

## Kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) agarda *Cryptococcus neoformans*'ın pigment aktivitesinin incelenmesi

### Pigment activity investigation of *Cryptococcus neoformans* on red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) agar

Sedef Zeliha ÖNER<sup>1</sup> (ID), Mustafa ŞENGÜL<sup>1</sup> (ID), Çağrı ERGİN<sup>1</sup> (ID)

#### ÖZET

**Amaç:** *Cryptococcus neoformans* insanlarda hayatı tehdit eden ciddi kriptokokkoz tablosuna neden olmaktadır. Bu türler doğada kolonize olarak çevreden konağa bulaşmaktadır. *C. neoformans*'ın tanımlanabilmesi amacıyla çeşitli besiyerleri üretilmiştir. Maya, melanin öncülü pigmentlerin bulunduğu besiyerlerinde melanin üretimi sayesinde kolaylıkla tanımlanır. Ülkemizde yeni yayılmaya başlayan kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*), flavonoid pigmentler bulundurulur. Bu çalışmada, beyaz ve kırmızı pitaya meyvelerinden yeni tanımlanarak hazırlanan besiyerlerinde *C. neoformans*'ın pigment oluşumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Araştırmaya çevresel araştırmalardan izole edilmiş ve moleküler tanımlaması yapılmış 13 *C. neoformans* kökeni dahil edildi. Araştırmada iki farklı pitayanın [beyaz pitaya (*Hylocereus undatus*) agar (BPA) ve kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) agar (KPA)] mezokarp ve endokarpı kullanılarak besiyerleri hazırlandı. Staib agar ve patatesli dekstroz agar

#### ABSTRACT

**Objective:** *Cryptococcus neoformans* causes life-threatening severe cryptococcosis in humans. These species are colonized in the nature and are spread from the environment to the host. Various media have been produced for the identification of *C. neoformans*. Yeast is easily identified due to the production of melanin in culture media containing pigment precursors. The red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) which has just started to planted in our country has flavonoid pigments. In this study, it was aimed to evaluate the melanin pigment production of *C. neoformans* in the agar media prepared by newly defined from white and red pitahaya fruits.

**Methods:** Molecularly confirmed thirteen environmental strains of *C. neoformans* were included in the study. In the study, in-house media were prepared from two different pitahaya [white pitahaya (*Hylocereus undatus*) agar (WPA) and red pitahaya] with mesocarp and endocarp parts of the fruits. Staib agar and potato dextrose agar media were used as positive and negative controls. *Candida albicans* has been used

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Denizli



İletişim / Corresponding Author : Sedef Zeliha ÖNER

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Kınıklı, Denizli - Türkiye

E-posta / E-mail : tezelsedef@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 11.01.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 19.09.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2023.65481

Öner SZ, Şengül M, Ergin Ç. Kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) agarda *Cryptococcus neoformans*'ın pigment aktivitesinin incelenmesi  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2023; 80(3): 267 - 276

besiyerleri pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. *Candida albicans* ise pigmentless maya olarak çalışıldı. Kökenler 24 kuyucuklu steril polistren plaklarda üretildi ve bir hafta süre ile pigment üretimi ölçümü Fiji/ImajeJ (GPLv3, NIH, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

**Bulgular:** KPA besiyerlerine yapılan ekimlerde göz ile kolaylıkla pigmentless *C. albicans* maya kolonilerinden ayrılabilen kahverengi pigmentli kolonilerin oluştuğu görüldü KPA besiyerinde oluşan koloni pigmenti Staib agarda oluşana göre daha azdı. Staib agarda *C. albicans* kolonileri daha büyük iken, KPA'da *C. neoformans* daha mukoid koloniler oluşturdu. Bir haftalık inkübasyon sonunda KPA, BPA'dan daha yoğun pigment oluştururken, Staib agar besiyerinden daha az pigment oluşumuna yol açtı ( $p<0.05$ ). Negatif kontrol olan PDA besiyerinde ise pigment gözlenmedi.

