



**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN PİGMENT ÜRETEEN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU
VE PİGMENTLERİN POTANSİYEL UYGULAMA
ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM KÜTÜK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
ARALIK - 2022**

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN PİGMENT ÜRETEEN
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU
VE PİGMENTLERİN POTANSİYEL UYGULAMA
ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM KÜTÜK
ORCID ID: 0000-0002-4433-5625

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. MUTLU NİSA ÜNALDI CORAL
ORCID ID: 0000-0001-6124-4576

MERSİN
ARALIK - 2022

ÖZET

ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN PİGMENT ÜRETEB AKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE PİGMENTLERİN POTANSİYEL UYGULAMA ALANLARININ ARAŞTIRILMASI

Doğal veya sentetik pigmentler kozmetik, tekstil, gıda, kağıt gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan bileşiklerdir. Özellikle gıdalarda kullanılan sentetik pigmentlerin sağlık üzerine olumsuz etkilerinin belirlenmesinden sonra, doğal pigmentlerin kullanımı önem kazanmıştır. Bakteriyel pigmentler ile yapılan çalışmalar, pigmentlerin sadece boyar madde şeklinde kullanımının sınırlı olmadığı, aynı zamanda antimikrobiyal, antiviral, antikanser gibi özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, çevresel örneklerde pigment üreten bakteri izolasyonu ve bu pigmentlerin karakterizasyonu ile bazı potansiyel uygulama alanları araştırılmıştır. Mersin ili ve Tarsus ilçesinden su ve toprak örneklerinden pigment üreten bakteri izolasyonu yapılmıştır. Toplam 50 pigmentli bakteri arasından seçilen BYL-1, BYL-3, BYL-Kır ve Phyto izolatları pigment üretimi için kullanılmıştır. 16S rRNA analizi ile *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus* ve *Bhargavaea ginsengi* olarak tanımlanan türlerden pigmentler ekstrakte edilerek antimikrobiyal ve antialgal etkileri belirlenmiştir. Pigment üretimi üzerine sıcaklık, pH ve ağır metallerin etkisi araştırılmıştır. BYL, BYL-3 ve BYL-Kır izolatlarının pigmentlerinde antimikrobiyal etki tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel pigment, *Serratia* spp., *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, *Bhargavaea ginsengi*.

Danışman: Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PIGMENT-PRODUCING BACTERIA FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES AND INVESTIGATION OF POTENTIAL APPLICATION OF PIGMENTS

Natural or synthetic pigments are compounds used in a wide variety of industrial areas such as cosmetics, textiles, food, and paper. Especially after determining the negative effects of synthetic pigments used in foods on health, the use of natural pigments has gained importance. Studies with bacterial pigments have shown that the use of pigments is not only limited to dyestuffs, but also has a wide range of uses due to its antimicrobial, antiviral and anticancer properties.

In this study, some potential application areas were investigated with the isolation of pigment-producing bacteria in environmental samples and the characterization of these pigments. Pigment-producing bacteria were isolated from water and soil samples from Mersin province and Tarsus district. BYL-1, BYL-3, BYL-Kır and Phyto isolates selected from a total of 50 pigmented bacteria were used for the pigment production. Antimicrobial and antialgal effects were determined by extracting pigments from species defined as *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, and *Bhargavaea ginsengi* by 16S rRNA analysis. The effects of temperature, pH and heavy metals on pigment production were investigated. Antimicrobial effect was detected in the pigments of BYL1, BYL-3 and BYL-Kır isolates.

Keywords: Bacterial pigment, *Serratia* spp., *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, *Bhargavaea ginsengi*.

Advisor: Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL, Department of Biotechnology, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince bana her zaman destek olan bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve bana her zaman hoşgörölü ve nazik davrandığı, deneysel çalışmalarımnda her daim yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Biyoloji Araştırma laboratuvarında bir an olsun yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen deneysel çalışmalarımnda bilgilerini her zaman aktarıp yardımcı olan hocam Prof. Dr. Elif EKER DEVELİ'ye teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarımnda her zaman destek olan eksik olduğum bilgilerde bana her daim yardımcı olan Biyolog Emine AKDENİZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu yaşıma kadar her zaman arkamda duran, verdiğim bütün kararlarda beni destekleyen, eğitim, öğretim hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan her konuda yardımcı olmaya çalışan canım annem, canım babam ve canım kardeşime sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022-1-TP2-4664 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Pigmentlerin Tarihi	4
2.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1. İnorganik Pigmentler	6
2.2.2. Sentetik Pigmentler	6
2.2.3. Doğal Pigmentler	7
2.2.3.1. Bitkisel Pigmentler	8
2.2.3.2. Hayvansal Pigmentler	9
2.2.4. Mikrobiyal Pigmentler	10
2.2.4.1. Fungal Pigmentler	11
2.2.4.2. Bakteriyal Pigment Türleri	11
2.2.4.2.1. <i>Micrococcus</i> Türleri	12
2.2.4.2.2. <i>Pseudomonas</i> Türleri	13
2.2.4.2.3. <i>Serratia</i> Türleri	13
2.2.4.2.4. <i>Bhargavaea ginsengi</i>	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Besiyerleri, Kimyasallar ve Cihazlar	15
3.2. Örneklerin Toplanması	16
3.2.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi ve Saklanması	16
3.3. Bakterilerin Tanımlanması	17
3.3.1. Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	17
3.3.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	17
3.3.2.1. İndol Testi	17
3.3.2.2. Metil Kırmızısı Testi	17
3.3.2.3. Vogler-Proskauer Testi	18
3.3.2.4. Sitrat Testi	18
3.3.2.5. API 20E Testi	18
3.3.3. 16S rRNA Analizi	19
3.4. Pigment Üretimi	19
3.4.1. Farklı pH ve Sıcaklık Ortamlarında Pigment Üretimi	19
3.5. Pigment Ekstraksiyonu	19
3.5.1. Spektrofotometrik Ölçümler (400, 500, 600 nm ölçümler)	20
3.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	20
3.6. Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi	20
3.7. Antialgal Etkisinin Belirlenmesi	21
3.8. Ağır Metallerin Etkisi	21
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
4.1. Pigment Üretimi İçin Uygun Bakterilerin Seçilmesi	22
4.2. Bakterilerin Tanımlanması	24
4.2.1. Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	24
4.2.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	25

	Sayfa
4.2.3. 16S rRNA Analizi	29
4.3. Pigment Ekstraksiyonu ve Spektrofotometrik Ölçüm	32
4.4. Pigmentlerin Kısmi Karakterizasyonu	35
4.5. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
4.5.1. Pigmentlerinin Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi	37
4.5.2. Pigmentlerin Algler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	38
4.6. Farklı Sıcaklık, pH ve Ağır Metaller Etkisinde Pigment Üretiminin Belirlenmesi	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Pigmentlerin sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. Bakteriyel pigmentler ve uygulama alanları	13
Tablo 3.1. Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kullanım amaçları	15
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	15
Tablo 3.3 Örneklerin toplandığı bölgeler	16
Tablo 4.1. Çeşitli ortamlardan toplanan örnekler	22
Tablo 4.2. BYL Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları	27
Tablo 4.3. BYL-3-Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları	27
Tablo 4.4. BYL-Kırmızı kodlu suşun API 20E test sonuçları	28
Tablo 4.5. Phyto kodlu suşun API 20E test sonuçları	29
Tablo 4.6. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları	33
Tablo 4.7. Kullanılan pigmentler ve antibakteriyel test sonuçları	37
Tablo 4.8. Sıcaklığın pigment üretimi üzerine etkisi	39
Tablo 4.9. Farklı pH'ların pigment üretimi üzerine etkisi	40
Tablo 4.10. BYL-Kırmızı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları	40
Tablo 4.11. BYL-Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları	41
Tablo 4.12. BYL-3 Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları	42
Tablo 4.13. İzolatların MTC değerleri	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Doğal pigmentlerin yapısı	8
Şekil 2.2. Mikrobiyal pigmentler ve kullanım alanları	10
Şekil 3.1. API 20E test bakterilerin pozitif, negatif olarak değerlendirme sonuçları	18
Şekil 4.1. Katı besiyerlerinde üretilmiş olan bakteri ve pigmentleri	23
Şekil 4.2. LB ve NB broth sıvı besi yerlerinde üretilmiş olan bakteri kültürleri	23
Şekil 4.3. <i>Nitzschia navis- varingica</i>	24
Şekil 4.4. Gram boyama sonrası bakteri izolatlarının ışık mikroskopunda görüntüleri	25
Şekil 4.5. Sitrat ve VP test sonuçları	25
Şekil 4.6. API 20E sonuçları	26
Şekil 4.7. BYL-Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları	27
Şekil 4.8. BYL-3 Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları	27
Şekil 4.9. BYL-Kırmızı kodlu suşun API 20E test sonuçları	28
Şekil 4.10. Phyto kodlu suşun API 20E test sonuçları	28
Şekil 4.11 <i>Micrococcus yunnanensis</i> 'in filogenetik ağacı	30
Şekil 4.12 <i>Micrococcus luteus</i> 'un filogenetik ağacı	31
Şekil 4.13 <i>Bhargavaea ginsengi</i> 'nin filogenetik ağacı	33
Şekil 4.14. Metanol ile çözülmüş olan pigmentler	34
Şekil 4.15. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları	34
Şekil 4.16. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları	34
Şekil 4.17. Rotary evaportörde pigmentlerin kurutulması	35
Şekil 4.18. TLC kağıt kromatografisinde pigmentlerin ölçülmesi	36
Şekil 4.19. Pigmentlerin antibakteriyel pozitif ve negatif test sonuçları	38
Şekil 4.20. <i>Grammatophora</i> alg türünün mikroskop görüntüsü	38
Şekil 4.21. Farklı pH'larda pigment üretimi	40
Şekil 4.22. Farklı pH'larda maksimum absorbans değerleri	41
Şekil 4.23. BYL-Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları	42
Şekil 4.24. BYL-3 Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
LB Agar	Luria Bertani Agar
LB Broth	Luria Bertani Broth
TDA	Triptofan deaminaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Reoksiribonükleik asit
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
API 20E	Analytical Profile Index
MHA	Muller Hilton Agar
IND	İndol
VP	Voges-Proskauer
TLC	Thin Layer Chromatography
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
dH ₂ O	distile su
ml	Millilitre
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
cm	Santimetre

1. GİRİŞ

Pigmentler çeşitli bitkilerden, böceklerden, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalardan ekstrakte edilen boyalardır. İnsanlar geçmişten günümüze yoğun bir şekilde renk maddelerini gıda, kozmetik, ilaç sektörü ve boya üretiminde kullanmaktadır. Sentetik pigmentler bulununcaya kadar doğal pigmentler yaygın olarak kullanılmaktaydı. Doğal pigmentler dünyada ticari olarak özellikle kürk, yün, deri ve pamuk boyama gibi amaçlar için kullanılmıştır. Ancak doğal pigmentlerin üretiminin yavaş olmasından kaynaklı piyasadaki talebi yeterince karşılayamamış ve sentetik pigmentlerin ortaya çıkışı kaçınılmaz olmuştur. Sentetik pigmentlerin ilk olarak Pekin’de 1856’da tanıtılmasıyla birlikte oldukça maliyeti düşük olan bu pigmentlerin kullanımı artmış ve doğal boyalara olan talep giderek azalmıştır. Ayrıca yarı sentetik pigmentler de üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Venil vd., 2013). Sentetik pigmentli boyaların, geliştirilmesinin kolay olması, ekonomik olması, gıdalarda istenmeyen tatların olmaması ve az miktarda kullanılsa bile mükemmel renklendirme özellikleri gibi çeşitli özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür (Sajjad vd., 2020).

Tekstil alanında çok yaygın bir şekilde kullanılan sentetik pigmentler özellikle ciddi su kayıplarına neden olmaktadır. Bir kg’lık bir tekstil malzemesinin boyanması için 100 L’ye kadar su tüketilebilmektedir. Su tüketiminin fazla olmasının yanında boyalı suların çevreye bırakılması ve yeraltı sularına karışması neticesinde çevre kirliliğine de neden olmaktadır (Sudova vd., 2007). Sentetik pigmentlerin boyama endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanımı sonucunda doğaya olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. İşlemler sonrasında büyük miktarlardaki boya maddelerinin sulara karışması insanlar için tehdit oluşturmakta ve insanların uzun süre maruz kalmaları durumunda kanserojen etki göstermektedirler. Bu sebeplerden dolayı, doğal pigmentler özellikle çocuk tekstilinde, gıda maddelerinde vb. kullanımı çevre dostu olmasından dolayı tercih edilmesi gerekmektedir (Velmurugan vd., 2010a). Kullanılan sentetik pigmentli boyaların çoğu, insan sağlığına zararlı benzen, kurşun, bakır, cıva, krom gibi ağır metaller içeren kimyasal bileşiklerden oluşmaktadır. Daha önce Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilaç, gıda, tekstil ve kozmetik geliştirmede kullanılmasına izin verilen birçok sentetik renklendiricinin daha sonra kullanımlarında kansere neden olduğu bulunmuştur (Sajjad vd., 2020). Sentetik pigmentlerin birçok soruna neden olduğunu gösteren çalışmalar sonrasında bakteriler tarafından üretilen pigmentlerin kullanımı söz konusu olmuştur. Doğal pigmentlerin uygulama alanlarının araştırılmasına büyük ilgi ve önem verilmiştir (Tuli vd., 2015; Chandika vd., 2015).

Fermentasyon yolu ile mikroorganizmalardan doğal pigmentlerin endüstriyel üretimi, daha ucuz olmaları, daha kolay üretilibilmeleri, ekstraksiyonlarına yıl boyunca devam edilebilmesi ve daha yüksek verim gibi birçok avantaja sahiptir. Bakterilerde çeşitli renklerde birçok pigment mevcuttur. Bu pigmentler, renk verme işlevini yerine getirmenin yanı sıra, bakteriler tarafından hayatta kalma avantajı için üretilen sekonder metabolit bileşiklerdir (Vila vd., 2019). Örneğin, Antarktika gibi soğuk bölgedeki bakteriler, hem düşük sıcaklıkların hem de sürekli UV’ye maruz kaldıkları için hücresel hasara karşı koruma sağlayan karotenoidler gibi koruma ve yaşamlarını devam ettirme amacı ile pigment üretme

eğilimindedirler (Órdenes-Aenishanslins vd., 2016). Bakterilerde pigment üretimi sadece koruma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda diğer bakterilere karşı direnç gibi birçok fonksiyona da hizmet eder. Örneğin deOndarza (2017), çalışmasında renkli pigment üreten bakterilerin, ozon ve peroksit maruz kaldıklarında, pigment üretmeyen bakterilere göre daha iyi hayatta kalma şansına sahip olduklarını göstermiştir. Bakterilerden üretilen pigmentlerin insan sağlığı için de önemli avantajları vardır. Potansiyel sağlık yararları olan ilginç biyoaktif bileşikler olarak bilinir. Bu pigmentler tıp, gıda, farmakoloji, zirai kimyasallar, kozmetik ve tekstil endüstrisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Venil vd., 2013). Çok sayıda mikrobiyal pigment keşfedilmiştir ve bu pigmentlerin çoğu antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal özellikler göstermektedir (Ramesh vd., 2019).

Örnek olarak Astaksantin pigmenti kırmızı renkli olup *Agrobacterium aurantiacum* bakterisi tarafından üretilen bir pigmenttir. Kantaksantin pigmenti ise *Bradyrhizobium* sp.'den elde edilerek balık yemlerinde kullanılmıştır. Bu pigment kırmızı-turuncu renkli olup *Halobacterium* bakterisi tarafından da üretilmektedir. Sarı renkli zeaksantin pigmenti *Flavobacterium* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir ve yumurta sarısının rengini artırmak üzere tavuk yemlerinde kullanılmaktadır (Dufossé vd., 2005). Prodigiosin pigmenti, *Serratia marcescens*'ten elde edilmekte ve tekstil boyası olarak akrilik, pamuk, ipek gibi kumaşların boyanmasında kullanılmaktadır (Shahid vd., 2013).

Pigmentlerin insanlar üzerinde dikkate değer bir psikolojik etkiye de sahip olduğu bilinmektedir. Başta gıda endüstrisi olmak üzere çok çeşitli tepkileri ve duyguları teşvik edebileceği için pazarlama ve reklamcılıkta çok önemli bir yerde olduğu kabul edilir (You vd., 2019).

Pigment üreten bakteriler genellikle toprak ve deniz suyundan izole edilmiş olsa da ekosistemde hemen hemen her ortamdan izole etmek mümkündür. Üretilmiş olan bakteri pigmentlerinin çok yönlü kullanım alanları bulunmaktadır. Kozmetik, tekstil, gıda, kağıt endüstrisi ve hatta bazı bakteri pigmentleri *Bradyrhizobium* sp' den elde edilmiş olan kantaksantin (Dufossé vd., 2005) yıllarca balık yemi olarak kullanılmıştır. Bakteri pigmentlerinin diğer önemli bir kullanım alanı ise ilaç endüstrisidir. Üretilmiş olan antibakteriyel, antiviral, yara onarımı, yaşlanma karşıtı ve migren tedavisinde kullanılabilecek biyolojik aktivitelere sahiptir. Bakteriyel pigmentler ile yapılan çalışmalar, pigmentlerin sadece boyar madde şeklinde kullanımının sınırlı olmadığı, aynı zamanda antimikrobiyal, antiviral, antikanser gibi özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahip olduğunu göstermiştir.

Mikrobiyal pigmentlerin üretimi ile ilgili iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki - Farklı çevresel ortamlardan pigment üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve üretkenliklerinin artırılması; diğeri ise -Halihazırda bulunan suşların iyileştirilmesi ve süreç geliştirilmesidir (Venil vd., 2013).

Bu çalışmada çevresel örneklerden pigment üreten bakteri izolasyonu ve bu pigmentlerin kısmi karakterizasyonu ile potansiyel uygulama alanlarının araştırılması hedeflenmiştir. Potansiyel uygulama alanı olarak çeşitli sektörlerde renk maddesi şeklinde kullanımı ile sınırlı kalmayarak bunun yanında antibakteriyel ve antialgal özelliklerinin araştırılması da amaçlar içerisindedir. Bakterilerden üretilecek

olan pigmentlerin sentetik pigmentlere göre kolay, ekonomik ve yüksek verimlilikte elde edilmesi hedefi de bu çalışmamızın diğer bir önemli amacını oluşturmaktadır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Pigmentlerin Tarihi

Pigment, renkli cisimleri belirtmek amacıyla kullanılan Latince kökenli bir kelimedir. Ortaçağ dönemlerinde pigment gıda renklendiricisi terimi olarak kullanılmıştır. Biyolojik terminolojide ise pigment, hücre granüllerinde oluşan ve dokuların içinde depolanan hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan renklendirici maddelerdir. Bütün bu doğal ve yapay katmanlara da “pigment” adı verilmiştir (Babitha vd., 2009).

