T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

MORCA MAĞARASI'NDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Batu ÇOLAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Ocak, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Burçak GÜRBÜZ
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-37545 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez sürecim boyunca karşılaştığım tüm zorlukları desteği ve yardımı sayesinde aştığım, sadece tez çalışması sürecinde değil lisans eğitimim boyunca da bana rehberlik eden ve beni mağaracılıkla tanıştıran tez danışmanım Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR'e çok teşekkür ederim. Onun liderliği, inceliği akademik hayatımın haricinde kişisel hayatımda da her zaman yol gösterici olmuştur. Bana gösterdiği sevgi ve anlayışı, verdiği emeği hayatım boyunca unutamam ve ödeyemem.

Tez sürecim boyunca yardımını, bilgilerini ve desteğini asla esirgemeyen sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Bana verdiği emeği asla geri ödeyemem.

Lisans ve yüksek lisans sürecimde çalışmalarımızın gerçekleştiği sevgi ve saygı ortamının oluşmasını sağlayan, gerçek bir eğitmenlik anlayışıyla hepimize ilham veren anabilim dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Ayten KİMİRAN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Başta değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR ve Doç. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI olmak üzere beni geri çevirmeyen ve yardımlarını esirgemeyen tüm bölüm hocalarıma teşekkürlerimi iletiyorum. Tüm tez sürecimde deneyimlerini, fikirlerini paylaşan, laboratuvar aletleri ve deneyleri konusunda ihtiyacım olduğunda bana yardım eden Nahdhoit AHAMADA RACHID'e çok teşekkür ederim. Mağaradan örnekleri toplarken bana eşlik eden, alanındaki uzmanlığı sayesinde ihtiyacım olan bilgilere ulaşabilmemi sağlayan ve her zaman yardımcı olan dostum Büşra KARATAY'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı Morca Mağarası etkinliğini düzenleyen ANADOLU SPELEOLOJİ GRUBU DERNEĞİ'ne (ASPEG), gezi sırasında ekipman ve teknik bilgilerini eksik etmeyen Eray GÜNGÖR ve Ender A. USULOĞLU'na teşekkür ederim. Tez sürecimde emeği geçen tüm TEMA laboratuvar ekibine de teşekkür ederim. Yağmur AVCI, Jale Nil GÜRSOY, Gülnihan SELİM'i ve tüm diğer arkadaş ve meslektaşlarımı saygı ve sevgiyle anıyorum.

Son olarak çocukluğumdan itibaren bilime olan ilgimi ve merakımı körükleyen, cesaretimi yitirdiğimde yanımda olan ve beni destekleyen, maddi ve manevi olarak arkamda duran, her koşulda benimle gurur duyan annem Tülay GÖRGÜN ve abim Utku ÇOLAK'a çok teşekkür ediyorum ve bu çalışmayı onlara adıyorum.

Ocak 2023 Batu ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **ix**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. YERALTI OLUŞUMLARI OLARAK MAĞARALAR VE ÖZELLİKLERİ 3
2.2. MAĞARA ÇEŞİTLERİ VE OLUŞUMLARI 3
2.3. KARSTİK MAĞARALAR VE MAĞARA YAPILARI 5
2.4. MAĞARALARIN İNSAN HAYATINDAKİ YERİ 6
2.5. MAĞARALARIN MİKROBİAL ÇEŞİTLİLİĞİ VE MİKROORGANİZMALARIN MAĞARA OLUŞUMUNA KATKILARI 7
2.6. PİGMENTLER VE İNSAN İÇİN ÖNEMİ 9
2.7. MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN ÜRETİLEN PİGMENTLER 11
2.8. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ 17
2.9. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ENDÜSTRİDEKİ YERİ 18
2.10. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN MİKROBİYAL YOLLA ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLAR 19
3. MALZEME VE YÖNTEM **23**
3.1. MORCA MAĞARASI'NIN KEŞFİ VE HİKAYESİ 23
3.2. MORCA MAĞARASI'NIN YERİ VE ÖZELLİKLERİ 24
3.3. ÖRNEKLEME 24
3.4. BAKTERİ İZOLASYONU 24
3.5. DNA İZOLASYONU 25
3.6. 16S RDNA GEN BÖLGELERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE ÇOĞALTILMASI VE REAKSİYON ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZİ 27
3.7. DNA DİZİ ANALİZİ 28

3.8. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU 28
3.9.KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ 29
3.10. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN İÇERİKLERİNİN İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ 30
3.11. KAROTENOİD İÇERİKLERİNİN HPLC ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ.....31
3.12. BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN MİKTARI 31
3.13.KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....31
3.14. KULLANILAN BESİYERLERİ VE REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI.....32
3.14.1. Nutrient Agar (Candalab, Spain).....32
3.14.2 Reasoner's 2 Agar (Candalab, Spain) 33
3.14.3. Muller Hinton Agar (Candalab, Spain) 33
3.14.4. %1'lik Agaroz Jel 33
3.14.5. Lizozim Hazırlanması (Sigma aldrich) 34
3.14.6. 10X TBE Hazırlanması (Stok Çözelti).....34
3.14.7. 1X TBE (Stok çözelti kullanılarak).....34
3.14.8. %5'lik DMSO.....34
4. BULGULAR.....35
4.1. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN KÜLTÜR VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ 35
4.2. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ÜRETİMİ 40
4.2.1. Pigmentlerin Spektrofotometrik Analiz Sonuçları 40
4.2.2. İnce Tabaka Kromotografisi Analiz Sonuçları.....41
4.2.3 HPLC Analiz Sonuçları.....44
4.3. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ 46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 48
5.1. PİGMENT ÜRETİMİ GÖSTEREN İZOLATLARIN MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ VE KAROTENOİDLERİN KARAKTERİZASYONU.....48
5.2. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ 54
5.3. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ENDÜSTRİ VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ GELECEĞİ 54
5.4. SONUÇ 55
6. KAYNAKLAR 57
7. ÖZGEÇMİŞ 75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Çeşitli mağaraların özellikleri (Engel, 2010). 4

Şekil 2.2: Karstik mağara yapılarının oluşma süreci (Fairchild ve diğ., 2006). 6

Şekil 2.3: Bazı organik pigmentlerin kimyasal yapıları (Ramesh ve diğ., 2019) 13

Şekil 3.1: Turuncu ve sarı pigment oluşturan bakteri suşları. 25

Şekil 3.2: Sarı ve turuncu pigment oluşturan bakterilerin metanolde çözünmüş görüntüleri. 29

Şekil 3.3: Metanolün uçurulmasıyla çökeltilen pigmentler. 30

Şekil 3.4: Pigment emdirilmiş diskler. 32

Şekil 4.1: Silika plakalarının UV ve normal ışık altında görünümü. 42

Şekil 4.2: Rf değerine göre ksantofil ve beta karoten üretimi gösteren izolat sayıları 43

Şekil 4.3: Beta karoten standardının HPLC analiz sonucu. 44

Şekil 4.4: Lutein standardının HPLC analiz sonucu. 44

Şekil 4.5: 1ppm konsantrasyondaki standart karışımın HPLC analiz sonucu. 44

Şekil 4.6: 10my3 örneğinin HPLC analiz sonucu. 45

Şekil 4.7: Ampisilin disklerinin *S. aureus* üzerindeki etkisi. 47

Şekil 4.8: Ampisilin disklerinin *B. subtilis* üzerindeki etkisi. 47

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin renkleri ve biyolojik fonksiyonları. 14

Tablo 3.1: Örneklerin alındığı ortam ve derinlikleri. 24

Tablo 3.2: PZR için kullanılan primerlerin dizileri (Gülcü, 2020). 27

Tablo 3.3: PZR karışımının içeriği (Gülcü, 2020). 27

Tablo 4.1: Seçilen pigment oluşturan bakterilerin kültür ve morfolojik özellikleri. 35

Tablo 4.2: İzolatların tür analizleri ve aksesyon numaraları. 39

Tablo 4.3: Pigmentlerin spektrofotometrik analiz sonuçları. 41

Tablo 4.4: İnce Tabaka Kromotografisinde gözlemlenen spotların Rf değerleri. 42

Tablo 4.5: İzolatların pik, alan, ppb değerleri ve karotenoid miktarları. 45

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
bp	: Baz çifti
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
λ	: Lambda
ºC	: Santigrat derece
dk	: Dakika
rpm	: Dakika devir sayısı (round per minute)
ppm	: Milyonda bir birim (parts per million)
ppb	: Milyarda bir birim (parts per billion)
m	: Metre
%	: Yüzde oran
nm	: Nanometre
µM	: Mikromolar
β	: Beta
ε	: Epsilon

Kısaltmalar	Açıklama
TLC	: İnce Tabaka Kromotografisi (Thin Layer Chromatography)
HPLC	:Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi (High-performance liquid chromatography)
Rf	: Gecikme faktörü (Retention factor)
RSM	: Cevap yüzey yöntemi (Response surface methodology)
16S rRNA	:16S ribozomal ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
UV	: Mor ötesi ışınım (Ultraviyole)
pH	: Potansiyel hidrojen
CRISPR	:Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DMSO : Dimetil sülfoksit

Gr (+) : Gram pozitif

Gr(-) **:** Gram negatif

ÖZET

MORCA MAĞARASI'NDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Batu ÇOLAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Şehir hayatından biraz uzaklaştığımızda bile dikkatimizi çeken ilk şeyler canlılığın göz kamaştırıcı renkleri ve organizmaların çevreleriyle bir uyum içerisinde yaşadıklarıdır. Tüm bunlar birer tesadüf gibi görünse de evrim ve adaptasyon süreci sonucu ortaya çıkan özelliklerin neredeyse hepsi bir fonksiyona hizmet etmektedir. Örneğin canlıların sahip olduğu renkler görsel bir iletişim aracı olarak görev alabilir. Ayrıca renkleri oluşturan organik pigmentler çeşitli biyolojik sistemlerde görev alarak canlının hayatta kalabilmesinde doğrudan rol de oynayabilir.

Mağaralar insanlar tarafından keşfedilebilecek büyüklükte olan doğal yeraltı oluşumlarıdır. Yüzey ile minimum temasta olan mağaralar çevre koşullarından oldukça izole haldedir. Mağaralar, girişleri haricindeki kısımları güneş ışığından uzak, sabit ve düşük sıcaklıkta, yüksek nem koşullarına ve düşük organik madde girişine sahip olan karmaşık yeraltı sistemlerini oluşturur. Bu nedenle ekstrem ortamlar olarak kabul edilirler.

Mağaraların ekstrem ortamına uyum sağlayabilmiş canlıların ürettikleri pigmentler ve enzimler biyoteknolojide araştırma konularıdır ve çeşitli endüstrilerde ürün olarak kullanılabilir. Karotenoidler gıda ve ilaç sanayinde sıkça kullanılan bir pigmentlerdir. Üretimi çoğunlukla bitki kaynaklı olmasına rağmen mikrobiyal kaynaklı üretimi de mümkündür. Bu

tez çalışmasında Anamur bölgesinde bulunan Morca Mağarası'ndan izole edilen bakterilerin ürettikleri karotenoid pigmentlerinin tanımlanması ve bu pigmentlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Morca Mağarası'nın 400m, 620m, 680m derinliklerinden alınmış toprak ve yüzey örneklerinden izole edilmiş bakterilerin karotenoid pigmenti üretimine bakılmıştır. Pigmentlerin karakterizasyonu yapılmış ve antimikrobiyal özellikleri test edilmiştir. İzole edilen toplam 254 bakterinin %74'ü Gram (+) %26'i Gram (-) özellik göstermiştir. Koloni renklerine göre seçilen 40 bakteriden izole edilen pigmentlerin karakterizasyonu İnce Tabaka Kromotografisi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi (HPLC) ve spektrofotometrik analizlerle yapılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında 25 izolatta beta karoten, 36 izolatta lutein (β,ε-karoten-3,3′-diol) olduğu ortaya çıkmıştır. Pigment üretimi gösteren bakterilerin %61.9'inin Actinobacteria, %33.4'inin Proteobacteria ve %4.7'inin Firmicutes filumlarına ait olduğu görülmüştür. Elde edilen mikrobiyal pigmentlerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiş ancak herhangi bir etki saptanamamıştır.

Çalışmamız sonucunda, ekstrem ortamlar olarak kabul edilen mağaraların zengin bir mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğu, bu bakterilerin arasından seçilen izolatların endüstiyel alanlarda kullanılabilecek karotenoid pigmentleri ürettiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle mağaralar pigment üreten mikroorganizmaların keşfedilmesi için potansiyel bir kaynak oluşturur.

Ocak 2023, 89 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mağara, Mikrobiyal pigment, Karotenoid, Biyoteknoloji, Endüstri

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF CAROTENOID PIGMENTS PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM MORCA CAVE

M.Sc. THESIS

Batu ÇOLAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

The resplendent nature of life and the harmony of organisms with their surroundings are one of the first things we notice when we leave the vicinity of the urban environment. Although they may seem like a matter of chance, almost all of these properties have resulted from the processes of evolution and adaptation, and serve a function. For example, the colors of living organisms can serve as a visual communication tool. Additionally, the organic pigments that display color can play a direct role in the survival of an organism by being part of its various biological systems.

Caves are natural underground formations that are large enough for human exploration. Having minimum contact with the surface, caves are rather isolated from the conditions of the environment. Except for their entrance, caves form complex underground systems devoid of sunlight, with constant but low temperature, high humidity, and a low influx of organic matter.

The pigments and enzymes of the organisms that have been able to adapt to the extreme conditions of caves can be utilized in several industries and as research areas in

biotechnology. Carotenoid pigments are widely used in the food and pharmaceutical industries. Although carotenoid production is mainly plant-sourced and synthetic, microbial organisms can also be used for pigment production. In this thesis, it was aimed to identify the carotenoid pigments produced by the bacteria isolated from the Morca Cave in the Anamur region and to determine the antimicrobial activities of these pigments.

The focus of this research is the carotenoid production of the bacteria that have been isolated from the soil and surface samples taken from the -400 m, -620 m, and -680 m levels of the Morca Cave. The pigments have been identified and tested for their antimicrobial effects. Of the 254 isolated bacteria, 74% were Gram (+) and 26% were Gram (-). 40 isolates are chosen for their colony colors and pigment identification carried with Thin Layer Chromatography (TLC), High-performance liquid chromatography (HPLC) ve spectrophotometric analyses. The results have shown that 25 of the isolates produce beta carotene, and 36 of them produce lutein (β,ε-carotene-3,3′-diol). It has been observed that Actinobacteria, Proteobacteria, and Firmicutes phyla make up 61.9%, 33.4%, and 4.7% of the pigmented bacteria respectively. The antimicrobial activity of the obtained microbial pigments was tested by the disc diffusion method, but no effect was found.

As a result of our study, it has been revealed that the Caves, which are considered as extreme environments, have a rich microbial diversity, and the isolates selected from these bacteria can produce carotenoid pigments that can be used in industrial areas. Therefore, caves constitute a potential source for the discovery of pigment-producing microorganisms.

January 2023, 89 pages.

Keywords: Cave, Microbial pigment, Carotenoid, Biotechnology, Industry

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların keşfi insanlığın canlılığa bakış açısını değiştirmiş ve yaşamın her ölçekte var olabileceğini göstermiştir (Gest, 2004; Rothschild ve Mancinelli, 2001). Teknolojinin gelişmesi sayesinde bu ekstrem ortamlarda laboratuvar koşullarında çoğaltılamayan türler olduğu fark edilmiş, gen dizileme ve 16S rRNA analizleri taksonomi anlayışımızı değiştirmiştir (Shu ve Huang, 2022). Deniz dipleri, mağaralar gibi ekstrem ortamlara erişme ve örnek toplama imkânı, uygulanacak teknolojilerin gelişmesi ve daha ekonomik hale gelmesi, bu çalışmaların değerini ve akademik çevredeki önemini arttırmaktadır.

Mağaralar insanın yeraltını keşfetmesine olanak sağlayan doğal açıklıklardır. Doğal süreçlerle oluşan bu açıklıkların genel yapısı düşük sıcaklık, yüksek nem, organik bileşen açısından yoksun olarak tanımlanabilir. Enerjiden yoksun gibi görünse de mineral açıdan zengin olan mağaralar oligotrofik yollarla enerji elde edebilen canlı türleriyle doludur. Çevresiyle etkileşime geçen bu mikrobiyal yaşamın mağaraya şekil verebilmesi mağaraların hem biyolojik hem jeolojik süreçler sonucu oluştuğunu gösterir (Barton ve Jurado, 2007).

Mağaraların çeşitliliği, uzun süre değişmeden kalması, dış ortamdan izole bir şekilde durması mağaraları evrim ve biyoteknoloji açısından önemli araştırma ortamları yapmaktadır. Her mağaranın kendine özel olması endemik ve yeni tür bulma ihtimalini arttırır. Enerji kaynağının kıtlığı sebebiyle oluşan rekabet, alternatif mikrobiyal enerji kaynaklarının kullanılmasına, enzim ve antibiyotik gibi yeni mikrobiyal ürünlerin keşfine olanak sağlamaktadır (Hamedi ve diğ., 2019).

Mikrobiyal kaynaklı ürünler insanlık tarafından uzun süredir kullanılmaktadır. Alkol, yoğurt, turşu gibi fermente ürünler insanlık tarihinde sıkça tüketilmiştir. Penisilinin keşfi mikrobiyal kaynaklı ürünlere olan ilgiyi daha çok arttırmış, devamlı fermantasyon teknikleri sayesinde sağlık, endüstri alanlarında çığır açılmıştır (Kardos ve Demain, 2011). Genetik mühendisliğinin gelişmesi tüm mikrobiyal ürünlerin potansiyelini açığa çıkarmıştır. İnsülin hormonunun rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi ilaç sanayinde devrim yaratmış ve hayvan kaynaklı insüline olan bağımlılığı azaltmıştır (Khan ve diğ., 2016).

Mikrobiyal kaynaklı ürünler arasında organik pigmentler de vardır. Pigmentler canlılarda renk haricinde birçok görevde rol alır (Ghidalia ve diğ., 1985). Enerji transferi sistemlerinde görev almalarının yanında ışığın zararlı özelliklerinden koruyan ve antimikrobiyal aktivitesi olan pigmentler de vardır (El-Sayyad ve diğ., 2018).

Pigmentler genel olarak canlılar için son derece önemlidir. Bitkilerin fotosentezinde görev alan klorofil ya da insanları ultraviyole ışıktan koruyan melanin bu pigmentlerdendir. Pigmentler birçok canlı tarafından üretilir fakat bazı pigmentleri üretemeyen canlılar gıda yoluyla pigmentleri bünyelerine almak zorundadırlar. Örneğin memelilerin çoğu karotenoid pigmentlerini üretemezler ve diyetlerinde almak durumundadır. Örneğin beta karoten A vitamini öncüsü olduğu için insanlar için de son derece önemlidir (Harrison ve Quadro, 2018). Gıda takviyesi ve antioksidan gibi özellikleri olması nedeniyle mikrobiyal kaynaklı pigmentler gıda ve ilaç sanayi gibi sektörlerde kullanılmaktadır (Kumar ve diğ., 2015a).

Çalışmamız da; Morca Mağara'sının 400 m, 620 m, 680 m derinliklerinden alınan, yüzey ve toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin karotenoid pigmenti üretme yeteneklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda pigment üretimi gözlenen bakterilerin sekans analizlerinin yapılarak tür düzeyinde isimlendirilmesi, ürettikleri pigmentlerin izolasyonu/karakterizasyonu ve bu pigmentlerin antimikrobiyal özellikleri olup olmadığı değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. YERALTI OLUŞUMLARI OLARAK MAĞARALAR VE ÖZELLİKLERİ

Mağaralar genel olarak yeraltında bulunan doğal boşluklar olarak değerlendirilebilir, fakat bu tanımı yeterli bulmayan bazı araştırmacılar mağara tanımını daha detaylı açıklamak istemiştir (Curl, 1964). Mağaralar farklı bakış açıları ve disiplinler arasında farklı tanımlannaktadır. Ancak güncel anlamda bir tanım yapmak gerekirse; yeryüzünün altında, alacakaranlık kuşağının ötesine uzanan ve en az bir insanın sığacağı büyüklükte olan doğal açıklıklar olarak tanımlanabilir (Northup ve Lavoie, 2001; White ve Culver, 2019). Mağaralar bulundukları kayanın yapısı oluşma biçimi, yeraltı suları ile ilişkileri ve sahip oldukları morfolojilere göre çeşitli şekilde sınıflandırılabilir (Palmer, 1991). En çok karşımıza çıkan mağara türlerine örnek olarak kireç taşının ya da benzer kalkerli yapıdaki kayaçların parçalanmasıyla oluşan mağaraları ve bazaltik mağaraları gösterebiliriz (Northup ve Lavoie, 2001; Lee ve diğ., 2012). Speleogenez ise sıvıların, çözünebilir kayaç ya da çatlakların arasından ilerleyerek ortaya çıkan mağara sistemlerinin oluşmasını açıklayan bir terimdir (Audra ve Palmer, 2015).

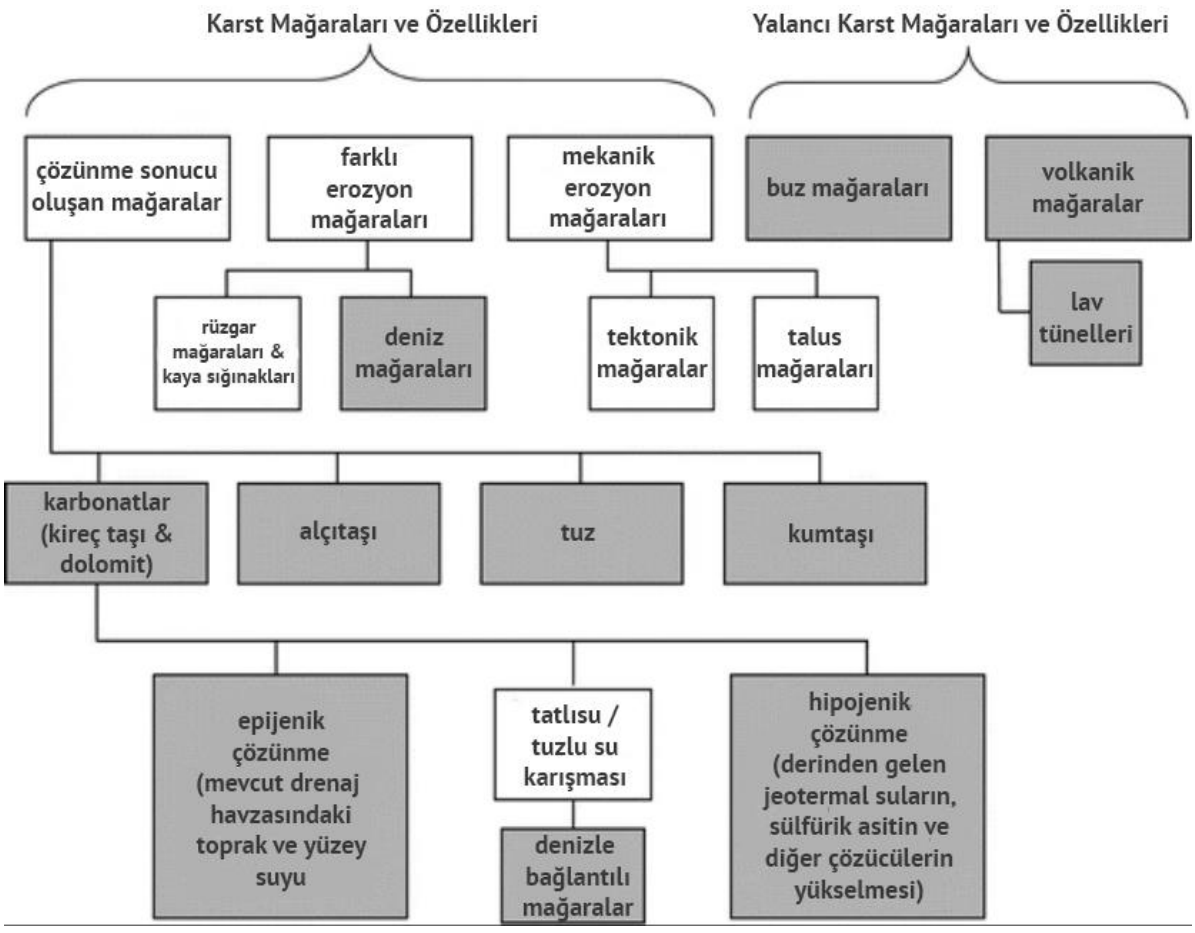
Mağara ortamı, girişe yakın bölgede alacakaranlık ortamı, orta bölgelerde zifiri karanlık ve değişken ısı, derin bölgelerde ise zifiri karanlık ve sabit ısı olacak şekilde üç bölgeye ayrılabilir (Poulson ve White, 1969). Mağaraların nem oranı çok yüksektir. Nem oranları %80'lere kadar düşen mağaralar ile karşılaşabildiğimiz gibi, genellikle %95-100 nem oranına sahip mağaralar karşımıza çıkmaktadır (Poulson ve White, 1969). Ayrıca mağaralar termal olarak yalıtılmış sistemler olarak düşünülebilir, içerideki ısı dışarıdan giren sıvılara nazaran çok daha stabildir (Badino, 2004).

