

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN ALKALİFİLİK *BACILLUS* CİNSİ  
İZOLATLARIN TAKSONOMİK SINIFLANDIRMASI VE  
ALKALEN PROTEAZ ÜRETİM KAPASİTELERİ

Nilgün TEKİN

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2013

## ÖZET

Yüksek pH koşullarında gelişim gösteren, ekstremofil olarak tanımlanan alkalifilik bakterilere ait enzimler, yüksek pH değerlerinde stabil olmaları nedeniyle bir çok endüstri dalı tarafından talep görmektedir. Bu enzimlerin başında alkalen proteazlar gelmekte olup, deterjan, medikal, gıda, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Pek çok ülkede endüstriyel enzim üretimi amacıyla yasal iznin alınması ve enzimlerin ticari olarak kullanılabilmesi için, endüstriyel öneme sahip enzim üretimi yapan mikroorganizma türlerinin tam olarak teşhis edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada biyoteknolojik öneme sahip alkalen proteaz üreticisi basillerin belirlenmesi için Türkiye'nin farklı bölgelerinden yüksek alkali koşullarda gelişebilen 56 adet Gram pozitif, endospor oluşturan çubuk şeklinde bakteriler izole edilmiştir. Herbir izolataın alkalen proteaz ürettiği uygun koşulun belirlenmesi için bir çok farklı parametrede enzim aktivitesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen parametrelerin her birinde 7 izolataın standart suşlardan daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatlardan E114 ve C265 kodlu izolataın en yüksek alkalen proteaz üreten (103125 U/ml/g) izolataın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bütün izolataın fenotipik karakterleri belirlenmiş ve 16S rRNA geni dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Yüksek alkalen proteaz üreticisi izolataın olan E114 ve C265, sırasıyla %99.4 dizi benzerliği ile *B. licheniformis* ve %99.8 dizi benzerliği ile *B. mojavensis* olarak tanımlanmıştır. *B. safensis* olarak gruplandırılan izolataın yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolataın olduğu belirlenmiştir. İzolataın genotipik karakterizasyonları birden fazla moleküler teknikle (ITS-PCR, (GTG)<sub>5</sub>-PCR, BOX-PCR, ARDRA ve toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizi) yapılmıştır. Bu farklı tekniklerle alkalifilik izolataın arasındaki farklılıklar ortaya koyulurken elde edilen sonuçların 16S rRNA geninin filogenetik analizi ile uyumluluğu da gösterilmiştir. Sonuç olarak biyoteknolojik öneme sahip alkalen proteaz üreticisi izolataın daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenirken, her bir izolat polifazik bir yaklaşımla çoklu-genotipik analizler ile taksonomik pozisyonlarına göre gruplandırılmıştır.

**2013, 159 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Alkalifilik *Bacillus*, alkalen proteaz, 16S rRNA gen dizisi, toplam hücre protein profili, SDS-PAGE, rep-PCR, Box-PCR, ITS-PCR, ARDRA

## ABSTRACT

Alkaliphilic bacteria, which are also called as extremophile, can grow at high pH conditions. The enzymes of these alkaliphilic bacteria have a high demand for (hayatım bu daha dogru gibi geldi ama emin olamadım) many industrial branches due to their stability at high pH values. Of these enzymes, alkaline proteases take the lead and have been used in many areas such as detergent, medicine, food, leather, pharmaceuticals, biological waste elimination and textile industry. In many countries, obtaining legal permission is necessary in order to produce industrial enzymes and the types of microorganisms that produce enzymes with industrial importance should be fully identified to use enzymes commercially. In this study, 56 gram positive, endospore forming, rod shaped bacteria, capable of growing under highly alkaline conditions were isolated from different regions of Turkey in order to isolate biotechnologically important alkaline protease producing bacilli. Alkaline protease activity experiments were carried out at different parameters to determine the suitable alkaline protease production condition of the each isolates. Seven of the isolates showed higher enzyme activity than the standard strains at each parameter of which E114 and C265 isolates were found to be the highest alkaline protease producers (103125 U/ml/g). All these isolates were examined by means of their phenotypic characters and 16S rRNA sequences. The highest alkaline protease producing isolates, E114 and C265, were identified as *B. licheniformis* with 99.4% and *B. mojavensis* with 99.8% sequence similarities, respectively. The isolates identified as *B.safensis* determined as high capacity alkaline protease producer. Genotypic characterizations of the isolates were also determined by using a wide range of molecular techniques (ARDRA, ITS-PCR, (GTG)<sub>5</sub>-PCR, BOX-PCR and SDS-PAGE of whole cell proteins). These different techniques allowed us to differentiate the alkaliphilic isolates and the results were in concurrence with phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene. In conclusion, biotechnologically valuable alkaline protease producing isolates were introduced in order to use in further studies and each of the isolated strains grouped into their taxonomic position by using polyphasic approach with multi-genotypic analyses.

**2013, 159 Pages**

**Key Words:** Alkaliphilic *Bacillus*, alkaline protease, 16S rRNA gene sequence, total cell protein profile, SDS-PAGE, rep-PCR, Box-PCR, ITS-PCR, ARDRA

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora öğrenim sürem boyunca çalışmalarımın her aşamasında teşvik ve yönlendirmelerini esirgemeyen, her konuda büyük bir anlayışla bana destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e;

2007 yılından bu yana gerek bilimsel gerek sosyal ortamlarda, beni danışmanlığını yürüttüğü öğrencilerinden ayırmadan, maddi manevi her konuda her zaman destekleyen, bana sunduğu fırsatlarla bilimsel alt yapımın ve özgüvenimin artmasını sağlayan kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Her altı ayda bir yapılan değerlendirmelerle çalışmanın şekillenmesinde desteklerini gördüğüm Tez İzleme Komitesi'nin değerli üyeleri Sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI ile Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a

Yüksek lisansa başladığım dönemden bu yana özellikle mikrobiyoloji alanında edindiği bilgi birikimi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve öğreten sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a,

Her türlü konuda akıl danıştığım, dostluğunu ve sevgisini benden esirgemeyen, tezin düzeltilmesi aşamasında da çok büyük destek olan sevgili ablam Dr. Yeşim DOĞAN'a,

Laboratuvarda her zaman arkadaşlıklarını, yardım ve desteklerini yanımda hissettiğim büyük bir zevkle çalıştığım arkadaşlarım Pınar ÖZATEŞ'e, Sennur ÇALIŞKAN'a ve MELİH KOÇ'a, çalıştığım her anın eğlenceli hale dönüşmesini sağlayan, sevgi ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan çok değerli sevgili ekip arkadaşlarıma, GENOMBİLİM BİRİMİ'nin her bir üyesine,

Acı tatlı her olayda her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Günseli ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ'e, Yrd. Doç. Dr. Serkan DURDU'ya, Yrd. Doç. Dr. Özge ÖZMEN'e, Devrim AYDIN'a, Zeynep ÖZKESERLİ'ye, Kübra YILDIRIM KASAROĞLU'na ve sevgili dostum Zümrüt YILMAZ EJDER'e

Tezimi proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje no: 11B4240003), en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her insanın ailesi çok değerlidir. Ama benim ailem benim için 'herşey'dir. Her zaman bana olan güvenleri, inançları ve sevgileriyle beni destekleyen, her konuda hatta laboratuvarda dahi benden yardımlarını esirgemeyen mükemmel aileme, güzel annem Sema TEKİN'e, süper babam Bülent TEKİN'e, birtanecik canım kardeşim Recep TEKİN'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

**Nilgün TEKİN**

**ANKARA, 2013**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Proteazlar .....	3
2.2. Bakteriyal alkalen proteazlar .....	4
2.3. Amilazlar .....	5
2.4. Alkalem $\alpha$ -amilazlar .....	6
2.5. Türkiye’de Endüstriyel Biyoteknoloji: Enzim Pazarı.....	7
2.6. Alkalifilik <i>Bacillus</i> Türleri.....	9
2.7. Bakteriyel Taksonomi .....	12
2.7.1. Klasik taksonomi .....	13
2.7.1.1. Mikroskopik morfoloji .....	14
2.7.1.2. Makroskopik morfoloji .....	15
2.7.1.3. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikler .....	15
2.7.2. Kemotaksonomi .....	16
2.7.2.1. Yağ asiti tiplerinin ve oranlarının karakterizasyonu (FAME) .....	17
2.7.2.2. Toplam hücre protein profillerinin SDS-PAGE ile analizleri .....	18
2.7.3. Moleküler taksonomi.....	19
2.7.3.1. 16S rRNA geni dizi analizi.....	20
2.7.3.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) Bölgeleri.....	21
2.7.3.3. Çok lokuslu dizi tiplendirmesi/analizi (MLST/MLSA).....	22
2.7.3.4. DNA baz kompozisyonu; %G+C içeriği.....	23
2.7.3.5. DNA:DNA hibridizasyonu .....	23
2.7.3.6. Tüm genom dizi analizleri .....	24

2.7.3.7. Nükleik asit parmakizi teknikleri .....	25
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materyal .....	28
3.1.1. Standart <i>Bacillus</i> Suşları .....	28
3.1.2. Alkalifilik <i>Bacillus</i> İzolatları .....	28
3.1.3. Besiyerleri.....	28
3.1.4. Tampon ve Çözeltiler .....	30
3.1.4.1. Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	30
3.1.4.2. $\alpha$ -amilaz aktivitesi deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	30
3.1.4.3. Agaroz jel elektroforezi.....	31
3.1.4.4. Gitsher Tamponu (5X).....	31
3.1.4.5. SDS-PAGE'de kullanılan jeller, tamponlar ve çözeltiler .....	32
3.1.5. Cihaz ve teçhizatlar .....	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi.	34
3.2.2. Kalitatif olarak alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi .....	34
3.2.3. Kantitatif olarak alkalen proteaz aktivitesinin ölçülmesi.....	34
3.2.3.1. Hücre dışı alkalen proteaz üretimi .....	36
3.2.3.2. Alkalen proteaz aktivite deneyi.....	37
3.2.3.3. Tirozin konsantrasyon eğrisi .....	37
3.2.4. Kantitatif olarak alkalen $\alpha$ -amilaz aktivitesinin ölçülmesi.....	38
3.2.4.1. Hücre dışı $\alpha$ -amilaz üretimi.....	38
3.2.4.2. $\alpha$ -Amilaz aktivite deneyi .....	39
3.2.4.3. Maltozun ekstinksiyon katsayısının hesaplanması.....	39
3.2.5. İzolatlara ait bazı fenotipik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler .....	40
3.2.5.1. Gram boyama ve faz kontrast mikroskopik inceleme .....	40
3.2.5.2. Koloni morfolojisi.....	41
3.2.5.3. Amilaz ve katalaz aktivitesi .....	41

3.2.5.4. pH optimumu, sıcaklık optimumu ve tuz toleransının belirlenmesi....	41
3.2.6. Bazı moleküler taksonomi teknikleriyle sınıflandırma.....	42
3.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	42
3.2.6.2. 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması.....	43
3.2.6.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması .....	45
3.2.6.4. 16S rRNA geni dizi analizi.....	45
3.2.6.5. 16S rRNA geninin dizilenmesiyle gerçekleştirilen filogenetik analizler .....	48
3.2.6.6. İntergenik 16S-23S rRNA geninin PCR reaksiyonu (ITS-PCR) ile sınıflandırma .....	48
3.2.6.7. Tekrar eden (GTG) <sub>5</sub> ve BOX elementlerinin PCR ile çoğaltılması .....	50
3.2.6.8. ARDRA Analizi (Ribotiplendirme).....	52
3.2.6.9. Toplam hücre protein profilinin SDS-PAGE ile belirlenmesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	54
4.1. Bakteri İzolatları ve Standart <i>Bacillus</i> Suşları .....	54
4.1.1. Standart <i>Bacillus</i> Suşları .....	54
4.1.2. Alkalifilik <i>Bacillus</i> izolatları.....	55
4.2. Alkalen Proteaz Aktivitesi .....	58
4.2.1. Bakteri izolatlarının kalitatif alkalen proteaz aktivitesi .....	58
4.2.2. Bakteri izolatlarının kantitatif alkalen proteaz aktivitesi.....	62
4.2.2.1. Tirozin ekstinksiyon katsayısı .....	62
4.2.2.2. Bakteri izolatlarının alkalen proteaz üretim değerleri .....	63
4.3. Alkalen $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi.....	86
4.3.1. Maltozun Ekstinksiyon Katsayısı.....	86
4.3.2. Bakteri İzolatlarının $\alpha$ -Amilaz Üretim Değerleri.....	86
4.4. İzolatlara ait bazı fenotipik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler	90
4.5. Bazı moleküler taksonomi teknikleriyle sınıflandırma.....	94
4.5.1. Genomik DNA izolasyonu.....	94
4.5.2. 16S rRNA geninin PCR ve PCR purifikasyon sonuçları .....	95

4.5.3. 16S rRNA gen dizi analizleri temel alınarak yapılan filogenetik analizler	97
4.5.4. ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG) <sub>5</sub> -PCR ile elde edilen DNA bant profillerinin değerlendirilmesi .....	109
4.5.3.1. İntergenik 16S-23S rRNA genlerinin ITS-PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri .....	113
4.5.4.2. BOX elementinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri.....	118
4.5.4.3. (GTG) <sub>5</sub> elementinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri.....	123
4.5.5. ARDRA Analizi (Ribotiplendirme) Sonuçları .....	128
4.5.5.1. <i>AluI</i> Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme.....	134
4.5.5.2. <i>Taq I</i> Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme.....	137
4.5.5.3. <i>HaeIII</i> Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme.....	140
4.5.6. Toplam hücre protein profillerini gösteren SDS-PAGE analizi sonuçları .....	142
5. SONUÇ.....	147
KAYNAKLAR.....	150
ÖZGEÇMİŞ.....	158



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri ve oluşturdukları ürünler.....	6
Şekil 2.2.	Sitoplazmik pH regülasyonunun şematik ifadesi.....	10
Şekil 2.3.	Klasik taksonomide incelenen özellikler.....	14
Şekil 2.4.	Kemotaksonomik parmakizi teknikleri.....	16
Şekil 2.5.	Moleküler taksonomide uygulanan teknikler.....	19
Şekil 2.6.	Prokaryotlardaki 30S ribozomal RNA ve alt birimleri.....	22
Şekil 3.1.	Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerin akış şeması.....	27
Şekil 3.2.	Nişastalı besiyerinde farklı sürelerle üretilen alkalen proteazın farklı pH değerlerinde ölçüm yolu.....	35
Şekil 3.3.	Kazeinli besiyerinde farklı sürelerle üretilen alkalen proteazın farklı pH değerlerinde ölçüm yolu.....	36
Şekil 3.4.	DNA dizi analizinde kullanılan primerlerin 16S rRNA geni üzerindeki lokasyonları.....	46
Şekil 4.1.	APT30, APT2 ve APT37 kodlu izolatların Skim Milk Agar'da (pH 7.0, 9.0 ve pH 10.0) oluşturduğu proteolitik zonlar.....	58
Şekil 4.2.	Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.3.	pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	70
Şekil 4.4.	pH 9,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	71
Şekil 4.5.	pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	72
Şekil 4.6.	pH 9,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	73
Şekil 4.7.	pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	74
Şekil 4.8.	pH 9,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	75
Şekil 4.9.	pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	76
Şekil 4.10.	pH 9,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	77
Şekil 4.11.	pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	78
Şekil 4.12.	pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	79
Şekil 4.13.	pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	80

Şekil 4.14. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	81
Şekil 4.15. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	82
Şekil 4.16. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	83
Şekil 4.17. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	84
Şekil 4.18. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri.....	85
Şekil 4.19. Maltoz konsantrasyon eğrisi.....	86
Şekil 4.20. Genomik DNA'lara ait agaroz jel görüntüsü.....	95
Şekil 4.21. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	96
Şekil 4.22. Purifiye edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	96
Şekil 4.23. 907R primeri ile APT5 izolatının 16S rDNA'sına ait elektroferogram görüntüsü.....	97
Şekil 4.24. İzolatların 16S rRNA gen dizileri temel alınarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç.....	102
Şekil 4.25. ITS, BOX ve (GTG) <sub>5</sub> -PCR bant profillerinin biraraya getirilmesiyle oluşturulan kümeleme analizi.....	112
Şekil 4.26. ITS-PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi.....	117
Şekil 4.27. BOX-PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi.....	122
Şekil 4.28. (GTG) <sub>5</sub> -PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi...	127
Şekil 4.29. ARDRA bant profillerinin biraraya getirilmesiyle oluşturulan kümeleme analizi.....	133
Şekil 4.30. AluI ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi.....	136
Şekil 4.31. TaqI ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi.....	139
Şekil 4.32. HaeIII ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi.....	141
Şekil 4.33. 18 saatlik toplam hücre protein profilleri.....	145
Şekil 4.34. <i>B.safensis</i> grubuna dahil 7 izolatın 72 saatlik proteinlerinin, proteazlar tarafından degrade edilmiş SDS-PAGE profilleri.....	146
Şekil 4.35. <i>Exiguobacterium</i> cinsine dahil izolatların 72 saatlik protein profilleri.....	146

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Alkalifilik <i>Bacillus</i> türleri.....	10
Çizelge 3.1. Enzim aktivitesi deneylerinde kullanılan seçici besiyerleri ve içerikleri.....	29
Çizelge 3.2. Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	30
Çizelge 3.3. Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	30
Çizelge 3.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan jeller ve tamponun hazırlanışı.....	31
Çizelge 3.5. Agaroz jel hazırlanışı ve tampon çözeltisi.....	32
Çizelge 3.6. Tez kapsamında kullanılan cihaz/teçhizatlar ve kullanım amaçları.....	33
Çizelge 3.7. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü.....	44
Çizelge 3.8. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan termal döngü koşulları.....	44
Çizelge 3.9. 16S rRNA geni dizi analizinde kullanılan primerler ve dizileri.....	46
Çizelge 3.10. Sekans reaksiyonu için uygulanan PCR protokolü.....	47
Çizelge 3.11. Sekans reaksiyonu için uygulanan termal döngü koşulları.....	47
Çizelge 3.12. ITS-PCR için uygulanan protokol.....	49
Çizelge 3.13. ITS-PCR için uygulanan termal döngü koşulları.....	49
Çizelge 3.14. Tekrar elementleri için uygulanan PCR protokolü.....	50
Çizelge 3.15. (GTG) <sub>5</sub> -PCR için uygulanan termal döngü koşulları.....	51
Çizelge 3.16. BOX-PCR için uygulanan termal döngü koşulları.....	51
Çizelge 3.17. Restriksiyon enzimleriyle kesim protokolü.....	53
Çizelge 3.18. Restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirilen kesim koşulları.....	53
Çizelge 4.1. Tez kapsamında kullanılan standart suşlar.....	54
Çizelge 4.2. Tez kapsamında izole edilen alkalifilik bakteri izolatları.....	56
Çizelge 4.3. Kültür stoklarından temin edilen izolatlar.....	57
Çizelge 4.4. Skim Milk Agar'da 72 saat inkübasyon sonrasında ölçülen proteolitik zon çapları.....	60
Çizelge 4.5. Yüksek enzim üreticisi izolatların ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarları; kazeinli ve nişastalı sıvı besiyerinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile ölçülen spesifik aktivite değerleri .....	64
Çizelge 4.6. Yüksek enzim üreticisi izolatların ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarları; kazeinli ve nişastalı sıvı besiyerinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası <u>pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile</u> ölçülen spesifik aktivite değerleri.....	65
Çizelge 4.7. İzolat ve standart suşların alkalen proteaz aktiviteleri.....	67

<b>Çizelge 4.8.</b> Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolat ve referans suşların pH 7.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde gelişim sonrası kantitatif olarak elde edilen alkalen $\alpha$ -amilaz üretimleri.....	89
<b>Çizelge 4.9.</b> Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolat ve referans suşların pH 9.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde gelişim sonrası kantitatif olarak elde edilen alkalen $\alpha$ -amilaz üretimleri.....	89
<b>Çizelge 4.10.</b> İzolatların Gram boyama, faz kontrast mikroskopik inceleme, koloni morfolojisi, amilaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi sonuçları.....	91
<b>Çizelge 4.11.</b> İzolatların gelişim gösterdikleri pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu değerleri.....	93
<b>Çizelge 4.12.</b> Bazı DNA örneklerinin Nanodrop cihazında ölçülen nitel özellikleri.....	94
<b>Çizelge 4.13.</b> 16S rRNA genlerine göre oluşturulan filogenetik gruplar; bu gruplara dahil olan izolatların en çok benzerlik gösterdikleri tip suşla benzerlik oranları.....	103
<b>Çizelge 4.14.</b> İzolatlara ait GenBank numaraları.....	105
<b>Çizelge 4.15.</b> İzolatların taksonomik grupları ve yüksek alkalen proteaz aktivitesi gösterdikleri koşullar.....	108
<b>Çizelge 4.16.</b> 16S rRNA geni, ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG) <sub>5</sub> -PCR ile elde edilen gruplar.....	110
<b>Çizelge 4.17.</b> 16S rRNA geni dizi analizi, ITS-PCR, BOX-PCR ve GTG-PCR ile oluşan gruplar.....	111
<b>Çizelge 4.18.</b> 16S rRNA geni dizi analizi ve ARDRA analizleri ile elde edilen gruplar....	128
<b>Çizelge 4.19.</b> 16S rRNA geni dizi analizi ve ARDRA analizleri ile oluşan gruplar.....	132

## SİMGELER DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
APS	Amonyum Persülfat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
bç	Baz çifti
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfat
$\epsilon$	Ekstinksiyon katsayısı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
F Primer	Forward Primer
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
kDa	Kilodalton
L	Litre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Sodyum klorür
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R Primer	Revers Primer
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodezil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
TBE	Tris-HCl, Borik asit, EDTA
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
V	Volt
%	Yüzde

## 1. GİRİŞ

Hidrolytik enzimlerin geniş bir grubunu oluşturan proteazlar proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizler. Proteazlar tüm organizmalarda hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan enzimlerdir. Hücrenel metabolizmada önemli rol oynamalarının yanı sıra endüstriyel alanda da büyük öneme sahiptirler. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlikleri ve genetik manipülasyonlara imkan vermeleri nedeniyle önemli proteaz kaynaklarıdır (Rao *et al.* 1998). Bu çerçevede endüstriyel enzim üretimi *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar ile oldukça kısa zamanda ve düşük maliyetli karbon ve azot kaynakları ile gerçekleştirilebildiğinden, *Bacillus* cinsine ait bakteriler enzim üreticisi bakterilerin başında gelmektedir. Alkalifilik *Bacillus* türleri, yüksek pH koşullarında gelişim göstermeleri nedeniyle ekstremofil olarak adlandırılan alkalifilik mikroorganizmalar grubuna dahildir. Bu türler, yüksek pH ve/veya yüksek sıcaklık koşullarına dirençli olan enzimleri üretebilmeleri sebebiyle endüstriyel biyoteknolojide en çok ilgi duyulan bakteri türlerindedir. Alkalifilik *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen alkalin proteazlar, 1914 yılından bu yana deterjan formülasyonlarına ilave edilerek deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kalizs 1988). Alkalin proteaz uygulamaları, deterjan endüstrisinin yanı sıra son yıllarda medikal, gıda, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisinde protein bazlı boyaların uzaklaştırılması gibi alanlarda da çok hızlı bir şekilde artmıştır. Ancak endüstriyel enzim ticaretinde büyük bir yer kaplayan alkalin proteazları ne yazık ki Türkiye’de biyoteknolojik olarak üreten çok az sayıda kuruluşun olması nedeniyle, ülkemiz bu enzimlerin ithalatı için her yıl milyarlarca dolar ayırmaktadır.

Pek çok ülkede endüstriyel enzim üretimi amacıyla yasal olarak izin alabilmek ve enzimlerin ticari olarak kullanılabilmesi için, endüstriyel öneme sahip enzim üretimi yapan mikroorganizma türlerinin tam olarak teşhis edilmesi gerekmektedir (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto 2002). Bakteriyel taksonomi, bakterilerin tanımlanması, sınıflandırılması ve adlandırılması basamaklarını kapsayan bir bilim dalıdır. Bakteriyel sistematik konusunda uzman mikrobiyologlardan oluşan “ad hoc committee” topluluğu (Wayne *et al.* 1987), bir bakteri türünün sistematik çalışmalarla sınıflandırılabilmesi ve bir türün kesin olarak tanımlanabilmesi için fenotipik testler, 16S rRNA gen dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyon analizi, genomik DNA’nın G+C oranı ve yağ asiti analizlerinin mutlaka

gerçekleştirilmesi gerektiğini bildirmiştir (Stackebrandt *et al.* 2002). Ancak 16S rRNA geni evrim sürecinde çok korunmuş bir gen bölgesi olması nedeniyle % 97'nin üzerinde dizi benzerliği görüldüğü durumlarda bakterileri sadece cins düzeyinde sınıflandırmaya olanak sağlamaktadır. Bu durumda “ad hoc committee” üyeleri (Wayne *et al.* 1987) bir bakteri türünün kesin olarak tanımlanması için, 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda ortaya çıkan en yakın akraba tip türlerle DNA:DNA hibridizasyonunun yapılmasını şart koşturmaktadır. Ancak, DNA:DNA hibridizasyon testinin optimizasyonu ve uygulanması oldukça güç olup maliyet açısından da pahalı bir tekniktir. Bakteriyel taksonomide yaşanan bu sıkıntılar mikrobiyologları, yeni teknolojilerin bilim dünyasına kazandırdığı daha ileri teknikleri uygulamaya yönlendirmiştir. Önerilen her yeni teknik ve şu an rutin olarak uygulanan tekniklerin kıyaslanmasının yapıldığı her bir çalışmayla bakteriyel taksonomideki sıkıntıların giderilmesine katkı sağlanmış olacaktır.

Bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan su kaynaklarından toplanan su, toprak ve çamur örneklerinden alkalen proteaz aktivitesine sahip alkalifilik bakteriler izole edilmiştir. İzolatlar alkalen proteaz üretim kapasiteleri bakımından standart *Bacillus* türleri ile kıyaslanmış ve yüksek enzim üreticisi izolatlar belirlenmiştir. Aynı zamanda her bir izolatın alkalen proteaz üretimi için en uygun koşulun belirlenmesi için, iki farklı pH'daki iki farklı besiyerinde 48 ve 72 saat gelişimin ardından iki farklı pH'da tampon kullanılarak aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında, alkalen proteaz üretim kapasiteleri ve üretim koşulları belirlenen izolatlar 16S rRNA geni dizi analizi, ITS PCR ve bazı nükleik asit parmak izi tekniklerini kapsayan moleküler taksonomik yöntemlerle gruplandırılmıştır. İzolatların ve standart suşların birden fazla taksonomik teknikle sınıflandırılmasından elde edilen veriler kıyaslanarak, uygulanan tekniklerin alkalifilik *Bacillus* türlerinin tanımlanmasındaki etkinlikleri ortaya konmuştur. Türkiye'den izole edilen alkalifilik bakteriler ve alkalen proteaz üretim kapasiteleri ile ilgili sınırlı sayıda literatür mevcuttur. Tez kapsamında araştırılan çok sayıda *Bacillus* izolatından elde edilen taksonomik verilerle hem ülkemizdeki mevcut alkalifilik türlere ait taksonomik çalışmalara katkı sağlanmış hem de ülkemize özgü alkalen proteaz üreticisi bakteriler belirlenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Proteazlar

Proteazlar bütün canlılarda bulunan ve proteinlerdeki peptid bağlarının koparılmasını katalizleyen enzim grubudur. Bu enzimler tüm organizmalarda hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için önemli role sahiptir. Mikrobiyal proteazlar dünya piyasasındaki enzim satışlarının yaklaşık olarak %60'ını kapsamaktadır. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknolojik metotlarla elde edilmesini sağlayan özellikleri, biyokimyasal çeşitlikleri ve genetik manipülasyonlara imkan vermeleri nedeniyle bitkisel ve hayvansal proteazlara karşı tercih edilmekte, bitkisel ve hayvansal proteazların elde edilmesindeki kısıtlamalar nedeniyle mikrobiyal proteazlara karşı ilgi tüm dünyada artmaktadır (Rao *et al.* 1998).

Proteazlar, substrat üzerinde etki gösterme mekanizmalarına göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucu tarafındaki peptid bağı parçalarken endopeptidazlar substratın terminal ucunun uzağındaki peptid bağlarını parçalamaktadır.

Aktif bölgelerindeki fonksiyonel gruba göre proteazlar dört ara grupta sınıflandırılırlar;

- serin proteazlar
- aspartik proteazlar
- sistein proteazlar
- metalloproteazlar

Serin proteazlar genellikle pH 7.0 ve pH 11.0 aralığında nötral ve alkali pH'larda aktiftirler. Yüksek alkali pH koşullarında aktif olan serin alkalen proteazlar ve subtilisinler serin proteazların iki büyük önemli grubunu oluşturmaktadır.



Aspartik asit proteazları asidik proteazlar olarak tanımlanırlar ve katalitik aktivitelerini aspartik asit kökleri üzerine etki ederek gösteren endopeptidazlardır.

Sistein proteazlar hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. Yaklaşık 20 familyası belirlenmiştir. Bütün sistein proteazların katalitik aktivitesi sistein ve histidin amino asitlerini içeren katalitik diyadlar üzerinedir. Genellikle nötral pH'da optimum aktivite gösterirlerken lizozomal proteazlar gibi çok az bir kısmı asidik pH değerlerinde aktiftirler.

Metalloproteazlar aktivite göstermek için divalent metal iyonlarına ihtiyaç duymalarıyla karakterize edilirler. Metalloproteazlar yüksek organizmalarda kollogenaz, yılan zehirindeki hemorhagic toksin ve bakterilerde termolizin gibi canlılar arasında geniş yayılım göstermektedir. Yaklaşık 30 familyası belirlenmiştir. Metallaoproteazların tümü EDTA gibi çelat ajanları tarafından inhibe olur.

Özet olarak proteazlar protein substratları üzerine etki mekanizmalarına göre endo ve ekzoproteazlar olmak üzere iki geniş sınıf oluştururlar. Endoproteazlar serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere kategorize edilirler. Bunlar da amino asit sekanslarına ve evrimsel ilişkilerine göre farklı familya ve klanlara sınıflandırılırlar. Optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerine göre nötral, asidik ve alkalin proteazlar olmak üzere ayrılırlar. Proteazlar içerisinde alkali koşullarda en iyi aktivite gösteren enzim sınıfı serin proteazlardır.

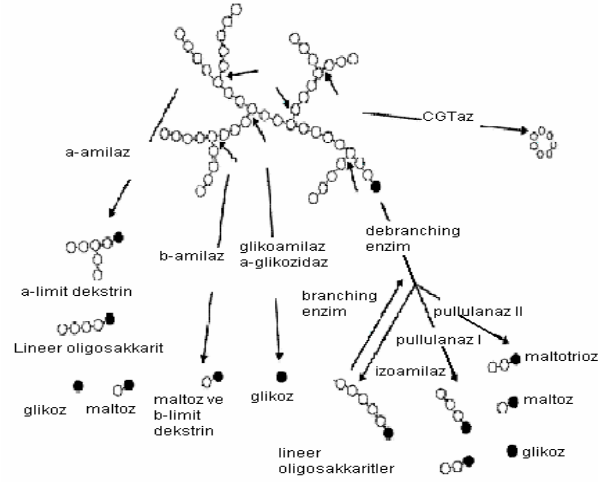
## **2.2. Bakteriyal Alkalin Proteazlar**

Mikrobiyal proteazlar enzimoloji çalışmaları başladığından beri kapsamlı olarak araştırılan hidrolitik enzimlerin en önemlisidir. Bu enzimlerin hücresel metabolik aşamalarda önemli rol oynamalarının yanı sıra endüstriyel alanda da önem kazanmaları, proteolitik enzim çalışmalarında yeni bir ilgi konusu olmuştur. Bakteriyal alkalin proteazlar, pH 10,0 gibi alkalin koşullarda yüksek aktivite göstermeleri ve geniş substrat spesifikliği göstermeleriyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklıkları 60°C civarındadır. Bakteriyel alkalin proteazların bu özellikleri onları deterjan endüstrisi için uygun kılmaktadır (Rao *et*

al. 1998). Günümüzde proteazlar endüstriyel pazardaki %60'lık payları ile deterjan, gıda, ilaç, deri, atık su artımı ve röntgen filmlerinden gümüşün arındırılması gibi alanlarda kullanılırken, alkalen proteazlar özellikle deterjan endüstrisinde alkali pH aralığında stabil olmaları nedeniyle önemli yere sahiptir (Gupta *et al.* 2002) ve 1914 yılından bu yana deterjan formülasyonlarına ilave edilmeleriyle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kalisz 1988, Hodgson 1994). Organik çözücülerini tolere edebilen bakteriyel alkalen proteazların kullanılması; denatürasyon, enzim inaktivasyonu ve organik ortamdaki düşük ürün miktarı gibi ana problemlerin çözümlenmesine olanak sağlayabilmektedir. Deterjan endüstrisinin yanı sıra son yıllarda medikal, gıda ve yem, deri, farmasötik, biyolojik atık giderimi ve tekstil endüstrisinde protein bazlı boyaların uzaklaştırılması gibi alanlarda alkalen proteaz uygulamaları çok hızlı bir şekilde artmıştır (Kumar and Takagi 1999, Gupta *et al.* 2002, Joo *et al.* 2003, Sellami-Kamoun *et al.* 2008).

### **2.3. Amilazlar**

1930 yılında Ohlsson ise malttan elde ettiği parçalayıcı enzimleri, elde ettiği şeker tipine göre  $\alpha$  ve  $\beta$ -amilazlar olmak üzere ikiye ayırmıştır (Çalışkan 2011). Bunun dışında amilazlar endo ve ekzoamilazlar olarak da 2 gruba ayrılabilirler. Bertoldo ve Antranikan (2002) endoamilazların nişasta molekülünün iç kısmındaki bağlara etki ederek, değişik zincir uzunluğunda düz ve dallanmış oligosakkaritleri meydana getirdiğini açıklamışlardır (Şekil 1.) (Çalışkan 2011). Ekzoamilazlar ise, nişasta molekülünü indirgen olmayan uçlardan parçalarlar. Günümüzde ise amilazlar, nişastayı parçalama mekanizmasına göre 6 gruba sınıflandırılmışlardır;  $\alpha$ -Amilazlar,  $\beta$ -Amilazlar, Amiloglukozidazlar, Pullulanazlar,  $\alpha$ -Glukozidazlar, CGTazlar (Siklodekstringlukanotransferaz) (Çalışkan 2011).



**Şekil 2.1.** Amilolitik enzimlerin nişastayı hidroliz şekilleri ve oluşturdukları ürünler

## 2.4. Alkalen $\alpha$ -amilazlar

Bir glukozid hidrolaz ve ticari olarak kullanılan ilk enzim olan  $\alpha$ -amilaz bir endoamilazdır.  $\alpha$ -Amilaz enzimlerinin sentezi nişasta ya da daha düşük molekül ağırlıklı oligosakkaritler varlığında uyarılır. Bir nişasta molekülü amiloz ve amilopektin olmak üzere iki adet glukoz polimeri içerir. Amiloz, glukoz birimleri arasında  $\alpha$ -1,4-glukozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıda iken, amilopektin ise glukoz birimleri arasında  $\alpha$ -1,4 bağlantısına ek olarak  $\alpha$ -1,6-glukozidik dallanma bağ noktalarını da içermektedir.  $\alpha$ -Amilazlar nişasta moleküllerindeki amiloz zincirlerinin  $\alpha$ -1,4 bağlarına geliş güzel etki ederler (Sarıkaya 1995, Çalışkan 2011). Nişastanın hidrolizi sonucunda ortaya çıkan ürünler  $\alpha$ -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere  $\alpha$ -amilazlar adı verilmiştir (Mac Gregor 1988, Çalışkan 2011).

Endüstriyel alanda kullanılan  $\alpha$ -amilazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedirler.  $\alpha$ -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya'da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır. 1970'lerde ise *B. subtilis* ve *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya 1995).  $\alpha$ -Amilazlar gıda, tekstil ve farmasötik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Malhotra *et al.* 2000). Alkalen  $\alpha$ -amilazlar ise pH 9.0-11.0 aralığında yüksek katalitik etkinlik ve stabilite göstermektedir (Burhan *et al.* 2003). Bu özellikleriyle nişasta ve tekstil endüstrisinde

yüksek pH koşullarında nişastanın hidrolizinde, deterjan endüstrisinde de bulaşık makine ve kuru temizleme deterjanlarının içeriğine eklenmektedirler (Burhan *et al.* 2003).

## **2.5. Türkiye’de Endüstriyel Biyoteknoloji: Enzim Pazarı**

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı, 1.4 milyar USD dolayında tutarla yılda %10’un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75’ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır. Endüstriyel gelişmenin göstergesi olarak da bu enzimlerin %60’ı rekombinant ürünlerdir. Bu da endüstriyel uygulamaların önemini vurgulanmaktadır. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (Cowan 1996, Topal *et al.* 2000).

Türkiye büyük bir biyoteknoloji ürünleri tüketicisi olan fakat biyo-girişimciler tarafından bu pazarın yeterince değerlendirilmediği bir ülkedir. Tüketicisi olduğumuz bu pazarın en önemli alanlarından birisini “enzimler” oluşturmaktadır. Türkiye’nin yerli enzim arzı hemen hemen yok gibidir. Enzimler farklı kategorilerde farklı isimler, sektörler ve kalemler altında yerli pazara girdikleri ve tüketildikleri için pazar hacminin bütününün tek bir rakam halinde tespiti de mümkün değildir, fakat en bilinen kadarıyla bile tüketimimiz milyar dolarlar seviyesindedir (Özer 2002).

Devlet Planlama Teşkilatı’ nın 2001 yılında yayınladığı Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planında yer alan Kimya Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu ve Yeni malzemeler Alt Komisyonu Raporu’na göre 1999 yılında enzim ithalatı için harcanan giderin, “Enzimler, Mustahzar Enzimler” olarak belirtilen kalemden 22.532.319 \$ olduğu açıklanmıştır.

2000 yılında TÜSİAD tarafından Türk sanayinin, rekabet gücünü artırması ve uluslararası ekonomik sistemde belirgin ve kalıcı bir yer edinmesini sağlamaya yönelik olarak hazırlanan, sektörel rekabet stratejileri raporlarından “Uluslar arası Rekabet Stratejileri: Biyoteknoloji” başlıklı raporda, gıda sektöründe enzim, başlangıç kültürü gibi birçok biyoteknoloji ürününün yaygın olarak kullanıldığı ancak bu alanda endüstriyel Ar-Ge

olmadığı, çünkü sektörün biyoteknoloji girdilerinin ithal edildiği bildirilmiştir. Tekstil ve deri sanayisinde girdi olarak kullanılan enzimlerden bazılarının (örnek; amilaz enzimi ve alkalin fosfataz) üretimini yapan ulusal tek şirketin Orba olduğu açıklanmıştır. Sanayinin büyük miktarda girdisi, büyük ölçekli üretimleriyle çok ucuz ürün üretebilen çokuluslu şirketlerden ithal edildiği belirtilmektedir.

Ülkemizde endüstriyel enzimlerin kullanılması birçok alanda elzemdir. Tekstil enzimleri Türkiye'deki enzim tüketiminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Türkiye'de tekstil enzimleri, özellikle taşıma ve haşıl sökmek amacıyla tonlarca tüketilmektedir. Tekstilde enzim kullanımı sadece taşıma ve haşıl sökmekle kısıtlı değildir; bunlar sadece en çok tüketilme amaçlarından ikisidir.

Ülkemizde çok tüketilen başka bir enzim kalemi ise deterjanlarda kullanılan temizlik enzimleridir. Bunların da pazarı oldukça geniştir. Enzimler, tükettiğimiz birçok leke çıkarıcının ve deterjanın vazgeçilmez malzemesidir. Enzimler dericilikte de çok tüketilmektedir. Özellikle derilerden kıl ve yağların ayrılmasında kullanılıyor olup, enzim kaynağı yine ithalatla sağlanmaktadır.

Enzim sektöründe döviz kaybımıza neden olan en önemli alanlardan bir başkası da yem katkı maddelerinde kullanılan enzimlerdir. Bunlar kültür hayvanlarının yemlerinin daha verimli şekilde ete, yumurtaya, süte v.b. dönüşmesini sağladığı için tavuk yeminden büyük baş hayvan yemine kadar birçok yemin içine eklenmektedir. Bu konuda da yeterli üretimimiz yoktur. Yukarıda sadece belli başlı endüstriyel enzimlerden bahsedilmiştir, kozmetik ve tıpta kullanılan yüksek saflıkta ve daha ince üretim gerektiren enzimler de yine ithal edilmektedir (Özer 2002).

## 2.6. Alkalifilik *Bacillus* Türleri

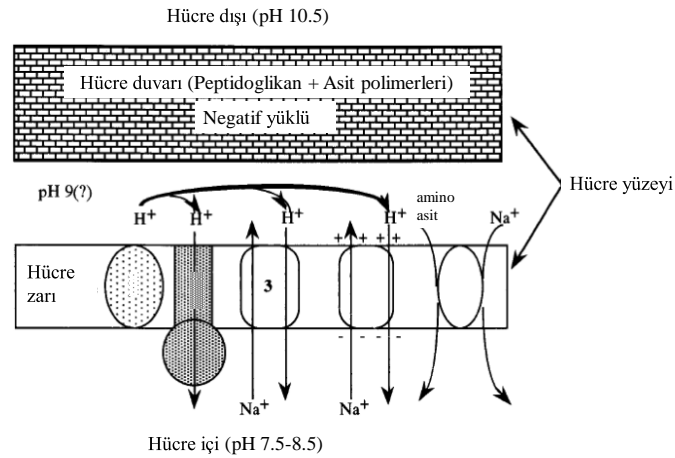
Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Bakteri (Eubakteri) domanı içerisine dahil edilmiştir (Woese and Wolfe 1985, Woese 1999). *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Gram (+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, aerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif mikroorganizmalardır (Claus and Berkeley 1986). 16S rRNA genine ait dizi analizleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Bacillus* cinsinin oldukça geniş bir filogenetik heterojeniteye sahip olduğu görülmüştür (Nazina *et al.* 2001).

Ekstrem koşullara adapte olmuş mikroorganizmalar ekstremofiller olarak tanımlanmakta ve bunların spesifik özellikleri, farklı yöntemlerle yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Robertson *et al.* 1996). Alkalifilik mikroorganizmalar alkalifiller ve alkalotoleranlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Alkalifil terimi optimum olarak pH 9.0'da gelişim gösterirken pH 10.0'un üzerinde gelişim gösterebilen ancak pH 7.0 ve altındaki pH değerlerinde gelişim gösteremeyen mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Diğer yandan alkalotoleranlar ise pH 10.0 gibi yüksek alkalik koşullarda gelişim gösterebilirken optimum olarak nötrale yakın koşullarda gelişim gösterebilen mikroorganizmalardır. Ekstrem alkalifiller terimi de iki gruba ayrılmış, fakültatif ve obligat alkalifilleri tanımlamak için kullanılmıştır. Fakültatif alkalifiller optimal olarak pH 10.0'da gelişim gösterirken nötral pH'da da iyi gelişim gösterebilmektedir. Ancak obligat alkalifiller nötral pH'da gelişim göstermemeleriyle bunlardan ayrılmaktadır (Krulwich and Guffanti 1983, Horikoshi 1999, Kumar and Takagi 1999).

Alkalifiller ayrıca, mikroorganizmalar içerisinde alkalifiller ve haloalkalifiller olmak üzere iki grubu da içermektedirler. Alkalifilik mikroorganizmalar alkali kısıtlaması olmadan her türlü çevre koşulunda dağılım göstermektedirler. Özellikle tuzlu su özelliğindeki tuz gölleri gibi su kaynakları alkalifillerin büyük bir kısmını oluşturan haloalkalifillerin habitatlarını oluşturmaktadır. Tuzlu ve bazik özellikteki acı sulu su kaynaklarının yanı sıra dünya üzerinde çok az bulunan sodalı topraklar, sodalı göller ve çöller geniş çeşitlilikte bu mikroorganizmaları barındırmaktadır (Kumar and Takagi 1999).

Alkalifilik mikroorganizmalar etkin olarak pH 9.0 ve 11.0 aralığında gelişmektedir ve Na<sup>+</sup> iyonlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Kemoosmotik Teori'ye göre, hücrelerdeki proton ittirici güç elektron taşıma zinciri veya ATPaz tarafından ATP metabolizması ile H<sup>+</sup> çıkartılması sonucu meydana gelmektedir. Na<sup>+</sup> bağlı taşıma sistemlerinde H<sup>+</sup> ile Na<sup>+</sup> değişimi Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter sistemleri ile gerçekleşmektedir. Böylece Na<sup>+</sup> ittirici güç ile substratlar Na<sup>+</sup> eşliğinde hücre içine alınmaktadır (Horikoshi 1999).

Hücre içi pH ile hücre dışı pH'nın dengelenmesinde hücre zarı ve hücre duvarı etkin rol oynamaktadır. Şekil 2' de pH 10.5 değerindeki dış ortamın pH'sını 8.0 değerindeki iç ortama dengelemek için hücre yüzeyindeki hücre zarı ve hücre duvarı ile iki farklı bariyer uygulandığı ve membran proteinlerinin transferde rol oynadığını gösterilmektedir (Horikoshi 1999).



Şekil 2.2. Sitoplazmik pH regülasyonunun şematik ifadesi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalar doğada oldukça yaygın olup, genetik olarak geniş bir heterojenite göstermektedirler. Yapılan taksonomik araştırmalarda, 16S rRNA gen dizilemesine dayalı filogenetik analizlerden alınan verilere göre, **alkalifilik ve spor oluşturan basillerin** *Bacillus* cinsinin 16S rRNA genetik grup 6 içerisinde sınıflandırıldıkları görülmüştür (Yumoto *et al.* 2003). Alkalifilik *Bacillus* cinsi bakteri türleri Çizelge 2.1.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Alkalifilik *Bacillus* türleri

---

**Alkalifilik *Bacillus* türleri**

---

*B. alcalophilus*  
*B. cohnii*  
*B. agaradhaerens*  
*B. clarkii*  
*B. clausii*  
*B. gibsonii*  
*B. halodurans*  
*B. halmapAlus*  
*B. horikoshii*  
*B. pseudoalcalophilus*  
*B. pseudofirmus*  
*B. mojavensis*

---

İlginç ve ekstrem özellik göstermeleri nedeniyle alkalifillerin kullanım potansiyelleri birçok endüstri alanında artmıştır. Alkalifiller tarafından üretilen endüstriyel enzimlerin başında alkalin proteazlar gelmektedir. Ticari proteazların çoğu *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından nötral ve alkalin olarak üretilmektedir (Kumar and Takagi 1999). 1971 yılında *Bacillus* sp. strain 221 tarafından üretilen alkalin proteaz, alkalin enzim içeren ilk çalışmadır (Horikoshi 1971).

Genel olarak proteaz üreticisi mikroorganizmaların pek çoğu toksik ve patojen özellik göstermelerine rağmen bunların içinde az sayıda bulunan toksik ve patojen olmayan mikroorganizmalar ticari kullanım için uygun görülen proteaz üreticileridir (generally regarded as safe; GRAS) ve *Bacillus* cinsine ait bakteriler alkalin proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cinse ait en çok tercih edilen alkalin proteaz üreticisi türler *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis*' tir (Kumar and Takagi 1999).



Alkalen proteazların dışında alkalifiller tarafından üretilen endüstriyel öneme sahip pek çok alkalen enzim bulunmaktadır. Bunlar; nişastanın parçalanmasında kullanılan alkalen amilazlar, siklodekstrinlerin üretilmesinde siklomaltodekstrin glukano transferazlar, kağıt endüstrisinin yanı sıra özellikle kuru temizleme endüstrisinde kullanımı önem kazanan alkalen selülazlar, deterjan endüstrisinde kullanılan bir diğer enzim olan alkalen lipazlar, şarap ve meyve suyu üretiminde kullanılan alkalen pektinazlar, biyolojik atık gideriminin kontrolünde ve gıda endüstrisinde kullanılan alkalen kitinazlar endüstriyel boyutta önem taşıyan alkalen enzimlerdir ve bu enzimlerin üretiminde yine alkalifilik *Bacillus* türleri tercih edilmektedir (Horikoshi 1999).

## 2.7. Bakteriyel Taksonomi

Taksonomi sınıflandırma bilimi olup teşhis ve adlandırma olmak üzere iki alt disiplin içerir. Bakteriyel taksonomi, klasik anlamda fenotipik analizlere dayandırılır. Bunun yanı sıra prokaryotların filogenisi genotipik analizlerden ortaya çıkarılır. Mikrobiyal taksonomistler şu an prokaryotik türlerin sayısı hakkında kesin bir tahmin yapamamakla birlikte daha tanımlanmamış binlerce veya milyonlarca türün var olduğu düşünülmektedir. Şu an mevcut teknikler ile doğadaki prokaryotik çeşitliliğin sadece yüzeysel bir kısmı kültüre edilebilmektedir. Bu sebeple prokaryotik çeşitliliği ortaya çıkarmak için daha gelişmiş kültürel ve moleküler araçlar kullanılarak yapılan ve yapılacak olan her çalışmanın bu konudaki büyük bilgi eksikliğine katkıda bulunacağı kesindir (Madigan and Martinko 2007).