Tarih öncesi dönemlerde insanların kıyafetlerini renklendirmek, kendilerini süslemek ve yaşadıkları ortamlara iz bırakmak amacıyla çeşitli boyaları kullandıkları bilinmektedir. MÖ 1900-2600 yıllarında İndus vadisi uygarlığında kullanılan elbise kumaşlarının iplik ve bez kısımlarında kök boyasının izleri bulunmaktadır. Yine insanların kendilerini güzelleştirmek için kına gibi doğal boyaları kullandıkları bilinmektedir. Doğal boyalar, yazılı kaynaklara göre ilk kez Çin’de MÖ 2600 yılında kullanılmış ve kayıtlara geçmiştir (Siva, 2007). İlkel boyama teknikleri bitkilerin ham halde ya da kaynatılarak özütünün çıkarılıp rengin kumaşı boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotun kullanımı zor ve zaman alıcı olduğundan daha ileri yöntemlerle, bir çok meyve ve bazı bitkilerin ezildikten sonra kaynatılıp, elde edilen boyanın kumaşa uygulanması şeklinde geliştirilmiştir. Kırmızı renkli bir boya olan Koşnil boyası ise Aztek ve Maya medeniyetleri tarafından ilk olarak kullanılmıştır. Tarih boyunca kullanılan çivit otu, kına ve safran gibi doğal boyalar günümüze kadar ulaşmıştır. 8. yüzyılda Japonya’da soya ve adzuki fasulyesinden elde edilmiş boyalar gıdalarda kullanılmıştır. Ayrıca doğal pigmentlerle ilgili yapılan farklı çalışmalar boyama sanatı gibi birçok alanı da etkilemiştir (Venil vd., 2013).

18. yy’ da hızlı nüfus artışı ve sanayi devriminin başlaması ile endüstriyel alanda doğal renk maddelerine talep artmıştır. Ancak artan talebinin karşılanmasında doğal üretilen pigmentler yetersiz kalınca sentetik pigmentler üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. 1704’te Almanya’da Johann Jacob Diesbach, laboratuvarında Prus mavisini üretmiştir ve bu pigment kimyasal olarak sentezlenen ilk renk maddesi olmuştur. Az miktarlarda kullanılsa bile sentetik pigmentlerin doğal pigment maddelerine göre renk verme gücü, renk spektrumları ve kalıcılıkları daha yüksek olmuştur. Bu nedenlerden dolayı sentetik pigmentli renk maddeleri sanayide çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda sentetik pigmentlerin özellikle gıdalarda kullanımı konusunda olumsuz sonuçların olması nedeniyle üreticiler doğal pigmentleri kullanmaya tekrar yönelmişlerdir.

Mikroorganizmalar kullanılarak pigment üretiminin yapıldığı *Blakeslea* küfünden β -karoten elde edilmesi ilk başarılı çalışmadır. 20. yy’dan itibaren doğal pigmentlerin bu şekilde üretimi ile ve organik kimyadaki biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ile doğal pigmentler yeniden dikkat çekmeye başlamıştır (Venil vd., 2013; Gurpreet ve Balmeet, 2014).

2.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması

Günümüzde pigmentler elde edildikleri kaynaklara göre doğal, sentetik ve inorganik pigmentler olarak sınıflandırılmaktadır. Sentetik pigmentler in vitro ortamlarda, doğal pigmentler ise bitkinin kök, gövde, yaprak gibi organlarından, çeşitli böceklerden ve mikroorganizmalardan izole edilirler. Endüstriyel amaçlı kullanımda pigmentlerin özelliklerinin bilinmesi tüketiciler için tercih aşamasında da önem teşkil etmektedir (Erdal ve Ökmen, 2013).

Pigmentler elde edildikleri kaynaklarına göre; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal pigmentler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kimyasal özelliklerine göre ise; flavonoid türevleri (yapısında iki fenil halkası bulunduran pigment türevleri), isoprenoid türevleri, pirol türevleri (C_4H_4NH yapısında olan pigmentler) ve azot-heterosiklik (yapısında azot grubu bulunduran bileşikler) türevleri olarak sınıflandırılırlar (Sigurdson vd., 2017).

Bir gıda maddesinin renginin göze hoş gelen güzel görünümlü ve bu görünümün gıdanın tazeliğini ve güvenliğini göstermesi açısından önemlidir. Doğal kaynaklardan üretilen pigmentlerin renklendirilme çalışmalarında son yıllarda dünya çapında ilgi görmekte ve önem kazanmaktadır. Bu pigmentler, istenmeyen pazar nedeniyle sentetik olanların yerine doğal bir gıda boyası olarak güvenli kullanımları için aranmaktadır (Soliev vd., 2011).

Tablo 2.1. Pigmentlerin sınıflandırılması (Erdal ve Ökmen, 2013) kaynağından modifiye edilmiştir.

Sınıflandırma	Pigment türü	Özellikleri	Örnekler
KÖKENİNE GÖRE	DOĞAL	Bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilen organik bileşikler	Karotenoid, Antosiyanin, Klorofil
	SENTETİK	İn vitro ortamlarda kimyasallar kullanılarak üretilen bileşikler	FD&C (Food, Drug and Cosmetic) gıda, ilaç ve kozmetik renklendiricileri
	İNORGANİK	Sentez ile elde edilen ya da doğada bulunan bileşikler	Kurşun kromat + Phtalocyanine blue à Chrome fast green (has krom yeşili)
	Tetrapirel türevleri	Dört pirol yapısına sahip bileşikler	Klorofiller, ('Hem' grubu içerir)
	Karotenoidler	İzoprenoid türevleri, çoğu polimer bileşikler	Likopen, karoten, lutein, kapsantin
	Tetrapirel Olmayan N-	Kimyasal yapısında azot bulunduranlar	Pürinler, Pterinler,

YAPISINA GÖRE	Heterosiklik Bileşikler		Flavinler, Fenazinler, Fenoksazinler, Betainler
	Benzopiran türevleri	Oksijenlenmiş heterosiklik bileşikler	Antosiyanin ve diğer flavonoidler
	Kuonlar	Yapısında kuon bulunduran bileşikler	Benzokuon, naftokuon, antrakinon
	Melaninler	İçerisinde azot bulunduran monomerlerden elde edilen polimorfik bileşikler	Ömelanin, Faomelanin

2.2.1. İnorganik Pigmentler

Geçmişten günümüze kadar gıda renklendiricisi olarak kullanılan ve doğada bulunan inorganik pigmentler, sentez yoluyla da elde edilmektedir. İnorganik pigmentlerin büyük bir çoğunluğunu metallerin elementleri veya metalde çözülme metal tuzlarından oluşmaktadır. Altın, alüminyum tozu, gümüş, kalsiyum karbonat vb, bileşikler başlıca inorganik pigmentlerdir (Anonim, 2011).

İnorganik pigmentlerin sentezinde genellikle metaller ve kimyasallar kullanıldığı için toksik özellik göstermektedir. Pigmentlerin birçoğu, önemli sağlık problemlerine neden olduğu için kullanımları sınırlandırılmıştır. Gıdalarda renklendirici olarak kullanılabilen inorganik bir pigment olan karbon siyahı bağırsak kanserine neden olan benzidin türevidir. İnsanlar için kesinlikle kanserojenik tehlikelere yol açması nedeniyle artık kullanılmamaktadır (Rao vd., 2017).

İnorganik pigmentlerin renk verme gücü, renk spektrumları ve dayanıklılıkları daha yüksek olmasına ve ayrıca kullanımları daha kolay olmalarına rağmen, hem insan sağlığı hem de çevre üzerine oldukça olumsuz etkileri vardır. Bu olumsuz etkiler tüketicinin inorganik pigmentlerden uzaklaşarak doğal pigmentlere yönelmesine neden olmuştur (Velmurugan vd., 2010a).

2.2.2. Sentetik Pigmentler

Sentetik pigmentler geçmişten günümüze tekstil, gıda, ilaç kozmetik ve kağıt üretimi gibi birçok endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Üretimleri düşük maliyetli, işlenebilirlikleri kolay ve istenen renklendirme özellikleri gibi bir çok üstünlükleri nedeniyle ilk çıktıkları yy'dan itibaren tüm pazara hakim olmuşlardır. Sentetik pigmentlerin olumlu yönlerinin yanı sıra insanlar ve çevre üzerinde zararlı birçok olumsuz etkiye sahiptir (Lagashetti vd., 2019).

İlk sentetik pigmentin keşfinde 1856'da William Henry Perkin'in sıtma tedavisi için bir deney gerçekleştirirken kullandığı anilin türevidir olan katranın bir tesadüf sonucu anilinin oksidasyonu ile leylak

renkli pigmentin oluşumunu tespit etti. Daha sonrasında sentetik boyar maddelerinin ilk fabrikasını kurdu. İlerleyen yıllarda, anilin ve diğer katran türevlerinden daha fazla boya ürününün keşfedilmesi için deneyler gerçekleştirildi. Yapılan deneyler sonucunda sentetik pigmentlerin sıvı, toz, jel ve macunlardan oluşan birçok formu da geliştirildi (Paredes-López, 2002).

Sentetik pigmentlerin küresel boya talebi yıllık 800.000 ton olup, en büyük yüzde tekstil imalatındadır. Su, tekstil imalatında yoğun bir şekilde kullanılmakta ve kullanılan suyun büyük bir oranı kaçınılmaz olarak atık suya yol açmaktadır. Sulu aşamada gözlemlenen sorun, boyaların tekstil malzemelerine kısmen tüketilmesi ve bunun sonucunda boyar maddenin önemli bir kısmının atık suya salınmasıdır (Jamee ve Siddique, 2019).

Sentetik pigmentlerin kullanımı gıda endüstrisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, üretimi genellikle kabul görmüş çevresel sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca, bazı sentetik pigmentler kanserojenik ve insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri tespit edilmiştir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanımına izin verilen bazı sentetik pigmentlerin potansiyel bir kanserojen olan karbon siyahı ve bağırsak kanserine neden olan benzidin gibi belirgin tehlikelere yol açtığı görülmüş ve kullanımı yasaklanmıştır (Rao vd., 2017). Bu nedenle, bu bileşiklerin kademeli olarak doğal kaynaklardan elde edilen alternatif pigmentlerle ikame edilmesi son on yılda özel ilgi görmüştür. Ek olarak, doğal pigmentler ayrıca antioksidan, antienflamatuar, antikanser ve antimikrobiyal aktiviteler gibi avantajlı biyolojik özellikler de gösterebilir (Tuli vd., 2015).

2.2.3. Doğal Pigmentler

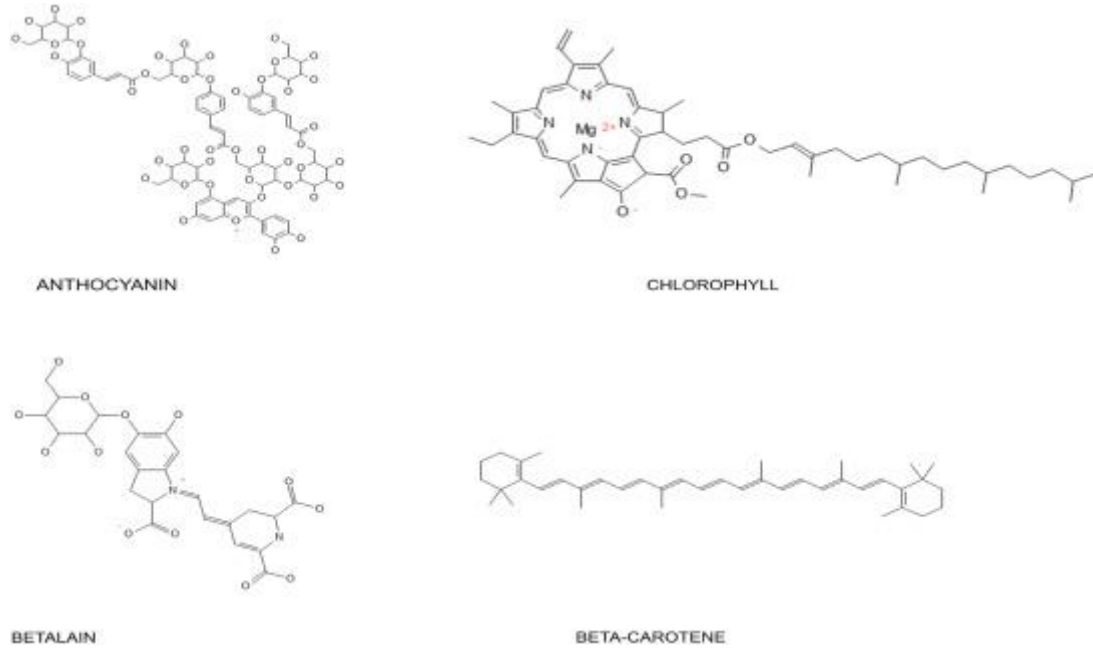
Doğal pigmentler bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan (bakteri, fungus ve alg) elde edilebilir. Mikroorganizmalardan elde edilen doğal pigmentler, pigmentlerin çözünürlüğü ve stabilitesi ve mikropların kültür için kolay bulunabilirliği nedeniyle bitki ve hayvanlara göre daha idealdir. Bu metabolitler arasında pigmentler, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilen mikroorganizmaların önemli özellikleridir. Pigment üretimi çoğunlukla sitoplazma içerisinde gerçekleşir (Pagano ve Dhar, 2015).

Günümüzde birçok alanda renkler yaygın olarak kullanıldığı için pigmentler önemli bir materyal halini almaktadır. Sentetik pigmentlerin boyama endüstrisinde yoğun bir biçimde kullanımı sonucunda fazla miktarlarda boya sulara karışmakta ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Doğaya bırakılan bu boyar maddelerin insanlar için olumsuz etkileri bilinmektedir. Hatta uzun süre bu boyalara maruz kalındığında kanserojenik etki gösterebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı gıdaların renklendirilmesinde, kıyafetlerin boyanmasında ve özellikle de çocuk tekstil ürünlerinde kullanılmak üzere doğal pigmentlere talep günden güne artmaktadır (Velmurugan vd., 2010b).

Laboratuvar ortamında elde edilen sentetik pigmentlerin olumsuz sonuçlarının bulunmasından dolayı daha çok tercih edilen doğal pigmentler, çoğunlukla bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen pigmentlerin renkleri ortam koşullarına

göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bu yüzden bu tip pigmentlerin saklama koşullarının uygun olması dikkat edilmesi gereken unsurlardan biridir (Erdal ve Ökmen, 2013; Babitha vd., 2009).

Kaynak olarak bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin birçoğunun üretimi ile ilgili sınırlılıklar bulunmaktadır. Özellikle elde edilen bitki endemik ise türün ortadan kalkması gibi riskleri barındırmaktadır. Ayrıca bitkilerden pigment üretiminin zor ve zaman alıyor olması alternatif arayışlara yöneltmiştir. Bitkilere alternatif olarak kolay üretilen mikroorganizmalar pigment eldesinde tercih edilmektedir (Samyuktha ve Mahajan 2016).



Şekil 2.1. Doğal pigmentlerin yapısı (Ghosh vd., 2022)

2.2.3.1. Bitkisel Pigmentler

Bitki pigmentleri, meyve ve sebzelerin renkli görünümlerinden ve görsel çekiciliğinden sorumlu olan eşsiz kimyasal maddelerdir. Fotosentez, savunma, düzenleme ve foto-oksidatif hasardan korunma dahil olmak üzere bitkilerin kritik biyolojik süreçlerinde temel roller oynayan ve ikincil metabolit bitki bileşikleri olarak kabul edilirler. İnsanlar tarafından tüketiminin de çeşitli hastalıklara yakalanma durumunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Ghosh vd., 2021).

Pigmentler, bitkilerin doğal muhteşem rengine neden olur. Kırmızı-sarı renkli betalainler, yeşil klorofiller bitkilerde klorofil-a ve klorofil- b, kırmızı-mor antosiyaninler ve sarı-turuncu karotenoidler sebze ve meyvelerde en yaygın bulunan pigmentlerdir. Renklendirme özelliklerinin yanı sıra, bu bitki pigmentleri potansiyel olarak sağlığı geliştirici işlevler sergiler (Ghosh vd., 2022).

Mikrobiyal kaynaklı pigment üretimine yönelmenin sebeplerinden birisi de bitki kaynaklı pigmentlerin, suda düşük çözünürlüğe sahip olmaları, ısı ve ışığa karşı kararsız olmalarıdır (Sharmila vd., 2013; Said ve Hamid, 2018).

Bitki pigmentlerinin sınıflandırılması:

Klorofiller; Pirel türevi olan klorofiller, bitkilerde, alglerde ve siyanobakterilerde bulunan fotosentetik yeşil renkli pigmentlerdir. Fotosentezin temel bir bileşeni olarak, ışık enerjisini organik bileşiklerin sentezi yoluyla kimyasal enerjiye dönüştüren süreçte işlev görmektedir. Klorofil yıkımı, yaprak yaşlanması ve meyve olgunlaşmasının hayati bir katabolik sürecidir. Bu özelliklerinden dolayı çeşitli bilim ve endüstriyel teknoloji alanlarında potansiyel olarak uygulanabilir. Klorofil, a, b, c, d ve f olmak üzere beş ana sınıfa ayrılmaktadır (Jurić vd., 2020).

Karotenoidler: İzoprenoid türevi olan karotenoidler sarı, kırmızı ve turuncu renkli yağda çözünen doğal pigmentlerdir. Karotenoidlerin doğal kaynağı bitkiler, mikroalgler, bakteriler ve mantarlardır. Fonksiyonel gruplarına bağlı olarak karotenoidler α -karoten ve β -karoten olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. α -karoten hidrokarbon zinciri içerirken, β -karoten fonksiyonel grup olarak oksijen içerir. Karotenoidler, izoprenoid lipidler sınıfına aittir. Renk oluşumu, kimyasal yapıdaki konjuge karbon-karbon çift bağlarına bağlıdır. Değişen çift ve tek bağ sistemi, konjuge bir sistem oluşturur (Shilpa vd., 2020).