2.2. MAĞARA ÇEŞİTLERİ VE OLUŞUMLARI

Mağaraları tanımlanırken birçok farklı özelliklerinden yararlanılır; mağaranın şekli ve derinliği gibi morfolojik yapısının yanında, mağaranın oluşma şekli, bulunduğu kayanın yapısı, yeraltı sularına olan mesafesi tanımlayıcı özellik taşır. Yeraltı sularına yakınlığı açısından mağaralar iki başlık altında incelenebilir.

1- Epijenik mağaralar: Yeryüzü ve bulunduğu bölgenin su durumuna bağlı olan yeraltı su tabanına yakın mağaralardır.

2- Hipojenik mağaralar: Su ve gaz seviyelerinin yükselmesine bağlı olarak yeryüzünden bağımsız süreçlerle gerçekleşen, yeraltı su tabanı seviyesi veya daha altında bulunan mağaralardır. Doğal ve mikrobiyal yolla oluşan sülfirik asidin şekillendirdiği sülfürik asit mağaraları hipojenik mağaralara bir örnektir (Northup ve Lavoie, 2001; Gunn, 2004; Engel, 2011; Palmer, 2007).



Şekil 2.1: Çeşitli mağaraların özellikleri (Engel, 2010).

Karst ve yalancı karst mağaralarının özellikleri yukarıda verilmiştir (Şekil 2.1). Mağaralar kadar speleogenezi sırasında bulunduğu kaya ve jeokimyasal koşullar oldukça önemlidir. Bu süreçler kayaca bağlı olarak altı şekilde incelenebilir (Northup ve Lavoie, 2001; Lee ve diğ., 2012).

1-Taş ve minerallerin zaman içerisinde çözünüp çökelmesi: Bu birikme sonucu sarkıt, dikit, sütun, mağara incisi gibi mağara yapıları oluşabilir.

2- Taşın sülfirik asit yüzünden çözünmesi: Asit erozyonu sebebiyle kayalarda oluşan büyük boşluklar şeklinde görünürler. Uygun koşullar devam ediyorsa mikrobiyal koloniler görülebilir.

3- Volkanik aktivite sebebiyle: Akış halindeki lavın geride bıraktığı tüneller halinde ortaya çıkarlar.

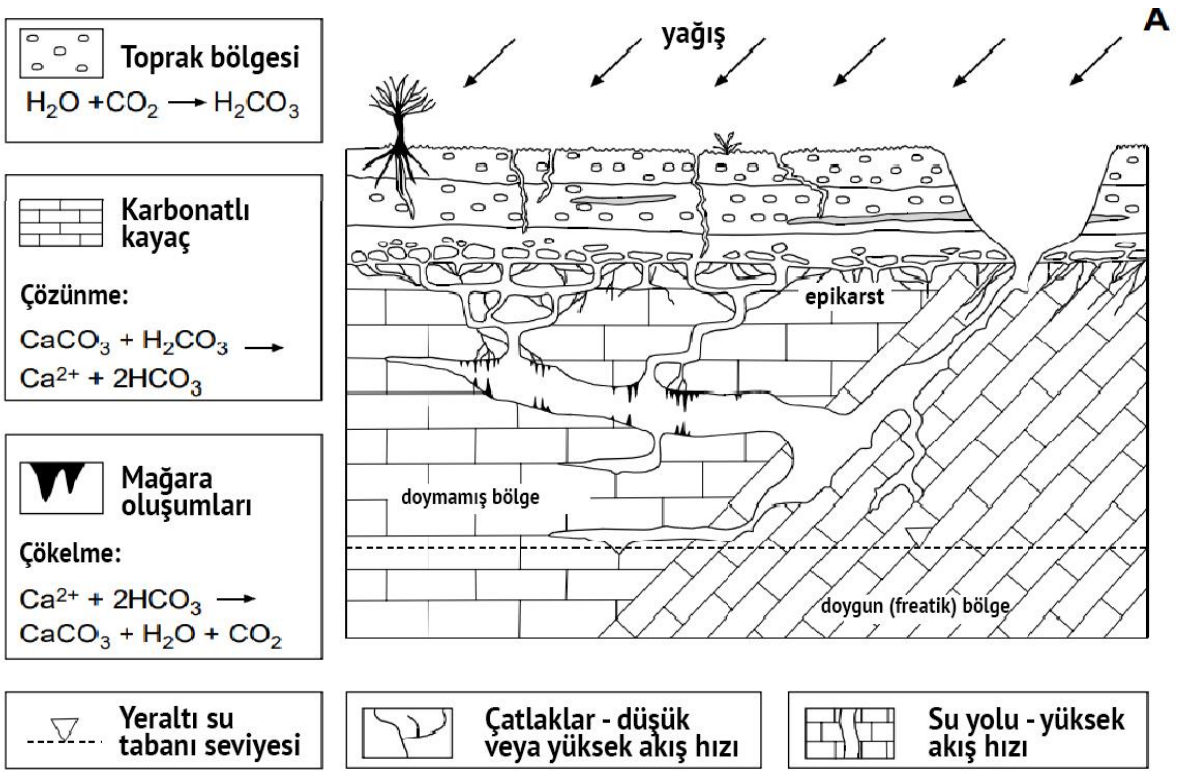
4- Taşın su tarafından fiziksel olarak parçalanması: Denizin yamaç diplerine ve kayalara çarpması yüzünden oluşan deniz mağaraları bu duruma örnektir.

5- Tatlı ve tuzlu suyun birlikte etkisi: Denizle bağlantılı olan ve dışarıdan havuz şeklinde görülen kıyıya yakın mağaralarda, tatlı su ve tuzlu suyun birleşmesiyle birlikte sürekli bir çözünme durumu ortaya çıkar ve oluşum hızlanır.

6- Buzulların erimesi: Akarsu ya da kaynakların büyük buz kütleleri içerisinde akmasıyla oluşan buz mağaraları bu duruma örnektir.

2.3. KARSTİK MAĞARALAR VE MAĞARA YAPILARI

Karstik yapıdaki kayaçların su içerisinde çözünmesiyle oluşan açıklıklar karşımıza en çok çıkan mağara çeşididir (Palmer, 1991). CO_2 bakımından zengin hale gelen karstik sular sayesinde kalsiyum karbonatın çökelmesi ‘speleothem’ olarak bilinen çeşitli mağara şekillerini meydana getirir (Frisia ve Borsato, 2010). Suda bulunan CO_2’in karbonatlı kayaçları çözmesiyle sular karbonik asit sayesinde asitleşir. Asidik yapıdaki su kireç taşlarını kalsiyum bikarbonata dönüştürür. Denge halindeki kalsiyum bikarbonat buharlaşma, ısınma gibi nedenlerle tepkimenin tersine dönmesiyle kalsiyum karbonat halinde çöker ve mağara yapılarını oluşturur (Şekil 2.2). Ayrıca speleothem olarak bilinen bu mağara oluşumları, zamanının çevre ve iklim koşullarına dair kimyasal özelliklerini saklayarak, bilim insanlarına zaman içerisindeki değişimleri takip etmelerini sağlayan kütüphaneler haline gelirler (Fairchild ve diğ., 2006; Frisia ve Borsato, 2010).



Şekil 2.2: Karstik mağara yapılarının oluşma süreci (Fairchild ve diğ., 2006).

Mağara ve mağara yapı oluşumlarının sadece jeolojik süreçlerin sonucunda değil aynı zamanda biyolojik süreçlerin etkileriyle de şekil aldığı ortaya konmuştur. Bu nedenle mağaralar sadece jeolojik değil biyojeolojik oluşumlar olarak da kabul edilmektedir (Frisia ve Borsato, 2010). Genellikle morfolojilerine ve oluşum şekillerine göre sınıflandırılan speleothem tiplerine 36 farklı örnek verilmiştir (sarkıt, dikit, vb.) (Hill ve Forti, 1995).

2.4. MAĞARALARIN İNSAN HAYATINDAKİ YERİ

Mağaralar çevre etkenlerinden koruması nedeniyle tüm canlılar için önemli doğal oluşumlardır. Özellikle arkeolojik çalışma alanları olarak değerlendirildiğinde insanlığın tarihsel gelişimine önemli ölçüde ışık tutmuştur. Hayvan ve bitki kalıntıları insanların tükettikleri besinler hakkında bilgi verebilir. Defin alanları ve bulunan araç gereçler, sahip oldukları teknoloji, kültür ve sosyal yapı hakkında fikir sahibi olmamızı sağlar. Mağaraların sunduğu korunaklı ortam bu kanıtların günümüze kadar zarar görmeden kalmasını sağlayabilir (Goldberg ve Mandel, 2008; Lee ve diğ., 2012).

Günümüzde mağaralar arkeolojik önemlerinin yanı sıra turistik ve spor amaçlı sıkça ziyaret edilen kültürel turizm alanları olarak değerlendirilmektedir. Gün ışığından uzak olmaları, yıl içerisinde sabit sıcaklığa sahip olmaları ve düşük besin miktarı içermeleri canlılık için uygun bir ortam olmadığı düşünülse de oligotrofik ve kemolitotrofik mikroorganizmalar bu ekstrem ortamda hayatta kalabilir ve üretici görevi görerek önemli doğal nişler üstlenirler. Bu açıdan bakıldığında insanların bu turistik amaçlar yüzünden mağaraları ziyaret etmesi sırasında taşıdıkları çeşitli mikroorganizmalar mağaralara özgü mikrobiyal yapıyı bozabilir. Mağaraların ışıklandırılması sayesinde fototrofik canlılar üreyebilir. Bu durumda duvar resimleri gibi mağara kalıntılarına negatif etki edebileceği gibi doğal yapı da bozulabilir. Ayrıca mağaralardaki potansiyel patojenik mikroorganizmalar da mağara ziyaretçilerinin sağlığını tehdit edebilir (Saiz-Jimenez, 2012).

Gelecekte mağaralar bizi geçmişte olduğu gibi dış etkenlerden koruyabilir. Özellikle Mars gibi Dünya'ya nazaran ince atmosferi olan gök cisimlerine gidilmesi durumunda, radyasyon ve meteorit gibi dış etkenlerden insanları koruyabilecek doğal oluşumlardır. Ayrıca bu gökcisimlerinde yapılacak biyolojik araştırmalar için de bu korunaklı durumlarından dolayı mağaralar bilim insanları için cazibesini hiç kaybetmemiştir (Fratini ve Amendola, 2014; Çolak ve Doğruöz Güngör, 2022; Al Husseini ve diğ., 2009). Mağaralar birçok açıdan insan hayatı ve tarihini etkilemiş, gelecekte de insan hayatındaki yeri ve önemini kolayca kaybetmeyeceği ortadadır.

2.5. MAĞARALARIN MİKROBİAL ÇEŞİTLİLİĞİ VE MİKROORGANİZMALARIN MAĞARA OLUŞUMUNA KATKILARI

Hayvanlar, mantarlar, arkeler ve bakteriler mağaraların yüzey ile olan bağları nedeniyle bu ortamda yer bulmakta ve bu sayede mağara ekosistemleri oluşmaktadır. Bitki ve hayvanların mağara içerisindeki aktiviteleri genellikle giriş ve girişe yakın olan kısımlarında görülür. Mikroorganizmalar ise aktivitelerini mağaraların her yerinde gösterebilir ve mağaraları kolonize edebilirler. Mikroorganizmaların mağara oluşumuna katkıları uzun süre tartışılmış ve yapılan çalışmalarla mikrobiyal aktivitelerin bu oluşumlar üzerinde etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Forti, 2001; Engel, 2010).

Karstik mağara ortamlarında yapılan çalışmalarda sediment ve su örnekleri mikroskop ve temel kültür yöntemleri ile incelendiğinde yeryüzüne kıyasla daha az çeşitlilik gösterebilir.

Fakat kültür tekniklerinin oligotrof mikroorganizmaların elde edilmesi üzerinde yarattığı zorlukları göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Barton, 2006; Barton ve Jurado, 2007; Hill ve diğ., 2000; Gurtner ve diğ., 2000). Bu türlerin yüzeyden çeşitli faktörler (hayvan, akarsu, topraktan sızıp damlayan sular vb.) yardımıyla mağara içerisinde taşınabilir olması mağaraların mikrobiyal çeşitliliğinin çalışılmaya değer olmadığını düşündürebilir (Laiz ve diğ., 1999). Fakat moleküler genetik metotlarının gelişmesiyle söz konusu bazı mağara türlerinin yüzeydeki akrabalarından farklı olduklarını ve mağaraya özgü olduklarına dair kanıtlar ortaya koymuştur (Vlasceanu ve diğ., 1997; Engel, 2010). Yapılan araştırmalar sülfür kullanan, demir ve manganez okside eden bakterilerin mağara ekosisteminde organik madde üreticisi olduğunu, bakterilerin mağara oluşumuna katkısında ve mağara ekosisteminde ne kadar önemli rol aldıklarını göstermektedir (Hose ve Pisarowicz, 1997; Angert ve diğ., 1998; Northup ve diğ., 2000; Engel ve diğ., 2001; Engel ve diğ., 2004). Biyomineralizasyon sonucu kalsiyum karbonat kristalleri oluşturan bakteriler sayesinde mikroorganizmaların karstik mağaraların oluşumunda aktif rol oynadıklarını biliyoruz (Türkgenci ve Doğruöz Güngör, 2021; Lange-Enyedi ve diğ., 2022).

Çin'in güneybatı bölgesinde bulunan 8 karstik mağarada yapılan çalışmada hava, su, kaya ve sediment örneklerinden izole edilen bakterilerin 16S rRNA analizleri sonucunda Proteobacteria, Actinobacteria ve Firmicutes filumlarının öne çıktığı gözlemlenmiştir. Su ve hava örneklerinde Proteobacteria çoğunluktayken, kaya ve sediment örneklerinde Actinobacteria'nın baskın olduğu ortaya çıkmıştır (Zhu ve diğ., 2019).

Romanya'da bulunan Movile Mağarası'na sülfür ve metan içeriği zengin sular akmaktadır bu nedenle mağaradaki ekosistemin temelini kemoototrofinin oluşturduğu düşünülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda sülfür oksidasyonu yapan Gammaproteobacteria ve Betaproteobacteria'nın Movile Mağarası'nda bulunduğu ortaya çıkmış, nitrit okside eden *Nitrospira* ve *Candidatus* bakterilerinin de bulunması nitrit oksidasyonunun da bir diğer enerji kaynağı olabileceğini ortaya koymuştur (Chen ve diğ., 2009).

Amerika'nın Ozark bölgesindeki 5 mağarada yapılan çalışmada alınan toprak örnekleri incelendiğinde 49 adet bakteri filumu gözlemlenmiş, Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Bacteroidetes ve Nitrospirae filumlarının öne çıktığı belirlenmiştir. Karanlık ve besin açısından fakir olmasına rağmen geniş canlılığa sahip

olabilen mağaralarda heterotrofik ve kemoototrofik türler görülmüştür (Oliveira ve diğ., 2017).

Güney İtalya'da bulunan Pertosa-Auletta mağarasında yapılan çalışmada, vermikülasyon adı verilen solucana benzer yapıdaki yüzeylerden alınan örneklerde bulunma miktarına göre sırasıyla; Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Planctomycetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Latescibacteria filumları moleküler analizler sonucu ortaya çıkmıştır. Bu solucanımsı oluşumlarda biyotik faktörlerin de rolü olduğu düşüncesi desteklenmiştir **(**Addesso ve diğ., 2021).

Güney Amerika'da Guyana Kalkanı olarak da bilinen Guyana Dağlığı'ndaki (Guiana Highlands/Guiana Shield) silikattan oluşmuş mağaradan toplanmış iki farklı speleothem örneği toplanmıştır. Örneklerden elde edilen DNA'ların 16S rRNA bölgesi çoğaltılarak dizileme yapıldığında; beyazımsı ve yumuşak olan yapıdaki örnekler Acidobacteriota, Pseudomonadota (önceki ismi Proteobacteria) ve Chloroflexota filumları ile örtüşmüş, siyah ve sert yapıda olan oluşumdan alınan örnekler ise Pseudomonadota, Acidobacteriota, Actinomycetota (önceki ismi Actinobacteria) filumları ile ilişkilendirilmiştir. Hücrenin yakın çevresinin pH'ını etkileyebilen membran transport ve amino asit metabolizmaları göz önüne alındığında bu bakterilerin silikat mağarasındaki oluşumlar üzerinde etkili olabileceği önce sürülmüştür (Liu ve diğ., 2022).

Metagenomik analizler sayesinde mağara ekolojisine bakış değişmiştir. Mağaraların ışıksız ve oligotrofik ortamına uyum sağlamış kültüre edilemeyen bakterilerin varlığı kanıtlanmıştır. Bakterilerin mağara ve mağara speleothemlerin oluşumuna olan katkıları tartışma olmaktan çıkmış ve deneyler ile gözlemlenmiştir.

2.6. PİGMENTLER VE İNSAN İÇİN ÖNEMİ

Renkler etrafımızda fark ettiğimiz ilk şeylerden birisidir. Organik ya da inorganik kaynaklı olabilen renkler antropolojik, estetik, psikolojik ve ekonomik alanlarda insanlığı etkilemiştir (Hao ve Iqbal, 1997; Clarke ve Anliker, 1980). Renklendirici özellik gösteren maddeler, boyalar ve pigmentlerdir. Boyaların genel özelliği monomoleküler yapının görünür ışığın selektif absorbsiyona maruz kalmasıyla renk vermesidir. Pigmentler ise çoğu çözücüde çözünemeyen renkli maddelerdir ve renklerini selektif absorbsiyon ve/veya görünür ışığın yansıması sayesinde gösterirler (Hao ve Iqbal, 1997). Organik pigmentler ışığa duyarlı

yapılardır. Fotosentetik yapıları canlılık için büyük önem taşır. Organik pigmentleri canlılık için önemli yapan üç özelliği vardır: 1- Işığı verimli bir şekilde absorblamaları. 2- Reaksiyonun başlaması için gerekli enerjinin, reaksiyon merkezlerindeki kaybını minimuma indirmesi. 3- Fazlalık enerjinin fotosentetik yapıya çok fazla zarar vermeden dağıtılabilmesi. Bu fonksiyonları gösteren klorofil, fikobilin ve karotenoid pigmentleridir (Scheer, 2003). Klorofiller ve fikobilinler çoğunlukla fotosentez sırasında ışığın yakalanmasında görev alırlar. Karotenoidler ise ışığın yakalanmasına yardımcı olmanın yanı sıra reaktif oksijen türleri ve fazla enerji gibi ışığın zarar verici özelliklerinden korunmada önemli bir rol oynar (Scheer, 2003).

Pigment ve boyalar uzun zamandır renk verici özellikleri sebebiyle tekstil, sanat ve gıda alanlarında insanlık tarafından sık sık kullanılmıştır. Bu pigment ve boyaların sentetik yollardan elde edilmeye başlamasıyla kullanımı yaygınlaşmıştır. Sentetik yoldan üretilen boyalar suda çözünürlükleri, çok fazla renk çeşitlilikleri, kolay absorblanabilmeleri ve iyi boyama özelliklerinden dolayı doğal boyalardan farklılık göstermiştir (Jamee ve Siddique 2019). Sentetik boyaların tekstil, kâğıt, deri, gıda gibi endüstrilerde yoğunlukla kullanılması, atık ve atık su olarak doğaya geri dönmesi çevre ve insan sağlığı için endişe verici bir durum oluşturmuştur (Ardila-Leal ve diğ., 2021). Sentetik boyaların toksik, kanserojenik ve mutajenik olduklarını bilinmektedir (Ardila-Leal ve diğ., 2021; Lellis ve diğ., 2019; Sharma ve diğ., 2018). Her geçen gün artan tüketimi ve sentetik boyanın doğaya verdiği zarar, doğal pigmentlerin bu konuda bir alternatif olabileceğini düşündürmüştür (Anliker, 1979). Doğal pigmentler bitkisel, mikrobiyal ya da hayvansal kaynaklardan elde edilebilir. Doğal pigmentler doğal olarak çözünebildikleri için sentetik pigmentlerin doğaya verdiği zararı vermezler. İlaç ve gıda sektöründeki avantajları nedeniyle de vazgeçilmezdir.

İnsanların diyetlerinde alınan pigmentlerin de birçok biyolojik fonksiyon göstermektedir, özellikle karotenoidler sadece gıda yoluyla alınabilmektedir. Bu nedenle eksiklikleri insan sağlığına etkili olabilir. İnsan diyetinde 30-50 arası karotenoid bulunabilir bunlardan yaklaşık 20'si kan serumunda gözükebilir. Serumda bulunan bu karotenoidlerden öne çıkanlar alfa ve beta karoten, lutein, zeaksantindir. Retina da özellikle lutein ve zeaksantin çok yoğun bulunur. Gözü mavi ışık ve oksidatif stresten koruduğu gibi bu pigmentlerin yeterli miktarda alınması yaşa bağlı göz hastalıklarını azalttığı düşünülmektedir (Whitehead ve diğ., 2006).

İnsan derisinde stratum corneum ve epidermiste bulunan melanin pigmenti 350-1200 nm arası dalga boylarında olan radyasyonu absorbe ederek ışığın zararlı etkilerinden koruma sağlamaktadır. Ayrıca melenogenez sayesinde indüklenebilen bir UV koruma mekanizması da söz konusudur (Anderson ve Parrish, 1981; Brenner ve Hearing, 2008).

Hemoglobinler kırmızı renkli kromoproteinlerdir ve prostetik grubu olarak demir porifirin içerirler (Goodwin, 1960). İnsan vücudunda hemoglobinde bulunan hemin parçalanmasıyla safra pigmentleri (biliverdin, bilirubin) oluşur, hem-oksijenaz enzimi sayesinde gerçekleşmektedir (Tenhunen ve diğ., 1968; Tenhunen ve diğ., 1970; Pimstone ve diğ., 1971). Daha sonra yapılan çalışmalarda biliverdin ve bilirubinin antioksidan özellikleri olduğu da tartışılmaktadır (Stocker ve diğ., 1990).

Pigmentler göz alıcı (dikkat çekici/ ikaz edici), biyolojik aktiviteleri olan önemli moleküllerdir. Sanayide pigment ve boyar madde olarak kullanılan tetrapirollerin 'The pigments of life' (Hayatın renkleri) olarak da anılması biyokimyasal önemini vurgulamaktadır (Battersby, 2000; Karaca, 2004; Bryant ve diğ., 2020).

