

# DENİZLİ ŞEHİR MERKEZİNDE KOVUKLU AĞAÇ GÖVDELERİNDEN CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS İZOLASYONU\*

## ISOLATION OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* FROM LIVING TREE TRUNK HOLLOWES IN DENİZLİ CITY CENTER, TURKEY

Çağrı ERGİN<sup>1</sup>, İlknur KALELİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli. (cagri@pau.edu.tr)

### ÖZET

*Cryptococcus neoformans* insan ve hayvanlarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturan bazidiomiset bir maya mantarıdır. Bu maya mantarı, dünyanın çeşitli bölgelerindeki ağaçların çürüyen oyuk ve yarıklarından izole edilmiştir. Mayanın Akdeniz'in doğu bölgelerinden izolasyonu çok azdır. Varlığından şüphelenilen bölgelerde yaklaşık 10 yıldır ardarda sürdürülen sistematik taramalar ile sadece çiçeklenme dönemindeki bir *Eucalyptus camaldulensis* debrisinden *C.neoformans* suşu izole edilebilmiştir. Bu çalışmada; Temmuz 2008 döneminde Denizli il yerleşiminde bulunan, üzerinde kovuk ve derin yarıkların bulunduğu 300 ağacın *C.neoformans* kolonizasyonu yönünden taranması amaçlanmıştır. Ağaçların kovuk ve yarıklardan eküvyon tekniği ile alınan örnekler minimal Staib agar besiyerine (kreatinin ve potasyum dihidrojen fosfat içermeyen) ekilmiş ve örneklerin %0.6 (2/300)'sından *C.neoformans* izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatların biri *Platanus orientalis* (doğu çınarı; n= 92), diğeri ise *Punica granatum* (nar; n= 2) ağacından elde edilmiştir. *P.orientalis*'ten yapılan izolasyonda petri plağında 6 koloni *C.neoformans* saptanırken, *P.granatum*'dan 3 koloni izole edilmiştir. İzolasyonların yapıldığı ağaçlardan iki ay sonra alınan kültürlerde üreme olmamıştır. Bu çalışma sonucunda, her ne kadar daha önceden literatürde bildirilmeyen iki ağaçtan (*Platanus orientalis* ve *Punica granatum*) *C.neoformans* izolasyonu yapılmış olsa da, Denizli şehir merkezindeki ağaçların florasında *C.neoformans*'ın kolonizasyonuna sık rastlanmadığı gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Cryptococcus neoformans*, çevresel kolonizasyon, *Platanus orientalis*, *Punica granatum*, ağaç, kovuk, Türkiye.

### ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous yeast leading to life-threatening infections in human and animals. It has been isolated from decaying hollows and fissures from various tree species in different parts of the world. The isolation of the yeast from the environment is less in the eastern part of Me-

\* Bu araştırma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: 2007TPF009) desteklenmiştir.

diterranean area. Only one *C. neoformans* strain from debris of *Eucalyptus camaldulensis* in the blossoming period, has been reported by consecutive studies done in suspected areas since the last 10 years. In this study, 300 tree including trunk hollows and fissures have been screened for colonization of *C. neoformans* in Denizli city (located on Aegean part of Turkey) center during July 2008. All samples has been collected by swabbing technique and cultured on minimal Staib agar medium (without creatinine and potassium dihydroden phosphate). Two (0.6%) strains of *C. neoformans* have been isolated from the total of 300 screened trees. One of these isolates was from *Platanus orientalis* (plane tree; n= 92) and one from *Punica granatum* (pomegranate tree; n= 2). Six and three colonies per plate have been isolated from *P.orientalis* and *P.granatum* samples, respectively. *C. neoformans* has not been isolated in the repeat cultures done in the following two months. Although *C. neoformans* was isolated from previously unaccomplished niches in this study, our results suggested that *C. neoformans* colonization of trees trunk hollows and fissures was not common in Denizli city center.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, environmental colonization, *Platanus orientalis*, *Punica granatum*, tree, hollow, Turkey.