Antosiyaninler: Flovanoid türevi olan antosiyaninler, bitkilerde kırmızı, mor ve mavi renk oluşturan, bitkilerde çoğalma ve savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan suda çözünen pigmentlerdir. Bitkilerde en yaygın olarak antosiyanidinler arasında siyanidin, malvidin, petunidin, delfinidin, pelargonidin ve peonidin bulunur. Kırmızı, mavi ve mor renkli bitkilerin oluşumu, antosiyaninlerin konjuge bağlarına bağlıdır (Eker vd., 2019).

Betalainler: Azot-heterosiklik türevi olan betalainler, sarı-turuncu betaksantin ve kırmızı-mor betasiyanin olarak iki ana sınıfa ayrılır. Betalainler, bitkilerin yenilebilir kısımlarında ve yapraklarda, çiçeklerde ve gövdelerde bulunur. Betanin bitkiler arasında her yerde bulunan betasiyanindir ve kırmızı pancar en yaygın betanin kaynağıdır. Pigment oranına bağlı olarak, bitkilerin benzer kısımlarında betaksantinler ve betasiyaninlerin bir arada bulunması turuncudan kırmızıya renk verir (Hussain vd., 2018).

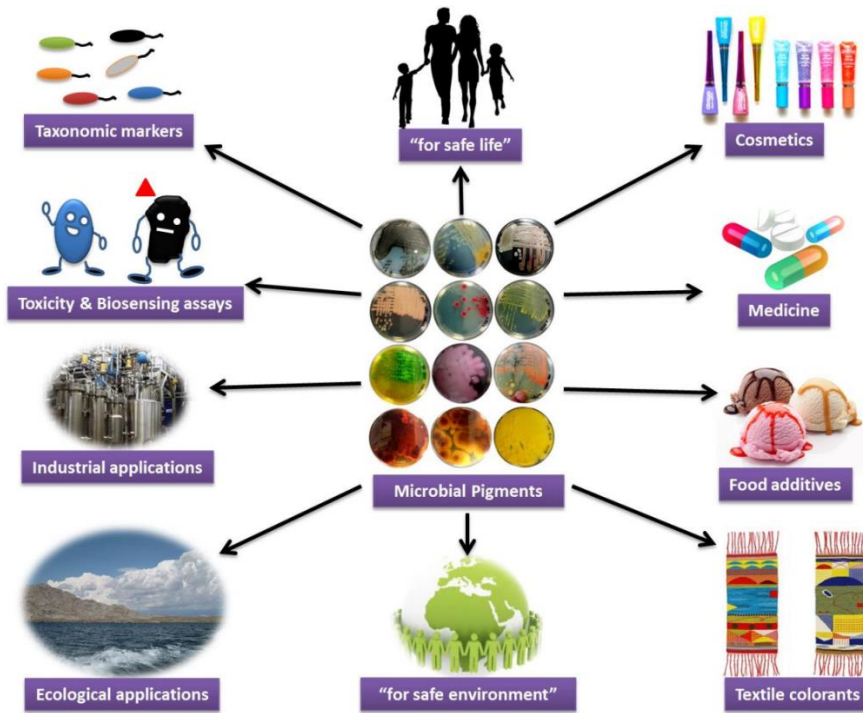
2.2.3.2. Hayvansal Pigmentler

Tüm bitkiler kendi pigmentlerini sentezler; hayvanlarda ya bitki besinlerinden pigment elde ederler ya da bunları kendileri sentezlerler. Başlıca hayvan pigmentleri, kan hemoglobininin hemleri (kırmızı), insan derisinin rengini veren melaninler (siyah ve kahverengi) karotenler, ve guanindir (beyaz ve yanardöner). Pigmentlerin sadece dış görünüşün renklendirilmesinde görevi yoktur, aynı zamanda bazı önemli fizyolojik süreçlerde de işlev görür. Göz retinasındaki pigmentler ışığı algılar, kandaki

hemoglobin solunum için organlara oksijen taşımakla görevlidir. Doğadaki birçok hayvan melanin pigmenti sentezleyebilir. Memeli hayvanların kürkleri, kuşların tüyleri, birçok böceğin dış iskeletleri ve kelebek kanatlarındaki siyah alanlar melanin ile renklendirilir. Böcekler arasında kelebekler renkleri nedeniyle dikkat çekicidir. Kanatlardaki pullardaki boyalar veya pigmentler ile siyah, kahverengi, kırmızı, turuncu ve sarı üretilir. Hayvanların karotenoidleri genellikle bitkisel gıda karotenoidlerinin dönüşüm ürünleridir. Pek çok kuş tüyünün özellikle filamingoların bacak renkleri ve uğur böceği kabuğu, Colorado böceği ve diğer birçok böceğin sarıdan kırmızıya renginden sorumludurlar (Dwarka vd., 2020).

2.2.4. Mikrobiyal Pigmentler

Mikrobiyal pigmentler inorganik veya organik olabilir, ancak organik pigmentlerin gıda ürünlerinde renklendirici olarak kullanılması daha çok tercih edilmektedir. Mikrobiyal fermantasyon doğal pigmentlerin üretimi için, daha yüksek verim, daha kolay ekstraksiyon, daha düşük maliyetli ham maddeler, mevsimsel değişimlerin olmaması ve doğal pigmenti artırmak için suyu iyileştirme teknikleri gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Mikrobiyal pigmentler, bulunabilirlikleri, mevsimsel olmamaları, ölçeklenebilirlikleri, hektar başına daha yüksek verimleri ve doğrudan aşağı akışlı işlemleri nedeniyle bitkilere kıyasla sentetik gıda renklerine daha iyi bir alternatiftir. Mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda oldukça farklı renk, yapı ve fonksiyonel çeşitlilik gösteren pigmentler tespit edilmiştir (Joshi vd., 2016).



Şekil 2.2. Mikrobiyal pigmentler ve kullanım alanları (Ramesh vd., 2019).

Choksi vd. (2020), Hindistan'da su ve toprak örneklerinden izole edilen 19 pigment üreten bakteri suşu üzerinde çalışmışlardır. 17 izolat tarafından üretilen pigmentler, 0,4-8,34 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda güneş koruyucu aktivite göstermiş ve bunlardan altısı belirgin antibakteriyel aktivite sergilenmiştir. Bununla birlikte, 16S rRNA gen dizileme yöntemi ile tanımlanan *Staphylococcus xylosus* tarafından üretilen biyopigmentlerin, beş transfere kadar stabil olduğu ve kullanılabilir güneşten koruma aktivitesi ile en fazla antibakteriyel ve antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Ramesh vd. (2019), deniz bakteri suşlarından ekstrakte edilen pigmentlerin çeşitliliği ve biyoprospektif yönlerini incelenmiştir. Yaklaşık 180 örnek toplanmış ve sonuçlar turuncu ve kırmızı pigmentli bakterilerin en bol popülasyonlar olduğunu ortaya koymuştur; bu suşlardan yoğun pigmentasyonları nedeniyle 14 izolat seçilmiş ve pigmentler gıda renklendirici uygulamaları ve biyoaktif doğası açısından test edilmiştir. İki kırmızı pigmentli suşun (BSE6.1 ve S2.1) antioksidan potansiyeli, antibakteriyel aktivitesi ve gıda renklendirici özellikleri çalışılmış ve kimyasal analiz (HPLC, TLC ve GC-MS ile) sonrasında prodigiosinin ana kimyasal bileşen olduğu tespit edilmiştir. Antibakteriyel testlerde, *S. aureus* subsp.'nin tam inhibisyonu için BSE6.1'in 400 µg ve S2.1'in 300 µg ve 150 µg kırmızı pigmente ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. 16S rRNA dizi analizine göre, sırasıyla BSE6.1 ve S2.1 suşları *Streptomyces* sp. ve *Zooshikella* sp., olduğu gösterilmiştir.

2.2.4.1. Fungal Pigmentler

Fungusların, çok çeşitli kimyasal yapı ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip ikincil metabolitlerin önemli bir kaynağı olduğu bilinmektedir (Gao Yang ve Qin, 2013). Doğal pigmentler için mantarlar kolay bulunabilen iyi bir alternatif kaynaktır. Önemli bir mantar türü olan *Monascus azaphilones*'den üretilen pigmentler, doğal renklendiriciler ve gıda koruyucuları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 19. yüzyıldan beri mantarlardan üretilen doğal pigmentler gıda ve ilaç endüstrisinde yer almaktadır ve verimli ve ekonomik üretimleri, çeşitli renkleri ve çözünürlüklerinin iyi olması nedeniyle dünya çapındaki gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır (Ali vd., 2022; Huang vd., 2017; Liu vd., 2014; Mostafa ve Abbady, 2014).

2.2.4.2. Bakteriyel Pigment Türleri

Mikroorganizmalar arasında bakteriler, çeşitli biyoürünler üretme konusunda muazzam bir potansiyele sahiptir. Bakteriyel pigmentlerin doğal renklendiriciler olarak üretimi ve uygulamaları çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Mikrobiyal kökenli kaynaklardan özellikle bakterilerin üretiminin hızlı ve kolay olması, sürekli kültür bioreaktörlerde üretililebilmeleri ve gen manipülasyonuna uygun olmalarından kaynaklı pek çok avantajı bulunmaktadır. Bu nedenle bakteriler biyoteknolojik çalışmalarda pigment üretimi için çok daha fazla tercih edilmektedir. Çeşitli araştırmacılar bakteriyel

pigmentlerin doğal renklendirici olarak üretimi ve uygulanması konusunda çalışmalar yapmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Ahmad vd., 2012).

Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı bakteriyel pigmentlerin bakterileri tanımlamak için de kullanılabildikleri bilinmektedir. *Agrobacterium aurantiacum* tarafından üretilen Astaksantin pigmenti kırmızı renkli bir pigment olup iyi bir örnektir. Kantaksantin pigmenti ise fotosentetik *Bradyrhizobium* sp. bakterisinden elde edilen bir pigment olup, yıllarca balık yeminde kullanılmıştır. *Halobacterium*'dan elde edilen kırmızı- turuncu renkli kantaksantin mikrobiyal kaynaklı diğer bir pigmenttir. Zeaksantin ise *Flavobacterium* türünden elde edilen sarı renkli pigmenttir. Kümes hayvanlarının yemlerine katkı maddesi olarak ilave edilmekte ve yumurta sarısı rengini arttırmak için kullanılmaktadır (Dufossé vd., 2005).

2.2.4.2.1. *Micrococcus* Türleri

Micrococcus spp. *Micrococcaceae* familyasına ait gram-pozitif, oksidaz-pozitif ve aerobik koklardır. Genellikle düzensiz kümeler, tetradlar ve çiftler halinde ortaya çıkarlar. Hücreler yaklaşık 1-1,8 µm çapındadır ve genellikle hareketsizdirler ve spor oluşturmazlar. *Micrococcus* spp. ve yakın cinsler genellikle deri, mukoza ve orofarinkste yaşayan zararsız saprofitler olarak kabul edilir; ancak, bağışıklığı baskılanmış kişiler için fırsatçı patojenler olabilirler. Türleri; *M. agilis*, *M. antarcticus*, *M. halobius*, *M. kristinae*, *M. luteus*, *M. lylae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. roseus*, *M. sedentarius*, *M. varians*. Sarı veya kırmızı pigment üretimi yaparlar (Beets, 2006).

Bu cins beş türü kapsar: *Micrococcus antarcticus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus mucilaginosus* ve *Micrococcus roseus*. *Micrococcus luteus* endokardit gibi patolojilerle ilişkili olduğu için patojen olarak kabul edilmektedir.

2.2.4.2.2. *Pseudomonas* Türleri

Bazı türleri insan, hayvan ve bitkilerde patojenik özellik göstermektedir. Türlerin tamamı katalaz (+), Gram (-), hareketli çubuk şekilli bakterilerdir. Son derece önemli olan bu bakteri türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir. Ayrıca *Pseudomonas* 'ları gıdalar için önemli kılan pek çok özelliğe sahiptirler. Aerobik yaşam sürdürmeleri nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla gelişebilirler ve bunun sonucunda okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Bazı gıda maddeleri üzerinde *P. fluorescens* yeşilimsi, *P. nigricans* siyah, diğer türleri ise kahverengi pigment oluşturma özellikleri vardır. Oksijensiz ortamlarda ve 42 derecenin üzerinde üreyemezler ve kurumaya dirençlilikleri zayıftır. *P. aureginosa* saprofit bir tür olmakla birlikte gastroenterik hastalıklara neden olabilir (mikrobiyoloji.org).

2.2.4.2.3. *Serratia* Türleri

Serratia türleri, sağlıklı insan dışkı florasının yaygın bir bileşeni olmamasına rağmen, Enterobacteriaceae bakteri grubunun endospor oluşturmayan, hareketli gram negatif basilleridir. *Serratia* türleri: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. fonticola*, *S. marnorubra*, *S. proteamaculans* ve *S. odorifera*. genellikle su, toprak ve bitkilerden izole edilebilen fırsatçı patojenlerdir. *S. Marcescens* suşları, özellikle hastanede uzun süre yatan, uzun süre antibiyotik kullanan ve kalıcı kateter bulunan hastalarda hastane salgınlarına neden olmaktadır. *Serratia* cinsine ait birçok tür kırmızı renkli prodigiosin pigmenti ve sürfaktan üretmektedir (Horinouchi vd., 2010).

2.2.4.2.4. *Bhargavaea ginsengi*

Bhargavaea ailesinde bulunan *Bhargavaea ginsengi*, Çin Pekin'de ginseng bitkisinin köklerinden izole edilen Gram pozitif, obligat aerob ve hareketsiz (kamçılı değildir) bir bakteridir. *Bhargavaea ginsengi* 'nin optimum büyüme sıcaklığı 30 °C olup, 4–45 °C'ler arasında üreyebilmektedir. Büyüme için pH aralığı 6,0–11,0'dır; optimum pH 7,0–8,0'dır. % 0–10 NaCl'de üreyebilir. Katalaz ve oksidaz aktiviteleri, jelatin hidrolizi ve nitrat indirgemesi pozitif, indol üretimi negatiftir. Voges – Proskauer ve metil kırmızısı testleri ve sitrat ve propiyonat kullanımı, kazein ve aeskülin hidrolizi (Katı besiyerinde koloni etrafında oluşan siyahlanma), arginin dihidrolaz ve lizozim direnci için değişkenlik gösterdiği açıklanmıştır (Qiu vd., 2010; Verma vd., 2012).

Tablo 2.2.Bakteriyel pigmentler ve uygulama alanları (Tunca, 2019)

Bakteri	Pigment	Renk	Uygulama alanları
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	Cycloprodigiosin	Sarı	Antiplasmodiyal, antikanser
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	Mor	Antioksidant, ROS etkisini giderici, antifugal ajan
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyanin	Mavi, Yeşil	Sitotoksisite, nötrofilapoptosis, proinflamatuvar, antimikrobiyal ajan
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxanthin	Pembe Kırmızı	Antioksidant, fotoprotektant, antikanser, antiinflamatuvar, gıda renklendiricisi
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Cathaxanthin	Turuncu	Antioksidant, antikanser
<i>Streptomyces sp.</i>	Undecylprodigiosin	Kırmızı	Antibakteriyel, antioksidatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphyloxanthin	Altın Sarısı	Antioksidant, ROS etkisini giderici

<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadin	Sarı	Fotohasara karşı koruma
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	Kırmızı	Sitotoksikite; antiproliferatif etki; diabetes mellitus; B-cell kronik lenfotik lösemi hastaları
<i>Flavobacterium</i>	Zeaxanthin	Sarı	Hayvan derisinin ve yumurta sarısının rengini artırmak için kanatlı yemlerinde katkı maddesi olarak; kozmetik ve gıda endüstrisinde renklendirici olarak
<i>Vogesella indigofera</i>	Blue pigment	Mavi	Ağır metal gideriminde

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Besiyerleri, Kimyasallar ve Cihazlar

Bakterilerin izolasyonunda, biyokimyasal testlerde, izolatların saklanması ve pigment üretiminde kullanılan besiyerleri ve çözeltiler Tablo 3.1’de verilmiştir. Deneylerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kullanım amaçları

Besiyeri; Çözelti	İçerik	Kullanım amacı
Nutrient Agar	Pepton; 10 g, Et özütü: 10 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, 1000 mL distile su, pH 7,0±0,2	Bakteri izolasyonunda
Nutrient Broth	Pepton; 10 g, Et özütü: 10 g, NaCl 5 g, 1000 mL distile su, pH 7,0±0,2	Pigment üretiminde
LB Agar	Tripton; 10 g, Yeast extract; 5 g; NaCl; 10g, Agar 15 g, 1000 mL distile su	Bakteri izolasyonunda
LB Broth	Tripton; 10 g, Yeast extract; 5 g; NaCl; 10g, 1000 mL distile su	Pigment üretiminde
Muller Hilton Agar	Meat infusion 2 g, Kazein 17,5, nişasta 1,5 g agar 17 g 1000 mL distile su, pH 7,0±0,2	Antibiyogram testinde
Peptonlu besiyeri	Casein pepton (tripton) 10 gr, - NaCl 5 gr, Distile su 1000 mL, pH 7,0±0,2	İndol testinde
Clark Lubs besiyeri	Glikoz 5 gr, K ₂ HPO ₄ 5 gr, Kazein pepton 3,5 gr, Meat pepton 3,5 gr, pH 7,0±0,2	Metil Kırmızısı testi ve Vogor Proskauer testinde
Citrat besiyeri	Sodyum citrate 1 gr, MgSO ₄ 0,2 gr, K ₂ PO ₄ 1 gr, NaCl 5 gr, NH ₄ H ₂ PO ₄ 1 gr, Bromtimol mavisi 0.08 gr, Agar 15 g, pH 6,8 ± 0,2	Sitrat testinde
Kristal Viyole	0,5 gr Kristal viyole 100 mL su	Gram boyamada
Etil Alkol	%70’lik	Pigment ekstraksiyonunda
Metil Alkol	% 95’lik	Pigment ekstraksiyonunda

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz	Amacı
İnkübatör	Bakteri üretimi ve bazı biyokimyasal testler için
Otoklav	Besiyerlerinin ve çözeltilerin sterilizasyonu için
Rotary Evaporatör	Pigment ekstraksiyonunda

Spektrofotometre	Pigmentlerin farklı dalga boylarında ölçümü için
Santürlüj	Pigment ekstraksiyonu için
İnverted Mikroskop	Alglerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için
Su banyosu	Bakteri izolatlarından pigment ekstraksiyonu işleminde bakteri hücrelerinin parçalanmasında
Laminar Flow Kabin	Örneklerin ekimlerinin ve diğer mikrobiyolojik çalışmaların steril bir ortamda gerçekleştirilmesi için
Vorteks karıştırıcı	Pigment ekstraksiyonu işleminde çözücülerin homojenizasyonunu hızlı bir şekilde sağlamak amacı ile
Çalkalamalı inkübatör	Pigment üretimi için sıvı besiyerlerinde üretilmek istenen bakteri kültürleri için
Manyetik karıştırıcı	Besiyeri hazırlama aşamasında homojen bir şekilde besiyerinin çözünmesini sağlamak amacıyla

3.2. Örneklerin Toplanması

Çalışmada çeşitli çevresel örneklerden pigment üreten bakteri izolasyonu yapmak amacıyla toprak ve su örnekleri toplanmıştır. Örnekler aseptik koşullarda laboratuvara getirilerek izolasyon aşamasına geçilmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler Mersin ili ve Tarsus ilçesinin farklı bölgelerinden alınmıştır. Tablo 3.3’de örneklerin toplandığı bölgeler verilmiştir.