**Sonuç:** KPA besiyerinde pigment oluşumu, Staib agar besiyerine göre daha az olmasına rağmen, KPA besiyeri *C. neoformans*'ın pigment oluşumunun gösterilmesinde kullanılabilir. *C. neoformans*'ın pigment yapımının araştırılmasında kullanılan fenolik içerik bulunduran kolaylıkla ulaşılabilir çevresel kaynaklar, ucuz ve basit ayırteci/tanımlayıcı besiyerlerinin yapılması için önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cryptococcus neoformans*, kırmızı pitaya agar, beyaz pitaya agar, besiyeri, pigment ölçümü

for nonpigmented yeasts. The strains were cultured in sterile 24-well polystyrene plates and pigment production was measured by Fiji/ImajeJ (GPLv3, NIH, USA) during one week.

**Results:** It was observed that brown pigmented colonies, which can be easily separated from the non-pigmented *C. albicans* yeast colonies, were formed in the grown on KPA medium. Colony pigment formed in KPA medium was less than those formed on Staib agar. *C. albicans* colonies were larger on Staib agar, while *C. neoformans* formed more mucoid colonies on RPA. It was observed that the colony pigment formed in the RPA medium was less than the other in the cultivations on Staib agar and RPA medium. While RPA pigments are higher than WPA's, the yeasts' melanin production in Staib agar have higher data ( $p<0.05$ ). No pigment production has been observed in PDA.

**Conclusion:** Although the pigment production on RPA is less than on Staib agar medium, RPA can be used to demonstrate pigment production of *C. neoformans*. Descriptive media should be prepared with easily accessible inexpensive environmental resources containing phenolic chemicals for the research of pigment production of *C. neoformans*.

**Key Words:** *Cryptococcus neoformans*, red pitahaya agar, white pitahaya agar, medium, pigment measurement

## GİRİŞ

*Cryptococcus* sp. çevrede 30'dan fazla türe sahip bazidiyomiset mantar cinsidir. Bu türlerden *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* insanlarda hayatı tehdit eden ciddi kriptokokkoz tablosu oluşturmaktadır (1). Bu türler doğada toprakta, kanatlı çıkartılarında ve ağaçlarda kolonize olarak çevreden konağa bulaşır (2). *C. neoformans*

çoğunlukla bağışıklığı baskılanmış konakda, nadiren de bağışıklığı yeterli olan konaklarda hastalığa neden olur (1).

Mayanın hücre duvarında biriken melanin, polisakkarit kapsülünden sonra en önemli ikincil virülans faktörüdür (3). Birçok çevresel ve konak stres faktörüne karşı korumada rol alır ve hücre duvarının geçirgenliğini azaltır (4). Enfeksiyon sırasında fagositoza karşı direnç sağlar (5). Kriptokokkal

melanin üretimi, tanımlayıcı olarak kullanılan ve içinde melanin öncüllerini içeren besiyeri ortamında, makroskobik olarak ayırt edilebilen renkli koloniler oluşmasına neden olur. Bu amaçla besiyeri bileşimine Niger tohumu (*Guizotia abyssinica*, Staib agar) özütlerinin karıştırılması yaygın olarak kullanılmaktadır (6). Ayrıca L-3,4-dihidroksifenilalanin içeren besiyeri de ayırtedici olarak tanımlamıştır. Benzer şekilde içinde melanin benzeri maddelerin farklı sentez öncüllerini bulunduran ayçiçeği (Pal besiyeri), patlıcan, muz çiçekleri, kişniş, kimyon, soya fasulyesi, acı bakla, keten, kabak, fesleğen, nane, mercan köşkü ekstraktlarını (özlerini) içeren farklı besiyerleri de vardır (7-11).

Ülkemizde pitaya veya ejder meyvesi olarak bilinen bitki, *Cactaceae* ailesinin *Hylocereus* cinsine aittir. *Hylocereus* türlerinin çoğu Latin Amerika (muhtemelen Meksika ve Kolombiya'dan) kökenlidir (12). Kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) ve beyaz pitaya (*Hylocereus undatus*) yenilebilir meyvesi olan türlerdir. Güçlü antioksidan potansiyeli olan polifenoller, flavonoidler ve C vitamini sahiptirler (13). *H. polyrhizus*'a kırmızı rengini veren betasiyaninlerdir (14). Betasiyaninler ısı ile parçalanmakta ve yapılarında dopa içeren bileşikler ortaya çıkmaktadır (15).

