklarının çoğunlukla kanatlı çıkartıları ve bitki kaynaklı olduğudur. Yapılan çevresel çalışmalarda predispozan faktörlerin varlığına rağmen mayanın izole edilememesi, mayanın kolonizasyonuna ve üremesine engel beklenmeyen faktörlerin varlığını düşündürmektedir. Bu faktörlerin açığa çıkarılması, çevreye uygulanabilir hale getirilmesi, özellikle insan yerleşim yerlerinde maya kolonizasyonu için risk olduğu düşünülen bölgelerin dekontaminasyonu açısından önemlidir. Aynı zamanda bu faktörlerin bulunması, insanda *C. neoformans* enfeksiyonu varlığında korunma ve tedavi açısından yarar sağlayabilir. Sonuç olarak *C. ne-*

oformans'ın çevresel uygun ortamların varlığına rağmen izole edilmesindeki engellerin araştırılmasının, *C. neoformans*'ın yaşam döngüsünün öğrenilmesine yardımcı olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Ellis DH, Pfeiffer TJ: Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 336: 923 (1990).
2. Baró T, Torres-Rodriguez JM, Morera Y, Conception A, López O, Mendez R: Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J Clin Microbiol 37: 1170 (1999).
3. Viviani MA, Esposto MC, Cogliata M, Montagna MT, Wickes BL: Isolation of a *Cryptococcus neoformans* serotype A MATa strain from the Italian environment. Med Mycol 39: 383 (2001).
4. Passo LC, Pernice I, Gallo M, Barbara C, Luck FT, Criseo G, Pernice A: Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* strains in the Maltese Islands. J Clin Microbiol 35: 751 (1997).
5. Criseo G, Gallo M: Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). Mycoses 40: 95 (1997).
6. Velegraki A, Kiosses VG, Pitsouni H, Toukas D, Daniilidis VD, Legakis NJ: First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. Med Mycol 39: 419 (2001).
7. Mahmoud YA: First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. Mycopathologia 148: 83 (1999).
8. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, Kaleli İ, Gülbaba AG, Demirci M, Kaya S: The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia despite Taurus Mountains alkalinity. Mycopathologia 158: 43 (2004).
9. Hamasha AMS, Yıldırım ŞT, Gönülüm A, Saraçlı MA, Doğançlı L: *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of *Eucalyptus* trees

and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 158: 195 (2004).

10. Boekhout T, Scorzetti G: Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 35: 147 (1997).

11. Stumm C, Hermans JM, Middelbeek EJ, Croes AF, de Vries GJ: Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek* 43: 125 (1977).

12. Casadevall A, Perfect JR: Ecology of *Cryptococcus neoformans*. "Casadevall A, Perfect JR (eds): *Cryptococcus neoformans*", p41, American Society of Microbiology, Washington DC (1998).

13. Kielstein P, Hotzel H, Khaschabi D, Glawischnig W: Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pi-

geons and pet birds. *Mycoses* 43: 7 (2000).

14. Avcıoğlu E, Gürses MK, Gülbaba AG, Genç A, Özkurt N, Özkurt A: Türkiye’de okaliptüslerin yetişebileceği bölgelerde tür ve orijin seçimi üzerine araştırmalar. *Teknik Bülten* No: 1, Tarsus, (1994).

15. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Mete E: *Cryptococcus neoformans* serotipleri için büyüme dinamiklerinin incelenmesinde okaliptüs infüzyon besiyerinin kullanımı. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 3-6 Mayıs 2005, Konya: Çatı Grafik, (2005).