

Çevresel Örneklerde *Cryptococcus neoformans* Taramaları İçin Patlıcan (*Solanum melongena*) Agarın Yeni Bir Besiyeri Olarak Değerlendirilmesi*

Evaluation of a New Medium, Eggplant (*Solanum melongena*) Agar as a Screening Medium for *Cryptococcus neoformans* in Environmental Samples

Mustafa ŞENGÜL¹, Çağrı ERGİN¹, Tuğba KARTAL²

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli.

² Pamukkale University Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Denizli, Turkey.

* Bu çalışma, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (5-8 Haziran 2012, Ankara)'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 15.01.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.03.2014

ÖZET

Cryptococcus neoformans, özellikle bağımsızlık sistemi baskılanmış kişilerde hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilen kapsüllü bir maya mantarıdır. Enfeksiyonların, çevresel ortamdan solunum havasına bulaşması ile oluştuğu kabul edilmektedir. Bilinen çevresel odaklar kanatlı çıkartıları, ağaçlarda çürüyen kovuklar ve topraktır. Öncül maddeleri içeren besiyeri ortamında kahverengi pigmentli maya oluşumu, *C. neoformans*'ın hızlı tanımlanmasında önemli bir basamaktır. Bu besiyerlerinin yapımında, kolay ulaşılabilir ve ekonomik olmaları nedeniyle bitki tohumları tercih edilmektedir. *Guizotia abyssinica* (Nijer tohumu, kuşyemi) ile Staib agar, *Helianthus annuus* (Ayçiçeği) ile Pal besiyeri, *Brassica nigra* (Hardal) tohumu agar, tütün agar, *Mucuna pruriens* (Kadife fasulye) tohumu agar, *Perilla frutescens* (Çin fesleğeni) tohumu agar, *Rubus fruticosus* (Böğürten) agar ve öğütülmüş kırmızıbiber agar *C. neoformans*'ın pigment yapımına dayalı olarak ayırımını sağlayan seçici besiyerleridir. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde yaygın olarak bulunan patlıcandan (*Solanum melongena*) elde edilen yeni bir besiyerinde *C. neoformans*'ın pigment yapımının araştırılması ve kolonize olduğu çevresel ortamlardan izolasyonunda Staib, Pal ve tütün agarlarla performanslarının karşılaştırılmasıdır. Araştırmaya 3 farklı patlıcandan (*S. melongena* Melanzaza viserba, *S. melongena* Pinstripe F1 ve *S. ovigerum* Ivory F1) hazırlanan besiyerleri alınmıştır. Ülkemizde sürekli kolonizasyonun bulunduğu Gökova-Akyaka bölgesindeki 19 *Eucalyptus camaldulensis* ağacının kovuklarından sürüntü tekniği ile alınan örnekler, patlıcan besiyeri ile Staib, Pal ve tütün agar besiyerlerine eklenmiştir.

İletişim (Correspondence): Dr. Mustafa Şengül, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye. Tel (Phone): +90 258 296 2580, E-posta (E-mail): msengul@pau.edu.tr