Tablo 3.3. Örneklerin toplandığı bölgeler

İzolatlar	Temin edilen yer
T1-Sarı	Toprak
BYL- Kırmızı	Toprak
Phyto	Biy. Lab
T2- Sarı	Toprak
BYL –Sarı	Deniz suyu
LAB – Siyah	Toprak
BYL3 – Sarı	Deniz suyu
BYL-1 Sarı	Deniz suyu
T3 – Kırmızı	Toprak
Şelale Pembe	Şelale suyu

3.2.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi ve Saklanması

Su örneklerinden 100 µl alarak daha önceden hazırlamış besi yerlerine direk yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış, 48 saat 35°C’de inkübasyondan sonra renkli koloniler seçilmiştir. İnkübasyon sonrasında seçilen koloniler tekrar saflaştırılmak üzere 3 kez tek koloni ekim yapılmıştır. Toprak örnekleri ise suda çözülüp dinlendirildikten sonra süpernatanttan alınarak ekim yapılmıştır. 1-4 gün inkübasyon sonrasında pigment üreten tek düşmüş saf koloniler seçilmiştir. Renkli koloni oluşturan

örnekler seçilerek daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere stok kültürleri hazırlanıp +4 derecede buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Bakterilerin Tanımlanması

Bakteri izolatlarının tanımlanması kültürel, morfolojik, biyokimyasal özellikleri ile rRNA analizlerine göre yapılmıştır. Besiyerinde pigment üretmiş olan renkli bakteri kolonilerinin karakterizasyonu, rengi, şekli, hareketliliği gram boyama metodu kullanılarak yapılmıştır.

3.3.1. Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin koloni morfolojilerini tespit etmek amacıyla Nutrient Agar ve LB Agar kullanılmıştır. Tek koloni ekim yöntemi kullanılarak ekilen bakteriler 24-48 saat arası 36°C’de inkübasyona bırakılmış ve koloni morfolojileri tespit edilmiştir. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için Gram boyama yapılmış ve mikroskopta gözlenmiştir.

3.3.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için IMVIC testi (İndol, Metil Kırmızısı, Citrat ve Voges-Proskauer testi (VP)) ve diğer bazı biyokimyasal özelliklerin bir arada görülmesini sağlayacak olan API 20E (Analytical Profile Index) testi yapılmıştır.

3.3.2.1. İndol Testi

Test edilecek izolatın 24 saatlik kültüründen peptonlu besiyerine ekim yapılır. 36°C’de 24 saat inkübe ettikten sonra kültürün üzerine Kovaks’ın İndol ayırıcından 5 damla damlatılır. Kırmızı renkli halka tabakanın oluşması test sonucunun pozitif olduğunu gösterir. Sarımsı halkanın oluşması sonucun negatif olduğunu gösterir.

3.3.2.2. Metil Kırmızı Testi

Clark Lubs besiyerine test edilecek izolatın 24 saatlik kültüründen ekim yapılır. 36°C’de 24 saat inkübe ettikten sonra kültürün üzerine Metil Kırmızısı ayırıcından 4-5 damla damlatılır. Kültürün üzerinde kırmızı renkli tabakanın oluşması test sonucunun pozitif olduğunu gösterir. Negatif sonuçta sarı renkli tabaka oluşur.

3.3.2.3. Voges-Proskauer Testi

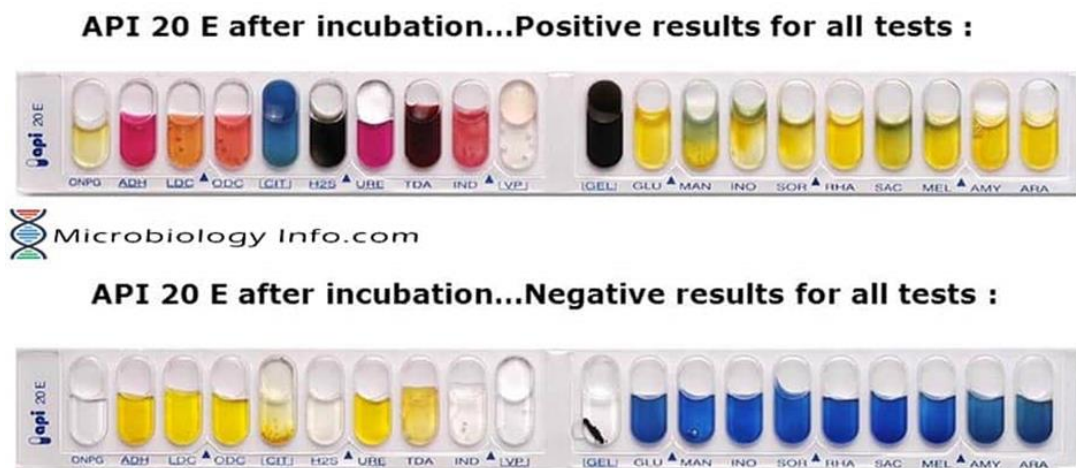
Clark Lubs besiyerine test edilecek izolatın 24 saatlik kültüründen ekim yapılır. 36°C’de 24 saat inkübe ettikten sonra kültürün üzerine Reagent 1 ve Reagent 2 damlatılır. Besiyerinin üzerinde pembe renk meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

3.3.2.4. Sitrat Testi

Simmon’un sitrat besiyerine test edilecek izolatların 24 saatlik kültüründen ekim yapılır. 36°C’de 24 saat inkübe ettikten sonra üreme kontrol edilir. Üreme ile birlikte koyu mavi rengin oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

3.3.2.5. API 20E Testi

Saf kültürden alınan bakteri kolonileri 7 ml distile su (dH₂O) içerisinde çözdürülmüş, 20 ayrı kuyucuktan oluşan biyokimyasal reaktifler içeren API 20E Biyokimyasal Test Şeridinin her bir kuyucuğuna eşit miktarda bakteri süspansiyondan eklenmiştir. TDA (Tryptofan deaminaz testi) kuyucuğuna bir damla Ferrik Klorür; IND (indol testi) için bir damla Kovacs reaktifi ve VP (Voges-Proskauer testi) için de bir damla %40 KOH (VP reaktif 1) & Bir damla VP Reaktif 2 (α -Naphthol) eklenmiştir (www.biomerieux-usa.com). Test kitleri 48 saat inkübasyondan sonra renk değişimine göre değerlendirilmiştir. Test edilen suşlara ait API 20E pozitif ve negatif sonuç değerlendirmelerinin nasıl yapıldığı Şekil 3.1.’de verilmiştir.



Şekil 3.1. API 20E test bakterilerin pozitif, negatif olarak değerlendirme sonuçları

3.3.3. 16S rRNA Analizi

Bakteri üzerinden tür tayini için örneklerin DNA izolasyonunda EurX GeneMATRIX Bacterial ve Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. PCR çalışmasında universal primer olarak 27F – 1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

3.4. Pigment Üretimi

Pigment üretimi için, izole edilen bakterilerden 4 farklı besi yerine (Nutrinet Agar, Nutrient Broth, Luria Bertani Broth (LB) ve Luria Bertani (LB) Agara ekim yapılmıştır. Sıvı kültürler 35 derecelik 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 7 gün ünkübasyona bırakılmıştır. Pigmentler, katı besiyerinden ve sıvı besiyerinden ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Kültürler, 100 ml'lik steril Nutrient Broth ve LB broth besiyerlerinde 35 °C'de inkübatörde statik durumda ve 150 rpm'de döner çalkalayıcıda tutulmuş, katı besiyerleri ise 35 °C'de standart etüvde 7 gün boyunca inkübasyona bırakılarak pigment oluşumu gözlenmiştir (Goswami vd., 2014).

3.4.1. Farklı ve pH ve Sıcaklık Ortamlarında Pigment Üretimi

NA ve LB agar besi yerleri pigment üretmek için üçlü setler halinde (I, II, III) hazırlanmıştır. Farklı pH'ta besiyerleri elde etmek için otoklavlanmadan önce besiyerlerinin pH'ı 5,3, 7,0 ve 8,5'e HCl ile ayarlanmıştır. Ekim yapılan petri 2-4 gün arası 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından petri kutusunda üremiş bakteriler sıyrılarak alınmış ve spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Farklı sıcaklıklar için, benzer şekilde hazırlanan besiyerleri kullanılmış bakteri ekimi yapıldıktan sonra 25-30-37 °C aralıklarında üçlü setler şeklinde inkübasyona bırakılmıştır. 2-4 gün arası inkübe edildikten sonra, petri kutusunda üremiş bakteriler sıyrılarak alınmış ve spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.5. Pigment Ekstraksiyonu

Pigment ekstraksiyonu için, izole edilen bakterilerden Nutrient Broth ve LB Broth besiyerlerine ekim yapılmış çalkalamalı etüvde 150 rpd'de 35 derecelerde 1 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dakika 2 kez santüfjü edilmiş ve süpernatant 5 mL'lik çözücülerde (etanol, metanol) çözülerek 60 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Ardından 4000 rpm'de 10 dakika daha santüfjü edilmiş, süpernatant daha sonraki uygulamalar için steril ependorflara aktararak +4 °C'de saklanmıştır (Shetti, 2017).

3.5.1. Spektrofotometrik Ölçümler (400, 500, 600 nm ölçümler)

Literatürdeki çalışmalardan pigment dalga boyu aralığı dikkate alınmıştır ve buna bağlı olarak UV spektrofotometrik ölçümler için quartz küvetler kullanılmıştır. Cam küvetlerin tipik olarak görünür ışığın dalga boyu aralığında kullanımı için uygundur. Renkli bakteri kolonilerinden izole edilen pigmentler metanol ile çözündürüldükten sonra ve santrifüj işlemlerinin yapıp pellet kısımları atıldıktan sonra süpernatant kısımları renkli sıvı pigmentler quartz küvetler kullanılarak kırmızı pigmentliler için 400, 500 ve 600 nm (Ahmad vd., 2012), açık sarı ve sarı olanlar için ise 400,500,600 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır (Gupta vd., 2019). Daha sonrasında bakterilerin farklı pH'larda pigment üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı pH'larda üretilen pigmentler metanol ile çözündürüldükten sonra yeniden spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. İkinci ölçümlerde 10 adet bakteri türü ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda çıkan pikler doğrultusunda değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuçlar araştırma bulguları ve tartışma kısmında detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

3.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC) pigmentlerin karakterizasyon işlemleri ve tanısı için kullanılan bir ayırma yöntemidir. Sabit ve hareketli olmak üzere iki fazı bulunmaktadır. Ekstrakte edilmiş olan pigmentler kısmi saflaştırma işlemleri için Kloroform: metanol (9:1), Kloroform: metanol (6:4), kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) plakaları ile ayrıştırılmıştır. Örnekler hazır silika jel tabakası (Merk) üzerine kapiler tüp yardımıyla uygulanarak havada kurutulmuştur. Kör olarak çözücü TLC tabakaları solvent sistemine batırılıp ve pigmentlerin yürüme mesafelerine tespit edilmiştir. Metanol ile ekstrakte edilmiş olan pigmentlerin kromatografik olarak analizinde (Gupta vd., 2019) kırmızı pigmentler için çözücü olarak etil asetat, hareketli faz olarak kloroform/metanol (9/1 oranında) turuncu ve sarı pigmentler için çözücü olarak metanol, hareketli faz olarak ise metanol/aseton (30/20 oranında) tercih edilmiştir. Çalışmada kırmızı pigmentler için çözücü olarak metanol hareketli faz olarak kloroform/metanol sarı ve açık sarı pigmentler için ise çözücü olarak metanol hareketli faz olarak kloroform/metanol (9/1 oranında) kullanılmıştır. Uygun çözücülerle ekstrakte edilen pigmentlerden 20 µl alınarak silika tabakası üzerine damlatılmıştır. Kromatografi tankına yerleştirilen silika tabaka 1 cm yükseklikte olacak şekilde kutunun içerisine dik bir şekilde konulmuştur. Yaklaşık 15-20 dakika sonrasında silika tabaka üzerindeki pigmentlerin yürüme mesafeleri hesaplanarak pigmentler hakkında yorumlar yapılmıştır.

3.6. Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Pigmentlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle pigmentlerin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen pigmentlerin konsantre etmek için Rotary evaporatör

kullanılmıştır. Konsantre edilmiş pigmentler 1 ml metanol ile tamamen çözdürülmüştür. MHA'lı besiyerlerinin üzerine disk difüzyon testi uygulamak için Oxoid™ marka (Blank Antimicrobial Susceptibility discs) antimikrobiyal duyarlılık testi diskleri kullanılmıştır. Disklerin herbirine 20 µL hazırlanmış olan pigment solüsyonu emdirilerek etüvde kurutulmuştur. Pigmentlerin antimikrobiyal etkilerini araştırmak için disk difüzyon tekniği kullanılarak Müller Hilton agarda standart bakteri türler üzerinde test edilmiştir. Standart bakteri türleri; *E.coli*,(25922) *Staphylococcus aureus*,(25953), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *B. subtilis spizenii*, *En. faecalis* ve *En. hormaecheni* kullanılmıştır. Bakteri kültürü için MHA besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiş ve üzerine hazırlanmış olan pigmentli diskler belli aralıklarla yerleştirilmiştir. Petriler ters çevrilmeden 36 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri kültürü için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüştür.

3.7. Antialgal Etkinin Belirlenmesi

Pigmentlerin algler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 2 alg kültürü kullanılmıştır. Bunlar *Grammatophora* cinsi ve *Prymnesium parvum* türüdür. Akdeniz suyundan izole edilen *Grammatophora*'nın 13 mL'lik F2 besiyerindeki kültürüne, bakteri pigmenti 50 µL ilave edilmiştir ve sonuçlar gözlemlenmiştir. *Prymnesium parvum* Marmara denizinden izole edilmiştir. 13 mL'lik alg kültürü üzerine 50 µL pigment örneği F2 besi yerine konularak birlikte inkübasyona bırakılmıştır. Her iki alg kültürü için bir kontrol tüpü kullanılmıştır.

3.8. Ağır Metallerin Etkisi

İzolatların maksimum üreyebildiği ağır metal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, CuSO₄ (5, 10, 15, 20 mM), NiCl₂ (5, 10, 15, 20 mM), CdCl₂ (3, 6, 9, 12 mM), K₂Cr₂O₇ N (1, 3, 5, 7 mM), konsantrasyonlarda Nutrient Agar besiyerlerine eklenmiştir. Besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra 36 °C'de 24 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üreme görülen en yüksek konsantrasyon bakterilerin tolere edebildiği maksimum metal konsantrasyonu (MTC-Maksimum Tolerable Concentration) olarak belirlenmiştir. Belirlenen MTC değerlerinde izolatlardan pigment üretimi ve ekstraksiyonu yapılarak ağır metallerin etkisi değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

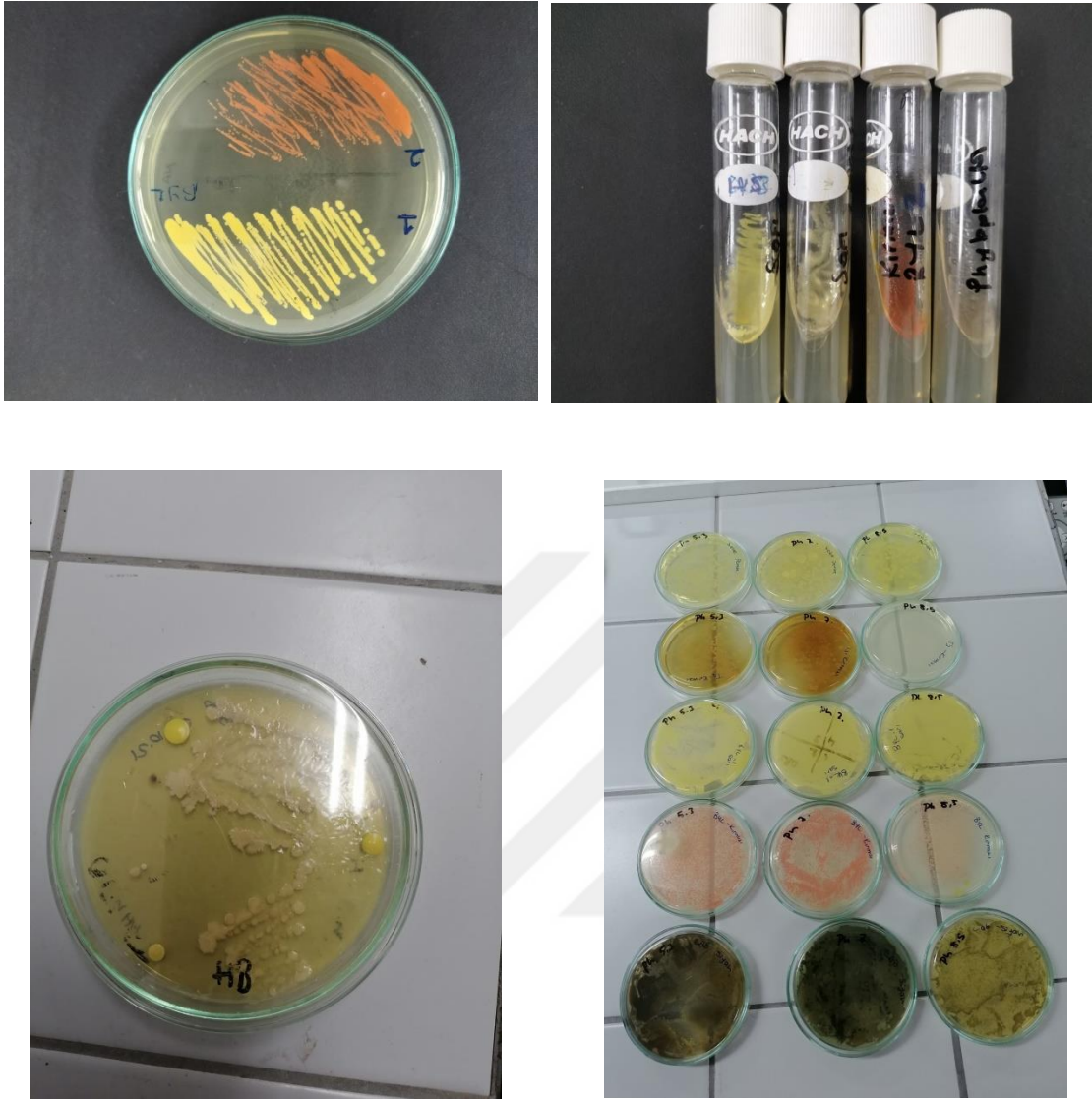
4.1.Pigment Üretimi İçin Uygun Bakterilerin Seçilmesi

Pigment üreten bakterilerin izolasyonu ve üretilen pigmentlerin kısmi karakterizasyon işlemleri için farklı çevresel ortamlardan örnekler alınmıştır. Yaklaşık 50 izolat ile başlatılan çalışma pigment üretiminin yoğun olduğu gözlenen 10 izolata düşürülmüştür. Mersin ili ve Tarsus ilçesinin farklı bölgelerinden temin edilen örnekler Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. İzolatlar ürettiği pigmentin rengine göre kodlanmıştır.