## GİRİŞ

*Cryptococcus neoformans* heterotallik bazidiomiçetes sınıfından, yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturabilen kapsüllü bir maya mantarıdır. İnsanlara, kolonize olduğu çevresel odaklardan havaya karışan yapılarının solunum yolu ile alınması sonucu bulaşır. Kolonize olduğu ağaç ortamı, maya mantarının yaşam döngüsünü ve virülansını da etkiler. *C. neoformans*'ın doğada çoğaldığı konaktaki genotipik özellikleri, basidiosporların enfeksiyöz oluşumları ve eşey şekilleri çevresel konağa göre değişim göstermektedir<sup>1-3</sup>. Bu nedenle farklı çevresel kolonizasyon odaklarının bulunması; mayanın henüz tam olarak belirlenemeyen yaşam siklusunu saptamak ve enfeksiyöz basidiosporların oluşumunu anlamaya yardımcı olacaktır.

*C. neoformans*'ın doğal ortamda kolonize olduğu ortamlar kanatlı (çoğunlukla güvercin) dışkıları ile kontamine bölgeler ve ağaç (çoğunlukla *Eucalyptus* spp.) florasıdır<sup>1</sup>. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalar ile *C. neoformans* güvercinliklerden, arı kovanlarından ve Gökova bölgesindeki *Eucalyptus camaldulensis* florasından izole edilebilmiştir<sup>4-9</sup>. Çeşitli ülkelerde okaliptüs florası dışında farklı ağaçlardan da izole edilmiştir. Bu izolasyonların canlı ağaçların oyuklarından yapılabilmesi, mikroklimatize ortamlarda *C. neoformans*'ın doğada kolaylıkla çoğalabildiğini açıklamaktadır<sup>10-12</sup>. Bu sonuç doğadan insana bulaşan mayalar için önemli bir odağın varlığını göstermektedir. Ülkemizde bu konuda yürütülen iki ayrı çalışmada izolasyon yapılamamıştır<sup>13,14</sup>.

Bu çalışma; kent yerleşimi içinde risk faktörü olabileceği düşünülen farklı ağaç türlerinde *C. neoformans*'ın varlığının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Denizli il merkezinde, insan yerleşimlerinin olduğu ve halka açık bölgelerde, üzerinde oyuk ve/veya kovuk bulunan 300 ağaç [92 *Platanus orientalis* (çınar, doğu çınarı), 49 *Morus* spp. (dut), 40 *Tilia* spp. (ıhlamur), 38 *Olea europaea* (zeytin), 13 *Pistacia terebinthus* (menengiç, çitlik), 11 *Acer* spp. (akçaağaç), 8 *Eucalyptus camaldulensis* (okaliptüs), 6

*Robinia pseudoacacia* (salkım ağacı, beyaz çiçekli yalancı akasya), 6 *Ficus carica* (incir), 6 *Juglans regia* (ceviz), 5 *Quercus* spp. (meşe), 4 *Aesculus* spp. (at kestanesi), 6 *Salix* spp. (söğüt), 4 *Fagus* spp. (kayın), 3 *Phoenix dactylifera* (hurma), 2 *Cydonia oblonga* (ayva), 2 *Juniperus* spp. (ardıç), 2 *Pauwlonia tomentosa* (pavlonya, Çin kavağı), 2 *Punica granatum* (nar), 1 *Prunus avium* (kiraz)] araştırmaya alındı. Araştırma 2008 yılı Temmuz ayı içinde yürütüldü.

Araştırmaya alınan ağaçlardan eküvyon yöntemi ile örnekleme yapıldı<sup>12</sup>. Bu yöntemle göre; yaklaşık 2 mm kalınlığında, ortalama 30-40 cm uzunluğunda bambu çubuklar temin edildi. Bu çubukların bir uçları pamuk ile eküvyon haline getirilerek 10'luk paketler halinde, otoklavda 121°C'de, 15 dakika süre ile steril hale getirildi. Çevresel örneklerin alımı sırasında hazırlanan eküvyon, gentamisin (25 mg/l) içeren steril %0.9 NaCl ile ıslatılıp ağacın kovuğundan farklı bölgelere sürterek örnekleme yapıldı. Üzerinde delik ve derin yarık bulunan ağaçların yarıklarından da aynı yöntemle örnek alındı. Alınan örnekler, içinde 5-10 ml steril %0.9 NaCl bulunan steril cam tüpler içinde taşındı ve oda sıcaklığında, en fazla üç saat içinde işleme alındı. Her örnek, eküvyon içinden çıkarıldıktan sonra vortekslendi ve oda sıcaklığında 30 dakika çökelmeye bırakıldı. Sıvının yüzeyinden 100 µl alınarak %0.01 bifenil ve %0.5 kloramfenikol içeren, 9 cm çapında petri plağında hazırlanan, basitleştirilmiş Staib agar (kreatinin ve potasyum dihidrojen fosfat içermeyen) besiyerine ekildi. Örnekler, 28°C'de 15 gün inkübe edildi. Besiyeri kontrolünde *C.neoformans* ATCC 90112 suşu kullanıldı. *C.neoformans* Staib agar besiyerinde; kahverengi pigment oluşturmaması, üreaz aktivitesi varlığı, 37°C'de üreyebilme ve hif oluşturmama özelliklerine göre tanımlandı. *C.neoformans*'ın *Cryptococcus gattii*'den ayırımında kanavanin-glisin-bromtimol (KGB) agar kullanıldı<sup>15</sup> (*C.gattii* KGB besiyerinde kanavanin direnci varlığı ve glisin kullanımı ile ürer ve besiyerinin rengi yeşilden sarıya dönüşür; *C.neoformans* ise KGB besiyerinde üremez). KGB besiyeri kontrolünde *C.neoformans* ATCC 90112 ve *C.gattii* NIH18C suşları kullanıldı.