Carl Woese tarafından 16S ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre hücresel yaşam *domeyn* adı verilen üç temel soy üzerinden evrimleşir. Buna göre Prokaryotik gruplar **Bakteriler** ve **Arkeler**'dir; ökaryotik domeyn **Ökaryotlar** olarak adlandırılır. Bu terimler yaşamın üç **domeynini** temsil eder ki domeyn biyolojik taksonların en üst seviyesidir (Woese and Wolfe 1985, Woese 1999). Yeni bir tür genellikle pek çok suşun karakterizasyonu yapılarak tanımlanır. Mikrobiyolojide tür kavramı önemlidir, çünkü izole edilmiş suşlara resmi bir taksonomik kimlik verir. Tür grupları daha sonra cinsler (genera, tekili **genus**) altında toplanır.

Moleküler kriterlere göre yeni bir cins oluşturmak, tür kavramını değerlendirmekten daha zordur ama bir organizmanın *16S dizisinin diğer organizmalardan % 5 farklılık*

*göstermesi* (diğer bir deyişle % 95'den az dizi benzerliği), onun yeni bir cins olduğunu gösterir. Cins grupları aileler (**families**), aileler ordolar (**orders**), ordolar sınıflar (**classes**) ve sınıflar da en yüksek taksnomik seviye olan **domeynler** içerisinde toplanırlar (Madigan and Martinko 2007).

Genel olarak bakteriyal taksonomi üç ana başlıkta gruplandırılabilir; Klasik Taksonomi, Kemotaksonomi ve Moleküler Taksonomi.

### **2.7.1. Klasik taksonomi**

Bakteriyel taksonomi, klasik anlamda *fenotipik* analizlere dayanır. Bunlar bir organizmanın neye benzediği, enerji metabolizması, enzimleri ve diğer özelliklerini kapsar. Her ne kadar prokaryotların filogenisi *genotipik* analizlerden ortaya çıksa da, fenotipik analizler bakteriyel teşhis ve sınıflandırmada önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. Klasik bakteriyel taksonomide pek çok fenotipik karakter değerlendirilir ve elde edilem veriler, organizmaları türden domeyne kadar olan taksonomik basamaklarda gruplandırmak için kullanılır (Madigan and Martinko 2007). Bu amaçla kullanılan taksonomik değere sahip karakterler morfoloji, beslenme ve fizyoloji ile habitatdır.

Bir organizmayı tanımlamak için araştırmacı, genelden özele kadar pek çok fenotipik özelliği değerlendirmelidir. Klasik taksonomide incelenen özellikler Şekil 2.3.'de özetlenmiştir. Bireysel karaktere özgü çok sayıda verinin toplanmasıyla, muhtemel organizmaların listesi kesin bir teşhis yapılarına kadar sınırlandırılmış olur (Tindall *et al.* 2010). Klasik taksonomide incelenen özellikler *Mikroskobik Morfoloji, Makroskobik Morfoloji, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler'* dir.

Mikroskopik Morfoloji	Makroskopik Morfoloji	Fizyolojik Özellikler	Biyokimyasal Özellikler
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hücre büyüklüğü (genişlik ve uzunluk)</li> <li>•Genel şekil (kok, basil,vs.)</li> <li>•Filamentler</li> <li>•Gram reaksiyonu</li> <li>•Hareket</li> <li>•Flagellanın tipi</li> <li>•Spor içeriği</li> <li>•Spor şekli ve pozisyonu</li> <li>•Şişkin spor</li> <li>•Spor fotomikrografi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Kullanılan gelişme ortamı</li> <li>•Kültür koşulları (sıcaklık, pH, tuz, inkübasyon süresi)</li> <li>•Koloni çapı</li> <li>•Koloni şekli</li> <li>•Koloninin dikey yüksekliği</li> <li>•Koloni kenarlarının şekli</li> <li>•Koloni rengi</li> <li>•Koloninin yüzey dokusu</li> <li>•Koloninin yoğunluğu ve besiyerine adherens özelliği</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Önerilen besiyeri ortamı</li> <li>•Gelişme gösterdiği optimum-minimum-maksimum sıcaklık değerleri</li> <li>•Gelişme gösterdiği optimum-minimum-maksimum pH değerleri</li> <li>•Oksijen ihtiyacı (aerobik, anaerobik, fakültatif aerobik/anaerobik)</li> <li>•Tuz toleransı</li> <li>•Katalaz</li> <li>•Oksidaz</li> <li>•Bilinen diğer nutrient gereksinimleri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Karbohidratlardan asit ve gaz üretimi (D-glukoz, L-arabinoz, D-mannitol gibi)</li> <li>•Kazein, jelatin ve nişastanın hidrolizi</li> <li>•Eskülin ve üre hidrolizi</li> <li>•Nitratın redüksiyonu</li> <li>•Arjinin dihidrolaz</li> <li>•Sitrat kullanımı</li> <li>•Karbon kaynağı olarak propionat ve diğer organik asitlerin kullanımı</li> <li>•Karbon kaynağı olarak amino asitlerin kullanımı</li> <li>•Karbon kaynağı olarak karbohidratların kullanımı</li> <li>•Lesitinaz reaksiyonu</li> <li>•Triptofandan indol üretimi</li> </ul>

**Şekil 2.3.** Klasik taksonomide incelenen özellikler

### 2.7.1.1. Mikroskopik morfoloji

Bir mikroorganizmanın teşhisi sırasında aydınlık alan mikroskobundan çok daha ayrıntılı ve yüksek rezolüsyon sağlayan faz kontrast mikroskopta 1000X büyültmede vejetatif hücreler, varsa spor yapıları ve hücrelerin hareket özelliği incelenmelidir. Vejetatif hücrelerin incelenmesi için 18-24 saatlik kültürlerden alınan numuneler kullanılmalıdır. Hücre duvarı kompozisyonu analiz edilse bile Gram reaksiyonu ile önemli tanısal sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle, öncelikli olarak hücrelerin Gram reaksiyonları gerçekleştirilmelidir. Bunun dışında faz kontrast mikroskop ile de hücre büyüklüğü, hücre şekli, zincir oluşturma yapıları ve hareket yetenekleri incelenmelidir (Logan *et al.* 2009).

### 2.7.1.2. Makroskobik morfoloji

Tür içerisinde ve türler arasında geniş çeşitlilikte koloni morfolojisi çeşitliliği mevcuttur. Kolonisel tanımlamalar çap, genel yüzey şekli, tümseklik gösterip göstermemesi, koloni rengi, besiyeri ortamına koloninin tutunma özelliği incelenebilmektedir. Hücrelerin morfolojik yapılarını besiyeri içeriği ve inkübasyon koşulları etkileyeceği için uygulanan kültür koşulları da ayrıca belirtilmelidir (Logan *et al.* 2009).

### 2.7.1.3. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikler

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* kitabı, 1923'den bu yana mikrobiyologlar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır ve tüm bilinen prokaryotik türlere ait özet bilgiler içeren ciltlik bir ansiklopedi şeklindedir. Bir uzman tarafından yazılmış her bölüm tablolar, şekiller ve teşhis etmede kullanılabilir diğer sistematik bilgileri içerir. *Bergey's Manual*'ın I. Cildinin ikinci baskısı 2001 yılında, 2. Cildi ise 2005 yılında basılmış, üç yeni ilave cilt ise 2007 yılında basılmıştır. *Bergey's Manual*'ın ikinci baskısı, ribozomal RNA dizilemesi ve genomik çalışmaların bol miktarda fenotipik bilgi ile harmanlandığı pek çok kavramı içine alır. Bu kitapta yer alan testler laboratuvar ortamında hazırlanan manuel besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilebileceği gibi ticari olarak da temin edilebilen kitlerle de gerçekleştirilebilmektedir.

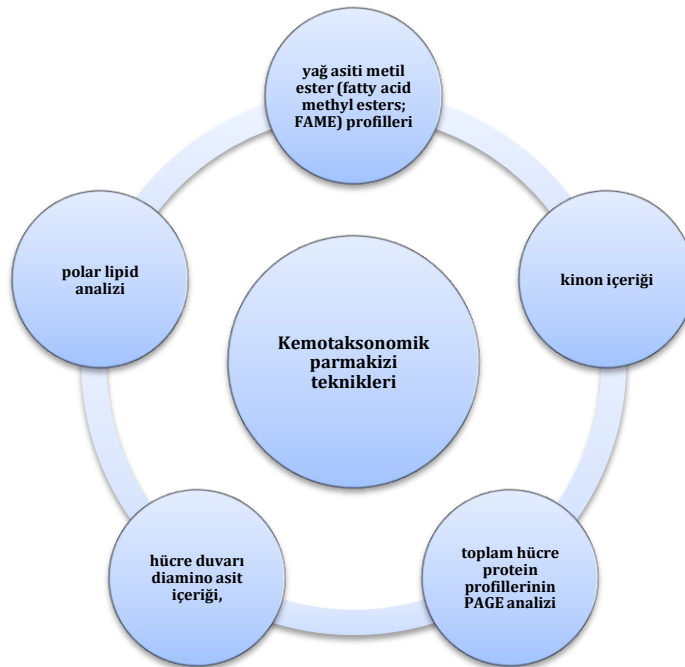
Bakterilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenebildiği, ticari olarak satılan bu kitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerin tanımlanmasında API 20E ve 50CHB sistemleri ile VITEK sistemleri önerilmektedir. Bu ticari sistemlerin içerdiği besiyeri ortamları laboratuvarda manuel olarak da hazırlanabilmektedir. Ancak laboratuvarlar arasındaki farklılıkların minimize edilmesi için ticari kitlerin kullanılması daha uygundur. Özellikle yeni bir taksanın tanımlanmasında “geleneksel” olarak adlandırılan fizyolojik ve biyokimyasal karakterlerin incelenmesi elzemdir (Logan *et al.* 2009).

Mikroorganizmaların teşhisinde kullanılan bazı biyokimyasal testler; Kazein, sitrat, nişasta, tirozin, jelatin, üre kullanımı, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer testi, H<sub>2</sub>S ve indol

üretimi, nitratin nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz oluşumu, şekerlerden asit oluşumu (maltoz, D-fruktoz, laktoz, glukoz, glukozdan gaz oluşumu, D-(+)-galaktoz, sükroz, raffinöz vs), sıcaklık ve pH isteği, NaCl'e tolerans, lizozime direnç, antibiyotik dirençlilikleri, plazmid DNA içerikleri gibi, mikroorganizmanın gelişim koşulları, besin ihtiyaçları, fizyolojik özelliklerini inceleyen testlerdir.

## 2.7.2. Kemotaksonomi

Kemotaksonomi hücredeki bir veya daha yapı taşının moleküler analizini kapsar. Kemotaksonomik parmakizi teknikleri Şekil 2.4.'de verilmiştir. Rutin olarak kullanılan kemotaksonomik yöntemlerin başında *lipid profillerinin çıkarılması* gelir. Kemotaksonomik parmakizi teknikleri ile yağ asiti metil ester (fatty acid methyl esters; FAME) profilleri, toplam hücre protein profillerinin PAGE analizi, polar lipid analizi, kuinon içeriği, hücre duvarı diamino asit içeriği, piroliz kütle spektrometrisi, Fourier-transform infrared spektroskopi, Raman spektroskopi ve MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılmaktadır (Logan *et al.* 2009). Kemotaksonomik tekniklerden FAME ve SDS-PAGE ile ilgili bilgi, bölüm 2.7.2.1 ve 2.7.2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Kemotaksonomik parmakizi teknikleri

### 2.7.2.1. Yağ asiti tiplerinin ve oranlarının karakterizasyonu (FAME)

Bakteriyel sınıflandırmadaki yaygın yöntemlerden biri hücrelerin sitoplazmik membranlarındaki ve dış membranlarındaki lipitlerde bulunan **yağ asiti tiplerinin ve oranlarının karakterizasyonudur**. Bu teknik **yağ asiti metil ester (fatty acid methyl esters; FAME)** profilleri olarak adlandırılır. Prokaryotlardaki yağ asiti içerikleri oldukça çeşitlilik gösterip, bu değişiklikler yağ asitinin zincir uzunluğu, çift bağ, halka yapısı, dallanmış zincirler veya hidroksil gruplar içerip içermemesi gibi farklılıkları kapsar. Bu nedenle yağ asiti profili genellikle belirli bir bakteri türünü teşhis edebilir (Madigan and Martinko 2007).

FAME analizi tanımlama için ticari dataların olduğu tek kemotaksonomik tekniktir. Bu tekniğin dezavantajı uygulanan protokollerin gelişim ve diğer koşulların tam anlamıyla standardize edilmiş olmasını gerektirmesidir. Bir organizmanın yağ asiti profili; sıcaklık, büyüme fazı (üssel veya duraklama) ve geliştirilen besiyerine göre değişiklik göstermektedir. Tutarlı sonuçlar almak için, karşılaştırmak istenilen bilinmeyen organizmayı, veritabanında yağ asiti profilleri kayıtlı olan organizmalarla aynı koşullarda, yani belirli bir besiyerinde ve sıcaklıkta geliştirmek şarttır. Özellikle asidofil, alkalifil, halofil ve termofil gibi ekstremofillerin gelişmesi için özel gelişme koşullarına ihtiyaç duyulduğu için bu organizmaların tanımlanmasında ticari sistemlerin kullanılmasında sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Pek çok mikroorganizma için bu mümkün olmadığından, FAME analizleri sadece belirli koşullarda geliştirilebilen organizmalar ile sınırlıdır (Madigan and Martinko 2007).

Ancak, birçok polar lipid tanımlanmış olmasına rağmen yapısal olarak henüz karakterize edilmemiştir. Bu dezavantaj bu analizin önemini azaltmamaktadır. İki boyutlu ince tabaka tekniği ile bütün lipitler gösterilebilmektedir. Polar lipitlerin taksonomik önemi yeni tanımlanan *Ornithinibacillus* ve *Viridibacillus* gibi cinslerde ortaya koyulmuştur. Bu nedenle son yıllarda taksonomik sınıflandırmada polar lipidlerin analizi de elzem analizler arasına girmiştir (Logan *et al.* 2009).

### 2.7.2.2. Toplam hücre protein profillerinin SDS-PAGE ile analizleri

Genom proteoma kıyasla değişmezken, proteom oldukça yüksek bir dinamizme sahiptir. Bu dinamizm, hücrenin çevresel koşullardan, çeşitli stres durumlarından etkilenmesine bağlı olabileceği gibi, hücrenin sağlıklı olup olmaması ile fizyolojik durumundan da kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, farklı ortam koşulları altında genom içeriği aynı olsa bile farklı organizmaların farklı proteomları olması muhtemeldir (Reddy *et al.* 2008).

Proteom çalışmaları ile belirli koşullar altında bütün bir organizmanın, özel bir dokunun veya herhangi bir hücresel kısmın proteinlerindeki değişiklikler belirlenebilmektedir. Elektroforetik ayırım ve proteinlerin analizi bakterilerin ayrılmasında ve tanımlanmasında kullanılan önemli bir metottur. Tek boyutlu poliakrilamid jel elektroforez metotları ile çeşitli türlerden elde edilen protein profilleri bu türlerin ayrılarak taksonomik ilişkilerinin ortaya çıkartılmasında kullanılmaktadır (Jackson *et al.* 1984). *Bacillus* cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında toplam hücre proteinlerinden de faydalanılmaktadır. Bu grup bakterilerin teşhisinde, sporulasyon öncesi ve sporulasyon sonrası protein profilleri SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre tek boyutlu olarak belirlenmekte ve elde edilen protein bantları dikkate alınarak sınıflandırma gerçekleştirilmektedir (Vauterin *et al.* 1991, Berber *et al.* 2003).

SDS-PAGE ile bakteriyel protein profil analizi 1980'lerden bu yana bakterilerin sınıflandırılması, tanımlanması, tiplendirilmesi ve karşılaştırılmasında uygulana bir teknik olmasının yanı sıra diğer tiplendirme metotları ile tanımlanamayan mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaktadır (Kustos *et al.* 1998, Pfaller 1991). Bu teknik ile bakterilerin protein profillerinin kıyaslanmasıyla özellikle tür ve alt tür taksonlar için ayırım sağlanabilmektedir. Ayrıca, SDS-PAGE ile ayırım sonucunda bir veya birkaç yoğun protein bandının sayısı ve moleküler ağırlığında saptanabilecek değişim, bir türe ait suşların farklı bir sınıfa dahil edilmesine sebep olabilmektedir. (Vandamme *et al.* 1996). SDS-PAGE ile elde edilen protein profillerine göre yapılan analiz sonuçları, DNA-DNA hibridizasyonu gibi taksonomideki önemli analizlerden alınan sonuçlarla uygunluk göstermektedir (Vauterin *et al.* 1990, Niemi *et al.* 1993, Berber *et al.* 2003).

### 2.7.3. Moleküler taksonomi

İşlevsel olarak benzer (homolog) makromoleküllerin nükleotid ve amino asit dizisindeki farklılıklar, *evrimsel uzaklıklarının* bir sonucudur. Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmektedir. Ancak bunlar arasından *ribozomal RNA*'ları kodlayan genler, translasyonel sistemdeki temel bileşenler, *ATPaz proteinleri*, ATP sentezleyen veya hidrolizini yapan enzim kompleksleri, genetik rekombinasyona yardımcı olan *RecA* enzimi ve belirli translasyonel proteinler mikroorganizmalar hakkında en çok kabul edilebilir filogenetik bilgiyi edinmemizi sağlamışlardır. Bu moleküllerin hepsi, ilkel hücrelerde bile gereklidir ve bu sebeple onların gen dizilerindeki varyasyonlar, evrimsel geçmişlerini daha derinlemesine incelememize olanak sağlar (Logan *et al.* 2009).

Moleküler taksonomide kullanılan yöntemler nükleik asitler üzerinden gerçekleştirilen rezolüsyonu yüksek tekniklerdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Moleküler taksonomide uygulanan teknikler



### 2.7.3.1. 16S rRNA geni dizi analizi

16S ribozomal RNA Prokaryotlarda ribozomların küçük alt birimi olarak görev yapan büyük polinükleotitler (~1500 baz) olup, dizilimi evrimsel bilgi edinilmesinde kullanılır. 16S rRNA gen dizisi modern bakteriyel taksonominin filogenetik temelini oluşturması nedeniyle bu gen dizisinin referans suşların dizileriyle karşılaştırılması elzemdir. Karşılaştırmalı ribozomal RNA dizilemesi günümüzde rutin olarak uygulanan bir yöntemdir. 16S rRNA'yı kodlayan genin çoğaltılması, dizilemesi ve dizinin diğer referans dizilerle analizini kapsar.

Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu şu an oldukça rutin hale gelmiştir. Yeni bulunan diziler, RDP'deki veya GenBank (Amerika), DDBS (Japonya) ve EMBL (Almanya) gibi diğer genetik veri tabanlarındaki mevcut dizilerle karşılaştırılabilir. Daha sonra ağaç oluşturan bir algoritma kullanarak dizilerin tabiatında olan evrimsel bilgiyi en iyi şekilde ifade eden filogenetik bir ağaç çizilebilir (Madigan and Martinko 2007).

Karşılaştırmalı ribozomal RNA dizilemesinde kullanmak amacıyla dizi analizleri için çok çeşitli algoritmalar ve filogenetik ağaç oluşumları geliştirilmiştir. Hangi programın kullanılacağına bakılmaksızın ilk yapılması gereken ham dizi verilerinin, daha önce sıralanmış dizilerle bir dizi editörü yardımı ile sıralanmasıdır. rRNA'ların hepsi tamamen aynı uzunlukta değildir. Bu sebeple sıralama esnasında bir dizinin diğerinden daha kısa olduğu bölgelerdeki gerekli boşluklar doldurulmalıdır. Sıralanmış diziler daha sonra bir ağaç oluşturma programına taşınarak karşılaştırmalı analizleri yapılır (Şekil 6). Organizmaların evrimsel ilişkisini cevaplandırmak için sonuç olarak tek bir filogenetik ağaç yeterli değildir. Oluşturulan herhangi bir ağaç, bir grubun doğru olarak filogenisine sadece yakın bir tahmin olarak düşünülebilir.

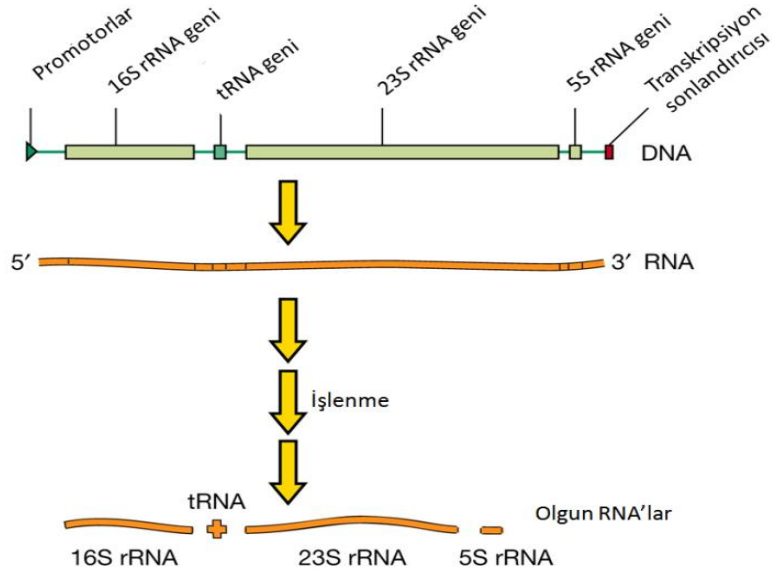
16S ribozomal RNA dizisinde, diğer tüm organizmalardan **%3'den fazla farklılık gösteren** bir prokaryotun (diğer bir deyişle veri tabanındaki diğer tüm dizilere %97'den az benzerlik gösteren) **Yeni bir tür** olduğu düşünülebilir. Bu rastgele seçilmiş bir rakam değildir. Bu öneriyi destekleyen en önemli gözlem, 16S rRNA dizisinde %97'den az

benzerlik gösteren iki prokaryotun **genomik DNA'larının genelde %70'den az hibridize** olduğudur. Minimal bir değer bulunduğu ise iki mikroorganizmanın aynı tür oldukları düşünülür. 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması filogenetik ilişkiyi **en azından cins seviyesinde** belirlerken bazı durumlarda tür seviyesindeki sınıflandırmalarda evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş olması nedeniyle yeterli ayrımı sağlayamamaktadır (Madigan and Martinko 2007).

EMBL/GenBank/DDBJ gibi veri tabanlarından bu güne dek ortaya çıkartılmış bakteriyel 16S rRNA gen dizilerine ulaşılabilir. Ancak yine de herkese açık olan bu veri tabanlarındaki verilerin kalitesi kontrol edilmelidir. Bu nedenle SILVA, Living Tree Project, EzTaxon gibi veri tabanlarından diziler ayrıca kontrol edilmelidir (Logan *et al.* 2009).

### **2.7.3.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) Bölgeleri**

16S-23S internal transcribed spacer (ITS) bölgeleri (Madigan and Martinko 2007, Şekil 2.6.), evrimsel olarak korunmuş olan 16S rRNA gen dizilerine göre daha fazla çeşitlilik içerebilmektedir. Bu nedenle ITS-PCR parmak izi tekniği tür içi ilişkilerin ortaya koyulmasında uygulanan bir diğer nükleik asit temelli tekniktir (Logan *et al.* 2009). Ayrıca, 16S ve 23S rRNA genetik lokuslarının arasında bulunan ITS (intergenic transcribed spacers) bölgesi, bakterileri tür ve alt tür seviyesinde ayırmaya yarayan, bakteri türüne göre özgüllük gösteren ve literatürde sık kullanılan PCR temelli bir yöntemidir. ITS bölgesindeki polimorfizmin sebebi, sayı ve dizi açısından farklılık gösteren ve birden fazla ribozomal operon içeren tRNA genlerinin varlığıdır (Daffonchio *et al.* 2003). Bu polimorfizm, Flint *et al.* (2001), Daffonchio *et al.* (2003), Freitas *et al.* (2008), Manachini *et al.* (2000) ve Cihan *et al.* (2011) gibi araştırmacıların yapmış olduğu önceki çalışmalarda, yakından ilişkili *Bacillus* türler arasındaki genotipik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır.



**Şekil 2.6.** Prokaryotlardaki 30S ribozomal RNA ve alt birimleri

### 2.7.3.3. Çok lokuslu dizi tiplendirmesi/analizi (MLST/MLSA)

Evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş olan housekeeping genler ya da protein kodlayan diğer genler 16S rRNA gen dizisine göre daha yüksek rezolüsyon sağlayabilmektedir. 16S rRNA gen dizisi analizlerindeki kısıtlamalardan biri de, analizlerin sadece tek bir gen üzerine odaklanmasıdır. Çok lokuslu dizi tiplendirmesi ve dizi analizi (MLST ve MLSA), bu sorunun üstesinden gelir ve bir tür içerisindeki suşların karakterizasyonunda kullanılan yararlı bir tekniktir. Bu metotlarla birbiriyle yakın akraba türlerin ayrılabilmesi için primer çiftleriyle amplifiye edilebilecek kadar korunmuş, bütün türlerde bulunan ve hızlı evrimleşme göstermeyen genler üzerinden analiz yapılmaktadır. Bu nedenle birbirinden uzak akraba taksonların sınıflandırılmasında bu metot uygulanamamaktadır. MLSA'da kullanılan genler tek kopya olmalıdır ve rekombinasyonla seçici avantaj sağlayan genler (virülens genler ve antijen kodlayan genler gibi) ya da bağlı genler olmamalıdır. Bakteriyel housekeeping genlerin dizilerine GenBank , TaxonGap ve Multilocus Sequence Typing veri tabanlarından ulaşılabilir (Logan *et al.* 2009).

#### 2.7.3.4. DNA baz kompozisyonu; %G+C içeriği

Bir organizmanın genomik DNA'sındaki **GC oranı**, taksonomik sonuçları yorumlarken kullanılan aydınlatıcı özelliklerden biridir. GC oranı bir organizmanın, DNA'sındaki guanin ve sitozin bazlarını içeren toplam nükleik asit yüzdesi olarak tanımlanır. Bu oran, DNA'nın erime sıcaklığının ölçümü veya kromatografi yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir. GC oranı oldukça çeşitlilik gösterip, prokaryotlar arasında bilinen en düşük değeri %20 iken en yüksek değeri yaklaşık %80 kadardır. Bu oranlar ökaryotlarda biraz daha dar bir aralıktadır.

Çok çeşitli organizmalara ait DNA baz içerikleri belirlenmiş olup, bir organizmanın GC oranı bilgisi duruma bağlı olarak önemli bir veri olabilir. Örneğin iki organizmaya ait GC oranları benzer olabilir, ancak hem taksonomik hem de filogenetik açıdan birbirlerinden oldukça farklılık gösterebilirler, çünkü DNA'daki tek bir baz *içeriği* ile baz *dizisinde* çeşitlilik görülmesi mümkündür. Bu durumda benzer GC oranları taksonomik açıdan bir anlam ifade etmez. Bu durumun aksine, iki organizmanın GC oranlarının yaklaşık olarak %5'den fazla farklılık göstermesi, sadece bir kaç ortak DNA dizisi paylaşabilecekleri anlamına gelir ve bu nedenle birbirleriyle yakın ilişkide olma ihtimalleri de düşer (Madigan and Martinko 2007).

#### 2.7.3.5. DNA:DNA hibridizasyonu

Genomik hibridizasyon, iki DNA arasındaki dizi benzerliğinin derecesini ölçer ve rRNA dizilemesinin ayırım sağlayamadığı durumlarda çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde kullanılır. DNA:DNA hibridizasyonu, iki organizmanın genlerindeki küçük farklılıkları ortaya çıkarmakta kullanılan hassas bir yöntemdir ve bu sebeple *yakın akraba* olan organizmaları ayırt etmede kullanılır. Taksonomik çalışmalarda kullanılan genomik hibridizasyon aslında SSU ribozomal RNA dizilemesi ve fenotipik analizlerinin, iki farklı tür olduğundan şüphelenilen organizmalar arasında belirgin bir farklılık ortaya koyamadığı durumlarda kullanılır.

İki organizmanın aynı taksonomik dereceye sahip olduğunu göstermek için, iki DNA arasındaki hibridizasyon miktarının ne kadar olması gerektiği hakkında kesin bir kural

yoktur. Yine de iki organizmanın **aynı tür olduğunu söylemek için %70 veya üzerindeki** hibridizasyon değerlerine sahip olunması önerilir. Bunun aksine iki organizmayı **aynı cinse dahil etmek için**, %25'den daha düşük hibridizasyon değerleri gereklidir. Örneğin; birbiriyle ilişkili olmayan *Clostridium* (gram pozitif) ve *Salmonella* (gram negatif) gibi farklı organizmalara ait DNA'ların hibridizasyonu ise sadece %10 veya daha az bir hibridizasyon seviyesi gösterecektir (Madigan and Martinko 2007).

#### **2.7.3.6. Tüm genom dizi analizleri**

İlk kez 1995 yılında *Haemophilus influenzae*'nin genomu sekanslanmıştır. Birçok bakteri genomunun sekanslanmasıyla elde edilen dizilerin kamuya açık veritabanlarından ulaşılır hale gelmesiyle, bakteri türlerinin evrimsel ilişkilerinde genom sekanslarının kullanılmasına olan ilgi giderek artmaktadır. Bakterilerin filogenetik ilişkilerini 16S rRNA ve housekeeping genler gibi tek bir gen üzerinden araştırılması yerine tüm genomun dizileri üzerinden araştırılması yeni nesil sekans teknolojileri ile daha cazip hale gelmektedir.

Tüm genom analizlerinden elde edilen verilerle de korunmuş genler incelenmekle birlikte, **ortolog genlerin ya da gen ailelerinin, spesifik protein katlanmalarının, korunmuş insersiyon ve delesyonların varlığı ya da yokluğu, aminoasit kompozisyonundaki farklılıklar** ve genomlardaki **nükleotid kompozisyonu** incelenerek kesin olarak filogenetik ve taksonomik sonuçlar elde edilmektedir. Tüm genom sekans analizi, bakteriyel taksonomide uygulanan en ileri tekniktir. Bu teknikten elde edilen verilerin önemi yeni çalışmalarla her geçen gün ortaya koyulmaktadır (Logan *et al.* 2009).

### **2.7.3.7. Nükleik asit parmakizi teknikleri**

Genellikle bu teknikler tür ve alt tür seviyesinde bilgi sağlamaktadır (Logan *et al.* 2009). Bakteriyel taksonomide uygulanan nükleik asit parmak izi teknikleri; Amplified fragment-length polimorfizim (AFLP) analizi, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) sonrası gerçekleştirilen makrorestriksiyon analizi, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analizi, Genomda doğal olarak ve çoklu kopyalar halinde bulunan korunmuş tekrar dizilerini çoğaltan repetitive element-primed PCR (GTG<sub>5</sub>-PCR), Tekrar eden ekstragenik palindromik PCR (REP-PCR), Enterobakteriyel intergenik tekrar eden konsensus dizilerin PCR'ı (ERIC-PCR), BoxA elementinin çoğaltıldığı BOX-PCR, Ribotiplendirme ARDRA Analizi (Amplified rDNA Restriction Analysis). Bu tekniklerden REP elementleri ve Ribotiplendirme ile ilgili bilgi, bölüm 2.7.3.7.1 ve 2.7.3.7.2'de verilmiştir.

#### **2.7.3.7.1. REP (Repetitive Extragenic Palindromic) elementleri**

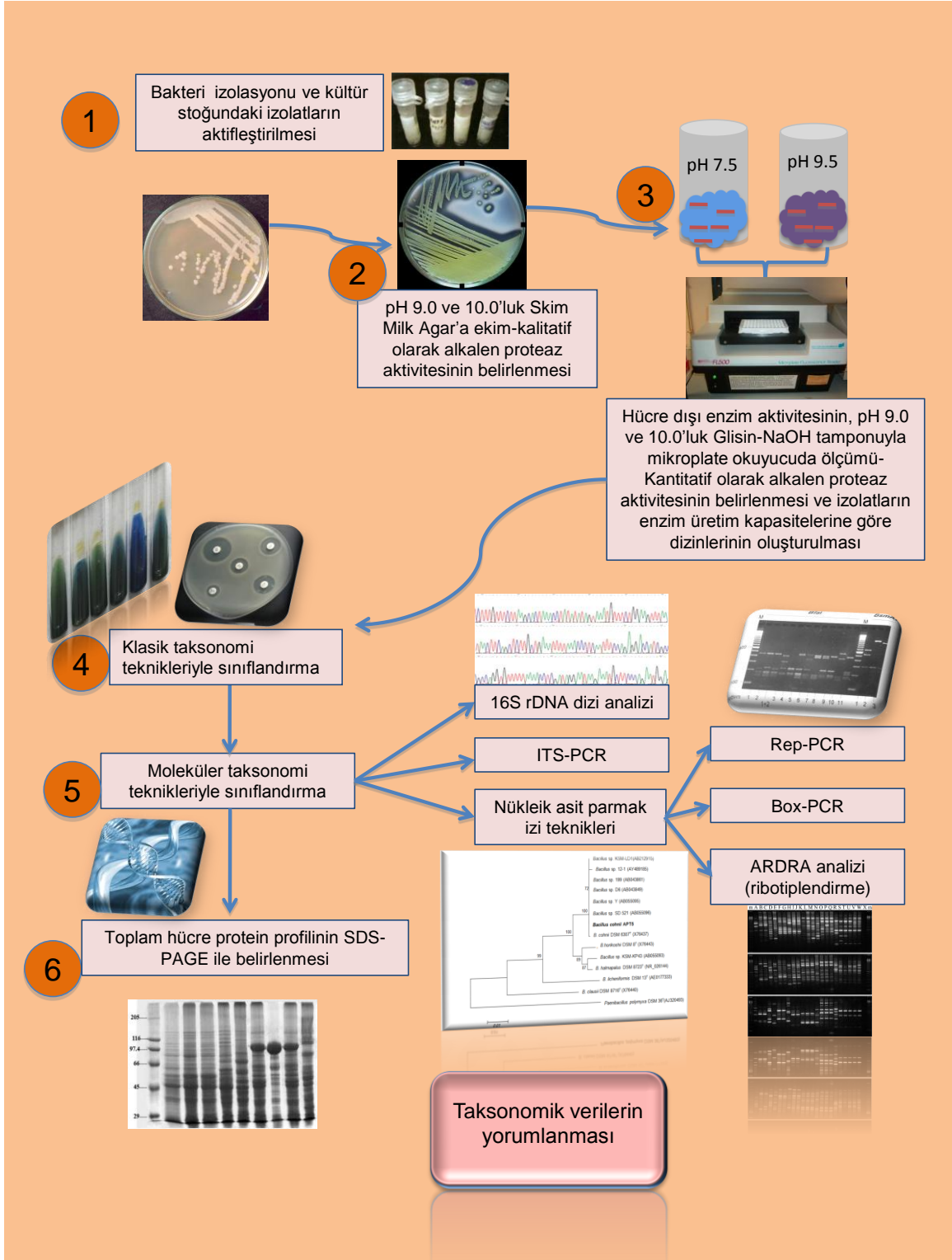
BOX ve (GTG)<sub>5</sub> gibi REP elementleri, prokaryotik genomlarda evrimsel olarak korunmuş tekrar dizileri olarak bilinir ve PCR temelli genomik parmak izi (REP-PCR) analizlerinde oligonükleotid bağlanma bölgesi olarak kullanılabilirler. Rep-PCR analizinin yukarıda söz edilen diğer parmak izi analizlerinden en önemli farkı bakterinin tüm genomundaki tekrar bölgelerinin taranmasına izin vererek suşların tür ve alt tür seviyesinde ayrılmasına olanak sağlamasıdır (Versalovic *et al.* 1994). Box ve (GTG)<sub>5</sub> elementlerinin *Bacillus* cinsi bakterilerin taksonomik sınıflandırılmasındaki etkinliği bir çok araştırmada gösterilmiştir (Heyrman *et al.* 2003, De Clerck *et al.* 2004a, Freitas *et al.* 2008, Logan *et al.* 2009).

#### **2.7.3.7.2. Ribotiplendirme (ARDRA Analizi; Çoğaltılmış rDNA restriksiyon analizi)**

Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) genellikle DNA polimorfizmini temel alarak mikrobiyal çeşitliliğin araştırılmasında kullanılmaktadır (Deng *et al.* 2008). Bu teknik 16S rRNA geninin PCR ile çoğaltıldıktan sonra restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesiminin ardından elde edilen fragmentlerin agaroz ya da akrilamid jellerde ayrılmasını temel almaktadır. Elde edilen bant profilleri ile araştırılan topluluk genotipik olarak gruplandırılmaktadır (Tiedje *et al.* 1999). 16S rRNA genine ait

dizi analizleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Bacillus* cinsinin oldukça geniş bir filogenetik heterojeniteye sahip olduğu görülmüştür (Nazina *et al.* 2001). Özellikle aynı cinse ait benzer bakteriler hakkında oldukça fazla bilgiye sahip olmak, onların doğru olarak sınıflandırılmasında büyük önem teşkil etmektedir. Nükleik asit parmak izi tekniklerinden biri olan ARDRA analizinin *Bacillus* cinsine ait bakterilerin genotipik olarak gruplandırılmasında etkinliği bir çok araştırmada gösterilmiştir (Logan *et al.* 2002, *et al.* 2004, De Clerck *et al.* 2004b, Wu *et al.* 2006, Sass *et al.* 2008).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM



Şekil 3.1. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerin akış şeması



### 3.1. Materyal

#### 3.1.1. Standart *Bacillus* Suşları

Alkalen proteaz aktivitesine sahip *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Bacillus coagulans* DSM 1<sup>T</sup>, *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>, *Bacillus alcalophilus* DSM 485<sup>T</sup>, *Bacillus subtilis* DSM 1971, *Bacillus clausii* DSM 8716<sup>T</sup>, *Bacillus cohnii* DSM 6307<sup>T</sup>, *Bacillus horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup>, *Bacillus gibsonii* 8722<sup>T</sup>, *Bacillus agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>, *Bacillus halodurans* DSM 497<sup>T</sup> ve *Bacillus pseudocaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup> olmak üzere toplam 12 standart suş çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.1.2. Alkalifilik *Bacillus* İzolatları

Tez kapsamında; Hazar Gölü (Elazığ), Sulu Ada (Antalya), Tuz Gölü (Aksaray), Burdur Gölü (Burdur), Avlan Gölü (Antalya), Kükürtlü Su (Antalya), Burguç Şifalı Su Kaynağı (Antalya), Güvercinlik Mağarası (Konya), Kırıkkale ve Kastamonu'dan alınan su ve toprak numunelerinden Gram pozitif, endospor oluşturan basil şeklindeki bakteriler izole edilmiştir. Bunun yanı sıra, A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür stoklarında bulunan ve değişik kaynaklardan izole edilmiş alkalen proteaz üreticisi Gram pozitif, endospor oluşturan basil izolatları da araştırmaya dahil edilmiştir.

#### 3.1.3. Besiyerleri

Tez kapsamındaki enzim aktivitesi deneylerinde kullanılan seçici besiyerleri, içerikleri ve hazırlanışları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Ayrıca bakterilerin izole edilmesinde, izolatların bazı fenotipik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde, toplam hücre proteinlerinin elde edilmesinde pH 9.0 ve/veya pH 10.0'luk Nutrient Agar (Merck, 1.05450) ve Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerleri kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Enzim aktivitesi deneylerinde kullanılan seçici besiyerleri ve içerikleri

<p><b><u>Skim Milk Agar Besiyeri:</u></b> Alkalen proteaz üreticisi izolatların belirlenmesinde seçici besiyeri olarak kullanılmıştır (Denizci <i>et al.</i> 2004). Skim milk solüsyon olarak ayrıca sterilize edilmiş ve sterilizasyondan sonra besiyerine eklenerek pH'sı % 10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma, S7795) ile 7.0, 9.0 ve 10.0' a ayarlanmıştır</p> <p><b><u>Besiyeri içeriği:</u></b></p> <table border="0"> <tr> <td>Dekstroz (Oxoid, L71)</td> <td>% 0.1</td> </tr> <tr> <td>Pepton (Lab M, MC18)</td> <td>% 0.2</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract (Lab M, MC1)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, P8281)</td> <td>% 0.1</td> </tr> <tr> <td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck, 1.05886)</td> <td>% 0.02</td> </tr> <tr> <td>Skim Milk (Scharlau, 06-019)</td> <td>% 5</td> </tr> <tr> <td>Agar (Oxoid, L11)</td> <td>% 3</td> </tr> </table>	Dekstroz (Oxoid, L71)	% 0.1	Pepton (Lab M, MC18)	% 0.2	Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02	Skim Milk (Scharlau, 06-019)	% 5	Agar (Oxoid, L11)	% 3	<p><b><u>Kazeinli Sıvı Besiyeri:</u></b> Alkalen proteaz aktivite deneyi için enzim üretim ortamı olarak kullanılmıştır (Gessesse ve Gashe 1997). Sterilizasyon sonrasında sıvı besiyerlerinin pH'sı %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile pH 7.5 ve 9.5 olarak ayarlanmıştır.</p> <p><b><u>Besiyeri içeriği:</u></b></p> <table border="0"> <tr> <td>Kazein (Sigma, C7078)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>Pepton (Lab M, MC18)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract (Lab M, MC1)</td> <td>% 0.2</td> </tr> <tr> <td>NaCl (Merck, 1.06400)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck, 1.05886)</td> <td>% 0.02</td> </tr> <tr> <td>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Scharlau, CA0193)</td> <td>% 0.01</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, P8281)</td> <td>% 0.1</td> </tr> </table>	Kazein (Sigma, C7078)	% 0.5	Pepton (Lab M, MC18)	% 0.5	Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.2	NaCl (Merck, 1.06400)	% 0.5	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Scharlau, CA0193)	% 0.01	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1
Dekstroz (Oxoid, L71)	% 0.1																												
Pepton (Lab M, MC18)	% 0.2																												
Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.5																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1																												
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02																												
Skim Milk (Scharlau, 06-019)	% 5																												
Agar (Oxoid, L11)	% 3																												
Kazein (Sigma, C7078)	% 0.5																												
Pepton (Lab M, MC18)	% 0.5																												
Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.2																												
NaCl (Merck, 1.06400)	% 0.5																												
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02																												
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Scharlau, CA0193)	% 0.01																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1																												
<p><b><u>Niştalı Sıvı Besiyeri:</u></b> Alkalen proteaz aktivite deneyi için enzim üretim ortamı olarak kullanılmıştır (Denizci <i>et al.</i> 2004). Sterilizasyon sonrasında %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile sıvı besiyerlerinin pH'sı 7.5 ve 9.5 olarak ayarlanmıştır.</p> <p><b><u>Besiyeri içeriği:</u></b></p> <table border="0"> <tr> <td>Niştalı (Scharlau, AL0715)</td> <td>% 1</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract (Lab M, MC1)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, P8281)</td> <td>% 0.1</td> </tr> <tr> <td>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck, 1.05886)</td> <td>% 0.02</td> </tr> </table>	Niştalı (Scharlau, AL0715)	% 1	Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02	<p><b><u>MI Agar:</u></b> Biyokimyasal testlerden amilaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Suzuki <i>et al.</i> 1976).</p> <p><b><u>Besiyeri içeriği:</u></b></p> <table border="0"> <tr> <td>Çözünür Niştalı (Scharlau, AL0715)</td> <td>% 1</td> </tr> <tr> <td>Pepton (Lab M, MC18)</td> <td>% 0.5</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract (Lab M, MC1)</td> <td>% 0.3</td> </tr> <tr> <td>Meat extract (Merck, 1.03979)</td> <td>% 0.3</td> </tr> <tr> <td>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, P8281)</td> <td>% 0.3</td> </tr> <tr> <td>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Scharlau, PO0260)</td> <td>% 0.1</td> </tr> <tr> <td>Agar (Oxoid, L11)</td> <td>% 3</td> </tr> </table>	Çözünür Niştalı (Scharlau, AL0715)	% 1	Pepton (Lab M, MC18)	% 0.5	Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.3	Meat extract (Merck, 1.03979)	% 0.3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Scharlau, PO0260)	% 0.1	Agar (Oxoid, L11)	% 3						
Niştalı (Scharlau, AL0715)	% 1																												
Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.5																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.1																												
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck, 1.05886)	% 0.02																												
Çözünür Niştalı (Scharlau, AL0715)	% 1																												
Pepton (Lab M, MC18)	% 0.5																												
Yeast extract (Lab M, MC1)	% 0.3																												
Meat extract (Merck, 1.03979)	% 0.3																												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P8281)	% 0.3																												
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Scharlau, PO0260)	% 0.1																												
Agar (Oxoid, L11)	% 3																												

### 3.1.4. Tampon ve Çözeltiler

#### 3.1.4.1. Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Alkalen proteaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler

<b>50mM Glisin-NaOH Tamponu</b>	0,375 g Glisin (AppliChem, A1067) 80-90 ml ddH <sub>2</sub> O' da çözülmüştür. 1N NaOH ile pH 9.0 ve 10.0'a ayarlandıktan sonra son hacim ddH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye ayarlanmıştır.
<b>TCA Solüsyonu</b>	0.1 M TCA, 0.22 M Na-asetat ve 0.33 M Asetik asit'ten oluşmaktadır. 1.634 g TCA (Scharlau, AC3130), 2.994 g Na-asetat (Panreac, 141632.1211) ve 1.89 ml Glasiyel asetik asit (Merck, 1.0056) ddH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
<b>0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	5.3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Scharlau, SO0115) 100 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözülmüştür.

#### 3.1.4.2. α-amilaz aktivitesi deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler

α-amilaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Alkalen proteaz aktivite deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler

<b>50mM Glisin-NaOH Tamponu</b>	0,375 g Glisin (AppliChem, A1067) 80-90 ml ddH <sub>2</sub> O' da çözülmüştür. 1N NaOH ile pH 9.0 ve 10.0'a ayarlandıktan sonra son hacim ddH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye ayarlanmıştır.
<b>DNS (Dinitro salisilik asit)</b>	α-amilaz aktivitesini durdurmak amacı ile kullanılmıştır. 1 gr DNS (Sigma, D0550) 50 ml de-iyonize su içinde çözüldükten sonra 30 gr K-Na-Tartarat (Merck, 1.08087) ve 20 ml 2N NaOH (Merck, 1.06482) ilave edilerek, son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlanır (Aiba 1983).

### 3.1.4.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz jellerin ve tamponun hazırlanışı Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan jeller ve tamponun hazırlanışı

<b>Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu (5X)</b>	54 gr Trisma Base (Amresco, 0826), 27,5 gr Borik asit (Amresco, 0588) ve 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, E5134) 1000ml'ye ddH <sub>2</sub> O ile tamamlanarak 5X konsantrasyonunda stok olarak hazırlanmıştır. 100 ml 5X TBE 900 ml ddH <sub>2</sub> O ile 1X konsantrasyonuna seyreltilerek agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.
<b>Agaroz Jel (% 1, % 1,5, % 2)</b>	1, 1,5 veya 2 g agaroz (Peqlab, peqGOLD Universal Agarose) üzerine, son hacim 100 ml olacak şekilde TBE (1X) eklenir. Hazırlanan bu karışımın mikrodalga fırında (çözünmesi sağlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bir süre soğuması sonra 5 µl EtBr (Scharlau, ET0109) eklenir. İyice karıştırılmasının ardından çözelti, donması için jel tablasına dökülerek 25-30 dk bekletilir.

### 3.1.4.4. Gitsher Tamponu (5X)

Nükleik asit parmak izi tekniklerinden (GTG)<sub>5</sub> ve BOX PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır. 10 ml Gitsher tamponu, aşağıda konsantrasyonları ve miktarları verilen solüsyon ve kimyasallarla hazırlanmıştır.