Araştırmaya alınan türlerden *S.melongena* Melanzaza viserba ve *S.melongena* Pinstripe F1 ile yapılan besiyerlerinde *C.neofomans* pigment oluştururken, *S.ovigerum* Ivory F1'den yapılan besiyerinde pigment oluşumu gözlenmemiştir. Kolonizasyon bölgesindeki 19 *E.camaldulensis* ağacının 11 (%57.9)'inden basit Staib agar, basit Pal agar ve patlıcan agar ile izolasyon yapılabilirken, tütün agar ile 10 (%52.6) örnekten izolasyon yapılabildiği. Benzer şekilde *C.neofomans* üremesi, basit Staib, basit Pal ve patlıcan agar besiyerlerinde sırasıyla 51, 57 ve 48 koloni oluşturan ünite (cfu)/petri plağı (ortanca değer) olarak saptanırken, tütün agarda daha az sayıda (33 cfu/petri) koloni üremesi saptanmıştır. Patlıcan agar besiyerinin *C.neofomans*'ı çevresel ortamlardan ayırabilme yeteneği, basit Staib ve Pal agar besiyerlerinden farklı bulunmamıştır ($p= 0.71$). Sonuç olarak çevresel izolasyon taramalarında yaygın olarak kullanılan Staib agar ve Pal agar besiyeri ile birlikte patlıcan agar besiyeri de kolaylıkla hazırlanarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: *Cryptococcus neoformans*; patlıcan; *Solanum melongena*; pigment; çevresel izolasyon; besiyeri.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast-like fungus that causes life-threatening infections, especially in immunosuppressive patients. *C.neofomans* infection is believed to be acquired via inhalation of aerosolized particles from the environment. Avian guano, decaying tree hollows and soil are the related known environmental niches. Brown pigmented yeast growth from the precursors in growth media is an important step for the identification and isolation of *C.neofomans*. Seeds of plants in nature are preferred owing to easy accessibility and low costs for the preparation of such media. *Guizotia abyssinica* (Niger seed) as Staib agar, *Helianthus annuus* (Sunflower) as Pal's medium, *Brassica nigra* (Mustard) agar, tobacco agar, *Mucuna pruriens* (Velvet bean) seed agar, *Perilla frutescens* (Beefsteak plant) seed agar, *Rubus fruticosus* (Blackberry) agar and ground red hot pepper agar are pigment-based selective media for the differentiation of *C.neofomans*. The aim of this study was to observe the pigment production of *C.neofomans* in a new medium based on eggplant (*Solanum melongena*) and also to compare its performance with the simplified Staib, Pal's and tobacco agar for isolation from the environment. Three different eggplant-based medium (*S.melongena* Melanzaza viserba, *S.melongena* Pinstripe F1 and *S.ovigerum* Ivory F1) were included in the study. Pigment-forming eggplant medium, simplified Staib agar, Pal's agar and tobacco agar were used for the cultivation of the environmental swabbed samples from 19 *Eucalyptus camaldulensis* trunk hollows in continuous colonization region. While pigment formation were observed with *S.melongena* Melanzaza viserba and *S.melongena* Pinstripe F1 containing media, *S.ovigerum* Ivory F1 medium was found to be non-reactive. In colonization area (Gökova-Akyaka, Turkey), 11 (57.9%) out of 19 *E.camaldulensis* samples were positive with simplified Staib agar, Pal's agar and eggplant agar while 10 (52.6%) of them are positive with tobacco agar. *C.neofomans* colony forming unit (cfu) per plate were found as 51, 57 and 48 (median values) on simplified Staib agar, Pal's agar and eggplant agar, respectively, while tobacco agar has lower performance with 33 cfu/petri. No statistically significant difference were found between simplified Staib agar, Pal's agar and eggplant agar's performances for *C.neofomans* isolations from the nature ($p=0.71$). In conclusion, easily prepared eggplant agar is as functional as widely used media such as simplified Staib agar and Pal's agar for the isolation of *C.neofomans* from the natural environment.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; eggplant; *Solanum melongena*; pigment; environmental isolation; medium.

GİRİŞ

Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış konakta hayatı tehdit edebilen enfeksiyonlara neden olan *Cryptococcus neoformans* ve sağlıklı bireylerde de enfeksiyon oluşturabilen

C.gattii kapsüllü maya mantarlarıdır. Melanin, *C.neoformans* kökenlerinin önemli bir patojenite faktörü olup, aynı zamanda bu mantarı doğada ultraviyole gibi çeşitli zararlı etkilere de korumaktadır¹. Çevresel ortamdaki para- ve orto-difenollerini sağlayan besiyeri ortamları, azot kaynağı ile birlikte tanınal mikrobiyolojide kullanılmaktadır². Tomurcuklanarak çoğalan bu maya benzeri mantar hücreleri 3-6 µm çaplı, konakta ve sentetik bazı besiyerlerinde geniş polisakarit kapsülle çevrili hücrelerden oluşan S tipi, konveks, sarıdan kahverengiye kadar değişen renkli koloniler oluşturmaktadır. Yapısında bulunan fenol oksidaz gibi farklı enzim aktiviteleri ile kültür ortamına ilave edilen öncül maddelerden kahverengi melanin pigmenti oluşturması *C.neoformans* için ayırt edici ve karakteristik bir özelliktir^{3,4}. Bu pigmentler ultraviyole ışık (UV), oksitleyici maddeler ve iyonize radyasyon gibi çok çeşitli çevresel baskılara karşı savunma sağlayan patojeniteden sorumlu organizmaya ait hücre duvarında yer alan yapısal moleküldür^{1,2}.