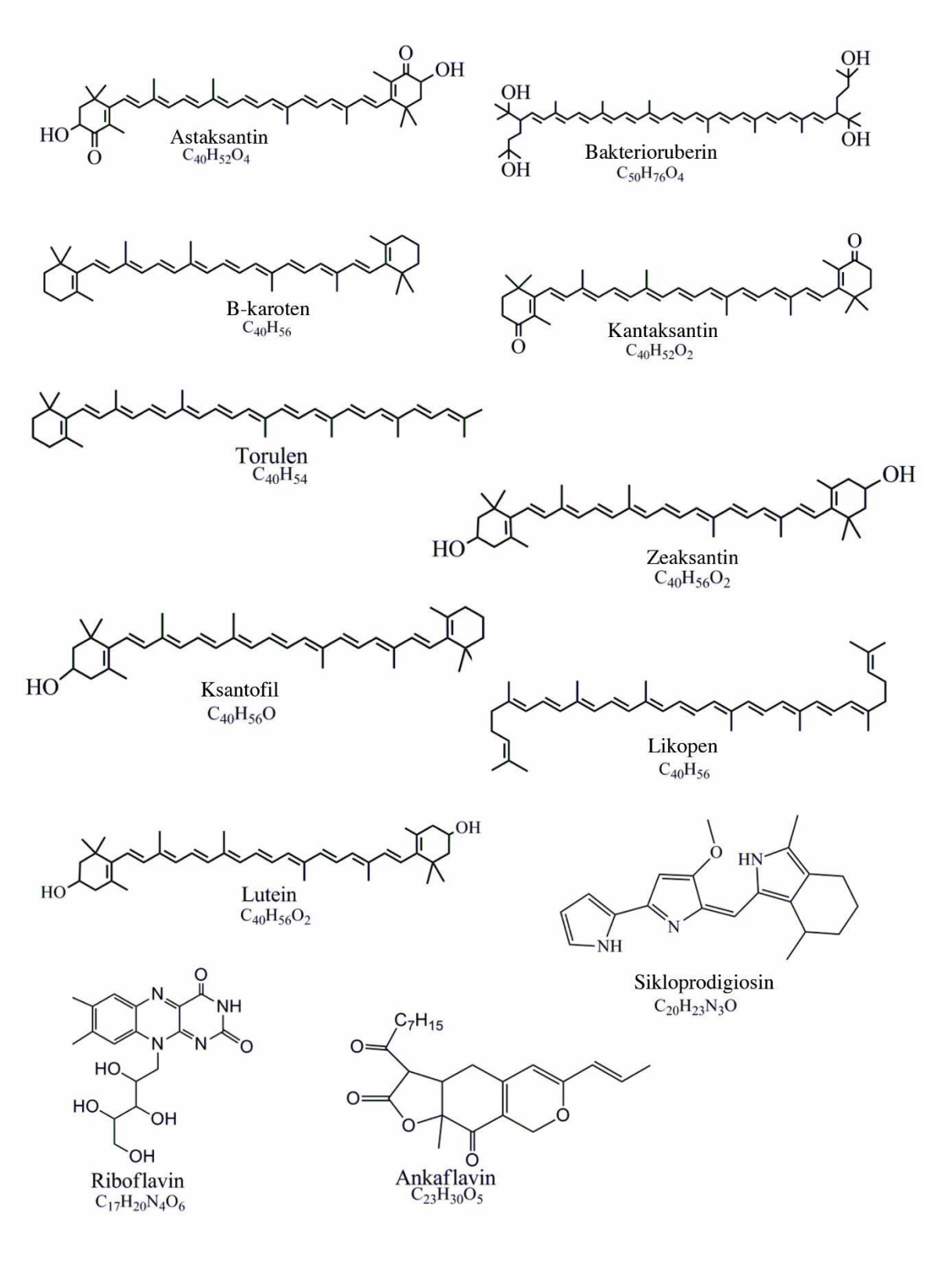
2.7. MİKROORGANİZMALAR TARAFINDAN ÜRETİLEN PİGMENTLER

Mikrobiyal kaynaklı pigmentler sarı, kırmızı, yeşil gibi birçok renkte olabilen pigmentlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilebilen bu pigmentler, mikroorganizmaların metabolizması sonucu oluşan renkli sekonder metabolitlerdir. Renk vermek, fotosenteze yardımcı olmak, konağın oluşturduğu streslere karşı mikroorganizmayı koruyarak dolaylı olarak patojen etkinin oluşmasına yardımcı olur (Rao ve diğ., 2021). Doğal pigmentler ve sentetik boyalar gıda, tekstil, kâğıt sanayi, tarım, bilimsel araştırma ve su teknolojilerinde sıkça kullanılır. Bitkiler ve mikroorganizmalar doğal pigmentlerin en önemli kaynaklarıdır fakat bitkilerden pigment elde edilmesinin mikroorganizmalara kıyasla bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar ışığa karşı hassasiyet (istikrarsızlık), suda az çözünürlük, mevsimsel koşullara bağlı olarak üretilebilmesi şeklinde sıralanabilir. Mikrobiyal pigmentlerin stabilitesi ve sahip olduğumuz kültür teknolojileri ile yıl boyu elde edilebilmesi, nedeniyle söz konusu dezavantajlar mikrobiyal pigment üretiminde geçerli değildir (Kumar ve diğ., 2015a). Son yıllarda sentetik pigmentlerin doğa üzerindeki kötü etkisinin fark edilmesi ve tüketicilerin doğal ürünlere karşı bilinçli tercihi sonucunda mikrobiyal pigmentlere karşı bir yönelim başlamıştır. Mikrobiyal pigmentlerin doğaya zarar vermemesinin yanında antioksidan ve

antikanserojen etkileri de vardır (Malik ve diğ., 2012; Moss, 2002). Gıda endüstrisinde gıdayla uyumlu, toksik özellik bulundurmayan, ekonomik açıdan uygun ve gıdayı iyileştirecek renklendiricilere ihtiyaç vardır. Bu sektörde de mikrobiyal pigmentlerin sentetik pigmentlerin yerini alması beklenmektedir. Karotenoidlerin ve antosiyaninlerin endüstriyel anlamda mikrobiyal olarak üretilmesi başarılmıştır. Pigment üretimi için seçilen suşların toksik ve patojen özellik göstermemesi ve yeterli miktarda pigment sentez edememesi mikrobiyal pigment üretiminin karşılaştığı önemli engellerdir. Biyoteknolojik ve genetik mühendislik alanındaki gelişmeler sayesinde bu sorunların aşılabileceği düşünülmektedir (Sen ve diğ., 2019). Pigmentlerin de dahil olduğu mikrobiyal kaynaklı ürünlerin karşısındaki bir diğer engel ise elde edilen ürünlerin ekonomik anlamda üretilmeye değer olup olmadığıdır. Bu sorun girdi değişkenleriyle bir veya daha fazla çıktı değişkeninin arasındaki ilişkiyi inceleyen Cevap Yüzeyi Metodu (RSM) ve istatiksel analiz çalışmalarıyla üretimin optimizasyon sağlanarak çözülebilir (Breig ve Luti, 2021).

Mikrobiyal pigment üretimi sürecinde çevre koşulları önemlidir ve pigment üretimi üzerinde doğrudan etkilidir. Önemli çevre koşullarından bazıları ısı, pH, karbon kaynağı, azot kaynağı, fermantasyon tipi, havalandırma miktarı, nem ve mineraller olarak sayılabilir. Fermantasyon yolu ile üretilen pigment kullanımı ilk başlarda tartışılsa da şu an piyasalarda tüketimi devam etmektedir (Venil ve diğ., 2013).

1970 ve 2018 yılları arasında 500 mikroorganizmadan 261 adet pigment elde edilmiştir. Bu pigmentlerin bazıları bakteriyoklorofiller, karotenoidler, flavinler, indigoidlar, melaninler, feomelaninler, monaskinler, fenazin, phenazostatin D, prodigiosinler, viyolasin, glaukothalin, fikosiyanin, ksantomonadin, fenazin, kantaksantin, astaksantin, beta-karoten'dir. Adı geçen pigmentler hücreye özgü özel metabolik aktiviteleri yerine getirirler. Ayrıca bu pigmentlerden bazılarının sitotoksik, antioksidan, antimikrobiyal, antimalaryal, antikanser, antitümör, antifouling özellik gösterdikleri de kanıtlanmış olup birçok endüstride kullanılmaktadır. Bu pigmentlerden bazılarının kimyasal formülü Şekil 2.3'de verilmiştir (Ramesh ve diğ., 2019).



Şekil 2.3: Bazı organik pigmentlerin kimyasal yapıları (Ramesh ve diğ., 2019).

Mikrobiyal kaynaklı özellikle de gıda endüstrisi için önemli doğal pigmentlere riboflavin, beta-karoten, kantaksantin, prodigiozin, fikosiyanin, melanin, viyolasin, astaksantin, likopen, aprink red, monaskus örnek olarak verilebilir (Rana ve diğ., 2021; Sen ve diğ., 2019). Mikroorganizmaların ürettikleri pigmentlerin renkleri ve biyolojik aktiviteleri Tablo 2.1' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin renkleri ve biyolojik fonksiyonları.

Pigment	Mikroorganizma	Renk	Biyoaktivite	Referans
Alg-Mikroalg				
Astaksantin	*Haematococcus pluvialis*	Pembe-kırmızı	Antienflamatuar, Antikanser, Antioksidan, ışıktan korunma	Terao, 1989; Guerin ve diğ., 2003; Dufossé ve diğ., 2005.
Beta-karoten	*Dunaliella salina*	Turuncu	Antikanser, Antioksidan	Kobayashi ve diğ., 1993; Fuhrman ve diğ., 1997.
Lutein	*Chlorella ve* çoğu mikroalgler	Sarı	Antioksidan	Chen ve diğ., 2016; Ahmed ve diğ., 2013.
Fikoeritrin	*Porphyridium cruentum* ve çoğu mikroalgler, siyanobakteriler	Kırmızı	Antioksidan, Antitümör, İmmünoregülatör	Dufossé ve diğ., 2005; Sonani ve diğ., 2014.
Fikosiyanin	*Arthrospira* sp. ve çoğu mikroalgler, siyanobakteriler	Mavi	Antioksidan, Antitümör, İmmünoregülatör	Dufossé, 2018; Guedes ve diğ., 2011.
Arke				
Kantaksantin	*Haloferax alexandrines*	Turuncu	Antienflamatuar, Antikanser, Antioksidan, ışıktan korunma	Lorqunin ve diğ., 1997; Chew ve diğ., 1999.
Bakteri				
Astaksantin	*Agrobacterium aurantiacum, Paracoccus carotinifaciens*	Pembe-kırmızı	Antioksidan, Antikanser, Antienflamatuar,	Yokoyama ve Miki, 1995; Chew ve diğ., 1999.
Kantaksantin	*Lactobacillus pluvalis, Bradyrhizobium* spp.	Turuncu	Antioksidan, Antikanser	Lorqunin ve diğ., 1997; Mathews-Roth, 1982; Chew ve diğ., 1999.
Heptil Prodigiozin	*α-proteobacteria*	Kırmızı	Antiplazmodiyal	Lazaro ve diğ.; 2002.

Tablo 2.1 (Devam): Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin renkleri ve biyolojik fonksiyonları.

Pigment	Mikroorganizma	Renk	Biyoaktivite	Referans
Prodigiosin	*Serratia marcescens, Pseudoalteromonas rubra,*	Kırmızı	Antikanser, İmmünosüpresif	Fehér ve diğ., 2008; Deorukhkar ve diğ., 2007; Melvin ve diğ., 2000; Tsuji ve diğ., 1990.
Fikosiyanin	*Pseudomonas* spp.	Mavi, yeşil	Sitotoksik, Nötrofil apoptozu, proinflamatuar	Baron ve Rowe, 1981.
Rubrolon	*Streptomyces echinoruber*	Kırmızı	Antimikrobial	Schüep ve diğ., 1978; Dharmaraj ve diğ., 2009.
Stafiloksantin	*Staphylococcus aureus*	Altın rengi	Antioksidan	Liu ve diğ., 2005a; Liu ve diğ., 2005b; Clauditz ve diğ., 2006.
Triptantrin	*Cytophaga/Flexibacteria* AM13,1 suşu	Koyu Sarı	Antioksidan, Antikanser	Wagner-Döbler ve diğ., 2002.
Undesilprodigiozin	*Streptomyces* sp.	Kırmızı	Antibakteriyel, UV koruma, Antikanser	Gerber, 1975; Liu ve diğ., 2005a; Liu ve diğ., 2005b; Stankovic ve diğ., 2012
Viyolasin	*Janthinobacterium lividum, Pseudoalteromonas tunicate. Pseudoalteromonas* spp., *Chromobacterium violaceum*	Mor	Antioksidan	Konzen ve diğ., 2006; Durán ve diğ., 2012.
Zeaksantin	*Staphylococcus aureus, Flavobacterium* spp., *Paracoccus zeaxanthinifaciens*	Sarı	Antioksidan, ışıktan korunma	Hammond ve White, 1970.
Siyanobakteri				
Sitonemin	*Cyanobacteria*	Kırmızımsı kahverengi	Antienflamatuar	Stevenson ve diğ., 2002.

Tablo 2.1 (Devam): Mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin renkleri ve biyolojik fonksiyonları.

Pigment	Mikroorganizma	Renk	Biyoaktivite	Referans
Fungus				
Ankaflavin	*Monascus* sp.	Sarı	Antitümor, Antienflamatuar	Hsu ve diğ., 2011; Dufossé, 2017.
Antrakinonlar	*Penicillium oxalicum* ve diğer birçok fungus	Kırmızı/ arpink red	Antifungal, Virüsidal	Andersen ve diğ., 1991; Agarwal ve diğ., 2000.
Beta-karoten	*Blakeslea trispora, Fusarium sporotrichioides, Mucor circinelloides, Neurospora crassa,*	Sarı-turuncu	Antioksidan, Antikanser, kolestrol sentezini bastırma	Terao, 1989; Dufossé, 2017.
Kantaksantin	*Monascus* spp.	Turuncu, pembe	Antioksidan, Antikanser	Dufossé, 2018; Mathews-Roth; 1982; Chew ve diğ.; 1999.
Siklopro digiozin	*Pseudoalteromonas denitrificans*	Kırmızı	Antikanser, Antiplasmodyal	Kim ve diğ., 1999; Yamamoto ve diğ., 1999.
Likopen	*Blakeslea trispora, Fusarium sporotrichioides*	Kırmızı	Antioksidan, Antikanser	Di Mascio ve diğ., 1989; Giovannucci ve diğ., 2002.
Monaskorubramin	*Monascus* spp.	Kırmızı	Antioksidan, Antikanser	Dufossé, 2018; Blanc ve diğ., 1994.
Riboflavin	*Ashbya gossypi*	Sarı	Antioksidan, Antikanser, kardiovaskülar hastalıklara karşı koruma	Hong ve diğ., 2008; Powers, 2003; Dufossé, 2018.
Maya				
Astaksantin	*Xanthophyllomyces dendrorhous*	Pembe-kırmızı	Antienflamatuar, Antikanser, Antioksidan, ışıktan korunma	Ramirez ve diğ., 2000; Flores-Cotera ve Sanchez, 2001.
Melanin	*Saccharomyces, Neoformans*	Siyah	Antioksidan, Antimikrobial	Vinarov ve diğ., 2003.

Kantaksantin, turuncu ve koyu pembe tonlarında görünen trans-karotenoid pigmenttir. Somon balığı ve kümes hayvanlarının etine renk vermesi amacıyla yemlere katılan kantaksantin, aynı zamanda antioksidan özellik gösterir (Surai, 2012). Astaksantin, turuncu ve kırmızı tonlarında bir pigmenttir. Çeşitli maya, mikro alg ve deniz kabuklusunda bulunan bu pigment, balık ve hayvan yemlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır (Gupta ve diğ., 2007). Antioksidan özelliği olduğu da kanıtlanmıştır (Pogorzelska ve diğ., 2018). Prodigiosin, malarya gibi bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılabilir ve antibiyotik özelliklere sahiptir (Bennet ve Bentley, 2000). Aynı zamanda süt ürünlerinde ve gazlı içeceklerde renklendirici olarak kullanılan kırmızı bir pigmenttir (Namazkar ve Ahmad, 2013). Fikosiyanin, gıda endüstrisinde sıkça kullanılan mavi renkli bir pigmenttir. Klorofil A bulunduran siyanobakteriler tarafından üretilen bu pigment, özellikle tatlı ve dondurma ürünlerinin renklendirilmesinde kullanılır (Eriksen, 2008). Viyolasin, antifungal, antibiyotik, antitümör ve antibakteriyel özellikler gösteren, mor renkli bir pigmenttir. Gıda endüstrisinin yanı sıra kozmetik ve tekstil endüstrilerinde de kullanılmaya uygundur (Durán ve diğ., 2012). Riboflavin, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen sarı renkli bir pigmenttir. Süt ürünlerinde, bebek mamalarında, kahvaltılık gevreklerde, meyve sularında ve enerji içeceklerinde kullanılmaktadır. B2 vitamini olarak da bilinir ve suda çözünür (Powers, 2003). Beta-karoten, turuncu ve kırmızı tonlarında bir pigmenttir ve yaygın olarak *Dunaliella salina*'dan elde edilir. Gıda renklendiricisi olarak kullanılır (Emeish, 2012). Melanin bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilen organik pigmentlerdir. UV korumalı kremler, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılır (Vinarov ve diğ., 2003). Likopen domates, *Fusarium* (küf mantarı) gibi canlılardan izole edilmiş parlak kırmızı renkte bir pigmenttir. Bazı kanser ve kalp hastalıklarında kullanılma potansiyelleri vardır. Et ürünlerini kırmızılaştırmak adına renklendirici olarak kullanılabilir (Di Mascio ve diğ., 1989; Giovannucci ve diğ., 2002).

2.8. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Karotenoidler doğada oldukça sık karşımıza çıkan organik pigmentlerdir (Britton, 1995; Namitha ve Negi, 2010; Yılmaz, 2010). Karotenoid pigmentleri tetraterpen yapıda olup fotosentetik bakteri, alg, bitki ve fungi gibi canlılarda doğal olarak sentezlenmektedir. 2018 yılında doğal olan 850 karotenoid pigmenti kayıtlara geçmiştir. Karotenoidler fotosentezde görev almalarının yanısıra ışıktan koruyucu, antioksidan, renk ve hormon prekürsörü olma

gibi özellikleri sayesinde canlılık için önem taşır. Hayvanlar karotenoidleri gıda yoluyla alırlar ya da yapısal modifikasyon sayesinde elde edebilirler. Özellikle A vitamini prekürsörü olması, immün sistemin güçlenmesinde ve radikal oksijen türlerinden korunmada görev almaları hayvanlar için karotenoidlerin önemini göstermektedir (Maoka, 2020; Ram ve diğ., 2020).

Kimyasal yapılarına göre karotenoidler ikiye ayrılırlar. Sadece karbon ve hidrojen atomlarından oluşanlar karoten, oksijen atomu içeren karotenoidler ise ksantofil olarak isimlendirilir. Bu iki grup kendi içlerinde içerdikleri karbon ve çifte bağ miktarlarına göre alt gruplara ayrılırlar (Rodriguez-Concepcion ve diğ., 2018). Karotenoidler sarı, turuncu, kırmızı, mor renkte görünen tetraterpen pigmentlerdir. Çoğu karotenoid pigmenti 40-karbon iskeleti ve sekiz izopren biriminden oluşur. Genel yapıları dokuz konjuge çift bağ içeren polien zincir ve bu zincirin her iki uçlarında bulunan son gruplarından oluşmaktadır. 45 veya 50 karbonlu zincir içeren karotenoid pigmentlerine ise yüksek karotenoidler denir (Maoka, 2020).

Karotenoidlerin fiziksel ve kimyasal yapıları sayesinde ışık absorbsiyonu enerji transferi, kimyasal reaktivite, çözünebilirlik, protein bağlama ve izomerizasyon gibi özelliklere sahiptir. Canlılar içinde ise fotosentez ve ışıktan korunma sırasında enerji transferi ve karotenoidlerin metabolize edilerek A vitamini oluşturmasında rol oynarlar (Krinsky, 1994).

Karotenoidlerin biyolojik açıdan canlılar için faydaları ışığın absorbe edilmesi, antioksidan etkileri, dejeneratif hastalık riskinin azaltması, antikarsinojenik etki, katarakt, damar kalp hastalıkları üzerindeki pozitif etkisi olarak sayılabilir (Mohana ve diğ., 2013). Bu etkilerin bazılarının mekanizmaları şimdilik tam olarak ortaya konulamasa da karotenoid pigmentinin insanlık ve canlılık için önemini göstermektedir (Krinsky, 1994).

2.9. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ENDÜSTRİDEKİ YERİ

Global olarak karotenoidlerin piyasası 2010 yılında 1.2 milyar dolar, 2019 yılında 1.5 milyar dolarlık bir hacim kaplarken, yıllık % 4.2 büyümeyle 2026 yılında 2 milyar dolarlık bir hacim kaplaması öngörülmektedir (Mata-Gómez ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2022). Dünya nüfusunun mevcut artışını koruması durumunda gıda endüstri gereksinimlerini karşılamak için gereken gıda boyası olarak kullanılabilir mikrobiyal pigmentlere olan ilginin artması beklenebilir (Aberoumand, 2011). Mikrobiyal pigmentler üzerinde yapılan araştırma ve

çalışmaların azlığından dolayı mikrobiyal pigmentlere olan talebin kestirilmesi zor olmaktadır (Chatragadda ve Dufossé, 2021).

Şu anda kullanılmakta olan karotenoidlerin hemen hemen hepsi sentetik olarak üretilmektedir geriye kalan küçük bir kısım ise bitki ve alglerden izole edilmektedir. Fakat günümüzde sentetik yerine doğal ürünlerin kullanılması fikri popüler hale gelmiştir. Bu nedenle karotenoid pigmentlerini üreten canlılar ve bu pigmentlerin izolasyon yöntemlerinin optimizasyonu önemli bir çalışma alanı oluşturmuştur (Galasso ve diğ., 2017; Mezzomo ve Ferreira; 2016, Ambati ve diğ., 2019).

Gıda, hayvancılık, ilaç sanayinde sıkça kullanılan karotenoidler, renk verici özelliği, organik ve doğal olması, antikarsinojen ve antioksidan etki göstermesi nedeniyle tercih edilir. Bitkilerden ya da mikrobiyal yolla elde edilen karotenoid pigmentleri endüstri içinde giderek artan ilgiyle karşılanmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı üretimin kısa süren büyüme döngüsü ve düşük üretim maliyeti sayesinde, bitkisel ve algal karotenoid üretimine karşı avantaj sağlamaktadır (Zhang ve diğ., 2022). Fakat pigmentlerin bakteri kaynaklı üretiminin endüstri standartlarını yakalayamaması nedeniyle genetik mühendisliği, fermantasyon ve endüstriyel üretimin optimizasyonu konuları gündemdedir. Ayrıca tarım ve gıda sektörleri atıklarının hammadde olarak kullanılması bakteriyel pigment üretimini endüstri standartları seviyesine taşıyabilir (Venil ve diğ., 2014; Buzzini ve Martini, 2000; Tuli ve diğ., 2015). Mikrobiyal kaynaklı pigmentlerin toksik olabilen sentetik pigmentlerin yerini alması için çalışmalar devam etmektedir (Rao ve diğ., 2021,00).

Mikrobiyal pigmentlerin arasında olan karotenoidler antioksidan, antienflamatuar, antitümör, provitamin A aktivitesi sayesinde sağlık kalitesini de arttırmaktadır. Et, et ve balık yan ürünleri, peynir gibi gıdalarda renk verici olarak kullanılması o ürünlerin göze çarpmasına neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı doğal karotenoidlerin sentetik olarak üretilen karotenoidlerin yerini alması beklenebilir.

2.10. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN MİKROBİYAL YOLLA ÜRETİMİ VE BİYOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLAR

Karotenoid gen ve gen bölgelerinin önemli bir kısmı karotenoid üretmeyen *Escherichia coli* bakterisine başarıyla aktarılmıştır. Doğal olarak karotenoid üreten *Dunalliella*, *Haematococcus, Flavobacterium* cinsleriyle kıyaslandığında heterolog karotenoid genlerin

aktarıldığı *E. coli*'nin ürettiği pigment miktarının çok az olduğu ortaya çıkmıştır (Ruther ve diğ., 1997; Albrecht ve diğ., 1999). Karotenoid yolaklarının biyokimyasal mekanizmalarının detaylı bir şekilde anlaşılması ilerideki genetik çalışmalara kolaylık sağlayarak mikrobiyal karotenoid üretimini arttırmayı mümkün kılacaktır. *E. coli*'ye kıyasla daha çok karotenoid depolayabilen alternatif konakların kullanılması ya da *E. coli*'ye karotenoid üretimine pozitif etki gösterecek diğer sistemlerin genetik olarak aktarılması karotenoid üretimini arttırabilir. Bu nedenlerle yüksek miktarda karotenoid üretimi gösterecek suşları tasarlarken terpenoid prekürsörlerinin optimizasyonu, pigment genlerinin ifadesinin dengelenerek prekürsörlerin başarılı transformasyonu, gerekli olan yüksek miktarda depolama alanının genetik mühendislik kullanılarak ulaşılması ya da diğer potansiyel konakların bulunması önemlidir. Bu sayede mikrobiyal pigment üretiminin endüstriyel standartların üstüne çıkarılması sağlanabilir (Lee ve diğ., 2002; Mapari ve diğ., 2010).

Yeni ve akıllı görüntüleme sistemleri mikrobiyal pigmentlerin daha kolay tanımlanmasını sağlayabilir. Örneğin elde taşınabilen Raman spektrometresi karotenoidleri, bakteriyoruberini ve bilinen diğer pigment bileşiklerini tanıyabilir. Bu ölçüm cihazının Mars görevlerinde yer alması beklenmektedir (Jehlička ve Oren, 2013; Brossier ve diğ., 2022; Büttner ve diğ., 2022). Önceden toksik metabolitler ürettiği bilinen mikroorganizmaların tanımlanması ve doğru karakterize edilmesi gıda endüstrisinde kullanılmasını engelleyerek araştırmacılara zaman kazandırmaktadır (Nielsen ve diğ., 2003). Kütle spektrometresi, Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi (HPLC), Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (LCMS), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Ultraviyole-görünür ışık (UV-VIS) analizleri kullanılarak istenilen moleküllerin hızlıca tanımlanabilmesi araştırmacıların işlerini kolaylaştırmıştır (Smedsgaard ve Frisvad, 1996; Elyashberg ve diğ., 2002).

Karotenoid üretimi düşük olan yabani tiplermutajenler ile müdahale edilmesi sonucunda bu suşlar geliştirilebilirler. Bu mutasyonlar için kullanılan yöntemler arasında yaygın olanlar; Etil metan sülfonat (EMS), Ultraviyole ışık (UV) pigment üretimini arttırabilir (Tripathi ve diğ., 2001; Chen ve diğ., 2003).

Biyoteknoloji sayesinde tasarlanan suşların büyük miktarda pigment üretimi sağlamak için büyük fermantasyon tankları araç olarak kullanılır. Bu tanklar içerisinde olan besiyerinin optimizasyonu da pigment üretiminden maksimum verim alınmasını sağlayacak önemli adımlardan biridir. Optimizasyon için fermantasyonun gerçekleştiği ortamın içeriği,

havalandırılması, sıcaklığı ve pH'ı yakından kontrol edilmelidir. Su ve diğ. (2011) yaptığı çalışmada besiyerinin optimizasyonu sayesinde prodigiosin pigmenti üretiminin 2.12-2.15 kat arttığını ortaya koymuştur. Pigment üretiminin, besiyerine KH_2PO_4 eklenmesiyle kontrole göre 1.17 kat artabildiği görülmüştür. Aynı çalışmada istatiksel yaklaşımlarla yapılan optimizasyon sonucu pigment üretimi neredeyse 8.42 kat artmıştır.