1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	830 µl
1M Tris-HCl (pH 8.8)	3350 µl
1M MgCl <sub>2</sub> (Fluka, 63020)	335 µl
5mM EDTA (pH 8.8)	65 µl
β-Mercaptoethanol (AppliChem, A1108)	104 µl
ddH <sub>2</sub> O	5316 µl

### 3.1.4.5. SDS-PAGE’de kullanılan jeller, tamponlar ve çözeltiler

SDS-PAGE’de kullanılan jellerin, tamponların içerikleri ve hazırlanışları Çizelge 3.5.’te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Agaroz jel hazırlanışı ve tampon çözeltisi

<u>Yığıma Jeli (%4)</u>		<u>Ayırma Jeli (%10)</u>	
Akrilamid/Bisakrilmid	0.328 ml	Akrilamid/Bisakrilmid	3.34 ml
dH <sub>2</sub> O	1.172 ml	dH <sub>2</sub> O	4.12 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.5 ml	1.5 M Tris-HCl (pH 8.6)	2.5 ml
% 10 APS (Merck, 1200)	12 µl	% 10 APS (Merck, 1200)	50.2 µl
TEMED (Fluka, 87690)	2 µl	TEMED (Fluka, 87690)	4.72 µl
<u>Yükleme Tamponu Stoğu (pH 8.3)</u>		<u>Örnek Tamponu (4X)</u>	
Trizma base (Sigma, T6066)	1.65 g	0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	5.12 ml
Glisin (Sigma, G8898)	8 g	Gliserol	8 ml
SDS (Sigma, L3771)	1.4 g	SDS (Sigma, L3771)	2 g
dH <sub>2</sub> O	1100 ml	dH <sub>2</sub> O	3 ml
		β-Mercaptoethanol	4 ml
		(Riedel de Haen, 62736)	
		Bromofenol blue	2.10 <sup>-4</sup> g
		(Sigma, B-0126)	
<u>Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi</u>		<u>Boya giderme Çözeltisi</u>	
Coomassie Brilliant Blue R250	1.5 g	İzopropil alkol	250 ml
(Sigma, B-0849)		(Panreac, 141090.1212)	
İzopropil alkol	250 ml	Glasiyel asetik asit	100 ml
(Panreac, 141090.1212)		(Merck, 1.00056)	
Glasiyel asetik asit	100 ml	dH <sub>2</sub> O	650 ml
(Merck, 1.00056)			
dH <sub>2</sub> O	650 ml		

### 3.1.5. Cihaz ve teçhizatlar

Tez kapsamında kullanılan tüm cihaz/teçhizatlar ve kullanım amaçları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Tez kapsamında kullanılan cihaz/teçhizatlar ve kullanım amaçları

<b>Cihaz/Teçhizat</b>	<b>Marka</b>	<b>Kullanım amacı</b>
Derin dondurucu	Indesit	DNA örnekleri, PCR ürünleri, PCR reaktiflerinin muhafazası
Buzdolabı	Indesit	Çözeltilerin ve bakteri kültürlerinin muhafazası
Fırın	Dedeoğlu	Cam malzemelerin sterilizasyonu
Otoklav	Nüve (OT 020)	Besiyeri, çözelti, tampon, pipet tiplerinin sterilizasyonu
İnkübatör (Çalkalamalı)	SHEL LAB	Bakteri kültürlerinin geliştirilmesi
Vorteks	Stuart Scientific (Vortex Mixer SA3)	Sıvı besiyeri, çözelti, kimyasalların karıştırılması
Manyetik karıştırıcı	Chiltern	Sıvı besiyeri, çözelti, kimyasalların karıştırılarak çözülmesi
Terazi	Scaltec	Kimyasal madde ve bakteri kültürlerinin tartımı
PH metre	Jenco	Besiyeri pH'sının ayarlanması
Mikroskop	Olympus BX51	Bakteri hücrelerinin morfolojileri ve hareket yeteneklerinin incelenmesi
Su banyosu	Clifton	Enzim aktivitesi deneylerinin gerçekleştirilmesi
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Micro 22R)	Biyokütle eldesi
Mikropipet seti	Gilson Pipetman Classic	1000µl'ye kadar hacimdeki sıvıların aktarılması
Microplate spektrofotometre	BioTek Instruments (µQuant)	Belirli dalga boylarında enzim aktivitesi ürünlerinin tespiti
Spektrofotometre	Unico (UV/VIS 2802 PC)	Bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunun ayarlanması
Spektrofotometre	Nanodrop (ND-1000)	DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi
Thermal Döngü Cihazı	MJ Research Tetrad 2	PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek
Jel dökümantasyon Sistemi	Vilber Lourmat (Quantum-capt)	Agaroz jellerin görüntülenmesi
Mikrodalga fırın	Arçelik	Agaroz jellerin homojenizasyonu
Yatay elektroforez tankı	Thermo Scientific (Owl A2)	Agaroz jellerin elektroforezi
Dikey elektroforez tankı	Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell (165-8003EDU)	Poliakrilamid jellerin elektroforezi
Güç kaynağı	Thermo Scientific (EC300XL2)	Elektroforez işlemlerinde elektrik enerjisi sağlamak
Kapiller elektroforez sistemi	Beckman Coulter (CEQ 8000)	DNA dizi analizi reaksiyon ürünlerinin elektroforezi

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi**

Bakterilerin izolasyonu amacı ile farklı illerden toplanan su, toprak ve çamur örnekleri, pH 10.0' luk Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerine 0.25-0.40 g veya 1ml olacak şekilde eklenip 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişmenin görüldüğü örneklerden steril % 0.85 tuz solüsyonu ile seri seyreltmeler yapıldıktan sonra, alkalen proteaz üreticisi izolatların izole edilmesi için seçici besiyerine (pH 7.0, 9.0, 10.0) ekim yapılmıştır. Alkalen proteaz üreticisi izolatların belirlenmesi için, Denizci ve arkadaşlarının (2004) uyguladığı Skim Milk Agar seçici besiyeri olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Proteolitik aktiviteye sahip izolatlar, 37°C'de 72 saat inkübasyonun ardından koloni çevresinde skim milkin hidrolizi sonucunda oluşan proteolitik zonun varlığına bağlı olarak belirlenmiştir.

### **3.2.2. Kalitatif olarak alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesi**

Alkalen proteaz aktivitesinin kalitatif analizi, Skim Milk Agar besiyerinde yapılmıştır. Bakteri izolatları pH 7.0, 9.0 ve 10.0' luk Skim Milk Agar'da oluşturdukları proteolitik zon çaplarının büyüklükleri (mm) bakımından karşılaştırılmıştır. Skim Milk Agar besiyerine inoküle edilen bakteri izolatları ve standart suşlar 37°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra koloni çevresinde oluşan proteolitik zon çapı (mm) ölçülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir.

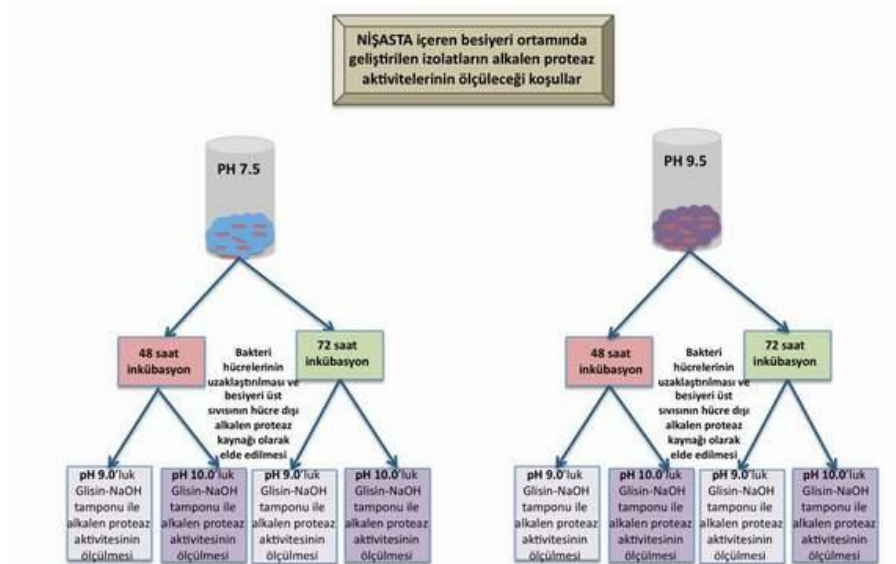
### **3.2.3. Kantitatif olarak alkalen proteaz aktivitesinin ölçülmesi**

*Bacillus* türlerinde hücre dışı proteaz sentezi, genellikle gelişimin durağan (sabit) fazında gerçekleşmektedir. Bu evrede enzimin hücresel fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamış olsa da, alkalen proteaz sentezi protein işlenmesi ve sporulasyon süreciyle korelasyon göstermektedir (Uehara *et al.* 1974, Chu *et al.* 1992).

Bu nedenlerle;

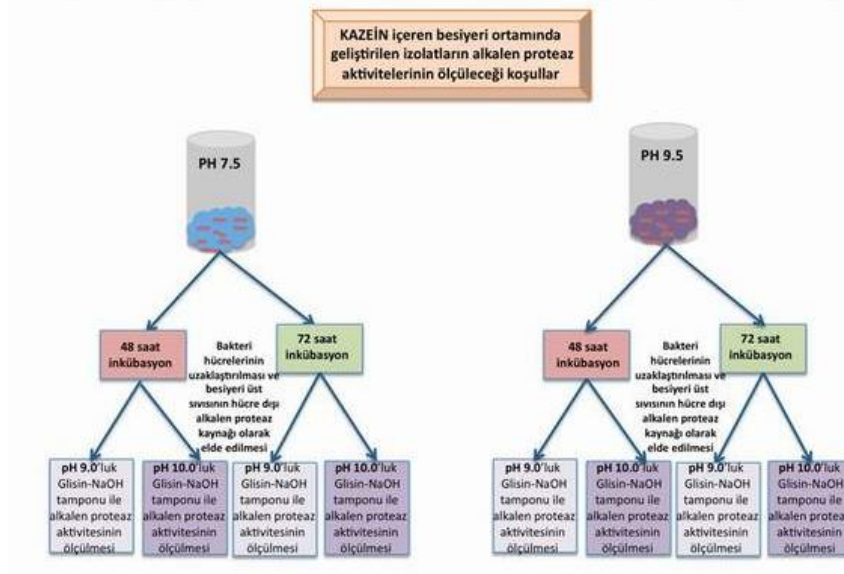
- Skim Milk Agar'da hidrolitik zon oluşturarak alkalen proteaz ürettiği belirlenen *Bacillus* izolatları, pH 7.5 (alkalotolerant ve fakültatif alkalifillerin gelişimi için) ve pH 9.5'lük (alkalifilik ve obligat alkalifillerin gelişimi için) kazein ve nişasta içeren iki farklı sıvı besiyerinde 48 ve 72 saat geliştirilmiştir.
- Belirtilen sürelerin sonunda, besiyeri üst sıvısının enzim kaynağı olarak kullanılmasıyla pH 9.0 ve 10.0'lük Glisin-NaOH tamponunda alkalen proteaz enzim aktiviteleri (U/ml) mikroplate okuyucuda spektrofotometrik olarak en az üç tekrarlı olarak ölçülmüş ve enzim aktivitesi toplam hücre pelet ağırlığına (g) oranlanarak da hücre başına düşen enzim aktivitesi hesaplanarak kantitatif verilere ulaşılmıştır.

İzolatların ve standart suşların alkalen proteaz üretim kapasiteleri yukarıda belirtilen parametreler doğrultusunda karşılaştırılmıştır. İlgili deney düzeneği Şekil 3.2. ve 3.3.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Nişastalı Sıvı Besiyeri'nde farklı sürelerle üretilen alkalen proteazın farklı pH değerlerinde ölçüm yolu





**Şekil 3.3.** Kazeinli Sıvı Besiyeri'nde farklı sürelerle üretilen alkalen proteazın farklı pH değerlerinde ölçüm yolu

### 3.2.3.1. Hücre dışı alkalen proteaz üretimi

Hücre dışı enzim elde etmek için pH 9.0'luk Skim Milk Agar besiyerinde 18 saat inkübasyon ile aktifleştirilen izolatlar ve standart suşlar, %0.85 tuz çözeltisinde süspansiyon edilmiş ve spektrofotometrik olarak 600 nm'de absorbansları 0.2-0.4 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Gessesse ve Gashe (1997) tarafından belirlenen Kazeinli Sıvı Besiyeri ve Denizci *et al.* (2004) tarafından belirtilen Nişastalı Sıvı Besiyeri alkalen proteaz üretimi için kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Sterilizasyon sonrasında besiyerlerinin pH'sı 7.5 (alkalotolerant izolatların gelişmesi için) ve 9.5 (alkalifil ve obligat alkalifil izolatların gelişmesi için) olarak ayarlanmıştır. 600 nm'deki optik yoğunlukları 0.2-0.4 olarak ayarlanan bakteri kültürleri, Kazeinli ve Nişastalı Sıvı Besiyerlerine %10 oranında aşılanıp 37°C'de, 200 rpm'de 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamları +4°C'de 5000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilip, bakteri peletinin yaş ağırlığı belirlenmiş ve besiyeri üst sıvısı alkalen proteaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### 3.2.3.2. Alkalen proteaz aktivite deneyi

Alkalen proteaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kazein kullanılmıştır. Aktivite deneyinde kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 3.2.'de verilmiştir. % 0.6 kazein (Sigma, C7078) içeren pH 9.0 ve 10.0'luk 50 mM Glisin-NaOH tamponunun 0.5 ml'si ile 0.1ml besiyeri üst sıvısı karıştırılarak 20 dakika 37°C'de inkübe edilmiş, reaksiyon 0.5 ml TCA solüsyonu ile durdurulduktan sonra 37°C'de 30 dakika bekletilip 14000 rpm'de 7 dakika (+4°C) santrifüj edildikten sonra süpernatantın 25 µl'si mikrolatellere alınmıştır.

25 µl süpernatanta 125 µl 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile 25 µl 1N Folin-ciocalteu's phenol reaktifi (Sigma, F9252) (1/2 oranında seyreltilmiş) eklenip, 30 dakika oda koşulunda inkübe edildikten sonra 660 nm'deki absorbans mikrolate okuyucuda ölçülmüştür. Enzim aktivitesi reaksiyonları üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir izolattan ve standart suştan pH 9.0 ve 10.0'luk ortamlarda ayrı ayrı üç tekrarlı olarak elde edilen proteaz enzim kaynağı, yine üç tekrarlı olarak ölçülmüş ve her bir ölçümün ortalaması alınmıştır.

### 3.2.3.3. Tirozin konsantrasyon eğrisi

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 12,5 mg/ml stok tirozin destile suda çözülmüş ve bu stok çözeltilerden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400 ve 500 µg/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmelerden 25 µl alınmış ve üzerine sırasıyla 125 µl 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma, S7795) ile 25 µl 1N Folin-ciocalteu's phenol (Sigma, F9252) reaktifi (1/2 oranında seyreltilmiş) eklenerek 30 dakika oda koşulunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her bir dilüsyonun 660 nm'deki optik yoğunluğu ölçülmüştür. Ekstinksiyon katsayısı, okutulan absorbansa karşı µM tirozin konsantrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanmıştır.

Bir ünite (U/ml) alkalen proteaz, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılacaktır (Erarslan vd 2005).

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/ml)} = \frac{(\text{OD660/eğim}) \times \text{Toplam Hacim}}{\text{Enzim Hacmi(ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi}}$$

OD: Optik yoğunluk

Eğim: Tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısı (0.001 µg/ml)

Toplam Hacim: Tüpte hazırlanan toplam hacim (1.1 ml)

Enzim Hacmi: 0.1 ml

İnkübasyon Süresi: 20 dakika

### **3.2.4. Kantitatif olarak alkalen α-amilaz aktivitesinin ölçülmesi**

Alkalen proteaz üretimi için kullanılmış olan Nişastalı Sıvı Besiyeri (Çizelge 3.1.) yüksek miktarda alkalen proteaz ürettiği belirlenen izolatların α-amilaz aktivitesinin belirlenmesi için de kullanılmıştır. Böylelikle karbon kaynağı olarak nişastanın kullanılmasının alkalen proteaz aktivitesine etkisi incelenmiştir.

#### **3.2.4.1. Hücre dışı α-amilaz üretimi**

Hücre dışı α-amilaz üretimi için izolatlar öncelikle pH 9.0'luk Skim Milk Agar besiyerinde 18 saat inkübasyon sonunda aktifleştirilmiştir. Bakterilerin absorbansları steril %0,85 NaCl varlığında 600 nm'de 0,2-0,4 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bölüm 3.2.3.1.' de alkalen proteaz üretiminde de kullanılan, Nişastalı Sıvı Besiyeri, α-amilaz üretimi için de kullanılmıştır. Besiyeri pH'sı 7.5 (alkalotolerant izolatların gelişmesi için) ve pH 9.5 (alkalifil ve obligat alkalifil izolatların gelişmesi için) olarak ayarlanmıştır. Optik danstitesi ayarlanan 7 izolat ve standart suşlar, sıvı besiyerlerine %10 oranında inoküle edilip, 37°C'de, 200 rpm'de 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamları +4°C'de 5000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilip, bakteri peletinin yaş ağırlığı belirlenmiş ve besiyeri üst sıvısı α-amilaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### 3.2.4.2. $\alpha$ -Amilaz aktivite deneyi

Standart suşlar ve yüksek kapasitede alkalen proteaz ürettiği belirlenen 7 izolatin  $\alpha$ -amilaz üretim kapasiteleri, substrat olarak kullanılan çözünebilir nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerine göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Aktivite deneyinde kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 3.3.'de verilmiştir. % 2 oranında çözünebilir nişasta (Scharlau, AL0715) içeren pH 9.0 ve 10.0'luk 50 mM Glisin-NaOH tamponunun 0.25 ml'si ile 0.25ml besiyeri üst sıvısı karıştırılarak 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiş, reaksiyon 0.5 ml DNS ayırıcı (Çizelge 3.3.) ile durdurulduktan sonra renk reaksiyonunun oluşması için 5 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. Tüpler soğutulduktan sonra 540nm dalga boyu kullanılarak spektrofotometrede, 0,5 ml substrat çözeltisi, 0,5 ml fosfat tamponu ve 1 ml DNS ayırıcı kullanılarak hazırlanan köre karşı okuma yapılarak standart eğriye göre maltoz oranı belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir izolattan ve standart suştan pH 9.0 ve 10.0'luk ortamlarda ayrı ayrı üç tekrarlı olarak elde edilen amilaz enzim kaynağı, yine üç tekrarlı olarak ölçülmüş ve her bir ölçümün ortalaması alınmıştır (Çalışkan 2011).

### 3.2.4.3. Maltozun ekstinksiyon katsayısının hesaplanması

$\alpha$ -amilaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltozun ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 50 mg/ml stok maltoz dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür. Bu stok çözeltiden pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu kullanılarak 1.25, 0.625, 0.5, 0.25, 0.125 olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların 0.5 ml'si üzerine 0.5 ml DNS ayırıcı eklenerek 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra 540nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşı mM maltoz konsantrasyon eğrisinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır (Çalışkan 2011).

Bir ünite (U/ml)  $\alpha$ -amilaz, dakikada 1  $\mu$ mol indirgen şeker (maltoz) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Çalışkan, 2011).

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times \text{Vf} \times \text{df}}{\epsilon_{540\text{nm}} \times t \times b \times \text{Ve}}$$

OD = Optik yoğunluk

$\Delta\text{OD} = \text{OD}_{540\text{nm}} \text{ Örnek} - \text{OD}_{540\text{nm}} \text{ Kör}$

Vf = Tüpte hazırlanan toplam hacim (1 ml)

Df = Dilüsyon faktörü

$\epsilon_{540\text{nm}} = \text{Maltozun } 540\text{nm}'\text{deki ekstinksiyon katsayısı}^*$

t = Reaksiyon zamanı (10 dakika)

b = Küvetin ışık geçiş yolu (1 cm)

Ve = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.25 ml)

\* : Ekstinksiyon katsayısı, enzim aktivitesinde uygulanan sıcaklığa göre L/mM.cm cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.2.5. İzolatlara ait bazı fenotipik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler**

#### **3.2.5.1. Gram boyama ve faz kontrast mikroskopik inceleme**

Nutrient Agar (Merck, 1.05450) besiyerinde 37°C'de 18-24 saat geliştirilmiş kültürlerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılarak immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Hücre morfolojileri ve hareket yetenekleri, 15 saatlik sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar ile Olympus BX51 faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Yine faz kontrast mikroskobu ile izolatların spor oluşturma özelliklerine göre spor pozisyonları ve şekilleri incelenmiştir. Spor oluşumu 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda belirlenmiş olup spor oluşturan izolatlar; spor şekli (Oval, Elipsoidal, Yuvarlak), vejetatif hücredeki spor pozisyonu (Sentral, Subterminal, Terminal) ve şişkinlik oluşturup oluşturmaması açısından incelenmiştir (Suzuki *et al.* 1976, Claus and Berkeley 1986, Nazina *et al.* 2001).

### **3.2.5.2. Koloni morfolojisi**

İzolatların koloni morfolojileri, Nutrient Agar (Merck, 1.05450) besiyerinde (pH 9.0) 37°C’de 18 saat geliştirildikten sonra belirlenmiştir.

### **3.2.5.3. Amilaz ve katalaz aktivitesi**

Amilaz aktivitesi, % 1 çözünür nişasta içeren pH 9.0’luk MI katı besiyerinde (Çizelge 3.1.) belirlenmiştir (Suzuki *et al.* 1976). Enzim aktivitesi, besiyerinde 37°C’de 24 saat geliştirilen kültürler lugol ayracı damlatılarak incelenmiş, koloni etrafında, nişastanın parçalanması sonucu oluşan zonun büyüklüğüne göre izolatlardaki amilaz aktivitesi belirlenmiştir (Claus and Berkeley 1986, Suzuki *et al.* 1976).

Katalaz ativitesi, pH 9.0’luk Nutrient Agar (Merck, 1.05450) besiyerinde 37°C’de 18-24 saat inkübe edildikten sonra lam üzerine süspanse edilen kültüre % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, H1009) damlatılmasıyla belirlenmiştir (Claus and Berkeley 1986).

### **3.2.5.4. pH optimumu, sıcaklık optimumu ve tuz toleransının belirlenmesi**

Bakteri izolatlarının pH optimumlarını belirlemek için, pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 11.5, 12.0 12.5 ve 13.0 ’lük Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerinde 37°C’de 24-48 saatlik gelişimleri gözlenmiştir (Sneath and Sokal 1973, Nielsen *et al.* 1995).

Sıcaklık optimumunun belirlenmesi için, pH10’luk Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerinde 5, 30, 40, 50, 55, 60 ve 70°C’de 24-48 saatlik gelişimleri gözlenmiştir (Sneath and Sokal 1973, Nielsen *et al.* 1995).

İzolatların tuza toleranslarını belirlemek amacı ile pH 10.0’luk Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerine % 2, 5, 7, 10 konsantrasyonlarında NaCl (Merck, 1.06400) eklenerek 37°C’de 24-48 saatlik gelişimleri gözlenmiştir (Sneath and Sokal 1973, Nielsen *et al.* 1995).

### 3.2.6. Bazı moleküler taksonomi teknikleriyle sınıflandırma

Tez kapsamında araştırılan izolat ve standart suşlara uygulanan moleküler taksonomi teknikleri şu şekildedir; 16S rRNA geninin PCR ile çoğaltılması, 16S rRNA geninin DNA dizi analizi, ITS-PCR, nükleik asit parmak izi tekniklerinden rep-PCR, Box-PCR ve ARDRA analizi (ribotiplendirme).

#### 3.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

İzolatların genomik DNA izolasyonu *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.* 1997) Bölüm 2.4.1-2.4.5' de bulunan bakteriyal DNA izolasyon protokolüne RNase A ilavesi ile modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. İzolatlar ve standart suşlar pH 9.0'luk Nutrient agar (Merck, 1.05450) besiyerinde 14-15 saat aktifleştirildikten sonra pH 9.0 olan 5 ml Nutrient Broth (Merck, 1.05443) besiyerine tek koloniden ekim yapılarak 14 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir kültürden 1.5 ml alınarak 12,000 rpm'de 5 dakika (+4C) santrifüj edilmiştir. Besiyeri üst sıvısı atılarak hücreler Tris-EDTA tamponunda çözülerek %10'luk SDS (Sigma, L3771) çözeltisinden 145µl ve 20mg/ml Proteinaz K (Fermentas, EO0491) çözeltisinde 3µl eklenip karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 100 µl 5M NaCl (Merck, 1.06400) ve 80 µl CTAB/NaCl solüsyonundan eklendikten sonra 65°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenip alt üst edilip santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) (Sigma, 77617) eklenip alt üst edilip santrifüj edildikten sonra bu aşama tekrar edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak 0.6 ml isopropanol (Panreac, 141090.1212) eklenerek DNA görünür hale gelene dek alt-üst edilmiş ve santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Üst faz dökülüp %70'lik etanol eklendikten sonra santrifüj edilerek DNA peletinin yıkanması sağlanmıştır. Tüpler ters çevrilerek oda koşulunda kurutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Pelet 50-100 µl distile su içerisinde parmakla vurularak çözülmüş ve 10 mg/ml RNase A (Sigma, R-6513) solüsyonundan 4-5 µl eklenerek 37°C'de 45 dk inkübe edilerek RNA'lar uzaklaştırılmıştır.

İzole edilen DNA moleküllerinin saflığı ve bütünlüğü %1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendikten sonra mikroplate okuyucu cihazı kullanılarak DNA miktarları (ng/μl) ve temizlik kontrolü 260, 280 ve 230 nm'deki absorbanları dikkate alınarak 260/280 ve 260/230 oranları ile belirlenmiştir.

### **3.2.6.2. 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması**

Alkalin proteaz üreten izolatların yaklaşık 1500 bç'lik 16S rRNA geni, bakterilere özgü **27F** (5'AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3') ve **1492R** (5'GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3') primerleri kullanılarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılmıştır. Standart suşlara ait 16S rRNA dizileri NCBI internet sitesinin 'nucleotide' veri tabanından temin edilmiştir. PCR reaksiyonları Çizelge 3.7.'de miktarları belirtilen Solis BioDyne marka PCR reaktifleri (Solis BioDyne, 01-01-00500) ve Çizelge 3.8.'deki termal döngü koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PCR sonucunda elde edilen ürünlerin büyüklüğü, 1kb'lık DNA markerı (Fermentas, SM1343) kullanılarak 1X TBE tamponu ile % 2'lik agaroz jelde (Çizelge 3.4.) elektroforeze tabi tutulduktan sonra, jel dökümantasyon sisteminde görüntülenerek doğrulanmıştır.



**Çizelge 3.7.** 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
10X Taq tamponu	5
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, 25 mM)	2
dNTP (Fermentas, 10 mM)	1
F Primer (50 pmol/µl)	0.3
R Primer (50 pmol/µl)	0.3
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0.2
dH <sub>2</sub> O	38.6
DNA (200ng/ µl)	2.5
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50</b>

**Çizelge 3.8.** 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan termal döngü koşulları

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
95	4 dk	1
95	1dk	
58	1dk	35
72	3 dk	
72	7 dk	1
10	∞	1

### 3.2.6.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması

DNA dizi analizinden önce, 16S rRNA PCR ürünleri, primerler ve dNTP'ler gibi reaksiyon artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması için Norgen marka PCR saflaştırma kiti (Norgen 34500) ile saflaştırıldıktan sonra, tekrar 1kb DNA marker (Fermentas, SM1343) kullanılarak ) 5X tamponu ile %2'lik agaroz jelde (Çizelge 3.4.) elektroforeze tabi tutulmuştur.

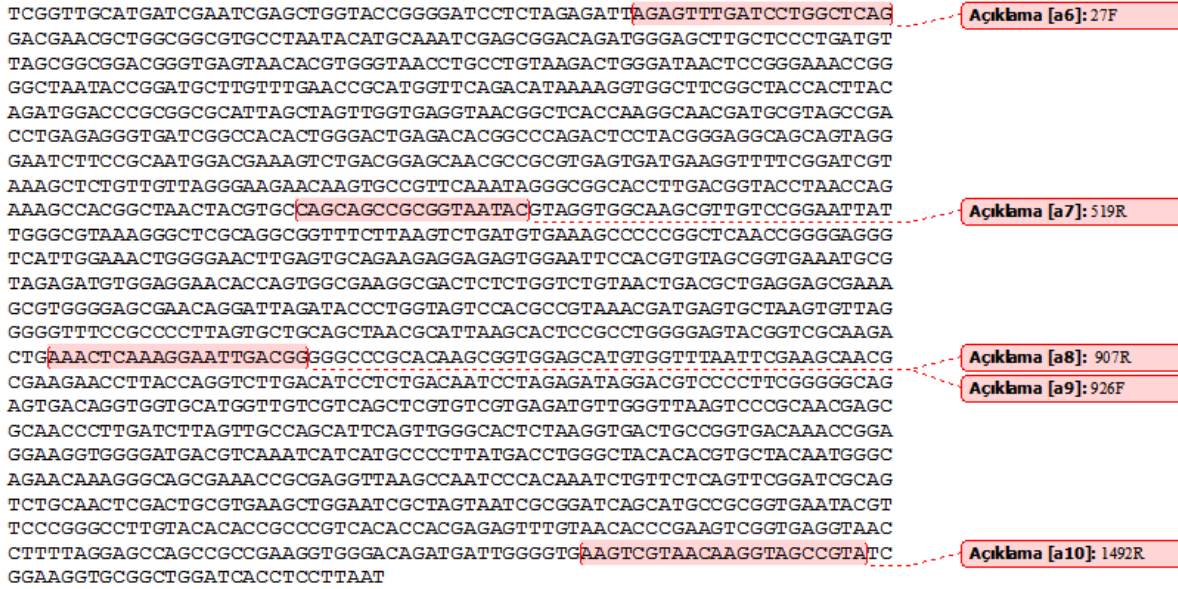
### 3.2.6.4. 16S rRNA geni dizi analizi

DNA dizi analizinde kullanılan kapiller elektroforez sistemi (Beckman Coulter CEQ 8000, A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı) bir defada yaklaşık 500-600 bp uzunluğundaki bölgenin dizisini çıkartabilmektedir. 27F ve 1492R primerleri ile elde edilen PCR ürünleri sekans reaksiyonlarında kalıp DNA molekülü olarak kullanılmıştır. 1500 bp'lik PCR ürününün dizisinin *tamamını* aydınlatabilmek için her bir örnek için ileri (forward) ve geri (reverse) primerleri kapsayan 5 primer (27F, 519R, 907R, 926F, 1492R) ile sekans reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizinde kullanılan bu primerler ve dizileri Çizelge 3.9.'da verilmiştir. Primerlerin 16S rRNA geni üzerindeki lokasyonları Şekil 3.4.'te verilmiştir.

Floresan işaretli dideoksinikleotidlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen zincir sonlanma PCR deneyi (sekans reaksiyonu) Beckman Coulter tarafından belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sekans reaksiyonu için kullanılan 'Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit' (Beckman Coulter, 608000) içerisinde bulunan master mix ddNTP, dNTP, DNA Polimeraz ve tampon ortamını ihtiva etmektedir. Sekans reaksiyonları Çizelge 3.10.'da miktarları belirtilen reaktifler ve Çizelge 3.11.'deki termal döngü koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.9.** 16S rRNA geni dizi analizinde kullanılan primerler ve dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
27F	5'AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'
519R	5'-GWA-TTA-CCG-CGG-CKG-CTG-3'
926F	5'-AAA-CTC-AAA-GGA-ATT-GAC-GG-3'
907R	5'-CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT-3'
1492R	5'GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'



**Şekil 3.4.** DNA dizi analizinde kullanılan primerlerin 16S rRNA geni üzerindeki lokasyonları

**Çizelge 3.10.** Sekans reaksiyonu için uygulanan PCR protokolü

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
DTCS Qick start master mix	4
F veya R Primer (1.6 pmol/µl)	1
Betain (5M)	2
saflaştırılmış PCR ürünü	2-3
ddH <sub>2</sub> O	2-3
<b>Toplam Hacim</b>	<b>10</b>

**Çizelge 3.11.** Sekans reaksiyonu için uygulanan termal döngü koşulları

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
96	3 dk	1
96	20 sn	
55	20 sn	35
60	4 dk	
10	∞	1

Zincir sonlanma reaksiyon ürünlerinin purifikasyonunda “Etanol Presipitasyonu” yöntemi kullanılmıştır. Tüplere sırasıyla 1 µl 3 M Na-asetat (Sigma, S2889) (pH 5.2), 10µl dizileme reaksiyonu PCR ürünü, 1 µl 125mM EDTA (Sigma, E7889) (pH 8.0), 35 µl %100 etanol eklendikten sonra hafifçe vortekslenmiştir. 15 dk oda koşulunda inkübe edildikten sonra 20 dk 14,000 rpm’de (+4°C) santrifüj edilmiştir. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 135 µl %70’lik etanol eklenip 10 dk 14,000 rpm’de (+4°C) santrifüj edilmiştir. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra %70’lik etanol ile yıkama aşaması tekrar edilmiştir. Tüpler havlu kağıt üzerine ters çevrilerek pelletin kuruması sağlanmıştır. Pellet üzerine 20 µl Formamid (GE Healthcare UK, MegaBACE Loading Solution 93-79916-40ml) eklenip, hafifçe vortekslenerek ve pipetleme yapılarak pellet çözülmüştür.

Örnekler Beckman Sample Plate'e yüklenip ve üzerlerine birer damla mineral oil eklenmiş, Beckman Buffer Plate'e kuyuların ¾'ü dolacak şekilde separation buffer eklendikten sonra, her iki plate de cihaza yüklenerek kapiler elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6.5. 16S rRNA geninin dizilenmesiyle gerçekleştirilen filogenetik analizler**

DNA dizi analizi sonucunda elde edilen DNA dizileri daha önce çalışılmış mevcut referans suşlarla homolojilerini araştırmak için, NCBI internet sitesindeki BLASTN arama programı kullanılmıştır. İzolat ve standart suşların 16S rRNA gen dizileri Clustal W programı kullanılarak sıralanmıştır (Thompson *et al.* 1994). Ağaç mesafesi matrisi Jukes ve Cantor'un (1969) algoritması temel alınarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağaç, MEGA 4.1 programı kullanılarak neighbour-joining metodu ile oluşturulup, bootstrap numunelemesi (1000 replicates) ile değerlendirilmiştir (Kumar *et al.* 2004).

### **3.2.6.6. İntergenik 16S-23S rRNA geninin PCR reaksiyonu (ITS-PCR) ile sınıflandırma**

S-D-Bact-1494-a-S-20 (5'-GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA-3') ve L-D-Bact-0035-a-A-15 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') primerleri, tüm izolat ve standartların 16S ve 23S rRNA genlerinin arasındaki ITS bölgesini (Intergenic Transcribed Spacers) çoğaltmakta kullanılmış olup, PCR koşulları Daffonchio ve arkadaşlarına (2003) göre uygulanarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. ITS PCR reaksiyonları, Çizelge 3.12.'de miktarları belirtilen Solis BioDyne marka PCR reaktifleri (Solis BioDyne, 01-01-00500) ve Çizelge 3.13.'teki termal döngü koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen ITS-PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde 1X TBE tamponu (Çizelge 3.4.) kullanılarak 120 V'da 4 saat koşurulmuştur. Görüntülenen parmak izi profilleri, Gel Compare II software (Applied Maths, Belgium) programı ile oluşan DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğü analiz edilerek izolatların genotipik çeşitlilikleri araştırılmıştır.

**Çizelge 3.12.** ITS-PCR için uygulanan protokol

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
10X Taq tamponu	5
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, 25 mM)	5
dNTP (Fermentas, 20 mM)	0,5
F Primer (50 pmol/µl)	0.3
R Primer (50 pmol/µl)	0.3
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0.3
dH <sub>2</sub> O	36.6
DNA (200ng/ µl)	2
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50</b>

**Çizelge 3.13.** ITS-PCR için uygulanan termal döngü koşulları

<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
94	4 dk	1
94	1 dk	
55	7 dk	35
72	2 dk	
72	7 dk	1
10	∞	1

### 3.2.6.7. Tekrar eden (GTG)<sub>5</sub> ve BOX elementlerinin PCR ile çoğaltılması

Tekrar eden (GTG)<sub>5</sub> ve BOX elementlerinin genomik parmak izi analizleri (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') ve BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') primerleri ile ve Versalovic ve arkadaşlarının (1994) tanımladığı PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir. Her iki tekrar elementi için de uygulanan PCR protokolü, primerler hariç aynıdır (Çizelge 3.14). Termal döngü koşulları ise her iki PCR için farklılık göstermektedir (Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16).

Elde edilen (GTG)<sub>5</sub> ve BOX PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde 1X TBE tamponu (Çizelge 3.4.) kullanılarak 120 V'da 4 saat koşturulmuştur. Görüntülenen parmak izi profilleri, Gel Compare II software (Applied Maths, Belgium) programı ile oluşan DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğü analiz edilerek izolatların genotipik çeşitlilikleri araştırılmıştır.

**Çizelge 3.14.** Tekrar elementleri için uygulanan PCR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
Gitsher tamponu (5X)	4
DMSO(AppliChem, A3006)	2,5
dNTP (Fermentas, 20 mM)	0,63
Primer (50 pmol/µl)	0.3
BSA (Sigma, B4287)	1,25
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0.21
dH <sub>2</sub> O	13,61
DNA (200ng/ µl)	7,5
<b>Toplam Hacim</b>	<b>30</b>

**Çizelge 3.15.** (GTG)<sub>5</sub>-PCR için uygulanan termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
94	7 dk	1
94	30 sn	
45	1 dk	30
65	8 dk	
65	15 dk	1
10	∞	1

**Çizelge 3.16.** BOX-PCR için uygulanan termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
94	7 dk	1
94	1 dk	
53	1 dk	30
65	8 dk	
65	15 dk	1
10	∞	1



### 3.2.6.8. ARDRA Analizi (Ribotiplendirme)

Ribotiplendirme, 16S rRNA geninin 27F-1492R primerleriyle çoğaltılmasıyla elde edilen PCR ürünü restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Hem standart suşların hem de izolatların PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 5 µl 16S rRNA gen bölgesi, 30 µl son hacimde ***AluI*** (Fermentas, FD0014), ***HaeIII*** (Fermentas, FD0154), veya ***Taq I*** (Fermentas, FD0674) restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve oluşan kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Enzim kesim bantlarının sayısı ve büyüklüğüne göre izolatlar, standartlar bakteriler ile karşılaştırılmış ve belirli taksonomik gruplara ayrılmışlardır (Caccamo *et al.* 2000). Kesim reaksiyonları, Çizelge 3.17.'de miktarları belirtilen Fermentas DastDigest reaktifleri ile, Çizelge 3.18'de belirtilen sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Restriksiyon enzimleriyle elde edilen kesim ürünleri %1.5 agaroz jelde 1X TBE tamponu (Çizelge 3.4.) kullanılarak 120 V'da 4 saat koşturulmuştur. Görüntülenen parmak izi profilleri, Gel Compare II software (Applied Maths, Belgium) programı ile oluşan DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğü analiz edilerek izolatların genotipik çeşitlilikleri araştırılmıştır.

**Çizelge 3.17.** Restriksiyon enzimleriyle kesim protokolü

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
ddH <sub>2</sub> O	17
10X FastDigest Green Buffer	2
PCR ürünü	10
Restriksiyon enzimi	1
<b>Toplam Hacim</b>	<b>30</b>

**Çizelge 3.18.** Restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirilen kesim koşulları

Restriksiyon Enzimi	Sıcaklık (°C)	Süre
Alu	37	15 dk
	65	5 dk
HaeIII	37	5 dk
TaqI	65	5dk

### 3.2.6.9. Toplam hücre protein profilinin SDS-PAGE ile belirlenmesi

Toplam hücre protein profillerinin incelenmesi için, optik yoğunluğu (OD 660nm) 0.2-0.4'ye ayarlanan 18 saatlik aktif bakteri kültürü, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (5 mg/ml) içeren Nutrient Broth'a (Merck, 1.05443) (pH 9.0) %10 oranında aşlandıktan sonra (Claus and Berkeley 1986) 37°C'de 18 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Protein ekstraksiyonu için 5 ml'lik kültürler 5000rpm'de 10 dakika (+4°C) santrifüj edilerek bakteri peleti çöktürülecek ve soğuk % 0.85 NaCl solüsyonu ile 3'er kez yıkanmıştır.

Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE'i Laemmli (1970)'e göre, % 4'lük yığıma jeli ve % 10'luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5.). Toplam protein SDS-örnek tamponu kullanılarak ekstrakte edilmiş ve 3 dakika kaynatılarak denatüre edilmiştir. Ekstraktlardaki protein miktarının yarı kantitatif tayini için spot test yapılmıştır (Esen 1978). Örnekler yüklendikten sonra sırası ile 25 ve 30 mA'de elektroforez işlemi yapılmış, jel bir gece Coomassie Brilliant mavisinde boyandıktan sonra dekolorize edilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Bakteri İzolatları ve Standart *Bacillus* Suşları

#### 4.1.1. Standart *Bacillus* Suşları

Tez kapsamında 12 adet standart *Bacillus* suşu kullanılmıştır. Bu suşlardan 3'ü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarımızdan, 9'u ise DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)'den temin edilmiştir (Çizelge 4.1.)

**Çizelge 4.1.** Tez kapsamında kullanılan standart suşlar

No	Standart Suş
1	<i>Bacillus alcalophilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>
2	<i>Bacillus agaradhaerens</i> DSM 8721 <sup>T</sup>
3	* <i>Bacillus coagulans</i> DSM 1 <sup>T</sup>
4	* <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>
5	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307 <sup>T</sup>
6	<i>Bacillus pseudocaliphilus</i> DSM 8725 <sup>T</sup>
7	* <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup>
8	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719 <sup>T</sup>
9	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup>
10	<i>Bacillus halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>
11	<i>Bacillus gibsonii</i> 8722 <sup>T</sup>
12	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 1971

\*; Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilen suşlar

#### 4.1.2. Alkalifilik *Bacillus* izolatları

Tez kapsamında 7 ildeki (Antalya, Aksaray, Burdur, Elazığ, Kastamonu, Konya ve Kırıkkale) farklı su kaynaklarından alınan su, toprak ve çamur örnekleri, alkalifilik bakterilerin gelişmesi için pH 10.0'luk Nutrient Broth'a ekilmiştir. Gelişme görülen kültürlerden alkalen proteaz üreticisi izolatların seçilmesi için pH 7.0, 9.0 ve 10.0'luk Skim Milk Agar besiyerlerine tekrar ekim yapıldıktan sonra proteolitik zon oluşturan izolatlar seçilmiştir.

Bu izolatlardan 25 adetinin *Bacillus* cinsinin temel karakterlerini (Gram pozitif, endospor oluşturan, basil şeklinde) taşıdığı belirlenmiştir (Claus and Berkeley 1984, Nazina *et al.* 2001, Nicolaus *et al.* 2004) (Çizelge 4.2.).

Bunun yanı sıra, A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür stoklarında bulunan ve değişik kaynaklardan izole edilmiş Gram pozitif, endospor oluşturan basil izolatlar pH 7.0, 9.0 ve 10.0'luk Skim Milk Agar'da proteolitik zon oluşturmaları bakımından incelenerek 31 izolat araştırmaya dahil edilerek (Çizelge 4.3.) standart suşlarla birlikte 68 bakteri örneğinin materyal olarak araştırılmasına karar verilmiştir (56 bakteri izolatu + 12 standart suş=68).

**Çizelge 4.2.** Tez kapsamında izole edilen alkalifilik bakteri izolatları

No	İzolat	Numune	Numunenin alındığı yer
1	APT10	Toprak	Hazar Gölü (Diyarbakır'a yakın kıyısından)
2	APT11	Toprak	Hazar Gölü (Diyarbakır'a yakın kıyısından)
3	APT12	Toprak	Hazar Gölü (Diyarbakır'a yakın kıyısından)
4	APT13a	Çamur	Hazar Gölü (Diyarbakır'a yakın kıyısından)
5	APT14	Çamur	Hazar Gölü (Diyarbakır'a yakın kıyısından)
6	APT20b	Çamur	Hazar Gölü (Sivrice Beldesi-Elazığ Merkeze 30km)
7	APT23	Toprak	Sulu Ada (Adrasan-Antalya)
8	APT24	Toprak	Sulu Ada (Adrasan-Antalya)
9	APT25	Toprak	Sulu Ada (Adrasan-Antalya)
10	APT26	Toprak	Sulu Ada (Adrasan-Antalya)
11	APT30	Toprak	Acısu Deresi (Başköy-Kastamonu)
12	APT32	Su	Burdur Gölü (Burdur) pH8,96
13	APT34	Çamur	Burdur Gölü (Burdur) pH8,96
14	APT35	Toprak	Burdur Gölü (Burdur) pH8,96
15	APT36	Toprak	Burdur Gölü (Burdur) pH8,96
16	APT37	Su	Güvercinlik Mağarası, -130 metre derinlikteki dikey mağara, Güneysınır ilçesi (Konya) pH8,36
17	APT38	Su	Güvercinlik Mağarası, -130 metre derinlikteki dikey mağara, Güneysınır ilçesi (Konya) pH8,36
18	APT39	Toprak	Güvercinlik Mağarası, -130 metre derinlikteki dikey mağara, Güneysınır ilçesi (Konya) pH8,36
19	APT40	Toprak	Güvercinlik Mağarası, -130 metre derinlikteki dikey mağara, Güneysınır ilçesi (Konya) pH8,36
20	APT41	Toprak	Güvercinlik Mağarası, -130 metre derinlikteki dikey mağara, Güneysınır ilçesi (Konya) pH8,36
21	APT42	Çamur	Avlan Gölü (Antalya)
22	APT43	Su	Avlan Gölü (Antalya) pH8,0
23	APT44	Çamur	Kükürtlü Su (Antalya-İçme)
24	APT47	Su	Kükürtlü Su (Antalya-İçme) pH7,74
25	APT48	Çamur	Burguç Şifalı Su Kaynağı (Antalya)

**Çizelge 4.3.** Kültür stoklarından temin edilen izolatlar

No	İzolat Kodu	Numune	Numunenin Alındığı Yer
1	APT1	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
2	APT2	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
3	APT5	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
4	APT8	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
5	APT9	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
6	TG11	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
7	TG20	Toprak	Yükseloto Yıkama Tesisi, Beşevler-Ankara
8	A107	Sediment	MTA Kuyusu-Aktaş Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
9	A111	Toprak	MTA Kuyusu-Aktaş Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
10	A131	Sediment	MTA Kuyusu-Horçayı Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
11	A151	Sediment	MTA Kuyusu-Horçayı Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
12	A185	Sediment	MTA Kuyusu, Ömerbeyli mezarlığı yanı, Delimehmet Durağı , Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
13	A325	Toprak	MTA Kuyusu-Horçayı Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
14	A331	Toprak	MTA Kuyusu-Horçayı Mevkii, Germencik-Ömerbeyli köyü-Aydın
15	A363	Toprak	MTA Kaynağı (Kaynak kuru), Salavatlı-Yavuz Köy-Aydın
16	B16	Su	TUR-KAP Turgutlu Kaplıcaları (70C-pH6.7), Turgutlu-Urganlı Mevkii, Manisa
17	B65	Toprak	TUR-KAP Turgutlu Kaplıcaları (70C-pH6.7), Turgutlu-Urganlı Mevkii, Manisa
18	C83ca	Su	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası (75°C-pH 7.7), Çavuşoğlu mevkii, Denizli
19	C91	Su	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası (75°C-pH 7.7), Çavuşoğlu mevkii, Denizli
20	C92	Su	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası (75°C-pH 7.7), Çavuşoğlu mevkii, Denizli
21	C234	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
22	C235	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
23	C236	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
24	C241	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
25	C244	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli

#### Çizelge 4.3. Kültür stoklarından temin edilen izolatlar (Devam)

No	İzolat Kodu	Numune	Numunenin Alındığı Yer
26	C251	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
27	C265	Toprak	Buharkent/Sarayköy-Tekkehamam/Tekkeköy Mevkii, Çavuşoğlu Kaplıcası, Çavuşoğlu mevkii, Denizli
28	D311	Su	Seferhisar-Doğanbey Mevkii, İzmir
29	E114	Sediment	Kozaklı Şehir Hamamı yanı (96°C, pH7.5)-Altınsu Mahallesi, Nevşehir
30	E215	Toprak	Kozaklı Belediye Kaplıcası (Bağlıca vadisi içi), Nevşehir
31	E287	Sediment	Kozaklı Şehir Hamamı yanı-Altınsu Mahallesi, Nevşehir

## 4.2. Alkalen Proteaz Aktivitesi

### 4.2.1. Bakteri izolatlarının kalitatif alkalen proteaz aktivitesi

Skim Milk Agar besiyerindeki skim milk hidrolizi sonucu proteolitik zon oluşturan izolatlar, alkalen proteaz üreticisi olarak belirlenmiştir. Şekil 4.1.'de bazı izolatların Skim Milk Agar'da (pH7.0, 9.0, 10.0) 72 saat inkübasyon sonrası oluşturduğu proteolitik zonlar verilmiştir.



Şekil 4.1. APT30, APT2 ve APT37 kodlu izolatların Skim Milk Agar'da (pH 7.0, 9.0 ve pH 10.0) oluşturduğu proteolitik zonlar

3 adet izolatın (APT1, APT8 ve A107) ve bir adet standart suşun (*B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>) pH 10.0'luk Skim Milk Agar'da gelişme göstermediği, APT41 kodlu izolatın ve standart suş *B.agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>'in ise pH 7.0'lik Skim Milk Agar'da gelişme göstermediği belirlenmiştir. Belirtilen 4 izolatın dışında kalan 52 izolat ve 11 adet standart suş pH 7.0, 9.0 ve 10.'luk Skim Milk Agar'da gelişerek proteolitik zon oluşturabilmektedir.

Araştırılan izolatlar içerisinde C265 kodlu izolatın, pH 7.0 ve 9.0'luk Skim Milk Agar'da en geniş proteolitik aktivite zonunu oluşturduğu belirlenmiştir (sırasıyla; 9 mm ve 6 mm).

pH 10.0'luk Skim Milk Agar'da ise *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup> ve *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup> standart suşlarının en geniş proteolitik aktivite zonunu oluşturduğu (sırasıyla 7 mm ve 5 mm), B16 kodlu izolatın ise bu suşlardan sonra en geniş zonu oluşturduğu (4 mm) belirlenmiştir. Çizelge 4.4.'te izolatlar ve standart suşların pH 7.0, 9.0 ve 10.0'luk Skim Milk Agar'da 72 saat gelişim sonrasında oluşturdukları proteolitik zon çapları verilmiştir.