Melanin gibi kahverengi-siyah pigmentlerin sentezinde öncül olabilecek maddeleri içeren farklı besiyerleri, çevresel ve klinik *C.neoformans* varlığının araştırılmasında kullanılmaktadır^{1,2}. Bu besiyerleri arasında, günlük hayatta kullanılan bitki ve tohumları içeren formülasyonlar önemli yer tutar; zira hem malzemelerin sağlanması kolay hem de maliyeti diğer kimyasal içerikli besiyerlerine göre daha düşüktür. *Guizotia abyssinica* (Nijer tohumu, kuşyemi) ile Staib agar^{3,4}, *Helianthus annuus* (Ayçiçeği) ile Pal besiyeri^{5,6}, *Brassica nigra* (Hardal) tohumu agar⁷, Tütün agar⁸, *Mucuna pruriens* (Kadife fasulye) tohumu agar⁹, *Perilla frutescens* (Çin fesleğeni) tohumu agar¹⁰, *Rubus fruticosus* (Böğürtlen) agar¹¹ ve öğütülmüş kırmızıbiber agar¹² bunlara örnektir. Bu besiyerlerinde *C.neoformans*'ın hangi öncül maddelerden pigment oluşturduğu ise tam olarak belirlenememiştir. 2,3- ve 3,4- dihidroksibenzoik asit ve delfinidin bu öncül maddelerdendir^{1,2,11}.

Patlıcan (*Solanum melongena* L.) *Solanacea* ailesi içinde yer alan tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılmış farklı genotiplere sahip 90 cins ve 2500 tür içeren bir bitkidir. Ülkemizde 12 cinsine ait 36 türü bilinmektedir. Bu bitkinin, milattan sonra 6. yüzyılda Arap tüccarlar tarafından İpekyolu üzerinden Ortadoğu, Afrika ve Avrupa'ya yayıldığı düşünülmektedir¹³⁻¹⁵. Sunulan çalışmada, ülkemizde yerel olarak bilinen ve yaygın olarak yetiştirilen üç farklı patlıcan meyvesinden hazırlanan besiyerlerinde *C.neoformans*'ın pigment oluşturması ve bu besiyerlerinin çevresel ortamdan *C.neoformans* izolasyonundaki başarısı değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma; (1) *C.neoformans* kökenleri ile farklı *S.melongena* türlerinden hazırlanan besiyerlerinde pigment oluşumunun araştırılması ve (2) Çevresel olarak sık *C.neoformans* izolasyonunun yapıldığı bölgede farklı ayırıcı besiyerleri ile yeni besiyerinin performanslarının karşılaştırılması olmak üzere iki aşamada yürütüldü. İlk aşamada, 3 farklı patlıcan türü/alttürü (*S.melongena* Melanzaza viserba, *Solanum ovigerum* Ivory F1 ve *S.melongena* Pinstripe F1) araştırmaya alındı. Her türün dış kabukları 50 g/L distile su içinde 30 dakika süre ile kaynatıldı. Gazlı bez ile süzöldükten sonra 1 L'ye tamamlandı. İçine dekstroz (1.0 g/L), KH₂PO₄ (1.0 g/L), kreatinin (1.0 g/L), kloramfenikol (0.4 g/L), bifenil (0.5 g/L) ve agar (15 g/L) ilave edildi. Her besiyeri pH 6.5 olarak ayarlandı. Otoklavda, 1.5 atmosfer

basınçta 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilerek 9 cm çaplı steril petri plaklarında patlıcan agar (PatA) hazırlandı. Besiyerinde pigment kontrolü amacıyla, *C.neoformans* H99 (ATCC 208821; serotip A); *C.neoformans* NIH 52D (Serotip D), 14 farklı çevresel *C.neoformans* (serotip A) kökeni, 2 *C.gattii* [Serotip B (CDC B237) ve Serotip C (NIH18C)] ve negatif kontrol olarak *Candida albicans* ATCC 10232 kökeni kullanıldı. Kökenler steril serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlandı ve besiyerine ekildi. Tüm ekimler 28°C'de 15 gün süre ile takip edilerek üreme ve pigment özellikleri gözle değerlendirilerek kaydedildi.