İzolasyon yapılan ağaçlardan iki ay sonra yine aynı yöntem ile örnekler alındı ve aynı işlemler tekrarlandı.

## BULGULAR

Çalışmada, Denizli şehir yerleşimi içinde 17 farklı bölgede saptanan 300 kovuklu ağaçtan 321 örnek alınmıştır (Tablo I). Anıt ağaç olarak yerel yönetimler tarafından tes-cil edilmiş 40 doğu çınarı (*Platanus orientalis*) ağacı üzerinde farklı zamanlarda oluşturulmuş yaş saptama delikleri (yaklaşık 1 cm çapında, ağacın gövdesine dik 15-30 cm derinliğinde) bulunmuştur.

Örnekleme yapılan ağaçların 2 (%0.6)'sinden [*Platanus orientalis* (doğu çınarı) ve *Punica granatum* (nar) ağaçlarından] *C.neoformans* izolasyonu yapılmıştır. Üzerinde derin yaş saptama delikleri bulunan ağaçlardan izolasyon yapılmamıştır. *P.orientalis*'ten yapılan izolasyonda besiyerinde toplam 6 koloni, *P.granatum*'da ise 3 koloni *C.neoformans* saptanmıştır. Her iki izolatin da KGB agar besiyerinde üremediği, besiyerinde renk değişimi olmaması ile saptanmıştır.