Ülkemizde güney sahillerimizde son yıllarda yaygın olarak ticari amaçla üretilmektedir. Sunulan araştırmada, renkli ve renksiz pitaya meyvelerinden yeni tanımlanarak hazırlanan besiyerlerinde *C. neoformans*'ın pigment oluşumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada besiyerleri laboratuvar ortamında her biri ayrı ayrı hazırlandı. Ticari olarak satın alınan kırmızı pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) ve beyaz pitaya (*Hylocereus undatus*) meyvelerinin dış kabuğu (ekzokarp) soyuldu, etli kısım (mezokarp ve endokarp) ezilerek, distile su içinde bir saat kaynatıldı. Pigmentasyon yönünden negatif kontrol için patatesli dekstroz agar (PDA) besiyeri, pozitif kontrol için Staib agar besiyeri standart olarak hazırlandı. Besiyerlerinin bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir. Besiyerleri 2X konsantrasyonda (iki kat konsantre) hazırlandı, pH değerleri 6.0'a ayarlandı ve 121°C'da 15 dakika süre ile steril edildi.

Araştırmaya çevresel araştırmalarda izole edilmiş ve moleküler tanımlaması yapılmış 13 *C. neoformans* kökeni alındı (16). Kökenler stoklardan patatesli dekstroz agar besiyerine pasajlandı ve 28°C'da dört gün süre ile inkübe edilerek canlandırıldı. Steril serum fizyolojik içinde McFarland 1.0'a ayarlandı.

Görsel pigment yapımlarının gözlenebilmesi için analize alınan *Cryptococcus neoformans*'ın kökenlerden biri ile çevresel *Candida albicans* kökeni; McFarland 1.0 yoğunluğunda karıştırılarak Staib agar ve kırmızı pitaya agar (KPA) besiyerlerine ekildi. İnkübasyon 28°C'da, altı gün süre izlenerek pigment oluşumu takip edildi.

Mayalardan melanin varlığının ölçülmesinde Brilhante ve ark'nın tanımladığı yöntem kullanıldı (17). Kısaca; otoklav sterilizasyonundan çıkan besiyerleri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra, eşit hacimde

**Tablo 1.** Araştırmada kullanılan besiyerleri

Besiyeri	İçerik
Patatesli dekstroz agar	Patates 75 gr.L <sup>-1</sup> , glikoz 20 gr.L <sup>-1</sup> , agar 15 gr.L <sup>-1</sup>
Beyaz pitaya agar (BPA)	<i>Hylocereus undatus</i> 10 gr.L <sup>-1</sup> , kreatinin gr.L <sup>-1</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 gr.L <sup>-1</sup> , agar 15 gr.L <sup>-1</sup>
Kırmızı pitaya agar (KPA)	<i>Hylocereus polyrhizus</i> 10 gr.L <sup>-1</sup> , kreatinin gr.L <sup>-1</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 gr.L <sup>-1</sup> , agar 15 gr.L <sup>-1</sup>
Staib agar	<i>Guizotia abyssinica</i> 50 gr.L <sup>-1</sup> , kreatinin gr.L <sup>-1</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 gr.L <sup>-1</sup> , glukoz 0.5 gr.L <sup>-1</sup> , agar 15 gr.L <sup>-1</sup>

hazırlanan her bir *C. neoformans* süspansiyonu besiyerleri ile karıştırıldı. Son konsantrasyonu iki kat konsantrasyondan 1:1 yoğunluğa ulaşmış olan maya-besiyeri karışımı 24 kuyucuklu steril polistren plaklara dağıtıldı. Kontrol kuyucukları ise (maya süspansiyonu içermeyen), steril serum fizyolojik ve eşit hacimdeki steril besiyeri ile karıştırılarak oluşturuldu.