Moleküler biyoloji, metabolik mühendisliğin ve araçlarının gelişmesi ile pigment üretiminden sorumlu genler klonlanabilir ve bu sayede pigment biyosentezinin arttırılması başarılabilir. Heterolog gen ifadesi sayesinde mikroorganizmalar pigment üreten biyoreaktörlere dönüşmüşlerdir. Bunlar yeni ya da daha önceden pigment üreten mikroorganizmalar olabilir (Sankari ve diğ., 2018; Nielsen ve Nielsen, 2017). Mikrobiyal pigmentlerin biyosentez yollarının anlaşılması, sorumlu genlerin belirlenmesi, genlerin ifadesi sırasındaki adımların tanımlanması bu aşamaların pigment üretimini maksimuma çıkarması için modifiye edilmesi endüstriyel pigment üretimi için çok önemlidir. Endüstride çok kullanılan *Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, E. coli, Pichia pastoris, Pseudomonas putida* gibi türler genetiği değiştirilerek pigment üretebilir hale gelen rekombinantlar için ideal adaylar olabilir (Chemler ve Koffas, 2008). *Agrobacterium aurantiacum, Candida utilis* ve *Saccharomyces cerevisiae* genetik mühendislik sayesinde likopen, beta karoten ve astaksantin gibi karotenoidleri üretebilir hale gelmiştir (Ungureanu ve Ferdes, 2012; Miura ve diğ., 1998; Heider ve diğ., 2014). Genetik mühendisliği ve mutagenez çalışmaları sayesinde *Rhodotorula mucilaginosa* KC8'in beta karoten ve toruladin pigmentlerinin üretimi artırılmıştır (Wang ve diğ., 2017).

Biyoteknolojiye yeni bir yaklaşım getiren Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPR-Cas9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sistemi özellikle genetik mühendisliğinde daha önce zor ya da mümkün olmayan uygulamaları başarıyla gerçekleştirilmesini sağlamıştır. CRISPR-Cas9 iki önemli parça sayesinde DNA üzerinde değişiklikler yapmamızı sağlar. İlk parçası olarak Cas9 enzimi bir moleküler makas gibi görev alarak DNA üzerinde istenilen bölgede her iki iplikçiği keser ve DNA parçalarını eklemek ya da çıkarmak için kullanılır. İkinci önemli etken ise rehber RNA'dır. Önceden belirlenmiş (tasarlanmış) yaklaşık 20 bazlık rehber RNA, daha büyük boyuttaki farklı bir RNA iskeletinin içinde bulunmaktadır. Bu iskelet hedef alınan DNA dizisine bağlanır, Cas9 enzimi rehber RNA'nın yardımıyla genomum istenilen yerden kesilme işlemi gerçekleştirir. Bu olayı DNA

hasarı olarak algılayan hücre DNA tamir mekanizmasını devreye sokar ve bu sayede genomda bir ya da daha fazla gen başarıyla değiştirilmiş olur (Doudna ve Charpentier, 2014; Baltimore ve diğ., 2015; Mali ve diğ., 2013). CRISPR-Cas9 sistemi bakteri, maya ve fungus hücrelerini biyoreaktör haline getirerek endüstriyel pigment üretimini daha efektif hale getirebilir (Donohoue ve diğ., 2018).

Escherichia coli, Staphylococcus, Pseudomonas, Mycobacterium, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Streptomyces, Corynebacterium gibi bakteri hücreleri, CRISPER-Cas9 sayesinde biyoyakıt, biyokimya ve ilaç öncülleri ya da diğer değerli metabolitlerin üretimi sağlayacak şekilde modifiye edilebilir (Cho ve diğ., 2018). Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* endüstriyel çalışmalarda standart olarak kabul edilen bir mayadır ve CRISPR-Cas9 sistemi sayesinde renk oluşumu sağlayan genlerin eklenmesiyle doğal renk oluşumunun tetiklenmesi sağlanabilir (Lian ve diğ., 2018).

Yeni olan CRISPR teknolojisi uygulamaları tam olarak yaygın hale gelmemiştir. Mikroorganizmaların pigment üretimi üzerine çalışmaları sınırlı sayıdadır. Bu alanda optimizasyonun ve tam anlamıyla uygulanabilir hale gelmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği ortadadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MORCA MAĞARASI'NIN KEŞFİ VE HİKAYESİ

Morca Mağara'sı, Boğaziçi Üniversitesi Mağaracılık Kulübü'nün (BÜMAK) düzenlediği Çukurpınar yüzey tarama ve keşif etkinlikleri sırasında, kulübe eşlik ve rehberlik eden bir köylünün göstermesi ile kayıtlara geçirilmiştir. Morca Mağarası 1989-1996 yılları arasında fark edilmesine rağmen 2012 yılına kadar araştırılmamıştır. 2012 yılında taş atma testi ile potansiyeli fark edilen Morca Mağarası'nın ilk araştırma etkinliği Ender USULOĞLU'nun başkanlığında 2013 yılında yapılmış ve -120 metreye kadar inilmiştir. Daha da derine indiği düşünülen mağara 2014 yılında haritalandırılmaya başlanmış ve -427 metre derinliğe kadar keşfi devam etmiştir. 4 yıl aradan sonra 2018 yılının yazında gerçekleşen keşif etkinliğinde Morca Mağarası -919 metre derinliğe ve yaklaşık 3 km uzunluğa erişmiştir. Örneklemenin yapıldığı 2019 yılı keşif gezisinde Morca Mağarası 1210 metre derinliğe ve 4 km uzunluğa ulaşarak Türkiye'nin en derin mağaraları listesinde girmiştir (Ahamada Rachid, 2021).

Türkiye'nin en derin mağara listesinde 1. ve 2. sırada yer alan EGMA Peynirlikönü (-1429 m), Kuzgun Düdeni (-1.400 m) ile aynı jeolojik yapıda olması, aynı platoda bulunması ve girişinin bu diğer mağaralara kıyasla 200 m yüksekte bulunması Morca Mağarası'nın teorik olarak -1.600 m'ye gidebileceğini gösterir. Ancak 2020 yılında yapılan sifon dalışında Morca'nın ana kolunun daha derine gitmediği ortaya çıkmıştır. Morca Mağarası'nın keşfi ve haritalanması mağaranın sahip olduğu yan kolların araştırılması için keşif çalışmalarının devam edilmesi gerektiğine karar verilmiştir (Ahamada Rachid, 2021).

Türkiye'nin en derin 3 mağarasına ev sahipliği yapan Taşeli Platosu yaklaşık 900 km^{2}'dir. Morca Mağarası'nın araştırılmamış ve haritalanmamış yan kolları sayesinde daha derine gidebilme potansiyeli söz konusudur, bu sebeple Morca Mağarası'nın Türkiye'nin en derin mağarası olması ve Dünya'nın en derin 10 mağarası arasına girmesi teorik olarak mümkündür.

3.2. MORCA MAĞARASI'NIN YERİ VE ÖZELLİKLERİ

Morca Mağarası'nın girişi Taşeli Platosu'nun güneyinde 36° 18' 34.37'' Kuzey, 32° 39' 37.10'' Doğu koordinatlarında bulunmaktadır. Alp-Himalaya orojenik kuşağı üzerinde bulunan Toros Dağları'nın orta kesiminde yer alan Taşeli Platosu yapısal olarak genel anlamda düz olup, kuzeybatı doğrultusunda olan faylar tarafından şekillendirilmiştir. Taşeli Platosu'nda bulunan kireçtaşları -1600 metre kalınlığa varabilen, çeşitli kalınlık ve yaşlardan oluşmaktadır (Ahamada Rachid, 2021).

3.3. ÖRNEKLEME

Bu çalışma kapsamında Morca Mağarası'nın farklı derinliklerden ve insan kontaminasyonundan uzak olacak şekilde toprak ve sürüntü (yüzey) şeklinde örnekleme yapılmıştır. Örnekler steril kaplar içine aseptik koşullar sağlanacak şekilde alındıktan sonra soğuk zincir bozulmayacak şekilde en kısa zamanda mikrobiyoloji araştırma laboratuvarına iletilmiştir. Örneklerin alındığı derinlikler Tablo 3.1'de verilmiştir.

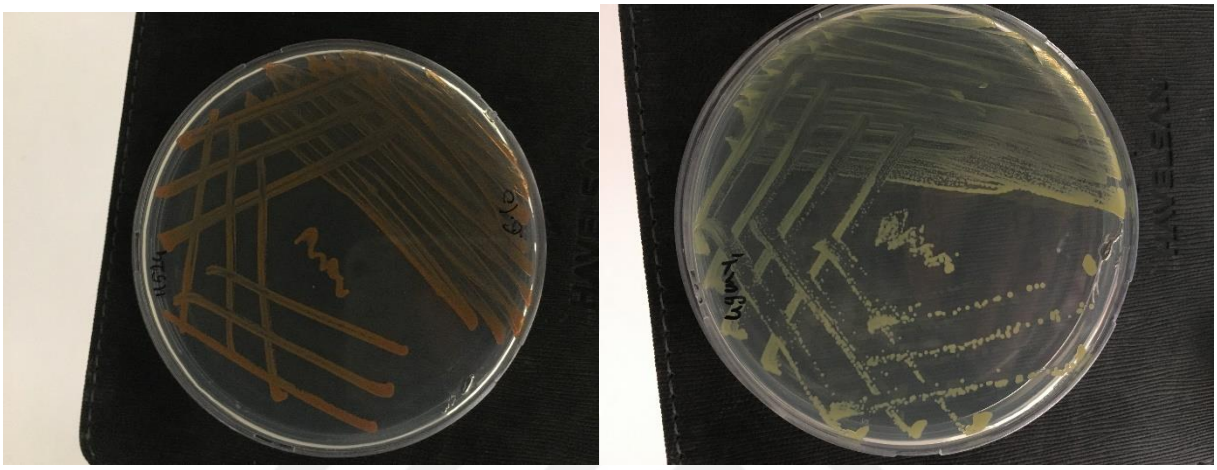
Tablo 3.1: Örneklerin alındığı ortam ve derinlikleri.

Örneğin toplandığı yer	Verilen kod	Örneğin toplandığı derinlik
1. Yüzey	MY1	-620 m
2. Yüzey	MY2	-680 m
3.Yüzey	MY3	-400 m
1. Toprak	MT1	-620 m
2.Toprak	MT2	-400 m

3.4. BAKTERİ İZOLASYONU

Alınan toprak örneklerinden steril koşullar altında 1 gr tartılarak fosfat tamponuna eklenmiştir. Tampona eklenen toprak örnekleri ve mağara yüzeyinden steril eküvyon kullanılarak alınan örnekler 10^{-1} - 10^{-5} oranında sulandırılmıştır.

Sulandırılan toprak ve yüzey örnekleri 3'er tekrarlı şekilde R2A besiyerine ekilmiş ve üremeleri için 28 ºC'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, R2A besiyeri üzerinde farklı morfolojik özellikler gösteren tüm koloniler tespit edilerek, Gram boyama yapılmış ve R2A besiyerine saf kültürleri alınmıştır (Şekil 3.1). İzolatların renkli koloni oluşturanları not edilmiştir.



Şekil 3.1: Turuncu ve sarı pigment oluşturan bakteri suşları.

İzolatların 24 saatlik taze kültürleri fosfat tamponu yardımıyla besiyerinden toplanmıştır. Sıvı hale gelen kültür (400 µl) gliserin (100 µl) ile birlikte eppendorf tüplerine aseptik koşullarda aktarılmıştır. Pipetaj yapılarak karıştırılan örnekler -20º C ve -86º C'ye kaldırılarak daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.5. DNA İZOLASYONU

Toprak ve yüzey örneklerinden kültüre alınan ve pigment ürettiği gözlenen bakteri suşlarının izolasyonu DNA izolasyon kiti (GeneAll Exegene Cell SV mini) kullanılarak elde edilmiştir. Kit prosedürüne uygun olarak gerçekleşen DNA izolasyonunun basamakları aşağıda açıklanmıştır.

1. Saf olarak üretilen bakteri suşları, hücre yoğunluğu standart 1 numaralı McFarland bulanıklık tüpüne göre ayarlanmış ve 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri içerisine süspanse edilmiştir. Hazırlanan tüpler 8 000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

2. Çökeltinin üzerine önceden hazırlanmış 180 µl lizozim solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve 37ºC sıcaklığa hazırlanmış termal blok içerisinde 30 dk bekletilmiştir.

3. Kit içerisinde bulunan Proteinaz K solüsyonundan (20mg/ml) 20 µl, BL buffer olarak isimlendirilen solüsyondan 200 µl eklenip vorteks yardımı ile çalkalanmıştır.

4. Tüpler sırası ile 56 ºC ve 70 ºC'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığına inmesi beklenen tüpler spinlenmiştir.

5. Örneklere 200 µl saf etanol eklenip vorteks ve spinden geçirilmiştir. Bu işlem sırasında görülebilen beyaz bir çökeltinin ve tüm sıvının eksiksiz olarak aktarılması önemlidir.

6. Karışımın tümü kit içinde SV sütunu olarak isimlendirilen membran içeren tüplere dikkatlice aktarılarak. 8.000 rpm üzerinde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Membrandan geçmeyen karışım kalırsa örnekler 13.000 rpm de 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. SV sütunun toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.

7. Örneklere 600 µl kit içinde bulunan ve BW buffer olarak isimlendirilen solüsyondan eklenip 8 000 rmp de 1 dakika santrifüjedilmiştir. Sütunun toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.

8. 700 µl kit içinde bulunan ve TW buffer olarak isimlendirilen solüsyondan eklenerek 8 000 rpm de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü içerisine toplanan sıvı uzaklaştırılmış tüp SV sütununa geri konulmuştur.

9. Stunlar 14 000 rpm de 1 dakika santrifüjlenerek wash buffer kalıntıları uzaklaştırılmıştır. SV sütunları steril mikrosantifüj tüplerine (1.5 ml) konulmuştur. Wash buffer kalıntısı olursa uzaklaştırılana kadar tam hız santrifüj yapılmıştır.

10. 100 µl AE buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. 14 000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiş filtre uzaklaştırılarak mikrosantrifüj tüpleri tutulmuştur.

11. Örneklerin DNA konsantrasyonları nanodrop cihazı (NanoDrop spektrofotometre-Thermo Scientific) kullanarak belirlenmiştir. Elde edilen DNA'lar PZR için -20º C de saklanmıştır.

3.6. 16S RDNA GEN BÖLGELERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE ÇOĞALTILMASI VE REAKSİYON ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZİ

16S rDNA gen bölgeleri geleneksel PZR yöntemi kullanılarak Tablo 3.2'de gösterilmiş olan primer dizileri ile çoğaltılmıştır. PZR için kullanılacak DNA konsantrasyonları $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ formülü kullanılarak 10 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.2: PZR için kullanılan primerlerin dizileri (Gülcü, 2020).

Primerin hedefi	Primer	Sekans (5' →3')
16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S rDNA	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Tablo 3.3: PZR karışımının içeriği (Gülcü, 2020).

DNA (10 ng/µl)	1 µl
Master Mix (EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix, Takara)	12.5 µl
27F primeri (5 µM)	1.5 µl
1492R primeri (5 µM)	1.5 µl
Moleküler saf su	8.5 µl
Son hacim	25 µl

Termal döngü cihazında (BIORAD T100 Thermal Cycler) ayarlanan protokolde ilk denatürasyon (1 döngü, 94^{o}C, 30 sn.), denatürasyon (30 döngü, 94^{o}C, 30 sn.), bağlanma (30 döngü, 58^{o}C, 30 sn.), uzama (30 döngü, 72^{o}C, 60 sn.), son uzama (1 döngü, 72^{o}C, 10 dk) basamakları uygulanmıştır.

16S rDNA PZR ürünlerinin elektroforezi için hazırlanan %1'lik agaroz jel mikrodalga fırın kullanılarak tamamen çözülmüştür. İdeal sıcaklığa gelince nükleik asitlerin görünmesi için

%1 Gel Red boyası (Fisher Biotec) eklenmiştir. Agaroz jel tanklarına dökülen jel içerisine tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Donan jel içerisinden taraklar dikkatlice çıkarılarak jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankının içerisine önceden hazırlanmış 1X TBE tamponu ideal hacimde konulmuştur (tampon jel seviyesinin, tankın maksimum hacim kapasitesini aşmayacak şekilde üstünde olmalıdır). Tarakların oluşturduğu kuyucukların ilkine 5 µl DNA Ladder (HyperLadderTM 100 bp, Bioline) konulmuştur. Kuyucukların devamına DNA'nın görünürlüğünü sağlayan boya DNA Loading Dye (Bioline) ve PZR ürünleri (1 µl DNA Loading Dye, 4 µl PZR son ürünü) mikroplaka içerisinde karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez cihazı 100 volt ve 30 dakikaya ayarlanmıştır. UV-Transilluminatör yardımıyla jel içerisinde oluşan bantlar görüntülenmiştir.

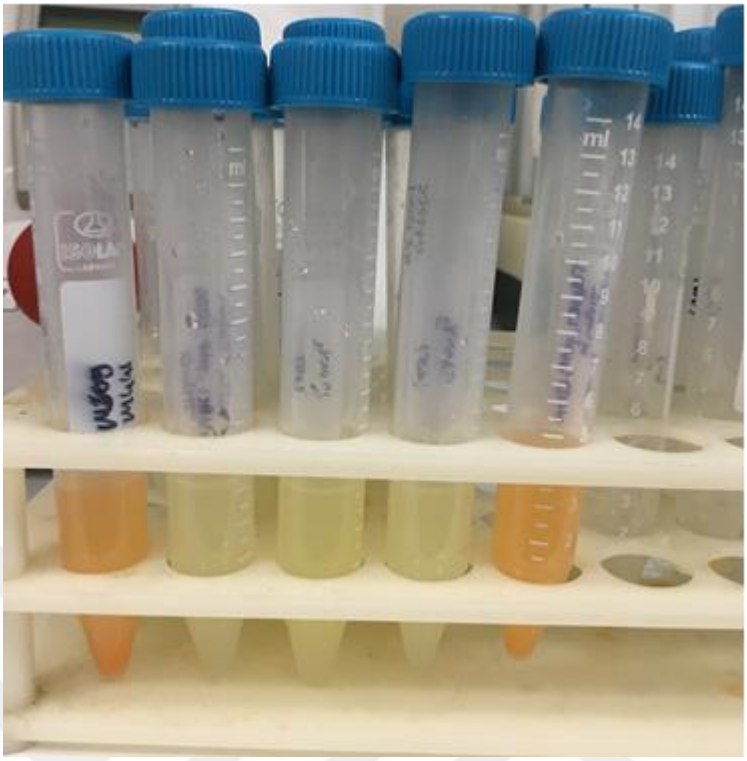
3.7. DNA DİZİ ANALİZİ

Bant oluşumu gösteren örneklerin kodlarına ait PZR ürünü bulunan tüpler, BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara) firmasına dizi analizine gönderilmiştir (Applied Biosystems API3730XL DNA Analyzer/ USA).

Seçilen suşların 16S rDNA gen dizileri analizlerinin sonuçları FinçTV yazılımı kullanılarak FASTA formatına getirilmiştir. Filogenetik akrabalıkların ortaya çıkması için NCBI BLAST veri tabanı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) içerisinde kayıtlı diğer diziler ile karşılaştırılarak en yakın tür seçilmiştir.

3.8. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN EKSTRAKSİYONU

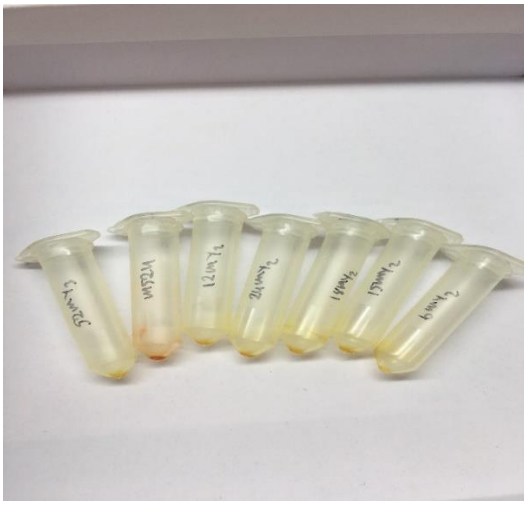
Üretilen izolatlardan turuncu, sarı ve pembe renkli koloniler seçilmiştir. Seçilen izolatlar Nutrient agar besiyerine sık ekim yapılarak çoğaltılmıştır pigment üretimi için 30 ºC'de 5 gün süreyle bırakılmıştır. İzolatlar Petri'lere 5 ml metanol eklenerek toplanmış ve 15 ml'lik Falkon tüplere aktarılmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve vorteks yardımıyla tekrar karıştırılmış, bu işlem açık renkli çökelti kalana kadar tekrarlanmış ve süpernatant toplanmıştır (Şekil 3.3). Süpernatant 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine dağıtılmış ardından metanol 60 ºC'de uçurulmuştur. Tüpler daha sonraki deneyler için -20 ºC'de ışıktan uzak şekilde saklanmıştır (Craft ve Soares, 1992; Thirkell ve Strang, 1967; Sobin ve Stahly, 1942).



Şekil 3.2: Sarı ve turuncu pigment oluşturan bakterilerin metanolde çözünmüş görüntüleri.

3.9.KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

Kuru halde saklanan pigmentler (Şekil 3.4) 75 µl metanol yardımıyla tekrar çözülmüştür. 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilip süpernatant toplanmıştır. Çözeltilerden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara koyularak spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 445-485 nm dalga boyunda 5 nm aralıklarda gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometri analizi sonrası pigmentler ince tabaka kromotografisinde kullanılmak üzere +4 ºC' de karanlıkta saklanmıştır.



Şekil 3.3: Metanolün uçurulmasıyla çökeltilen pigmentler.

3.10. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN İÇERİKLERİNİN İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Bakteriler tarafından üretilen karotenoidlerin belirlenmesi için ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Silika jel plakaların (TLC Silica gel 60 20x20, Supelco) tabanından mobil faza değmeyecek şekilde 1.5 cm yükseklikte olacak şekilde çizgi çekilmiş, örneklerin yükleneceği yerler bu çizgi üzerine nokta koyarak belirlenmiştir. Belirlenen noktalara 2.5 µl örnek yüklenmiştir. Farklı hareketli fazlar arasından en iyi sonucu kloroform: metanol (9:1) vermiştir. Denenen diğer fazlar; aseton: hekzan (6: 4), metanol: aseton: su (4: 4: 2), kloroform: metanol (6: 4) ve etanol: su: kloroform (4: 2: 4)'dür. Örnek yüklenmiş slika jel plakalar tank içine konulmuş 9:1(kloroform:metanol) mobil faz içerisinde 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaka çıkartılmış ve mobil fazın geldiği yer işaretlenmiştir. UV ışık yardımıyla görüntülenen plakalar üzerinde bantların ilerlediği son noktalar işaretlenmiştir. İşaretlenen bantlar karotenoid olarak değerlendirilmiştir. Rf değeri hesaplanarak sonuçlar okunmuştur. Rf değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Rf = Damlatılan örneklerin ilerlediği mesafe / Mobil fazın ilerlediği son mesafe (Bele ve Khale, 2011)

3.11. KAROTENOİD İÇERİKLERİNİN HPLC ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir karışım içindeki bileşenleri ayırmak için kullanılan kromatografik bir sistemdir. Çalışma prensibi, bir sütun içindeki katı adsorban maddelerden, sıvı fazın geçirilmesi ve bu şekilde sıvı örneklerin sürüklenmesi şeklindedir. Sürüklenme sırasında, örneğin bileşenleri, katı materyalle etkileşime girerken, etkileşim zayıf ise kolon dışına çıkması kısa sürede, etkileşim güçlü ise uzun sürede olmaktadır. Bu durum sürüklenme farklılıkları yaratarak, kromatogramda farklı pikler elde edilmesini sağlamaktadır (Jian ve diğ., 2012).

HLPC analizleri EGE MATAL ANALİZ'den hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içinde 2'şer tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Kullanılan HPLC modeli Agilent 1260 Infınıty HPLC-DAD'dır. Akış hızı: 0.8 mL/min olarak ayarlanmış, dalga boyu: 450 nm, mobil faz: 50:40:10 (Metanol:Asetonitril: tersiyer butyl metil eter) olarak belirlenmiş, kolon olarak ise Agilent Eclipse Plus C18 5 µm 4.6*250 mm kullanılmıştır.

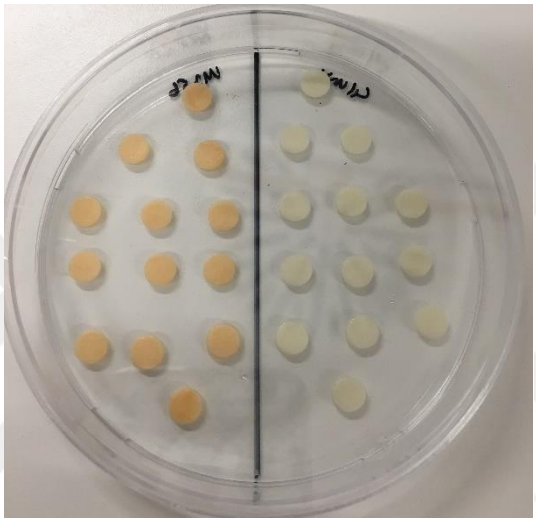
3.12. BAKTERİLERİN ÜRETTİKLERİ KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN MİKTARI

Bakterilerin ürettikleri karotenoid miktarları hesaplanırken HPLC analizlerinden gelen sonuçlardan ppb ölçümleri ve gönderilen hacim (1.5 ml) kullanılarak karetonoid miktarı (ng/ml) = ppb ölçümleri(ng/ml) × gönderilen hacim (1.5) formülü üzerinden hesaplanmıştır.