**Tablo 1.** Literatürde *Eucalyptus* spp. Dışında *Cryptococcus neoformans* İzolasyonu Yapılan Ağaç Türleri

Ağaç türü	İzolasyon oranı*
<i>Acacia nilotica</i> (dikenli akasya, <i>Fabaceae</i> )	2/14 ◇ 2/4 ◇ 3/4 <sup>(17)</sup>
<i>Aegle marmelos</i> (hint ayvası, <i>Rotaceae</i> )	1/1 ◇ 4/4 <sup>(17)</sup>
<i>Alstonia scholaris</i> (hint şeytan ağacı, <i>Apocynaceae</i> )	1/19 <sup>(17)</sup>
<i>Anadenanthera peregrina</i> ( <i>Fabaceae</i> )	1/3 <sup>(20)</sup>
<i>Azadirachta indica</i> (yalancı tespih ağacı, <i>Meliaceae</i> )	1/5 ◇ 7/20 ◇ 4/5 <sup>(17)</sup>
<i>Butea monosperma</i> (ateş ağacı, <i>Fabaceae</i> )	1/2 ◇ 1/1 <sup>(10)</sup>
<i>Caesalpinia peltophoroides</i> ( <i>Fabaceae</i> )	1/8 <sup>(20)</sup>
<i>Cassia fistula</i> (yağmur sinamekisi, <i>Fabaceae</i> )	8/19 ◇ 3/4 ◇ 4/4 <sup>(17)</sup> ; 1/22 <sup>(24)</sup>
<i>Cassia grandis</i> ( <i>Fabaceae</i> )	5/7 <sup>(10)</sup>
<i>Dalbergia sissoo</i> (tali, <i>Faboideae</i> )	1/13 <sup>(17)</sup>
<i>Ficus microcarpa</i> ( <i>Moraceae</i> )	2/12 <sup>(10)</sup>
<i>Ficus religiosa</i> (bo ağacı, <i>Moraceae</i> )	1/15 <sup>(17)</sup> ; 3/17 <sup>(27)</sup>
<i>Manilkara hexandra</i> ( <i>Sapotaceae</i> )	2/6 ◇ 7/10 <sup>(17)</sup>
<i>Mangifera indica</i> (mango, <i>Anacardiaceae</i> )	1/7 ◇ 3/4 <sup>(17)</sup> ; 6/45 <sup>(24)</sup> ; 1/8 <sup>(26)</sup>
<i>Mimusops elengi</i> (İspanyol kirazı, <i>Sapotaceae</i> )	1/13 ◇ 4/4 ◇ 5/6 ◇ 8/8 ◇ 8/9 <sup>(17)</sup>
<i>Phoenix</i> spp. ( <i>Arecaceae</i> )	1/8 <sup>(18)</sup>
<i>Polyalthia longifolia</i> ( <i>Annonaceae</i> )	5/18 ◇ 17/30 ◇ 10/14 <sup>(17)</sup>
<i>Senna multijugga</i> ( <i>Fabaceae</i> )	1/2 <sup>(10)</sup>
<i>Syzygium cumini</i> (java Kirazı, <i>Myrtaceae</i> )	11/67 <sup>(16)</sup> ; 1/7 <sup>(27)</sup> ; 2/50 <sup>(24)</sup> ; 1/12 ◇ 1/9 <sup>(26)</sup> ; 4/12 ◇ 1/14 ◇ 2/7 ◇ 1/1 ◇ 2/8 <sup>(27)</sup> ; 2/8 <sup>(28)</sup>
<i>Tamarindus indica</i> (demirhindi, <i>Fabaceae</i> )	1/2 <sup>(10)</sup> ; 2/45 <sup>(24)</sup> ; 2/10 ◇ 1/7 <sup>(26)</sup>
<i>Terminalia arjuna</i> ( <i>Combretaceae</i> )	1/4 <sup>(24)</sup>
<i>Tipuana tipu</i> ( <i>Fabaceae</i> )	2/71 <sup>(18)</sup>

\* İzolasyon sayısı/örnekleme yapılan ağaç sayısı; zaman içinde tekrarlayan izolatlar "◇" ile ayrılmıştır; kaynaklar "(xx)" ile belirtilmiştir.

İzolasyonların yapıldığı ağaçlardan iki ay sonra alınan kültürlerde *C. neoformans* üremesi saptanmamıştır.

## TARTIŞMA

*C. neoformans*'ın yaşam döngüsü içinde çevresel ortamdan insana bulaşmasında en önemli basamak; olumsuz çevre şartlarına rağmen çoğalabileceği uygun ortamlardır<sup>1,2,10-12</sup>. Bu maya mantarı ağaçlardaki selüloz ve lignini parçalayarak doğada yaşamına devam edebilir<sup>1-3</sup>. Okaliptüs florasından mayanın sık olarak izole edilmesi, kolaylaştırıcı etmen olarak ağaçlarda kolonizasyonun araştırılmasına neden olmuştur. *C. neoformans*'ın çevresel ortamda kolonize olarak çoğaldığı odun yapının; eşeyli şekillerinin bulunabilmesi, doğada yayılımı ve patojenitesi için önemli olduğu öne sürülmüştür<sup>2,3</sup>.

*Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı mayaların bitki hormonlarına duyarlı olduğu, indol-3-asetik asitin mayanın invazif bir şekilde çoğalmasına yol açtığı bilinmektedir<sup>16</sup>. Benzer şekilde, *C.neoformans*'ın da bitki yapılarındaki inositol ve indol-3-asetik asit ile birlikte, ayrıca ışığın da yardımı ile eşeyli sporlanma yapabileceği ve insana bulaşacak yapıların oluşabileceği düşünülmektedir<sup>2</sup>. Burada anahtar rolü, mayanın kolonize olduğu ağacın türünün ve dolayısıyla yapısındaki besin kaynağı farklılıklarının oynadığı belirtilmektedir<sup>3</sup>. Ağaçlardan toplama ve sedimentasyon yöntemi ile yapılan örneklemelerde, az sayıda izolatin elde edilmesi nedeniyle farklı yöntemler denenmiş, eküvyon ile örnekleme sonucunda daha yüksek izolasyon oranı sağlanmıştır. Eküvyon ile örneklemede, mayanın yoğun olduğu bölgelere daha kolay ulaşılabilirdiği, doğrudan güneş ışığı gibi olumsuz faktörlerden uzak kalarak örnekleme yapılabilmesinin, izolasyon oranını artırdığı düşünülmektedir<sup>12</sup>. Ülkemizde sedimentasyon ve eküvyon ile okaliptüs florasyndan *C.neoformans* araştırmaları yapılmış, ancak sedimentasyon yöntemi ile tek bir örnekten bir suş izole edilebilmiştir<sup>4,8,13</sup>. Çevresel izolasyonun yapılamadığı okaliptüs ormanı içerisindeki bal arısı (*Apis mellifera*) kolonilerinden ise eküvyon yöntemi ile maya ayrılabilmiştir<sup>9</sup>.