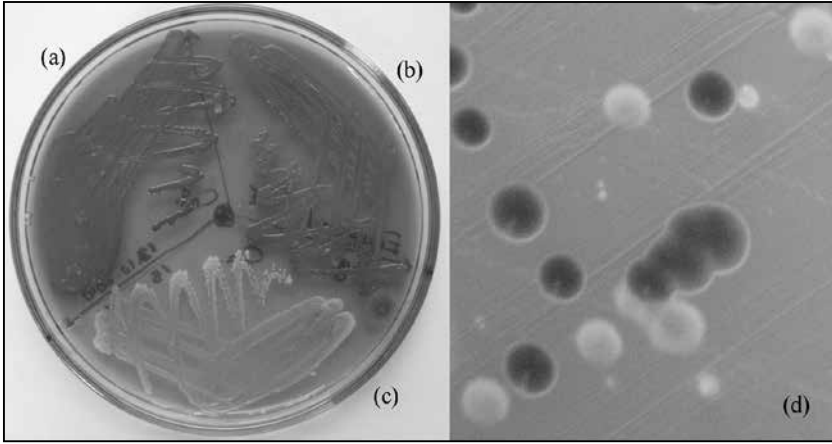
İkinci aşamada, çevresel ortamlardan besiyerinin başarısının araştırılması amacıyla en iyi pigment oluşumunun görüldüğü besiyeri kullanıldı. Daha önceki araştırmalarda, sürekli kolonizasyonun gösterildiği Gökova-Akçapınar-Akyaka bölgesinde [37° 03' 14 Kuzey, 28° 21' 33 Doğu; 37° 01' 37 Kuzey, 28° 21' 32 Doğu arasındaki hat üzerinde] kovuk bulunan 19 *Eucalyptus camaldulensis* Dehn ağacı araştırma için seçildi¹⁶. Ağaçlardan Randhawa ve arkadaşları¹⁷ tarafından tanımlandığı şekilde eküvyon tekniği ile örnekleme yapıldı. Araştırmada kullanılacak basit Staib agar (bSA), basit Pal agar (bPA) ve tütün agar literatürde tarif edildiği şekilde, her birinin içerisine kloramfenikol (0.4 g/L) ve bifenil (0.5 g/L) ilavesiyle hazırlandı^{6,8,17}. Örnekler aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılarak tüm besiyerlerine ekildi. Besiyerleri 28°C'de 15 gün süre ile takip edildi. Kahverengi pigment oluşturan koloniler Gram boyama, Dalmau agarda üreme mikromorfolojisi, 37°C'de üreyebilme, üreaz aktivitesi ve kanavanin-glisin-bromtimol mavisi agar besiyeri reaksiyonlarına göre değerlendirildi¹⁸. Her örnek için *C.neoformans* kolonilerinin koloni sayısı ve üreme zamanları kaydedildi.

İstatistiksel analiz için eşleştirilmiş t testi (SPSS Ver 17.0, ABD) uygulandı.

BULGULAR

Araştırmaya alınan tüm *C.neoformans* kökenlerinin, *S.melongena* Melanzaza viserba ve *S.melongena* Pinstripe F1 ile hazırlanan besiyerlerinde pigment oluşturdular; ancak *S.ovigerum* Ivory F1 ile hazırlanan besiyerinde pigment meydana getirmedikleri görülmüştür (Resim 1). *S.melongena* Melanzaza viserba ve *S.melongena* Pinstripe F1 besiyerlerinde oluşan pigmentin Staib agar ile aynı koyulukta olduğu, göz ile değerlendirmede pigment oluşumlarının en erken 36. saatte fark edilebildiği, 48 saat içinde de tüm *C.neoformans* kökenlerinin pigment oluşturdıkları belirlenmiştir. *C.albicans* ATCC 10232 kökeni ise besiyerlerinin hiçbirisinde pigment oluşturmamıştır.