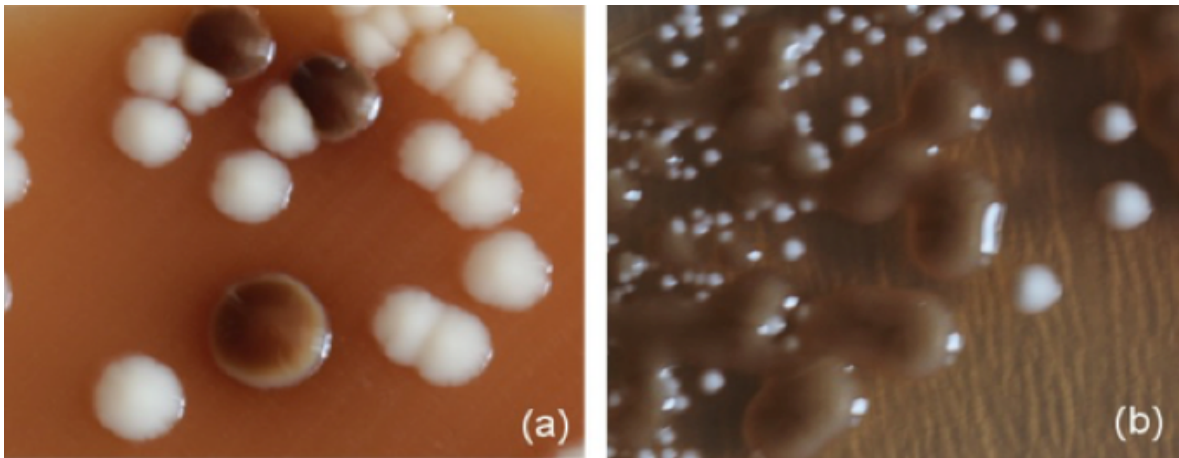
Bir hafta süre ile nemli ortamda ve 28°C'da inkübasyona bırakılan besiyerleri günlük olarak standart floresans ışıklandırma altında Canon EOS 100D ile fotoğraflandı. Fotoğraflama; 25 cm uzaklık, F/8 alan derinliği, 0.5 sn pozlama süresi, ISO hızı 400, açıklık 2.8, odak uzaklığı 32 mm ve 72 dpi çözünürlük ile yapıldı. Analizde beyaz denge ayarı için kadraja kesin siyah ve kesin beyaz yüzeyler eklendi. Fotoğrafların ölçüm amacı ile dönüşümü; Fiji (ImageJ Ver1.53f51 üzerine, Java 1.8.0\_172 tabanlı, GPLv3, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) ile yapıldı (18). Bilgisayara aktarılan resimlere (her bir plak için ayrı ayrı olmak üzere) sırasıyla; (a) gerekli bölümün kesilmesi; (b) 8 bit dönüşümü, (c) parlaklık ve kontrast standartlaştırması, (d) Beyaz=0, Siyah=255 olmak üzere doğrusal karşılıklı veri dönüşümü uygulaması ve (e) standardize büyüklükte (190 px çap) alandan gri

ölçekte değer ölçümü yapılması işlemleri uygulandı. Elde edilen değerlerden, aynı dönüşümden geçirilen kontrol besiyeri değerleri çıkarılarak ölçüm verileri elde edildi.

Ölçüm verileri Minitab (Ver 18.1, Köln, Almanya) programında istatistik analize alındı. Elde edilen kantitatif (0-255 arası) değerlerin dört grup arasında karşılaştırılmasında Friedman ve gereğinde ikili karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis'in tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Hata payı 0.05 olarak kabul edildi. Her gün yapılan değerlendirmede günlük veriler; analiz günü başına her besiyeri için elde edilen pigment (grilik) değeri (ortalama  $\pm$  standart sapması) olarak kaydedildi.

## BULGULAR

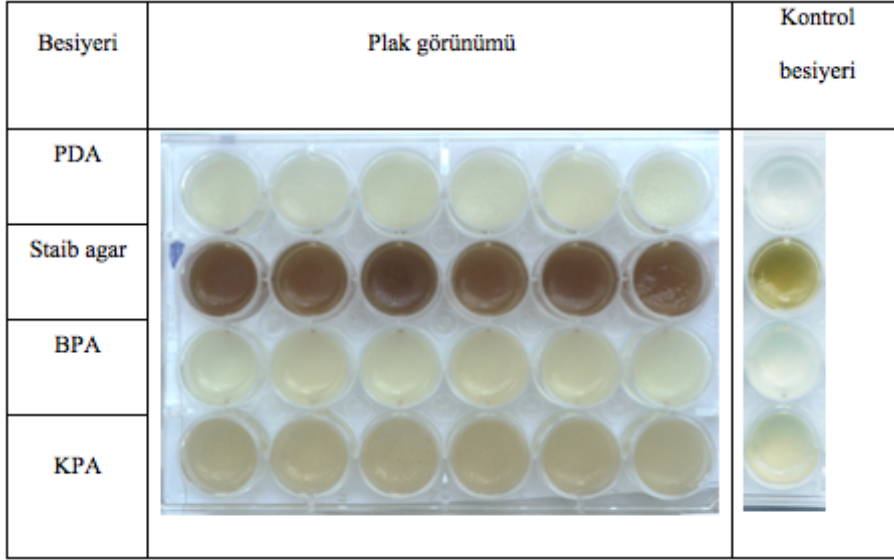
KPA besiyerlerine yapılan ekimlerde göz ile kolaylıkla pigmentless *C. albicans* maya kolonilerinden ayrılabilen kahverengi pigmentli kolonilerin oluştuğu görüldü. Bu pigmentasyon Staib agarda oluşandan daha azdı. Staib agarda *C. albicans* kolonileri daha büyük iken, kırmızı pitaya agarda *C. neoformans* daha mukoid koloniler oluşturmuştur. (Şekil 1).