Özellikle Hindistan, Brezilya, Arjantin ve Kolombiya gibi ülkelerde uzun sürelere yayılan çalışmalar ile çeşitli ağaçlardan *C.neoformans* izolasyonları yapılmıştır<sup>17-21</sup>. Okaliptüs dışındaki ağaçlardan izole edilen *C.neoformans* suşlarının izolasyon oranları ve uzun süreli ve/veya tek seferlik izolasyon durumları Tablo I'de görülmektedir. İzolasyon oranlarına kaynaklarda rastlanmayan, ancak *C.neoformans* izolasyonunun yapıldığı bildirilen ağaçlar arasında *Tachigali myrmecophila* (*Fabaceae*), *Miroxylon peruiferum* (*Fabaceae*), *Theobroma cacao*, (kakao ağacı, *Malvaceae*) yer alır<sup>22</sup>. İzolasyon, genellikle ağaçların kovuklu bölgelerinden yapılmıştır. Kovukların dış ortamın olumsuz etkilerinden koruyarak, özellikle sıcak iklimlerde yüksek nemli ve ılık bir ortam oluşturarak mikroklimatik ortamda mayanın yaşamına olanak sağladığı ve kolonizasyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. *C.neoformans*'ın kanatlı dışkılarındaki kolonizasyonunda kreatininin oynadığı role benzer olarak, ağaçlardaki kolonizasyonunun da lakkaz aktivitesi ile odun yapısının parçalaması ve çürümesi sonucu oluştuğu öne sürülmektedir<sup>18,23</sup>. İzolasyon yapılan bölgeler genellikle tropikal, subtropikal veya kurak iklime sahip bölgelerdir. Bu maya mantarı, sıcak bölgelerde nemli ortamda, soğuk bölgelerdeki kovuklara göre daha sık bulunur. Yağışlı geçen ılıman iklim dönemlerinin, mayanın kolonizasyonunda önemli olduğu bildirilmiştir<sup>18</sup>. Ülkemizde benzer iklim özelliklerine sahip bölgeler Ege ve Akdeniz bölgeleridir. Geniş okaliptüs bitki örtüsüne ve sıcak/nemli iklimde eski, içi oyulmuş büyük kovuklu ağaçların olmasına rağmen, bu bölgelerde yapılan saha araştırmalarında *C.neoformans* izolasyonu yapılamamıştır<sup>24</sup>. Eski, anıtsal özellik taşıyan, üzerinde büyük kovukların bulunduğu ağaçların taranması sonucunda da mayaya rastlanmamıştır<sup>14</sup>.

Çalışmamızda, daha önce dünyanın farklı bölgelerinden *C.neoformans* kolonizasyonu olduğu bildirilen ağaçlar da araştırmaya alınmış, ancak bu ağaçlardan izolasyon yapılamamıştır. Buna karşın, daha önce *C.neoformans* kolonizasyonu bildirilmeyen doğu çınarı (*Platanus orientalis*) ve nar (*Punica granatum*) ağaçlarından *C.neoformans* izole edilmiştir. Çalışmamızda, kültürlerde elde edilen koloni sayısı, diğer çalışmalarda rapor edilenlere göre düşük bulunmuş; ancak ağaçların bulunduğu bölgelerdeki iklim şartlarının,

mayanın ortamda bulunabilmesi için yeterli olduğu düşünülmüştür. Granados ve Castañeda<sup>19</sup>, dış ortam neminin yüksek olmasının, çevresel mikrobiyal üremeye yol açarak maya üremesini inhibe edebileceğini ifade etmektedir.