Tablo 4.1. Çeşitli ortamlardan toplanan örnekler

İzolatlar	Temin edilen yer	Koordinat
T1-Sarı	Toprak	36.78863251595183, 34.52471168870022
BYL- Kırmızı	Toprak	36.79126369185421, 34.52000507518695
Phyto	Biy. Lab KK	-
T2- Sarı	Toprak	36.78863251595183, 34.52471168870022
BYL –Sarı	Deniz suyu	36.79401876092589, 34.62889555889761
LAB – Siyah	Toprak	36.79126369185421, 34.52000507518695
BYL3 – Sarı	Deniz suyu	36.76346450027256, 34.55577154043409
BYL-1 Sarı	Deniz suyu	36.76346450027256, 34.55577154043409
T3 – Kırmızı	Toprak	36.79126369185421, 34.52000507518695
Şelale Pembe	Şelale suyu	36.93306456106216, 34.89842350840191

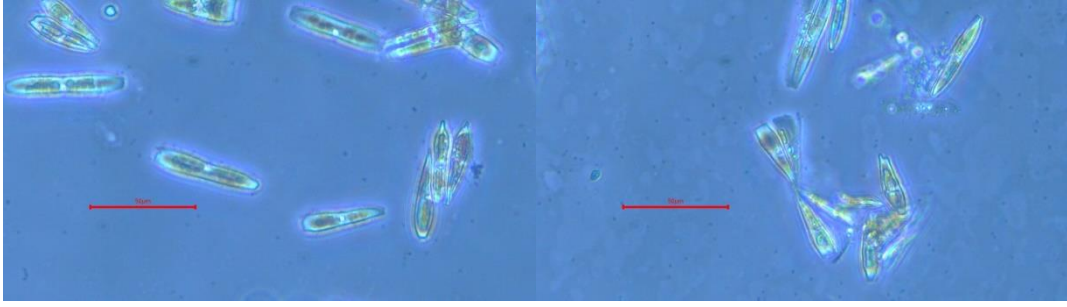
Örnekler, aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiş izolasyon için NA ve LB agarlara ekim yapılmıştır. Toprak örnekleri sulandırılarak katı besiyerine tek koloni ekim yapılırken tatlı ve deniz suyu örnekleri direk ekilmiştir. Üreyen koloniler saflaştırmak için tekrarlar şeklinde ekilmiştir. Bakteri örneklerinin yayma ekim yöntemi ile ekimleri yapılmıştır 48 saat 35 °C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Pigment üreten izolatlar seçilerek çalışmalara bunlar ile devam edilmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2'de bazı izolatların besiyerinde oluşturdukları pigmentleri görülmektedir. Phyto olarak kodlanan izolat Biyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan alg kültür koleksiyonundan izole edilmiştir. *Nitzschia navis-varingica* kültüründen bakteri izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4.3.'de *Nitzschia navis-varingica* 'nin mikroskopik görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.1. Katı besiyerlerinde üretilmiş bakteri ve pigmentleri



Şekil 4.2. LB ve NB sıvı besiyerlerinde üretilmiş bakteri kültürleri



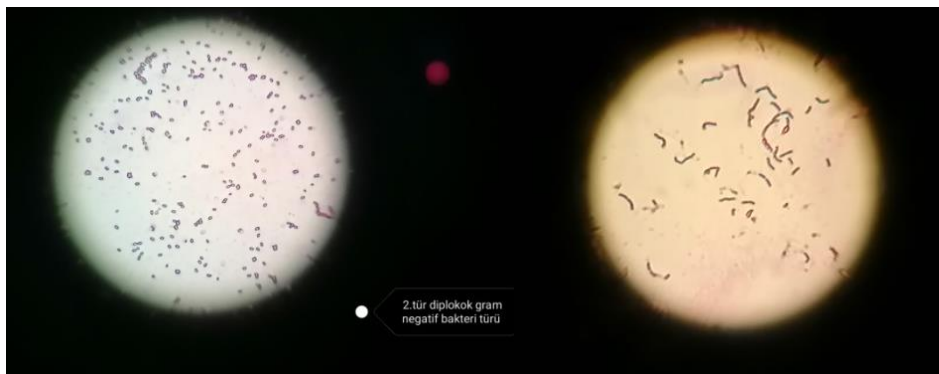
Şekil 4.3. *Nitzschia navis-varingica*

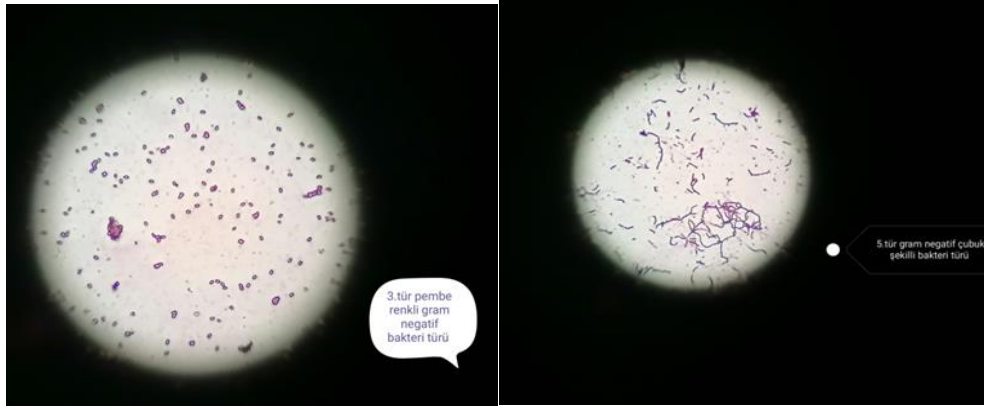
Pigment üreten bakterilerin izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, (Sasidharan vd., 2013) havadan, (Asker, 2017) suların ve toprak ortamlarından (Kadioğlu vd., 2018), bitki (Ozdal ve Kurbanoglu, 2018), böcek ve hayvanların farklı bölgelerinden, enfekte olmuş bitki ve hayvan örneklerinden, kısacası steril olmayan herhangi bir ortamdan bakteri izolasyonu yapılabileceği gösterilmiştir. Aksan (2005), çalışmalarında *Rhodotorula glutinis*'in hava, su, meyve fabrikaları atığı, insan ve diğer memeli hayvanlar gibi çok farklı ortamlarda izolasyon yapılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada da hem toprak hem de tatlı ve tuzlu sudan izole edilen bakterilerde pigment üreten suşlar tespit edilmiştir.

4.2. Bakterilerin Tanımlanması

4.2.1. Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının tanımlanması için mikroskopik ve kültür morfolojik özellikleri belirlenmiş ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Besiyerinde pigment üretmiş olan renkli bakteri kolonilerinin karakterizasyonu, rengi, şekli, hareketliliği gram boyama metodu kullanılarak yapılmıştır. Gram boyama işlemi bakteri izolatları ışık mikroskopunda 100x objektifte incelenmiştir. Mavi-mor renge boyanan tüm izolatlar Gram (+), pembe-kırmızı renkte olanlar ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca mikroskop görüntülerinde bakterilerin şekil ve büyüklükleri incelenmiştir (Şekil 4.4.).

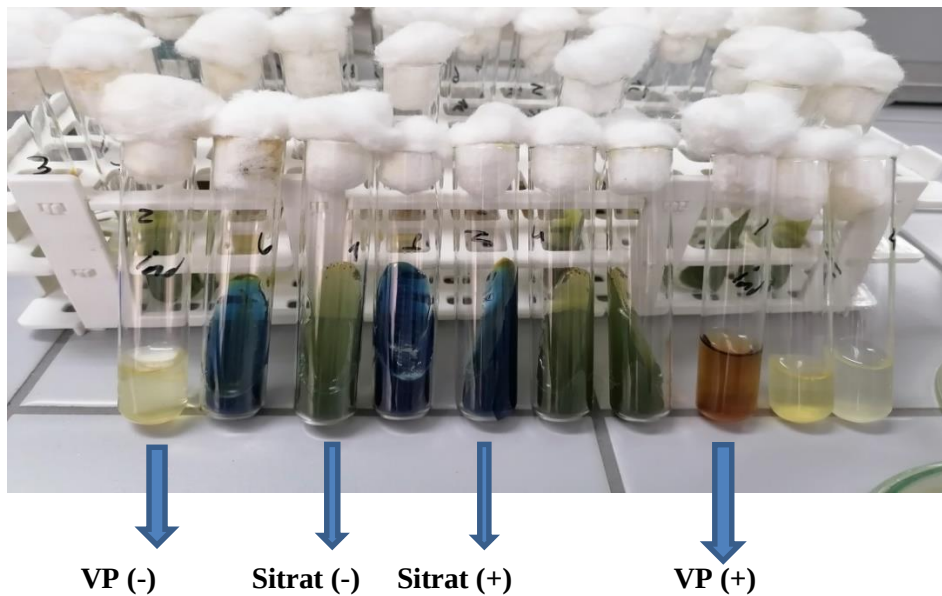




Şekil 4.4. Gram boyama sonrası bakteri izolatlarının ışık mikroskopunda görüntüleri

4.2.2. Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için IMVIC testi (İndol, Metil Kırmızısı, Citrat ve Voges-Proskauer testi (VP)) ve diğer bazı biyokimyasal özelliklerin bir arada görülmesini sağlayacak olan API 20E (Analytical Profile Index) testi yapılmıştır. Çalışmada petride iyi pigment üretimi gözlenen 10 adet bakteri izolatı incelenmiştir. Kırmızı, açık sarı, sarı, pembe, kahverengi pigment oluşturan koloniler seçilerek biyokimyasal testler yapılmıştır. Kırmızı renkli pigment üreten suş Indol (-), Metil kırmızısı (-), VP (+) ve Sitrat (+) olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.5.'de BL-Kırmızı olarak kodlanan suşun VP ve Sitrat testi sonucu gösterilmiştir. API 20E testi kiti pigment üretimi gözlemlenmiş suşların ön tanımlaması için yapılmıştır. Test edilen bazı suşlara ait API 20E pozitif ve negatif sonuçları Şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Sitrat ve VP test sonuçları



Şekil 4.6. API 20E sonuçları

BYL-Sarı, BYL3-Sarı, BYL-Kırmızı ve Phyto izolatlarının API 20E testi değerlendirmeleri sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’de verilmiştir.

The image shows the API 20E test result form for the BYL-Sarı isolate. The form has a header with the API 20E logo and the Biomérieux logo. Below the header, there is a grid of 20 wells, each containing a small amount of liquid. The colors of the liquids vary, indicating different biochemical test results. For example, the first few wells (1-4) are yellow, indicating a positive result for ONPG, ADH, LDC, and ODC. The last few wells (17-20) are blue, indicating a negative result for AMY, ARA, OX, and NO₂. The form also includes a section for 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy' and a section for 'Ident. / Ταυτοποίηση:'.

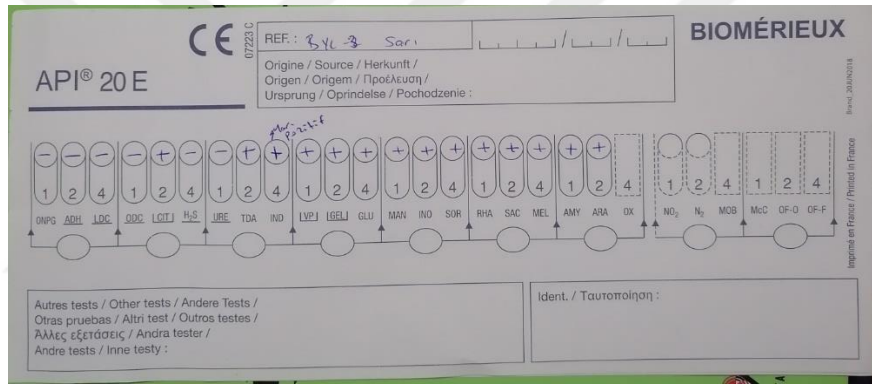
Şekil 4.7. BYL-Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları

BYL-Sarı kodlu bakteri suşu API 20E testinde ONPG, ADH, LDC, ODC, H₂S negatif, IND pozitif ve CIT, URE, TDA, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA sonuçları ise pozitif sonuç vermiştir.

Tablo 4.2. BYL Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları

48 saat sonrasında BYL Sarı kodlu bakteri türünün API 20E test sonuçları																				
Testler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sonuç	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1-β-galactosidase, 2-arginin dihidrolaz, 3-lizin dihidroloz, 4-ornitin dekarboksilaz, 5-sitrat kullanımı, 6-H₂S, 7-Üre, 8-triptofan deaminaz, 9-indol, 10-VP, 11-jeletinaz deaminaz, 12-glikoz, 13-mannitol, 14-inositol, 15-sorbitol, 16-rhamnose, 17-sükroz, 18-melibiyoz, 19-amigdalin, 20-arabinoz



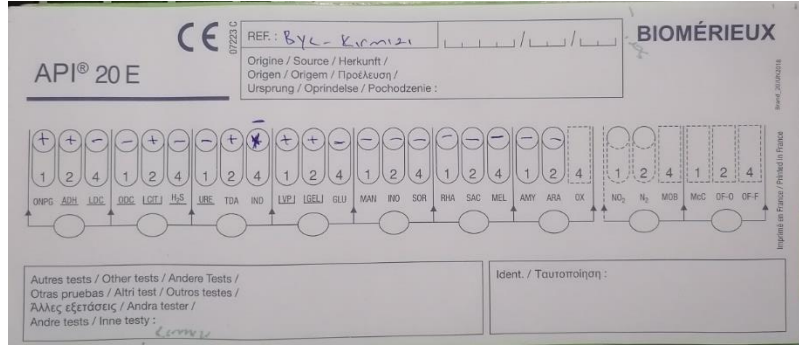
Şekil 4.8. BYL-3 Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları

BYL-3 Sarı kodlu suş, API 20E testinde ONPG, ADH, LDC, ODC, H₂S, URE negatif, IND kısmi pozitif ve CIT, TDA, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA ise pozitif sonuç vermiştir.

Tablo 4.3. BYL- 3 Sarı kodlu suşun API 20E test sonuçları

48 saat sonrasında BYL-3 Sarı kodlu bakteri suşunun API 20E test sonuçları																				
Testler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sonuç	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1-β-galactosidase, 2-arginin dihidrolaz, 3-lizin dihidroloz, 4-ornitin dekarboksilaz, 5-sitrat kullanımı, 6-H₂S, 7-Üre, 8-triptofan deaminaz, 9-indol, 10-VP, 11-jeletinaz deaminaz, 12-glikoz, 13-mannitol, 14-inositol, 15-sorbitol, 16-rhamnose, 17-sükroz, 18-melibiyoz, 19-amigdalin, 20-arabinoz



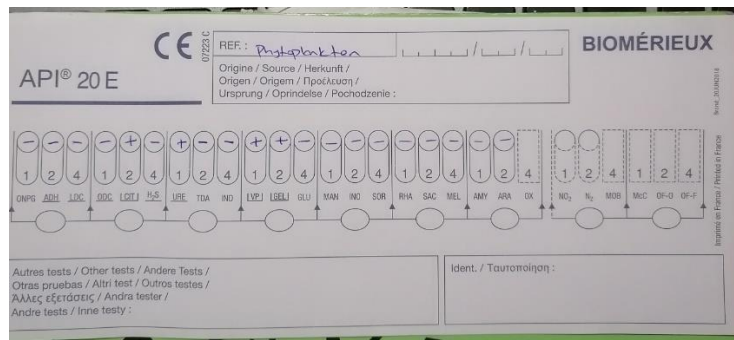
Şekil 4.9. BYL- Kırmızı kodlu suşun API 20E Test sonuçları

BYL-Kırmızı kodlu suşun API 20E test sonuçları ONPG, ADH, CIT, TDA, VP, GEL pozitif, LDC, ODC, H₂S, URE, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA test sonuçları negatif sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.4. BYL-Kırmızı kodlu suşun API 20E Test sonuçları

48 saat sonrasında BYL-Kırmızı kodlu suşun API 20E test sonuçları																				
Testler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sonuç	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1-β-galactosidase, 2-arginin dihidrolaz, 3-lizin dihidroloz, 4-ornitin dekarboksilaz, 5-sitrat kullanımı, 6-H₂S, 7-Üre, 8-triptofan deaminaz, 9-indol, 10-VP, 11-jeletinaz deaminaz, 12-glikoz, 13-mannitol, 14-inositol, 15-sorbitol, 16-rhamnose, 17-sükroz, 18-melibiyoz, 19-amigdalın, 20-arabinoz



Şekil 4.10. Phyto kodlu suşun API 20E test sonuçları

Phyto kodlu bakteri suşu API 20E testinde CIT, URE, VP, GEL pozitif, ONPG, ADH, LDC, ODC, H₂S, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA negatif sonuç vermiştir.