**Şekil 1.** Staib agar (a) ve kırmızı pitaya agarda (b) pigment oluşturan (*Cryptococcus neoformans*) ve oluşturmayan (*Candida albicans*) kolonileri (6. gün)

Günlük fotoğraflaması yapılan besiyerleri, her gün kendileri ait maya içermeyen kontrol kuyucuklar ile fotoğraflandı (Şekil 2). Analize alınan 13 *C. neoformans* kökeninin ikisinde; besiyerlerindeki

kuruma nedeni ile 6. ve 7. gün ölçümleri yapılamadı, bu günlere ait seri verileri analiz dışı bırakıldı. Günlük olarak alınan verilere örnek olarak bir maya kökenine ait dönüşüm Tablo 2’de verilmektedir.



Şekil 2. 24 kuyucuklu polistren plaklardan birinin ve aynı güne ait kontrol besiyerlerinin 6. gününe ait doğrudan görünümü  
PDA=Patatesli dekstroz agar; BPA=Beyaz pitaya (*Hyalococcus undatus*) agar; KPA=Kırmızı pitaya (*Hyalococcus polyrhizus*) agar

Tablo 2. Tek kökene ait 8-bit (0-255) gri ölçek dönüşüm örneği

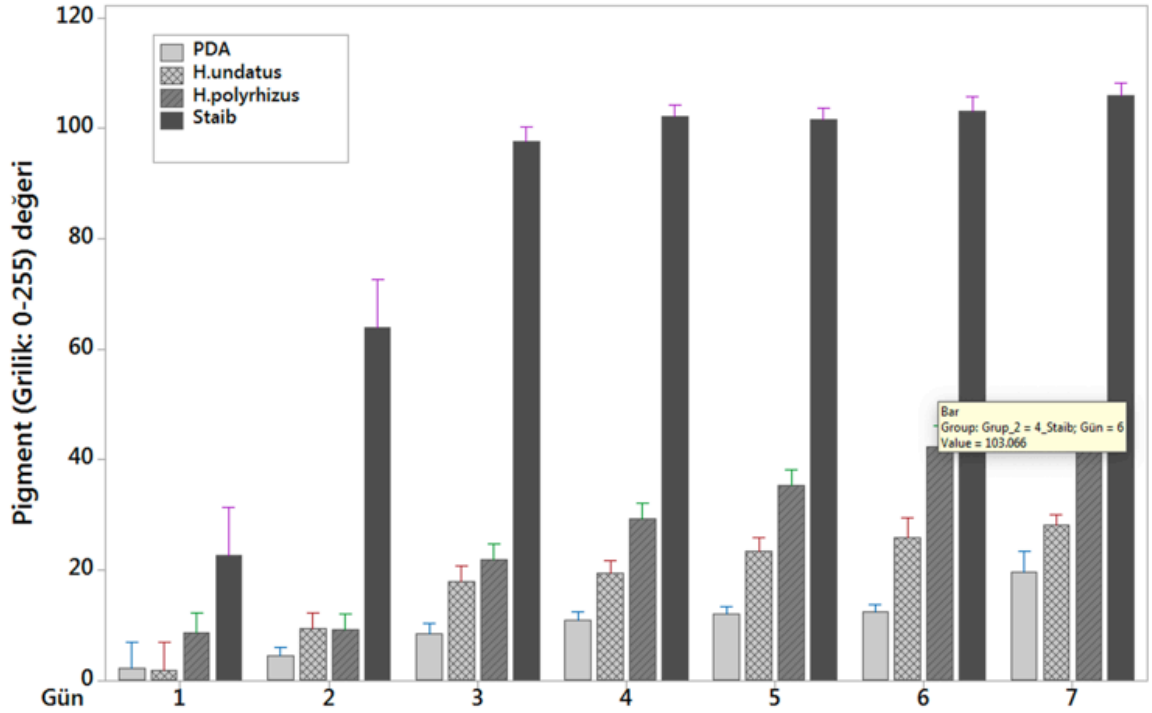
Gün	1	2	3	4	5	6	7
PDA							
Staib agar							
BPA							
KPA							