Çalışmamızda alınan bu sonuçlara göre, Gökova bölgesinde yapılacak olan taramada kullanılacak besiyerleri *S.melongena* Melanzaza viserba türünden hazırlanmıştır. Bölgede seçilen 19 *E.camaldulensis* ağacının 11 (%57.9)'inden bSA, bPA ve PatA ile izolasyon yapılabilirken, tütün agar ile 10 (%52.6) örnekten izolasyon yapılabilmiştir. Benzer şekilde bSA, Pal agar ve PatA besiyerlerinde yüksek sayıda *C.neoformans* üremesi saptanırken, tütün agarda daha az üreme saptanmıştır (Tablo I). PatA besiyerinin *C.neoformans*'ı çevresel ortamlardan ayırabilme yeteneği bSA'dan farklı bulunmamıştır (p= 0.71).



Resim 1. *Solanum melongena* (Patlıcan) agar besiyerinde *C.neoformans* ve *C.albicans* kökenlerinin pigment oluşturmaları; (a) *Cryptococcus neoformans* H99, (b) Çevresel *C.neoformans*, (c) *Candida albicans* ATCC 10232, (d) Çevresel örnek taramalarında farklı maya ve küf kolonileri arasında pigment oluşturan *C.neoformans* (40x).

Tablo 1. Araştırmaya Alınan Besiyerlerinde 19 *Eucalyptus camaldulensis* Kovuğundan Alınan Örneklerde *C.neoformans* Koloni Sayıları

Besiyeri	Pozitif örnek	
	Sayı (%)	Koloni sayısı* (cfu/petri)
Basit Staib agar ¹⁷	11 (57.9)	51 (2-100)
Basit Pal agar ⁶	11 (57.9)	57 (4-110)
Tütün agar ⁸	10 (52.6)	36 (6-66)
Patlıcan agar	11 (57.9)	48 (1-96)

* Ortanca (En düşük-En yüksek); cfu: Koloni oluşturan ünite.

TARTIŞMA

C.neoformans'ın izolasyonu ve tanımlanmasında, organizmanın L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa) veya 1,8-dihidroksinaftelen yollarından birini kullanarak pigment oluşturmaları, hem mayanın dış etkenlerden korunması hem de virülans faktörü olarak önemli bir basamaktır. Diğer maya mantarlarından farklı olarak *C.neoformans*'da pigment yapımı, bulunduğu ortamdaki maddelerin arasında substratların bulunup bulunmadığına bağlıdır. Bu amaçla Staib tarafından *Guizotia abyssinica* bitki tohumundan hazırlanan besiyeri yaygın olarak kullanılmaktadır^{1,2,17}. Birçok araştırmacı primer izolasyon amacını gözeterek benzer besiyerlerini tanımlamışlardır. Kullanılan bitki yapıları arasında ayçiçeği, hardal tohumu, Halep çamı tohumu, tüylü fasulye, böğürtlen, tütün ve acı kırmızı biber çeşitleri bulunmaktadır⁵⁻¹¹. Aynı şekilde substratların dışarıdan kimyasal olarak ilave edildiği TOC (Davis agar) besiyeri ve L-DOPA agar da bu amaca yöneliktir^{2,19}. Bu besiyerlerinin ilk tanımlanmalarında kafeik asit, ferik sitrat ve L-DOPA'nın substrat olması nedeniyle ileri tanıya ihtiyaç duyulmayacağı da savunulmuştur^{19,20}.