Tablo 4.5. Phyto kodlu kodlu suşun API 20E test sonuçları

48 saat sonrasında kodlu Phyto bakteri türünün API 20E test sonuçları																				
Testler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sonuç	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1-β-galactosidase, 2-arginin dihidrolaz, 3-lizin dihidroloz, 4-ornitin dekarboksilaz, 5-sitrat kullanımı, 6-H₂S, 7-Üre, 8-triptofan deaminaz, 9-indol, 10-VP, 11-jeletinaz deaminaz, 12-glikoz, 13-mannitol, 14-inositol, 15-sorbitol, 16-rhamnose, 17-sükroz, 18-melibiyoz, 19-amigdalın, 20-arabinoz

4.2.3. 16S rRNA Analizi

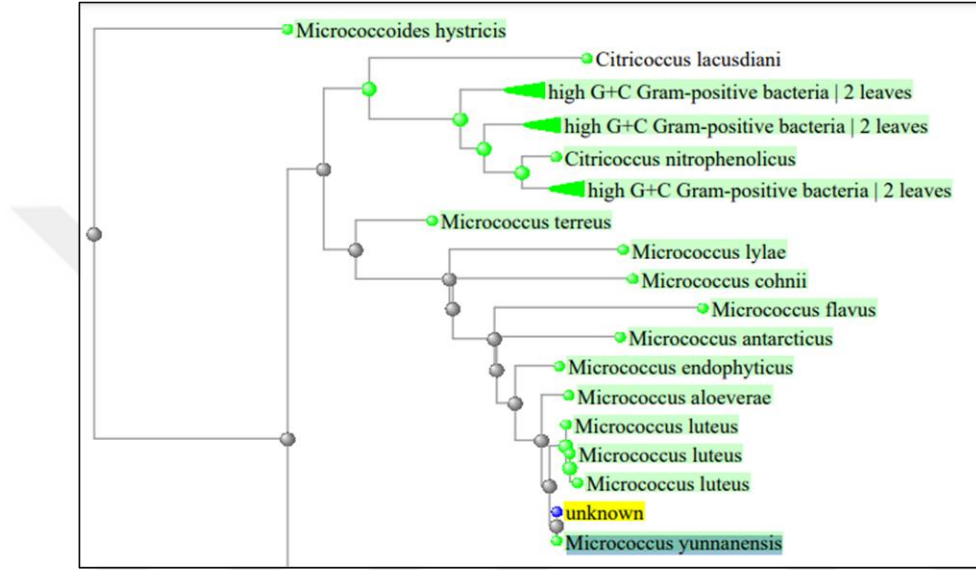
Hizmet alımı şeklinde yapılan rRNA tür analizi sonuçlarına göre izolatlar *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus* ve *Bhargavaea ginsengi* olarak tespit edilmiştir (sırasıyla Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Kırmızı kodlu suşun biyokimyasal test sonuçları ve API 20E sonuçlarına göre *Serrratia* cinsi olarak tanımlanmış ancak tür tanımlamasında sonuç elde edilememiştir.

1.BYC: MG952591.1 *Micrococcus yunnanensis*

TGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGAT
AGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGG
CCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
AGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGTCGTGAAAGTCCGGG
GCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAG
GTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTC
CGCGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCC
TTTGGGGCGGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCCTCGTTCCAT

GTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG
GTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATG
GCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCCAAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGT
CTGGTAACACCCGAA GCCGGTGGCCTAACCC

Benzerlik Oranı : %99,9



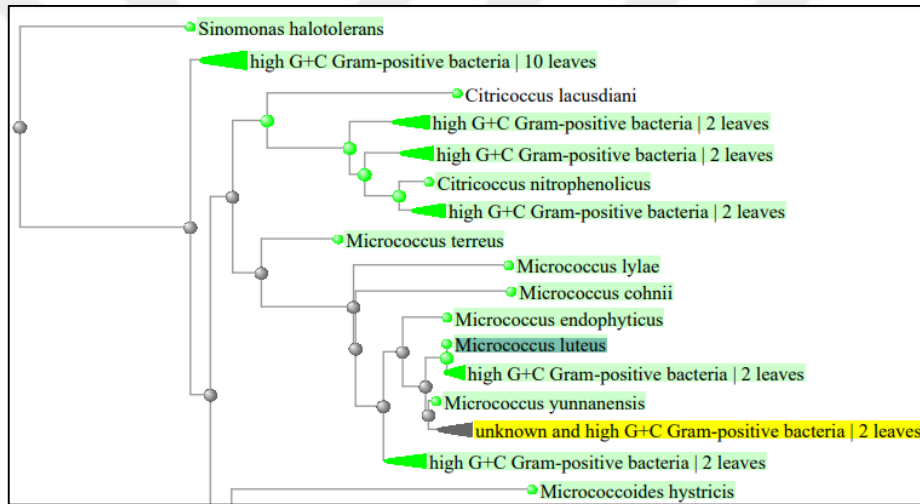
Şekil 4.11. *Micrococcus yunnanensis* 'in filogenetik ağacı

2.BYC-3; MZ734340.1 *Micrococcus luteus*

GATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGCGGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAAC
CTGCCCTTAACCTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCA
CCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTT
GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCCGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGG
CTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTTGTTGGCGGTTTGTGCGGTCCGTTCGTGAAAGTCCGGGGGCTTAACCC
GGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGC
TGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAG

CTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCCTTTGGGGCGG
GTTACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCG
AACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTCGTGGTGGGGACTCATGGGAGACT
GCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTT
GGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTCGATACTGTGAGGTGGAGCTA
ATCCCCAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGA
GTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCT
AACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAA

Benzerlik Oranı : %99,57

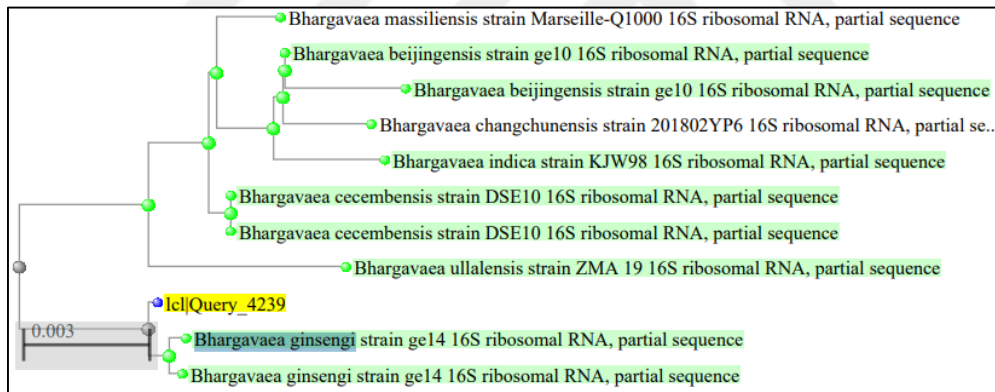


Şekil 4.12. *Micrococcus luteus* 'un filogenetik ağacı

3. PHY : MN121192.1 *Bhargavaea ginsengi*

GGAGAGCTTGCTCTCCGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT
GAAGATCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTCCTTCCTCCGCATG
GAGGAAGGCGGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGC
TAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGG
TCGTAAAGCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGCATCGGTAACTGCCGGTGCCCTGACGGT
ACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGT

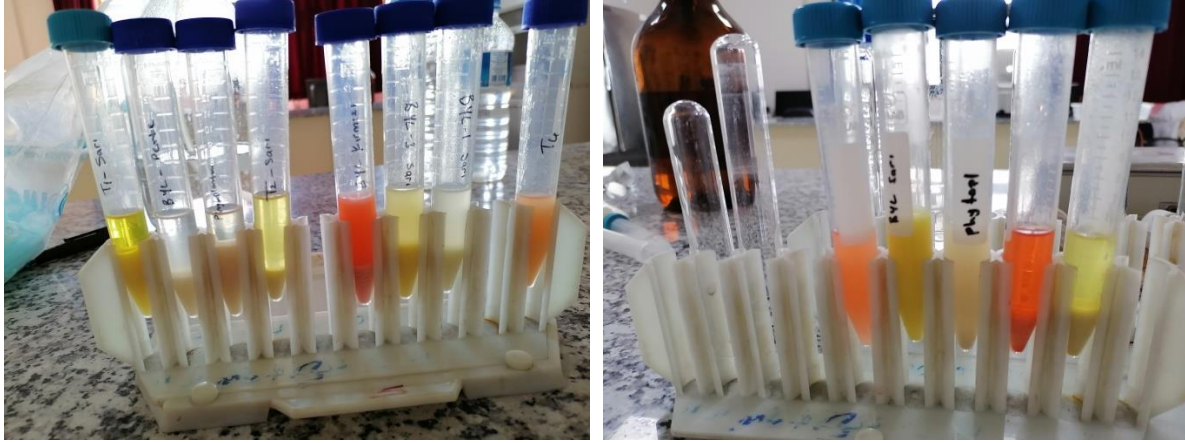
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAG
AGGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTT
TCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACCACCCTGGAGACAGG
GCCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAGAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGA
AAACCGTTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCTTACGGGAGCCAGC
Benzerlik Oranı: %100



Şekil 4.13. *Bhargavaea ginsengi* 'nin filogenetik ağacı

4.3. Pigment Ekstraksiyonu ve Spektrofotometrik Ölçüm

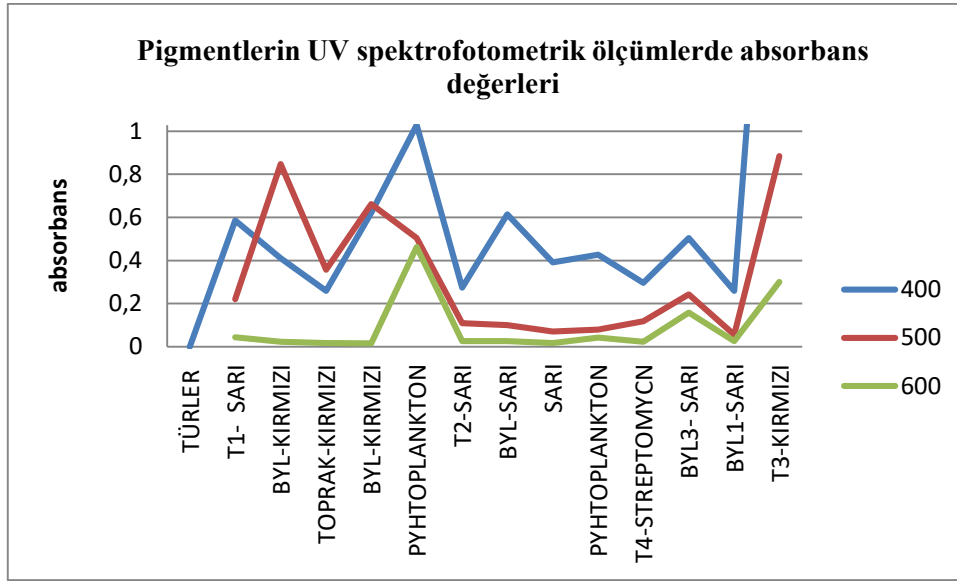
Pigment ekstarksiyonunda çok farklı organik çözümler kullanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda ekstraksiyon için metanol, etanol, etil asetat ve aseton sıklıkla kullanılmıştır. Bu çalışmada pigment ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol kullanılmıştır (Şekil 4.14.) (Shetti, 2017). Ekstrakte edilen pigmentlerin hangi dalga boyunda en iyi absorbans verdiğini tespit etmek için spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. 400-500 ve 600 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonuçları Tablo 4.6, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'de verilmiştir.



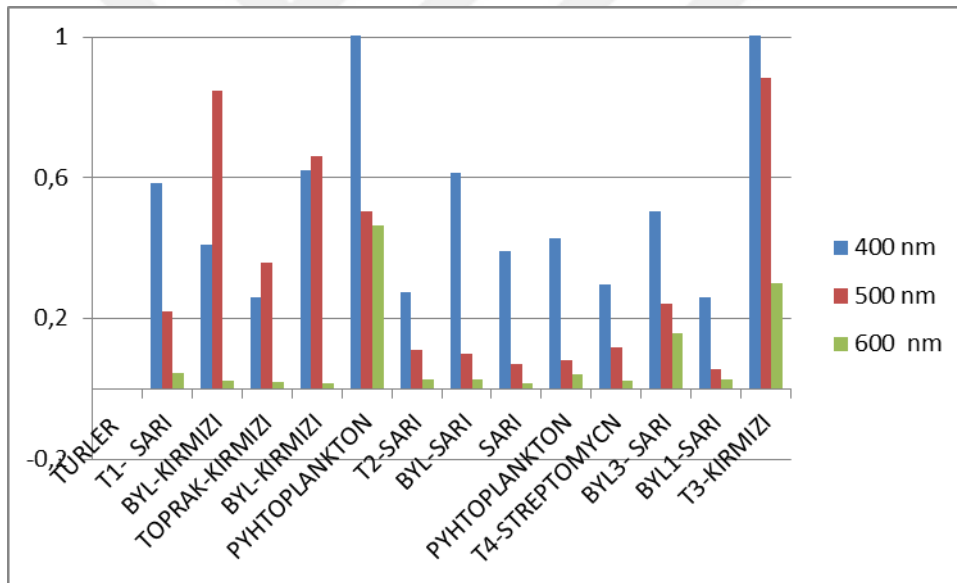
Şekil 4.14. Metanol ile çözülmüş olan pigmentler

Tablo 4.6. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları

		Adsorbans değerleri		
İzolatlar	Temin edilen yer	400 nm	500 nm	600 nm
T1 –SARI	Toprak	0,586	0,221	0,044
BYL- KIRMIZI	Toprak	0,410	0,847	0,023
Phyto	Biy. Lab KK	1,028	0,505	0,413
T2- SARI	Toprak	0,274	0,110	0,027
BYL –SARI	Deniz suyu	0,614	0,101	0,027
LAB – SİYAH	Toprak	0,363	0,068	0,024
BYL3 – SARI	Deniz suyu	0,504	0,243	0,159
BYL -1 SARI	Deniz suyu	0,259	0,056	0,027
T3 – KIRMIZI	Toprak	3,000	0,0884	0,301
ŞELELE PEMPE	Şelale suyu	0,182	0,072	0,052



Şekil 4.15. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları



Şekil 4.16. Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Ekstrakte edilen pigmentlerin konsantre etmek için Rotary evaporatör kullanılmıştır (Şekil 4.17). Konsantre edilmiş pigmentler 1 ml metanol ile tamamen çözündürülmüştür



Şekil 4.17. Rotary evaportörde pigmentlerin kurutulması

4.4. Pigmentlerin Kısmi Karakterizasyonu:

Pigmentlerin karakterizasyon işlemleri için literatürde farklı çalışmalar yapılmıştır. Trivedi vd. (2017), pirinç tarlasından almış oldukları toprak örneklerinden bakteri izolasyonları gerçekleştirmişlerdir. Bakterilerden pigment izolasyonu için üç çözücü kullanmışlardır. Bunlar; metanol, n-hekzan ve etil asetatır. Bu üç çözücü kullanarak bakterilerden pigment izolasyonu yapmışlar ve izole ettikleri pigmentlerin karakterizasyonu için Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) tekniğini kullanmışlardır. Pigment oluşturan bakterilerin 16S rRNA gen dizi analizleri yapılarak bakteri türünün *B. subtilis* olduğu, FTIR analizleri sonucunda elde edilen pigmentin standart olarak kullanılan beta karotene benzerlik gösterdiği ve pigmentin karotenoid türeği olduğu tespit edilmiştir.

Literatür çalışmalarında farklı spektrofotometrik çalışmalarda yapılmıştır. Indra vd. (2014), çalışmalarında 41 toprak örneği üzerinde yüksek karotenoid pigment üreten bakteri türleri araştırmışlardır. Araştırmalar ve bakteri izolasyonu sonucunda sarı renkli pigment oluşturduğu görülen 24 bakteri izolatu elde etmişlerdir. Bu pigmentler metanol ekstraktı kullanılarak spektrofotometrik ölçümler için hazırlanmıştır. Spektrofotometrik analizler sonucunda değerlendirmeler yapılmış ve 450 nm'de oluşan pikler, karotenoid pigmentinin varlığını göstermiştir.