**Çizelge 4.4.** Skim Milk Agar'da 72 saat inkübasyon sonrasında ölçülen proteolitik zon çapları

No	İzolat Kodu	pH 7.0	pH 9.0	pH 10.0
1	APT1	*	2mm	-
2	APT2	0,5mm	0,5mm	≤0,5mm
3	APT5	**	0,5mm	1mm
4	APT8	0,5mm	≤0,5mm	-
5	APT9	*	*	1mm
6	APT10	2mm	4mm	*
7	APT11	4mm	3mm	2mm
8	APT12	5mm	4mm	1,5mm
9	APT13a	4,5mm	6mm	0,5mm
10	APT14	4mm	4mm	*
11	APT20b	**	3,5mm	1mm
12	APT23	4,5mm	2mm	0,5mm
13	APT24	1mm	1mm	1,5mm
14	APT25	1mm	1mm	1mm
15	APT26	1,5mm	1mm	*
16	APT30	4mm	5mm	1mm
17	APT32	3mm	3,5mm	4mm
18	APT34	1mm	6mm	2mm
19	APT35	1mm	5mm	3mm
20	APT36	1mm	1mm	***
21	APT37	5mm	5mm	3mm
22	APT38	2mm	2mm	1mm
23	APT39	3mm	4mm	2mm
24	APT40	1mm	1mm	1mm
25	APT41	-	*	*
26	APT42	*	*	2mm
27	APT43	3mm	2mm	*
28	APT44	1mm	1mm	*
29	APT47	3mm	1mm	≤0,5mm
30	APT48	1mm	1mm	≤0,5mm
31	TG11	3mm	1mm	*
32	TG20	0,5mm	1mm	*
33	A107	6mm	1,5mm	-
34	A111	2mm	1mm	1mm
35	A131	6mm	4mm	1mm

\*; tek koloni olarak proteolitik zon oluşturulmamış ancak grup halindeki kolonilerin etrafında proteolitik zon mevcut, \*\*; proteolitik zon besiyerinin yalnızca ilk ekim bölgesinde mevcut \*\*\*; bakteri gelişimi mevcut ancak proteolitik zon yok, -; bakteri gelişimi yok

**Çizelge 4.4.** Skim Milk Agar'da 72 saat inkübasyon sonrasında ölçülen proteolitik zon çapları (Devam)

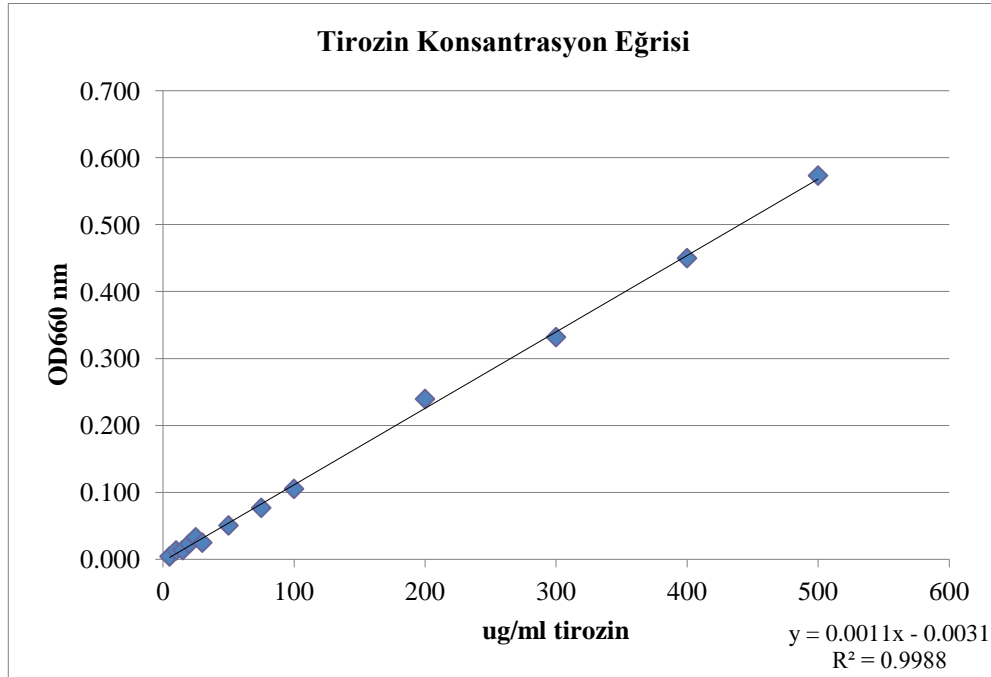
No	İzolat Kodu	pH 7.0	pH 9.0	pH 10.0
36	A151	2mm	3mm	1mm
37	A185	7mm	5mm	1mm
38	A325	7mm	4,5mm	**
39	A331	6mm	4mm	1mm
40	A363	7mm	4mm	1mm
41	B16	5,5mm	5mm	4mm
42	B65	3,5mm	2mm	2mm
43	C83ca	1mm	1mm	1mm
44	C91	1mm	2mm	1mm
45	C92	1mm	1,5mm	1mm
46	C234	3mm	4mm	2mm
47	C235	5mm	5mm	3,5mm
48	C236	4,5mm	4,5mm	2,5mm
49	C241	4,5mm	3,5mm	3mm
50	C244	4mm	3mm	2mm
51	C251	4mm	3,5mm	1,5mm
52	C265	9mm	6mm	1mm
53	D311	8mm	1,5mm	0,5mm
54	E114	2,5mm	1mm	1mm
55	E215	6mm	3,5mm	1mm
56	E287	5mm	3,5mm	1mm
57	<i>B. alcalophilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	**	*	1,5mm
58	<i>B. agaradhaerens</i> DSM 8721 <sup>T</sup>	-	*	5mm
59	<i>B. coagulans</i> DSM 1 <sup>T</sup>	1mm	1,5mm	2mm
60	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>	4,5mm	3mm	-
61	<i>B. cohnii</i> DSM 6307 <sup>T</sup>	**	*	*
62	<i>B. pseudocaliphilus</i> DSM 8725 <sup>T</sup>	**	**	1mm
63	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	1,5mm	2,5mm	2,5mm
64	<i>B. horikoshii</i> DSM 8719 <sup>T</sup>	**	1mm	≤0,5mm
65	<i>B. clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup>	3mm	3mm	1mm
66	<i>B. halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	1mm	2mm	1mm
67	<i>B. gibsonii</i> 8722 <sup>T</sup>	**	3mm	7mm
68	<i>B. subtilis</i> DSM 1971	6mm	3,5mm	0,5mm

\*; tek koloni olarak proteolitik zon oluşturulmamış ancak grup halindeki kolonilerin etrafında proteolitik zon mevcut, \*\*; proteolitik zon besiyerinin yalnızca ilk ekim bölgesinde mevcut \*\*\*; bakteri gelişimi mevcut ancak proteolitik zon yok, -; bakteri gelişimi yok

## 4.2.2. Bakteri izolatlarının kantitatif alkalen proteaz aktivitesi

### 4.2.2.1. Tirozin ekstinksiyon katsayısı

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan tirozinin mikromolar ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için hazırlanan dilüsyonların optik yoğunluğu 660nm'de spektrofotometrede okutulmuş, okutulan absorbansa karşı  $\mu\text{M}$  tirozin konsantrasyon eğrisi çizilerek eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır. Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için çizilen tirozin konsantrasyon eğrisi Şekil 4.2.'de verilmiş olup, alkalen proteaz aktivitesi hesaplanırken  $0.0011 \mu\text{M}/\text{ml}$  olarak bulunan ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Tirozinin ekstinksiyon katsayısının belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon eğrisi

#### 4.2.2.2. Bakteri izolatlarının alkalen proteaz üretim değerleri

Skim Milk Agar'da proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenen bakteri izolatlarının, Nişastalı ve Kazeinli, pH 7.5 ve pH 9.5'luk sıvı besiyerlerinde 48 ve 72 saatlik gelişimlerinin ardından, besiyeri üst sıvısı alkalen proteaz enzimi kaynağı olarak kullanılmış ve alkalen proteaz aktivitesi substrat olarak %0.6 kazein içeren pH 9.0 ve 10.0 olmak üzere 2 farklı Glisin-NaOH tamponu kullanılarak belirlenmiştir. Hücre başına düşen enzim üretim miktarı (U/ml/g), enzim aktivitesi (U/ml) bakteri yaş ağırlığına (g) bölünerek hesaplanmıştır.

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları genel olarak 353-103125 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. E114 kodlu izolatın pH 7.5'luk, C265 kodlu izolatın ise pH 9.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonucunda aynı miktarda enzim ürettiği ve hem bakteri izolatları hem de standart suşlar arasında en yüksek alkalen proteaz üreten izolatlar olduğu belirlenmiştir (103125 U/ml/g). Şekil 3.2. ve 3.3.'te özetlenen farklı parametrelerin her birinde E114, C265, APT11, B65, APT43, C251 ve C234 kodlu izolatların, standart suşlardan daha yüksek miktarda alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir.

Yüksek miktarda enzim üreten bu 7 izolat ve standart suşların, kazeinli ve nişastalı sıvı besiyerlerinde 48 ve 72 saatlik gelişim sonrasında pH 9.0'luk Glisin-NaOH tamponu ve pH 10.0'luk Glisin-NaOH tamponu ile ölçülen enzim üretim miktarlarına ilişkin veriler sırasıyla Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Yüksek alkalen proteaz aktivitesi değerleri koyu renkli olarak belirtilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Yüksek enzim üreticisi izolatların ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarları; kazeinli ve nişastalı sıvı besiyerinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile ölçülen spesifik aktivite değerleri

Bakteri İzolatı/ Standart Suş	pH 9.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)							
	Kazeinli Sıvı Besiyeri pH 7.5		Kazeinli Sıvı Besiyeri pH 9.5		Nişastalı Sıvı Besiyeri pH 7.5		Nişastalı Sıvı Besiyeri pH 9.5	
	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat
E114	<b>103125</b>	5784	9770	6537	1104	590	558	799
C265	38981	<b>44037</b>	<b>103125</b>	<b>51391</b>	4026	5254	6600	10074
APT11	29525	13421	29253	22481	<b>63429</b>	16191	10498	11303
B65	26840	17793	23681	23571	21256	45283	<b>49683</b>	23485
APT43	31955	26800	22330	16935	48300	33665	43152	<b>68082</b>
C251	21275	22229	18200	18815	37987	<b>65939</b>	29013	63219
C234	20842	29805	13526	34031	25190	10358	10389	9044
<i>B. alcaliphilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	47850	12134	4112	4776	10313	8388	12039	3850
<i>B. cohnii</i> DSM 6307 <sup>T</sup>	42213	10278	12925	5090	6875	6820	9664	7333
<i>B. horikoshii</i> DSM 8719 <sup>T</sup>	14575	12306	7890	5710	9154	6650	7068	6485
<i>B. halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	18113	6623	14375	8221	10496	5700	4659	7761
<i>B. clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup>	4685	12950	8779	9167	8507	4510	4767	5115
<i>B. gibsonii</i> DSM 8722 <sup>T</sup>	14654	7853	8672	13200	9747	19879	4457	26171
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>	19950	17011	22458	16606	8048	7688	5312	20371
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	17675	14634	12777	21450	17796	18567	9110	18700
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup>	12192	15125	13310	16323	6109	4545	3062	3832
<i>B. coagulans</i> DSM 1 <sup>T</sup>	13200	15538	14533	15308	2609	3144	5923	481
<i>B. agaradhaerens</i> DSM 8721 <sup>T</sup>	12018	10863	14200	15442	7975	29578	7167	15629
<i>B. pseudocaliphilus</i> DSM 8725 <sup>T</sup>	11498	11039	7902	12668	4718	4053	6700	7433

Bir ünite (U/ml) alkalen proteaz, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarıdır.

**Çizelge 4.6.** Yüksek enzim üreticisi izolatların ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarları; kazeinli ve nişastalı sıvı besiyerinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile ölçülen spesifik aktivite değerleri

Bakteri İzolatı/ Standart Suş	pH 10.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)							
	Kazeinli Sıvı Besiyeri pH 7.5		Kazeinli Sıvı Besiyeri pH 9.5		Nişastalı Sıvı Besiyeri pH 7.5		Nişastalı Sıvı Besiyeri pH 9.5	
	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat
E114	<b>67100</b>	5974	6629	5733	915	671	524	693
C265	34830	28502	<b>84700</b>	35578	3201	4125	5797	6759
APT11	38183	9401	27191	20167	45485	16363	9199	8044
B65	35145	21863	17692	26754	21288	<b>68506</b>	<b>42656</b>	36410
APT43	28188	22400	17710	16317	<b>49125</b>	30113	33413	<b>62386</b>
C251	17975	22733	18525	19846	35493	59828	29226	60867
C234	15805	<b>41721</b>	13394	<b>41834</b>	15327	13750	34375	10144
<i>B. alcaliphilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	32038	6566	3418	4661	7883	6531	9472	4452
<i>B. cohnii</i> DSM 6307 <sup>T</sup>	44688	10863	11629	6406	5500	5253	9821	5867
<i>B. horikoshii</i> DSM 8719 <sup>T</sup>	15461	13200	7658	5759	8643	4600	7260	6210
<i>B. halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	18993	8777	14367	8887	9167	5950	4206	8067
<i>B. clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup>	3687	9200	7559	8164	5143	3135	5011	4730
<i>B. gibsonii</i> DSM 8722 <sup>T</sup>	11196	8227	6637	11550	7119	11589	2842	23772
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>	17900	14614	21307	13285	6062	6098	4265	18933
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	15375	11629	10344	18792	14398	14415	8292	16665
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup>	11387	12409	13347	15086	4930	4111	2869	3610
<i>B. coagulans</i> DSM 1 <sup>T</sup>	12163	15331	12438	15437	2506	3428	4795	421
<i>B. agaradhaerens</i> DSM 8721 <sup>T</sup>	9020	9763	10000	13200	5981	20533	5775	10542
<i>B. pseudocaliphilus</i> DSM 8725 <sup>T</sup>	10502	9926	6875	11477	3802	3459	5033	5367

Bir ünite (U/ml) alkalen proteaz, dakikada 1 µg tirozinin açığa çıkması için gerekli enzim miktarıdır.

İncelenen alkalen proteaz üretim parametrelerinin her birine ait ayrıntılı sonuçlar bu bölümden sonra, alt başlıklar halinde incelenmiş, Çizelge 4.7’de tüm izolat ve standart suşların bu parametrelerdeki alkalen proteaz aktivite değerleri verilmiştir.

Alkalen proteaz aktivite değerleri 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerine göre karşılaştırıldığında, izolat ve standart suşların yaklaşık % 70’inin (43 adet izolat ve 5 adet standart suş) yüksek enzim aktivitesi değerlerinin, 48 saat inkübasyon sonrasında elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7.).

Enzim üretim ortamı olarak kullanılan Kazeinli ve Nişastalı Sıvı Besiyerlerine göre alkalen proteaz aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise, Kazeinli Sıvı Besiyeri’nde tüm örneklerin yaklaşık % 76’sının (42 adet izolat ve 10 adet standart suş) yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan besiyerleri pH’ları bakımından da incelendiği zaman, Kazeinli Sıvı Besiyeri için pH 7.5 değerinde 27 örnek (21 adet izolat ve 6 adet standart suş), pH 9.5 değerinde ise 25 örnek (21 adet izolat ve 4 adet standart suş) yüksek alkalen proteaz üretimi gerçekleştirmiştir. Benzer şekilde Nişastalı Sıvı Besiyeri için 16 örneğin 8’inin pH 7.5’luk ortamda, 8’inin de pH 9.5’luk ortamda (her iki pH değerinde de 7 adet izolat ve 1 adet standart suş) yüksek kapasitede alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7.).

Son olarak aktivite deneylerinin gerçekleştirildiği pH 9.0 ve 10.0’luk Glisin-NaOH tamponlarıyla elde edilen alkalen proteaz aktivite değerleri karşılaştırıldığında, tüm örneklerin yaklaşık % 73’ünün (47 adet izolat ve 3 adet standart suş) pH 9.0’luk Glisin-NaOH tamponu ile daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7.).

Bütün bu sonuçlara göre araştırılan 56 izolat ve 12 adet standart suşun genel olarak, yüksek alkalen proteaz aktivitelerinin kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat inkübasyon sonrasında pH 9.0’luk Glisin-NaOH tamponuyla ölçüldüğü, uygun besiyeri pH değerlerinin ise izolat ve standart suşların fizyolojik ihtiyaçlarına göre değişkenlik gösterdiği söylenebilir.

Çizelge 4.7. İzolat ve standart suşların alkalen proteaz aktiviteleri

İzolat/Standart suş	48 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)								72 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)							
	pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite			
	Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri	
	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5
APT1	15019	20442	2390	3059	12713	16011	1859	2040	19097	9014	3598	3538	15981	7598	2527	2420
APT2	16183	22358	8329	4734	13285	16885	3575	3005	9106	6478	6793	3279	8525	9778	1100	1608
APT5	20405	8823	8491	4696	15400	7394	6084	3342	13979	5569	4452	3039	10817	4778	2217	2008
APT8	24420	10519	7494	4426	20240	6623	4263	4380	9213	5775	3614	5250	7582	4217	2593	4650
APT9	23623	23497	4339	8273	17133	17539	2933	5454	11344	11660	3352	4844	11160	11953	3369	4167
APT10	17836	20689	13943	12719	14929	15329	3809	4730	6764	13115	13208	9286	6137	9431	3802	4464
APT11	29525	29253	63429	10498	38183	27191	45485	9199	13421	22481	16191	11303	9401	20167	16363	8044
APT12	13334	31549	3283	4351	11597	23031	2764	4449	12090	10925	2767	3953	9994	8952	3243	4217
APT13a	24844	16938	2094	4005	12658	8969	1591	2899	20136	16913	1805	2359	9638	11378	1728	2305
APT14	9598	6919	8855	6642	3502	4141	6157	5357	8314	6666	9127	4523	8912	6471	2171	3130
APT20b	5831	6482	1164	1121	6469	8054	1342	1471	7838	5827	686	920	8141	6050	732	1009
APT23	14491	11963	1233	1588	11478	9186	870	1361	9682	10625	1193	1009	7345	7763	834	914
APT24	1007	14465	4895	3009	1087	14438	4455	2701	13362	22756	4930	3014	9835	19983	4695	1994
APT25	10605	16800	4973	4871	9161	14600	3781	3850	16458	15950	4342	3732	11381	30200	2764	2711
APT26	15565	5009	5690	6539	18810	7759	5077	7272	10020	15981	3400	7364	8800	15156	2025	4400
APT30	14185	11073	3988	2504	16454	11715	4675	3416	10244	9848	3614	2776	10347	10175	3320	2305
APT32	16421	25369	14731	34035	16107	28016	15043	37271	14937	22521	7513	17283	16963	25401	11386	18732
APT34	10353	8816	2982	3791	10806	10531	3633	4321	8641	20006	8093	3355	8771	22516	8564	3648
APT35	35131	38019	15439	14496	32794	32106	11432	12434	30873	9190	6521	10698	26290	8834	8957	5280
APT36	1371	3824	494	475	1342	3485	493	501	1082	2122	570	684	1088	2087	628	675
APT37	12595	21254	14800	17539	19553	30407	18875	19769	14781	31656	19085	13402	12959	25697	16363	10285
APT38	6692	4988	863	760	7398	4790	992	730	6701	4142	747	699	7022	4147	770	802
APT39	9888	9825	2038	1907	9828	7938	1994	2278	6533	7131	1424	1561	6817	7520	1236	1539
APT40	9840	7188	4299	1883	11648	8578	6270	2883	5768	8918	1902	1515	6262	9350	2506	1650
APT41	10800	4863	2138	3896	13180	6719	2965	5977	6311	2845	2069	2037	7274	3247	3588	2719

Gri renk ile belirginleştirilen alkalen proteaz aktivite değerleri, ilgili izolat veya standart suşun ürettiği en yüksek enzim değerini göstermektedir.



Çizelge 4.7. İzolat ve standart suşların alkalen proteaz aktiviteleri (Devam)

İzolat/Standart suş	48 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)								72 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)							
	pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite			
	Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri	
	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5
APT42	8566	7242	15400	32489	7095	3403	14123	27762	6646	4268	7737	6325	6050	4221	7132	7108
APT43	31955	22330	48300	43152	28188	17710	49125	33413	26800	16935	33665	68082	22400	16317	30113	62386
APT44	22000	36300	5378	4746	15847	28820	4858	1894	7471	11423	1803	1829	7685	11360	2063	1602
APT47	26308	5965	659	1071	25422	5680	744	841	7568	6457	843	1010	8151	6366	797	1020
APT48	12100	9204	429	751	13298	10439	353	663	11642	11465	2383	495	11642	12664	2182	358
A107	8456	22471	2484	1567	6823	19093	1418	1106	17531	14723	2363	12788	14988	12692	2200	5060
A111	16902	15287	3893	5881	11360	12692	3329	3892	15143	17233	4772	4079	12540	15148	4788	4339
A131	30425	13029	17463	9112	19800	8458	11092	4748	14285	23100	16791	14163	13017	16968	7813	5208
A151	28024	20447	29906	20150	22393	14473	25403	10638	19632	27987	19448	6181	16393	20963	14729	4112
A185	19308	15339	33950	13269	19409	19739	20350	13114	25627	27048	22672	16490	18717	12689	22153	14117
A325	18506	3438	9818	5677	12585	2662	4469	3025	27726	6424	16539	11859	18975	5867	8318	5626
A331	19200	12121	5989	4103	14425	8737	3483	2685	21890	22367	10875	7433	18590	19464	1725	4525
A363	44864	20419	22825	4492	34846	27294	19027	3495	30123	15802	16150	16925	20371	14110	15317	14913
B16	19825	27500	42961	24228	17325	26164	41067	27115	13246	11926	21810	14245	10343	9755	19356	9996
B65	26840	23681	21256	49683	35145	17692	21288	42656	17793	23571	45283	23485	21863	26754	68506	36410
C234	20842	13526	25190	10389	15805	13394	15327	34375	29805	34031	10358	9044	41721	41834	13750	10144
C235	18305	14758	17854	37492	14317	12118	12417	30090	20055	33122	10894	19745	19329	29700	10683	19305
C236	29666	14178	19365	28854	27603	16806	27317	17304	17362	14667	31350	53763	16518	17279	35789	26675
C241	12911	10146	33069	30727	11234	10711	34490	32010	23815	27466	13711	11888	28573	33275	18111	14215
C244	14483	13933	28951	39233	11079	13475	25911	40929	19950	41171	15785	21144	20150	35868	13970	22947
C251	21275	18200	37987	29013	17975	18525	35493	29226	22229	18815	65939	63219	22733	19846	59828	60867
C265	38981	103125	4026	6600	34830	84700	3201	5797	44037	51391	5254	10074	28502	35578	4125	6759
C83ca	10857	9010	1621	2864	9917	7013	1668	3080	10757	12123	944	2684	12844	12444	1433	2783
C91	15881	17230	2716	11014	18700	15834	2635	9323	7832	8764	1224	654	8429	7282	1306	629

Gri renk ile belirginleştirilen alkalen proteaz aktivite değerleri, ilgili izolat veya standart suşun ürettiği en yüksek enzim değerini göstermektedir.

**Çizelge 4.7. İzolat ve standart suşların alkalen proteaz aktiviteleri (Devam)**

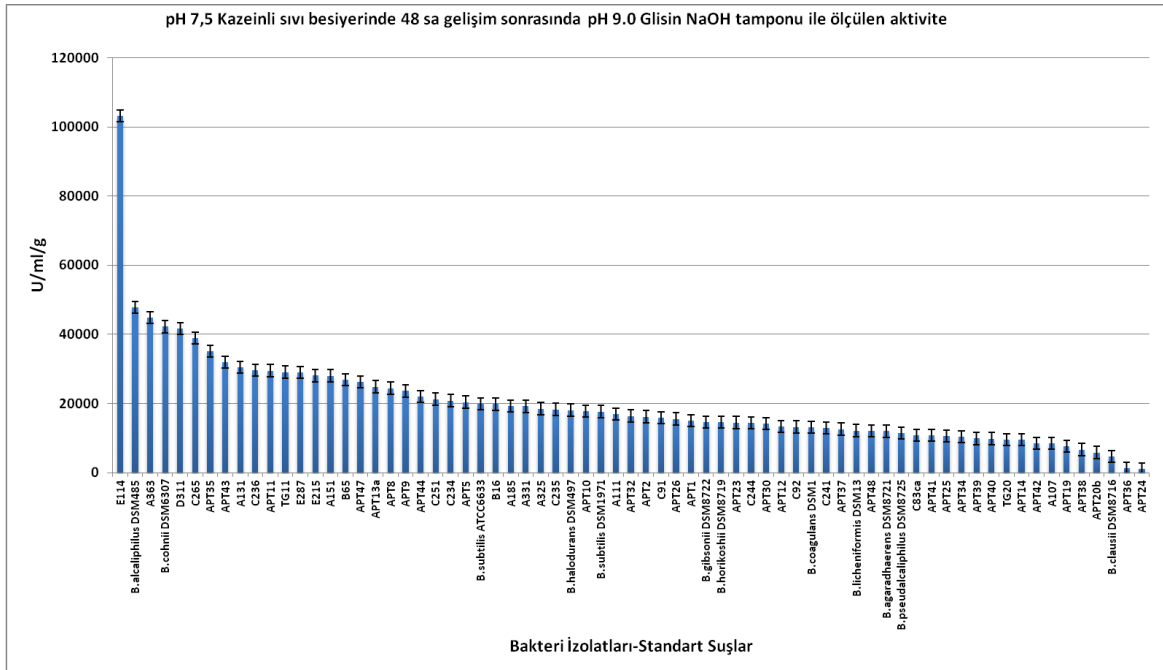
İzolat/Standart suş	48 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)								72 saat inkübasyon sonrasında alkalen proteaz aktivitesi (U/ml/g)							
	pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite				pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu ile aktivite			
	Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri		Kazeinli sıvı besiyeri		Nişastalı sıvı besiyeri	
	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5	pH 9.5	pH 7.5
C92	13220	18116	1327	2352	7150	14919	1455	2256	5102	5400	1135	663	5500	4550	924	631
D311	41663	31419	8892	9808	53350	35269	8525	12008	29517	30839	12485	10804	19097	18857	5583	6443
E114	103125	9770	1104	558	67100	6629	915	524	5784	6537	590	799	5974	5733	671	693
E215	28071	27860	33120	43725	28896	21133	19748	24475	19418	21377	20588	29113	17799	19800	22625	18737
E287	29013	41708	9350	10725	26984	30388	6685	8309	26366	23900	5816	9701	25506	15800	4716	7074
TG11	29081	21450	5791	6685	22779	19769	4901	5303	22619	14071	3039	3835	23283	15606	3259	3646
TG20	9625	6383	4589	628	10529	5153	4280	413	9195	4044	2296	2853	8009	4563	2626	2492
DSM485	47850	4112	10313	12039	32038	3418	7883	9472	12134	4776	8388	3850	6566	4661	6531	4452
DSM8725	11498	7902	4718	6700	10502	6875	3802	5033	11039	12668	4053	7433	9926	11477	3459	5367
DSM8721	12018	14200	7975	7167	9020	10000	5981	5775	10863	15442	29578	15629	9763	13200	20533	10542
DSM6307	42213	12925	6875	9664	44688	11629	5500	9821	10278	5090	6820	7333	10863	6406	5253	5867
DSM8716	4685	8779	8507	4767	3687	7559	5143	5011	12950	9167	4510	5115	9200	8164	3135	4730
DSM8722	14654	8672	9747	4457	11196	6637	7119	2842	7853	13200	19879	26171	8227	11550	11589	23772
DSM497	18113	14375	10496	4659	18993	14367	9167	4206	6623	8221	5700	7761	8777	8887	5950	8067
DSM8719	14575	7890	9154	7068	15461	7658	8643	7260	12306	5710	6650	6485	13200	5759	4600	6210
DSM13	12192	13310	6109	3062	11387	13347	4930	2869	15125	16323	4545	3832	12409	15086	4111	3610
ATCC6633	19950	22458	8048	5312	17900	21307	6062	4265	17011	16606	7688	20371	14614	13285	6098	18933
DSM1971	17675	12777	17796	9110	15375	10344	14398	8292	14634	21450	18567	18700	11629	18792	14415	16665
DSM1	13200	14533	2609	5923	12163	12438	2506	4795	15538	15308	3144	481	15331	15437	3428	421

Gri renk ile belirginleştirilen alkalen proteaz aktivite değerleri, ilgili izolat veya standart suşun ürettiği en yüksek enzim değerini göstermektedir.

#### 4.2.2.2.1. 48 saatlik Kazeinli ve nişastalı besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesi (pH 9.0)

##### 1. pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

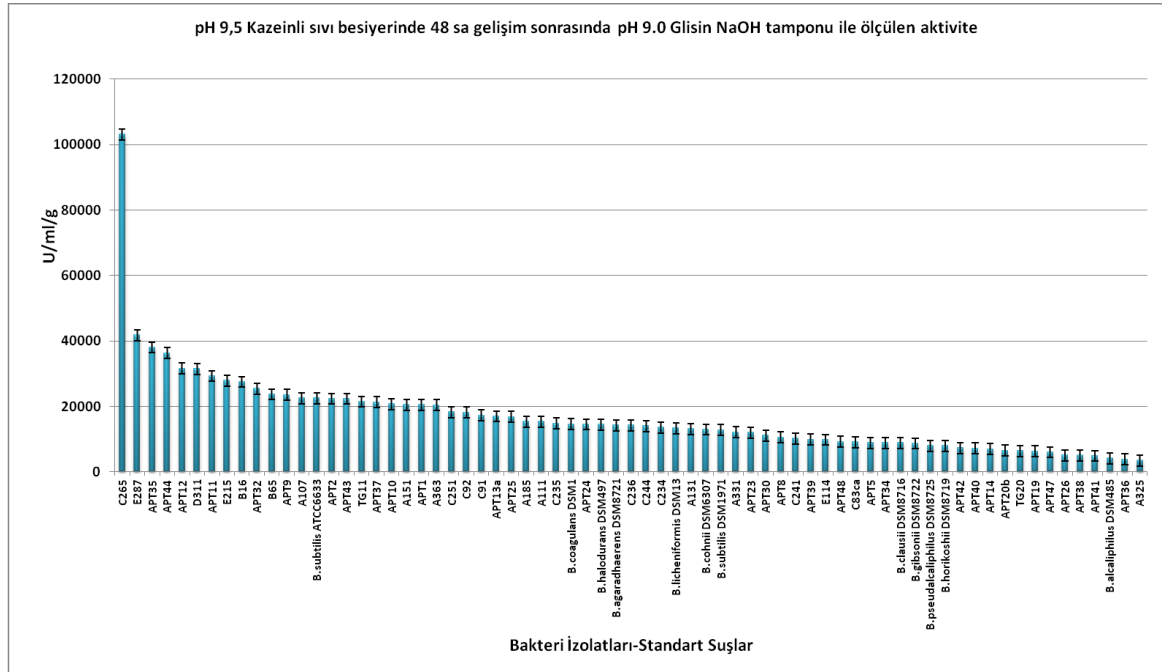
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 1007-10312 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda E114 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (10312 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. E114 izolatını 47850 U/ml/g değeriyle standart suş *B. alcaliphilus* DSM485<sup>T</sup> izlemiştir. Üçüncü sırada A363 kodlu izolat (44864 U/ml/g), dördüncü sırada standart suş *B. cohnii* DSM6307<sup>T</sup> (42211 U/ml/g), beşinci sırada ise D311 kodlu bakteri izolatı (41663 U/ml/g) enzim üretim miktarları bakımından sıralanmıştır. En düşük enzim üretim miktarını ise 1007 U/ml/g değeriyle APT24 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

## 2. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

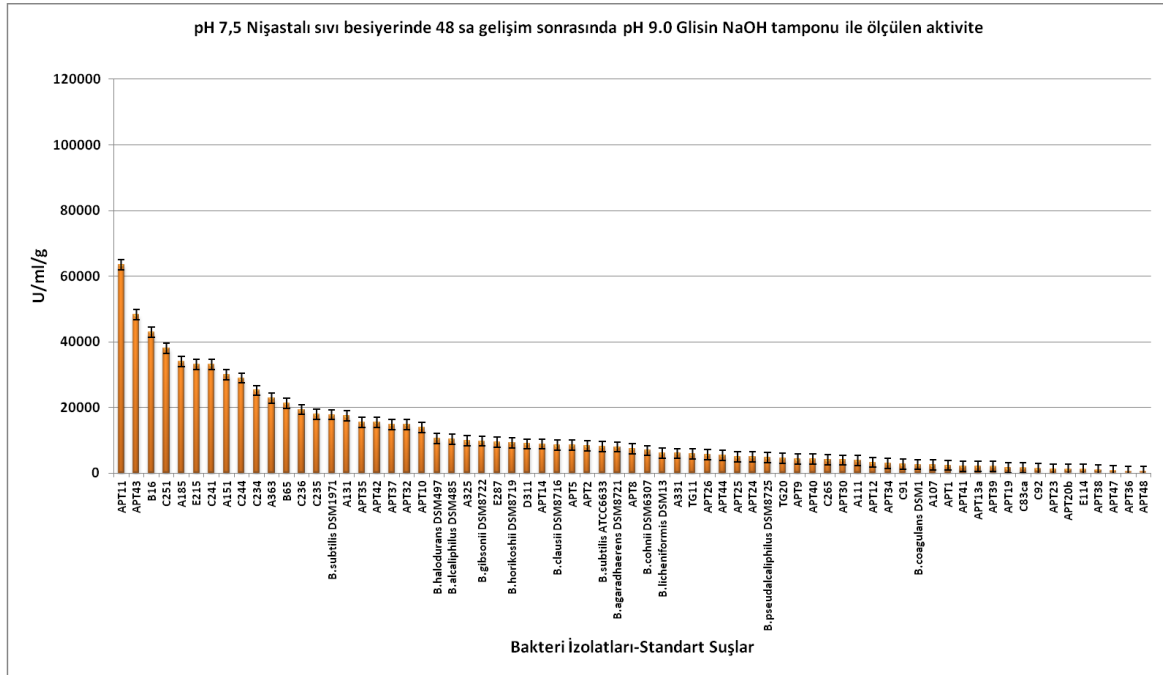
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 3438-103125 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda, pH 7.0 ve 9.0'luk Skim Milk Agar besiyerinde de en geniş proteolitik aktiviteyi gösteren C265 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (103125 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. C265 izolatını sırasıyla 41708 U/ml/g değeriyle E287 kodlu izolat, 38019 U/ml/g değeriyle APT35 kodlu izolat, 36300 U/ml/g değeriyle APT44 kodlu izolat, 31549 U/ml/g değeriyle APT12 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 3438 U/ml/g değeriyle A325 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.4. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

### 3. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

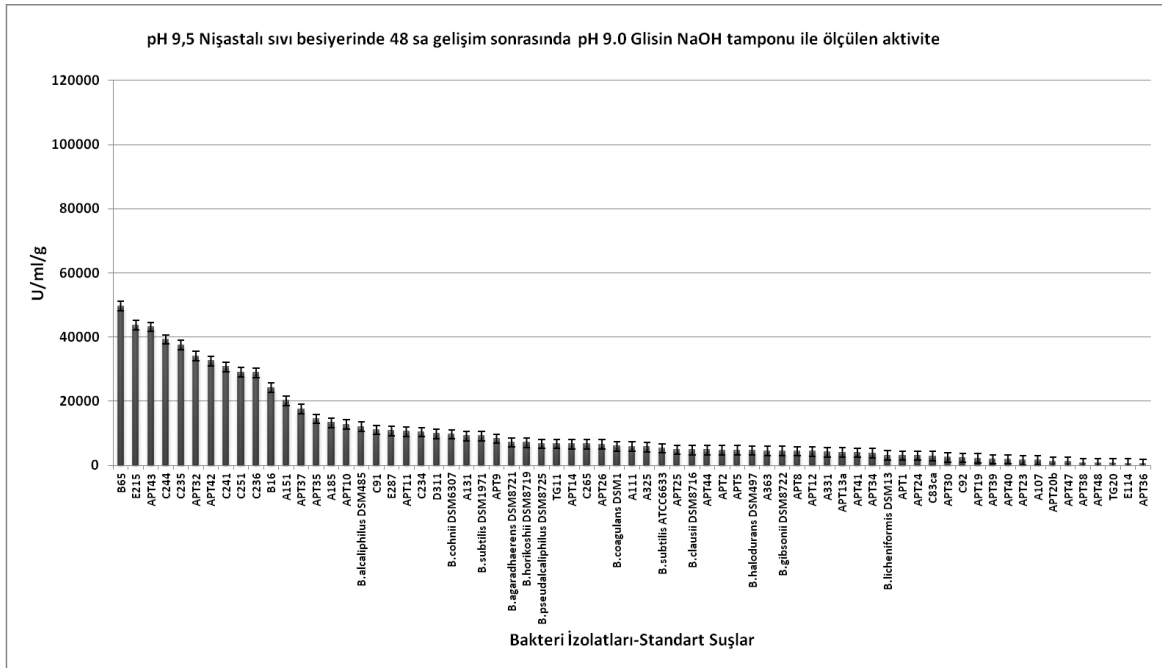
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 429-63429 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda APT11 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (63429 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. APT11 izolatını sırasıyla 48300 U/ml/g değeriyle APT43 kodlu izolat, 42961 U/ml/g değeriyle B16 kodlu izolat, 37987 U/ml/g değeriyle C251 kodlu izolat, 33950 U/ml/g değeriyle A185 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 429 U/ml/g değeriyle APT48 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalin proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 475-49683 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda B65 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (49683 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. B65 izolatını sırasıyla 43725 U/ml/g değeriyle E215 kodlu izolat, 43152 U/ml/g değeriyle APT43 kodlu izolat, 39233 U/ml/g değeriyle C244 kodlu izolat, 37492 U/ml/g değeriyle APT32 kodlu izolat, 3251 U/ml/g değeriyle C236 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 475 U/ml/g değeriyle APT36 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.6.'da verilmiştir.

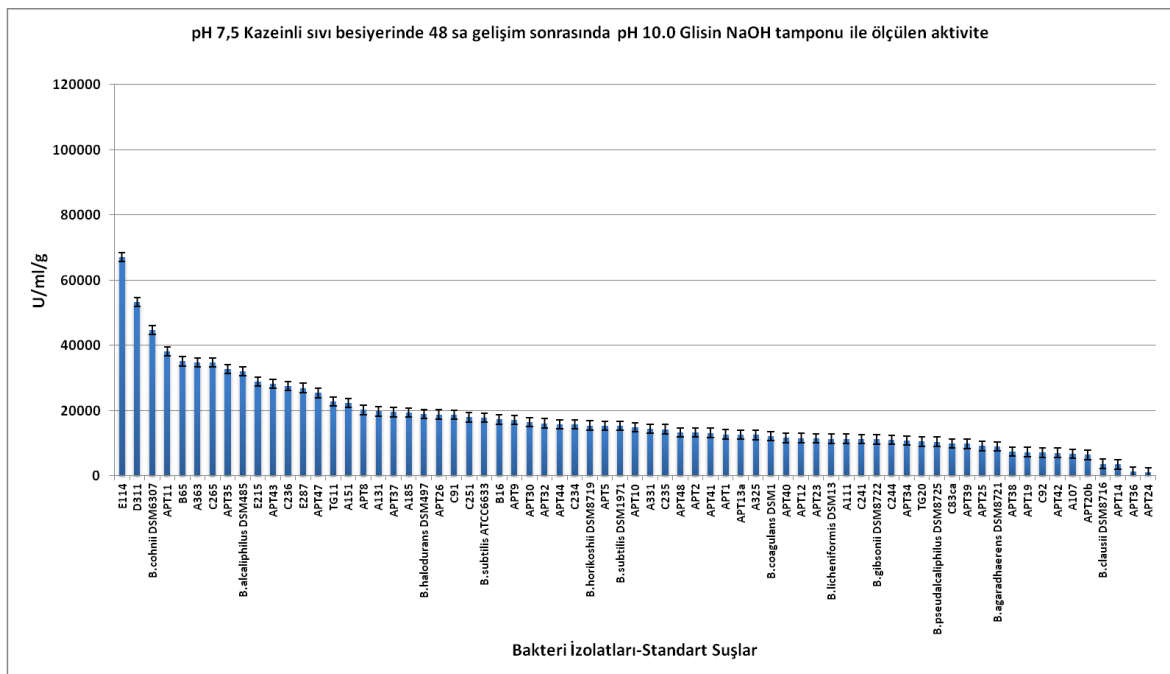


Şekil 4.6. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4.2.2.2.2. 48 saatlik Kazeinli ve nişastalı besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesi (pH 10.0)

### 1. pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

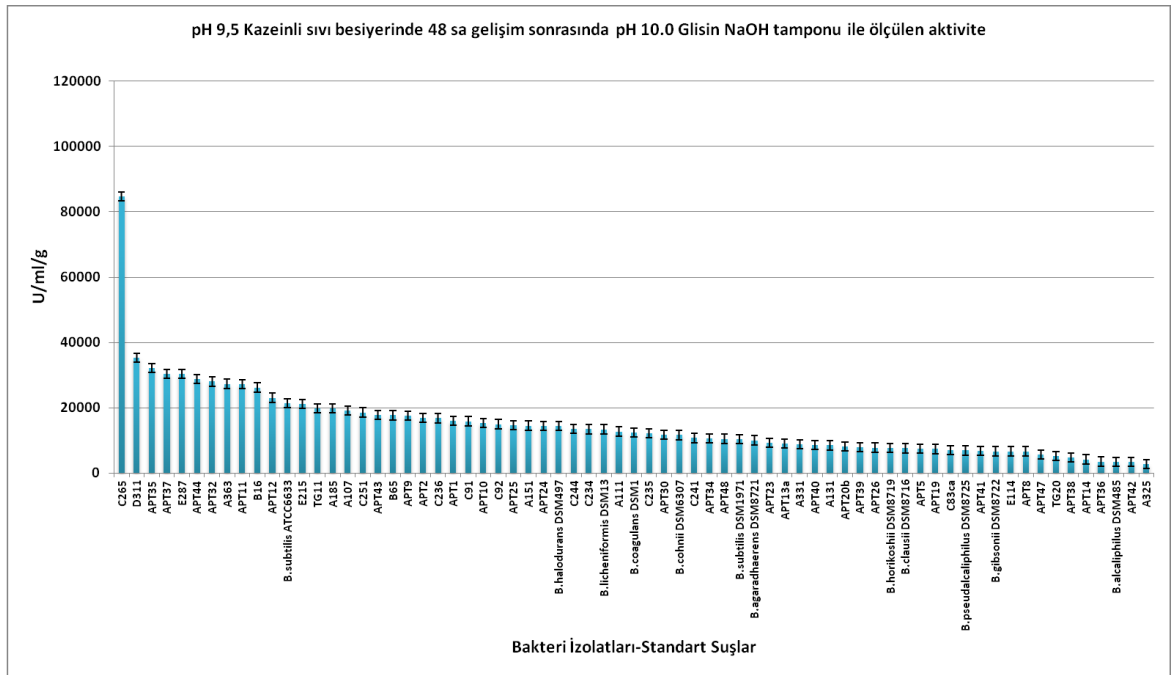
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 1087-67100U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda E114 kodlu izolat, pH 9.0 Glisin NaOH tamponuyla ölçülen aktivitede de olduğu gibi en yüksek enzim üretim miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (67100 U/ml/g). E114 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 53350 U/ml/g değeriyle D311 kodlu izolat, 44688 U/ml/g değeriyle standart suş *B. cohnii* DSM6307<sup>T</sup>, 38183 U/ml/g değeriyle APT11 kodlu izolat ve 35145 U/ml/g değeriyle B65 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini yine pH 9.0 Glisin-NaOH tamponuyla ölçülen aktivitede olduğu gibi APT24 kodlu bakteri izolatu göstermiştir (1087 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. pH 7,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

## 2. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 2662-84700 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda pH 9.0'luk Glisin-NaOH tamponuyla ölçülen aktivite sonucunda olduğu gibi C265 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (84700 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak pH 9.0'luk Glisin-NaOH tamponuyla daha yüksek enzim üretim miktarı elde edilmiştir (103125 U/ml/g). C265 izolatını sırasıyla 35269 U/ml/g değeriyle D311 kodlu izolat, 32106 U/ml/g değeriyle APT35 kodlu izolat, 30407 U/ml/g değeriyle APT37 kodlu izolat ve 30388 U/ml/g değeriyle E287 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 2662 U/ml/g değeriyle A325 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.8.'de verilmiştir.

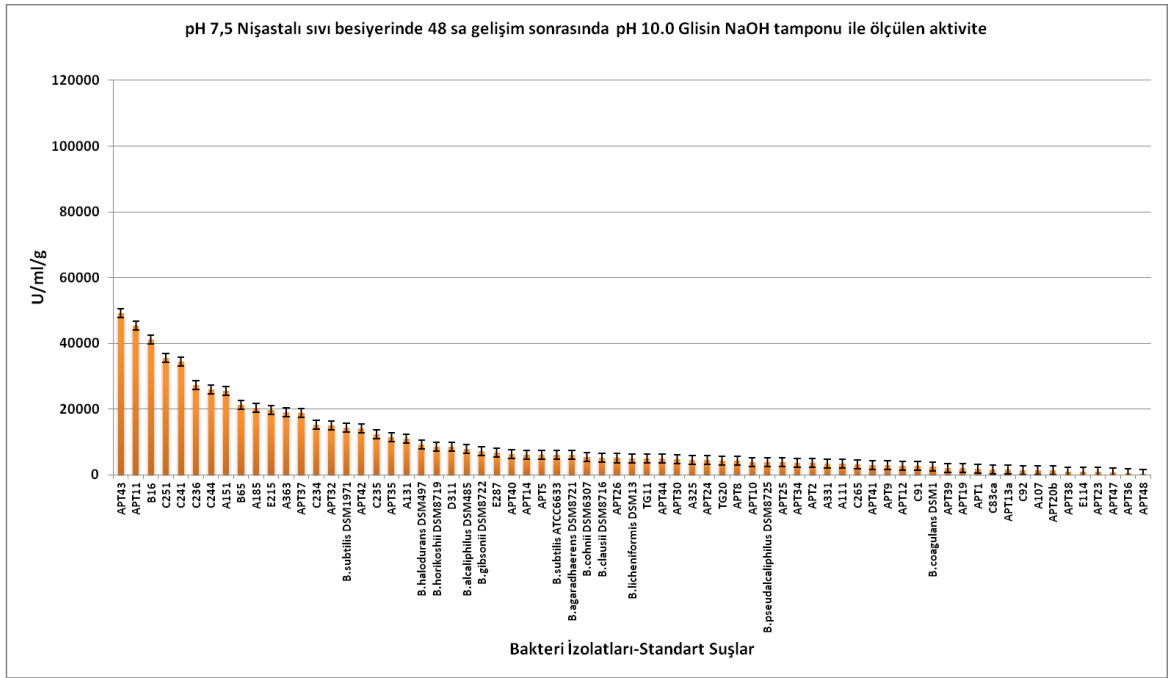


Şekil 4.8. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri



### 3. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

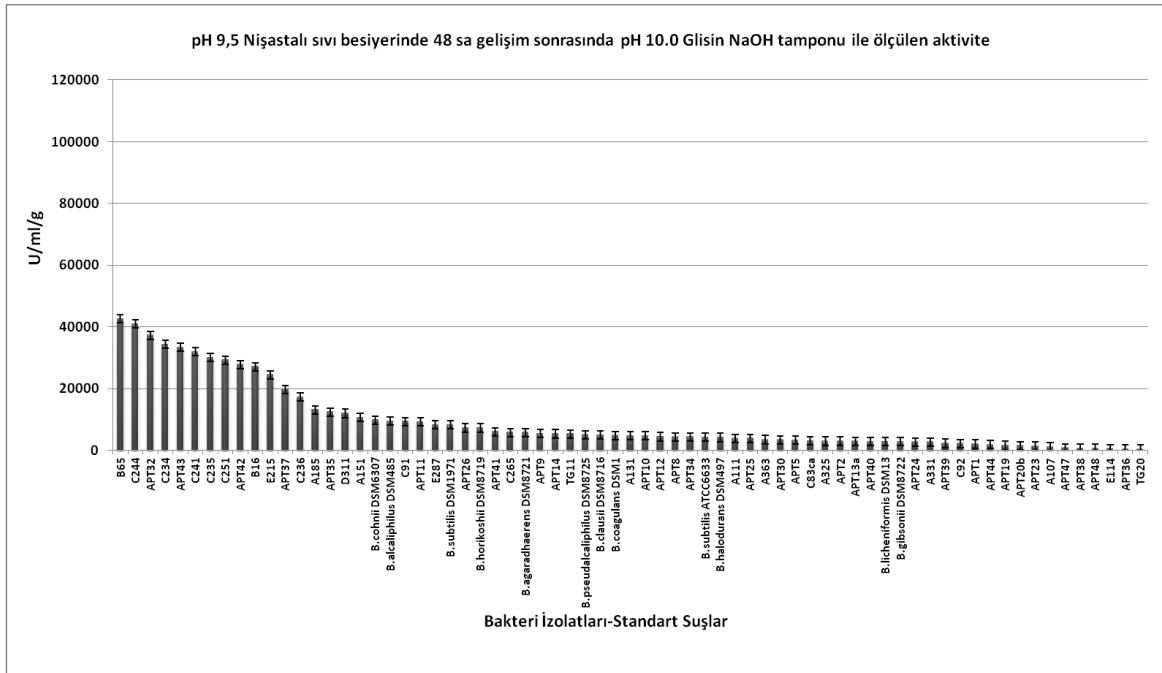
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 353-49125 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda APT43 kodlu izolatın en yüksek enzim üretim miktarına (49125 U/ml/g) sahip olduğu belirlenmiştir. APT43 izolatını sırasıyla 45485U/ml/g değeriyle APT11 kodlu izolat, 41067U/ml/g değeriyle B16 kodlu izolat, 35493 U/ml/g değeriyle C251 kodlu izolat ve 34490 U/ml/g değeriyle C241 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 353 U/ml/g değeriyle APT48 kodlu bakteri izolatı göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 413-42656 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda B65 kodlu izolat, pH 9.0 Glisin NaOH tamponuyla ölçülen aktivitede (49683 U/ml/g) de olduğu gibi pH 10.0 tamponuyla da en yüksek enzim üretim miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (42656 U/ml/g). B65 izolatını sırasıyla 40929 U/ml/g değeriyle C244 kodlu izolat, 37271 U/ml/g değeriyle APT32 kodlu izolat, 34375 U/ml/g değeriyle C234 kodlu izolat ve 33413 U/ml/g değeriyle APT43 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretim miktarını ise 413 U/ml/g değeriyle TG20 kodlu bakteri izolatu göstermiştir. Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.10'da verilmiştir.