3.13.KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

İzole edilmiş kuru pigmentler 300 µl %5'lik DMSO içerisinde çözülmüştür. Pigment örneginden 20µl alınarak boş antimikrobiyal diskler üzerine damlatılmıştır kurumaları için 24 saat beklenmiştir. Karotenoid pigmentlerinin antimikrobiyal aktivitelerini tayin etmek için standart olarak *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) kullanılmıştır. Standart bakteri ve mayaların 24 saatlik taze kültürleri 0.5 McFarland'a (1.5×10^8 kob/ml) göre ayarlanmıştır.

Muller Hinton Agar üzerine hazırlanan standartlardan 100 µl alınmış ve yayma ekim yapılmıştır. Bakteri ve maya ekiminin yapıldığı Muller Hinton Agar üzerine pigment emdirilmiş diskler yerleştirilerek 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Devamında pozitif kontrol olarak ampisilin ve negatif kontrol olarak %5'lik DMSO kullanılmıştır. Değerlendirmeler disklerin oluşturduğu inhibisyon zonu ölçülerek yapılmıştır. Disklerin pigment emdirilmiş görüntüleri (Şekil 3.5) aşağıda verilmiştir (Gurkok, 2022; Qayyum ve diğ., 2020; Mohana, ve diğ., 2013; Sahli ve diğ., 2022).



Şekil 3.4: Pigment emdirilmiş diskler.

3.14. KULLANILAN BESİYERLERİ VE REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

3.14.1. Nutrient Agar (Candalab, Spain)

Bakteriyolojik agar: 15 g/L

Et ekstraktı: 3 g/L

Pepton: 5 g/L

Litre başına 23 g olacak şekilde distile su içerisinde çözülen hazır toz besiyeri, 120 ºC'de 30 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

3.14.2 Reasoner's 2 Agar (Candalab, Spain)

Glikoz: 0.5 g/L

Bakteriyolojik agar: 15 g/L

Dipotasyum fosfat: 0.3 g/L

Sodyum piruvat: 0.3 g/L

Nişasta: 0.5 g/L

Maya ekstraktı: 0.5 g/L

Pepton proteoz N^{o}3: 0.5 g/L

Kazein hidrolizat: 0.5 g/L

Magnezyum sülfat (susuz): 0.024 g/L

Litre başına 18.12 g olacak şekilde distile su içerisinde çözülen hazır toz besiyeri, 120 ºC'de 30 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

3.14.3. Muller Hinton Agar (Candalab, Spain)

Asit kazein pepton: 17.5 g/L

Bakteriyolojik agar: 17 g/L

Et infüzyon: 2 g/L

Nişasta: 1.5 g/L

Litrede 38 g olacak şekilde distile su içerisinde çözülen hazır toz besi yeri, 120 ºC'de 30 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

3.14.4. %1'lik Agaroz Jel

1.2 gr Agaroz, 100 ml 1X TBE içinde mikrodalga fırın yardımıyla çözülerek %1'lik Agaroz jel elde edilmiştir.

3.14.5. Lizozim Hazırlanması (Sigma aldrich)

Molekül ağırlığı 121.14 olan Trisma Base 0.30 g tartılarak 80 ml bidistile su ile çözülmüştür. Çözeltinin pH'ı 1M HCl kullanılarak ile 8.0'e ayarlanmıştır. Moleküler hacmi 372.24 olan EDTA 0.09 g tartılmış ve çözünme tamamlanana dek karıştırılmış ve çözelti üzerine 1 ml Triton X-100 eklenmiştir. Son hacim bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan her bir tampon 15ml'lik falkon tüplere paylaştırılmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Steril koşullarda 30 mg/ml olacak şekilde lizozim tartılmış ve hazırlanan tampon çözeltiye eklenmiştir.

3.14.6. 10X TBE Hazırlanması (Stok Çözelti)

10.8 g Tris Base, 5.5 g Borik Asit, 0.75 g EDTA, disodium salt, 100 ml distile su içerisinde çözülür ve son pH 1N HCl kullanılarak 8.3'e ayarlanır.

3.14.7. 1X TBE (Stok çözelti kullanılarak)

100 ml 10X TBE stok çözeltisi 900 ml distile su ile seyreltilerek 1 L 1X TBE bufferi hazırlanmıştır.

3.14.8. %5'lik DMSO

5 ml DMSO üzerine 95 ml dH_2O eklenerek 100 ml %5 DMSO elde edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN KÜLTÜR VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Morca Mağarası'ndan alınan örneklerden koloni morfolojileri birbirinden farklılık gösteren toplam 254 bakteri izole edilmiştir. Morca Mağarası'ndan eküvyonla alınan 1. Yüzey (-620m) örneğinden 83 bakteri, 2. Yüzey (-680m) örneğinden 35 bakteri ve 3. Yüzey (-400m) örneğinden 58 bakteri izole edilirken steril örnek toplama kaplarına alınan 1. Toprak (-620) örneğinden 54 ve 2. Toprak (-400m) örneğinden de 22 bakteri izole edilmiştir.

Pigment çalışmaları için sarı, turuncu, pembe renk kolonilerin uygun olduğu düşünülerek seçilen 40 bakteri ve sahip oldukları morfolojik özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Seçilen pigment oluşturan bakterilerin kültür ve morfolojik özellikleri.

Bakteri Kodu	Çap	Renk	Hücre Şekli	Gram Özelliği	Koloni Morfolojisi
35mt1	2 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak.
41mt2	2.5 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, ortası hafif bombeli, opak, parlak.
9my3	<1 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
10my3	1 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
48mt2	3 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, bombeli, kenarları düz, opak, mat.
42mt1	1.5 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, yarı saydam, parlak.

Tablo 4.1 (Devam): Seçilen pigment oluşturan bakterilerin kültür ve morfolojik özellikleri.

Bakteri Kodu	Çap	Renk	Hücre Şekli	Gram Özelliği	Koloni Morfolojisi
61my3	1 mm	Sarı	Flementöz basil, sporlu.	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, hafif bombeli, saydam parlak.
15my2	1.5 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, parlak.
41my1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
39mt1	3.5 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düzensiz, düz, yarı saydam, parlak.
19my3	3 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, yarı saydam, parlak.
7my1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
80my1	2.5 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, parlak.
56my1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, şeffaf, parlak.
57my3	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak
6my2	1 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
16mt1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
17mt2	1 mm	Açık sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak.

Tablo 4.1 (Devam): Seçilen pigment oluşturan bakterilerin kültür ve morfolojik özellikleri.

Bakteri Kodu	Çap	Renk	Hücre Şekli	Gram Özelliği	Koloni Morfolojisi
24my2	4 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak (ortası yoğun).
2my3	1.5 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
52my3	2 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, hafif bombeli, saydam, parlak.
20mt2	1 mm	Sarı	Kok	Gr(+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
M401	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak.
54my1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
49my1	1 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
18my2	2 mm	Sarı	Kokobasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, parlak.
32mt2	2.5 mm	Sarı	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, mat.
54mt1	2 mm	Sarı	Kok	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düzensiz, düz, opak, parlak
12my2	1 mm	Sarı	Kokbasil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
22mt2	1 mm	Açık sarı	Kokbasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam, parlak

Tablo 4.1 (Devam): Seçilen pigment oluşturan bakterilerin kültür ve morfolojik özellikleri.

Bakteri Kodu	Çap	Renk	Hücre Şekli	Gram Özelliği	Koloni Morfolojisi
M524	1.5 mm	Turuncu	Basil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, saydam parlak.
M359	1 mm	Turuncu	Basil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, yarı saydam, parlak.
M282	1.5 mm	Turuncumsu pembe	Kokobasil	Gr (+)	Kenarları düzensiz, düz, opak, parlak.
M381	2 mm	Pembemsi turuncu	Kokobasil	Gr (+)	Kenarları düzensiz, hafif bombeli, opak, parlak.
M339	1.5 mm	Turuncu	Kokobasil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
M356	1 mm	Turuncu	Basil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, bombeli, opak, parlak.
M309	1 mm	Turuncu	Kok	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, parlak.
3mt1	1 mm	Turuncu	Basil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, parlak.
M253	1 mm	Turuncumsu pembe	Basil	Gr (-)	Yuvarlak, kenarları düz, hafif bombeli, opak, parlak.
M441	3 mm	Turuncu	Basil	Gr (+)	Yuvarlak, kenarları düz, düz, opak, mat.

Renkli koloniler oluşturduğu gözlemlenen bakteriler tür analizlerinin gerçekleştirilmesi için BM Labosis'e gönderilmiştir. Analiz sonuçları sekans numaraları ile beraber verilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: İzolatların tür analizleri ve aksesyon numaraları.

Bakteri kodu	En yakın organizma	Benzerlik (%)	Filum	Sınıf	Aksesyon kodu
M282	*Brevundimonas vesicularis*	99.47	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	NR_037104.10
M401	*Mycetocola zhadangensis*	99.67	Actinobacteria	Micrococcales	NR_109597.1
61MY3	*Microbacterium* sp.	100	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
12MY2	*Massilia* sp.	99	Proteobacteria	Betaproteobacteria	NR_157781.1
52MY3	*Microbacterium* sp.	100	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
49MY1	*Pseudarthrobacter* sp.	99.89	Actinobacteria	Micrococcales	NR_074770.2
39MT1	*Glutamicibacter arilaitensis*	100	Actinobacteria	Micrococcales	NR_074608.1
57MY3	*Microbacterium* sp.	100	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
2MY3	*Microbacterium* sp.	100	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
M441	*Brevundimonas* sp.	99.27	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	NR_037104.1
10MY3	*Microbacterium* sp.	99.90	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
24MY2	*Massilia agri*	99.15	Proteobacteria	Betaproteobacteria	NR_157781.1
48MT2	*Micrococcus yunnanensis*	99.79	Actinobacteria	Micrococcales	NR_116578.1
6MY2	*Massilia agri*	99.28	Proteobacteria	Betaproteobacteria	NR_157781.1
9MY3	*Microbacterium* sp.	99.79	Actinobacteria	Micrococcales	NR_042263.1
41MY1	*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*	99.90	Actinobacteria	Micrococcales	NR_074770.2
41MT2	*Stenotrophomonas tumulicola*	97.48	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NR_148818.1
M524	*Exiguobacterium* sp.	99.82	Firmicutes	Bacilli	NR_043478.1
16MT1	*Pseudarthrobacter* sp.	99.69	Actinobacteria	Micrococcales	NR_074770.2
18MY2	*Massilia* sp.	99.23	Proteobacteria	Betaproteobacteria	NR_042652.1

Tablo 4.2 (Devam): İzolatların tür analizleri ve aksesyon numaraları.

Bakteri kodu	En yakın organizma	Benzerlik (%)	Filum	Sınıf	Aksesyon kodu
17MT2	*Arthrobacter crystallopoietes*	99.39	Actinobacteria	Micrococcales	NR_026189.1
35MT1	t	t	t	t	t
42MT1	t	t	t	t	t
54MT1	t	t	t	t	t
22MT2	t	t	t	t	t
15MY2	t	t	t	t	t
19MY3	t	t	t	t	t
7MY1	t	t	t	t	t
80MY1	t	t	t	t	t
56MY1	t	t	t	t	t
20MT2	t	t	t	t	t
32MT2	t	t	t	t	t
M359	t	t	t	t	t
M309	t	t	t	t	t
3MT1	t	t	t	t	t
M253	t	t	t	t	t

t: Tanımlanamadı

4.2. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ÜRETİMİ

İzolatların karotenoid pigmentleri üretiminin belirlenebilmesi için İnce Tabaka Kromotografisi (TLC) ve spektrofotometrik analiz yöntemleri kullanılmıştır. Gözlemlenen spot ve pik değerlerine göre karotenoidler belirlendikten sonra pigmentlerin nitel ve nicel özelliklerinin belirlenmesi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi HPLC analizi yapılmıştır.

4.2.1. Pigmentlerin Spektrofotometrik Analiz Sonuçları

Metanol içerisinde çözülen pigmentler 96 kuyucuklu plakalar içerisinde spektrofotometre aletine yerleştirilmiştir. Ölçümlerin dalga boyu 450-480 nanometre arasında, 5 nanometre de bir olacak şekilde ayarlanmıştır. 40 bakteride elde edilen pigmentlere ait absorbans ve dalgaboyu değerleri aşağıda verilmiştir Tablo 4.3'de verilmiştir, örneklerin pik verdiği dalga boyları koyu renk yazılmıştır. 450 ve 480 nm arasında pik veren örnekler karotenoid olarak değerlendirilmiştir. 27 adet bakteride belirlenen aralıkta pik oluşumu gözlenirken, 13 adet örnek istenilen aralıkta pik göstermemiştir.

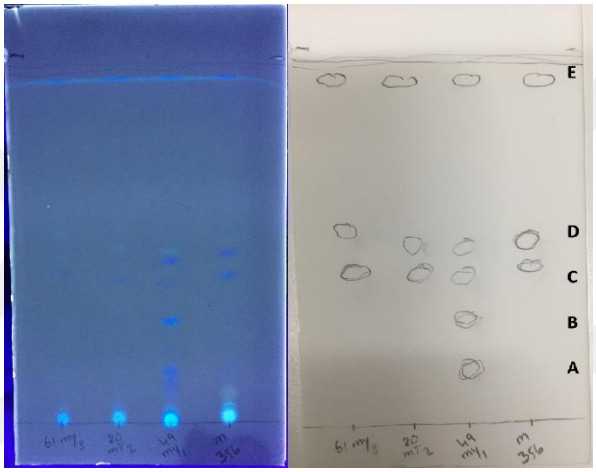
Tablo 4.3: Pigmentlerin spektrofotometrik analiz sonuçları.

Bakteri Kodu	Dalga Boyu (nm)						
	450	**455**	**460**	**465**	**470**	**475**	**480**
10my3	0.115	0.107	0.1157	**0.1248**	0.1203	0.0969	0.0698
17mt2	0.0634	0.0618	0.0598	0.0587	0.0585	0.0585	0.0573
22mt2	0.0902	0.0859	0.0869	**0.0882**	0.0859	0.0765	0.066
32mt2	0.0638	0.0628	0.0631	**0.0634**	0.0619	0.0589	0.0558
35mt1	0.1106	0.1047	0.1099	**0.1152**	0.1117	0.0946	0.0749
39mt1	0.086	0.082	0.0878	**0.0924**	0.0891	0.0754	0.0621
41mt1	0.085	0.0806	0.0767	0.073	0.0703	0.0677	0.0648
54mt1	0.0965	0.092	0.0988	**0.1054**	0.1027	0.0838	0.0649
57my1	0.0867	0.083	0.0868	**0.0903**	0.0876	0.0737	0.0591
7my1	0.0869	0.0822	0.0833	**0.0853**	0.0832	0.0743	0.0642
80my1	0.2596	0.2324	0.262	**0.3025**	0.3015	0.2276	0.1413
m253	0.103	0.0966	0.1013	**0.1069**	0.1049	0.0893	0.0718
m309	0.0472	0.0468	0.0459	0.0453	0.0449	0.0443	0.0438
m401	0.0772	0.0772	**0.0776**	0.0771	0.0759	0.0737	0.0723
9my3	0.0938	0.0867	0.0904	0.0972	**0.0980**	0.0856	0.0670
52my3	0.0526	0.0513	0.0518	**0.0531**	0.0524	0.0500	0.0460
15my2	0.0974	0.0942	0.0906	0.0889	0.0880	0.0873	0.0848
41my1	0.1207	0.1114	0.1197	**0.1316**	0.1307	0.1091	0.0809
61my3	0.0762	0.0740	0.0749	**0.0759**	0.0748	0.0702	0.0637
20mt2	0.0810	0.0774	0.0811	**0.0851**	0.0833	0.0732	0.0613
49my1	0.1151	0.1052	0.1119	0.1228	**0.1238**	0.1051	0.0783
m356	0.1197	0.1215	0.1228	**0.1231**	0.1225	0.1224	0.1194
54my1	0.0759	0.0724	0.0750	**0.0788**	0.0773	0.0694	0.0592
18my2	0.1435	0.1380	0.1316	0.1280	0.1265	0.1268	0.1226
12my2	0.1030	0.0993	0.0952	0.0930	0.0915	0.0915	0.0888
57my3	0.0739	0.0711	0.0725	**0.0744**	0.0728	0.0657	0.0572
19my3	0.0942	0.0889	0.0944	**0.1002**	0.0979	0.0836	0.0663
m524	0.3480	0.3622	0.3704	0.3767	**0.3785**	0.3773	0.3715
m441	0.2113	0.2132	**0.2146**	0.2140	0.2122	0.2099	0.2032
42mt1	0.0830	0.0808	0.0800	0.0805	0.0790	0.0758	0.0706
48mt2	0.0626	0.0608	0.0596	0.0589	0.0577	0.0559	0.0530
24my2	0.1150	0.1121	0.1081	**0.1057**	0.1044	0.1041	0.1012
16mt1	0.1163	0.1106	0.1140	**0.1180**	0.1147	0.1015	0.0850
2my3	0.0833	0.0802	0.0763	0.0744	0.0735	0.0732	0.0707
6my2	0.1017	0.0981	0.0941	0.0914	0.0905	0.0904	0.0877
m381	0.1459	0.1440	0.1429	0.1420	0.1406	0.1400	0.1391
m339	0.0956	0.0947	0.0946	0.0936	0.0929	0.0906	0.0883
m356	0.1970	0.2015	0.2073	**0.2079**	0.2073	0.2078	0.02025
3mt1	0.1517	0.1416	0.1336	0.1279	0.1223	0.1165	0.1102
m282	0.3639	0.3753	0.3855	0.3854	**0.3887**	0.3869	0.3792

4.2.2. İnce Tabaka Kromotografisi Analiz Sonuçları

Denenen mobil fazlar arasında en iyi sonucu kloroform: metanol (9:1) vermiştir. Denenen diğer fazlar; aseton: hekzan (6: 4), metanol: aseton: su (4: 4: 2), kloroform: metanol (6: 4) ve etanol: su: kloroform (4: 2: 4)'dür. Mobil fazda yürütülen pigmentlerin oluşturduğu spotlar

UV yardımıyla görüntülenmiştir. Görülen spotlara aşağıdan yukarıya doğru A, B, C, D ve E kodu verilmiştir. İşaretlenen spotlar ve Rf değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir. Karotenoid ailesine ait olduğu düşünülen spotlar standart karotenoidlerin teorik Rf değerleriyle karşılaştırılıp tabloya eklenmiştir (Bhatia, 2015). Şekil 4.1'de normal ışık ve UV altıdaki durumları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda organik çözücüler ile çözülen ve silika plakalar üzerinde yürütülen ksantofillerin Rf değer aralığının 0.17-0.53 beta karotenin 0.86-0.95 olması nedeniyle gözlenen spotlar ksantofil ve beta karoten olarak değerlendirilmiştir. Gözlenen spotlara ait olduğu düşünülen karotenoidler Şekil 4.2'de verilmiştir.



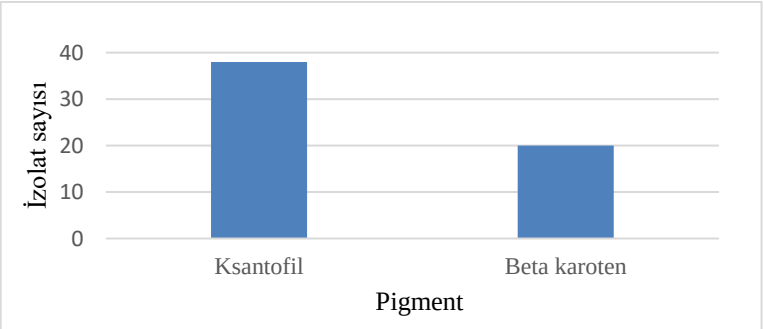
Şekil 4.1: Silika plakalarının UV ve normal ışık altında görünümü.

Tablo 4.4: İnce Tabaka Kromotografisinde gözlemlenen spotların Rf değerleri.

Bakteri	Spotlar				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**
9my3			0.45	0.51	
52my1			0.43	0.49	0.94
15my2			0.43	0.53	
41my1	0.32	0.43	0.53	0.58	0.94
M524		0.26	0.40		0.94
M441		0.21			0.94
42mt1	0.06	0.19	0.32		0.94
48mt2		0.21	0.32		0.94
61my3			0.38	0.54	0.94
20mt2			0.37	0.45	0.94
49my1	0.11	0.28	0.37	0.45	0.94
M356			0.4	0.47	0.94
24my2		0.4	0.47	0.49	0.94
16mt1	0.12	0.41	0.47		0.94

Tablo 4.4 (Devam): İzolatlarda gözlemlenen spotların Rf değerleri.

Bakteri	Spotlar				
	A	B	C	D	E
17mt2	-	-	-	-	-
M309	0.2	0.30	0.38		0.93
41mt2		0.29	0.37		0.93
39mt1			0.4	0.46	
22mt2		0.30	0.43	0.5	
M401		0.36	0.43		0.95
10my3		0.34	0.43		
56my1		0.37	0.47		0.95
57my3			0.41	0.5	0.95
M381	-	-	-	-	-
M339		0.25	0.31		0.93
M356		0.25	0.31		0.93
3mt1			0.32		0.93
M282		0.23	0.3		0.93
2my3			0.41	0.48	
6my2			0.43	0.5	
54my1	0.11	0.31	0.43		
18my2		0.25	0.38		
12my2		0.26	0.38		
19my3		0.34	0.47		
54mt1		0.34	0.43		0.94
M253		0.33	0.4		0.94
32mt2			0.38	0.5	
7my1		0.29	0.40		0.91
80my1	0.11	0.29	0.39		0.91
35mt2	0.14	0.33	0.42		

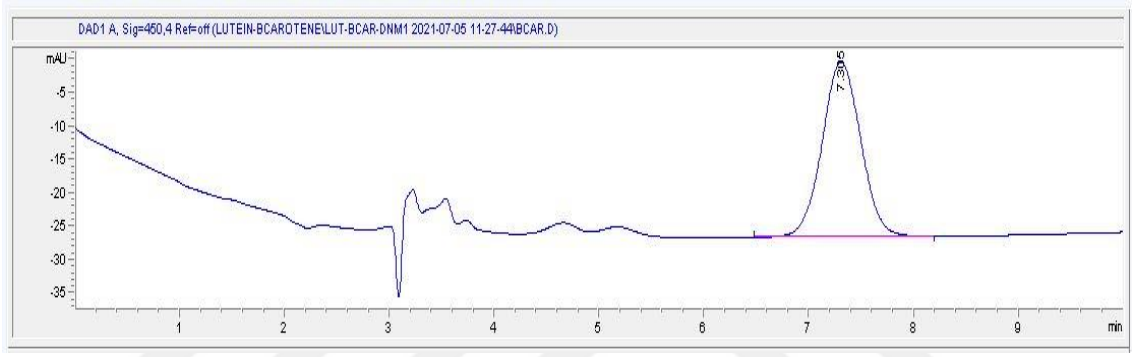


Şekil 4.2: Rf değerine göre ksantofil ve beta karoten üretimi gösteren izolat sayıları.

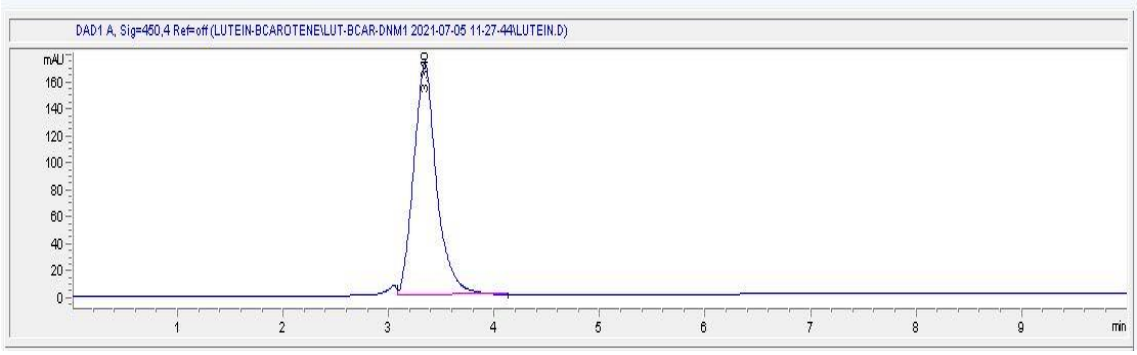
38 örnekte ksantofil, bu örneklerin 25'inde beta karoten görülmüştür. 2 örnek spot görülmemiştir.