Çalışmada kullanılan pigmentlerin karakterizasyonu işlemleri için İnce Kolon (Tabaka) Kromatografisi (TLC) ve UV Spektrofotometrik Ölçümler (400, 500, 600 nm ölçümler) yapılmış ve

sonuçlar değerlendirilmiştir. TLC kromatografi için Rf değeri hesaplanmış ve pigmentlerin karakterizasyonu hakkında literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

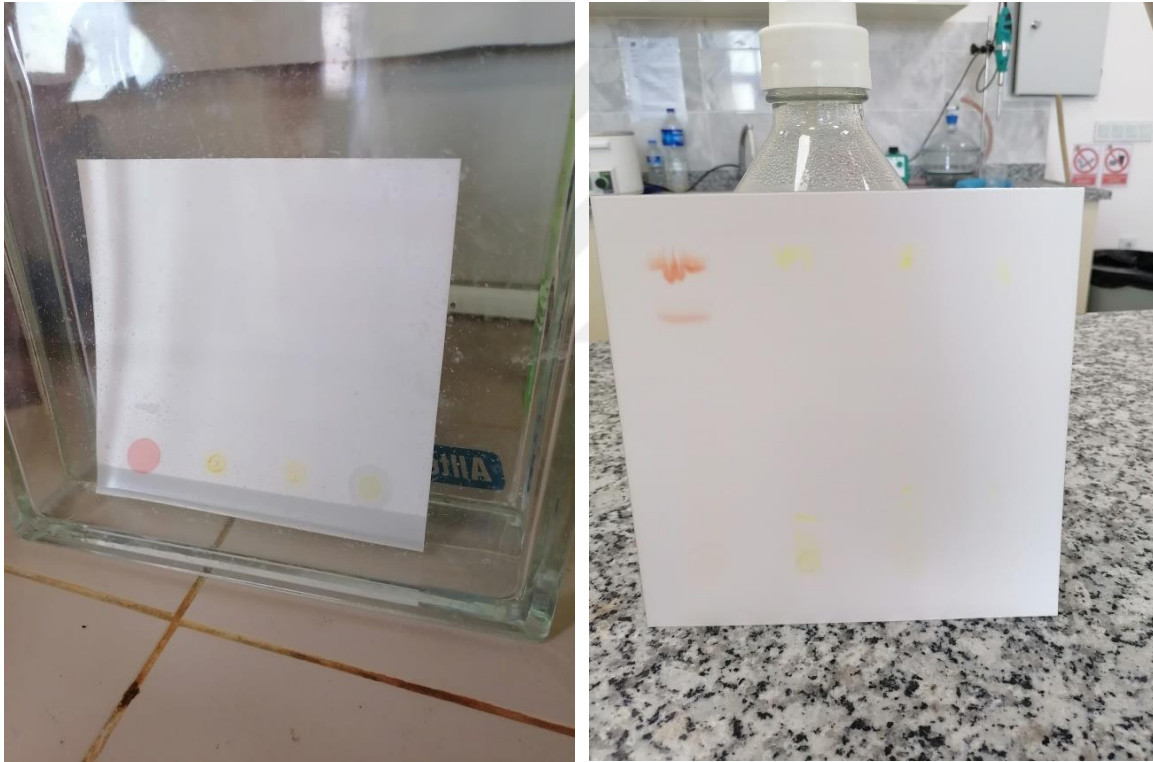
BYL-Kırmızı için Rf değeri

$$R_f = \frac{8}{10} = 0,8 \text{ cm olarak hesaplanmıştır.}$$

BYL-3 Sarı için Rf değeri

$$R_f: \frac{1,5}{10} = 0,15 \text{ cm olarak hesaplanmıştır.}$$

Rf değerleri incelendiğinde sonuçlar; literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılmış BYL- Kırmızı pigmentinin Indra vd. (2014) ve Gupta vd. (2019)'nın yaptığı çalışmalarda prodigiosinin ile, kırmızı pigmentli olduğu varsayılmıştır. BYL-3 Sarı pigmentinin ise Faraag vd. (2017) ve Srimathi vd. (2017) tarafından yapılan çalışmalarda ki beta-karotenler ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. TCL kağıt kromatografisinde pigmentlerin ölçülmesi

4.5. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada üretilmiş olan bakteri pigmentlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için antibakteriyel ve antialgal özellikleri incelenmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde Shetti vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada toprakta pigment üreten bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirip pigment üretimi görülmüş olan bakterilerden ekstraksiyon işlemi yapılarak bakteri pigmentlerinin antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen pigmentin morfolojik ve biyokimyasal

testleri yapılarak bakteri izolatının *Serratia sp.* (*Serratia marcescens* türüne ait gram negatif çubuk şeklinde bakteri) olduğu tanımlanmış ve bu izolatın üretmiş olduğu kırmızı pigmentin *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* standart patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Büyüksirt ve Kuleaşan (2013), çevresel kaynaklardan pigment üreten mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirmiş 16S ve 18S ribozomal DNA dizi analizi yaparak türleri tanımlamışlardır. Tanımlama sonrasında kavuniçi -sarı renkte pigment üreten *Rhodotorula glutinis*, sarı renk üreten *Cellulosimicrobium funkei* (gram pozitif aerobik bakteri) ve turuncu- kırmızı renk üreten türü ise *Dietzia natronolimnaea* olarak tanımlamışlardır. Tanımlanmış olan türlerden üretilen pigmentleri çeşitli çözücüler kullanarak ekstrakte etmişler. Saflaştırılan pigmentlerin bazı özelliklerini belirlemek amacıyla, ışık ve buzdolabı gibi düşük sıcaklık ortamında kararlılık testleri yapılmış ve renk değişimi olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca FT-IR spektroskopisinde spektrum analizleri ile kimyasal yapıları belirlenmiştir. En ideal pH aralığının 5-7 arasında tespit edilen pigmentlerin gıda renklendiricisi olarak dondurma üretiminde renk verme amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

4.5.1. Pigmentlerin Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada ekstrakte edilen 10 farklı pigment antibakteriyel test için kullanılmıştır. BYL-Kır, BYL3-Sarı ve BYL1-Sarı kodlu suşların pigmentlerinin belirgin inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Standart bakteri türleri ile yapılan antibakteriyel test sonuçları Tablo 4.7. ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Kullanılan pigmentler ve antibakteriyel test sonuçları

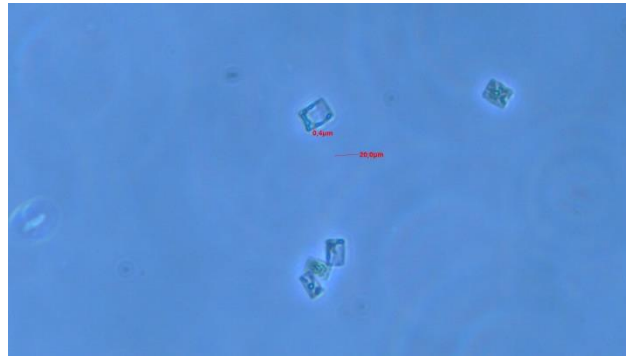
Pigmentler	Standart bakteri türleri					
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i> <i>spizanii</i>	<i>En. faecalis</i>	<i>En. hormaecheni</i>
BYL-Kırm	+	+	+	+	+	+
BYL1-Sarı	+	-	+	+	+	+
BYL-Sarı	+	±	+	+	-	-
BYL3-Sarı	+	-	+	+	+	+
LAB-Siyah	-	-	-	-	-	-
Şelale pembe	-	-	-	-	-	-
T1-Sarı	±	-	+	+	-	-
T2-Sarı	+	-	-	±	-	-
Phyto	±	-	-	-	±	±
T3-Kırmızı	±	-	-	+	-	-



Şekil 4.19. Pigmentlerin antibakteriyel pozitif ve negatif test sonuçları,

4.5.2. Pigmentlerin Algler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Pigmentlerin algler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 2 alg kültürü kullanılmıştır. Bunlar *Grammatophora* cinsi ve *Prymnesium parvum* türüdür. Kültür ortamına pigment eklendikten sonra alg miktarları mikroskopta değerlendirilmiştir. Bir hafta sonrasında kültür içerisindeki algleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Denenen 4 pigmentin alglerin üremesi üzerine olumsuz etki oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. *Grammatophora* alg türünün mikroskop görüntüsü

4.6. Farklı sıcaklık, pH ve Ağır Metaller Etkisinde Pigment Üretimini Belirlenmesi

Sıcaklığın etkisi:

Pigment üretiminde uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi için, farklı sıcaklık 25-30-37 °C'lik aralıklarında üretilen bakteriler inkübasyon sonrasında değerlendirmeler yapılmıştır. BYL-Kırmızı renk pigment üretiminin sırasıyla 25°C, 30°C ve de maksimum olduğunu göstermektedir. BYL3-Sarı, pigment üreten bakterilerin maksimum pigment ürettiği sıcaklık 30 °C' olarak görülmüştür. Yapılan tez çalışmalarında Jinendiran vd., (2019) Tez çalışmaları farklı pH koşulları sıcaklık denemeleri sonuçlarına göre; literatür çalışmalarıyla paralel şekilde pH 8,0 – 8,5 – 9,0 değerleri izolatlar için optimum pH gereksinimleri olarak belirlenmiştir. Sıcaklık koşulları denemeleri sonuçlarına göre; 37 ve 40°C sıcaklıklar izolatlar için optimum sıcaklık olarak seçilmiştir. Bunu yanı sıra, test edilen farklı pH ve sıcaklık değerlerinde, oldukça değişkenlik gösteren mikrobiyal sayım sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlar sınanan koşullardaki mikrobiyal gelişimin, ortam koşullarından fazlasıyla etkilendiğini göstermiştir.

Tablo 4.8. Sıcaklığın pigment üretimi üzerine etkisi

Sıcaklık	Şelale pembe	T3-Kırmızı	BYL Kırmızı	LAB Siyah	Phyto	Deniz Kahverengi	T2-Sarı	BYL Sarı	BYL-3 Sarı
25 °C	+	+	+	+			+	+	+
30 °C	++		+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
37 °C	++	++			++	++		++	

- (+) Mevcut Pigment Üretimi
 (++) İyi Pigment Üretimi
 (+++) Çok İyi Pigment Üretimi
 (-) Pigment Üretimi Yok

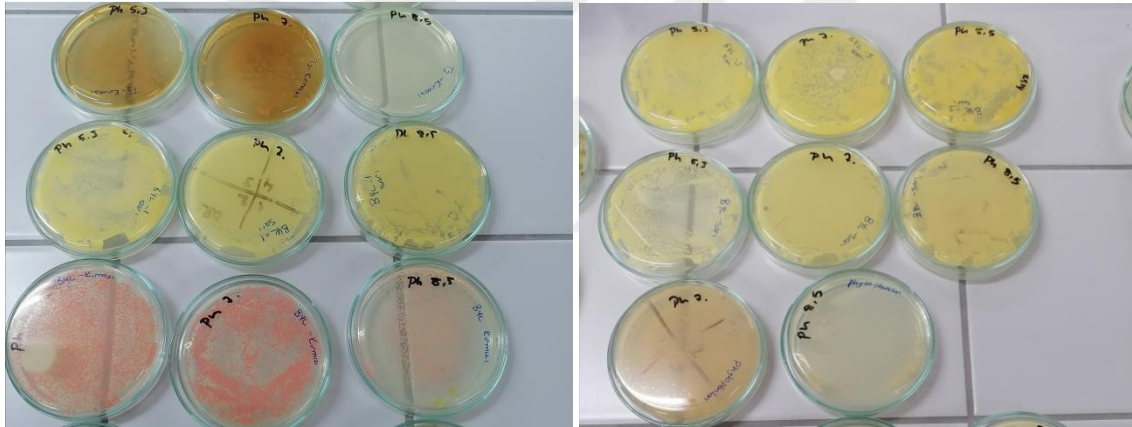
pH'nin etkisi

Farklı pH'larda bakterilerden pigment üretiminin araştırılması için öncelikle asidik (5,3), nötr (7,0) ve bazik (8,3) olmak üzere ayrı ayrı besi yerleri hazırlanmıştır. Maksimum pigment üretimi en fazla BYL-Kırmızı ve BYL-3 Sarı kodlu bakteri pigmentleri için pH 7,0' de olduğu gözlemlenmiştir. BYL-Sarı kodlu bakteri pigment üretimi için maksimum pH'ın 8,5 olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.9. Farklı pH'ın pigment üretimi üzerine etkisi

pH	Şelale pembe	T3-Kırmızı	BYL Kırmızı	LAB Siyah	Phyto	Deniz Kahverengi	T2-Sarı	BYL Sarı	BYL-3 Sarı
5,3	++	+	+++	++	-	++	+	+	+++
7	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++
8,5	+	-	+	+	-	+	++	++	+

(+) Mevcut Pigment Üretimi
 (++) İyi Pigment Üretimi
 (+++) Çok İyi Pigment Üretimi
 (-) Pigment Üretimi Yok

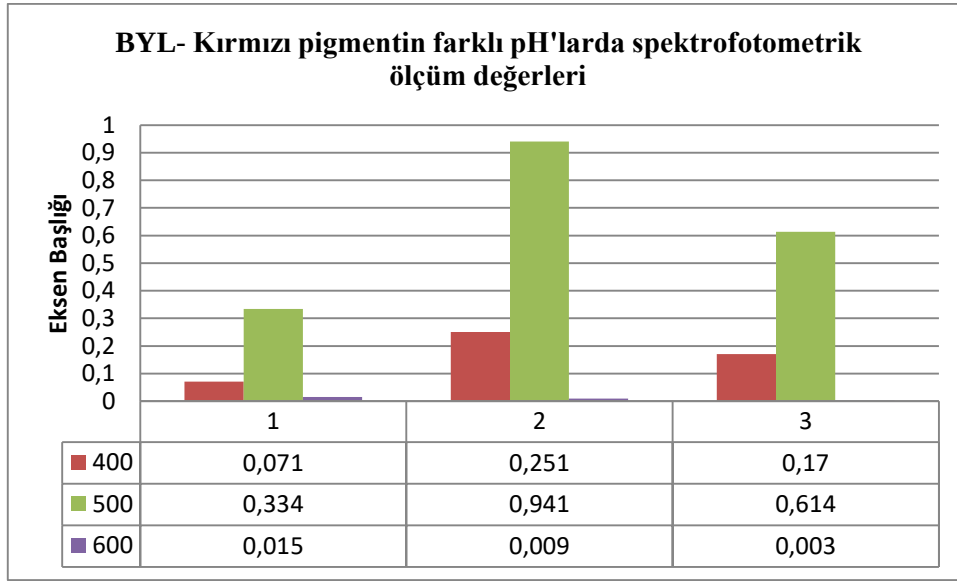


Şekil 4.21. Farklı pH'larda pigment üretimi

Çalışmamızda üretilmiş olan BYL-Kırmızı kodlu pigmentin farklı pH'larda üretilmesi ve UV Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre pH= 7 yani nötr ortamlarda maksimum çoğalma gösterdiği anlaşılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.10. da ve Şekil 4.21. de açıklanmıştır.

Tablo 4.10. BYL-Kırmızı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

pH	400 nm	500 nm	600 nm
5,3	0,071	0,334	0,015
7	0,251	0,941	0,009
8,5	0,17	0,614	0,003



Şekil 4.22. farklı pH'larda maksimum absorbanans değerleri

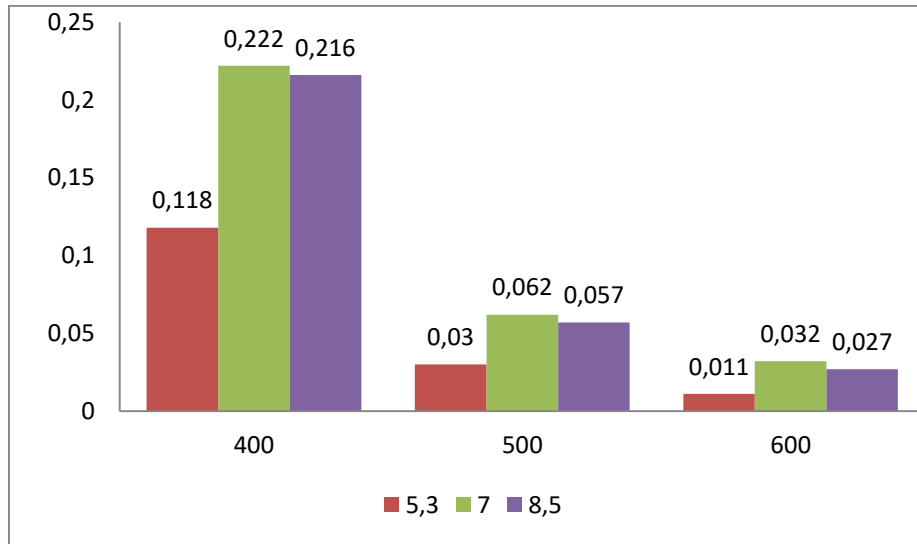
1. aralık 5,3 pH
2. aralık 7 pH
3. aralık 8,5 pH olarak grafikte gösterilmiştir.

Çalışmamızda üretilmiş olan ve tür tanımlaması yapılmış olan BYL-Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda üretilmesi ve UV Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre pH= 7 ve 400 nm absorbansta maksimum çoğalma gösterdiği anlaşılmıştır. Ölçüm sonuçları t

Tablo 4.11. de ve Şekil 4.22 de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. BYL-Sarı kodlu pigmentin farklı pH'larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

pH	400	500	600
5,3	0,118	0,03	0,011
7	0,222	0,062	0,032
8,5	0,216	0,057	0,027

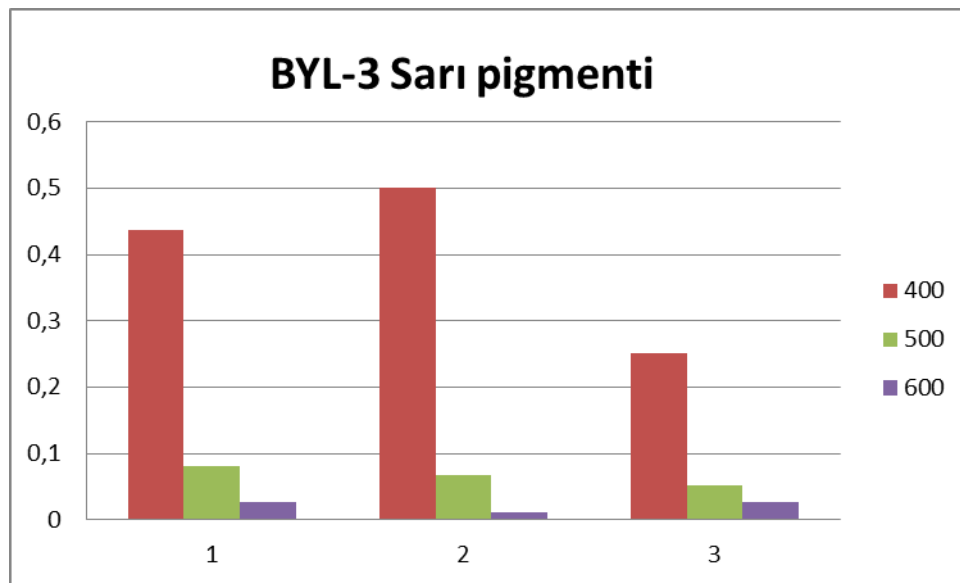


Şekil 4.23. BYL-Sarı kodlu pigmentin farklı pH’larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Çalışmamızda üretilmiş olan ve tür tanımlaması yapılmış olan BYL- 3 Sarı kodlu pigmentin farklı pH’larda üretilmesi ve UV Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre pH= 5,3 ve 400 nm absorbansta maksimum çoğalma gösterdiği anlaşılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 4.12. de ve Şekil 4.23. de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. BYL-3 Sarı kodlu pigmentin farklı pH’larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

pH	400	500	600
5,3	0,437	0,08	0,026
7	0,501	0,067	0,012
8,5	0,251	0,052	0,027



Şekil 4.24. BYL-3 Sarı kodlu pigmentin farklı pH’larda spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Ağır metallerin etkisi

Ağır metallerin etkisini tespit etmek amacıyla besiyerlerine çeşitli konsantrasyonlarda ağır metaller eklenmiş ve suşların MTC değerleri belirlenerek bu konsantrasyonlarda pigment üretimi test edilmiştir. İzolatların MTC değerleri Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.13. İzolatların MTC değerleri

İzolatlar	CuSO ₄	NiCl ₂	CdCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇
BYL-Kırmızı	20 mM	15 mM	9 mM	3 mM
BYL-Sarı	20 mM	10 mM	6 mM	5 mM
BYL3-Sarı	20 mM	10 mM	6 mM	5 mM
Phyto	15 mM	15 mM	6 mM	1 mM

Ağır metal iyonlarının etkisi ile bakterilerde pigment sentezi kaybı gözlenebilir. Ağır metal iyonlarının etkisi altında bakteriyel pigment sentezinin kaybının olması, çevresel ağır metal kirliliğinin izlenmesine kullanılabileceği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Ril ve Gvozdyak, 2007).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sentetik pigmentlerin yaygınlığına rağmen, sağlık sorunlarına neden olması, toksik etkileri ve çevreye çok fazla atık oluşturmalarından kaynaklı doğal pigmentlere olan eğilim artmıştır. Son araştırmalar, biyopigmentlerin üretiminin bu faydalı metabolitleri çıkarmak için ekonomik bir yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur; bununla birlikte, düşük stabilite, sonraki işlem maliyetlerinin yüksek olması, teknolojik başarısızlıklar, düşük verim ve işlem yoluyla toksin üretimi gibi bazı sınırlamalar hala mevcuttur. Bakteriyel pigment üretiminin çoğu hala Ar-Ge aşamasındadır. Bu nedenle, bakteriyel pigmentler üzerindeki çalışmalar, özellikle maliyeti azaltabilecek ve endüstriyel üretim için uygulanabilirliğini artırabilecek ucuz ve uygun büyüme ortamının bulunması konusunda yoğunlaştırılmalıdır. Pigment üreten bakteriler, sucul ortamlardan, toprak, bitki, böcekler ve insan veya hayvan gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilebilir/kültürlenebilir/saflaştırılabilir. Farklı bakteri türlerini izole etmek için çeşitli büyüme ortamları kullanılabilir. Bununla birlikte, sentetik besiyeri kullanmanın yüksek maliyeti nedeniyle, izolasyon işlemi sırasında olduğu kadar pigmentlerin üretimi için de düşük maliyetli yeni yöntemler geliştirmeye ihtiyaç vardır. Örneğin, tarımsal-endüstriyel artıkların kullanımı, substrat maliyetini düşürmenin karlı bir yolunu sağlayacaktır. Bakteriler tarafından üretilen pigment, solvent ekstraksiyonu kullanılarak izole edilebilir. Çeşitli ürünlerin bakteriyel pigmentlerle renklendirilmesi daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir potansiyele sahiptir.