Veriler kontrol kuyucuk verileri çıkarıldıktan sonra elde edilmiştir.

PDA=Patatesli dekstroz agar; BPA=Beyaz pitaya (*Hyalococcus undatus*) agar; KPA=Kırmızı pitaya (*Hyalococcus polyrhizus*) agar

Analize alınan 13 kökenin melanin üretimi incelendiğinde en yüksek melanin üretimin Staib agar besiyerinde olduğu görüldü. Bir haftalık inkübasyon sonunda, KPA ile elde edilen pigmentasyon beyaz pitaya agar (BPA) besiyerindekinden yüksek iken, Staib agar besiyeri verilerinin yaklaşık %40'ı kadardı.

KPA, BPA'dan daha yoğun pigment oluştururken, Staib agar besiyerinden daha az pigment oluşumuna neden olmaktadır ( $p < 0.05$ ). Negatif kontrol olan PDA besiyerinde ise çok az renk değişimi izlenmiştir ( $p > 0.05$ , Şekil 3).



Şekil 3. İncelemeye alınan besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin pigment oluşturma ölçümleri

## TARTIŞMA

Mantarlardaki melanin, bağışıklık sistemi ile etkileşir, fagositik hücrelerin etkinliğini azaltır, antifungalleri bağlar, kompleman ve antikor yanıtını değiştirir (19). *C. neoformans* L-3,4 dihidroksifenilalanin (L-dopa) yoluyla melanini sentezler. L-dopa veya tirozin bu yolun başlangıç molekülüdür (20). Diğer patojenik mantarlardan

farklı olarak *C. neoformans*, melanini oluşturmak için dışarıdan eklenecek fenolik substratlara ihtiyaç duyar (19). Melanizasyon in vitro katekolamin ve indol bileşiklerinin varlığında, in vivo ise enfeksiyon esnasında meydana gelir (21). Ekzojen difenolik bileşiklerin varlığında *C. neoformans*, lakkaz (*Lac1* ve *Lac2*) kataliziyle kahverengi renkli melanin üretir (22). L-dopa ve dopaminden siyah melanin üretimi olurken, epinefrin, norepinefrin ve kafeik asitten

kahverengi pigment oluşumu meydana gelir (23).

Bitki kaynaklı flavonoidler ve kafeik asit *C. neoformans* tarafından melanin substratı olarak kullanılır (24,25). Bir flavonoid olan betasiyanin kırmızı pitayaya rengini verir. Betasiyanin; betanin, izobetanin, filokaktin ve hiloserenden oluşmaktadır (14). Betasiyaninler ısıtma işlemiyle değişikliğe uğrarlar. Birincil bozunma ürünleri, betaninin bozunmasıyla meydana gelir. Bunlar betalamik asit ve siklo-DOPA-5-O-β-glukozittir. Ayrıca neobetanin de betaninin bozunma ürünüdür ve sarımsı renktedir. Isıtılma işlemiyle filokaktin ve hiloserenden üretilen başka bozunma ürünleri bulunmaktadır. Isıtılma işlemi sonrasında renk sarıya kadar değişebilmektedir (15). Araştırmada kırmızı pitayadan besiyeri elde etmek için gerçekleştirilen suda kaynatma ve sterilizasyon işlemi sonrasında betasiyanin içeriğinde meydana gelen değişiklikler sonucu KPA ten rengini almıştır. BPA ise rengini korumuştur. Tanımlanan BPA ve KPA besiyerlerinin açık renkli olması, *C. neoformans*'ın kahverengi pigmentinin göz ile saptanmasını kolaylaştırmaktadır. KPA'da 48 saat inkübasyon sonrası *C. neoformans* kolonilerinde kahverengi pigment oluşumu görülmüştür (Şekil 1). Beyaz ve kırmızı pitaya; kafeik asit, ferulik asit, C vitamini, K1 vitamini, potasyum ve demir açısından zengin bitkilerdir (26). Yaygın olarak kullanılan Staib agar ve Pal besiyeri kafeik asit içeren besiyerleri arasındadır (6,8). Aynı zamanda büyüme ortamına eklenen 3,4 dihidroksi transsinamik asitin (kafeik asit) *C. neoformans* pigmentasyonunu indüklediği gösterilmiştir (27). Araştırmadaki her iki *Hylocereus* türü de besiyerinde pigment oluşturmuşsa da, KPA'da oluşan pigment daha belirgindir ve renksiz *Candida* kolonilerinden göz ile rahatlıkla ayırım sağlanmaktadır (Şekil 1, 2).