4.2.3 HPLC Analiz Sonuçları

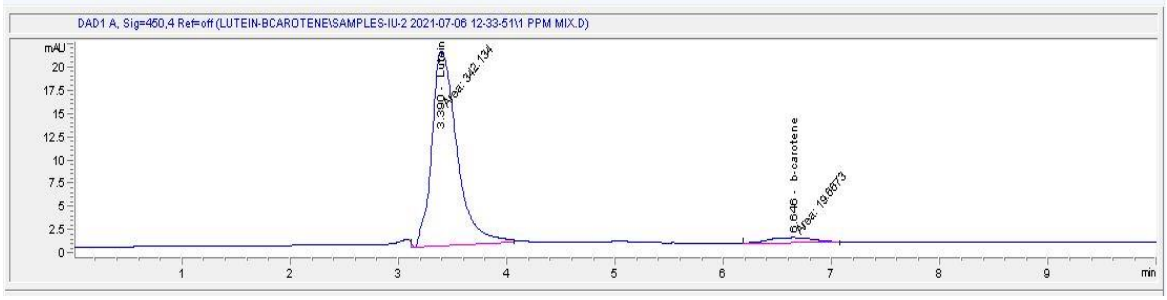
HPLC analizinde kullanılan standart karotenoidler beta karoten ve lutein olarak seçilmiş, ve Beta karoten (Şekil 4.3) ve lutein (Şekil 4.4) standartlarının verdiği pik ve kaçıncı dakikada olduğu aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Her iki standartın 1 ppm lik karışımlarının sonuçları Şekil 4.5'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre lutein standartı ile karşılaştırılan 40 örnekten 36'sının, 3. sn ve 4. sn arası pik verdiği görülmüştür ve lutein olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde beta karotene ait pik görülmemiştir. 10my3 kodlu bakteriden izole edilen örneğin HPLC sonucu Şekil 4.6' da verilmiştir.



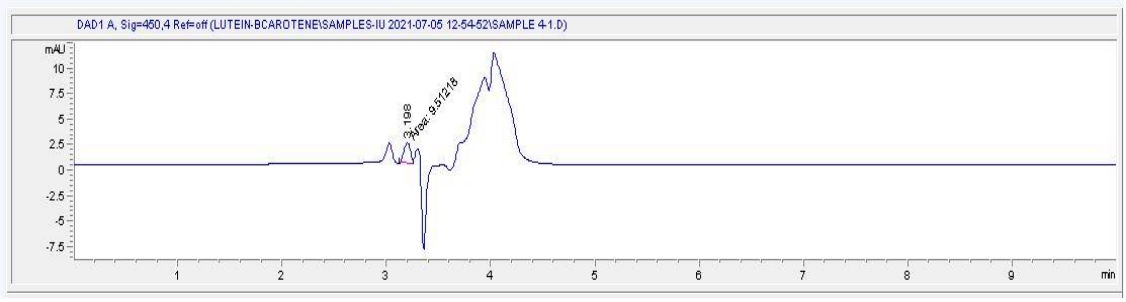
Şekil 4.3: Beta karoten standardının HPLC analiz sonucu.



Şekil 4.4: Lutein standardının HPLC analiz sonucu.



Şekil 4.5: 1ppm konsantrasyondaki standart karışımın HPLC analiz sonucu.



Şekil 4.6: 10my3 örneğinin HPLC analiz sonucu.

Analize yollanan örneklerin luteine ait verdiği pikler, ppb, alan ve pigment miktarı Tablo 4.5'de verilmiştir. Örneklerde beta karotene dair pik gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.5: İzolatların pik, alan, ppb değerleri ve karotenoid miktarları.

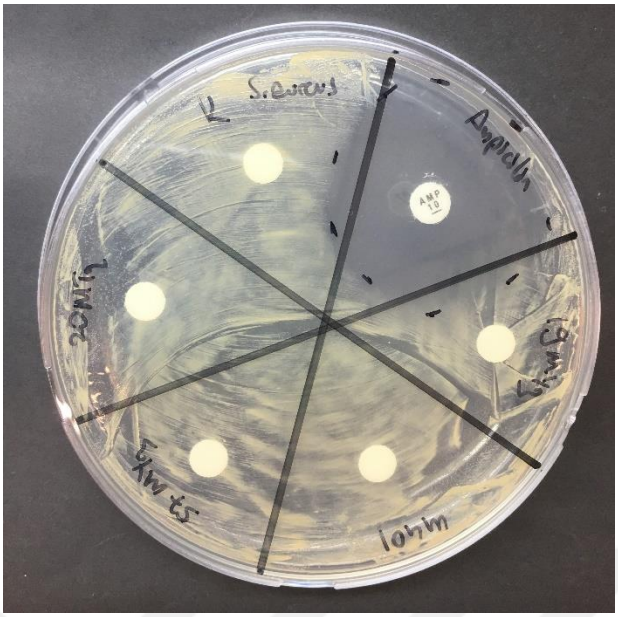
Bakteri kodu	Pik değerleri	Alan	Ppb	~Karotenoid miktarı (µg/ml)
35mt1	3.192	8.17998	22.12	33.16
41mt2	3.141	8.38392	16.87	25.3
9my3	3.199	8.06146	21.83	32.73
10my3	3.198	9.51218	25.91	38.85
48mt2	3.194	7.37791	19.79	29.67
42mt1	3.178	9.47664	25.91	38.85
6my2	3.226	7.51247	20.08	30.1
16mt1	3.203	5.01963	12.79	19.18
17mt2	3.206	5.9469	15.42	23.11
M401	3.220	5.87712	15.42	23.11
54mt1	3.221	6.44182	16.87	25.30
12my2	3.240	9.68846	26.49	39.72
22mt2	3.218	10.1575	27.94	41.91
61my3	3.269	9.76461	26.78	40.15
15my2	3.242	8.2406	22.12	33.16
41my1	3.247	5.35587	13.96	20.92
39mt1	3.242	5.33439	13.67	20.49
19my3	3.241	5.08531	13.08	19.62
7my1	3.239	9.11407	24.74	37.09
80my1	3.229	10.0977	27.65	41.47
56my1	3.231	9.72825	26.49	39.72
57my3	3.236	1.25781	2.01	3.01
24my2	3.211	5.53994	14.25	21.37
2my3	3.244	9.18501	25.03	37.54
52my3	3.246	4.83679	12.21	18.31

Tablo 4.5 (Devam): İzolatların pik, alan, ppb değerleri ve karotenoid miktarları.

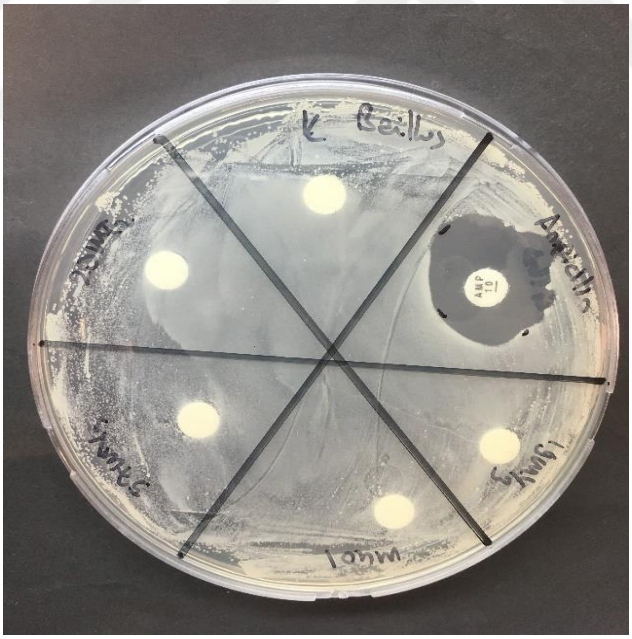
Bakteri kodu	Pik değerleri	Alan	Ppb	~Karotenoid miktarı (µg/ml)
20mt2	3.214	2.03962	4.05	6.07
54my1	-	-	-	-
49my1	3.202	9.55769	26.20	39.28
18my2	3.238	6.78987	18.04	27.04
32mt2	3.242	7.5393	20.08	30.10
M441	3.227	10.3557	28.53	42.78
M524	3.244	10.8293	29.69	44.53
M359	3.250	10.8879	29.98	44.97
M282	3.272	12.5329	34.65	51.96
M381	-	-	-	-
M339	-	-	-	-
M356	-	-	-	-
M309	3.246	1.08758	1.34	2.01
3mt1	3.244	4.71137	11.95	17.91
M253	3.222	3.35399	8.13	12.19

4.3. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

İzole edilen ve disklere emdirilen pigmentlerin standart bakteriler ve maya üzerine antimikrobiyal etkisi tespit edilememiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin antibiyotiğinin *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu, diğer standart bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı saptanmıştır. Negatif kontrol (%5 DMSO) diskinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan ampisilin antibiyotiğinin *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* bakterileri üzerindeki etkileri Şekil 4.7'de ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Ampisilin disklerinin *S. aureus* üzerindeki etkisi.



Şekil 4.8: Ampisilin disklerinin *B. subtilis* üzerindeki etkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Morca Mağarası'ndan alınmış toprak ve yüzey örneklerinden izole edilen bakterilerin karotenoid pigmenti üretme yetenekleri, ürettikleri karotenoid pigmentinin karakterizasyonu ve bu pigmentlerin antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Pigmentler tüm canlılarda doğal olarak bulunabilen organik moleküllerdir. İnsanda gözde bulunan lutein pigmenti göz sağlığına ve görmeye katkıda bulunurken, deride bulunan melanin pigmenti ise UV'nin yıpratıcı etkisinden koruyucu olarak işlev görür. Pigmentler doğada sadece fotoprotektör olarak karşımıza çıkmaz, klorofil ve bakteriyoklorofil gibi pigmentler ışığı absorblayarak ışık enerjisinin kimyasal enerjiye dönüşmesinde görev alırlar. Ayrıca yapılan çalışmalar pigmentlerin antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiimflamatuvar etki gösterdiklerini de ortaya koymuştur. Geleneksel olarak bitkisel kaynaklı olan doğal pigmentlerin yerine alternatif pigment kaynakları aranmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal kaynaklı pigmentler ve endüstriyel üretimleri yeni çalışma alanları oluşturmaktadır. Mağara gibi karanlık, izole ve ekstrem ortamlardan izole edilen mikroorganizmalar ve ürettikleri pigmentler bu ihtiyaca cevap verebilir. Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğin gelişmesiyle bu mikrobiyal pigmentler endüstriyel üretim için akıllıca bir çözüm sunabilir.

5.1. PİGMENT ÜRETİMİ GÖSTEREN İZOLATLARIN MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ VE KAROTENOİDLERİN KARAKTERİZASYONU

Morca Mağarası keşif ekspedisyonları devam eden ve turizme kapalı bir mağaradır. İnsan etkisinden uzak olması buradan izole edilen mikroorganizmaların bu mağaraya özgün olma ihtimalini arttırmaktadır. Çalışmamızda -400 m, -620 m ve -680 m derinliklerinden mağaracıların geçiş yolundan uzak olacak şekilde 3 yüzey (MY1, MY2, MY3) ve 2 toprak (MT1, MT2) olarak toplam 5 noktadan örnek toplanmıştır. Birbirinden farklılık gösteren 254 bakterinin %74'ü Gram (+) %26'i Gram (-) özellik göstermiştir. Yüzey ve toprak izolatları Gram özellikleri göre karşılaştırıldığında, yüzey örneklerinin %71.6'i Gram (+) ve %28.4'ünün Gram (-) toprak örneklerinin ise %78.9'u Gram (+) ve %21.1'inin Gram (-) olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar mağara toprak ve su örneklerinden izole edilen bakterilerin büyük çoğunluğunun Gram (+) olduğunu ortaya koymuştur (Türkgenci ve Doğruöz Güngör, 2021; Çandıroğlu, 2018). Urzì ve diğ. (2010) paleolitik mağaralarda

(Zuheros, İspanya) yaptığı çalışmada, mağara yüzeylerinden izole edilen bakterilerin Gram özelliklerine baktığında %90.2'sinin Gram (+) geriye kalan %9.8'inin Gram (-) olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde Baskar ve diğ. (2011) Mawmluh Mağarası'ndan izole ettikleri bakterilerin Gram (+) ağırlıkta olduğunu görmüştür. Bu durumdan yola çıkarak izolasyon sırasında temel kültür yöntemleri uygulanan mağara çalışmalarında Gram (+) bakterilerin sayılarının Gram (-) bakterilerden daha fazla olduğu yorumu yapılabilir.

Mağaradan izole edilen bakterin arasıdan pigment üretimine göre seçilen suşların mikrobiyal çeşitliliğine bakıldığında %61.9'unun Actinobacteria, %33.4'nün Proteobacteria ve %4.7'sinin Firmicutes filumlarına ait olduğu görülmüştür. Mağaraların mikrobiyal çeşitliliğinin yapıldığı çalışmalarda Actinobacteria, Proteobacteria (alfa, beta ve gama proteobakteriler) ve Firmicutes filumlarının baskın olduğu görülmüştür (Barton ve Jurado, 2007). Zhu ve diğ. (2019) karstik mağaralarda yaptıkları çalışmada da hava, su, kaya ve sediment örnekleri toplanmış, izole edilen bakterilerin 16S rRNA analizleri Proteobacteria, Actinobacteria ve Firmicutes filumlarının öne çıktığı göstermiştir. Su ve hava örneklerinde Proteobacteria ağırlıkta iken, kaya ve sediment örneklerinde Actinobacteria'nın daha çok olduğu ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda tanımlanan bakterilerin %61.9'u micrococales, %9.5'i alphaproteobacteria, %19'u betaproteobacteria, %4.8'i gamaproteobacteria, %4.8'i bacilli sınıfına ait olduğu görülmüştür. Leiva ve diğ. (2015) Antartika'da deniz makroalgleri ile ilişki içerisinde olan pigmentli bakterilerin çeşitliliği üzerine yaptıkları çalışmada *Actinobacteria* (*Agrococcus, Arthrobacter, Brachybacterium, Citricoccus, Kocuria, Labedella, Microbacterium, Micrococcus, Rhodococcus, Salinibacterium ve Sanguibacter*) ve *Firmicutes* olarak tanımlamıştır. Bu çalışmada Antarktika makroalglerinden izole edilen bakterilerin, karotenoid pigmentleri ve antimikrobiyal maddeler için kaynak olabileceğini tartışmıştır. Çalışmamızda da toprak ve su ortamlarından sıkça izole edilen *Actinobacteria, Proteobacteria* ve *Firmicutes*'in toprağın ve suyun bol olduğu mağara ortamından elde edilmesi ve bu türlerin pigment üretimi göstermesi çalışmamız adına tutarlı sonuç vermiştir.

İzole edilen bakterilerden sarı, turuncu, pembe renkli koloni oluşumu gösteren toplam 40 (30 sarı, 10 turuncu-pembe) adet bakteri seçilmiş ve karotenoid üretimleri gözlemlemek için TLC, HPLC ve spektrofotometrik analizler kullanılarak pigmentler karakterize edilmiştir. Karotenoidler sarı, turuncu, kırmızı, pembe renklere sahip doğal pigmentlerdir ve ksantofiller

ve karotenler olarak iki gruba ayrılırlar (Nisar ve diğ., 2015). Bu nedenle yapılan çalışmalar karotenoid ailesi üzerine odaklanmıştır.

Yapılan çalışmalarda organik çözücüler (metanol, etanol, hekzan) ile çözülen ve silika jel plakalar üzerinde yürütülen ksantofillerin Rf değer aralığının 0.17-0.53 beta karotenin 0.86-0.97 görülmüştür (Hynstova ve diğ., 2018; Rebecca ve diğ., 2014; Starek ve diğ., 2015; Kadeem, 2011). Yaptığımız çalışmada hareketli faz olarak kloroform:metanol(9:1)'den en iyi verim alındığı görülmüştür. Karotenoid ailesine ait olduğu düşünülen bu bantların 38 (%95) tanesi ksantofil, 25 (%62.5) tanesinin beta karotene ait Rf değer aralığında olması nedeniyle ksantofil ve beta karoten olarak yorumlanmıştır. Pigmentlerin adlandırılması için HPLC analizi yapılmıştır.

Çalışmamızdaki TLC analizleri sonucunda izolatların beta karoten, ksantofil üretimi ile ilişkilendirilmiştir. İzolatların kolonilerinin turuncu ve sarı olmasına rağmen birden fazla spotların olması farklı sayıda karotenoid pigmenti içerdiğini göstermiştir. Lutein ve antaksantin pigmentinin birbirine yakın bantlar vermesi analizlerdeki diğer ksantofilin antaksantin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. HPLC analizine yollanacak pigmentin seçimi için TLC deneylerinden sonra spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır.

Farklı organik çözücüler içerisinde spektrofotometrik ölçümler göreceli olarak Beta karoten standardının 448 nm-466 nm, luteninin standartının ise 442 nm ve 460 nm arası maksimum pik verdiği görülmüştür (Sobin ve Stahly, 1942; Craft ve Soares, 1992; Rodriguez-Amaya, 2001; Rouseff ve diğ., 1996; Domenici ve diğ., 2014). Costache ve diğ. (2012) çözücü olarak etanol ve metanol kullandıkları çalışmalarında karotenoidleri belirlemek için 470 nm dalgaboyu kullanmışlardır. Çalışmamızda metanol kullanarak izole ettiğimiz pigmentlerin spektrofotometrik analiz sonuçları aldığımız maksimum piklerin (λmax) belirtilen aralıkta(460 nm-470 nm) olması bunların karotenoid ailesine ait olduklarını göstermektedir. Literatür ile karşılaştırıldığında bu değer aralığında pik veren karotenoidin ksantofillere dahil olan lutein pigmenti olabileceği görülmüştür. Çalışılan örneklerden alınan spektrofotometrik ölçümlerinin maksimum pik değerlerinin (λmax) %5'nin 460nm, %52.5'nin 465nm, %10'unun 470 nm olduğu görülmüştür. Ölçümlerin %32.5'i istenilen aralıkta pik göstermemiştir. Bu aralığa yakın olabilecek karotenoidlerin kaçırılmaması spektrofotometrik ölçümlerin 400 ve 500 nm arası yapılması daha iyi olacaktır. TLC ve spektrofotometrik ölçümler sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında HPLC analizinde beta karoten ve lutein

standartları kullanılması istenmiştir. Karotenoid ailesi çeşitli olduğu için bakterilerin ürettikleri diğer pigmentlerin tanımlanması için gereken standart pigmentlerin pahalı olması bu çalışmada görülen diğer karotenoidlerin denenmesi ve adlandırılmasını yapılamamıştır.

Spot gözlenen bakteriler HPLC analizi ve pigmentlerin karakterizasyonu için EGE MATAL'dan hizmet alımı yapılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde 40 bakteriden elde edilen örneklerin 36'sının 3. ve 4. saniyeler arası pik vermiştir. Örnekler pigment standartlarıyla karşılaştırıldığında lutein içeriği görüntülenmiştir. Analiz sonucunda beta karoten görülmesi beklenmiş ancak görülmemiştir. Karotenoidlerin metanol ve diğer organik çözücüler içerisinde zamana bağlı olarak parçalandığı bilinmektedir (Craft ve Soares, 1992; Latasa ve diğ., 2001). Beta karoten pigmentinin oksidatif stres altında lutein pigmentine kıyasla daha çabuk parçalandığı (Henry ve diğ., 1998), ayrıca ısıya maruz bırakıldığında beta karotenin daha düşük stabiliteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Aman ve diğ., 2005). TLC üzerinde görülen karotenoid pigmentlerinin HPLC analizlerinde görülmeme sebebinin, iki örneğin karışık şekilde verilmesinden, beta karoten ve luteinin analizin yapılma sürecindeki bekleme ve ısıtılması nedeniyle parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Alınan sonuçlarda izolatların ürettikleri lutein pigment miktarının her bir mikrosantrifüj tüpleri içerisinde 2.01 µg/ml (0.00201 ppm) ve 51.96 µg/ml (0.05196 ppm) aralığında olduğu görülmüştür. Çalışmamızda pigment saflaştırılması yapılmamıştır. Bu miktarlar besiyeri ve fermantasyon koşullarının optimizasyonuyla arttırılabilir.Ayrıca bakterilerden izole edilen pigmentler birçok endüstride kullanılan bitki ve mineral kaynaklı pigment üretimi ile karşılaştırıldığında daha fazla yarar sağlayabilir; örneğin yüksek hacimli biyoreaktörlerin kullanılması, bakterilerin genetik mühendislik sayesinde pigment üretimlerinin arttırılabiliyor olması, üretimi için gerekli alanın bitki kaynaklı pigmentlere göre az olması ve çevre koşullarından bağımsız olması, gıda ve tarım atıklarının substrat kullanılarak üretilebilmesi sayesinde mikrobiyal pigmentler hem çevreci hemde ekonomik bir alternatif sunmaktadır (Setiyono ve diğ., 2019; Padhan ve diğ., 2021). Bu konuda çalışmaların arttırılması endüstride mikrobiyal pigment üretimine ve kullanımına katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda izole edilen izolatların tür analizlerinde sarı renkli koloni oluşturanlarının %73.2'sinin Actinobacteria, %27.7'inin Proteobacteria filumuna, turuncu-pembe koloni oluşturanlarının ise, %66'sının Proteobacteria ve %34'ünün Firmicutes filumuna ait olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda izole edilen suşlardan 48MT2 kodlu bakteri *Micrococcus yunnanensis* olarak tanımlanmıştır. Topraktan Raman spektrometresi gözlenen renkli bakterilerin *Micrococcus*, *Deinococcus* ve *Kocuria*' ya ait olduğu görülmüştür (Kumar ve diğ., 2015b). *Micrococcus yunnanensis* bakterisinden izole edilen nadir görülen 50 karbonlu, 3 karotenoidin anti oksidatif özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Osawa ve diğ., 2010). Bhat ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada *Micrococcus* cinsine ait sarı (*Micrococcus luteus*) ve turuncu (*Micrococcus roseus*) renkli kolonilerin tür analizlerini yapmıştır. Ibrahim (2008) yaptığı çalışmada denizden izole ettiği karotenoid üreticilerinin *Micrococcus* sp. olduğunu göstermiştir. Ayrıca mikrokokların ait olduğu Microbacteriaceae familyasının önemli bir miktarının sarı, kırmızı ya da turuncu renkli koloni oluşturdukları bilinmektedir. Bu renkliliğin sebebi 40 karbonlu karotenoidlerin absorbsiyon spektrasına çok benzeyen izoprenoidler olabilir. Bu familyaya ait olan *Microbacterium* ışıkla tetiklenerek karotenoid üretebilmektedir (Trutko ve diğ., 2005; Leiva ve diğ., 2015).

M282 kodlu izolat *Brevundimonas vesicularis* olarak tanımlanmıştır. Tao ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada topraktan izole edilen turuncu-pembe renkli koloniler oluşturan bakteriyi *Brevundimonas vesicularis* DC263 suşu olarak tanımlamış ve karotenoid sentez gen bölgesine sahip olduğunu belirlenmiştir. HPLC analizleri sonucunda bu pigmentler hidroksile astaksantin (2,3,2′,3′-tetrahydroxy-β,β′-caroten-4,4′-dione) olarak tanımlanmıştır.

M401 kodlu izolat *Mycetocola zhadangensis* hakkında literatürde yeterince bilgi bulunamamıştır. Shen ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada kardan izole ettikleri *Mycetocola zhadangensis*'nin sarı renkli koloni oluştuduğu ve izoprenoid kinon barındırdığı gösterilmiştir. Hücrelerin aerobik, Gram (+), çomak oldukları belirtilmiştir. R2A agar üzerinde 28 ºC'de 2-3 günlük inkübasyonları sonunda kolonilerin sarı, yuvarlak, pürüzsüz, konveks ve opak oldukları belirlenmiştir. Nitrat redüksiyonu negatif olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda da görülen sarı renkli koloniler ile tutarlılık göstermiştir. Bu bakterinin sahip olduğu pigmentler üzerine yeterli bir çalışma yoktur. Taklamakan Çölü'nden izole edilen *Mycetocola manganoxydans* kolonilerinin de sarı renkte oldukları Luo ve diğ. (2012) tarafından belirtilmiştir.

24MY2 ve 6MY2 kodlu bakteriler *Massilia agri sp.* olarak tanımlanmıştır. Chaudhary ve Kim (2017) yaptıkları çalışmada topraktan izole etmişler ve isimlendirmişlerdir. Kolonilerin açık sarı, yuvarlak, pürüzsüz, konveks ve opak oldukları gözlemlenmiştir. Gram (-), hareketli,

çomak olan bakterilerin R2A agar ve TSA besiyerinde iyi üretiklerini görmüştür. Pigment üretimi üzerine yeterince çalışma bulunmamaktadır.

41MY1 kodlu bakteri *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda *Arthobacter*'lerin bazıları yeniden adlandırılmış ve *Pseudarthrobacter* olarak tanımlanmıştır (Busse ve Schuman, 2019). Bu duruma ek olarak soğuk ortamlardan izole edilen *Arthrobacter*'lerin kırmızı ve sarı pigment üretimi gösterdikleri literatüre geçmiştir (Dsouza, 2015).