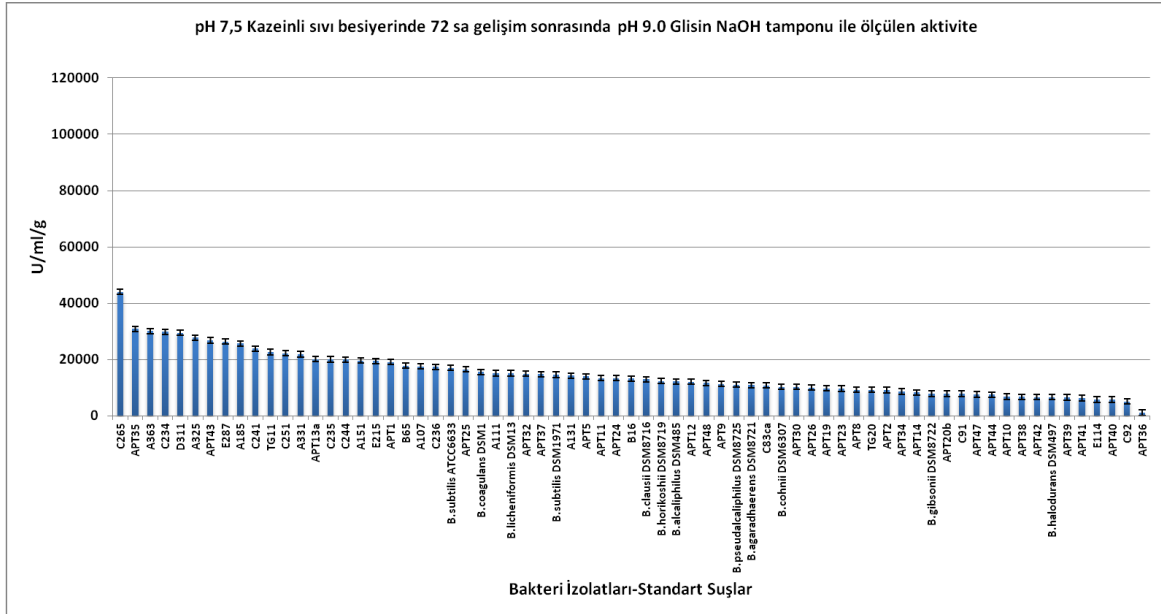


Şekil 4.10. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4.2.2.2.3. 72 saatlik Kazeinli ve nişastalı besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesi (pH 9.0)

##### 1. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

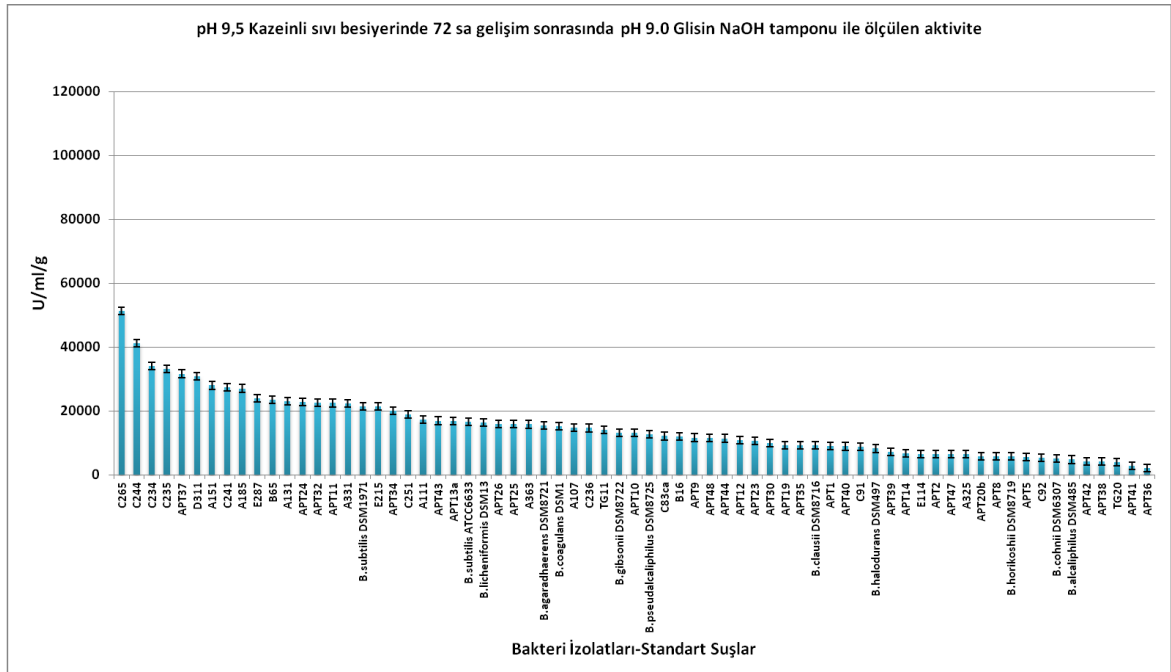
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 1082-44037 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda C265 kodlu izolat, pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişimin ardından pH 9.0 ve 10.0'luk Glisin NaOH tamponuyla ölçülen aktivitede de olduğu gibi, bu kez de pH 7,5'luk kazeinli ortamda 72 saat gelişimin ardından en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (44037 U/ml/g). C265 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 53350 U/ml/g değeriyle D311 kodlu izolat, 44688 U/ml/g değeriyle standart suş *B. cohnii* DSM6307<sup>T</sup>, 38183 U/ml/g değeriyle APT11 kodlu izolat ve 35145 U/ml/g değeriyle B65 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise APT36 kodlu bakteri izolatu göstermiştir (1082 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

## 2. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

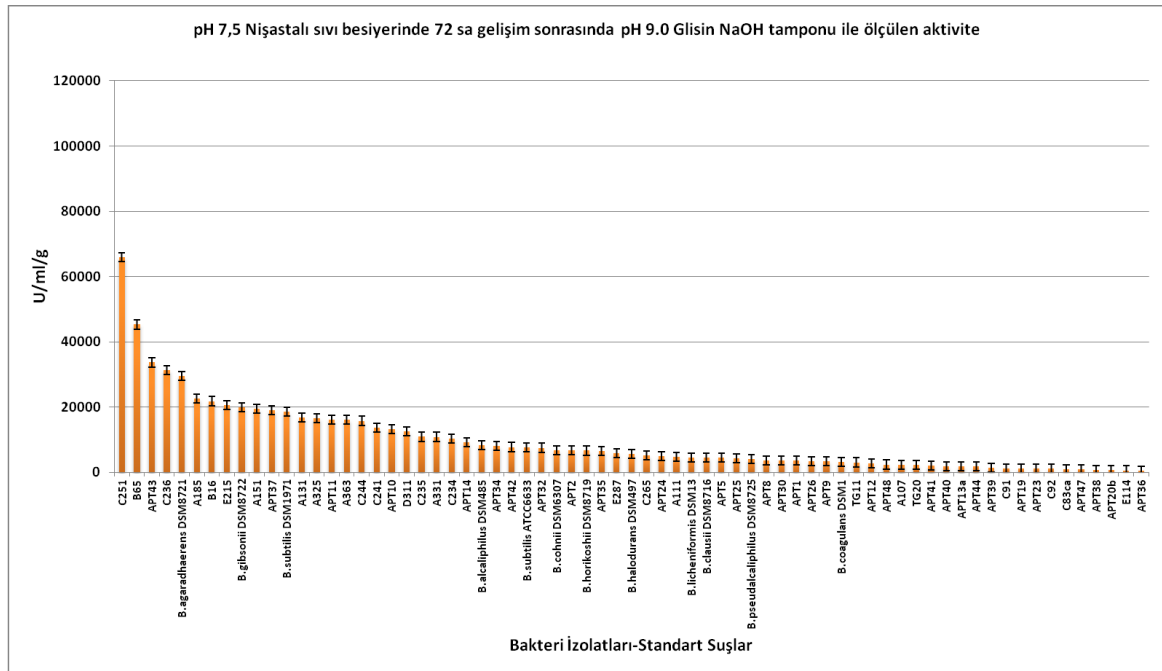
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 2122-51391 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda C265 kodlu izolat, bir önceki bölümde de belirtildiği gibi pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saatlik gelişimin ardından ve pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişimin ardından pH 9.0 ve 10.0'luk Glisin NaOH tamponuyla ölçülen aktivitede de olduğu gibi, bu kez de pH 9,5'luk kazeinli ortamda 72 saat gelişimin ardından en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (51391 U/ml/g). C265 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 41171 U/ml/g değeriyle C244 kodlu izolat, 34031 U/ml/g değeriyle C234 kodlu izolat, 33122 U/ml/g değeriyle C235 kodlu izolat ve 31656 U/ml/g değeriyle APT37 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişimin ardından elde edilen sonuç gibi APT36 kodlu bakteri izolatı göstermiştir (2122 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

### 3. pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

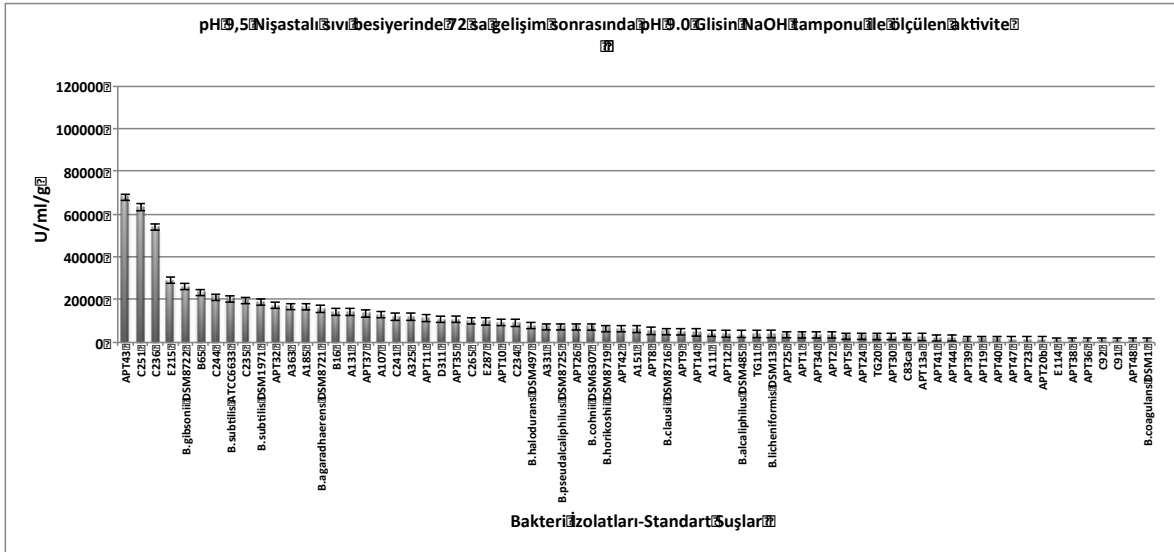
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 570-65939 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda C251 kodlu izolat en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (65939 U/ml/g). C251 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 45283 U/ml/g değeriyle B65 kodlu izolat, 33665 U/ml/g değeriyle APT43 kodlu izolat, 31350 U/ml/g değeriyle C236 kodlu izolat ve 29578 U/ml/g değeriyle standart suş *B. agaradhaerens* DSM8721<sup>T</sup> izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise pH 7,5 ve 9,5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişimin ardından elde edilen sonuç gibi APT36 kodlu bakteri izolatu göstermiştir (570 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.13.'te verilmiştir.



Şekil 4.13. pH 7,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 481-68082 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda APT43 kodlu izolat en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (68082 U/ml/g). APT43 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 63219 U/ml/g değeriyle C251 kodlu izolat, 53763 U/ml/g değeriyle C236 kodlu izolat, 29113 U/ml/g değeriyle E215 kodlu izolat ve 26171 U/ml/g değeriyle standart suş *B. gibsonii* DSM8722<sup>T</sup> izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise standart suş *B. coagulans* DSM1<sup>T</sup> göstermiştir (481 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.14.'te verilmiştir.

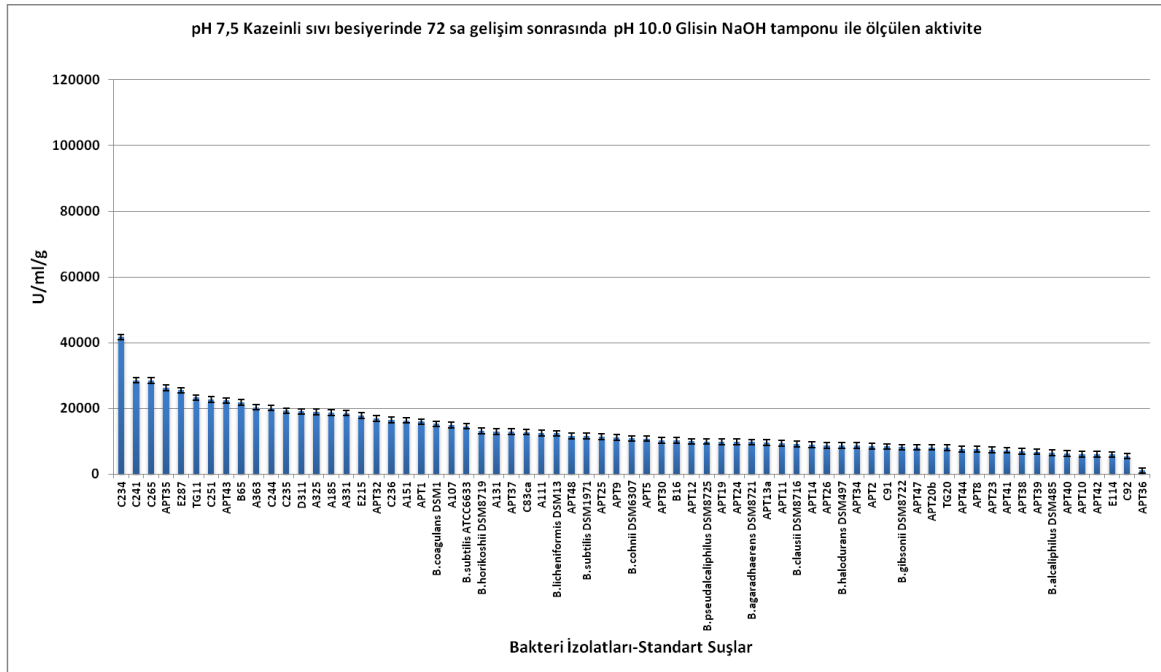


Şekil 4.14. pH 9,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4.2.2.2.4. 72 saatlik kazeinli ve nişastalı besiyerlerinde alkalen proteaz aktivitesi (pH 10.0)

##### 1. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

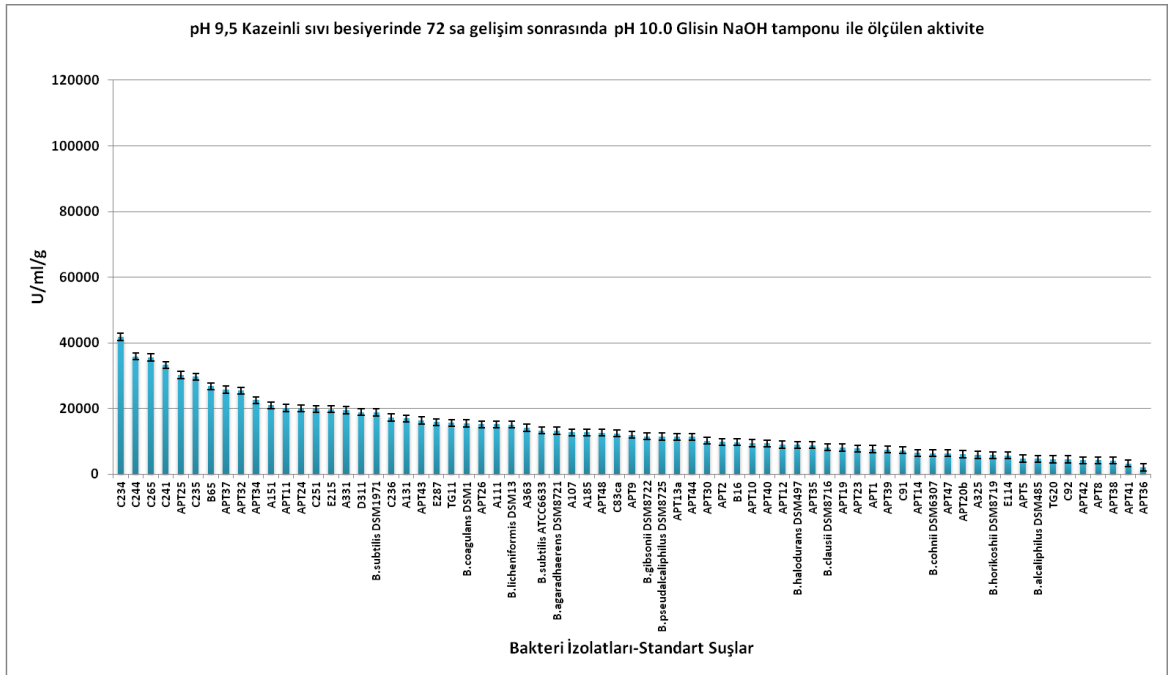
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 1088-41721 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda C234 kodlu izolat en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (41721 U/ml/g). C234 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 28573 U/ml/g değeriyle C241 kodlu izolat, 28502 U/ml/g değeriyle C265 kodlu izolat, 26290 U/ml/g değeriyle APT35 kodlu izolat ve 25506 U/ml/g değeriyle E287 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise APT36 kodlu bakteri izolatı göstermiştir (1088 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.15.'te verilmiştir.



Şekil 4.15. pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

## 2. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 2087-41834 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda, pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saatlik gelişimin ardından pH 10.0'luk Glisin-NaOH tamponuyla elde edilen enzim üretim miktarı gibi C234 kodlu izolat en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (41834 U/ml/g). C234 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 35868 U/ml/g değeriyle C244 kodlu izolat, 35578 U/ml/g değeriyle C265 kodlu izolat, 33275 U/ml/g değeriyle C241 kodlu izolat ve 30200 U/ml/g değeriyle APT25 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise yine pH 7,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saatlik gelişimin ardından pH 10.0'luk Glisin-NaOH tamponuyla elde edilen enzim üretim miktarı gibi APT36 kodlu bakteri izolatu göstermiştir (1088 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.16'da verilmiştir.

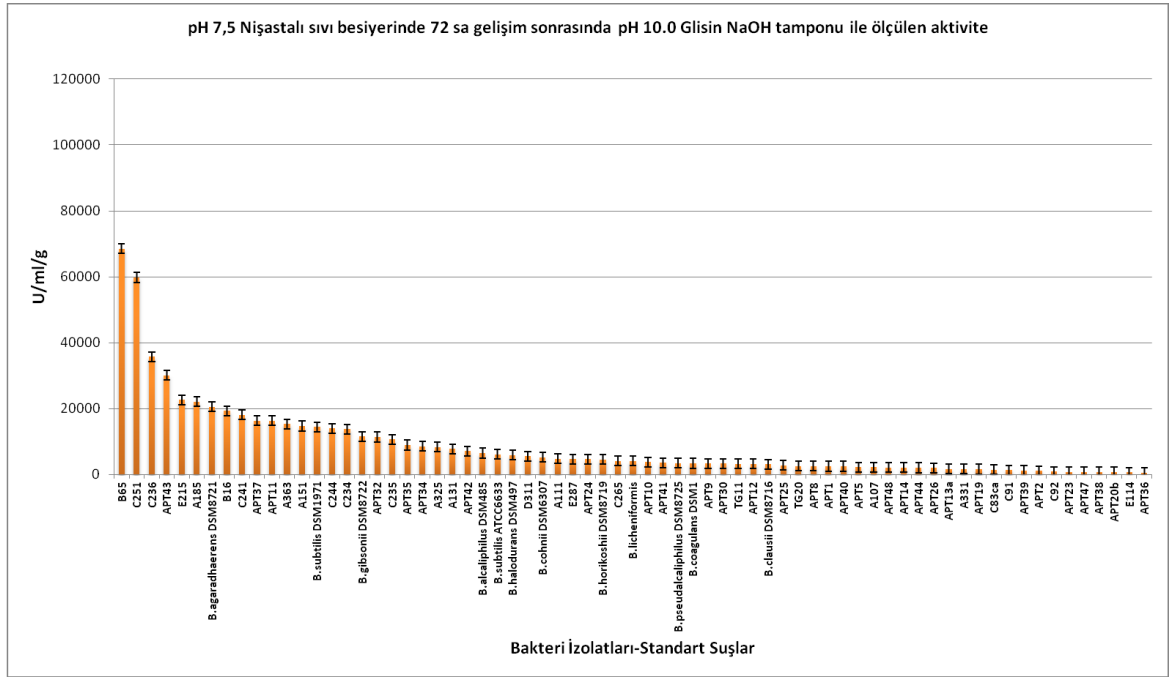


Şekil 4.16. pH 9,5'luk kazeinli sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri



### 3. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

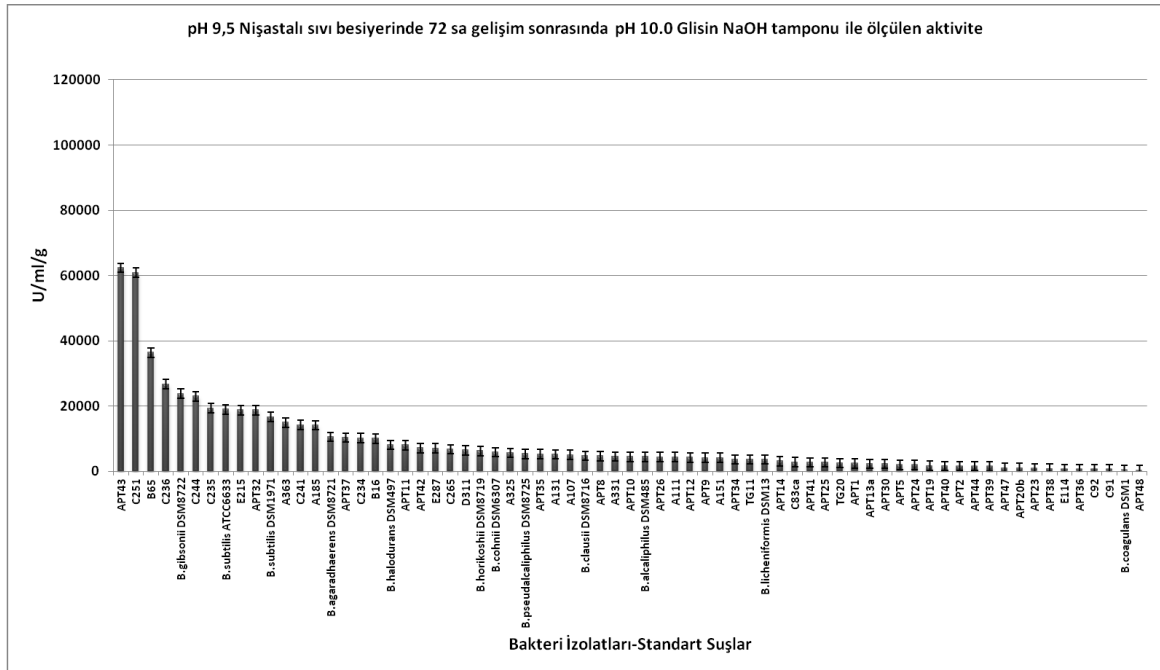
İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 7.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 628-68506 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda, B65 kodlu izolat en yüksek enzim üretim miktarını göstermiştir (68506 U/ml/g). B65 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 59828 U/ml/g değeriyle C251 kodlu izolat, 35789 U/ml/g değeriyle C236 kodlu izolat, 30113 U/ml/g değeriyle APT43 kodlu izolat ve 22625 U/ml/g değeriyle E215 kodlu izolat izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise APT36 kodlu bakteri izolatu göstermiştir (628 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. pH 7,5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

#### 4. pH 9,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile ölçülen aktivite sonuçları

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen enzim üretim miktarları pH 9.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 358-62386 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. Belirtilen koşullarda, APT43 kodlu izolat pH 9.0 Glisin-NaOH taponuyla elde edilen enzim üretim miktarı gibi en yüksek enzim üretim değerini göstermiştir (62386 U/ml/g). APT43 izolatını enzim üretim miktarları bakımından sırasıyla 60867 U/ml/g değeriyle C251 kodlu izolat, 36410 U/ml/g değeriyle B65 kodlu izolat, 26675 U/ml/g değeriyle C236 kodlu izolat ve 23772 U/ml/g değeriyle standart suş *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup> izlemiştir. En düşük enzim üretimini ise APT48 kodlu bakteri izolatı göstermiştir (358 U/ml/g). Bakteri izolatları ve standart suşların alkalen proteaz üretim miktarlarına ilişkin elde edilen veriler Şekil 4.18'de verilmiştir.

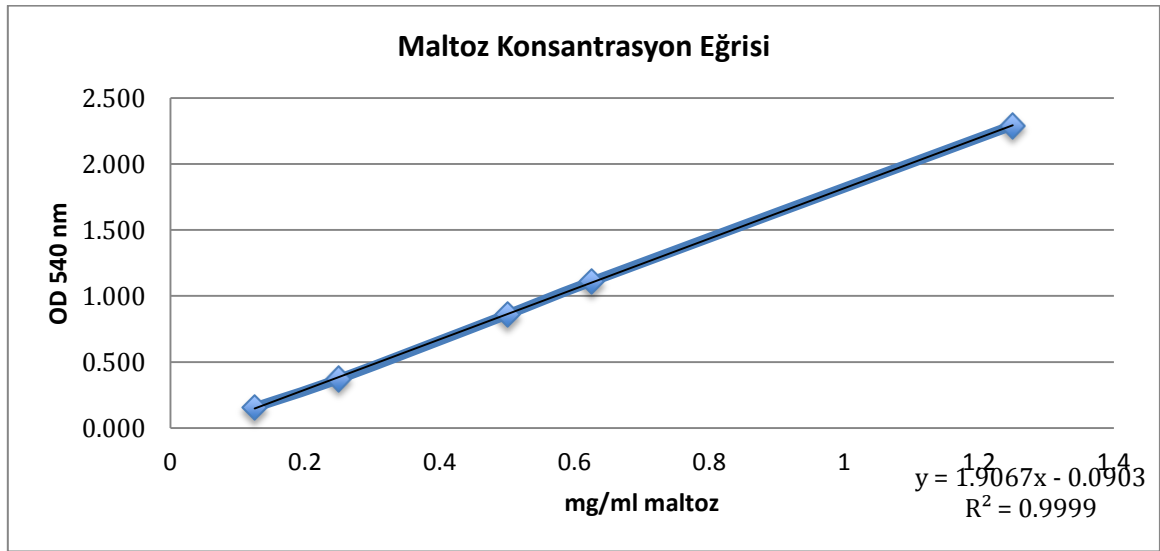


Şekil 4.18. pH 9,5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0 Glisin NaOH tamponu ile elde edilen enzim üretim değerleri

### 4.3. Alkaleen $\alpha$ -Amilaz Aktivitesi

#### 4.3.1. Maltozun Ekstinksiyon Katsayısı

$\alpha$ -amilaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltozun ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için hazırlanan dilüsyonların absorbansı 540nm'de okutulmuş buna karşılık mM maltoz konsantrasyon eğrisi çizilerek eğrinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu doğrultuda maltoz için hesaplanan ekstinksiyon katsayısı 1.9067 mM/ml olarak belirlenmiş ve şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Maltoz konsantrasyon eğrisi

#### 4.3.2. Bakteri İzolatlarının $\alpha$ -Amilaz Üretim Değerleri

Yüksek miktarda alkaleen proteaz üreten 7 izolat (E114,C265, APT11, B65, APT43, C251 ve C234) ve nişastalı sıvı besiyerlerinde (pH 7.5 ve pH 9.5) yüksek alkaleen proteaz üreten 6 adet referans suşun (*B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup>, *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup>, *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup>, *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>, *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>) alkaleen  $\alpha$ -amilaz üretimleri araştırılmıştır.

Alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimi için izolatlar ve referans suşlar alkalen proteaz üretiminde kullanılan pH 7.5 ve pH 9.5'lük nişastalı sıvı besiyerlerinde 48 ve 72 saatlik gelişimlerinin ardından, besiyeri üst sıvısı  $\alpha$ -amilaz enzimi kaynağı olarak kullanılmıştır. Alkalen proteaz aktivitesinin ölçümünde kullanıldığı gibi  $\alpha$ -amilaz aktivitesi için de pH 9.0 ve 10.0 olmak üzere 2 farklı Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır.  $\alpha$ -amilaz aktivitesi için belirtilen tamponlara substrat olarak %2 oranında çözünebilir nişasta eklenmiştir. Hücre başına düşen enzim üretim miktarı (spesifik aktive U/ml/g), enzim aktivitesi (U/ml) bakteri yaş ağırlığına (g) bölünerek hesaplanmıştır. İzolat ve standart suşların alkalen proteaz ve  $\alpha$ -amilaz aktivite değerleri Çizelge 4.8. ve 4.9.'da verilmiştir. Koyu renk ile belirtilen aktivite değerleri, ilgili parametredeki en yüksek enzim aktivitesi değerlerini göstermektedir.

İzolatların yaş pelet gram ağırlığı başına düşen  $\alpha$ -amilaz üretim miktarları genel olarak 15-377 U/ml/g aralığında değişiklik göstermiştir. En yüksek alkalen proteaz üreten iki izolatdan biri olan C265 kodlu izolatın (9.5'lük kazeinli sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0'lük Glisin-NaOH tamponu ile gerçekleştirilen alkalen proteaz aktivitesi; 103125 U/ml/g), pH 7.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0'lük Glisin-NaOH tamponu ile en yüksek  $\alpha$ -amilaz üreten izolat olduğu belirlenmiştir (377 U/ml/g). Bu izolatın aynı koşullar altındaki alkalen proteaz üretimi ise 3201 U/ml/g olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.8.).

Nişastalı sıvı besiyerinde en yüksek alkalen proteaz üretimini B65 kodlu izolat gerçekleştirmiştir (7.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 10.0'lük Glisin-NaOH tamponu ile gerçekleştirilen aktivite; 68506 U/ml/g) (Çizelge 4.8.). Ancak bu izolatın aynı koşullardaki  $\alpha$ -amilaz üretim miktarının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (35 U/ml/g). Benzer şekilde nişastalı sıvı besiyerinde araştırılan her parametre için pH 7.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde yüksek miktarda alkalen proteaz üreten APT11 (63429 U/ml/g), C251 (65939 U/ml/g), APT43 (49125 U/ml/g) kodlu izolatlar ve pH 9.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde ile yüksek miktarda alkalen proteaz üreten B65 (49683 U/ml/g), APT43 (68082 U/ml/g), B65 (42656 U/ml/g) ve APT43 (62386 U/ml/g) kodlu izolatların aynı parametre değerlerinde oldukça düşük  $\alpha$ -amilaz ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8. ve 4.9.).

APT43 kodlu izolatın ise pH 9.5'luk nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında gerçekleştirilen aktivite deneyleri sonucunda nişastalı sıvı besiyerinde en yüksek alkalen proteazı üretirken (68082 U/ml/g) aynı parametrelerde oldukça düşük alkalen  $\alpha$ -amilazı ürettiği belirlenmiştir (45 U/ml/g) (Çizelge 4.9.).

Referans suşların alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimi izolatlarla benzerlik göstermiştir. Nişastalı sıvı besiyerinde (pH 7.5) 72 saat geliştiği zaman en yüksek alkalen proteaz üretimi pH 9.0 Glisin-NaOH tamponu ile *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup> tarafından gerçekleştirilmiştir (29578 U/ml/g). Aynı koşullarda bu suşa ait  $\alpha$ -amilaz üretiminin 97 U/ml/g olduğu belirlenmiştir. En yüksek alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimini gerçekleştiren referans suşun ise *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup> olduğu belirlenmiştir (pH 9.5 nişastalı sıvı besiyerinde 72 saat gelişim sonrasında pH 9.0 glisin Na-OH tamponu ile ölçülen aktivite). Aynı koşullarda bu suşa ait alkalen proteaz üretiminin ise 7761 U/ml/g'dır (Çizelge 4.8. ve 4.9.).

**Çizelge 4.8.** Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolat ve referans suşların pH 7.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde gelişim sonrası kantitatif olarak elde edilen alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimleri

Bakteri İzolatu/ Standart Suş	pH 9.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)				pH 10.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)			
	48 Saat		72 Saat		48 Saat		72 Saat	
	Amilaz	Alkalen Proteaz	Amilaz	Alkalen Proteaz	Amilaz	Alkalen Proteaz	Amilaz	Alkalen Proteaz
E114	64	1104	54	590	55	915	49	671
C265	<b>322</b>	4026	<b>239</b>	5254	<b>377</b>	<b>3201</b>	<b>212</b>	4125
APT11	180	<b>63429</b>	38	16191	220	45485	46	16363
B65	46	21256	28	45283	34	21288	35	<b>68506</b>
APT43	22	48300	98	33665	20	<b>49125</b>	116	30113
C251	73	37987	33	<b>65939</b>	53	35493	32	59828
C234	45	25190	46	10358	31	15327	38	13750
<i>B. alcaliphilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	120	10313	72	8388	120	7883	90	6531
<i>B. halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	91	10496	143	5700	111	9167	126	5950
<i>B. gibsonii</i> DSM 8722 <sup>T</sup>	44	9747	81	19879	54	7119	76	11589
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>	<b>161</b>	8048	<b>313</b>	7688	<b>153</b>	6062	<b>322</b>	6098
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	81	17796	83	18567	98	14398	73	14415
<i>B. agaradhaerens</i> DSM8721 <sup>T</sup>	30	7975	97	29578	34	5981	90	20533

Bir ünite (U/ml)  $\alpha$ -amilaz, dakikada 1  $\mu$ mol indirgen şeker (maltoz) oluşturan enzim miktarıdır

**Çizelge 4.9.** Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolat ve referans suşların pH 9.5'lük nişastalı sıvı besiyerinde gelişim sonrası kantitatif olarak elde edilen alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimleri

Bakteri İzolatu/ Standart Suş	pH 9.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)				pH 10.0 Glisin-NaOH Tamponu ile Ölçülen Enzim Üretim Miktarları (U/ml/g)			
	48 Saat		72 Saat		48 Saat		48 Saat	
	Amilaz	Alkalen Proteaz	Amilaz	Amilaz	Alkalen Proteaz	Alkalen Proteaz	Amilaz	Alkalen Proteaz
E114	41	558	34	799	40	524	35	693
C265	<b>190</b>	6600	<b>187</b>	10074	<b>301</b>	5797	<b>177</b>	6759
APT11	41	10498	28	11303	33	9199	43	8044
B65	28	<b>49683</b>	32	23485	34	<b>42656</b>	31	36410
APT43	15	43152	<b>45</b>	<b>68082</b>	13	33413	101	<b>62386</b>
C251	43	29013	47	63219	52	29226	42	60867
C234	43	10389	41	9044	46	34375	41	10144
<i>B. alcaliphilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	23	12039	43	3850	27	9472	50	4452
<i>B. halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	<b>104</b>	4659	<b>426</b>	7761	94	4206	23	8067
<i>B. gibsonii</i> DSM 8722 <sup>T</sup>	46	4457	48	26171	24	2842	56	23772
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <sup>T</sup>	50	5312	226	20371	<b>242</b>	4265	<b>235</b>	18933
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	92	9110	78	18700	61	8292	86	16665
<i>B. agaradhaerens</i> DSM8721 <sup>T</sup>	41	558	34	799	40	524	35	693

Bir ünite (U/ml)  $\alpha$ -amilaz, dakikada 1  $\mu$ mol indirgen şeker (maltoz) oluşturan enzim miktarıdır

#### **4.4. İzolatlara ait bazı fenotipik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler**

İzolatların Gram boyamaları, faz kontrast mikroskopik incelemeleri, koloni morfolojileri, amilaz ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir. İzolatların tamamı Gram pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10.'da verilmiştir. İzolatlardan yalnızca APT26' nın katalaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. 56 izolatın 47 adeti amilaz aktivitesi gösterirken APT8, APT11, APT23, APT24, APT32, APT41, APT42, APT43 ve C234 kodlu izolatların amilaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.10.** İzolatların Gram boyama, faz kontrast mikroskopik inceleme, koloni morfolojisi, amilaz aktivitesi ve katalaz aktivitesi sonuçları

No	İzolat	Gram Boyama	Kok/Basil	Hareket	Koloni Morfolojisi					Spor Yapısı			Amilaz Aktivitesi	Katalaz Aktivitesi	
					Tüm Koloni	Kenar Yapısı	Dikey Görünüm	Yüzey	Koloni Rengi	Trans/Opak	Spor Pozisyonu	Spor Şekli			Şişkin Spor
1	APT1	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	^	+
2	APT2	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem-Kahve	Opak	Terminal	elipsoidal	-	+	+
3	APT5	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem-Kahve	Opak	Terminal	elipsoidal	+	++	+
4	APT8	+	Basil	+	Yuvarlak	Hafif dalgalı	Göbekli	Düz	Kahverengi	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	-	+
5	APT9	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	^	+
6	TG11	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	^	+
7	TG20	+	Basil	+	Filamentli	Düz	Yastık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
8	APT10	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	++	+
9	APT11	+	Basil	+	Düzensiz	Loblu	Göbekli	Kuru	Krem	Opak	Santral	oval	-	-	+
10	APT12	+	Basil	+	Düzensiz	Loblu	Göbekli	Pürüzlü	Krem (sarıms)	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	+++	+
11	APT13a	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali-Loblu	Konveks	Pürüzlü	Turuncu	Trans	Terminal	oval	-	++	+
12	APT14	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali-Loblu	Kabarık	Pürüzlü	Turuncu	Trans	Subterminal	oval	-	++	+
13	APT20b	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Turuncu	Trans	Terminal	oval	-	+++	+
14	APT23	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Düz	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	oval	-	-	+
15	APT24	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	-	+
16	APT25	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	+	+
17	APT26	+	Basil	+	Rizoid	Loblu	Konveks	Burusuk	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+	-
18	APT30	+	Basil	+	Yuvarlak	Dalgali	Yastık	Düz	Turuncu	Trans	Terminal	elipsoidal	-	+	+
19	APT32	+	Basil	+	Düzensiz-Yuvarlak	Hafif dalgalı	Konveks	Kuru	Krem	Opak	Terminal	oval	-	-	+
20	APT34	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Yastık	Pürüzlü	Turuncu	Opak	Terminal	oval	-	+++	+
21	APT35	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Sarı-Kahve	Trans	Subterminal	elipsoidal	-	+	+
22	APT36	+	Basil	+	Yuvarlak	Dalgali	Konveks	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	oval	+	-	+
23	APT37	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Santral	oval	+	-	+
24	APT38	+	Basil	+	Düzensiz	Düz	Düz	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+	+
25	APT39	+	Basil	+	Rizoid	Düz	Düz	Pürüzlü	Krem	Opak	Terminal	elipsoidal	-	++	+
26	APT40	+	Basil	+	Filamentli	Filamentli	Yastık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
27	APT41	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Konveks	Düz	Sarı-krem	Trans	Terminal	oval	+	-	+
28	APT42	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Sarı-krem	Trans	Terminal	yuvarlak	+	-	+
29	APT43	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Göbekli	Düz	Krem	Opak	Santral	oval	-	-	+
30	APT44	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Turuncu	Trans	Terminal	oval	-	+	+
31	APT47	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali-Loblu	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
32	APT48	+	Basil	+	Yuvarlak	Hafif dalgalı	Konveks	Düz	Turuncu	Trans	Terminal	elipsoidal	-	++	+
33	A107	+	Basil	+	Düzensiz	Düz	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+++	+
34	A111	+	Basil	+	Düzensiz	Loblu	Kabarık	Burusuk	Krem	Opak	Santral	elipsoidal	-	+	+
35	A131	+	Basil	+	Düzensiz	Loblu	Kabarık	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
36	A151	+	Basil	+	Düzensiz	Loblu	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
37	A185	+	Basil	+	Rizoid	Filamentli	Kabarık	Burusuk	Krem	Opak	Terminal	oval	+	++++	+
38	A325	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Kuru	Krem	Opak	Terminal	elipsoidal	+	++	+
39	A331	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Pürüzlü	krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
40	A363	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Pürüzlü	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+++	+
41	B16	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Bask	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+	+
42	B65	+	Basil	+	Düzensiz	Dalgali	Bask	Düz	Krem	Opak	Santral	elipsoidal	-	^	+
43	C83ca	+	Basil	+	Filamentli	Filamentli	Kabarık	Burusuk	Krem	Opak	Terminal	elipsoidal	+	^	+
44	C91	+	Basil	+	Filamentli	Filamentli	Kabarık	Burusuk	Kahverengi	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
45	C92	+	Basil	+	Filamentli	Filamentli	Kabarık	Burusuk	Kahverengi	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
46	C234	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem	Opak	Santral	elipsoidal	-	-	+
47	C235	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem	Opak	Santral	elipsoidal	-	^	+
48	C236	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem	Opak	Santral	elipsoidal	-	^	+
49	C241	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+	+
50	C244	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	+	+	+
51	C251	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	^	+
52	C265	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Düz	Düz	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
53	D311	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Bask	Kuru	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
54	E114	+	Basil	+	Filamentli	Filamentli	Kabarık	Burusuk	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	++	+
55	E215	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	Krem	Opak	Terminal	elipsoidal	+	^	+
56	E287	+	Basil	+	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Burusuk	Krem	Opak	Subterminal	elipsoidal	-	+++	+



İzolatlar fizyolojik özellikleri bakımından, gelişim gösterdikleri pH ve sıcaklık değerleri ile tuz istekleri bakımından incelenmiştir. Elde edilen değerler çizelge 4.11’de verilmiştir.

İzolatların pH 7.0-12.5 gibi geniş bir pH aralığında gelişim gösterdikleri, optimum gelişim gösterdikleri pH değerlerinin pH 7.0-10.0 aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir. APT2 ve APT 35 kodlu izolatların optimum gelişim gösterdiği pH değerinin 10.0 olduğu, APT2’nin fakültatif, APT35’in ise obligat alkalifil olduğu belirlenmiştir.

Benzer şekilde izolatların ekstrem sıcaklık değerlerini tolere ederek 25-70°C gibi geniş sıcaklık aralıklarında gelişebildiği belirlenmiştir. İzolatların optimum sıcaklık gösterdikleri sıcaklık değerleri ise 30-50°C aralığında değişmektedir.

İzolatlar tuz istekleri bakımından da %0-10 aralığında tuz toleransı gösterirken optimum olarak %0-7 gibi geniş bir tuz aralığında gelişim gösterdikleri belirlenmiştir.

**Çizelge 4.11.** İzolatların gelişim gösterdikleri pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu değerleri

No	İzolat	pH İsteği		Sıcaklık İsteği		Tuz İsteği	
		pH Aralığı	Optimum pH	Sıcaklık Aralığı (°C)	Optimum Sıcaklık (°C)	Tuz Aralığı (%)	Optimum Tuz (%)
1	APT1	7.0-11.5	8.0	25-65	37	0-2	0,5
2	APT2	7.0-11.0	10.0	25-65	37	0-5	0,5
3	APT5	8.0-11.0	9.0	25-55	37	0-10	2
4	APT8	7.0-11.0	8.0	25-60	37	0-0,5	0,5
5	APT9	7.0-11.0	8.0	25-60	37	0-2	0,5
6	TG11	7.0-11.0	8.0	25-70	40	0-2	0,5
7	TG20	7.0-11.0	8.0	30-60	37	0-2	0,5
8	APT10	7.0-12.5	9.0	25-65	30	0-2	0,5
9	APT11	7.0-12.0	9.0	25-65	30	0-5	0,5
10	APT12	7.0-11.0	8.0	25-55	50	0,5-7	2
11	APT13a	7.0-12.0	9.0	25-70	37	0-10	0
12	APT14	7.0-12.5	9.0	25-70	50	0-10	0
13	APT20b	7.0-12.0	9.0	25-60	37	0-7	0
14	APT23	8.0-11.0	8.0	30-55	40	0-0,5	0,5
15	APT24	7.0-12.0	8.0	25-55	37	0-2	0
16	APT25	7.0-12.0	9.0	25-65	40	0-2	0,5
17	APT26	8.0-12.0	9.0	25-55	40	0-2	0,5
18	APT30	7.0-12.5	9.0	25-70	40	0-10	0,5
19	APT32	8.0-12.5	9.0	25-70	37	0-10	0
20	APT34	8.0-12.5	9.0	25-65	40	0-10	2
21	APT35	9.0-12.5	10.0	25-55	30	0-10	7
22	APT36	7.0-12.0	8.0	25-60	40	0-0,5	0
23	APT37	7.0-12.0	9.0	25-65	30	0-7	0
24	APT38	8.0-12.5	9.0	30-65	37	0-5	0,5
25	APT39	7.0-12.5	9.0	30-65	40	0-10	0,5
26	APT40	8.0-12.0	9.0	25-65	40	0-5	2
27	APT41	7.0-12.5	8.0	25-55	30	0-2	0
28	APT42	7.0-11.5	7.0	25-65	40	0-5	0
29	APT43	7.0-12.5	8.0	25-65	37	0-5	0,5
30	APT44	7.0-12.5	8.0	25-70	37	0-10	0
31	APT47	7.0-12.0	8.0	25-60	37	0-7	2
32	APT48	7.0-12.5	9.0	25-70	37	0-10	0,5
33	A107	7.0-12.0	7.0	30-50	37	0-2	0,5
34	A111	7.0-12.0	8.0	25-60	50	0-5	0,5
35	A131	7.0-12.5	9.0	25-65	37	0-2	0,5
36	A151	7.0-12.5	9.0	30-65	37	0-7	0,5
37	A185	7.0-12.5	8.0	25-55	37	0-7	0,5
38	A325	7.0-10.0	8.0	25-60	37	0,5	0,5
39	A331	8.0-12.5	9.0	25-50	37	0-2	0,5
40	A363	8.0-12.0	8.0	25-50	40	0-2	0,5
41	B16	7.0-12.0	9.0	25-65	37	0-10	0,5
42	B65	7.0-11.0	8.0	25-60	50	0-2	0
43	C83ca	8.0-11.0	9.0	30-60	50	0-2	0,5
44	C91	7.0-10.0	7.0	25-65	37	0-2	2
45	C92	7.0-11.0	7.0	30-60	40	0-2	2
46	C234	7.0-12.5	8.0	25-70	40	0-7	0,5
47	C235	7.0-12.5	9.0	25-65	40	0-5	0,5
48	C236	7.0-12.5	8.0	25-60	30	0-10	0,5
49	C241	7.0-12.0	8.0	25-60	37	0-5	0,5
50	C244	7.0-12.5	8.0	25-70	40	0-5	2
51	C251	7.0-12.0	9.0	25-70	37	0-5	2
52	C265	7.0-12.0	9.0	25-55	37	0-2	0,5
53	D311	7.0-12.5	8.0	30-60	40	0-2	0
54	E114	8.0-11.0	9.0	25-65	30	0-2	0,5
55	E215	8.0-11.0	8.0	30-60	37	0-0,5	0
56	E287	7.0-11.0	8.0	25-65	30	0	0

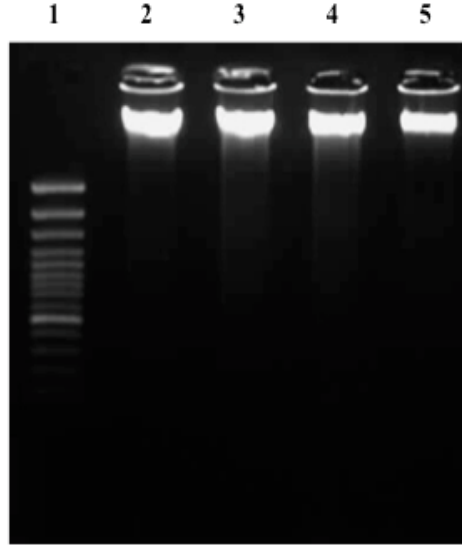
## 4.5. Bazı moleküler taksonomi teknikleriyle sınıflandırma

### 4.5.1. Genomik DNA izolasyonu

İzolatlardan ve referans suşlardan izole edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları ile RNA ve protein kirliliğini gösteren  $OD_{260/280}$  ve  $OD_{260/230}$  nm'deki absorbansları, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür (Çizelge 4.12). DNA konsantrasyonları, 430 ile 4400 ng/μl arasında değişiklik göstermiş olup, daha sonra yapılacak PCR reaksiyonunda eşit miktarda DNA kullanmak amacıyla tüm DNA konsantrasyonları 200 ng/μl olacak şekilde seyreltilmiştir. Ayrıca elde edilen genomik DNA'ların tamamı %1'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'ların bütünlükleri kontrol edilmiştir (Şekil 4.20).