Rubus fruticosus (Böğürtlen) ve acı kırmızı biberden tanımlanan besiyerleri yüksek miktarda anthosiyanın içermektedir^{11,12}. Bu flavonoid pigmentler, bitkilerin meyvelerine asıl rengi veren maddelerdir. Sunulan araştırmaya konu olan *S.melongena* taze bitki meyvesinde anthosiyanidinlerden delfinidin ve kuarsetin bulunmaktadır. Her ne kadar *S.melongena*'nın kaynatılarak hazırlanan ortamında anthosiyanidin grubundan siyanidin, delfinidin ve pelargonidin, flavonolardan apigenin ve luteolin, flavonollardan kaempferol ve mirisetin bulunuyorsa da kuarsetin ısı uygulaması sonucu kaybolmaktadır¹³⁻¹⁵. Bu bitkilerin meyvesinde bulunan zengin bileşikler ve elementler (farklı proteinsel yapılar, tiyamin, riboflavin, niyasin, pantoteik asit, B₆ vitamini, folat, C vitamini, kalsiyum, demir, magnezyum, fosfor, çinko, potasyum, bakır ve mangan) sayesinde, ortamda melanin öncül maddeleri bulunmasa bile *C.neoformans* kökenleri üreyerek aynı koloni çapında pigmentsiz koloniler oluşturabilmektedir^{14,15}. Sunulan araştırmada da, *S.melongena* meyvesinin pigmentli dış kabuk kısmından alınan materyalden hazırlanan ekstraksiyon içinde *C.neoformans*'ın kolonilerinde 48 saatlik inkübasyon sonrasında koyu kahverengi pigment oluşumu görülmüştür (Şekil 1). *Solanum* cinsinin pigmentsiz olan *S.ovigerum* Ivory F1 hibrid türünün dış yapısından hazırlanan ekstraksiyonlarda koloni pigment varlığı görülmemiştir. Hipotetik olarak; (i) *S.ovigerum* Ivory F1'in patlıcanlardaki yüksek genotipik değişimlere bağlı olarak kimyasal içeriklerinin değişmesi sonucunda diğer patlıcan hibridlerinde bulunan melanogenezdeki öncül maddeleri bulunmayabileceği; (ii) meyvede bulunan melanogenez öncül maddelerinin besiyeri hazırlanması sırasında ısı ile inaktive olabileceği ve/veya (iii) meyvenin *C.neoformans*'ın melanin üretimi basamağına yönelik inhibitör madde bulundurabileceği öne sürülebilir¹⁴.

Doğal tohum ve bitkisel yapılar, *C.neoformans*'ın pigment oluşumu ile tanımlanması amacına yönelik, ulaşılması kolay ve ucuz besiyeri yapımına imkan sağlamaktadır. Besiyerinde kullandığımız *S.melongena* L. (patlıcan), *Solanales* takımında, tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılım gösterir, temin edilmesi kolay ve ekonomiktir. Ancak hem doğal olarak hem de farklı kaygılarla (hastalıklara dayanıklı türlerin yetiştirilmesi, hızlı meyve veren türlerin elde edilmesi, uzun raf ömrü vb), türler arasında hibridizasyon çalışmaları yapılmaktadır¹⁵. Hibridizasyon aşamasında önemli engeller olmakla birlikte sunulan araştırmada test edildiği şekilde albino patlıcan kökenleri de ticari olarak bulunabilmektedir. Bu nedenle her patlıcan türünün pigment oluşturma özelliği ayrı ayrı araştırılmalıdır.

Staib besiyeri, pigment oluşumunun gösterilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte patlıcan, Staib besiyerini oluşturan *G.abysinicca*'dan daha ucuz ve kolay bulunabilen bir kaynaktır. Sunulan araştırmada tarif edilen patlıcan agar besiyerinin şeffaf görünümü ve açık kahverengi olması, koloni pigmentinin fark edilmesini kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla, doğal İtalyan tip patlıcan (*S.melongena* Melanzaza viserba) ve hibrid patlıcanın (*S.melongena* Pinstripe F1) pigmente dış kabukları ile yapılan besiyerlerinin, *C.neoformans*'ın pigment oluşturarak tanımlanması için rutin çalışmalarda kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Araştırmamızın ikinci bölümünde, sürekli kolonizasyon saptanan Gökova bölgesinde *S.melongena* Melanzaza viserba'dan yapılan besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan yeni patlıcanlı besiyerinin bSA ve bPA agar ile çevresel ortamlarda kolonizasyon taramasında aynı

izolasyon yeteneğinde olduğu bulunmuştur. Ülkemizde tüm Akdeniz bölgesinde yaygın ökaliptus florası olmakla birlikte özellikle Çukurova bölgesinde daha yoğundur. Bu alanlarda yapılan taramalarda henüz floradan *C.neoformans* izolasyonu yapılmamışsa da, periyodik taramalar kolonizasyon bölgelerinin saptanması için gereklidir^{21,22}.