Melanin üreten mantarlarda pigmentasyon ölçümü için farklı yöntemler tanımlanmıştır. Elektron

Spin Rezonans (ESR) Spektrometresi, denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), floresan spektroskopisi gibi yöntemler bulunmaktadır (28-30). Araştırmada kullanılan yöntem ise melaninden gri tonlamalı görüntüler elde edilerek yapılan ve yansıyan ışık miktarına dayalı olarak melaninin üretimini ve nicel ölçümünü analiz eden bir yöntemdir (17). Yöntemin uygulanabilirliği kolay ve maliyeti düşüktür. Sunulan araştırmada, günlük alınan verilerin kullanılması, ilk günden yedinci güne kadar PDA, Staib agar, KPA, BPA'daki melanin üretimindeki değişimi değerlendirmemizi olanaklı hale getirmiştir (Tablo 2).

Beyaz pitayanın şeker içeriği yüksek iken, kırmızı pitaya antioksidan potansiyeli yüksek olan fenolik bileşikler açısından üstündür. Toplam fenolik içeriği 100 g başına beyaz pitayada 25 mg, kırmızı pitayada 55 mg gallik asit eşdeğeridir. Flavonoid içeriği ise beyaz pitayada 15 mg, kırmızı pitayada 35 mg arasında değişmektedir (26). Araştırmada pigment ölçümü değerleri besiyerlerine göre değişiklik göstermiştir. KPA, BPA'dan daha yoğun pigment oluştururken, Staib agar besiyerinden daha az pigment oluşturmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 3). Hipotetik olarak, şeker içeriğinin farklılığı, kırmızı ve beyaz pitayanın fenolik ve flavonoid içeriğinin birbirlerinden farklı olması besiyerlerindeki pigmentasyon miktarını etkilemiş olabilir. Yapılan çalışmalarda farklı besiyerlerinde öncül maddelerin farklı olabileceği gösterilmiştir (10,11). Doğal maddelerin kimyasal içeriklerinin, bitkinin yetiştirme ortamına göre değişkenlik göstermesi, fenolik içerikler gibi maddelerin farklı miktarlarda olmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda kafeik asidin kırmızı pitayada fazla olması da etken olabilir (26). KPA besiyerinde kahverengi pigmentasyon görülmüştür. Bu durum L-dopa ve dopaminden siyah melanin üretimi olurken, epinefrin, norepinefrin ve kafeik asitten kahverengi pigment sentezlenmesi ile

uyumludur (23). Melanin üretimi virülans için önemli olmasına rağmen sentezinde yer alan bileşenler ve mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (21).

Sunulan araştırmanın en önemli kısıtlılığı, KPA ve BPA besiyerlerinin türe ve coğrafyaya bağlı fenolik maddelerinin kimyasal analizlerinin yapılamamasıdır.

Sonuç olarak, KPA besiyerinin Staib besiyerine

göre performansının daha az olduğu tespit edilmesine rağmen, *C. neoformans*'ın pigment oluşumunun gösterilmesinde kullanılabilir. *C. neoformans*'ın pigment yapımının araştırılmasında kullanılan fenolik içerik bulunduran kolaylıkla ulaşılabilir çevresel kaynaklar, ucuz ve basit ayırteci/tanımlayıcı besiyerlerinin yapılması için önemlidir.

#### ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma, Etik Kurul Onayı gerektirmemektedir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.