41MT2 *Stenotrophomonas tumulicola* strain T5916-2-1b olarak tanımlanmıştır. Handa ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada *Stenotrophomonas tumulicola* bakterilerinin Gram (-) özellikte düz ve kıvrık çomak olduklarını, Nutrient agar üzerinde düz, yuvarlak, parlak olmayan ve sarımtırak koloni olduklarını tespit etmişlerdir. Bu türün pigment üretimi üzerine yeterli bir çalışma yapılmamıştır.

17mt2 *Arthrobacter crystallopoietes* olarak tanımlanmıştır. *Arthrobacter*'lerin çoğunun turuncu, sarı, mavi, yeşil ve kırmızı renkli pigment üretimleri gözlemlenmiştir (Sutthiwong ve diğ., 2014). *Arthrobacter* c*rystallopoietes*'in karbon ve nitrojen kaynağı olarak 2-hidroksipiridin verildiğinde parlak yeşil kristalin pigmenti ürettiği bilinmektedir (Ensign ve Rittenberg, 1963).

39MT1 *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 olarak tanımlanmıştır. Çoğunlukla sarı renkli karotenoidler olan C50 karotenoidleri ürettiği bilinen bu türün, kırmızı renkli pigment de üretebildiği Sutthiwong ve diğ. (2021) tarafından kanıtlanmıştır. Borker ve diğ. (2021) yaptıkları çalışmada, toprak kompostundan izole edilen psikrotrofik *Glutamicibacter arilaitensis* LJH19 suşunun karotenoid gen bölgesine sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak izole ettiğimiz bakterileri filum bazında ele alırsak; hem fotosentetik özelliği olan hemde fotosentez yapmayan proteobakterilerin halka şeklinde olmayan C40 karotenoidleri ürettikleri bilinmektedir (Sandmann, 2021). Ayrıca *Arthrobacter* cinsine çok yakın akrabalık gösteren Actinobacteria'dan lutein izolasyonu gerçekleşmiştir (Asker, 2018). Shen ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada derin buzullardan izole edilen bakterilerin, Proteobacteria baskın olmak üzere Actinobacteria, Bacteroidetes ve Firmicutesin cinslerinin ağırlıkta olduğu, sarı renkli (% 47) kolonilerin ise çoğunlukta görüldüğü bildirilmiştir. Bu renk oluşumu gösteren bakterilerin ürettikleri pigmentlerin arasında alfa ve beta karoten,

peridinin, zeaksantin/lutein, fukoksantin ve fukosantin bulunur. Bu bilgiler ışığında soğuk ve ekstrem ortam olan mağaralardan izole edilen türlerin bu türler olması, pigmentasyon adına benzer sonuçlar almamız çalışmamızın tutarlı olduğunu göstermiştir.

5.2. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Çalışmamızda uygulanan disk difüzyonu sonucunda, standart olarak seçilen 5 bakteri ve 1 maya üzerinde pigment emdirilmiş diskler antimikrobiyal etki göstermemiştir. Bakteriden izole edilen pigmentlerin antimikrobiyal etkisinin denendiği Gurkok (2022) yaptığı çalışmada disk difüzyonu sonuçlarında istatiksel olarak pozitif bir sonuç alamamıştır. Bunun nedeninin pigmentlerin agara iyi difüzyon olmaması şeklinde açıklanmıştır. Aynı çalışmada pigmentlerin antimikrobiyal etkisinin tespit edilmesinde 96 kuyucuklu kültür plakası yönteminin daha başarılı olduğu görülmüştür (Gurkok, 2022). Deniz suyundan izole edilen *M. luteus* türünün ürettiği sarı renkli pigmentin *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. üzerinde antimikrobiyal etki yarattığını gösteren Umadevi ve Krishnaveni saflaştırma sayesinde daha iyi sonuç alınabileceğini öne sürmüştür (Umadevi ve Krishnaveni, 2013).

5.3. KAROTENOİD PİGMENTLERİNİN ENDÜSTRİ VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ GELECEĞİ

Çalışmamızda pigment üretiminin arttırılması için optimizasyon çalışması yapılmamıştır. Düşük miktarda üretimi görülen luteinin besiyeri ve fermantasyon koşulları optimize edilerek arttırılabilir. Endüstriyel anlamda mikrobiyal pigment üretimi için bu gereklidir. Chakraborty ve diğ. (2015) Actinobacteria'dan pigment üretiminin yaygın olmamasının nedenini yüksek hacimli fermantasyon uygulamalarının eksikliği ve izolasyon, saflaştırma, liyofilizasyon gibi aşamaların çok önemli olduğu 'Downstream' işleminin yeterince kullanışlı hale geçememesi olduğunu belirtmiştir.

Moreira ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada olan atık olarak kahve kabuğu ve geriye kalan kahve atıklarından oluşturdukları besiyerinde *Rhodotorula mucilaginosa* üretmeyi başarmış ve karotenoid elde etmiştir. Elde ettikleri beta karoteni sentetik beta karoten ile karşılaştırdıklarında piyasada bulunan fiyatın neredeyse yarısına ürettiklerini görmüşlerdir. Ayrıca elde ettikleri karotenoidin antimikrobiyal ve antioksidan etkisi olduğunu da göstermişlerdir. Bu durum pigment üreten mikroorganizmaların atık olarak değerlendirilen

substratlar kullanarak üretilmesi durumda organik pigmentlerin ekonomik olarak daha avantajlı olduğunu kanıtlamıştır.

5.4. SONUÇ

Uzun bir süre ekstrem olarak değerlendirilen çevrelerin canlılık barındırmadığı düşünülmüştür. Fakat termal sular, derin deniz bacaları ve mağara gibi ekstrem ortamlarda yapılan çalışmalar bunun aksini ispat etmiştir. Özellikle burada bulunan mikroorganizmaların ekstrem koşullara adaptasyonu sonucunda geliştirdikleri bu canlılara özel olan hayatta kalma mekanizmalarının, enzimlerin ve sekonder metabolitlerin keşfi biyoteknoloji alanında önemli atılımlara sebep olmuştur (ör; Taq polimeraz ve PZR). Oligotrofik koşullar, düşük ama sabit sıcaklık, yüksek nem, derinleştikçe azalan oksijen ve karanlıkla özdeşleşen mağalar, bu ortam koşulları nedeniyle ekstrem ekosistemler olarak değerlendirilirler. Bu nedenle mağaralardan izole edilen bakterilerin ürettikleri enzim, protein, pigment ve sekonder metabolitlerin biyoteknoloji araştırmalarında olduğu kadar endüstriyel anlamda da önemli potansiyele sahip oldukları ortadadır.

Çalışmamızda karanlık mağara ortamından izole edilen bakterilerin karotenoid pigment üretimi yaptıkları gösterilmiştir. Karotenoid pigmentlerin, özellikle karoten pigmentinin gıda, ecza, kozmetik sanayisinde boya ve renk verici madde olması, kümes hayvanları ve balık üretiminde renk kalitesinin arttırılmasında kullanılması bu organik pigmentlerin hayatımızda önemli bir yere sahip olduğunun kanıtıdır. Alternatif pigment kaynaklarının keşfedilmesi ve pigment üreten mikroorganizmaların araştırılması bu nedenle önemlidir. Ayrıca yapılan çalışmalar mikroorganizmalar tarafından üretilen pigmentlerin antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, fotoprotektör etkileri olduğunu da kanıtlanmıştır. Son zamanlarda sentetik pigmentlere olan ilginin doğal pigmentlere kayması doğal pigment kaynaklarının keşfine olan yönelimi arttırmıştır.

Çalışmamızda Morca Mağarası'ndan izole edilen bakterilerin ksantofil ve beta karoten pigmenti ürettikleri gözlemlenmiştir. Üretilen pigment miktarının endüstri standartlarının altında olduğu, izolasyonu ve karakterizasyonu yapılan pigmentlerin antimikrobiyal etkisi tespit edilememiştir. Mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin bitkisel kaynaklı pigmentlere nazaran daha az olduğu bilinmektedir. Fakat çok azı keşfedilmiş olan mağara deniz dipleri ve buzullar gibi ekstrem ortamlardan izole edilen bakteri ve karotenoid üretimi

göze alındığında birçok tür ve ürettikleri karotenoidlerden habersiz olduğumuz ortadadır. Ayrıca mikrobiyal kaynaklı pigmentlerin mevsim ve yaşam döngüsü gibi etmenlerden bağımsız olarak üretilebilmesi, bitkisel kaynaklı pigmentlere karşı avantaj sağlamaktadır. Özellikle fermantasyon teknikleri, besiyeri optimizasyonu, devamlı fermantasyon kültür yöntemleri ve genetik mühendislik sayesinde mikrobiyal kaynaklı pigment üretimi maksimize edilebilir. Bu sayede bitkisel kaynaklı pigmentlerin yerini mikrobiyal kaynaklı pigmentler alabilir. Ekstrem ortamlardan izole edilen mikrobiyal pigmentlerin ve etkilerinin yeterince çalışılmaması, mikrobiyal pigment üretiminin endüstriyel ve toplu üretimi için araştırmaların yetersiz olması, bu konuda daha fazla araştırma ve araştırmacıya ihtiyaç olduğunu göstermektedir çalışmamızın da mikrobiyal kaynaklı pigment çalışmalarında kaynak olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Aberoumand, A., 2011, A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry, *World J Dairy Food Sci*, 6(1), 71-78.

Addesso, R., Gonzalez-Pimentel, J.L., D'Angeli, I.M., De Waele, J., Saiz-Jimenez, C., Jurado, V., Miller A.Z., Cubero B., Vigliotta G., Baldantoni, D., 2021, Microbial community characterizing vermiculations from karst caves and its role in their formation, *Microbial ecology*, 81(4), 884-896.

Agarwal, S.K., Singh, S.S., Verma, S. and Kumar, S., 2000, Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi, *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 43-46.

Ahamada Rachid, N., 2021, *Mağaracılık aktivitelerinin mağara mikrobiyal çeşitliliği üzerine etkisinin belirlenmesi*, yüksek lisans tezi, İstanbul Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ahmed, F., Fanning, K., Schuhmann, H., Netzel, M. and Schenk, P., 2013, *Microalgae: a valuable source of natural carotenoids with potential health benefits*, Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefit, New York, NY: Nova Biomedical, 143-63.

Al Husseini, A., Apeldoorn, J., Ashford Jr, K., Bennell, K. M., de Carufel, G., Haider, O., Hirmer, T., Jivănescu I.E., Pegg, C.J., Shaghaghi Varzeghani, A., Shimmin, R., Suresh, R., Vaquero, T.M., Mar Vaquero Escribano, T., Vargas Muñoz, M., Winetraub B., Gallardo, B., Fernández-Dávila, A., Zavaleta, J. and Laufer, R., 2009, The role of caves and other subsurface habitats in the future exploration of Mars, *60th International Astronautical Congress*, 12-16 October 2009, Daejeon, Republic of Korea, Curran Associates, ISBN: 978-1-61567-908-9 ,1679-1694.

Albrecht, M., Misawa, N. and Sandmann, G., 1999, Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β-carotene and zeaxanthin, *Biotechnology letters*, 21(9), 791-795.

Aman, R., Schieber, A. and Carle, R., 2005, Effects of heating and illumination on trans− cis isomerization and degradation of β-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9512-9518.

Ambati, R.R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R.G., Ravi, S., Bikkina, P.N., Bo, L. and Yuepeng, S., 2019, Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects, *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(12), 1880-1902.

Andersen, D.O., Weber, N.D., Wood, S.G., Hughes, B.G., Murray, B.K. and North, J.A., 1991, In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives, *Antiviral research*, 16(2), 185-196.

Anderson, R.R. and Parrish, J.A., 1981, The optics of human skin, *Journal of investigative dermatology*, 77(1), 13-19.

Angert, E.R., Northup, D.E., Reysenbach, A.L., Peek, A.S., Goebel, B.M. and Pace, N.R., 1998, Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky, *American Mineralogist*, 83(11), 1583-1592.

Anliker, R., 1979, Ecotoxicology of dyestuffs—a joint effort by industry, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *3*(1), 59-74.

Ardila-Leal, L.D., Poutou-Piñales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Quevedo-Hidalgo, B.E., 2021, A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases, *Molecules*, *26*(13), 3813.

Asker, D., 2018, High throughput screening and profiling of high-value carotenoids from a wide diversity of bacteria in surface seawater, *Food chemistry*, 261, 103-111.

Audra, P. and Palmer, A.N., 2015, Research frontiers in speleogenesis. Dominant processes, hydrogeological conditions and resulting cave patterns. *Acta Carsologica*, 44(3), 315-348.

Badino, G., 2004, Cave temperatures and global climatic change, *International Journal of Speleology*, 33(1), 10.

Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R.A., Church, G., Corn J.E., Daley, C.Q., Doudna, J.A., Fenner, M., Greely, H.T., Jinek, M., Martin, G.S., Penhoet, E., Puck, J., Sternberg, S.H.,Weissman, J.S., Yamamoto, K.R., 2015, A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification, *Science*, 348(6230), 36-38.

Baron, S.S. and Rowe, J.J., 1981, Antibiotic action of pyocyanin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 20(6), 814-820.

Barton, H.A. and Jurado, V., 2007, What's up down there? Microbial diversity in caves, *Microbe*, 2, 132-138.

Barton, H.A., 2006, Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist, *Journal of cave and karst studies*, 68(2), 43-54.

Baskar, S., Baskar, R. and Routh, J., 2011, Biogenic evidences of moonmilk deposition in the Mawmluh cave, Meghalaya, India, *Geomicrobiology Journal*, 28(3), 252-265.

Battersby, A.R., 2000, Tetrapyrroles: the pigments of life, *Natural product reports*, 17(6), 507-526.

Bele, A.A. and Khale, A., 2011, An overview on thin layer chromatography, *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 2(2), 256.

Bennett, J.W. and Bentley, R., 2000, Seeing red: the story of prodigiosin, *Advances in Applied Microbiology*, 47, 1-32

Bhat, S.V., Khan, S.S. and Amin, T., 2013, Research article isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours, *Int. J. Rec. Sci. Res*, 4(10), 1605-1609.

Bhatia, M.S., 2015, Evaluation of pharmacognostical, phytochemical and anti-microbial properties of Porphyra vietnamensis, I*nternational Journal of Green Pharmacy* (IJGP), 9(2), 131-137.

Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A.L., Pareilleux, A., Prome, D. and Laussac, J.P. Goma G., 1994, Pigments of Monascus, *J Food Sci*, 59, 862-865.

Borker, S.S., Thakur, A., Kumar, S., Kumari, S., Kumar, R. and Kumar, S., 2021, Comparative genomics and physiological investigation supported safety, cold adaptation, efficient hydrolytic and plant growth-promoting potential of psychrotrophic Glutamicibacter arilaitensis LJH19, isolated from night-soil compost, *BMC genomics*, 22(1), 1-17.

Breig, S.J.M. and Luti, K.J.K., 2021, Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures, *Materials Today: Proceedings*, 42, 2277-2284.

Brenner, M. and Hearing, V.J., 2008, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 539-549.

Britton, G., 1995, Structure and properties of carotenoids in relation to function, *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.

Brossier, J., Altieri, F., De Sanctis, M.C., Frigeri, A., Ferrari, M., De Angelis, S., Apuzzo, A., Costa, N., 2022, Constraining the spectral behavior of the clay-bearing outcrops in Oxia Planum, the landing site for ExoMars “Rosalind Franklin” rover, *Icarus*, 386, 115114.

Bryant, D.A., Hunter, C.N. and Warren, M.J., 2020, Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life, *Journal of Biological Chemistry*, 295(20), 6888-6925.

Busse, H.J. and Schumann, P., 2019, Reclassification of Arthrobacter enclensis as Pseudarthrobacter enclensis comb. nov., and emended descriptions of the genus Pseudarthrobacter, and the species Pseudarthrobacter phenanthrenivorans and Pseudarthrobacter scleromae, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(11), 3508-3511.

Buzzini, P. and Martini, A., 2000, Production of carotenoids by strains of Rhodotorula glutinis cultured in raw materials of agro-industrial origin, *Bioresource technology*, 71(1), 41-44.

Büttner, A., Ernst, M., Hunnekuhl, M., Kalms, R., Willemsen, L.E., Heise, J., Ulrich, J., Weßels, P., Kracht, D., Neumann, J., 2022, Space-qualified, compact and lightweight pulsed DPSS UV laser for the MOMA instrument of the ExoMars mission, *CEAS Space Journal*, 1-35.

Chakraborty, I., Redkar, P., Munjal, M., Kumar, S.S. and Rao, K.B., 2015, Isolation and characterization of pigment producing marine actinobacteria from mangrove soil and applications of bio-pigments, *Der Pharm. Lett*, *7*, 93-100.

Chatragadda, R. and Dufossé, L., 2021, Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments, *Microorganisms*, 9(3), 637.

Chaudhary, D.K. and Kim, J., 2017, Massilia agri sp. nov., isolated from reclaimed grassland soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2696-2703.

Chemler, J.A. and Koffas, M.A., 2008, Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes, *Current opinion in biotechnology*, 19(6), 597-605.

Chen, C.Y., Hsieh, C., Lee, D.J., Chang, C.H. and Chang, J.S., 2016, Production, extraction and stabilization of lutein from microalga Chlorella sorokiniana MB-1, *Bioresource technology*, 200, 500-505.

Chen, Y., Li, D., Lu, W., Xing, J., Hui, B. and Han, Y., 2003, Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of Haematococcus pluvialis, *Biotechnology letters*, 25(7), 527-529.

Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciu, M., Lu, Y. and Colin Murrell, J., 2009, Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur-and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave, *The ISME journal*, 3(9), 1093-1104.

Chew, B.P., Park, J.S., Wong, M.W. and Wong, T. S., 1999, A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo, *Anticancer research*, 19(3A), 1849-1853.

Cho, S., Shin, J. and Cho, B.K., 2018, Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering, *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1089.

Clarke, E.A. and Anliker, R., 1980, Organic dyes and pigments, In *Anthropogenic compounds* (pp. 181-215). Springer, Berlin, Heidelberg.

Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.P., Peschel, A. and Götz, F., 2006, Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress, *Infection and immunity*, 74(8), 4950-4953.

Costache, M.A., Campeanu, G.H.E.O.R.G.H.E. and Neata, G., 2012, Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables, *Romanian Biotechnological Letters*, 17(5), 7702-7708.

Craft, N.E. and Soares, J.H., 1992, Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and beta-carotene in organic solvents, *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(3), 431-434.

Curl, R.L., 1964, On the definition of a cave, *Bulletin of the National Speleological Society*, 26(1), 1-6.

Çandıroğlu, B., 2018, *Bir mağaradan izole edilen bakterilerin antimikrobiyal madde üretme yeteneği ve antibiyotik dirençliliği*, yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Çolak, B. and Doğruöz Güngör, N., 2022, The Astrobiological Significance of Caves on Earth and on Mars, *International Journal of Environment and Geoinformatics*, 9(3), 57-64. DOI: 10.30897/ijegeo.1037382.

Deorukhkar, A.A., Chander, R., Ghosh, S.B. and Sainis, K.B., 2007, Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as Serratia marcescens, *Research in microbiology*, 158(5), 399-404.

Dharmaraj, S., Ashokkumar, B. and Dhevendaran, K., 2009, Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes, *Iranian Journal of Microbiology*, 1(4), 36-41.

Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H., 1989, Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Archives of biochemistry and biophysics*, 274(2), 532-538.

Domenici, V., Ancora, D., Cifelli, M., Serani, A., Veracini, C.A. and Zandomeneghi, M., 2014, Extraction of pigment information from near-UV vis absorption spectra of extra virgin olive oils, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(38), 9317-9325.

Donohoue, P. D., Barrangou, R. and May, A. P., 2018, Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems, *Trends in biotechnology*, 36(2), 134-146.

Doudna Jennifer, A. and Charpentier, E., 2014, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science*, 346(6213), 1258096.

Dsouza, M., Taylor, M.W., Turner, S. J. and Aislabie, J., 2015, Genomic and phenotypic insights into the ecology of Arthrobacter from Antarctic soils, *BMC genomics*, 16(1), 1-18.

Dufossé, L., 2017, *Current carotenoid production using microorganisms*. Bio-pigmentation and Biotechnological Implementations, In: Singh, O. M. (ed), Chapter 4, Wiley-Blackwell, Hoboken , USA, ISBN: 978-1119166146, 87-106.

Dufossé, L., 2018, *Microbial pigments from bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries*, Natural and artificial flavoring agents and food dyes, In: Grumezescu, A. M., Holban A. M. (ed), Chapter 4, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA ISBN: 978-0-12-811518-3, 113-132.

Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G. A., 2005, Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?, *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 389-406

Durán, M., Ponezi, A.N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M.F., Justo, G.Z. and Durán, N., 2012, Potential applications of violacein: a microbial pigment, *Medicinal Chemistry Research*, 21(7), 1524-1532.

El-Sayyad, G.S., Mosallam, F.M. and El-Batal, A.I., 2018, One-pot green synthesis of magnesium oxide nanoparticles using Penicillium chrysogenum melanin pigment and gamma rays with antimicrobial activity against multidrug-resistant microbes, *Advanced Powder Technology*, *29*(11), 2616-2625.

Elyashberg, M.E., Blinov, K.A., Williams, A.J., Martirosian, E.R. and Molodtsov, S.G., 2002, Application of a new expert system for the structure elucidation of natural products from their 1D and 2D NMR data, *Journal of natural products*, 65(5), 693-703.

Emeish, S., 2012, Production of natural β-carotene from Dunaliella living in the Dead Sea, *Jordan J Earth Environ Sci*, 4(2), 23-27.

Engel S., Megan L. Porter, Brian K. Kinkle, Thomas C. Kane, A., 2001, Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia, *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 259-274.

Engel, A. S., 2011, *Karst ecosystems*, Encyclopedia of Geobiology, Springer Encyclopedia of Earth Sciences Series, In: Reitner, J., Thiel, V. (ed), Springer, Dordrecht, Berlin, 521-553.

Engel, A.S., 2010, *Microbial diversity of cave ecosystems*, Geomicrobiology: molecular and environmental perspective, In: Barton, L., Mandl, M., Loy, A. (ed), Chapter 10, Springer, Dordrecht, Berlin, 219-238.

Engel, A.S., Porter, M. L., Stern, L. A., Quinlan, S. and Bennett, P. C., 2004, Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria", *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1), 31-53.

Ensign, J.C. and Rittenberg, S.C., 1963, A crystalline pigment produced from 2-hydroxypyridine by Arthrobacter crystallopoietes n. sp., *Archiv für Mikrobiologie*, 47(2), 137-153.

Eriksen, N.T., 2008, Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 1-14.

Fairchild, I.J., Frisia, S., Borsato, A. and Tooth, A.F., 2006, *Speleothems*, Geochemical Sediments and Landscapes, In: Nash, D.J., McLaren, S.J. (ed), Chapter 7, Wiley-Blackwell, Oxford.

Fehér, D., Barlow, R.S., Lorenzo, P.S. and Hemscheidt, T.K., 2008, A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl) prodigiosin, from Pseudoalteromonas rubra, *Journal of Natural Products*, 71(11), 1970-1972.

Flores-Cotera, L.B. and Sanchez, S., 2001, Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by Phaffia rhodozyma in a chemically defined medium, *Biotechnology letters*, 23(10), 793-797.

Forti, P., 2001, Biogenic speleothems: an overview, *International Journal of Speleology*, 30(1), 4.

Fratini, E. and Amendola, R., 2014, Caves and other subsurface environments in the future exploration of Mars: the absence of natural background radiation as biology concern, *Rendiconti Lincei*, *25*(1), 91-96.

Frisia, S. and Borsato, A., 2010, Karst, *Developments in sedimentology*, 61, 269-318.

Fuhrman, B., Elis, A. and Aviram, M., 1997, Hypocholesterolemic effect of lycopene and β-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages, *Biochemical and biophysical research communications*, 233(3), 658-662.

Galasso, C., Corinaldesi, C. and Sansone, C., 2017, Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications, *Antioxidants*, 6(4), 96.

Gerber, N.N., 1975, A new prodiginine (prodigiosin-like) pigment from streptomyces Antimalarial activity of several prodiginines, *The Journal of Antibiotics*, 28(3), 194-199.

Gest, H., 2004, The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society, *Notes and records of the Royal Society of London*, *58*(2), 187-201.

Ghidalia, W., Bliss, D.E. and Mantel, L.H., 1985, Structural and biological aspects of pigments, *The biology of crustacea*, 9, 301-395.

Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J. and Willett, W.C., 2002, A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk, *Journal of the National Cancer Institute*, 94(5), 391-398.

Goldberg, P. and Mandel, R.D., 2008, Caves and rockshelters, *Encyclopedia of Archaeology*, 2, 966-974.

Goodwin, T.W., 1960, Biochemistry of pigments, *The physiology of Crustacea*, 1, 101-140.

Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X., 2011, Microalgae as sources of carotenoids, *Marine drugs*, 9(4), 625-644.

Guerin, M., Huntley, M E. and Olaizola, M., 2003, Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition, *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210-216.

Gunn, J., 2004, *Encyclopedia of caves and karst science*, In: Gunn, J., (ed), Fitzroy Dearborn, an imprint of Taylor and Francis Group, New Fettner Lane, London, 1-1687.

Gupta, S.K., Jha, A.K., Pal, A.K. and Venkateshwarlu, G., 2007, Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes, *Natural Product Radiance*, 6(1), 46-49.