**Çizelge 4.12.** Bazı DNA örneklerinin Nanodrop cihazında ölçülen nitel özellikleri

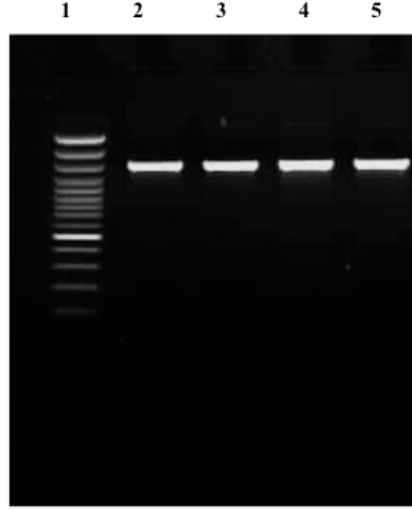
Örnek Adı	ng/μl	260/280	260/230
<b>APT2</b>	1553.32	1.98	1.96
<b>APT26</b>	1046.04	1.99	1.96
<b>APT44</b>	1366.6	1.99	1.89
<b>A107</b>	999.67	1.99	1.89



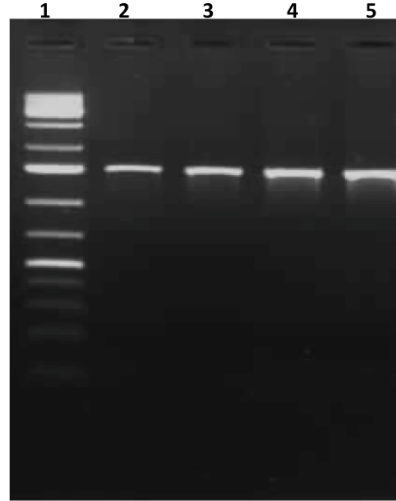
**Şekil 4.20.** Genomik DNA'lara ait agaroz jel görüntüsü; APT2, APT26, APT44 ve A107 izolatlarının genomik DNA'larının agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (1; Fermentas GeneRuler High Range DNA Markerı (#SM1353), (48502, 24508, 20555, 17000, 15258, 13825, 12119 ve 10171 bç) 2; APT2, 3; APT26, 4; APT44 ve 5; A107 'nin DNA örneği).

#### **4.5.2. 16S rRNA geninin PCR ve PCR purifikasyon sonuçları**

56 adet izolat ve 12 adet standart suşun, 16S rRNA gen dizilerine spesifik 27F forward primeri ve 1492R reverse primeri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda, hedeflendiği gibi yaklaşık 1500 bç'lik bir 16S ribozomal RNA gen bölgesinin çoğaltıldığı %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir (Şekil 4.21.). Elde edilen ürünler PCR purifikasyon kiti ile saflaştırıldıktan sonra tekrar %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek DNA dizi analizi reaksiyonlarına hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.22.).



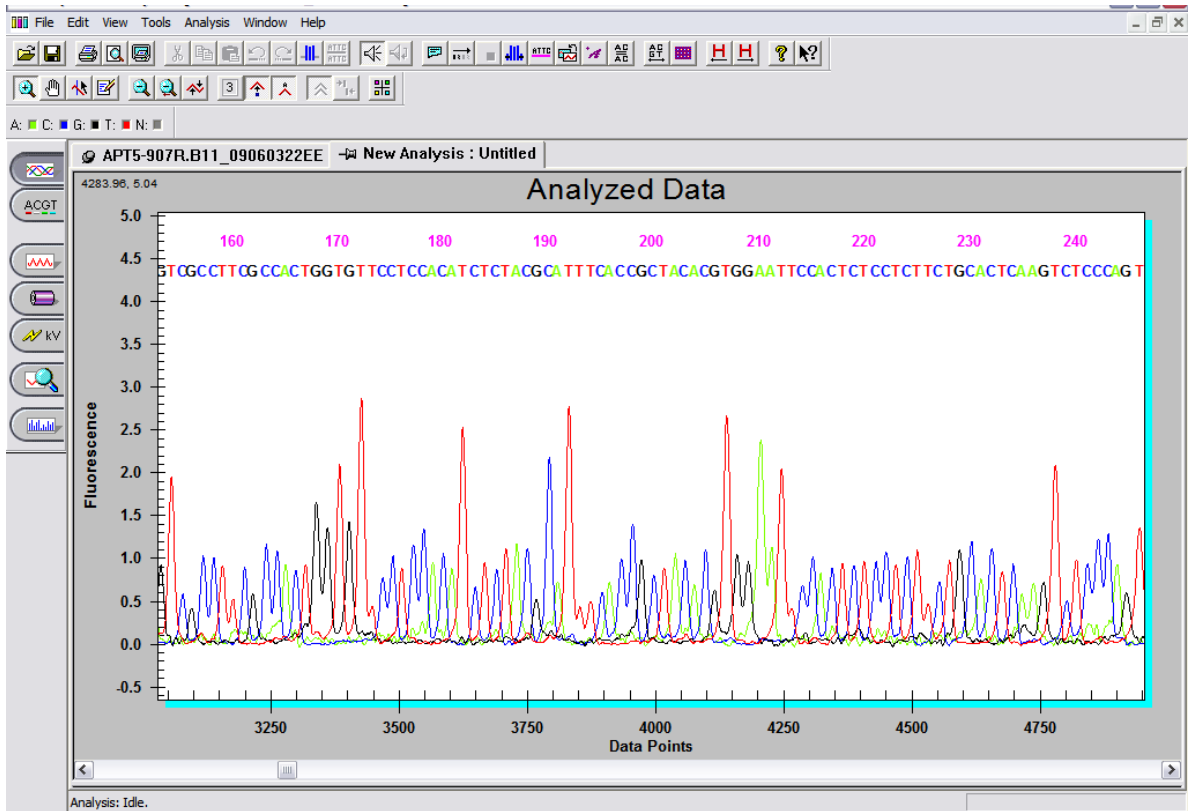
**Şekil 4.21.** PCR ürünlerinin jel agaroz görüntüsü; APT2, APT26, APT44 ve A107 izolatlarının 27F ve 1492R primerleriyle PCR sonucunda elde edilen yaklaşık 1500 bç'lik fragmentlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (1; Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (#SM0321), (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç), 2; APT2, 3; APT26, 4; APT44 ve 5; A107 örneğine ait amplikon).



**Şekil 4.22.** Purifiye edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü; APT2, APT26, APT44 ve A107 izolatlarının PCR ürünlerinin saflaştırılması sonrasında yaklaşık 1500 bç'lik fragmentlerin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (1; Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (#SM0321), (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç), 2; APT2, 3; APT26, 4; APT44 ve 5; A107 örneğine ait amplikon).

#### 4.5.3. 16S rRNA gen dizi analizleri temel alınarak yapılan filogenetik analizler

Yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki 16S rRNA gen bölgesi 27F, 519R, 907R, 926F (907R ve 926F primerleri birbirinin komplementeridir) ve 1492R primerleri ile analiz edilmiştir. Bölüm 3.2.6.4.'de de belirtildiği gibi, 500-600 bç uzunluğundaki dizileri analiz edebilme kapasitesine sahip Beckman CEQ 8000 dizi analiz cihazında yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki tüm dizinin tamamının doğru şekilde analiz edilmesi için 519R, 907R ve 926F iç primerleri ile de reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar her 5 primerle de gerçekleştirilerek başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Örnek olarak 907R primeri ile APT5 izolatının 16S rRNA gen dizisine ait elektroferogram görüntüsü Şekil 4.23.'te verilmiştir. Elde edilen diziler BioEdit v7.0.9 programı ile birleştirilmiş ve Mega 4.1. programı ile filogenetik analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.23. 907R primeri ile APT5 izolatının 16S rRNA gen dizisine ait elektroferogram görüntüsü

16S ribozomal RNA dizisi bakımından, veri tabanındaki diğer tüm dizilere % 97'den az benzerlik gösteren bir prokaryotun yeni bir tür olduğu düşünülebilir. Bunun nedeni 16S rRNA dizisinde % 97'den az benzerlik gösteren iki prokaryotun genomik DNA'larının genelde % 70'den az hibridize olmasıdır (Madigan and Martinko 2007). Elde edilen 16S rRNA geni dizilerine göre izolatların tamamı birden fazla tip suşla % 97'den fazla dizi benzerliği göstermektedir. Bu doğrultuda 16S rRNA genine göre yapılan ayırımda izolatların en çok dizi benzerliği gösterdiği tip suş temel alınmış ve taksonomik gruplandırma bu en yakın akraba tip suşa göre yapılmıştır. Ancak bu izolatların türlerinin kesin olarak belirlenmesi için Ad Hoc Committee'nin de önerdiği gibi %97'den fazla dizi benzerliği gösterdikleri tüm tip suşlarla hibridizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Wayne *et al.* 1987, Stackebrandt *et al.* 2002).

Buna göre izolatlar ve en çok 16S rRNA geni dizi benzerliği gösterdikleri tip suşlar temel alınarak oluşturulmuş evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç Şekil 4.24.'te verilmiştir. Ağaç, neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Bootstrap değerleri (%) 1000 tekrara dayandırılarak elde edilmiş olup, her 100 nükleotid pozisyonundaki 0.01'lik bir yer değişikliğini işaret etmektedir.

İzolatlar ve standart tip suşlar, filogenetik ağaçta 28 grup oluşturmuştur. İzolatların ve en yüksek dizi benzerliği gösterdikleri tip suşların 16S rRNA genlerine göre oluşturulan filogenetik grupları ve benzerlik oranları ile ilgili daha detaylı bilgi Çizelge 4.13'de belirtilmiştir. Ayrıca izolatların 16S rRNA gen dizileri gen bankası veri tabanına kayıt ettirilerek her izolata ait GenBank numarası (Çizelge 4.14.) alınmıştır. Araştırmaya dahil edilen standart suşlardan *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup> ve *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup> filogenetik ağaçta aynı dallanmayı göstererek *B. alcaliphilus* & *B. pseudalcaliphilus* grubunu (16S-25) oluştururken, *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup>, *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup>, *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>, *B. coagulans* DSM 1<sup>T</sup> ve *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup> diğer izolat ve standart suşlardan ayrılarak sırasıyla 16S-26, 16S-23, 16S-22, 16S-15 ve 16S-11 gruplarını oluşturmuşlardır. Geri kalan standart suşlar (*B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>, *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>, *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup>, *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup>) filogenetik ağaçta izolatlarla birlikte gruplanma göstermişlerdir (Şekil 4.24.)

İzolatlar *Bacillales* ordosuna dahil *Bacillaceae*, *Planococcaceae* ve *Paenibacillaceae* familyaları altında toplanmıştır. *Bacillaceae* familyasından 4 farklı cinse (*Bacillus*, *Virgibacillus*, *Lysinibacillus* ve *Exiguobacterium*) dahil türler ile gruplar elde edilirken *Planococcaceae* ve *Paenibacillaceae* familyalarından ise 2 farklı cinse (sırasıyla *Sporosarcina* ve *Paenibacillus* cinsleri) dahil türler ile taksonomik gruplar elde edilmiştir. İzolatların cins seviyesine kadarki taksonomik gruplandırmaları aşağıda verilmiştir;

### ***Bacillaceae* familyası**

Domain	= Bacteria ( <i>Eubacteria</i> )
Alem	= <i>Firmicutes</i> (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	= <i>Bacilli</i>
Ordo	= <i>Bacillales</i>
Family	= <i>Bacillaceae</i>
Genus	= <b><i>Bacillus</i></b>
Genus	= <b><i>Virgibacillus</i></b>
Genus	= <b><i>Exiguobacterium</i></b>
Genus	= <b><i>Lysinibacillus</i></b>

***Bacillus*** cinsi altında *B. subtilis* (1 izolat), *B. subtilis* subsp. *subtilis* (7 izolat), *B. mojavensis* (3 izolat), *B. licheniformis* (10 izolat), *B. aerophilus* (1 izolat), *B. pumilus* (1 izolat), *B. safensis* (9 izolat), *B. oceanisediminis* (1 izolat), *B. pseudofirmus* (1 izolat), *B. clausii* (1 izolat), *B. flexus* (1 izolat), *B. cohnii* (1 izolat), *B. cereus* (1 izolat), *B. anthracis* (6 izolat) ve *B. badius* (1 izolat) türlerine dahil olmak üzere toplam 45 adet izolat, standart tip suşlarıyla gruplanmıştır. ***Virgibacillus*** cinsi altında bir izolat, *V. proomii* türü standart tip suşla gruplanmıştır. ***Exiguobacterium*** cinsi altında *E. arabatum* tip suşuyla 5 izolat, *E. aurantiacum* ve *E. mexicanum* tip suşlarıyla ise birer izolat taksonomik olarak gruplanmıştır. ***Lysinibacillus*** cinsi altında ise *L. sphaericus* tip suşuyla birlikte bir izolat gruplanmıştır.



### ***Planococaceae* familyası**

Domain	= Bacteria ( <i>Eubacteria</i> )
Alem	= <i>Firmicutes</i> (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	= <i>Bacilli</i>
Ordo	= <i>Bacillales</i>
Family	= <i>Planococaceae</i>
Genus	= <i>Sporosarcina</i>

Bir izolat ***Sporosarcina*** cinsi altında *S. koreensis* türüne dahil tip suşla taksonomik olarak gruplanmıştır.

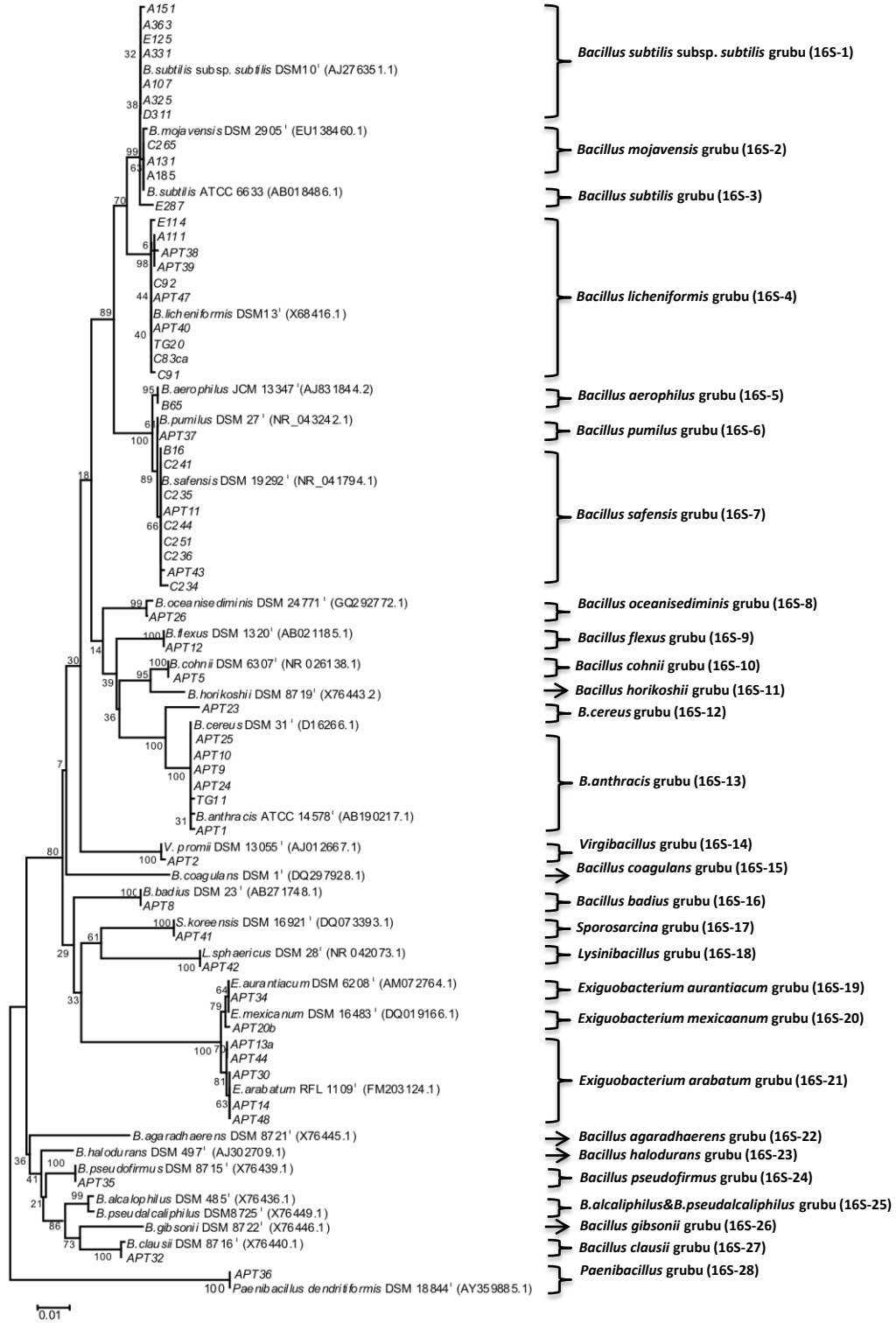
### ***Paenibacillaceae* familyası**

Domain	= Bacteria ( <i>Eubacteria</i> )
Alem	= <i>Firmicutes</i> (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	= <i>Bacilli</i>
Ordo	= <i>Bacillales</i>
Family	= <i>Paenibacillaceae</i>
Genus	= <i>Paenibacillus</i>

Bir izolat da ***Paenibacillus*** cinsi altında *P. dendritiformis* türüne dahil tip suşla taksonomik olarak gruplanmıştır.

İzolatların tip suşlarla 16S rRNA genlerine göre kümелendikleri filogenetik gruplar, bu gruplara dahil olan izolatlar ve sayıları Çizelge 4.13. ve Şekil 4.24.'te belirtilmiştir. Buna göre, *Bacillus* cinsine dahil olan izolatlardan 45'i en çok benzerlik gösterdiği tip suşlarla taksonomik olarak gruplandırılmış olup, *B. subtilis* (1 izolat), *B. subtilis* subsp. *subtilis* (7 izolat), *B. mojavensis* (3 izolat), *B. licheniformis* (10 izolat), *B. aerophilus* (1 izolat), *B. pumilus* (1 izolat), *B. safensis* (9 izolat), *B. oceanisediminis* (1 izolat), *B. pseudofirmus* (1 izolat), *B. clausii* (1 izolat), *B. flexus* (1 izolat), *B. cohnii* (1 izolat), *B. cereus* (1 izolat), *B. anthracis* (6 izolat), *B. badius* (1 izolat) türleriyle bir arada gruplanmışlardır.

Ayrıca *Virgibacillus*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus* ve *Paenibacillus* cinslerine dahil birer izolat standart tip suşlarla gruplanmıştır. *Exiguobacterium* cinsine dahil olan 7 izolat da 3 farklı tip suşla (*E. arabatum* (5), *E. aurantiacum* (1), *E. mexicanum*(1)) gruplanmıştır. *Bacillus* cinsine dahil edilen APT23 kodlu izolat *B. cereus* DSM 31<sup>T</sup> ve *B. anthracis* standart suşlarına sırasıyla % 98.3 ve 99.2 oranında benzerlik göstermişler ve filogenetik ağaçta bu yakın akraba türler ile kümelenmişlerdir. Geri kalan izolatların tamamı Çizelge 4.12.'de belirtilen standart tip suşlarla % 99,1 ve 100 oranında benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.24. 16S rRNA gen dizileri temel alınarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç

**Çizelge 4.13.** 16S rRNA genlerine göre oluşturulan filogenetik gruplar; bu gruplara dahil olan izolatların en çok benzerlik gösterdikleri tip suşla benzerlik oranları

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	Benzerlik Oranı (%)
<b><i>Bacillus</i> cinsi</b>		
<b><i>Bacillus subtilis</i> grubu (1 izolat)</b>	E287	99,7
<b><i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> grubu (7 izolat)</b>	A363	99,9
	E215	99,8
	A151	99,9
	D311	99,9
	A325	99,9
	A107	99,8
	E331	99,6
<b><i>Bacillus mojavensis</i> grubu (3 izolat)</b>	A185	99,8
	C265	99,8
	A131	99,8
<b><i>Bacillus licheniformis</i> grubu (10 izolat)</b>	C83ca	99,9
	C92	99,9
	C91	99,8
	A111	99,8
	APT38	99,7
	APT39	99,7
	APT47	99,6
	TG20	99,5
	E114	99,4
APT40	99,3	
<b><i>Bacillus aerophilus</i> grubu (1 izolat)</b>	B65	100,0
<b><i>Bacillus pumilus</i> grubu (1 izolat)</b>	APT37	99,8
<b><i>Bacillus safensis</i> grubu (9 izolat)</b>	B16	100,0
	APT43	99,9
	C235	100,0
	C244	100,0
	C241	100,0
	C234	99,9
	C236	99,9
	C251	99,9
	APT11	99,7
<b><i>Bacillus oceanisediminis</i> grubu (1 izolat)</b>	APT26	99,6
<b><i>Bacillus pseudofirmus</i> grubu (1 izolat)</b>	APT35	99,9
<b><i>Bacillus clausii</i> grubu (1 izolat)</b>	APT32	99,7
<b><i>Bacillus flexus</i> grubu (1 izolat)</b>	APT12	99,9
<b><i>Bacillus cohnii</i> grubu (1 izolat)</b>	APT5	99,9
<b><i>Bacillus cereus</i> grubu (1 izolat)</b>	APT23	98,3
<b><i>Bacillus anthracis</i> grubu (6 izolat)</b>	APT10	100,0
	APT24	100,0
	APT9	100,0
	APT25	100,0
	APT1	99,9
	TG11	99,9

**Çizelge 4.13.** 16S rRNA genlerine göre oluşturulan filogenetik gruplar; bu gruplara dahil olan izolatların en çok benzerlik gösterdikleri tip suşla benzerlik oranları (devam)

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	Benzerlik Oranı (%)
<b><i>Virgibacillus</i> cinsi</b>		
<i>Virgibacillus</i> grubu ( <i>V.proomii</i> -1 izolat)	26-APT2	99,9
<b><i>Sporosarcina</i> cinsi</b>		
<i>Sporosarcina</i> grubu ( <i>S.koreensis</i> -1 izolat)	APT41	99,7
<b><i>Lysinibacillus</i> cinsi</b>		
<i>Lysinibacillus</i> grubu ( <i>L.sphaericus</i> -1 izolat)	APT42	99,8
<b><i>Exiguobacterium</i> cinsi</b>		
<i>Exiguobacterium arabatum</i> (5 izolat)	APT14	99,9
	APT13a	99,9
	APT44	99,9
	APT48	99,9
	APT30	99,8
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (1 izolat)	APT34	99,9
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> (1 izolat)	APT20b	99,4
<b><i>Paenibacillus</i> cinsi</b>		
<i>Paenibacillus</i> grubu ( <i>P.dendritiformis</i> -1 izolat)	APT36	99,1

**Çizelge 4.14.** İzolatlara ait GenBank numaraları

No	İzolat Kodu	GenBank Numarası
1	APT1	KC519419
2	APT2	KC519420
3	APT5	JF689927.1
4	APT8	KC519421
5	APT9	KC519422
6	TG11	KC519423
7	TG20	KC519424
8	APT10	KC439345
9	APT11	KC519395
10	APT12	KC519396
11	APT13a	KC519397
12	APT14	KC519398
13	APT20b	KC519399
14	APT23	KC519400
15	APT24	KC519401
16	APT25	KC519402
17	APT26	KC519403
18	APT30	KC519404
19	APT32	KC519405
20	APT34	KC519406
21	APT35	KC519407
22	APT36	KC519408
23	APT37	KC519409
24	APT38	KC519410
25	APT39	KC519411
26	APT40	KC519412
27	APT41	KC519413
28	APT42	KC519414
29	APT43	KC519415
30	APT44	KC519416
31	APT47	KC519417
32	APT48	KC519418
33	A107	KC519425
34	A111	FJ429567.1
35	A131	KC519426
36	A151	KC519427
37	A185	KC519428
38	A325	KC519429
39	A331	KC519430
40	A363	KC519431
41	B16	KC519432
42	B65	KC519433
43	C83ca	FJ429573.1
44	C91	KC519434
45	C92	KC519435
46	C234	KC519436
47	C235	KC519437
48	C236	KC519438
49	C241	KC519439
50	C244	KC519440
51	C251	KC519441
52	C265	KC519442
53	D311	FJ430035.1
54	E114	FJ430054.1
55	E215	FJ429588.1
56	E287	FJ430065.1

Genel olarak proteaz üreticisi mikroorganizmaların pek çoğu toksik ve patojen özellik göstermelerine rağmen bunların içinde az sayıda bulunan toksik ve patojen olmayan mikroorganizmalar ticari kullanım için uygun görülen proteaz üreticileridir (generally recognized as safe; GRAS) ve *Bacillus* cinsine ait bakteriler alkalen proteaz üreticisi bakterilerin başında gelir. Bu cinse ait en çok tercih edilen alkalen proteaz üreticisi türler *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* ve *B. mojavensis*' tir (Kumar and Takagi, 1999). Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolatlardan E114; *B. licheniformis*, C265; *B. mojavensis*, B65; *B. aerophilus*, APT11, APT43, C251 ve C234 izolatları ise *B. safensis* türleri ile taksonomik olarak aynı grupta yer almıştır.

Özellikle *B. licheniformis* tarafından üretilen alkalen proteazlar endüstriyel olarak patentlenerek kuru temizleme deterjanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar and Takagi 1999, Amara *et al.* 2009). *B. mojavensis* tarafından üretilen alkalen serin proteazların da endüstriyel kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir (Beg and Gupta 2003, Haddar *et al.* 2009). Ancak gerek *B. safensis* gerekse *B. aerophilus*'un alkalen proteaz üretimi ile ilgili bir araştırma literatürde bulunmamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten bu 7 izolatın enzimlerinin saflaştırılarak karakterize edilmeye değer olduğu düşünülmektedir. Özellikle *B. safensis* ve *B. aerophilus* türlerinin alkalen proteaz üretimi ile ilgili literatürden bilgi edinilememesi nedeniyle, bu türlere dahil edilen 5 izolatın yeni alkalen proteaz kaynakları olabileceği öngörülebilir. Ayrıca bu izolatların patojen özellik taşımayan türler arasında tanımlanması endüstriyel olarak kullanım potansiyellerini desteklemektedir.

Araştırılan izolatlardan APT 23'ün *B. cereus*, APT1, APT9, APT10, APT24, APT25 ve TG11 izolatlarının ise *B. anthracis* olmak üzere III. sınıf (class III) patojen türlerle taksonomik olarak gruplandığı belirlenmiştir. Birçok standart suşa göre daha yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten bu izolatlar, ne yazık ki patojen özellikleri nedeniyle endüstriyel düzeyde enzim üretimine uygun değildir (Çizelge 4.15.). Belirtilen 7 izolatın dışındaki 49 izolatın tamamı ise patojen özellik göstermeyen türlerle bir arada kümelenmiştir.

Tüm izolat ve standart suşların içerisinde ise en düşük alkalen proteaz üretim kapasitesine sahip izolatın *Paenibacillus dendritiformis* ile gruplandırılan APT36 kodlu izolat (3824 U/ml/g) olduğu görülmektedir.

İzolatların optimum alkalen proteaz üretim koşulları dikkate alındığında, *B. safensis* grubu izolatların tamamının nişastalı sıvı besiyerinde, *B. licheniformis* ve *B. anthracis* grubu ile *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların tamamının ise kazeinli sıvı besiyerinde optimum alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca *Exiguobacterium* grubu izolatların tamamının optimum alkalen proteaz üretimi için, 48 saatlik inkübasyon süresinin uygun olduğu görülmektedir (Çizelge 4.15.). Standart suşlarla karşılaştırıldığında ise *Bacillus subtilis* ve *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* olarak gruplandırılan izolatların tamamı standart suşlar *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>,ten daha yüksek kapasitede alkalen proteaz ürettiği görülmektedir. Benzer şekilde *B. clausii* olarak gruplanan APT32 kodlu izolatın standart suş *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup>,dan daha yüksek kapasitede alkalen proteaz üretirken, *B. cohnii* olarak gruplandırılan APT5 kodlu izolat ise standart suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup>,ye göre daha düşük kapasitede alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.15.). Geri kalan izolatların standart suşları çalışmada mevcut olmadığı için, alkalen proteaz üretim değerleri bakımından standart suşlarla karşılaştırılamamışlardır.

Polifazik yaklaşım, aynı cinse ait çok sayıda benzer bakteriyi kümeler halinde gruplandırarak, tanımlayıcı fenotipik ve genotipik metodlar ile bu gruplar hakkında bilgi edinmeyi kapsar. Bu yaklaşımla aynı cinse ait benzer bakteriler hakkında oldukça fazla bilgiye sahip olmak, onların doğru olarak sınıflandırılmasında büyük önem teşkil etmektedir. Yürütülen bu tezin amacı, çok sayıdaki basil izolatının doğrudan tür teşhislerini yapmak değil, 16S rRNA gen dizileri, diğer genotipik ve fenotipik testlerle onların taksonomik pozisyonlarını polifazik bir yaklaşımla belirlemektir. Daha önce de belirtildiği gibi araştırılan tüm izolatların türlerinin tam olarak teşhis edilebilmesi için, DNA'larının yakın akraba standart suşların DNA'larıyla hybridize edilmesi gerekmektedir. Tez kapsamındaki izolatların yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği göstermeleri nedeniyle ticari kullanıma uygun şekilde patojenite göstermeyen izolatlar daha sonraki çalışmalarda materyal olarak kullanılmak üzere belirlenmiştir.



**Çizelge 4.15.** İzolatların taksonomik grupları ve yüksek alkalin proteaz aktivitesi gösterdikleri koşullar

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	Alkalin Proteaz Aktivitesi (U/ml/g)	Yüksek Alkalin Proteaz Aktivitesi Gösterdiği;			
			Sıvı besiyeri	Besiyeri pH'sı	İnkübasyon süresi	Glisin-NaOH tampon pH'sı
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	A363	44864	Kazein	7,5	48	9,0
	E215	43725	Nişasta	9,5	48	9,0
	A151	29906	Nişasta	7,5	48	9,0
	D311	53350	Nişasta	7,5	48	10,0
	A325	27726	Kazein	7,5	72	9,0
	A107	22471	Kazein	9,5	48	9,0
	E331	22367	Kazein	9,5	72	9,0
<i>Bacillus subtilis</i>	E287	41708	Kazein	9,5	48	9,0
	DSM1971	21450	Kazein	9,5	72	9,0
	ATCC6633	22458	Kazein	9,5	48	9,0
<i>Bacillus mojavensis</i>	A185	33950	Nişasta	7,5	48	9,0
	C265	103125	Kazein	9,5	48	9,0
	A131	30425	Kazein	7,5	48	9,0
<i>Bacillus licheniformis</i>	C83ca	12844	Kazein	7,5	72	10,0
	C92	18116	Kazein	9,5	48	9,0
	C91	18700	Kazein	7,5	48	10,0
	A111	17233	Kazein	9,5	72	9,0
	APT38	7398	Kazein	7,5	48	10,0
	APT39	9888	Kazein	7,5	48	9,0
	APT47	26308	Kazein	7,5	48	9,0
	TG20	10529	Kazein	7,5	48	10,0
	E114	103125	Kazein	7,5	48	9,0
	APT40	11648	Kazein	7,5	48	10,0
	DSM13	16323	Kazein	9,5	72	9,0
<i>Bacillus aerophilus</i>	B65	68506	Nişasta	7,5	72	10,0
<i>Bacillus pumilus</i>	APT37	31656	Kazein	9,5	72	9,0
<i>Bacillus safensis</i>	B16	42961	Nişasta	7,5	48	9,0
	APT43	68082	Nişasta	9,5	72	9,0
	C235	37492	Nişasta	9,5	48	9,0
	C244	65939	Nişasta	7,5	72	9,0
	C241	34490	Nişasta	7,5	48	10,0
	C234	34375	Nişasta	9,5	48	10,0
	C236	53763	Nişasta	9,5	72	9,0
	C251	65939	Nişasta	7,5	72	9,0
	APT11	63429	Nişasta	7,5	48	9,0
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	APT26	15981	Kazein	9,5	72	9,0
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	APT35	38019	Kazein	9,5	48	9,0
<i>Bacillus clausii</i>	APT32	34035	Nişasta	9,5	48	9,0
	DSM 8716 <sup>T</sup>	12950	Kazein	7,5	72	9,0
<i>Bacillus flexus</i>	APT12	31549	Kazein	9,5	48	9,0
<i>Bacillus cohnii</i>	APT5	15400	Kazein	7,5	48	10,0
	DSM 6307 <sup>T</sup>	44688	Kazein	7,5	48	10,0
<i>Bacillus cereus</i>	APT23	14491	Kazein	7,5	48	9,0
<i>Bacillus anthracis</i>	APT10	20689	Kazein	9,5	48	9,0
	APT24	22756	Kazein	9,5	72	9,0
	APT9	23623	Kazein	7,5	48	9,0
	APT25	16800	Kazein	9,5	48	9,0
	APT1	20442	Kazein	9,5	48	9,0
	TG11	29081	Kazein	7,5	48	9,0
<i>Bacillus badius</i>	APT8	24420	Kazein	7,5	48	9,0

**Çizelge 4.15.** İzolatların taksonomik grupları ve yüksek alkalen proteaz aktivitesi gösterdikleri koşullar (Devam)

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	Alkalen Proteaz Aktivitesi (U/ml/g)	Yüksek Alkalen Proteaz Aktivitesi Gösterdiği;			
			Sıvı besiyeri	Besiyeri pH'sı	İnkübasyon süresi	Glisin-NaOH tampon pH'sı
<i>Virgibacillus proomii</i>	APT2	22358	Kazein	9,5	48	9,0
<i>Sporosarcina koreensis</i>	APT41	13180	Kazein	7,5	48	10,0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	APT42	27762	Nişasta	9,5	48	10,0
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	APT34	20006	Kazein	9,5	72	9,0
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	APT20b	8054	Kazein	9,5	48	10,0
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	APT14	9598	Kazein	7,5	48	9,0
	APT13a	24844	Kazein	7,5	48	9,0
	APT44	36300	Kazein	9,5	48	9,0
	APT48	13292	Kazein	7,5	48	10,0
	APT30	16454	Kazein	7,5	48	10,0
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	APT36	3824	Kazein	9,5	48	9,0
<i>B. alcaliphilus</i>	DSM 486 <sup>T</sup>	47850	Kazein	7,5	48	9,0
<i>B. pseudalcaliphilus</i>	DSM 8715 <sup>T</sup>	12668	Kazein	9,5	72	9,0
<i>B. agaradhaerens</i>	DSM 8721 <sup>T</sup>	29578	Nişasta	7,5	72	9,0
<i>B. halodurans</i>	DSM 497 <sup>T</sup>	18993	Kazein	7,5	48	10,0
<i>B. horikoshii</i>	DSM 8719 <sup>T</sup>	15461	Kazein	7,5	48	10,0
<i>B. gibsonii</i>	DSM 8722 <sup>T</sup>	26171	Nişasta	9,5	72	9,0
<i>B. coagulans</i>	DSM 1 <sup>T</sup>	15538	Nişasta	7,5	72	9,0

#### 4.5.4. ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile elde edilen DNA bant profillerinin değerlendirilmesi

ITS, BOX ve (GTG)<sub>5</sub> PCR ile elde edilen DNA bantlarının varlığı veya yokluğu ve yoğunluklarına göre yapılan kümeleme analizinde, GelCompar II yazılımı benzerlik derecelerinin sınırlarını % 16.66, 33.33, 49.99, 66.66 ve 83.3 olarak kullanmıştır. Bu doğrultuda bant profilleri bakımından % 83.3-100 benzerlik gösteren örnekler birlikte gruplandırılırken, % 83'ün altında benzerlik gösteren örneklerin bant profilleri eşsiz bant profili olarak tanımlanmıştır.

İzolat ve standart suşlar ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR teknikleri ile elde edilen bant profillerine göre sırasıyla 28, 33 ve 51 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar 16S rRNA geni gibi evrimsel olarak iyi korunmamış olan 16S-23S rRNA genleri arasındaki ITS bölgeleri ile (GTG)<sub>5</sub> ve BOX gibi tüm genom boyunca tekrar eden genetik elementlerle

oluşturulduğu için izolat ve standart suşların genetik çeşitliliklerinin ortaya koyulmasında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. 16S rRNA geni dizi analizi, ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile elde edilen grupların sayısı ile gruplardaki izolat ve standart suşlar sırasıyla Çizelge 4.16 ve 4.17’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 16S rRNA geni grupları ile en fazla uyumu ITS-PCR grupları göstermiştir. Tür içi farklılıkların ortaya koyulmasında ise en fazla ayırım gücü (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile sağlanmıştır. ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR bant profillerinin bir araya getirilmesiyle elde edilen dendogram Şekil 4.25.’te verilmiştir. Her üç teknikle ayrı ayrı gerçekleştirilen kümeleme analizleri ise bölüm 4.5.4.1, 4.5.4.2. ve 4.5.4.3.’te ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Çizelge 4.16.** 16S rRNA geni, ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile elde edilen gruplar

	16S rRNA	ITS-PCR	BOX-PCR	GTG-PCR
<b>Standart Gruplarının Sayısı</b>	6	7	5	10
<b>İzolat Gruplarının Sayısı</b>	22	21	28	41
<b>Toplam Grup Sayısı</b>	28	28	33	51

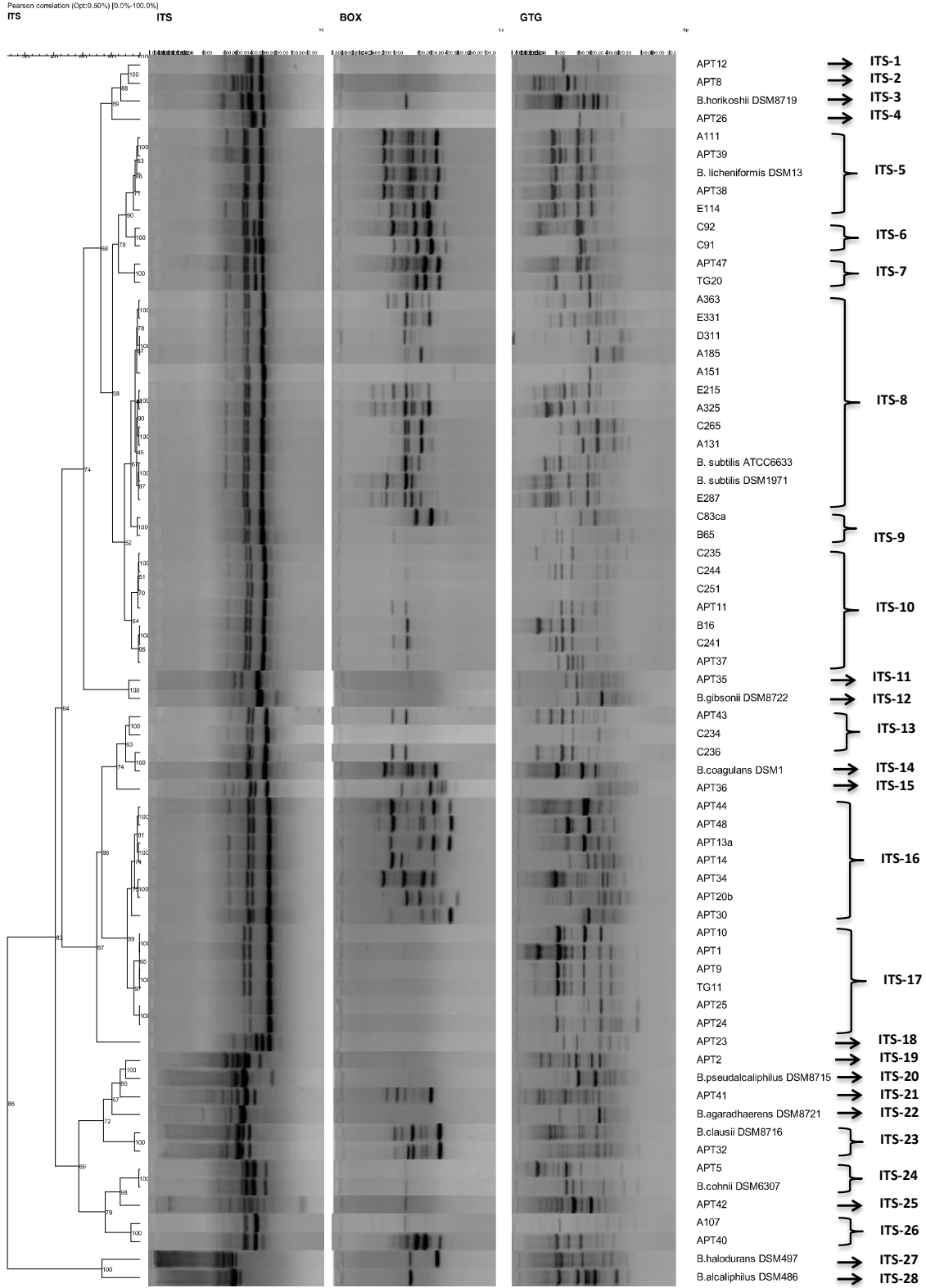
Araştırılan izolatlar, referans suşlarla %97’den fazla 16S rRNA geni benzerliği göstermektedir. Bu nedenle izolatların türlerinin tam olarak teşhis edilmesi için birden fazla yakın akraba referans suşla DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Pahalı ve uygulaması zor bir teknik olan DNA-DNA hibridizasyonu deneyi için, ucuz ve uygulanması kolay olan nükleik asit parmak izi teknikleri ile uygun referans suşların seçilmesi mümkündür (Cihan *et al.* 2011). Böylelikle daha az benzerlik gösteren referans suşlarla hibridizasyon olasılığı azaltılmaktadır.

Tez kapsamında ITS, BOX ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile oldukça ayırıcı bant profilleri elde edilmiştir. Gelecek yıllarda hibridizasyon deneylerinin gerçekleşmesi durumunda, 16S rRNA gen dizileri ve bu tekniklerden elde edilen verilerin referans suşların seçiminin kolaylık sağlayacağı ön görülmektedir.

Çizelge 4.17. 16S rRNA geni dizi analizi, ITS-PCR, BOX-PCR ve GTG-PCR ile oluşan gruplar

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	16S Grubu	ITS Grubu	BOX Grubu	GTG Grubu
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	A363	16S-1	ITS-8	BOX-27	GTG-44
	E215	16S-1	ITS-8	BOX-28*	GTG-44
	A151	16S-1	ITS-8	BOX-25*	GTG-16*
	D311	16S-1	ITS-8	BOX-30	GTG-45
	A325	16S-1	ITS-8	BOX-11	GTG-41*
	A107	16S-1	ITS-26	BOX-31*	GTG-46*
	E331	16S-1	ITS-8	BOX-11	GTG-1*
<i>Bacillus subtilis</i>	E287	16S-2	ITS-8	BOX-29*	GTG-43*
	DSM1971	-	ITS-8	BOX-27	GTG-42*
	ATCC6633	16S-2	ITS-8	BOX-30	GTG-45
<i>Bacillus mojavensis</i>	A185	16S-3	ITS-8	BOX-26	GTG-10
	C265	16S-3	ITS-8	BOX-26	GTG-10
	A131	16S-3	ITS-8	BOX-26	GTG-10
	<i>Bacillus licheniformis</i>	C83ca	16S-4	ITS-9	BOX-10
C92		16S-4	ITS-6	BOX-9	GTG-21
C91		16S-4	ITS-6	BOX-10	GTG-12*
A111		16S-4	ITS-5	BOX-4	GTG-22
APT38		16S-4	ITS-5	BOX-4	GTG-22
APT39		16S-4	ITS-5	BOX-4	GTG-22
APT47		16S-4	ITS-7	BOX-8*	GTG-24*
TG20		16S-4	ITS-7	BOX-7	GTG-20*
E114		16S-4	ITS-5	BOX-9	GTG-21
APT40		16S-4	ITS-26	BOX-7	GTG-25*
DSM13		16S-4	ITS-5	BOX-5*	GTG-22
<i>Bacillus aerophilus</i>		B65	16S-5	ITS-9	BOX-24*
<i>Bacillus pumilus</i>	APT37	16S-6	ITS-10	BOX-32	GTG-6*
<i>Bacillus safensis</i>	B16	16S-7	ITS-10	BOX-32	GTG-4
	APT43	16S-7	ITS-13	BOX-33	GTG-7
	C235	16S-7	ITS-10	BOX-23	GTG-3
	C244	16S-7	ITS-10	BOX-23	GTG-4
	C241	16S-7	ITS-10	BOX-32	GTG-4
	C234	16S-7	ITS-13	BOX-14	GTG-3
	C236	16S-7	ITS-13	BOX-33	GTG-7
	C251	16S-7	ITS-10	BOX-23	GTG-5
	APT11	16S-7	ITS-10	BOX-33	GTG-5
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	APT26	16S-8	ITS-4*	BOX-14	GTG-15*
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	APT35	16S-24	ITS-11*	BOX-14	GTG-11*
<i>Bacillus clausii</i>	APT32	16S-27	ITS-23	BOX-2*	GTG-19*
	DSM8716	16S-27	ITS-23	BOX-1*	GTG-26*
<i>Bacillus flexus</i>	APT12	16S-9	ITS-1*	BOX-14	GTG-13*
<i>Bacillus cohnii</i>	APT5	16S-10	ITS-24	BOX-14	GTG-51*
	DSM6307	16S-10	ITS-24	BOX-14	GTG-38*
<i>Bacillus cereus</i>	APT23	16S-12	ITS-18*	BOX-14	GTG-37*
<i>Bacillus anthracis</i>	APT10	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-36*
	APT24	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-35
	APT9	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-33
	APT25	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-35
	APT1	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-34*
	TG11	16S-13	ITS-17	BOX-14	GTG-33
<i>Bacillus bacillus</i>	APT8	16S-16	ITS-2*	BOX-14	GTG-28*
<i>Virgibacillus proomii</i>	APT2	16S-14	ITS-19*	BOX-14	GTG-50*
<i>Sporosarcina koreensis</i>	APT41	16S-17	ITS-21*	BOX-12*	GTG-47*
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	APT42	16S-18	ITS-25*	BOX-14	GTG-2*
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	APT34	16S-19	ITS-16	BOX-17*	GTG-39*
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	APT20b	16S-20	ITS-16	BOX-18*	GTG-48*
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	APT14	16S-21	ITS-16	BOX-19*	GTG-29
	APT13a	16S-21	ITS-16	BOX-22	GTG-27
	APT44	16S-21	ITS-16	BOX-20*	GTG-27
	APT48	16S-21	ITS-16	BOX-21*	GTG-30*
	APT30	16S-21	ITS-16	BOX-22	GTG-29
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	APT36	16S-28	ITS-15*	BOX-13*	GTG-17*
<i>B.alcaliphilus</i>	DSM486	16S-25	ITS-28*	BOX-16*	GTG-49*
<i>B.pseudalcaliphilus</i>	DSM8715	16S-25	ITS-20*	BOX-14	GTG-18*
<i>B.agaradhaerens</i>	DSM8721	16S-22	ITS-22*	BOX-14	GTG-31*
<i>B.halodurans</i>	DSM497	16S-23	ITS-27*	BOX-3*	GTG-40*
<i>B.horikoshii</i>	DSM8719	16S-11	ITS-3*	BOX-15*	GTG-8*
<i>B.gibsonii</i>	DSM8722	16S-26	ITS-12*	BOX-14	GTG-32*
<i>B.coagulans</i>	DSM1	16S-15	ITS-14*	BOX-6*	GTG-23*

\*' işaretli 'eşsiz bant profili' oluşturan izolatlar için, 'İtalik' yazı tipi standart şuşların oluşturduğu gruplar için, hem 'İtalik' yazı tipi hem '\*' işaretli ile belirtilen gruplar 'eşsiz bant profili oluşturan standart şuşlar' için kullanılmıştır.