Küresel pazarın artan talebini karşılamak için, daha etkili bir saflaştırma yöntemi elde etmek için iyileştirilmiş mikrobiyal suşların geliştirilmesi ve yetiştirme parametrelerinin optimizasyonu gerekmektedir. Ayrıca, biyopigment üretimini optimize etmek için genetik mühendisliği teknikleri araştırılmalıdır. Ek olarak, yeni çalışmalar, kanser gibi tehlikeli hastalıklara karşı insanların hayatta kalması için yeni yaklaşımların keşfedilmesinde gerçekten yararlı olabilecek biyopigmentlerin farmakolojik yönlerinin etki mekanizmasını açıklamaya odaklanmıştır. Bu şekilde, gelecekteki araştırmalar daha çok mikrobiyal pigmentlerin kimyasal yapısı ve yapıları ile farmakolojik işlev arasındaki ilişkiye yönelik olmalıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bakteriyel izolatlardan elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal özellikleri, antikanser ve antiviral etkileri ile hücrelere toksisitelerine bakılmıştır. Bakteri pigmentler antibakteriyel, antiviral, yara onarımı, yaşlanma karşıtı ve migren tedavisinde kullanılabilecek biyolojik aktivitelere sahip olmalarından kaynaklı ilaç endüstrisinde önemli bir kullanım alanına sahiptirler. Virüslerin enfeksiyonları bütün dünya genelinde sayısız salgın ve hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüzden virüs kaynaklı enfeksiyonel hastalıklar için yapılan birçok çalışma vardır.

Bu çalışmada, çevresel örneklerde pigment üreten bakteri izolasyonu ve bu pigmentlerin karakterizasyonu ile bazı potansiyel uygulama alanları araştırılmıştır. Mersin ili ve Tarsus ilçesinden su ve toprak örneklerinden pigment üreten bakteri izolasyonu yapılmıştır. Toplam 50 pigmentli bakteri arasından seçilen BYL-1, BYL-3, BYL-Kır ve Phyto izolatları pigment üretimi için kullanılmıştır. 16S rRNA analizi ile *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus* ve *Bhargavaea ginsengi* olarak

tanımlanan türlerden pigmentler ekstrakte edilerek antimikrobiyal ve antialgal etkileri belirlenmiştir. Pigment üretimi üzerine sıcaklık, pH ve ağır metallerin etkisi araştırılmıştır. BYL, BYL-3 ve BYL-Kır izolatlarının pigmentlerinde antimikrobiyal etki tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen pigmentin kısmi tanımlanması için UV-Spektrofometri ve TLC yöntemleri kullanılmıştır. Tam tanımlama yapabilmek ve pigmentin yapısını belirlemek için FTIR, HPLC, NMR gibi daha ileri tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışmada pigment üretiminin yaklaşık bir haftalık sürelerde gerçekleşmesi, endüstriyel üretim için pratik bir yaklaşım değildir. Pigment üretim süresinin kısılmasını sağlayacak rekombinant DNA teknolojileri çalışmaları gerekmektedir.



KAYNAKLAR

Ahmad, A. S., Ahmad, W. Y. W. and Zakaria, Z. K. 2012 Applications of bacterial pigments as colorant: The Malaysian perspective, Springer Berlin, Heidelberg.

Aksan, E. (2005). Çeşitli Mayalardan Karotenoidlerin Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.

Ali, S., Al-Dalali, J., Hao, A., Ikram, J., Zhang, D. and Xu, H. (2022). The stabilization of Monascus pigment by formation of Monascus pigment-sodium caseinate complex. Food Chemistry, Vol. 384, pp. 132480.

Anonim, (2011). Gıdalarda Kullanılan Doğal ve Yapay Renk Maddeleri. 22 Kasım 2022 tarihinde <http://www.kimyaevi.org> adresinden erişildi.

Asker, D. (2017). Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 65, No. 41, pp. 9101-9109.

Babitha, S., Joshi, V., Bala, A. and Shashi, B. (2009). Microbial pigments (S.K. Brar, G.S. Dhillon and C.R. Saccal Editors). Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals, Spriger, New York, pp. 147–162.

Beets, G. D. (2006). Other spoilage bacteria (Blackburn C. de W. Editör). Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing Series, UK, p. 668-693.

Büyüksırt, T. ve Kuleaşan, H. (2013). “Farklı Kaynaklardan Doğal Renk Maddesi Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanısı ve Elde Edilen Pigmentlerin Karakterizasyonu.” Gıda Dergisi, Vol. 38, No. 4, pp. 199-206.

Chandika, P., Ko, S. C. and Jung W. K. (2015). “Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration.” International Journal of Biological Macromolecules, Vol 77, pp. 24-35.

Choksi, J., Vora, J. and Shrivastava N. (2020). “Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial, Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products.” Indian Journal of Microbiology, Vol. 60, No. 3, pp. 379-382.

Delgado-Vargas, F. and Paredes-López, O. (2002). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press Boca Raton.

deOndarza, J. (2017). “Ozone sensitivity and catalase activity in pigmented and non-pigmented strains of *Serratia marcescens*.” *The Open Microbiology Journal*, Vol. 11, pp.12–22.

Dwarka, D., Murugan, N., Thaver, V. and Baijnath, H. (2020). “ A comparative microstructural study of the animal pigment, bilirubin, in seed arils of *Strelitzia nicolai*.” *South African Journal of Botany*, Vol. 128, pp.109-118.

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

Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Rimac Brnčić, S., El, S. N., Karakaya, S. and de Pascual-Teresa, S. (2019). “A Review of Factors Affecting Anthocyanin Bioavailability: Possible Implications for the Inter-Individual Variability.” *Foods*, Vol. 9, No. 1, pp. 2. doi:10.3390/foods9010002

Erdal, P. ve Ökmen, G. (2013). “Microbial Pigments Used in Foods.” *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, Vol. 6, No. 2, pp. 56–68.

Faraag, I., El-Batal, A. I. and El-Hendawy. (2017). “Characterization of prodigiosin produced by *Serratia marcescens* strain isolated from irrigation water in Egypt.” *Biology*, 13680603.

Gao, J.M., Yang, S.X. and Qin, J.C. (2013). “Azaphilones: chemistry and biology.” *Chemical Reviews*, Vol. 113, pp. 4755–4811.

Ghosh, S., Sarkar, T., Das, A. and Chakraborty, R. (2021). “Micro and nanoencapsulation of natural colors: A holistic view.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 193, pp. 3787-3811.

Ghosh, S., Sarkar, T., Chakraborty, R., Shariati, M. A. and Gandara, J. DS. (2022). “Nature’s palette: An emerging frontier for coloring dairy products.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 6, pp. 1-45. DOI: [10.1080/10408398.2022.2117785](https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2117785)

Goswami, B. and Bhowal, J. (2014). Identification and Characterization of Extracellular Red Pigment Producing Bacteria Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, Vol. 3, No. 9, pp. 169-176.

Gupta, N., Poddar, K., Sarkar, D., Kumari, N., Padhan, B. and Sarkar, A. (2019). "Fruit waste management by pigment production and utilization of residual as bioadsorbent." *Journal of Environmental Management*, Vol. 244, pp.138–143. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.055>

Gurpreet, K. C. and Balmeet, S. G. (2014). "Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review." *International Journal of Food Properties*, Vol. 14, pp. 503–513.

Horinouchi, S., Ueda, K., Nakayama, J. and Ikeda, T. (2010). "Cell-to-cell communications among microorganisms." *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Vol. 4, pp. 283-337.

Huang, T., Tan, H., Chen, G., Wang, L. and Wu, Z. (2017). "Rising temperature stimulates the biosynthesis of water-soluble fluorescent yellow pigments and gene expression in *Monascus ruber* CGMCC10910." *AMB Express*, Vol. 7, pp. 134.

Hussain, E.A., Sadiq, Z. and Zia-Ul-Haq, M. (2018). *Betalainler: Molecular Aspects*, Springer International Publishing, Switzerland.

Indra Arulselvi, P., Umamaheswari, S., Ranandkumar Sharma, G., Karthik, C. and Jayakrishna, C. (2014). "Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate." *Journal of Food Processing Technology*, Vol. 5, pp.292.

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*, Vol. 9, No, 4, pp. 114-118.

Jinendiran, S., Kumar, B.S.D., Dahms, H.U., Arulanandam, C.D. and Sivakumar, N. (2019). "Optimization of submerged fermentation process for improved production of β -carotene by *Exiguobacterium acetylicum* S0." *Heliyon*, Vol. 5, No. Issue 5, pp. e01730

Joshi, C., Kothari, V. and Patel, P. (2016). "Importance of selecting appropriate wavelength, while quantifying growth and production of quorum sensing regulated pigments in bacteria." *Recent Patents on Biotechnology*, Vol. 10, No. 2, pp. 145-152.

Jurić, S., Jurić, M., Król-Kińska, Z., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M., Dragović-Uzelac, V. and Donsi, F. (2020). "Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods." *Food Reviews International*, Vol. 38, No. 8, pp. 1735-1790.

Kadioğlu, G. B., Koseoglu, M. S., Ozdal, M., Sezen, A., Ozdal, O. G. and Algur, O. F. (2018). "Isolation of cold tolerant and ACC Deaminase producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from High Altitudes." *Romanian Biotechnological Letters*, Vol 23, No. 2, pp. 13479-13486.

Kalhotka, L., Hrdinova, Z., Korinkova, R., Prichastalova, J., Konecna, M., Kubac, L. and Lev, J. (2012). "Test of Phthalocyanines Antimicrobial Activity". *Nanocon*, pp.6-11.

Lagashetti, A.C., Dufossé, L., Singh, S.K. and Singh, P.N. (2019). "Fungal pigments and their prospects in different industries." *Microorganisms*, Vol. 7, No. 12, pp. 604-693.

LibreTexts Biology, https://bio.libretexts.org/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/Microbiology_Labs_I/43%3A_API-20E_multitest_strip [Accessed 10 Apr 2022].

Liu, Q. P., Xie, N. N., He, Y., Wang, L., Shao, Y.C., Zhao, H. Z. and Chen, F. S. (2014). "MpigE, a gene involved in pigment biosynthesis in *Monascus ruber* M7." *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 98, pp. 285–296.

Mikrobiyoloji Orlab, http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA_AF6AA849816B2EF0985DC0C84F0A463 15 Ocak 2022 tarihinde erişildi.

Mostafa, M., and Abbady, M.S. (2014). Secondary Metabolites and Bioactivity of the *Monascus* Pigments Review Article." *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 9, No.1, pp. 1-13.

Órdenes-Aenishanslins, N., Anziani-Ostuni, G., Vargas-Reyes, M., Alarcón, J., Tello, A. and Pérez-Donoso, J.M. (2016). "Pigments from UV resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in dye sensitized solar cells." *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Vol. 162, pp.707–714.
[https:// doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004)

Ozdal, M. and Kurbanoglu, E. B. (2018). "Valorisation of chicken feathers for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* MO-03." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Vol. 16, No. 2, pp.259-263.

Pagano M. C. and Dhar P. P. (2015). Fungal pigments: an overview. (V.K. Gupta, R.L. Mach, and S.Sreenivasaprasad Editors) Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments. 1st ed. Wiley, London.

Qiu, M., Xie, R., Shi, Y., Chen, H., Wen, Y., Gao, Y. and Hu, X. (2010). "Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from Ginkgo biloba L". World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 26, pp. 993–998.

Ramesh, C. H., Vinithkumar, N. V., Kirubakaran, R., Venil, C. K., and Dufossé, L. (2019). "Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications." Microorganisms, Vol. 7, No. 7, pp.186.

Rao, M. P. N., Xiao M. and Li, W. J. (2017). "Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications." Frontiers in Microbiology, Vol. 8, pp.1113.

Ril, O. F. and Gvozdyak, P. Y. (2005). "Influence of the ions of heavy metals on the pigment synthesizing ability of bacteria." Dopovyydyi Natsyional'noyi Akademiyi, Vol. 38, No. 44, pp. 161-164.

Said, F. M. and Hamid, N. F. B. (2018). "Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* FTC 5356 using response surface methodology." IIUM Engineering Journal, Vol. 19, pp.34-47.

Sajjad, W., Din, G., Rafiq, M., Iqbal, A., Khan, S., Zada S, et al. (2020). "Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications." Extremophiles, Vol. 24, pp.447-473.

Samyuktha, S. and Mahajan, S. (2016). "Isolation and identification of pigment producing bacteria and characterization of extracted pigments." International Journal of Applied Research, Vol. 2, No. 7, pp. 657664.

Sasidharan, P., Raja, R., Karthik, C. and Sharma, R. (2013). "Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps." Journal of Biochemistry Toxicology, Vol. 4, No. 4, pp.632-635.

Shahid, M., Shahid-Ul-Islam and Mohammad, F. (2013). "Recent advancements in natural dye applications: A review." Journal of Cleaner Production, Vol. 53, pp. 310–331.

Sharmila, G., Nidhi, B. and Muthukumaran, C. (2013). “Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder.” *Industrial Crops and Products*, Vol. 44, pp.158-164.

Shetti, A. A. (2017). “Antibacterial Potentials of Red Pigment Extracted from Soil Isolate *Serratia* sp.” *IOSR-JBB*, Vol. 3, pp. 49-52.

Shilpa, S., Shwetha, H. J., Raju, M. and Lakshminarayana, R. (2020). Factors affecting bioaccessibility and bio-efficacy of carotenoids (C.M. Galanakis, Editor). *Carotenoids: Properties, Processing and Applications*, Academic Press, United Kingdom.

Sigurdson, G. T., Tang, P., and Giusti, M. M. (2017). “Natural colorants: Food colorants from natural sources.” *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol. 8, pp. 261-280.

Siva, R. (2007). “Status of natural dyes and dye-yielding plants in India.” *International Journal of Current Science*, Vol. 92, No. 7, pp. 916–925.

Soliev, A.B., Hosokawa, K. and Enomoto K.(2011). “Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles.” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 670349.

Srimathi, R., Priya, R., Nirmala, M. and Malarvizhi, A. (2017). “Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by *Serratia marcescens* and its Applications.” *International Journal of Engineering Business Management*, Vol. 2, No. 2, pp. 11-21.

Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. and Vesely, T. (2007). “Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review.” *Veterinarni Medicina*, Vol. 52, No. 12, pp. 527-539.

Trivedi, N., Tandon, S., Dubey, A. (2017). “Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) profiling of red pigment produced by *Bacillus subtilis* PD5.” *African Journal of Biotechnology*, Vol. 16, No. 27, pp. 1507-1512.

Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V. and Sharma, A. K. (2014). “Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives.” *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 52, pp. 4669-4678.

Tunca, M. (2019). Biyoaktif bakteriyel pigmentlerin izolasyonu karakterizasyonu ve alternatif ilaç olarak uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J-C. and Oh, B-T. (2010a). “Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, No. 4, pp. 346–50.

Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C. and Oh, B. T. (2010b). “Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather.” *Carbohydrate Polymers*, Vol. 79, No. 2, pp. 262–268.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A. (2013). “Bacterial pigments and their applications.” *Process Biochemistry*, Vol. 48, No. 7, pp. 1065–1079.

Verma, P., Pandey, P. K., Gupta, A. K., Seong, C. N., Park, S. C., Choe, H. N., Baik, K. S., Patole, M. S. and Shouche, Y. S. (2012). “Reclassification of *Bacillus beijingensis* Qiu et al. 2009 and *Bacillus ginsengi* Qiu et al. 2009 as *Bhargavaea beijingensis* comb. nov. and *Bhargavaea ginsengi* comb. nov. and emended description of the genus *Bhargavaea*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 62, No. 10, pp. 2495-2504.

Vila, E., Hornero-Méndez, D., Azziz, G, Lareo, C. and Saravia, V. (2019). “Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula King George Island, Antarctica.” *Biotechnology Reports*, Vol.20, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00306>

You, W.T., Sun, L.Y., Yang, Z.Y. and Yang, C.Y. (2019). “Automatic advertising image color design incorporating a visual color analyzer.” *Journal of Computer Languages*, Vol. 55, 100910.