Bölgemizde, örnekleme yapıldığı dönemlerde ortalama sıcaklıklar 20-25°C arasındadır. Mayanın çevresel ortamlardan sık izole edildiği bölgelerde, izolasyon sıklığının mevsimsel olarak değiştiği belirtilmektedir. Kolombiya'da yapılan bir çalışmada<sup>19</sup> sıcaklığın 9-16°C arasında; Hindistan'da<sup>24</sup> ise sıcaklığın 15-33°C arasında değiştiği dönemlerde maya izolasyonlarının yapıldığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, tekrarlayan kültürlerde üremenin olmaması, bölgemizdeki ağaç florasında saptanan mantar kolonizasyonunun süreklilik göstermediğini ve farklı çevresel faktörlere bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde de, kolonizasyonun 0.7-2.5 yıllık süre içinde zaman zaman tekrarlandığı bir grup ağaç türü olduğu ya da izolasyonun tekrar yapılamadığı farklı ağaç türlerinin olduğu bildirilmektedir<sup>17</sup> (Tablo I). Buna karşın, bu konuda uzun süreli araştırma yapan çalışmacılar, mevsimsel özelliklere bağlı olarak *C.neoformans*'ın doğada kolonizasyonunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi için daha geniş çaplı ve uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğunu da vurgulamaktadırlar<sup>9,17,21,24,25</sup>.

Sonuç olarak *C.neoformans*, ülkemizde ağaç florasından az izole edilebilen bir mayadır. Doğu çınarı ve nar ağaçlarından birer izolasyonun yapılabilmesi, mayanın farklı iklim ve coğrafyada farklı bitkilerde bulunabileceğini, cinse veya türe özgü seçicilik göstermediğini düşündürmektedir. Bu nedenle, özellikle subtropik ve ılıman bölgelerimizde farklı floralardan eküvyon yöntemi ile araştırılmasının ve mayanın risk oluşturabileceği bölgelerin saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol 2006; 60: 69-105.
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.
3. Botes A, Boekhout T, Hagen F, Visser H, Swart J, Botha A. Growth and mating of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* on woody debris. Microb Ecol 2009; 57: 757-65.
4. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, et al. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia despite Taurus Mountains alkalinity. Mycopathol 2004; 158: 43-7.
5. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. I. Kısım. *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklardan izolasyonu. Tübitak VI. Bilim Kongresi 1977, Ankara. Tıp Araştırmaları Tebliğleri, s: 839-66.
6. Yıldırım ST, Saraçlı MA, Gönülüm A, Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. Med Mycol 1998; 36: 391-4.
7. Koç AN, Durkut S. Kayseri yöresindeki güvercinliklerde *Cryptococcus neoformans*, diğer medikal önemli üretilen mayaların ve *Histoplasma capsulatum*'un araştırılması. İnfeksiyon Derg 2001; 15: 335-40.
8. Karaca Deric Y, Tümbay E. İzmir ilinde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. İnfeksiyon Derg 2008; 22: 53-8.
9. Ergin Ç, İlkit M, Kaftanoğlu M. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. Mycoses 2004; 47: 431-4.

10. Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathol* 2000; 151: 63-9.
11. Lazéra MS, Pires FD, Camillo-Coura L, et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 127-31.
12. 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.
13. Ateş A, Turaç Biçer A, İlkit M. Sedimentasyon ve eküvyon yöntemleri ile okaliptüs ağaçlarında *Cryptococcus* spp. varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 655-60.
14. Ateş A, Ergin Ç, İlkit M. Anadolu anıt ağaçlarında *Cryptococcus neoformans*'ın araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2006; 20: 57-60.
15. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-7.
16. Prusty R, Grisafi P, Fink GR. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 4153-7.
17. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, et al. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol* 2008; 46: 823-33.
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.
19. Granados DP, Castañeda 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.
20. 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.
21. Granados DP, Castañeda 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.
22. Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol* 2000; 38: 67-77.
23. Randhawa HS, Kowshik T, Preeti Sinha K, et al. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol* 2006; 44: 623-30.
24. Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathol* 2007; 164: 159-70.
25. Hiremath SS, Chowdhary A, Kowshik T, Randhawa HS, Sun S, Xu J. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. *Microbiology* 2008; 154: 1513-24.
26. 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.
27. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2003; 41: 199-209.
28. Girish Kumar CP, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. *Mycoses* 2009; [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01699.x