**Şekil. 4.25.** ITS, BOX ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR bant profillerinin biraraya getirilmesiyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Pearson korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.3.1. İntergenik 16S-23S rRNA genlerinin ITS-PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri

Ribozomal operon, genetik ilişkinin belirlenmesinde ve türlerin hızlı bir şekilde tanımlanmasında kullanılan klasik moleküler markerlardan biridir (Amann *et al.* 1995). Ribozomal operonun birçok farklı bölgesinden biri olan 16 ve 23S ribosomal DNA arasındaki ITS (internal transcribed spacers) bölgeleri, mikrobiyal türlerin tanımlanmasında ve türler arasındaki ilişkinin analiz edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Gürtler and Stanisich 1996, Daffonchio *et al.* 1998a, Gürtler 1999). ITS bölgeleri birçok bakteriyal genomda çoklu kopyalar halinde bulunur (Jensen *et al.* 1993, Gürtler and Stanisich 1996). 16S-23S ITS bölgeleri, evrimsel olarak oldukça korunmuş olan 16S rRNA gen dizilerine göre daha fazla çeşitlilik içerebilmektedir. Bu nedenle ITS-PCR parmak izi tekniği tür içi ilişkilerin ortaya koyulmasında uygulanan nükleik asit temelli teknikler arasındadır (Logan *et al.* 2009).

Ayrıca, 16S ve 23S rRNA genetik lokuslarının arasında bulunan ITS bölgesi, bakterileri tür ve alt tür seviyesinde ayırmaya yarayan, bakteri türüne göre özgünlük gösteren ve literatürde sık kullanılan PCR temelli bir yöntemlerden biridir. ITS bölgesindeki polimorfizmin sebebi, sayı ve dizi açısından farklılık gösteren ve birden fazla ribozomal operon içeren tRNA genlerinin varlığıdır (Daffonchio *et al.* 2003). Bu polimorfizm, Flint *et al.* (2001), Daffonchio *et al.* (2003), Freitas *et al.* (2008), Manachini *et al.* (2000) ve Cihan *et al.* (2011) gibi araştırmacıların yapmış olduğu önceki çalışmalarda, yakından ilişkili endospor oluşturan basil türleri arasındaki genotipik çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır.

Araştırılan 56 adet izolat ile 12 adet referans suşun S-D-Bact-1494-a-S-20 ve L-D-Bact-0035-a-A-15 primerleri kullanılarak, 16S ve 23S rRNA genlerinin arasındaki ITS bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen nükleik asit parmak izleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforezi uygulanarak görüntülenen ITS parmak izi profillerindeki DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğüne göre izolatların genotipik çeşitlilikleri belirlenmiştir.

İzolat ve standartların **ITS gen bölgesinin** PCR reaksiyonları sonucunda, tür bazında **toplam 28 DNA profili** elde edilmiştir (Şekil 4.26.) 16S rRNA gen gruplarıyla karşılaştırılan ITS gen grupları sonuçlarına göre:

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan A107 kodlu izolat hariç *B. subtilis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* ve *B. mojavensis* gruplarına dahil edilen izolatların tamamı **ITS-8** gen grubu DNA profillerini oluşturmuştur. Bu gruptaki izolatlar ve standart suşlar (*B. subtilis* DSM 1971, *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>) birbirleriyle aynı bant profilini vermiştir. 16S rRNA gen bölgelerine göre *B. subtilis* türünden ayrılan *B. mojavensis* türüne dahil izolatlar, ITS gen bölgeleri bakımından *B. subtilis* türüne dahil izolatlarla aynı profili göstermiştir. Bu sonuçlara göre ITS gen bölgesinin *B. subtilis* ve *B. mojavensis* türü arasında ayırt edici özellik taşımadığı belirlenmiştir. Ayrıca 16S rRNA gen bölgesi bakımından *B. subtilis* subsp. *subtilis* türüne %99.8 benzerlik gösteren A107 kodlu izolatın ITS bant profili, ITS-8 gen grubu ile oldukça farklılık göstermiş ve **ITS-26** grubunda tanımlanmıştır. A107 kodlu izolat gösterdiği farklı ITS profili ile diğer *B. subtilis* türlerinden ayrılabilmiştir.
- *B. licheniformis* grubuna dahil edilen izolatlardan A111, APT38, APT39, E114 ve standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> **ITS-5** gen grubunda, C83ca **ITS-9** grubunda, C91 ve C92 **ITS-6** grubunda, APT47 ve TG20 **ITS-7** grubunda, APT40 **ITS-26** grubunda yer alarak birbirlerinden farklılık göstermiştir. Birbiriyle yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği olan bu gruptaki referans tür ve suşlar gösterdikleri 5 farklı ITS profili ile birbirlerinden ayrılabilmişlerdir.
- *B. aerophilus* grubuna dahil edilen B65 kodlu izolat, *B. licheniformis* grubuna dahil olan C83ca kodlu izolat ile **ITS-9** grubunu oluşturmuştur. 16S rRNA gen dizisine göre *B. licheniformis* grubunda tanımlanan C83ca kodlu izolatın, ITS gen profili bakımından diğer *B. licheniformis* grubu izolatlardan ayrılarak, *B. licheniformis* ile yüksek dizi benzerliği gösteren *B. aerophilus* grubunda yer alması dikkat çekicidir.
- *B. safensis* grubuna dahil edilen izolatlar iki farklı ITS grubu altında toplanmışlardır. **ITS-10** grubuna dahil olan B16, C235, C244, C241, C251 ve APT11 kodlu izolatlar birbirleriyle aynı bant profiline sahipken, **ITS-13** grubuna dahil olan APT43, C234 ve C236 kodlu izolatların ITS-10 grubundan oldukça farklı bant profiline sahip olduğu belirlenmiştir.

- Bunun yanı sıra *B. pumilus* grubuna dahil olan APT37 kodlu izolat *B. safensis* ITS-10 grubu ile aynı bant profilini vermiştir. Bu nedenle ITS gen bölgesinin *B. safensis* ve *B. pumilus* türü arasında ayırt edici özellik taşımadığı belirlenirken, *B. safensis* türü içindeki farklılıkları ortaya koyabildiği belirlenmiştir.
- *B. anthracis* grubunu oluşturan izolatların tamamı (APT10, APT24, APT9, APT25, APT1 ve TG11) bu gruba spesifik bant profilleri ile **ITS-17** grubunu oluşturmuşlardır. *B. cereus* olarak tanımlanan APT23 kodlu izolat ise **ITS-18** grubunda eşsiz bant profili oluşturmuştur. Bu duruma göre ITS gen bölgesinin, birbirleriyle oldukça yüksek 16S rRNA gen dizisi benzerliği gösteren bu iki patojen türün ayrılması için ayırt edici özelliğe sahip olduğu, ancak *B. anthracis* türleri için ayırt edici özellik göstermediği belirlenmiştir.
- *Exiguobacterium* cinsinin 3 farklı türüne dahil olan APT14, APT13a, APT44, APT48, APT30, APT34 ve APT20b kodlu izolatlar herhangi bir fark olmaksızın, *Exiguobacterium* cinsine özgü **ITS-16** profilini oluşturmuş ve ITS bant profillerinin *Exiguobacterium* cinsini diğer basillerden ayırt edebileceği belirlenirken tür/alt tür seviyesinde ayırım sağlamadığı belirlenmiştir.
- *B. cohnii* grubuna dahil olan APT5 kodlu izolat referans suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> ile tür içinde herhangi bir fark olmaksızın **ITS-24** grubunu oluşturmuşlardır. Aynı şekilde *B. clausii* grubuna dahil olan APT32 kodlu izolat referans suş *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup> ile **ITS-23** grubunu oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre ITS gen bölgesinin her iki tür için de (*B. cohnii* ve *B. clausii*) ayırım sağlamadığı ancak bu türleri birbirinden ve diğer *Bacillus* türlerinden ayırdığı belirlenmiştir.
- APT26, APT35, APT12, APT23, APT8, APT2, APT41, APT42 ve APT36 kodlu izolatlar sırasıyla **ITS-4, ITS-11, ITS-1, ITS-18, ITS-2, ITS-19, ITS-21, ITS-25** ve **ITS-15** gruplarında ITS gen bölgelerine göre her biri eşsiz ITS profilleri oluşturmuşlardır. Bu izolatlar tamamen kendilerine has ITS profilleri ile diğer izolatlardan ve standart suşlardan ayrılmıştır. Ancak bu izolatların her birinin araştırılan örnekler içerisinde tek olması ve referans suşlarının olmaması elde edilen bant profillerinin kesin olarak bu türlere spesifik olduğunu ortaya koymamaktadır.

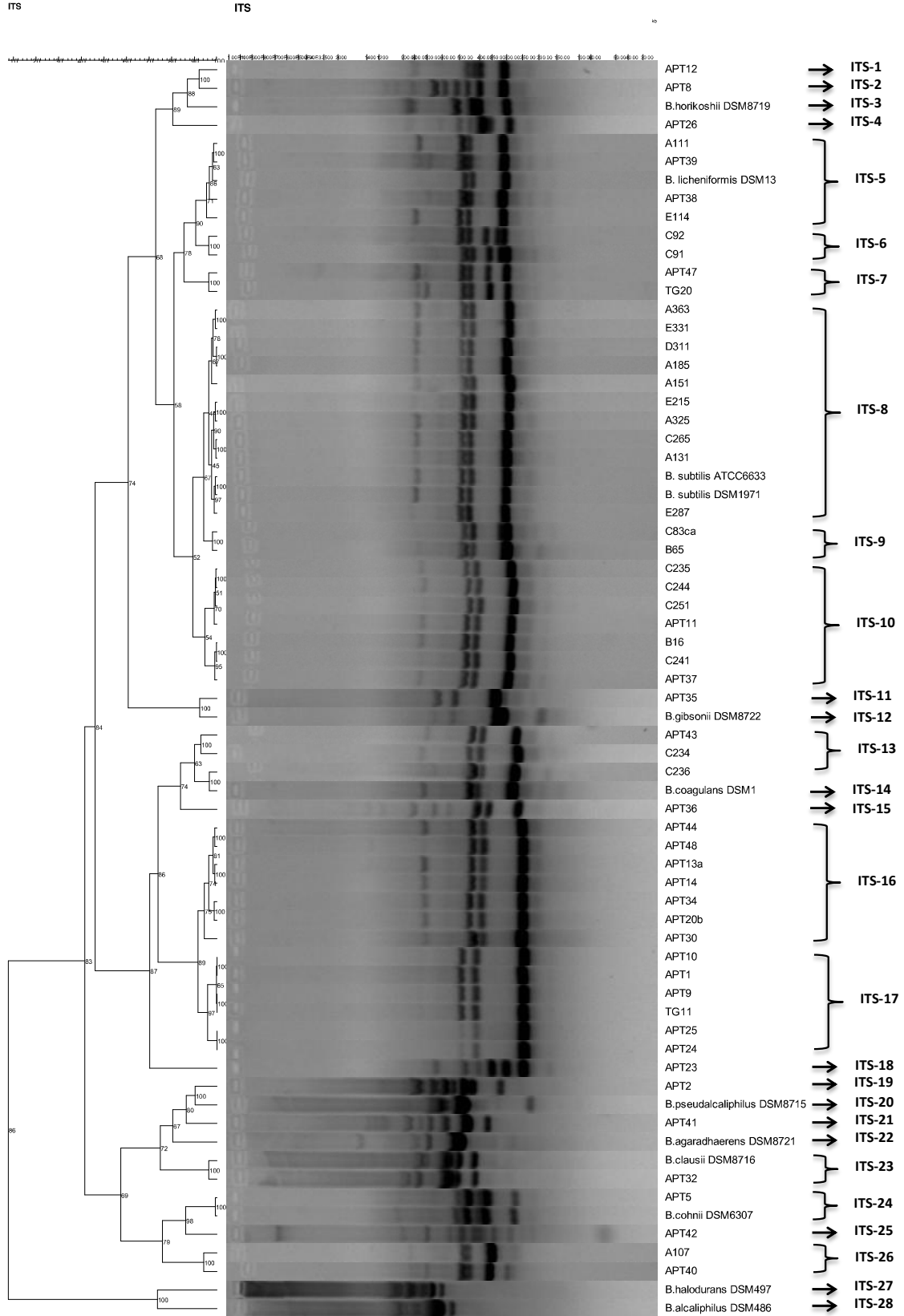


- Benzer şekilde referans suşlardan *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup>, *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup>, *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>, *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup>, *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup>, *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup> ve *B. coagulans* DSM 1<sup>T</sup> tamamen kendilerine has ITS profilleri ile diğer izolatlardan ve standart suşlardan ayrılarak sırasıyla **ITS-28**, **ITS-20**, **ITS-22**, **ITS-27**, **ITS-3**, **ITS-12** ve **ITS-14** gruplarını oluşturmuştur.

Bu sonuçlara göre izolat ve referans suşların 16S rRNA genlerine göre oluşturdukları gruplar ITS-PCR verileri ile desteklenmiştir. ITS gen bölgelerine göre yapılan gruplandırmada, bu tekniğin cins bazında yüksek ayırım gücü olduğu kadar *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis* türlerine ait gruplarda görüldüğü üzere tür ve alt türler arasında bile ayırım sağlayarak bu türleri birbirinden ayırt edebilmeyi sağlamıştır.

Daffonchio *et al.* (1998a, 1998b) *B. cereus* grubunun 6 türünün (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* ve *B. weihenstephanensis*) birbirleriyle eş tipik ITS profiline sahip olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle bu tekniğin *B. cereus* türlerinin tanımlanmasında etkin olmadığını öne sürülmektedir (Daffonchio *et al.* 1998a, Daffonchio *et al.* 1998b, Daffonchio *et al.* 2000). Huang *et al.* (2012) ise ITS-PCR'ın *Bacillus* izolatlarının tür seviyesinde tanımlanmasında etkin olmadığını ve *B. subtilis* türü ile *B. cereus* türlerini birbirinden ayıramadığını bildirmiştir. Ancak her iki çalışmanın aksine, tez çalışmasında elde edilen ITS-PCR sonuçları *B. subtilis* türü ile *B. cereus* ve *B. anthracis* türlerinin birbirlerinden başarılı bir şekilde ayrıldığını göstermektedir (Şekil 4.25).

Freitas *et al.* (2008), katılaştırılmış bitki atıklarından izole ettikleri bir çok *Bacillus* izolatıyla yaptıkları araştırmada ITS-PCR'ın *B. subtilis* ATCC6633<sup>T</sup>, *B. licheniformis* DSM13<sup>T</sup>, *B. pumilus* ATCC7061<sup>T</sup>, *B. amyloliquefaciens* ATCC23842, *B. cereus* ATCC11778 ve *B. sphaericus* ATCC 14577<sup>T</sup> referans suşlarının ayrılmasında yeterli rezolüsyonu sağladığını ancak bu tekniği kullanarak *Bacillus* izolatlarının referans suşlarla ilişkilendirilmesinin mümkün olmadığını bildirmiştir



**Şeki 4.26.** ITS-PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Pearson korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.4.2. BOX elementinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri

BOX ve (GTG)<sub>5</sub> gibi genomda tekrar eden REP elementleri, prokaryotik genomlarda evrimsel olarak korunmuş tekrar dizileri olarak bilinir ve PCR temelli genomik parmak izi (REP-PCR) analizlerinde oligonükleotid bağlanma bölgesi olarak kullanılabilirler. Rep-PCR analizinin diğer parmak izi analizlerinden en önemli farkı, bakterinin tüm genomundaki tekrar bölgelerinin taranmasına izin vererek suşların tür ve alt tür seviyesinde ayrılmasına olanak sağlamasıdır (Versalovic *et al.* 1994). BOX ve (GTG)<sub>5</sub> elementlerinin endospor oluşturan basillerin taksonomik sınıflandırılmasındaki etkinliği bir çok araştırmada gösterilmiştir (Heyrman *et al.* 2003, De Clerck *et al.* 2004a, Freitas *et al.* 2008, Logan *et al.* 2009, Cihan *et al.* 2011).

Araştırılan 56 adet izolat ve 12 referans suşun BOXA1R primeri ile PCR reaksiyonu yapılmış ve tekrar eden BOX elementi çoğaltılarak elde edilen nükleik asit parmak izlerine ait dendrogram Şekil 4.27.' de verilmiştir. Agaroz jel elektroforezi uygulanarak görüntülenen BOX elementi parmak izi profillerindeki DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğü analiz edilerek izolatların genotipik çeşitlilikleri incelenmiştir.

İzolat ve standartların **BOX elementlerinin** PCR reaksiyonları sonucunda, tür ve cins bazında **toplam 33 DNA profili** elde edilmiştir (Şekil 4.27.) 16S rRNA gen gruplarıyla karşılaştırılan BOX elementine göre oluşan gruplardan elde edilen verilere göre:

- *B. subtilis* ve *B. subtilis* subsp. *subtilis* gruplarına dahil izolatlardan E215 (**BOX-28**), A151 (**Box-25**) ve A107 (**BOX-31**) BOX elementleri bakımından eşsiz profiller oluşturarak birbirlerinden ve diğer *B. subtilis* subsp. *subtilis* izolatlarından ayrılmıştır. *B. subtilis* subsp. *subtilis* türü izolatlardan D311 standart suş *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> ile, A363 kodlu izolat ise *B. subtilis* DSM 1971 ile aynı bant profillerini vererek sırasıyla **BOX-30** ve **BOX-27** gruplarını oluşturmuşlardır. *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil izolatlardan A325 ve E331 kodlu izolatlar oldukça benzer bant profilleriyle **BOX-11** grubunu oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre BOX elementi ile elde edilen DNA profillerinin *B. subtilis* subsp. *subtilis*

grubuna dahil izolatların birbirlerinden ayrılmasını sağlarken, *B. subtilis* türü ile *B. subtilis* subsp. *subtilis* alt türü arasındaki ayrımı sağlayamadığı belirlenmiştir.

- ITS gen bölgeleri bakımından *B. subtilis* türü izolatlardan ayrılamayan *B. mojavensis* grubuna dahil A185, A131 ve C265 kodlu izolatlar BOX elementleri ile ayrılabilmişlerdir. Bu 3 izolat *B. mojavensis* türüne özgü DNA bant profilleri vererek **BOX-26** grubunu oluşturmuştur. Böylece yüksek 16S rRNA geni dizi benzerliği gösteren *B. subtilis* ile *B. mojavensis* türlerinin BOX elementleri ile birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır.
- *B. licheniformis* grubuna dahil edilen izolatlardan APT47 ve standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> eşsiz bant profilleri vererek sırasıyla **BOX-8** ve **BOX-5** gruplarını oluşturmuştur. A111, APT38 ve APT 39 kodlu izolatlar ITS gen grubunda (ITS-5) olduğu gibi aynı bant profilini vererek **BOX-4** grubunu oluşturmuştur. TG20 ve APT40 **BOX-7**, C92 ve E114 **BOX-9**, C83ca ve C91 **BOX-10** gruplarını oluşturan izolatların farklı DNA bant profillerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak BOX elementi bakımından *B. licheniformis* grubu izolatlar birbirlerinden tür/alt tür seviyesinde ayrım göstermiştir. Standart suşun izolatlardan farklı olarak eşsiz profil oluşturması bu ayrımı daha da desteklemektedir.
- *B. safensis* grubuna dahil edilen izolatlar ITS gruplandırmasında olduğu gibi BOX elementleri bakımından da birden fazla BOX grubu oluşturmuştur. B16 ve C241 **BOX-32**, C235, C251 ve C244 **BOX-23**, APT43, C236 ve APT11 **BOX-33** bant profillerini oluşturarak tür/alt tür seviyesinde birbirlerinden ayrılmıştır. ITS bant profilinde olduğu gibi *B. pumilus* grubuna dahil olan APT37 kodlu izolat **BOX-32** grubu ile aynı bant profilini vererek BOX elementi bakımından *B. safensis* türünden ayrılamamıştır. BOX elementinin de ITS gen bölgesi gibi *B. safensis* ve *B. pumilus* türü arasında ayırt edici özellik taşımadığı ancak *B. safensis* türü içindeki farklılıkları ortaya koyabildiği belirlenmiştir.
- ITS gen bölgeleri bakımından tek bir grup (ITS-16) oluşturan *Exiguobacterium* cinsinin farklı türlerine dahil olan izolatlar BOX elementleri ile oldukça ayrıcalık DNA profilleri oluşturmuştur. *E. aurantiacum* olarak tanımlanan APT34, *E. mexicanum* olarak tanımlanan APT20b ve *E. arabatum* olarak tanımlanan APT14,

APT44 ve APT48 kodlu izolatlar BOX elementleri bakımından eşsiz profiller oluşturarak sırasıyla BOX-17, BOX-18, BOX-19, BOX-20 ve BOX-21 gruplarını oluşturmuştur. *E. arabatum* türüne dahil edilen APT13a ve APT30 ise birbirleriyle oldukça benzer DNA bantları vererek BOX-22 grubuna dahil edilmiştir. Bu sonuçlara göre BOX elementinin *Exiguobacterium* cinsine dahil olan izolatların tür içi farklılıklarının ortaya koyulmasında oldukça etkili olduğu belirlenmiştir.

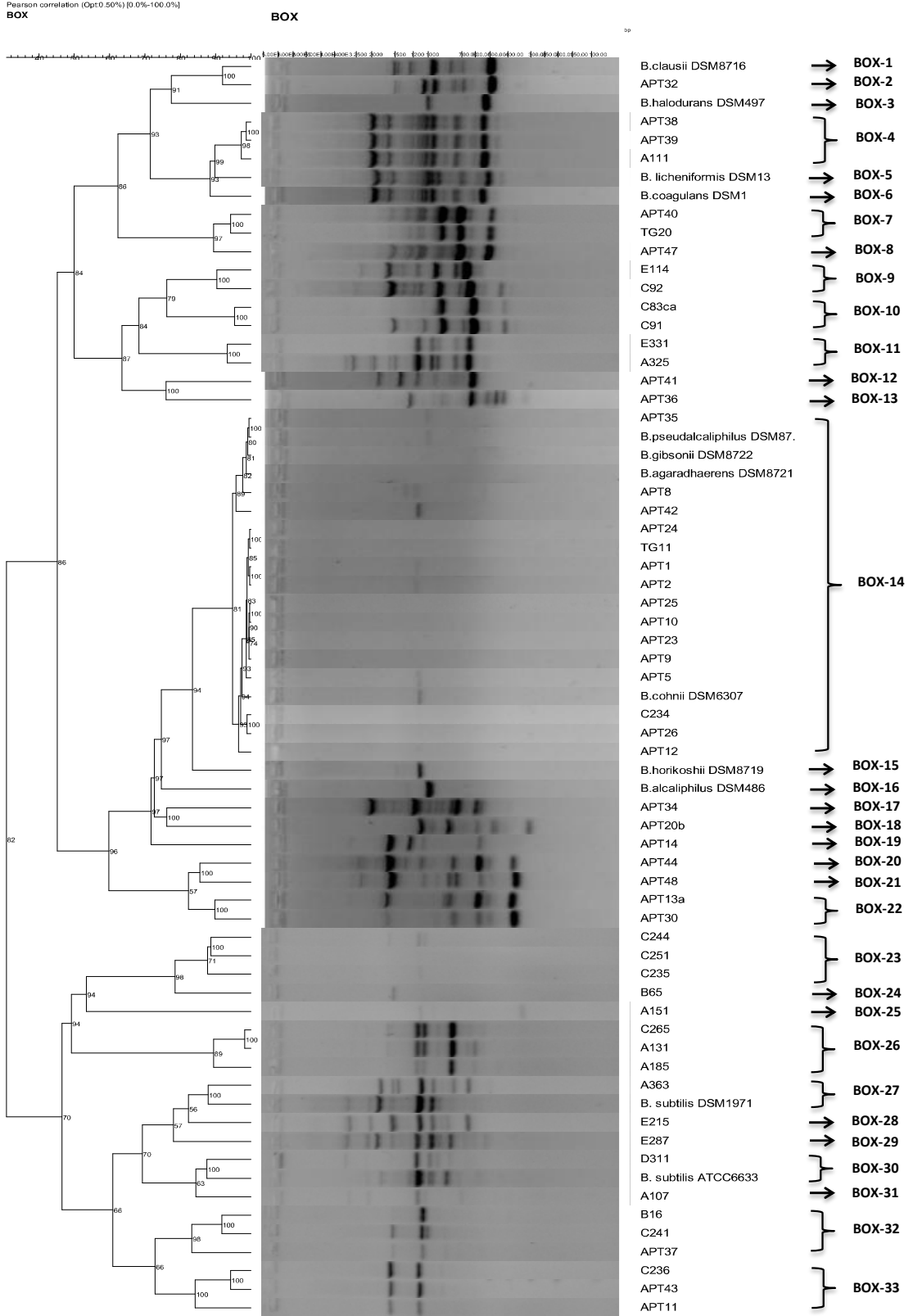
- ITS gen grupları bakımından aynı grupta (ITS-23) yer alan, *B. clausii* grubuna dahil APT32 kodlu izolat ve referans suş *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup>, BOX elementleri bakımından sırasıyla **BOX-2** ve **BOX-1** eşsiz bant profilleri oluşturarak birbirlerinden ayrılmıştır. Bu sonuca göre BOX elementinin tür ve alt tür seviyesinde *B. clausii* türüne dahil izolatları ayırabileceği öne sürülebilmektedir.
- Yukarıda belirtilen eşsiz profil oluşturan izolatların dışında B65, APT41 ve APT36 kodlu izolatlar sırasıyla **BOX-5**, **BOX-12**, ve **BOX-13** eşsiz profilleri ile diğer izolat ve standart suşlardan ayrılmıştır.
- Benzer şekilde standart suşlardan *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup> (**BOX-16**), *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup> (**BOX-3**), *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup> (**BOX-15**) ve *B. coagulans* DSM 1<sup>T</sup> (**BOX-6**) oluşturdukları eşsiz DNA bant profilleri ile diğer izolat ve referans suşlardan BOX elementleri bakımından farklılık göstererek ayrılmıştır.
- *B. oceanisediminis* grubuna dahil APT26, *B. flexus* grubuna dahil APT12, *B. pseudofirmus* olarak tanımlanan APT35, referans suşlardan *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup>, *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup>, *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup> *B. cohnii* grubuna dahil olan APT5 kodlu izolat referans suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup>, *B. cereus* grubuna dahil APT23 ve *B. anthracis* (APT10, APT24, APT9, APT25, APT1 ve TG11) grubunu oluşturan izolatların tamamının BOX elementleri kullanılan BOXA1R primerinin veya reaksiyon koşullarının bu türler için uygun olmaması nedeni ile PCR reaksiyonunda çoğaltılamamıştır.

Bu sonuçlara göre izolat ve referans suşların 16S rRNA genlerine göre oluşturdukları cins ve tür gruplarının doğruluğu BOX elementleri kıyaslanarak gösterilebilmiştir. BOX elementlerine göre yapılan gruplandırmada, cins bazında yüksek ayırım gücü olan bu tekniğin özellikle *B. subtilis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis* türleri ile *Exiguobacterium* cinsine dahil türlerin oluşturduğu gruplarda görüldüğü üzere tür içi farklılıkları ortaya koyduğu belirlenmiştir. Ancak özellikle *B. anthracis* ve *B. cereus* gibi patojen *Bacillus* türlerinin BOX elementlerinin amplifiye edilememiştir.

Banyko ve Vyletelova (2009) BOX-PCR'in süt ve mandıra ürünlerinde *B. licheniformis* ve *B. subtilis* türlerinin tespiti için, etkin ve nispeten hızlı bir teknik olduğunu bildirerek *Bacillus* türleri arasındaki farklılıkların ortaya koyulmasındaki önemini açıklarken, benzer şekilde Huang *et al.* (2012), BOXA1R-PCR ile elde edilen DNA parmakizi profillerinin, *Bacillus* türlerinin tanımlanmasındaki etkinliğini vurgulamışlardır.

Genersch ve Otten (2003) BOX A1R ve MBO REP1 PCR primerleri ile gerçekleştirilen iki farklı rep-PCR'in *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*'nin moleküler epidemiyolojisinin saptanmasında etkili araçlar olduğunu bildirmiştir. De Clerck ve De Vos (2004b) BOX PCR ile, 45 adet *B. licheniformis* suşunun 2 farklı grupta gruplandırıldığını ve her birinin grup spesifik bantlar oluşturarak izolatların birbirinden ayrıldığını açıklamıştır.

Freitas *et al.* (2008), bir çok farklı *Bacillus* izolatıyla yaptıkları çalışmada referans suşların uyguladıkları genomik parmakizi tekniklerinin (GTG-PCR, BOX-PCR ve ERIC-PCR) hepsinde de (*B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>, *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>, *B. pumilus* ATCC 7061<sup>T</sup>, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842, *B. cereus* ATCC 11778 ve *B. sphaericus* ATCC 14577<sup>T</sup>) eşsiz bant profili oluşturduğunu gösterirken, BOX-PCR uygulanan iki örneğin reaksiyonunun gerçekleşmediğini de bildirmişlerdir.



**Şekil 4.27.** BOX-PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Pearson korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.4.3. (GTG)<sub>5</sub> elementinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen DNA profilleri

Tez kapsamında, 56 adet alkalifilik basil izolatu ile 12 adet referans suşun (GTG)<sub>5</sub> primeri ile PCR reaksiyonu yapılmış ve tekrar eden (GTG)<sub>5</sub> elementi çoğaltılarak elde edilen nükleik asit parmak izleri Şekil 4.28.'de gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforezi uygulanarak görüntülenen (GTG)<sub>5</sub> elementi parmak izi profillerindeki DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğü analiz edilip izolatların genotipik çeşitlilikleri ortaya çıkarılmıştır.

İzolat ve standartların (GTG)<sub>5</sub> elementlerinin PCR reaksiyonları sonucunda, tür bazında **toplam 51 DNA profili** elde edilmiştir (Şekil 4.28.). 16S rRNA gen gruplarıyla karşılaştırılan (GTG)<sub>5</sub> elementi grupları sonuçlarına göre:

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil izolatlardan A151 (**GTG-16**), A325 (**GTG-41**), A107 (**GTG-46**) ve E331 (**GTG-1**) (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından eşsiz profiller oluşturarak birbirlerinden ve diğer *B. subtilis* subsp. *subtilis* izolatlarından ayrılmışlardır. Özellikle A151 ve A107 kodlu izolatların BOX elementleri bakımından da eşsiz profiller oluşturmaları dikkat çekicidir. A363 ve E215 kodlu izolatlar ise benzer DNA bantları ile **GTG-44** grubunu oluşturmuştur. *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubu izolatlardan D311 de standart suş *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> ile benzer profil göstererek **GTG-45** grubunda yer almıştır. *B. subtilis* grubunda yer alan E287 (**GTG-43**) kodlu izolat ve standart suş *B. subtilis* DSM1971 (**GTG-42**) ise eşsiz (GTG)<sub>5</sub> profilleri oluşturarak diğer izolatlardan ayrılmıştır. E287 kodlu izolatın da BOX elementi ile verdiği gibi (GTG)<sub>5</sub> elementi bakımından eşsiz bant profili vermesi dikkat çekicidir.
- *B. mojavensis* grubuna dahil A185, A131 ve C265 kodlu izolatlar BOX elementleri bakımından oluşturdukları grup (BOX-26) gibi (GTG)<sub>5</sub> elementi bakımından da *B. subtilis* türü izolatlarından spesifik bir şekilde **GTG-10** grubu ile ayrılmıştır. (GTG)<sub>5</sub> elementi bakımından da *B. mojavensis* türüne özgü DNA bant profilleri ile tür seviyesinde ayırım sağlanabilirken tür içi farklılar elde edilememiştir.



- *B. licheniformis* grubuna dahil edilen izolatlardan C83ca (**GTG-14**), C91 (**GTG-12**), APT47 (**GTG-24**), APT40 (**GTG-25**) ve TG20 (**GTG-20**) eşsiz bant profili sergileyerek diğer izolatlardan (GTG)<sub>5</sub> elementi bakımından ayırım göstermiştir. C92 ve E114 kodlu izolatlar da birbirlerine oldukça benzer **GTG-21** DNA bant profilleri ile ayırım göstermiştir. A111, APT38 ve APT39 kodlu izolatlar standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> ile (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından spesifik ve birbirleriyle aynı DNA bant profillerini (**GTG-22**) vererek ayrılmıştır. A111, APT38 ve APT39 kodlu izolatların ITS ve BOX profilleri bakımından da benzer bant profillerini vererek aynı gruplarda yer almaları, bu izolatların birbirleriyle yüksek benzerlik gösterdiğini desteklemektedir.
- ITS gen bölgesi ve BOX elementi bakımından *B. safensis* grubundan ayrılamayan *B. pumilus* grubuna dahil APT37 kodlu izolat (GTG)<sub>5</sub> elementi bakımından eşsiz bant profili (**GTG-6**) oluşturarak ayrılabilmiştir. Böylece (GTG)<sub>5</sub> elementinin tür seviyesindeki ayırım gücü ortaya koyulmuştur.
- *B. safensis* grubuna dahil edilen izolatlardan B16, C244 ve C241 **GTG-4** DNA bant profili ile, APT43 ve C236 **GTG-7** DNA bant profili ile, C235 ve C234 **GTG-3** DNA bant profili ile C251 ve APT11 ise **GTG-5** DNA bant profili ile 4 farklı grupta birbirlerinden ayrılmıştır. ITS ve BOX gruplandırmalarında olduğu gibi (GTG)<sub>5</sub> elementi de *B. safensis* grubuna dahil izolatların tür içi farklılıklarının ortaya koyulmasını sağlamıştır.
- ITS ve BOX profilleri ile birbirlerinden ayrılamayan *B. anthracis* grubu izolatlar (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından ayrılabilmiştir. APT24 ve APT25 ile APT9 ve TG11 sırasıyla **GTG-35** ve **GTG-33** gruplarına ayrılırken, APT10 (**GTG-36**) ve APT1 (**GTG-34**) kodlu izolatlar oluşturdukları eşsiz bant profilleri ile spesifik olarak ayırım göstermiştir. Genetik olarak oldukça homojen bir grup olan *B. anthracis* grubuna dahil izolatlar (GTG)<sub>5</sub> elementleri ile tür içi farklılıkları ortaya koyulmuştur.
- *Exiguobacterium* cinsinin farklı türlerine dahil olan izolatlar *Exiguobacterium* cinsine özgü ITS gruplarının aksine, BOX elementlerinde de olduğu gibi (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından birden fazla grup altında toplanmıştır. *E. aurantiacum* olarak tanımlanan APT34 kodlu izolat ve *E. mexicanum* olarak tanımlanan APT20b

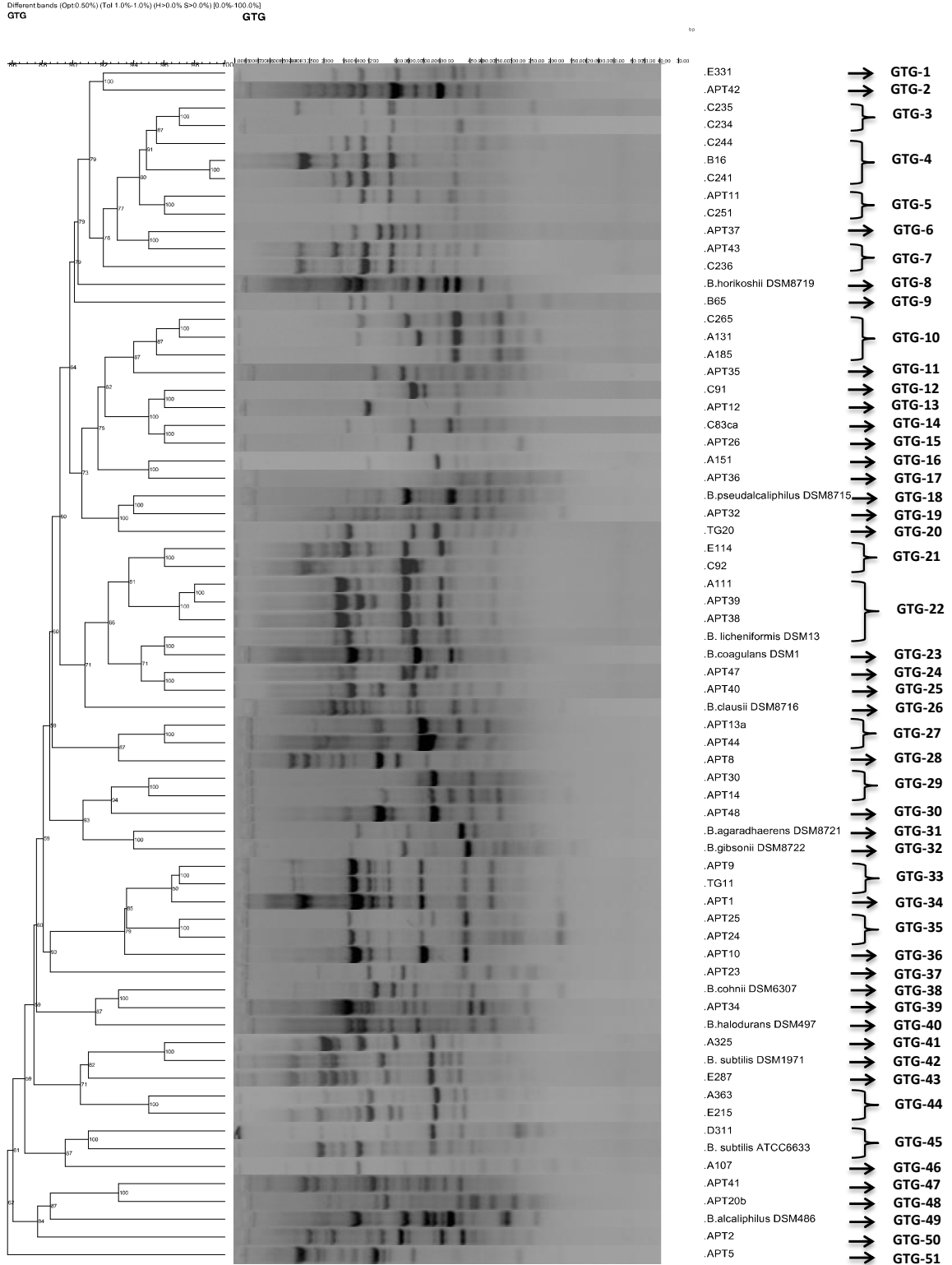
kodlu izolat BOX elementlerinde de olduğu gibi (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından sırasıyla GTG-39 ve GTG-38 eşsiz bant profilleri vererek tür seviyesinde birbirlerinden ve *E. arabatum* türü izolatlardan ayrılmıştır. *E. arabatum* grubu izolatlardan ise APT48 eşsiz bant profili verirken (GTG-30), APT13a ve APT44 kodlu izolatlar GTG-27, APT14 ve APT30 kodlu izolatlar ise GTG-29 DNA bant profilleriyle tür içi ayırım göstermiştir.

- BOX elementleri bakımından eşsiz bant profiline sahip olan *B. clausii* grubuna dahil APT32 kodlu izolat ve referans suş *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup>, (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından da sırasıyla **GTG-19** ve **GTG-26** eşsiz bant profilleri oluşturarak birbirlerinden ayrılmıştır. BOX elementinde de olduğu gibi (GTG)<sub>5</sub> elementinin de *B. clausii* türüne dahil izolatları tür içinde ayırdığı belirenmiştir.
- ITS gen grupları bakımından aynı grupta (ITS-24) yer alan, BOX elemeti bakımından ise tanımlanamayan *B. cohnii* grubuna dahil APT5 kodlu izolat ve referans suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup>, (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından birbirlerinden oldukça farklılık gösteren sırasıyla **GTG-51** ve **GT38** eşsiz bant profillerini oluşturarak ayrılmıştır. Bu sonuca göre (GTG)<sub>5</sub> elementinin tür ve alt tür seviyesinde *B. cohnii* türüne dahil izolatları ayırdığı belirlenmiştir.
- Yukarıda belirtilen eşsiz bant profile veren izolatların dışında 10 izolat daha eşsiz bant oluşturarak cins ve tür seviyesinde ayırım göstermiştir. (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından eşsiz bant profile sergileyen diğer 10 izolat ve (GTG)<sub>5</sub> grupları şu şekildedir; B65 (**GTG-9**), APT26 (**GTG-15**), APT35 (**GTG-11**), APT12 (**GTG-13**), APT23 (**GTG-37**), APT8 (**GTG-28**), APT2 (**GTG-50**), APT41 (**GTG-47**), APT 42 (**GTG-2**) ve APT36 (**GTG-17**).
- Aynı şekilde standart suşlardan *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup> (**GTG-49**), *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup> (**GTG-18**), *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup> (**GTG-31**), *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup> (**GTG-40**), *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup> (**GTG-8**), *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup> (**GTG-32**) ve *B. coagulans* DSM 1<sup>T</sup> (**GTG-23**) oluşturdukları eşsiz DNA bant profilleri ile diğer izolat ve referans suşlardan (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından ayrılmıştır.

(GTG)<sub>5</sub> elementlerine göre yapılan gruplandırmada, yüksek ayırım gücü olan bu tekniğin, hemen hemen tüm gruplarda görüldüğü üzere tür ve alt türler arasında bile ayırım sağlayabildiği belirlenmiştir. Özellikle ITS ve BOX elementleri bakımından spesifik bir şekilde ayırım sağlanamayan *B. cohnii*, *B. anthracis* ve *Exiguobacterium* gruplarının (GTG)<sub>5</sub> elementleri bakımından oldukça spesifik olarak tür içinde ayrıldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre (GTG)<sub>5</sub> elementinden ITS ve BOX-PCR'a göre daha fazla çeşitlilikte bant profili elde edilmiş ve GTG-PCR'ın ITS ve BOX-PCR ile ayrılamayan türlerin ayrılmasında daha yüksek bir çözünürlük sağlayarak türler arası ve tür içi farklılıkları ortaya koyduğu gösterilmiştir.

Scheldeman *et al.* (2004) çiğ süttten izole ettikleri 48 *Bacillus* izolatını (GTG)<sub>5</sub> elementlerine göre 4 profil ile gruplandırmıştır. Tez çalışmasındaki bulgularla benzer olarak, Freitas *et al.* (2008), bir çok farklı *Bacillus* izolatıyla 3 farklı primer setini ((GTG)<sub>5</sub>, BOXA1R ve ERIC) kullanarak gerçekleştirdikleri genomik parmakizi analizlerinden, en fazla çeşitlilikte bant profilini GTG-PCR ile elde ettiklerini bildirmiştir. Ancak izolatların gruplandırılmasında (GTG)<sub>5</sub> primerinin BOX ve ERIC primer setlerine göre daha az etkin olduğunu göstermişlerdir.

De Clerck *et al.* (2004c) jelatin ekstraktlarından izole ettikleri 1129 adet izolatı tür seviyesinde ayırt etmek için öncelikle GTG-PCR kullanarak ön gruplandırmada bu tekniğin etkinliğini vurgulamışlardır. İzolatlar, GTG-PCR ile 63 gruba ayrıldıktan sonra, 16S rRNA geni dizi analizlerini ve MLST analizlerini gerçekleştirmişlerdir.



**Şekil 4.28.** GTG-PCR ile elde edilen bant profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Different Bands korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.5. ARDRA Analizi (Ribotiplendirme) Sonuçları

ARDRA analizi, 16S rRNA geninin 27F-1492R primerleriyle çoğaltılmasıyla elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Hem standart suşların hem de izolatların PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, *AluI*, *HaeIII* veya *TaqI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve oluşan kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Enzim kesim bantlarının varlığı veya yokluğu ve yoğunluklarına göre izolatlar, standartlar bakteriler ile karşılaştırılmış ve belirli taksonomik gruplara ayrılmışlardır. Buna göre yapılan kümeleme analizinde, GelCompar II yazılımı benzerlik derecelerinin sınırlarını % 16.66, 33.33, 49.99, 66.66 ve 83.3 olarak kullanmıştır. Bu doğrultuda bant profilleri bakımından % 97-100 benzerlik gösteren örnekler birlikte gruplandırılırken, % 97'nin altında benzerlik gösteren örneklerin bant profilleri eşsiz bant profili olarak tanımlanmıştır.

İzolat ve standart suşların 16S rRNA genleri üzerinden gerçekleştirilen PCR ürünleri, *AluI*, *TaqI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek sırasıyla 26, 24 ve 27 farklı ARDRA grubu elde edilmiştir (Çizelge 4.18 ve 4.19).

**Çizelge 4.18.** 16S rRNA geni dizi analizi ve ARDRA analizleri ile elde edilen gruplar

	16S rRNA	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HaeIII</i>
<b>Standart Gruplarının Sayısı</b>	6	6	3	0
<b>İzolat Gruplarının Sayısı</b>	22	20	21	27
<b>Toplam Grup Sayısı</b>	28	26	24	27

Elde edilen bant profillerine göre en fazla grup *HaeIII*-ARDRA analizi ile elde edilmiş olsa da, araştırılan 12 adet standart suşun hepsi izolatlarla birlikte gruplanmış ve bu suşlardan eşsiz bant profili elde edilememiştir. Ayrıca elde edilen *HaeIII* gruplarının 16S rRNA gen dizilerine göre elde edilen gruplarla da oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *TaqI*-ARDRA analizi ile de referans suşların sadece 3 farklı eşsiz bant profili oluşturduğu belirlenmiştir.

*HaeIII* ve *TaqI* elde edilen ARDRA gruplarında filogenetik olarak birbirinden oldukça uzak olan tür ve referans suşların ortak kesim profili verdiği, tür seviyesinin yanı sıra cins seviyesinde dahi ayırımın başarılı olmadığı belirlenmiştir. ARDRA analizlerinin gerçekleştirildiği 16S rRNA geninin evrimsel olarak oldukça korunmuş olması nedeniyle izolat ve referans türler birbirlerinden ITS, BOX ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile elde edilen gruplar kadar başarılı bir şekilde ayrılamamıştır. Yine de *HaeIII* ve *TaqI* kesimlerinin aksine *AluI* enzimi ile standart suşlar ile 6 farklı eşsiz bant profili elde edilmiş, cins ve tür seviyesinde elde edilen farklılıkların 16S rRNA filogenetik analizlerini desteklediği belirlenmiştir.

16S rRNA geni dizi analizi ve ARDRA analizleriyle elde edilen grupların sayısı ile gruplardaki izolat ve standart suşlar sırasıyla Çizelge 4.18. ve 4.19.'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 16S rRNA geni grupları ile en fazla uyumu *AluI* grupları göstermiştir. *AluI* kesimi ile elde edilen dendogram temel alınarak *TaqI* ve *HaeIII* bant profilleri Şekil 4.29.'da verilmiştir. Her üç enzimle de ayrı ayrı gerçekleştirilen kümeleme analizleri ise bölüm 4.5.5.1, 4.5.5.2. ve 4.5.5.3.'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda endospor oluşturan basillerin ARDRA analizlerinde kullanılan *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *RsaI* ve *TaqI* restriksiyon enzimlerinden *AluI* ve *HaeIII*'ün en fazla sayıda ayırıcı bant oluşturduğu bildirilmiştir (Kuisiene *et al.* 2007). ARDRA analizi evrimsel olarak oldukça korunmuş olan 16S rRNA geni üzerinden gerçekleştiği için, izolatların ayrılması ve gruplandırmasında kısıtlamalar oluşturmaya rağmen, tez çalışmasında gerçekleştirilen ARDRA analizlerinden özellikle *AluI* restriksiyon fragmentlerinin 16S rRNA dizi analizi sonuçlarını desteklediği ve izolatları cins, tür ve alt tür seviyesinde kısmen de olsa ayırımında başarılı sonuç verdiği görülmektedir. rRNA genlerinin çoklu gen aileleri olarak organize olduğu ve 1'den 15'e kadar farklı kopya sayılarında eksprese oldukları bilinmektedir (Klappenbach *et al.* 2001). *HaeIII* özellikle de *TaqI* restriksiyon enzimleriyle elde edilen karışık grupların bu nedenle oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre izolat ve referans suşların 16S rRNA genlerine göre oluşturdukları cins ve tür grupları *AluI* kesim profilleri ile de gösterilebilmiştir. *AluI* kesim profilleri ile *B. licheniformis* (*AluI*-26), *B. clausii* (*AluI*-19), *B. cohnii* (*AluI*-12), ve

*Exiguobacterium* (*AluI*-16) gruplarında görüldüğü üzere tür seviyesinde ayırım sağlanırken diğer gruplarla alt tür seviyesindeki farklılıklar tespit edilebilmiştir. *TaqI* ve *HaeIII* kesim frgmentleri ile ise izolatlar *AluI* kesim profilinde olduğu gibi cins veya türe spesifik olarak ayırım elde edilememiştir.

Birçok araştırıcı elde ettikleri farklı restriksiyon enzimleriyle yaptıkları ARDRA analizlerini bütün halinde yorumlamaktadır (Heyndrickx *et al.* 1995, Heyndrickx *et al.* 1998, Logan *et al.* 2002, *et al.* 2004, Chen *et al.* 2012). Heyndrickx *et al.* (1995), uyguladıkları FAME ve SDS-PAGE analizlerinin yanı sıra özellikle ARDRA analizi ile (*HaeIII*, *DpnII*, *RsaI*, *BfaI*, *MseI* restriksiyon enzimleri ile), daha önceden *B. gordonae* ve *B. validus* olarak tanımlanan türlerin, *Paenibacillus* cinsine dahil olduğunu göstermiş ve bu türleri yeniden *P. gordonae* ve *P. validus* olarak tanımlamıştır.