Sunulan araştırmanın kısıtlılıkları bulunmaktadır. Tanımlanmış olan patlıcan agar besiyeri *Cryptococcus* cinsi içinde hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan *C.neoformans* ve *C.gattii*'ye yönelik olarak araştırılmıştır. Bugün için pigment oluşumunun nedenlerinin sorgulanması gereken patlıcan agarda, sunulan araştırmada çevresel örneklerde pigment oluşturan maya mantarı saptanmamasına rağmen, farklı cins ve türlerde maya mantarlarının da pigment oluşturmaları mümkündür. Bu nedenle klinik veya çevresel ortamlarda kullanılabilir olan patlıcan agar besiyerinde pigmentli olarak üretilen kolonilerden *C.neoformans/gattii* tanımlamasının doğrulanması önemlidir. Sonuç olarak çevresel izolasyon taramalarında yaygın olarak kullanılan Staib agar ve Pal agar besiyeri ile birlikte patlıcan agar besiyeri de kolaylıkla hazırlanarak kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

C.gattii CDC B237, *C.gattii* NIH18C ve *C.neoformans* NIH 52D kökenleri için Prof. Dr. Şinasi Taner Yıldırım ve Prof. Dr. Mehmet Ali Saraçlı'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. Appl Microbiol Biotech 2012; 93(3): 931-40.
2. Chaskes S, Tyndall L.R. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para-and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. J Clin Microbiol 1975; 1(6): 509-14.
3. Staib F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G.oleifera* D.C.) Z Hyg Infektionskr 1962; 148(5): 466-75.
4. Korth H, Pulverer O. Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. Appl Microbiol 1971; 21(3): 541-2.
5. Pal M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. Rev Iberoam Micol 1997; 14(4): 181-3.
6. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Clin Microbiol Infect 2004; 10(6): 590-2.
7. Nandhakumar B, Kumar CP, Prabu D, Menon T. Mustard seed agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 674.
8. Tendolkar U, Tainwala T, Jog S, Mathur M. Use of a new medium - Tobacco agar, for pigment production of *Cryptococcus neoformans*. Indian J Med Microbiol 2003; 21(4): 277-9.
9. Gokulshankar S, Babu K, Valli S, Ranjitsingh AJ, Ranjith MS. Cowitch seed agar medium--a simple new medium for identification and melanin production of *Cryptococcus neoformans*. Mycoses 2011; 54(4): 208-10.
10. Feng X, Yao Z, Ling B, Ren D, Liao W. Perilla frutescens seed agar, a new medium for identification of the *Cryptococcus* species complex: evaluation for all major molecular types. J Microb Method 2011; 84(2): 359-61.
11. Mseddi F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. Two new media Pinus halepensis seed agar and blackberry agar for rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. Mycoses 2011; 54(4): 350-3.

12. Stepanovic S, Vukovic D, Radonjic I, Dimitrijevic V, Svabic-Vlahovic M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 2002; 45(9-10): 384-8.
13. Wang JX, Gao TG, Knapp S. Ancient Chinese literature reveals pathways of eggplant domestication. *Ann Bot* 2008; 102(6): 891-7.
14. Meyer RS, Karol KG, Little DP, Nee MH, Litt A. Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Mol Phylogenet Evol* 2012; 63(3): 685-701.
15. Rao N. The barriers to hybridization between *Solanum melongena* and some other species of *Solanum*, p: 605. In: Hawkes, JG, Lester RN, Skelding AD (eds), *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. 1979, Academic Pres, New York.
16. Ergin Ç. Gökova bölgesinde eküvyon tekniği ile yüksek oranda çevresel *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2010; 40(3): 163-8.
17. 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(1): 67-71.
18. Kwong-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15(3): 535-7.
19. Fleming WH, Hopkins JM, Land GA. New culture medium (TOC Medium) for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1977; 5(2): 236-43.
20. Shields AB, Ajello L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 1966; 151(3707): 208-9.
21. İlkit M, Ateş A, Biçer AT, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microbiol* 2006; 56(2): 97-9.
22. Ergin C, İlkit M, Hilmioğlu S, et al. 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(1): 43-7.