## KAYNAKLAR

1. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am, 2016; 30(1): 179-206.
2. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol, 1997; 14(2): 42-3.
3. McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. Infect Immun, 2006; 74(3): 1500-4.
4. Momin M, Webb G. The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. Int J Mol Sci, 2021; 22(12): 6302.
5. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. Infect Immun, 1995; 63(6): 3131-6.
6. Staib F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) (Farbreaktion für *C. neoformans*). Z Hyg, 1962; 148(5): 466-75.
7. Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. J Clin Microbiol, 1975; 1(6): 509-14.
8. 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.
9. Şengül M, Ergin Ç, Kartal T. Çevresel örneklerde *Cryptococcus neoformans* taramaları için patlıcan (*Solanum melongena*) agarın yeni bir besiyeri olarak değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul, 2014; 48(2): 292-9.
10. Khayhan K, Juntaboon S, Fang W, Chaowasku T, Amornthipayawong D, Boekhout T. Banana blossom agar (BABA), a new medium to isolate members of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex useful for resource limited countries. Mycoses, 2018; 61(12): 959-62.
11. Krema ZA, Mokhtar ES, El Magrahi HS, Eshwika A, Ellabib MS, Cogliati M. Evaluation of novel culture media prepared from plant substrates for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans* species complex. Int J Clin Microbiol Biochem Technol, 2018; 1: 009-013.
12. Fournet J. Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique, Tome 1, Famille des Cactaceae, Inra-Cirad-Gondwana, Paris, France, 2002, pp. 224-40.
13. Ruzlan N, Idid SO, Idid SZ, Koya MS, Rehan AM, Kamarudin KR. Antioxidant study of pulps and peels of dragon fruits: A comparative study. International Food Research Journal, 2010; 17(2): 367-75.
14. Yong YY, Dykes G, Lee SM, Choo WS. Comparative study of betacyanin profile and antimicrobial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*). Plant Foods Hum Nutr, 2017; 72(1): 41-7.
15. Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. Eur Food Res Technol, 2004; 219: 377-85.
16. Ergin Ç, Şengül M, Aksoy L. *Cryptococcus neoformans* recovered from olive trees (*Olea europaea*) in Turkey reveal allopatry with African and South American lineages. Front Cell Infect Microbiol, 2019;9:384.
17. Brillhante RSN, España JDA, de Alencar LP. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato. Mycoses, 2017; 60(10): 697-702.
18. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods, 2012; 9(7): 676-82.

19. Liu S, Youngchim S, Zamith-Miranda D, Nosanchuk JD. Fungal melanin and the mammalian immune system. *J Fungi (Basel)*, 2021; 7(4): 264.
20. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 2003; 38(2): 143-58.
21. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, 2000; 3(4): 354-8.
22. García-Rodas R, Trevijano-Contador N, Román E. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*, 2015; 6: 798.
23. Brilhante RSN, Rocha MGD, Oliveira JS. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex melanized by epinephrine: Increased yeast survival after amphotericin B exposure. *Microb Pathog*, 2020; 143: 104123.
24. Fowler ZL, Baron CM, Panepinto JC, Koffas MA. Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. *Yeast*, 2011; 28(3): 181-8.
25. Vidotto V, Aoki S, Ponton J, Quindos G, Kogaito CY, Pugliese A. A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Rev Iberoam Micol*, 2004; 21(2): 87-9.
26. Arivalagan M, Karunakaran G, Roy TK. Biochemical and nutritional characterization of dragon fruit (*Hylocereus* species). *Food Chem*, 2021; 353: 129426.
27. Strachan AA, Yu RJ, Blank F. Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grown with extracts of *Guizotia abyssinica*. *Appl Mikrobiyol*, 1971; 22(3): 478-9.
28. Cunha MML, Franzen AJ, Seabra SH. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol*, 2010; 10: 80.
29. Pereira CB, Bueno FL, Dias ALT, Brigagão MRPL, Paula CR, Siqueira AM. Evaluation of laccases and melanization in clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* samples by non-denaturing PAGE. *J Med Microbiol*, 2009; 58(Pt 5): 563-6.
30. Fernandes B, Matamá T, Guimarães D, Gomes A, Cavaco-paulo A. Fluorescent quantification of melanin. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2016; 29(6): 707-12.