Gurkok, S., 2022, A novel carotenoid from Metabacillus idriensis LipT27: production, extraction, partial characterization, biological activities and use in textile dyeing, *Archives of Microbiology*, 204(6), 1-14.

Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G. Lubitz, W. Swings, J., Rölleke, S., 2000, Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46(3), 229–239.

Gülcü, M.D., 2020, *Mağara ekosisteminde kültüre edilebilir bakteri çeşitliliğinin ve mağara yüzey oluşumundaki etkilerinin incelenmesi*, yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Hamedi, J., Kafshnouchi, M. and Ranjbaran, M., 2019, A study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities, *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1587-1595.

Hammond, R.K. and White, D.C., 1970, Inhibition of carotenoid hydroxylation in Staphylococcus aureus by mixed-function oxidase inhibitors, *Journal of Bacteriology*, 103(3), 607-610.

Handa, Y., Tazato, N., Nagatsuka, Y., Koide, T., Kigawa, R., Sano, C. and Sugiyama, J., 2016, Stenotrophomonas tumulicola sp. nov., a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(3), 1119-1124.

Hao, Z. and Iqbal, A., 1997, Some aspects of organic pigments, *Chemical Society Reviews*, *26*(3), 203-213.

Harrison, E. H. and Quadro, L., 2018, Apocarotenoids: emerging roles in mammals, *Annual review of nutrition*, *38*, 153.

Heider, S.A., Peters-Wendisch, P., Wendisch, V.F., Beekwilder, J. and Brautaset, T., 2014, Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids, *Applied microbiology and biotechnology*, 98(10), 4355-4368.

Henry, L.K., Catignani, G.L. and Schwartz, S.J., 1998, Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β-carotene, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(7), 823-829.

Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez S., Lynch, S. T., Nelson, E. B., 2000, Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl Soil Ecol*, 15(1), 25–36.

Hill, C.A. and Forti, P., 1995, The classification of cave minerals and speleothems, *International Journal of Speleology*, 24(1), 5.

Hong, M.Y., Seeram, N.P., Zhang, Y. and Heber, D., 2008, Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells, *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(7), 448-458.

Hose, L.D. and Pisarowicz, J.A., 1997, Exploration and mapping of Cueva de Villa Luz (Dueva de la Sardina), Tabasco, Mexico, *Journal of Cave and Karst Studies*, 59(3), 173.

Hsu, L.C., Hsu, Y.W., Liang, Y.H., Kuo, Y.H. and Pan, T.M., 2011, Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from Monascus purpureus NTU 568, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(4), 1124-1130.

Hung, L.B., Parcher, J.F., Shores, J.C. and Ward, E.H., 1988, Theoretical and experimental foundation for surface-coverage programming in gas-solid chromatography with an adsorbable carrier gas, *Analytical Chemistry*, 60(11), 1090-1096.

Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D. and Adam, V., 2018, Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing Chlorella vulgaris and Spirulina platensis using high performance thin layer chromatography, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 148, 108-118.

Ibrahim, A.S.S., 2008, Production of carotenoids by a newly isolated marine Micrococcus sp., *Asian Network for Scientific Information*.

Jamee, R. and Siddique, R., 2019, Biodegradation of synthetic dyes of textile effluent by microorganisms: an environmentally and economically sustainable approach, *European journal of microbiology and immunology*, *9*(4), 114-118.

Jehlička, J., Oren A., Raman spectroscopy in halophile research, *Front Microbiol*, 4, 1-7.

Jian, W., Edom, R.W., Lin, Z J. and Weng, N., 2012, Chromatographic separation methods. ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley and Sons, Inc, 381-400.

Kadeem, E.J., 2011. Identification and Quantitative Estimation of Lutein in Iraqi Spinacia oleracea Family Chenopodiaceae by Using Chromatographic Methods. *Baghdad Science Journal*, 8(1).

Karaca, H., 2004. *Tetrapirol Türevlerinin katalitik etkilerinin incelenmesi*, Doktora tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kardos, N. and Demain, A.L., 2011, Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes, *Applied microbiology and biotechnology*, 92(4), 677-687.

Khan, S., Ullah, M.W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. and Hou, H., 2016, Role of recombinant DNA technology to improve life, *International journal of genomics*, *2016*.

Kim, H.S., Hayashi, M., Shibata, Y., Wataya, Y., Mitamura, T., Horii, T., Kawauchi, K., Hirata, H., Tsuboi, S. and Moriyama, Y., 1999, Cycloprodigiosin hydrochloride

obtained from Pseudoalteromonas denitrificans is a potent antimalarial agent, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22(5), 532-534.

Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S., 1993, Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, Haematococcus pluvialis, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867-873.

Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C.A., Vieira, T.O., Antonio, R.V. and Creczynski-Pasa, T.B., 2006, Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function, *Bioorganic and medicinal chemistry*, 14(24), 8307-8313.

Krinsky, N.I., 1994, The biological properties of carotenoids, *Pure and Applied Chemistry*, *66*(5), 1003-1010.

Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S. and Kumar, M., 2015a, Microbial pigments: production and their applications in varıous industries, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, *5*(1).

Kumar, V., Kampe, B., Rösch, P. and Popp, J., 2015b, Classification and identification of pigmented cocci bacteria relevant to the soil environment via Raman spectroscopy, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19317-19325.

Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I. and Saiz-Jimenez, C., 1999, Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain), *Journal of microbiological methods*, 36(1-2), 129-138.

Lange-Enyedi, N.T., Németh, P., Borsodi, A.K., Halmy, R., Czuppon, G., Kovács, I., Leél-Őssy, S., Demény, A. and Makk, J., 2022, Calcium carbonate precipitating cultivable bacteria from different speleothems of karst caves, *Geomicrobiology Journal*, 39(2), 107-122.

Latasa, M., Van Lenning, K., Garrido, J.L., Scharek, R., Estrada, M., Rodríguez, F. and Zapata, M., 2001, Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RPHPLC analysis of pigments, *Chromatographia*, 53(7), 385-391.

Lazaro, J.E., Nitcheu, J., Predicala, R.Z., Mangalindan, G.C., Nesslany, F., Marzin, D., Concepcion, G.P. and Diquet, B., 2002, Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro, *Journal of Natural Toxins*, 11(4), 367-377.

Lee, N.M., Meisinger, D.B., Aubrecht, R., Kovacik, L., Saiz-Jimenez, C., Baskar, S., Baskar, R., Liebl, W., Porter, M. and Engel, A.S., 2012, *Caves and karst environments*, Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival, In: Bell, E.M. (ed), CAB International, Oxfordshire, UK, 320-344.

Lee, P. and Schmidt-Dannert, C., 2002, Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1), 1-11

Leiva, S., Alvarado, P., Huang, Y., Wang, J. and Garrido, I., 2015, Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica, *FEMS Microbiology Letters*, 362(24).

Lellis, B., Fávaro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A. and Polonio, J. C., 2019, Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms, *Biotechnology Research and Innovation*, *3*(2), 275-290.

Lian, J., HamediRad, M. and Zhao, H., 2018, Advancing metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae using the CRISPR/Cas system, *Biotechnology Journal*, 13(9), 1700601.

Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., Fierer, J. and Nizet, V., 2005a, Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *The Journal of experimental medicine*, 202(2), 209-215.

Liu, Q., He, Z., Naganuma, T., Nakai, R., Rodríguez, L.M., Carreño, R. and Urbani, F., 2022, Phylotypic diversity of bacteria associated with speleothems of a silicate cave in a Guiana Shield tepui, *Microorganisms*, 10(7), 1395.

Liu, R., Cui, C.B., Duan, L., Gu, Q.Q. and Zhu, W.M., 2005b, Potentin Vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomyceteSac-charopolyspora sp. nov., *Archives of pharmacal research*, 28(12), 1341-1344.

Lorquin, J., Molouba, F. and Dreyfus, B.L., 1997, Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic Bradyrhizobium strains, *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 1151-1154.

Luo, X., Wang, J., Zeng, X.C., Wang, Y., Zhou, L., Nie, Y., Dai, J. and Fang, C., 2012, Mycetocola manganoxydans sp. nov., an actinobacterium isolated from the Taklamakan desert, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(12), 2967-2970.

Mali, P., Esvelt, K.M. and Church, G.M., 2013, Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nature methods*, 10(10), 957-963.

Malik, K., Tokkas, J. and Goyal, S., 2012, Microbial pigments: a review, *Int J Microbial Res Technol*, *1*(4), 361-365.

Maoka, T., 2020, Carotenoids as natural functional pigments, *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16.

Mapari, S. A., Thrane, U. and Meyer, A. S., 2010, Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?, *Trends in biotechnology*, 28(6), 300-307.

Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A. and Aguilar, C.N., 2014, Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview, *Microbial cell factories*, 13(1), 1-11.

Mathews-Roth, M.M., 1982, Antitumor activity of β-carotene, canthaxanthin and phytoene, *Oncology*, 39(1), 33-37.

Melvin, M.S., Tomlinson, J.T., Saluta, G.R., Kucera, G.L., Lindquist, N. and Manderville, R. A., 2000, Double-strand DNA cleavage by copper⊙ prodigiosin, *Journal of the American Chemical Society*, 122(26), 6333-6334.

Mezzomo, N. and Ferreira, S.R., 2016, Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review, *Journal of Chemistry*, 2016.

Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P.D. and Misawa, N., 1998, Production of the carotenoids lycopene, β-carotene, and astaxanthin in the food yeast Candida utilis, *Applied and environmental microbiology*, 64(4), 1226-1229.

Mohana, D.C., Thippeswamy, S. and Abhishek, R.U., 2013, Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from Micrococcus spp., *Radiation Protection and Environment*, 36(4), 168.

Moreira, M.D., Melo, M.M., Coimbra, J.M., Dos Reis, K.C., Schwan, R.F. and Silva, C.F., 2018, Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities, *Waste management*, 82, 93-99.

Moss, M., 2002, Bacterial pigments, *Microbiologist*, 3(4), 10-12.

Namazkar, S. and Ahmad, W.A., 2013, Spray-dried prodigiosin from Serratia marcescens as a colorant, *Biosciences biotechnology research asia*, 10(1).

Namitha, K.K. and Negi, P.S., 2010, Chemistry and biotechnology of carotenoids, *Critical reviews in food science and nutrition*, *50*(8), 728-760.

Narsing Rao, M.P., Xiao, M. and Li, W.J., 2017, Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications, *Frontiers in microbiology*, 8, 1113.

Nielsen, J.C. and Nielsen, J., 2017, Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism, *Synthetic and systems biotechnology*, 2(1), 5-12.

Nielsen, K.F., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Lund, F., Thrane, U., Frisvad, J.C., 2003, *Chemical Identification of Fungi: Metabolite Profiling and Metabolomics*, Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications, In: Arora, D.K, Chapter 2, Marcel Dekker, USA, 19-31.

Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N.C. and Pogson, B.J., 2015, Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*, 8(1), 68-82.

Northup, D.E., Dahm, C.N., Melim, L.A., Spilde, M.N., Crossey, L.J., Lavoie, K.H., Mallory, L.M, Boston, P.J., Cunningham, K.I. and Barns, S.M., 2000, Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves, *Journal of Cave and Karst Studies*, 62(2), 80-90.

Northup, D.E. and Lavoie, K.H., 2001, Geomicrobiology of Caves: A Review, *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 199-222.

Oliveira, C., Gunderman, L., Coles, C.A., Lochmann, J., Parks, M., Ballard, E., Glazko, G., Rahmatallah, Y., Tackett, A.J. and Thomas, D.J., 2017, 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of Ozark cave bacteria, *Diversity*, 9(3), 31.

Osawa, A., Ishii, Y., Sasamura, N., Morita, M., Kasai, H., Maoka, T. and Shindo, K., 2010, Characterization and antioxidative activities of rare C50 carotenoids-sarcinaxanthin, sarcinaxanthin monoglucoside, and sarcinaxanthin diglucoside-obtained from Micrococcus yunnanensis, *Journal of Oleo Science*, 59(12), 653-659.

Padhan, B., Poddar, K., Sarkar, D. and Sarkar, A., 2021, Production, purification, and process optimization of intracellular pigment from novel psychrotolerant Paenibacillus sp. BPW19, *Biotechnology Reports*, 29, e00592.

Padhan, B., Poddar, K., Sarkar, D. and Sarkar, A., 2021, Production, purification, and process optimization of intracellular pigment from novel psychrotolerant Paenibacillus sp. BPW19, *Biotechnology Reports*, *29*, e00592.

Palmer, A.N., 2007, *Cave geology*, Cave books, USA, ISBN: 978-0939748662.

Palmer, A.N., 1991, Origin and morphology of limestone caves, *Geological Society of America Bulletin*, 103(1), 1-21.

Pimstone, N.R., Tenhunen, R., Seitz, P.T., Marver, H.S. and Schmid, R., 1971, The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages, *The Journal of experimental medicine*, 133(6), 1264-1281.

Pogorzelska, E., Godziszewska, J., Brodowska, M. and Wierzbicka, A., 2018, Antioxidant potential of Haematococcus pluvialis extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage, *Meat science*, 135, 54-61.

Poulson, T.L. and White, W.B., 1969, The cave environment, *Science*, 165(3897), 971-981.

Powers, H.J., 2003, Riboflavin (vitamin B-2) and health, *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1352-1360.

Qayyum, S., Basharat, S., Mian, A.H., Qayum, S., Ali, M., Changsheng, P., Shahzad, M. and Sultan, F., 2020, Isolation, identification and antibacterial study of pigmented bacteria, *Applied Nanoscience*, 10(12), 4495-4503.

Ram, S., Mitra, M., Shah, F., Tirkey, S. R. and Mishra, S., 2020, Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges, *Journal of Functional Foods*, *67*, 103867.

Ramesh, C., Vinithkumar, N.V., Kirubagaran, R., Venil, C.K. and Dufossé, L., 2019, Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications, *Microorganisms*, 7(7), 186.

Ramirez, J., Nunez, M.L. and Valdivia, R., 2000, Increased astaxanthin production by a Phaffia rhodozyma mutant grown on date juice from Yucca fillifera, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 187-190.

Rana, B., Bhattacharyya, M., Patni, B., Arya, M. and Joshi, G.K., 2021, The Realm of Microbial Pigments in the Food Color Market, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 54.

Rao, A.S., Deka, S.P., More, S.S., Nair, A., More, V. S. and Ananthjaraju, K.S., 2021, A Comprehensive Review on Different Microbial-Derived Pigments and Their Multipurpose Activities, *Microbial Polymers*, 479-519.

Rebecca, L.J., Sharmila, S., Das, M. P. and Seshiah, C., 2014, Extraction and purification of carotenoids from vegetables, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 594-598.

Rodriguez-Amaya, D.B., 2001, A guide to carotenoid analysis in foods (Vol. 71). Washington: ILSI press.

Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M.L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Carmen Limon, M., Meléndez-Martínez, A.J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M.J., Zacarias, L. and Zhu, C., 2018, A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health, *Progress in lipid research*, *70*, 62-93.

Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L., 2001, Life in extreme environments, *Nature*, *409*(6823), 1092-1101.

Rouseff, R., Raley, L. and Hofsommer, H.J., 1996, Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2176-2181.

Ruther A, Misawa N, Boger P, Sandmann G., 1997, Production of zeaxanthin in Escherichia coli transformed with different carotenogenic plasmids, *Appl Microbiol Biotechnol* 48,162– 167.

Sahli, K., Gomri, M.A., Esclapez, J., Gómez-Villegas, P., Bonete, M. J., León, R. and Kharroub, K., 2022, Characterization and biological activities of carotenoids produced by three haloarchaeal strains isolated from Algerian salt lakes, *Archives of Microbiology*, 204(1), 1-10.

Saiz-Jimenez, C., 2012, Microbiological and environmental issues in show caves, *World Journal of microbiology and biotechnology*, *28*(7), 2453-2464.)

Sandmann, G., 2021, Diversity and origin of carotenoid biosynthesis: Its history of coevolution towards plant photosynthesis, *New Phytologist*, 232(2), 479-493.

Sankari, M., Rao, P.R., Hemachandran, H., Pullela, P.K., Tayubi, I.A., Subramanian, B., Gothandam, K.M., Singh, P. and Ramamoorthy, S., 2018, Prospects and progress in the

production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches, *Journal of Biotechnology*, 266, 89-101.

Scheer, H., 2003, *The pigments*, Light-harvesting antennas in photosynthesis, In: Green, B.R., Parson, W.W., Chapter 2, Springer, Dordrecht, 29-81.

Schüep, W., Blount, J.F., Williams, T.H. and Stempel, A., 1978, Production of a novel red pigment, rubrolone, by Streptomyces echinoruber sp. nov. II. Chemistry and structure elucidation, *The Journal of Antibiotics*, 31(12), 1226-1232.

Sen, T., Barrow, C.J. and Deshmukh, S.K., 2019, Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward, *Frontiers in nutrition*, 7.

Setiyono, E., Brotosudarmo, T.H.P., Pringgenies, D., Prihastyanti, M.N.U. and Shioi, Y., 2019, *Analysis of β-cryptoxanthin from yellow pigmented marine bacterium Erythrobacter sp. kj5*, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 30–31 October 2018, Semarang, Indonesia, IOP Publishing., 012004).

Sharma, B., Dangi, A.K. and Shukla, P., 2018, Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review, *Journal of environmental management*, 210, 10-22.

Shen, L., Liu, Y., Wang, N., Jiao, N., Xu, B. and Liu, X., 2018, Variation with depth of the abundance, diversity and pigmentation of culturable bacteria in a deep ice core from the Yuzhufeng Glacier, Tibetan Plateau, *Extremophiles*, 22(1), 29-38.

Shen, L., Liu, Y., Yao, T., Kang, S., Wang, Y., Jiao, N., Liu, H., Zhou, Y., Xu, B. and Liu, X., 2013, Mycetocolazhadangensis sp. nov., isolated from snow, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(9), 3375-3378.

Shu, W.S. and Huang, L.N., 2022, Microbial diversity in extreme environments, *Nature Reviews Microbiology*, *20*(4), 219-235.

Smedsgaard, J. and Frisvad, J.C., 1996, Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts, *Journal of Microbiological Methods*, 25(1), 5-17.

Sobin, B. and Stahly, G.L., 1942, The isolation and absorption spectrum maxima of bacterial carotenoid pigments, *Journal of Bacteriology*, 44(3), 265-276.

Sonani, R.R., Singh, N.K., Kumar, J., Thakar, D. and Madamwar, D., 2014, Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from Lyngbya sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in Caenorhabditis elegans, *Process Biochemistry*, 49(10), 1757-1766.

Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B. and Nikodinovic-Runic, J., 2012, Streptomyces sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1217-1231.

Starek, M., Guja, A., Dąbrowska, M. and Krzek, J., 2015, Assay of β-carotene in dietary supplements and fruit juices by TLC-densitometry, *Food Analytical Methods*, 8(5), 1347-1355.

Stevenson, C.S., Capper, E.A., Roshak, A.K., Marquez, B., Grace, K., Gerwick, W.H., Jacops, R.S. and Marshall, L.A., 2002, Scytonemin-a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases, *Inflammation Research*, 51(2), 112.

Stocker, R., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. and Ames, B.N., 1990, *Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and bilirubin*, Methods in enzymology, In: Packer, L., Glazer, A.N.(ed), Academic press, Cambridge, 301-309

Su, W.T., Tsou, T.Y. and Liu, H.L., 2011, Response surface optimization of microbial prodigiosin production from Serratia marcescens, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 217-222.

Surai, P.F., 2012, The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2, *World's Poultry Science Journal*, 68(4), 717-726.

Sutthiwong, N., Fouillaud, M., Valla, A., Caro, Y. and Dufossé, L., 2014, Bacteria belonging to the extremely versatile genus Arthrobacter as novel source of natural pigments with extended hue range, *Food research international*, 65, 156-162.

Sutthiwong, N., Sukdee, P., Lekhavat, S. and Dufossé, L., 2021, Identification of Red Pigments Produced by Cheese-Ripening Bacterial Strains of Glutamicibacter arilaitensis Using HPLC, *Dairy*, 2(3), 396-409.

Tao, L., Rouvière, P. E. and Cheng, Q., 2006, A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine Brevundimonas that synthesizes hydroxylated astaxanthin, *Gene*, 379, 101-108.

Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R., 1968, The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 748-755.

Tenhunen, R., Ross, M.E., Marver, H. S. and Schmid, R., 1970, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase. Partial purification and characterization, *Biochemistry*, 9(2), 298-303.

Terao, J., 1989, Antioxidant activity of β-carotene-related carotenoids in solution, *Lipids*, 24(7), 659-661.

Thirkell, D. and Strang, R.H.C., 1967, Analysis and comparison of the carotenoids of Sarcina flava and S. lutea, *Microbiology*, 49(1), 53-57.

Tripathi, U., Venkateshwaran, G., Sarada, R. and Ravishankar, G.A., 2001, Studies on Haematococcus pluvialis for improved production of astaxanthin by mutagenesis, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 143-148.

Trutko, S.M., Dorofeeva, L.V., Evtushenko, L.I., Ostrovskii, D.N., Hintz, M., Wiesner, J., Jomaa, H., Baskunov, B.P. and Akimenko, V.K., 2005, Isoprenoid pigments in representatives of the family Microbacteriaceae, *Microbiology*, 74(3), 284-289.

Tsujı, R. F., Yamamoto, M., Nakamura, A., Kataoka, T., Magae, J., Nagai, K. and Yamasaki, M., 1990, Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system, *The Journal of Antibiotics*, 43(10), 1293-1301.

Tuli, H.S., Chaudhary, P., Beniwal, V. and Sharma, A.K. 2015, Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives, *Journal of food science and technology*, 52(8), 4669-4678.

Türkgenci, M.D. and Doğruöz Güngör, N., 2021, Profiling of Bacteria Capable of Precipitating CaCO3 on the Speleothem Surfaces in Dupnisa Cave, Kırklareli, Turkey, *Geomicrobiology Journal*, 38(9), 816-827.

Umadevi, K. and Krishnaveni, M., 2013, Antibacterial activity of pigment produced from Micrococcus luteus KF532949, *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 4(3), 149-152.

Ungureanu, C. and Ferdes, M., 2012, Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of torularhodin, *Advanced Science Letters*, 18(1), 50-53.

Urzì, C., De Leo, F., Bruno, L. and Albertano, P., 2010, Microbial diversity in Paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain), *Microbial ecology*, 60(1), 116-129.

Venil, C.K., Aruldass, C.A., Dufossé, L., Zakaria, Z.A. and Ahmad, W.A., 2014, Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry–an incisive evaluation, *RSC Advances*, 4(74), 39523-39529.

Venil, C.K., Zakaria, Z.A. and Ahmad, W.A., 2013, Bacterial pigments and their applications, *Process Biochemistry*, *48*(7), 1065-1079.

Vinarov, A., Robucheva, Z., Sidorenko, T. and Dirina, E., 2003, Microbial biosynthesis and making of pigment melanin, *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 68(2 Pt A), 325-326.

Vlasceanu, L., Popa, R. and Kinkle, B.K., 1997, Characterization of Thiobacillus thioparus LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3123-3127.

Wagner-Döbler, I., Beil, W., Lang, S., Meiners, M. and Laatsch, H., 2002, Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites, *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, 207-238.

Wang, Q., Liu, D., Yang, Q. and Wang, P., 2017, Enhancing carotenoid production in Rhodotorula mucilaginosa KC8 by combining mutation and metabolic engineering, *Annals of Microbiology*, 67(6), 425-431.

White, W.B. and Culver, D. C., 2019, *Cave, definition of*, Encyclopedia of caves, In: White, W.B., Culver, D.C., Pipan, T.(ed), Chapter 29, Academic Press, Cambridge, USA, ISBN: 978-0-12-814124-3, 255-259.

Whitehead, A.J., Mares, J. A. and Danis, R. P., 2006, Macular pigment: a review of current knowledge, *Archives of ophthalmology*, 124(7), 1038-1045.

Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K., Yamamoto, D., Tsubura, A., Kamata, K., Hirata, H., Yamamoto, A., Kano, H., Seki, T. and Inoue, K., 1999, Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H(+)/Cl(-) symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice, *Hepatology*, 30(4), 894–902.

Yılmaz, İ., 2010, Karotenoidler. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, *17*(3), 223-231.

Yokoyama, A. and Miki, W., 1995, Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium Agrobacterium aurantiacum, *FEMS microbiology letters*, 128(2), 139-144.

Zhang, J., Guan, X., Lu, Y., Liu, Y., Xu, N., Cai, C., Li, Q., Liu, J., Wang, Y. and Liu, J., 2022, Titanium dioxide-mediated fatty acids promoted carotenoid synthesis in Phaffia rhodozyma PR106 analyzed whole genome, *Bioresource Technology*, 347, 126699.

Zhu, H.Z., Zhang, Z.F., Zhou, N., Jiang, C.Y., Wang, B.J., Cai, L. and Liu, S.J., 2019, Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system, *Frontiers in microbiology*, 10, 1726.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Batu ÇOLAK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	30.05.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler
Çolak, B. and Doğruöz Güngör, N. (2022). The Astrobiological Significance of Caves on Earth and on Mars . International Journal of Environment and Geoinformatics , 9 (3) , 57-64 . DOI: 10.30897/ijegeo.1037382.