Yine Heyndrickx *et al.* (1998) *HaeIII*, *DpnII*, *RsaI*, *BfaI* and *Tru9I* restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirdikleri ARDRA analizinde 12 adet *B. pantothenicus*, 29 adet *Bacillus* suşunu ve *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Marinococcus* cinslerine ait 8 suşu genotipik olarak karakterize etmiştir. Araştırılan 12 adet *B. pantothenicus* suşunun, elde edilen ARDRA profilleriyle diğer organizmalardan ayrılarak 2 alt gruba ayrıldığı ve 16S rRNA dizileriyle oluşturulan filogenetik ağacın ARDRA gruplarıyla uyum gösterdiği bildirilmiştir.

Chen *et al.* (2012), 6 restriksiyon enzimiye gerçekleştirdikleri ARDRA analizleriyle (*AluI*, *TaqI*, *MseI*, *Bst* UI, *HhaI* and *Tsp509I*), *Bacillus* TS02 suşunun *B. thuringiensis* ve *B. cereus* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir.

*et al.* (2004), 190 izolatı *RsaI*, *HaeIII*, ve *AluI* restriksiyon enzim fragmentlerine göre gerçekleştirdikleri ARDRA analizlerinde benzer bant profilleri elde ederek 32 farklı grup oluşturmuştur.

Cihan *et al.* (2012) ise 16 adet *Bacillus*, 13 adet *Brevibacillus*, 1 adet *Paenibacillus* ve 2 adet *Thermoactinomyces* olmak üzere toplamda 32 izolat ile yaptıkları araştırmada *AluI*,

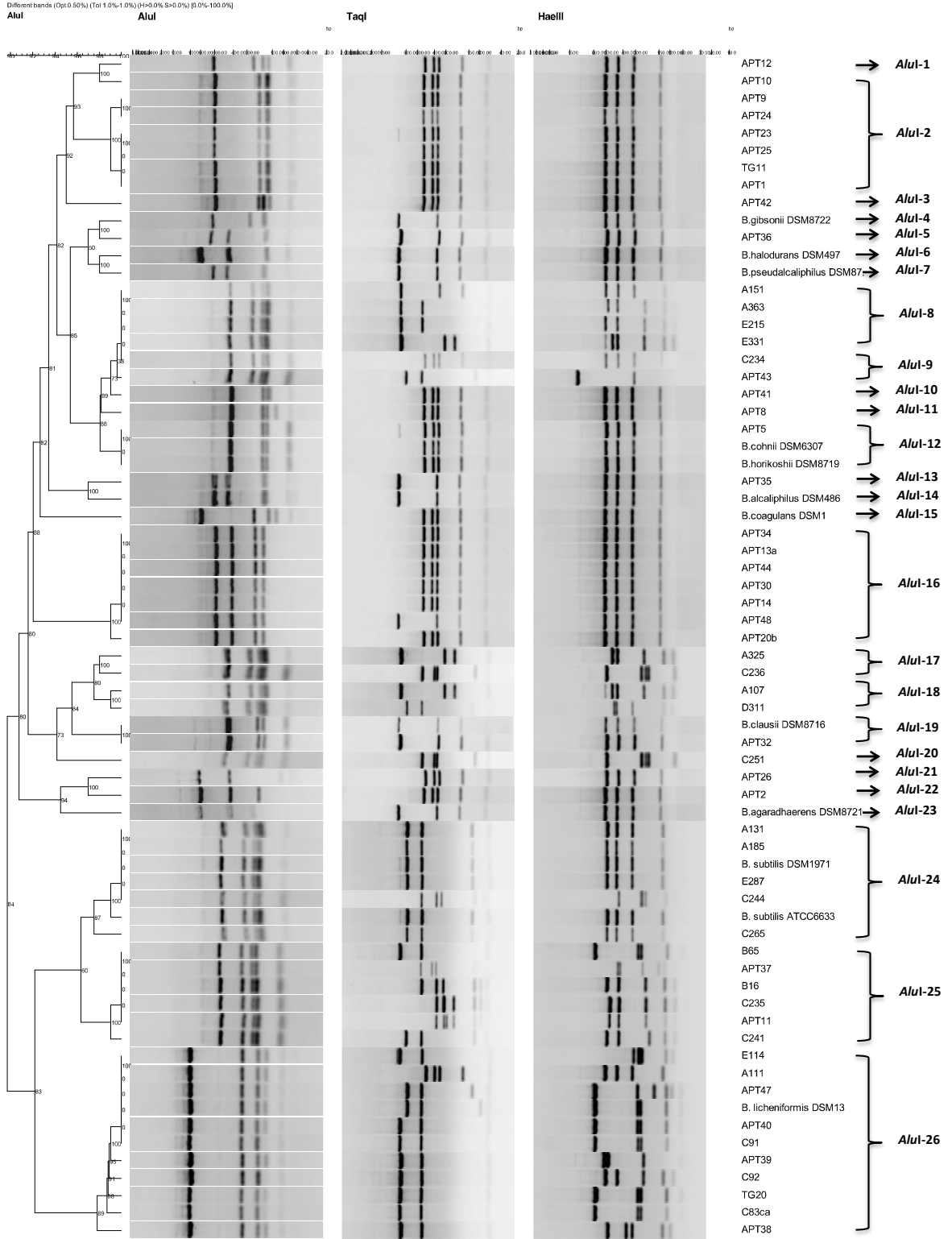
*HaeIII* and *TaqI* enzimleri ile gerçekleştirdikleri ARDRA analizi ile izolatların birbirinden ayrılması için gerekli ayırıcı kesim profilleri elde etmiştir. *AluI* kesimine göre *B. smithii*, *B. pumilis*, *B. subtilis* and *B. licheniformis* izolatları, *HaeIII* kesimine göre *B. smithii* izolatları, *TaqI* kesimine göre ise *B. smithii*, *B. pumilis* ve A391a kodlu izolatlar eşsiz bant profili oluşturmuştur. Her üç restriksiyon enzimi ile gerçekleştirilen ARDRA analizine göre ise, *Brevibacillus* cinsi izolatlar *B. agri* ve *B. thermoruber* olmak üzere iki farklı gruba ayrılmıştır. Bu araştırmacılar, tez çalışmasında elde edilen sonuçları destekleyici olarak, *AluI* ile gerçekleştirilen ARDRA analizinin, *HaeIII* ve *TaqI* restriksiyon fragmentlerine göre *Bacillus* cinsi izolatların genetik çeşitliliğinin ortaya koyulmasında daha başarılı olduğunu ifade etmektedir.



**Çizelge 4.19.** 16S rRNA geni dizi analizi ve ARDRA analizleri ile oluşan gruplar

16S rRNA Gen Grubu	İzolatlar	16S Grubu	AluI Grubu	TaqI Grubu	HaellI Grubu
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	A363	16S-1	AluI-8	TaqI-5	HaellI-1*
	E215	16S-1	AluI-8	TaqI-5	HaellI-14*
	A151	16S-1	AluI-8	TaqI-17*	HaellI-10
	D311	16S-1	AluI-18	TaqI-2	HaellI-5*
	A325	16S-1	AluI-17	TaqI-8	HaellI-9*
	A107	16S-1	AluI-18	TaqI-8	HaellI-17*
	E331	16S-1	AluI-8	TaqI-8	HaellI-15*
<i>Bacillus subtilis</i>	E287	16S-2	AluI-24	TaqI-1	HaellI-26*
	DSM1971	-	AluI-24	TaqI-1	HaellI-6
	ATCC6633	16S-2	AluI-24	TaqI-1	HaellI-6
<i>Bacillus mojavensis</i>	A185	16S-3	AluI-24	TaqI-2	HaellI-6
	C265	16S-3	AluI-24	TaqI-2	HaellI-6
	A131	16S-3	AluI-24	TaqI-2	HaellI-6
<i>Bacillus licheniformis</i>	C83ca	16S-4	AluI-26	TaqI-6	HaellI-22
	C92	16S-4	AluI-26	TaqI-5	HaellI-25*
	C91	16S-4	AluI-26	TaqI-6	HaellI-22
	A111	16S-4	AluI-26	TaqI-15*	HaellI-10
	APT38	16S-4	AluI-26	TaqI-6	HaellI-3*
	APT39	16S-4	AluI-26	TaqI-5	HaellI-12*
	APT47	16S-4	AluI-26	TaqI-2	HaellI-23*
	TG20	16S-4	AluI-26	TaqI-6	HaellI-22
	E114	16S-4	AluI-26	TaqI-7*	HaellI-7*
	APT40	16S-4	AluI-26	TaqI-6	HaellI-24
	DSM13	16S-4	AluI-26	TaqI-4*	HaellI-24
<i>Bacillus aerophilus</i>	B65	16S-5	AluI-25	TaqI-6	HaellI-19*
<i>Bacillus pumilus</i>	APT37	16S-6	AluI-25	TaqI-22*	HaellI-13*
<i>Bacillus safensis</i>	B16	16S-7	AluI-25	TaqI-24	HaellI-16*
	APT43	16S-7	AluI-9	TaqI-3	HaellI-27*
	C235	16S-7	AluI-25	TaqI-23	HaellI-11
	C244	16S-7	AluI-24	TaqI-24	HaellI-20*
	C241	16S-7	AluI-25	TaqI-3	HaellI-11
	C234	16S-7	AluI-9	TaqI-13*	HaellI-8
	C236	16S-7	AluI-17	TaqI-21	HaellI-2*
	C251	16S-7	AluI-20*	TaqI-21	HaellI-21*
	APT11	16S-7	AluI-25	TaqI-23	HaellI-18*
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	APT26	16S-8	AluI-21*	TaqI-10	HaellI-4
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	APT35	16S-24	AluI-13*	TaqI-20	HaellI-8
<i>Bacillus clausii</i>	APT32	16S-27	AluI-19	TaqI-19	HaellI-8
	DSM8716	16S-27	AluI-19	TaqI-20	HaellI-8
<i>Bacillus flexus</i>	APT12	16S-9	AluI-1	TaqI-10	HaellI-4
<i>Bacillus cohnii</i>	APT5	16S-10	AluI-12	TaqI-11	HaellI-4
	DSM6307	16S-10	AluI-12	TaqI-10	HaellI-4
<i>Bacillus cereus</i>	APT23	16S-12	AluI-2	TaqI-11	HaellI-8
<i>Bacillus anthracis</i>	APT10	16S-13	AluI-2	TaqI-9	HaellI-8
	APT24	16S-13	AluI-2	TaqI-14*	HaellI-4
	APT9	16S-13	AluI-2	TaqI-9	HaellI-8
	APT25	16S-13	AluI-2	TaqI-9	HaellI-8
	APT1	16S-13	AluI-2	TaqI-9	HaellI-8
	TG11	16S-13	AluI-2	TaqI-10	HaellI-8
<i>Bacillus badius</i>	APT8	16S-16	AluI-11*	TaqI-12	HaellI-4
<i>Virgibacillus proomii</i>	APT2	16S-14	AluI-22*	TaqI-12	HaellI-4
<i>Sporosarcina korensis</i>	APT41	16S-17	AluI-10*	TaqI-10	HaellI-4
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	APT42	16S-18	AluI-3*	TaqI-10	HaellI-4
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	APT34	16S-19	AluI-16	TaqI-12	HaellI-4
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	APT20b	16S-20	AluI-16	TaqI-9	HaellI-4
<i>Exiguobacterium arabatum</i>	APT14	16S-21	AluI-16	TaqI-9	HaellI-4
	APT13a	16S-21	AluI-16	TaqI-12	HaellI-8
	APT44	16S-21	AluI-16	TaqI-9	HaellI-8
	APT48	16S-21	AluI-16	TaqI-20	HaellI-8
	APT30	16S-21	AluI-16	TaqI-9	HaellI-8
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	APT36	16S-28	AluI-5*	TaqI-19	HaellI-8
<i>B. alcaliphilus</i>	DSM486	16S-25	AluI-14*	TaqI-16	HaellI-8
<i>B. pseudocaliphilus</i>	DSM8715	16S-25	AluI-7*	TaqI-18	HaellI-8
<i>B. agaradhaerens</i>	DSM8721	16S-22	AluI-23*	TaqI-16	HaellI-8
<i>B. halodurans</i>	DSM497	16S-23	AluI-6*	TaqI-16	HaellI-8
<i>B. horikoshii</i>	DSM8719	16S-11	AluI-12	TaqI-10	HaellI-4
<i>B. gibsonii</i>	DSM8722	16S-26	AluI-4*	TaqI-18	HaellI-8
<i>B. coagulans</i>	DSM1	16S-15	AluI-15*	TaqI-9	HaellI-4

\*' işaretleri 'eşsiz bant profili' oluşturan izolatlar için, 'İtalik' yazı tipi standart suşların oluşturduğu gruplar için, hem 'İtalik' yazı tipi hem '\*' işaretleri ile belirtilen gruplar 'eşsiz bant profili oluşturan standart suşlar' için kullanılmıştır.



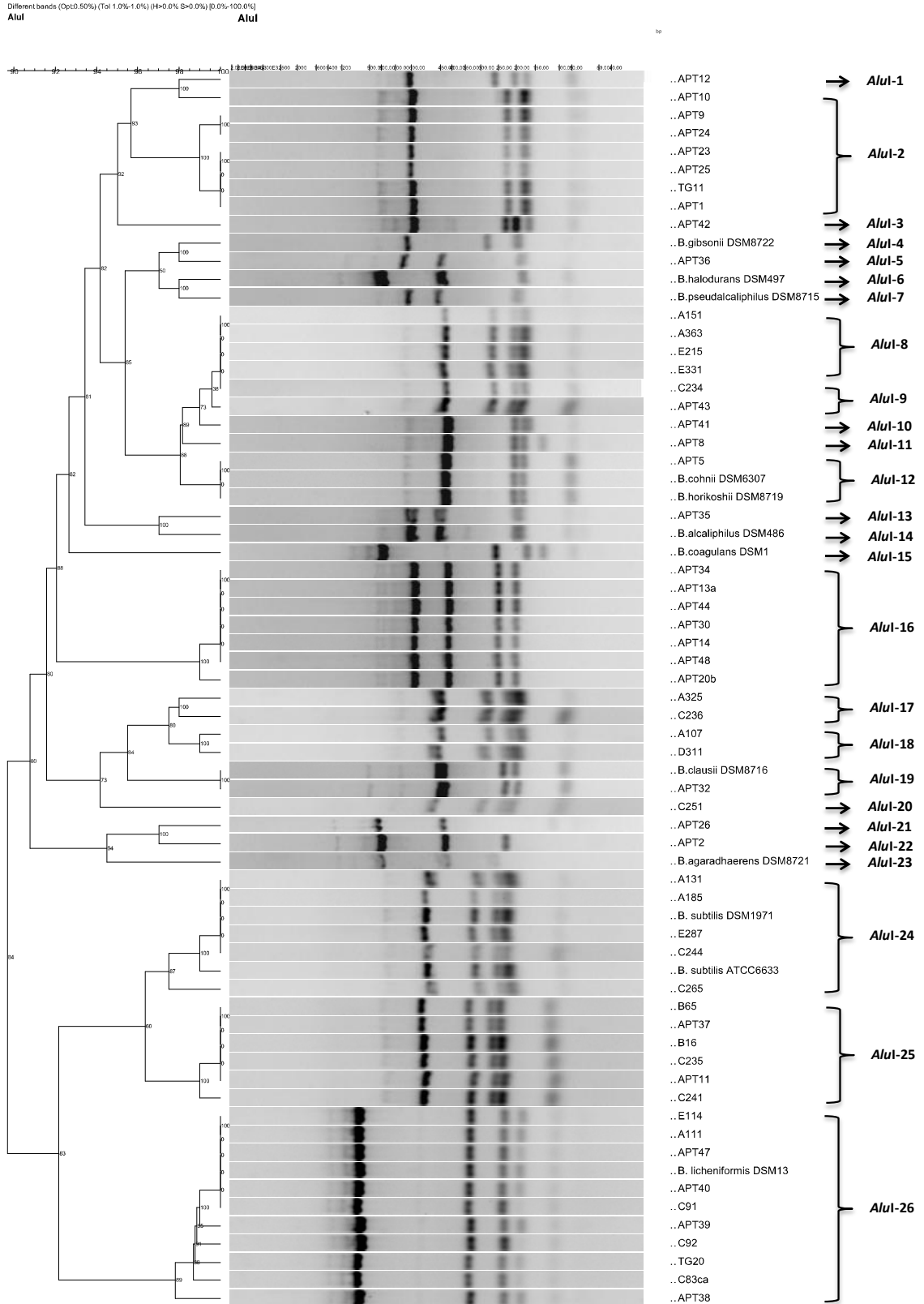
**Şekil 4.29.** ARDRA bant profillerinin biraraya getirilmesiyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Different Bands korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.5.1. *AluI* Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme

*AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen bant profillerine göre izolatlar ve referans suşlar 26 farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 4.30);

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatlar 3 farklı *AluI* kesim profili ile birbirlerinden ayrılmıştır. A363, E215, A151 ve E331 kodlu izolatlar ***AluI-8*** kesim grubunu, D311 ve A107 kodlu izolatlar ***AluI-18*** kesim grubunu, A325 kodlu izolat ise *B. safensis* grubu izolatlarından C236 ile ***AluI-17*** kesim grubunu oluşturarak birbirlerinden ayrılmıştır. Bu sonuçlara göre *AluI* restriksiyon enzimi ile ribotiplendirmenin *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubu için alt türler arasındaki farklılıkları gösterdiği belirlenmiştir.
- *B. subtilis* grubu (E287, *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>) ise *AluI* kesim profilleri bakımından *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubundan ayırım göstererek *B. mojavensis* grubuna dahil izolatlarla (A185, A131 ve C265) birlikte ***AluI-24*** kesim grubunda yer almıştır. Böylelikle *AluI* enzimi ile ribotiplendirmenin *B. subtilis* için alt tür seviyesinde ayırım sağlarken *B. mojavensis* türü ile birbirlerinden ayrılmasında etkin olmadığı belirlenmiştir.
- *B. licheniformis* grubuna dahil edilen izolatların tamamı ve standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> bu türe özgü ve birbiriyle aynı ***AluI-26*** kesim profilini oluşturmuştur. *AluI* ARDRA analizinin *B. licheniformis* türünü diğer türlerden ayırırken tür içi ayırmada etkin olmadığı belirlenmiştir.
- B16, C241, C235 ve APT11 kodlu *B. safensis* grubu izolatlar sırasıyla *B. aerophilus* ve *B. pumilus* grubu izolatlar olan B65 ve APT37 ile aynı bant profillerini oluşturarak ***AluI-25*** grubunu oluşturmuştur. APT43 ve C234 kodlu izolatların birbiriyle aynı kesim profilini vererek diğer *B. safensis* grubu izolatlarından ayırım gösterirken, C251'in eşsiz profile sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *AluI* ile ribotiplendirme *B. aerophilus* ve *B. pumilus* türlerinin ayırımında etkin olmazken, *B. safensis* grubu izolatların kendi içinde ayırabildiği gösterilmiştir.

- *B. cohnii* grubuna dahil olan APT5 kodlu izolat referans suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> ile referans suş *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup> **AluI-12** grubunu oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre *AluI* restriksiyon enzimi ile ribotiplendirmenin *B. cohnii* ve *B. horikoshii* türleri için ayırım sağlamadığı belirlenmiştir.
- Aynı şekilde *B. clausii* grubuna dahil olan APT32 kodlu izolat referans suş *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup> ile **AluI-19** grubunu oluşturarak diğer izolat ve referans suşlardan ayrılmıştır.
- *B. cereus* (APT23) ve *B. anthracis* (APT10, APT24, APT9, APT25, APT1 ve TG11) gruplarını oluşturan patojen izolatların tamamı bu gruba oldukça spesifik olan bant parofili vererek **AluI-2** kesim grubunu oluşturmuşlardır. Birbirleriyle yüksek 16S rRNA geni dizi benzerliği gösteren bu iki türün *AluI* enzimi ile ribotiplendirmede birbirlerinden ayrılamadığı belirlenmiştir.
- Benzer şekilde *Exiguobacterium* cinsine dahil 7 izolatın tamamı diğer izolatlardan tamamen farklı ve kendi cinsleri içerisinde birbirleriyle tamamen aynı kesim profillerini oluşturarak **AluI-16** kesim grubunu meydana getirirken *AluI* ile ribotiplendirmenin tür içinde ayırım göstermediği belirlenmiştir.
- APT26, APT35, APT12, APT8, APT2, APT41, APT42 ve APT36 kodlu izolatlar sırasıyla **AluI-21**, **AluI-13**, **AluI-1**, **AluI-11**, **AluI-22**, **AluI-10**, **AluI-3** ve **AluI-5** gruplarında her biri eşsiz *AluI* kesim profilleri oluşturmuşlardır. Bu izolatlar tamamen kendilerine has *AluI* kesim profilleri ile diğer izolatlardan ve standart suşlardan ayrılmıştır.
- Benzer şekilde referans suşlardan *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup>, *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup>, *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>, *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup>, *B. gibsonii* DSM 8722<sup>T</sup> ve *B. coagulans* DSM 1<sup>T</sup> tamamen kendilerine has *AluI* kesim profilleri ile diğer izolatlardan ve diğer standart suşlardan ayrılarak sırasıyla **AluI-14**, **AluI-7**, **AluI-23**, **AluI-6**, **AluI-4** ve **AluI-15** gruplarını oluşturmuştur.



**Şekil 4.30.** *AluI* ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Different Bands korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

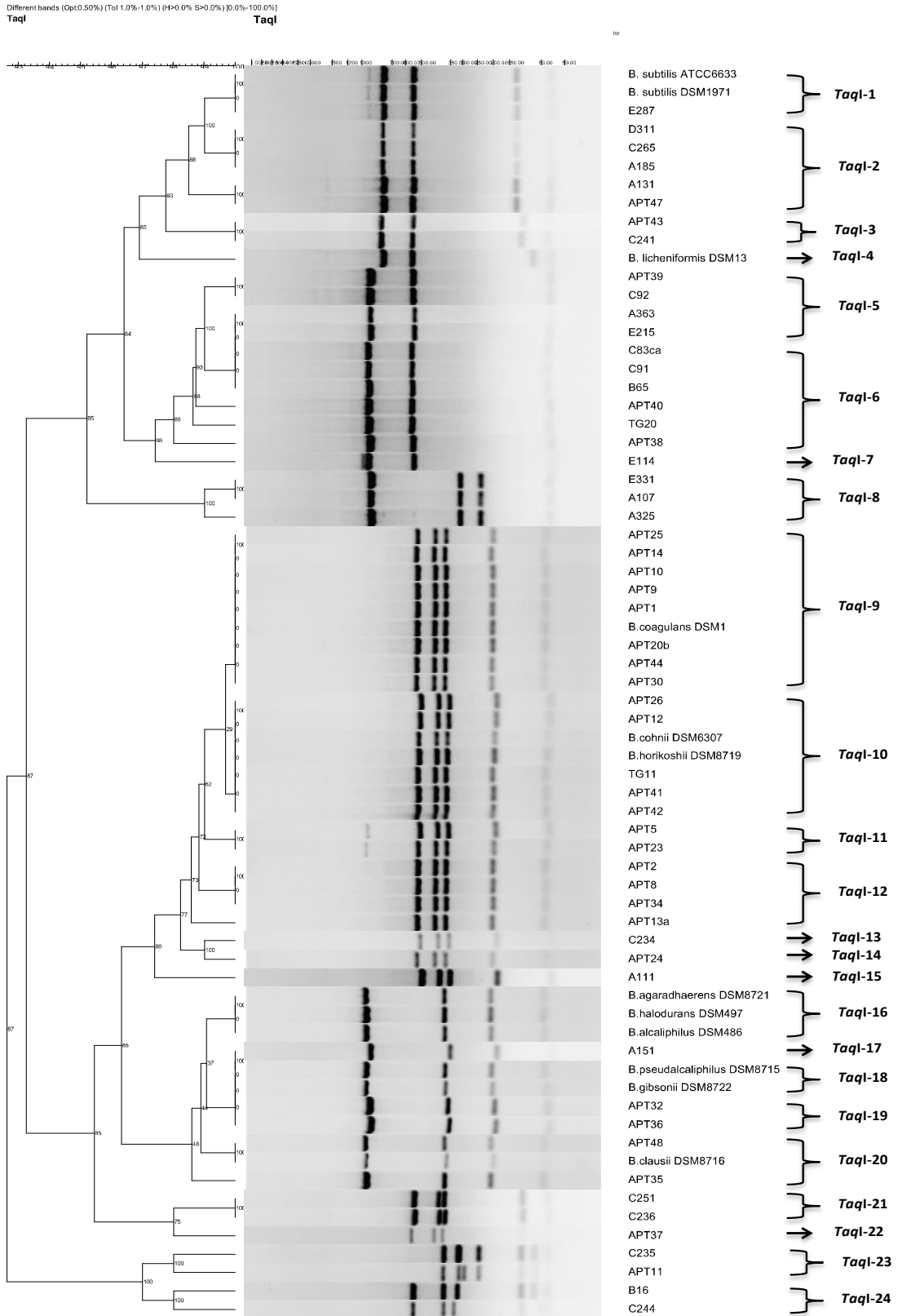
#### 4.5.5.2. *TaqI* Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme

*TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen bant profillerine göre izolatlar ve referans suşlar 24 farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 4.31);

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatlar 2 farklı temel *TaqI* kesim profili ile birbirlerinden ayrılmıştır. A325, A107 ve E331 izolatları ***TaqI-8*** kesim profilini gösterirken, A363 ve E215 kodlu izolatlar *B.licheniformis* grubu izolatlardan C83ca ve APT39 ile ***TaqI-5*** kesim profilini göstermiştir. A151 kodlu izolat ise eşsiz bant profili göstererek (***TaqI-17***) diğer izolatlardan ayrılmıştır. Bu sonuçlara göre *TaqI* ARDRA analizinin *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatlar için tür içi farklılıkların ortaya koyulmasında etkili olduğu belirlenmiştir.
- *B. subtilis* grubu (E287, *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>) ise oluşturdukları ***TaqI-1*** kesim profilleri ile yüksek 16S rRNA geni dizi benzerliği gösterdiği *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubundan ayrılarak türe spesifik ayırım sağlanmıştır.
- *B. mojavensis* grubuna dahil izolatlar (A185, A131 ve C265), *B. licheniformis* grubu izolatlardan APT47 ve *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubu izolatlardan D311 ile birlikte ***TaqI-2*** kesim grubunda yer almıştır.
- *B. licheniformis* grubuna dahil edilen izolatlardan A111, E114 ve standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> sırasıyla ***TaqI-15***, ***TaqI-7*** ve ***TaqI-4*** eşsiz kesim profillerini oluşturarak diğer izolatlardan ayrılmıştır. C83ca, C91, APT38, TG20, APT40 ve *B. aerophilus* grubu izolat B65 ile ***TaqI-6*** kesim profilini oluşturmuştur. *B. licheniformis* ile yüksek 16S rRNA dizi benzerliği gösteren *B. aerophilus* *TaqI* kesim profili bakımından ayrılamamıştır. C92 ve APT39 kodlu izolatlar da *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatlarla ***TaqI-5*** aynı kesim profilini vermiştir.
- B16 ve C244, APT43 ve C241, C236 ve C251 ile C235 ve APT11 kodlu *B. safensis* grubu izolatlar sırasıyla ***TaqI-24***, ***TaqI-3***, ***TaqI-21*** ve ***TaqI-23*** kesim

profillerini oluşturarak *TaqI* enzimi ile tür ve alt tür seviyesinde ayırım göstermiştir. Ayrıca C234 kodlu izolat da eşsiz kesim profili göstererek diğer izolat ve standart suşlardan ayrılmıştır.

- *AluI* kesim profilleri bakımından aynı grupta yer alan *B. cohnii* grubuna dahil olan APT5 kodlu izolat ve referans suş *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> sırasıyla **TaqI-11** ve **TaqI-10** kesim gruplarında yer alarak birbirlerinden tür içinde ayrılmıştır. Benzer şekilde *AluI* kesim profilleri bakımından aynı grupta yer alan *B. clausii* grubuna dahil olan APT32 kodlu izolat ve referans suş *B. clausii* DSM8716<sup>T</sup> sırasıyla **TaqI-19** ve **TaqI-20** grubunu oluşturarak birbirlerinden tür içinde ayrılmıştır.
- *B. anthracis* grubunu oluşturan patojen izolatlardan APT10, APT9, APT25 ve APT1 **TaqI-9** kesim profili ile TG11 (**TaqI-10**) ve eşsiz kesim profili gösteren APT24 (**TaqI-14**) kodlu izolatlarla tür ve alt tür seviyesinde ayırım göstermiştir.
- Benzer şekilde *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatlardan APT44, APT 30 ve APT14 (*E. arabatum*) ile APT20b (*E. mexicanum*) kodlu izolatlar *B.anthraxis* grubunu oluşturan patojen izolatlardan bazıları ile **TaqI-9** kesim profilini vermiştir. APT13a (*E. arabatum*) ve APT34 (*E. aurantiacum*) ise APT8 (*B. badius*) ve APT2 (*V. proomii*) kodlu izolatlarla birlikte **TaqI-12** kesim profilini vermiştir. Bu şekilde heterojen şekilde tür ve cins seviyesinde gruplanmalar olduğu için *TaqI* enzimi ile ribotiplendirmenin *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların ayrılmasındaki etkin olmadığı söylenebilir.
- Geri kalan izolatlar ve standart suşlar tür ve cins ayırımı gözetmeksizin heterojen olarak *TaqI* kesim gruplarına dağıldığı için bu izolatlar ve standart suşların *TaqI* ile ribotiplendirilmesinin ayırıcı olmadığı görülmektedir.



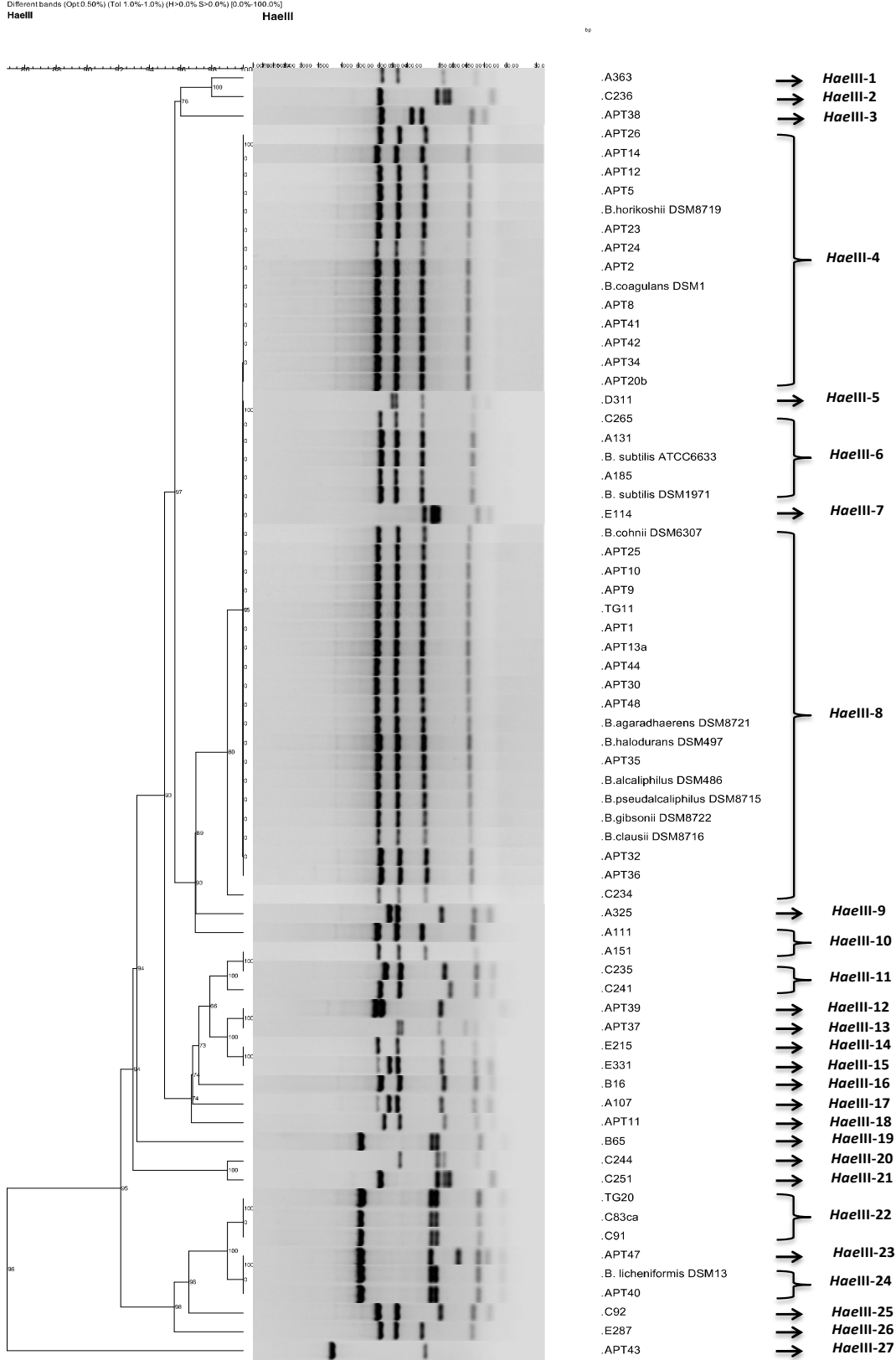
**Şekil 4.31.** *TaqI* ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Different Bands korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.



#### 4.5.5.3. *HaeIII* Restriksiyon Enzimi ile Ribotiplendirme

*HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen bant profillerine göre izolatlar ve referans suşlar 27 farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 4.32.);

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatlardan A151 hariç izolatların tamamı eşsiz *HaeIII* kesim profilleri oluşturmuştur. A151 kodlu izolat ise *B. licheniformis* grubu izolatlardan A111 ile ***HaeIII-10*** kesim profiline sahiptir. *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil olan izolatların tamamının eşsiz bant profili göstermeleri *HaeIII* restriksiyon enziminin bu alt türe dahil izolatların ayırımındaki etkinliğini göstermektedir.
- *B. subtilis* grubuna dahil olan E287 kodlu izolat da *HaeIII* enzimi ile eşsiz kesim profili (***HaeIII-26***) oluştururken standart suşlar *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> ise *B. mojavensis* grubuna dahil izolatlarla (A185, A131 ve C265) birlikte ***HaeIII-6*** kesim profilini göstermiştir. Bu nedenle *HaeIII* ile oluşan kesim profillerinin *B. mojavensis* türü için ayırıcı olmadığı belirlenmiştir.
- *B. licheniformis* grubu izolatlardan C83ca, C91 ve TG20 kodlu izolatlar ***HaeIII-22*** ile APT40 ve standart suş *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> ***HaeIII-24*** kesim profilleriyle tür içinde ayırım gösterirken geri kalan izolatlar olan C92, A111, APT38, APT39 ve E114 sırasıyla eşsiz ***HaeIII-25***, ***HaeIII-3***, ***HaeIII-12***, ***HaeIII-23*** ve ***HaeIII-7*** kesim profillerini göstererek tür içinde yüksek ayırım göstermiştir.
- B16, APT43, C244, C236 ve C251 ve APT11 kodlu *B. safensis* grubu izolatlar sırasıyla ***HaeIII-16***, ***HaeIII-27***, ***HaeIII-20***, ***HaeIII-2***, ***HaeIII-21*** ve ***HaeIII-18*** eşsiz kesim profilleri ile diğer izolat ve standart suşlardan ayrılmışlardır. C235 ve C241 kodlu izolatlar için de ***HaeIII-11*** kesim profilleri ile içinde ayırım sağlanmıştır.
- *B. aerophilus* grubuna dahil izolat B65 ***HaeIII-19*** eşsiz kesim profili ile diğer izolat ve referans suşlardan ayrılmıştır. *B. pumilus* grubuna dahil izolat APT37 ***HaeIII-13*** eşsiz kesim profili ile diğer izolat ve referans suşlardan ayrılmıştır.
- Geri kalan izolat ve standart suşlar heterojen olarak *HaeIII-4* ve *HaeIII-8* kesim profillerini oluşturduğu için *HaeIII* ARDRA analizinin bu gruplardaki izolatlar için tür seviyesinde ayırma etkin olmadığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.32.** *HaeIII* ARDRA profilleriyle oluşturulan kümeleme analizi. Dendrogram, benzerlik oranlarının Different Bands korelasyon katsayısının yüzde olarak belirlenmesiyle UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur.

#### 4.5.6. Toplam hücre protein profillerini gösteren SDS-PAGE analizi sonuçları

Tez kapsamında, izolat ve standart suşların sporulasyon öncesi ve sporulasyon sonrası elde edilen toplam hücre proteinleri profilleri, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Toplam hücre protein profilleri, bakterilerin taksonomik sınıflandırmasında kullanılan bir teknik olup, genomik çeşitliliklerin sonucunda ortaya çıkan gen ekspresyonunun varlığı ve miktarı, toplam hücre protein profilleri ile elde edilen protein bantlarının sayısı ve miktarı ile doğrudan orantılıdır. Ayrıca endospor oluşturan basillerin sporulasyon öncesi ve sonrası protein bantlarındaki çeşitlilikler ve ekspresyon farklılıkları da önemlidir. Bir çok araştırmacı özellikle yeni türlerin tanımlanmasında toplam hücre protein profillerinin ayırıcı özelliğinden faydalanmıştır (Heyndricks *et al.* 1995, Logan *et al.* 2002, Scheldeman *et al.* 2004). Logan *et al.* (2002), *Bacillus luciferensis* türünün ilk olarak tanımlanmasında 24 saatlik protein profillerinin türler arası ve tür içi farklılıkları ortaya koyduğunu göstermiştir. Heyndrickx *et al.* (1995), *Paenibacillus gordonae* ve *Paenibacillus validus* türlerinin ayrılmasında toplam hücre protein profillerinin 16S rRNA datasını desteklediğini ifade etmiştir.

İzolatlar ve standart suşların 18 saatlik toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri Şekil 4.33.'te verilmiştir. Ancak izolat ve standart suşların herbirinin de proteaz üreticisi izolatlar olması nedeniyle bazı izolatların 18 saatlik proteinlerinin, 72 saatlik gelişim sonrasında ise *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların dışındaki tüm örneklerin proteinlerinin kendi proteazları tarafından otoliz edildiği belirlenmiştir. Şekil 4.34.'te *B. safensis* grubuna dahil 7 izolatın 72 saatlik proteinlerinin, proteazlar tarafından degrade edilmiş SDS-PAGE profilleri verilmiştir.

18 saatlik protein profilleri elde edilemeyen izolatların içerisinde yüksek kapasitede alkalin proteaz ürettiği belirlenen 7 izolat (*B. licheniformis* E114, *B. mojavensis* C265, *B. aerophilus* B65, *B. safensis* APT11, *B. safensis* APT43, *B. safensis* C251 ve *B. safensis* C234) da bulunmaktadır. Şekil 4.33.'te *B. aerophilus* B65'in kısmen degradasyona uğramış 18 saatlik protein profili görülmektedir. Proteazlar tarafından degrade edildiği için 18 saatlik protein profilleri elde edilemeyen 16 izolat ve 2 standart suş şu şekildedir; *B. mojavensis* grubundan C265 ve A131, *B. licheniformis* grubundan E114, *B. aerophilus*

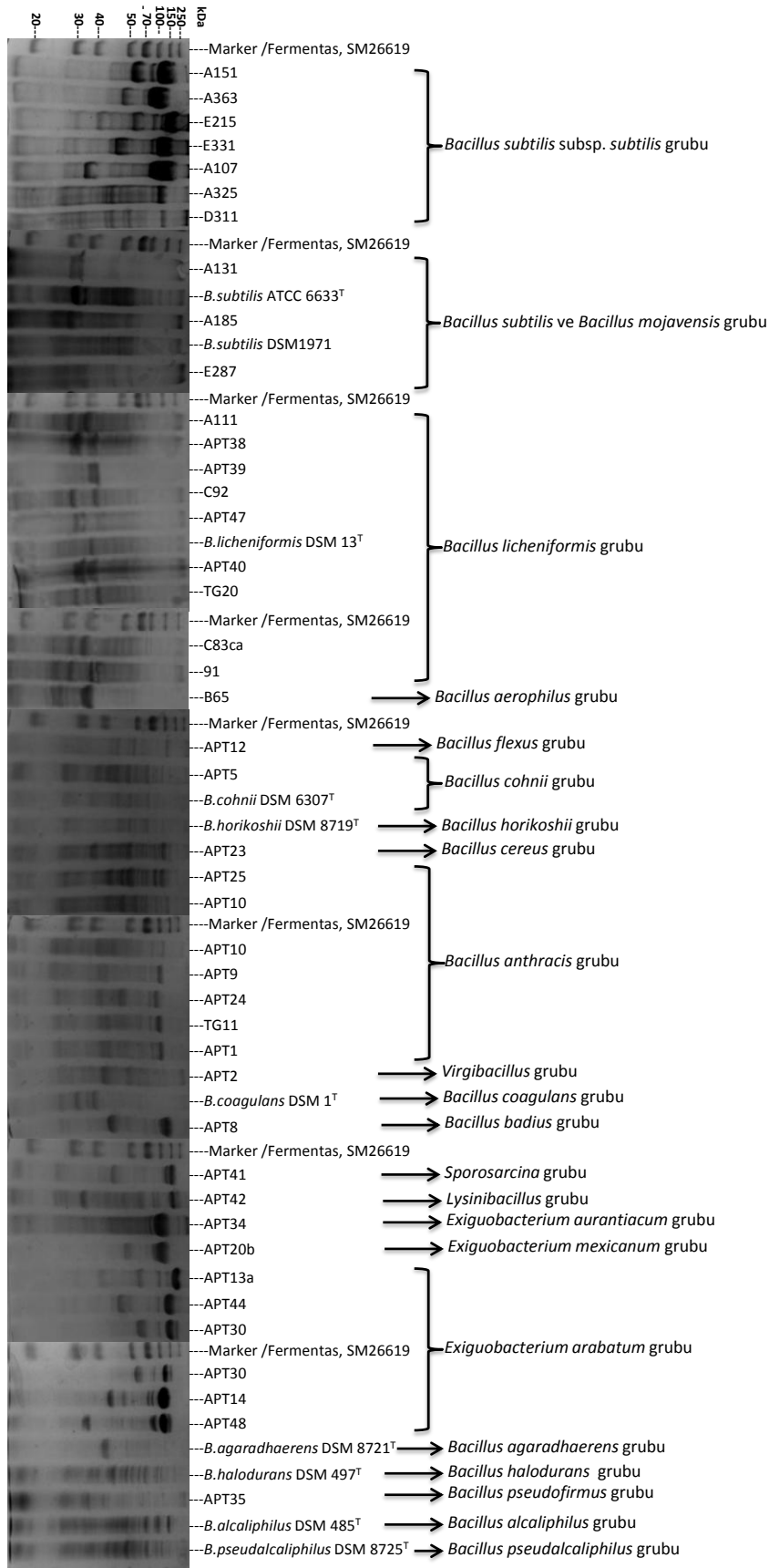
grubundan B65, *B. pumilus* grubundan APT37, *B. safensis* grubundan B16, C241, C235, APT11, C244, C251, C236, APT43, C234, *B. oceanisediminis* grubundan APT26, *B. clausii* grubundan APT32 ve *B. clausii* DSM 8716<sup>T</sup>, *B. gibsonii* 8722<sup>T</sup>. Tüm bu izolat ve standart suşların içerisinde *B. safensis* türüne dahil tüm izolatların proteinlerinin degrade olması dikkat çekicidir.

72 saatlik protein örnekleriyle gerçekleştirilen SDS-PAGE sonucunda ise sadece *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların protein profilleri elde edilebilmiştir (Şekil 4.35.).

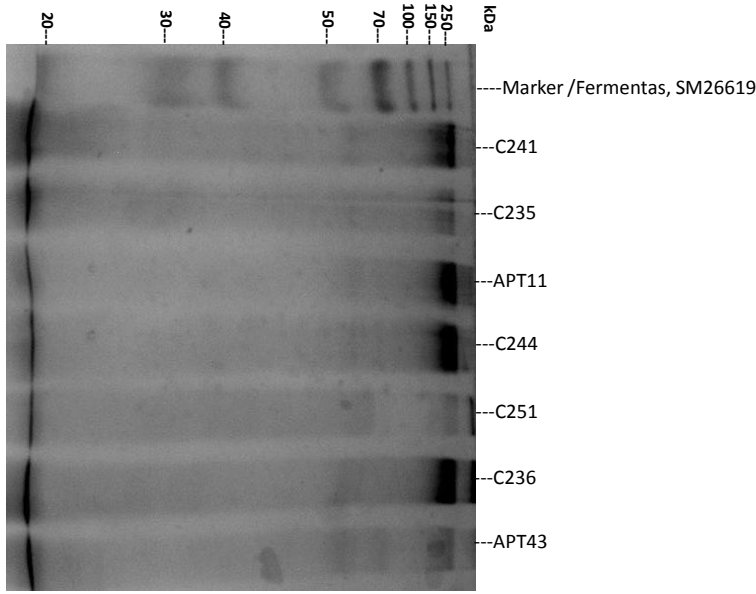
İzolat ve standart suşların 18 saatlik protein profilleri birbirlerinden oldukça farklılık gösterdiği için elde edilen bant profilleri, 16S rRNA dizilerine göre oluşturulan gruplara göre değerlendirilmiştir;

- *B. subtilis* subsp. *subtilis* grubuna dahil izolatların tamamı birbirlerinden farklı protein profilleri sergilemiştir. Bu gruptaki izolatların ürettikleri dominant protein bantlarının molekül ağırlıklarındaki ve yoğunluklarındaki fark dikkat çekmektedir. Özellikle A325 ve D311 kodlu izolatların protein profilleri benzerlik gösterse de izolatların tamamının farklı protein profiline sahip olduğu görülmektedir. A325 ve D311 kodlu izolatların protein profilleri *B. subtilis* grubuna dahil E287 ve standart suşlar *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> ile benzerlik gösterse de, bu örneklerin de bant profillerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre 18 saatlik protein profillerinin *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* ve *B. mojavensis* için tür içi farklılıkları işaret ettiği ancak her bir örneğin farklı bir profil sergilemesi nedeniyle türler arasında ayırt edici ortak bir bant profilinin olmadığı görülmektedir.
- Benzer şekilde *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların da ürettikleri dominant protein bantlarının molekül ağırlıklarındaki ve yoğunluklarındaki fark dikkat çekicidir. Ayrıca cins içinde de *E. arabatum* türlerinin *E. mexicanum* (APT20b) ve *E. aurantiacum* (APT34) türleri ile oldukça farklı protein bant profili sergilediği görülmektedir. Bu sonuçlara göre 18 saatlik toplam hücre protein profillerinin, cins ve tür bazında da bir ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.

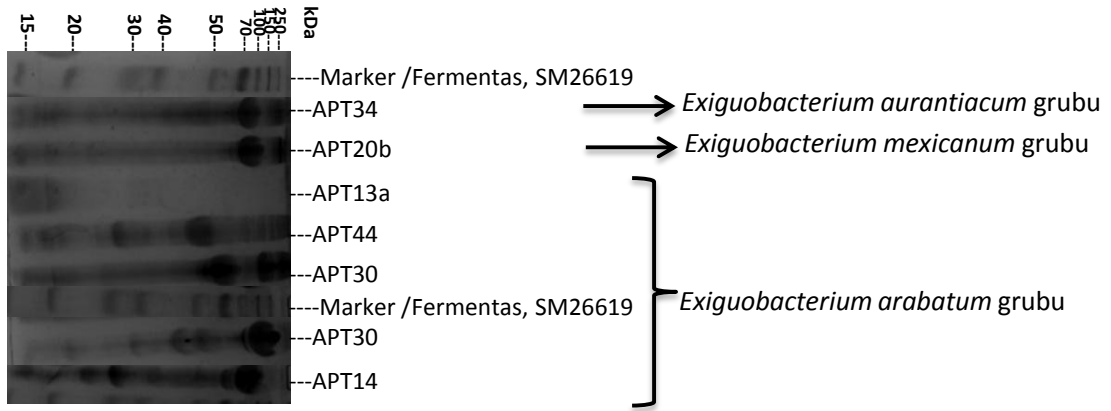
- *B. anthracis* grubunu oluşturan izolatlardan APT1, TG11, APT24 ve APT9'un birbiriyle oldukça benzer protein profiline sahipken APT10 ve APT25'in bu izolatlardan ayrıldığı görülmektedir. *B. anthracis* grubu için de toplam hücre protein profillerinin tür içinde ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. *B. cereus* grubuna dahil APT23 kodlu izolatın ise 18 saatlik protein profili ile özellikle *B. anthracis* APT25 ve APT10 izolatlarına benzerlik gösterse de dominant protein bantlarının molekül ağırlıklarındaki ve yoğunluklarındaki farklardan ötürü ayrıldığı görülmektedir.
- *B. cohnii* grubuna dahil olan APT5 kodlu izolatın referans suşlar *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> ve *B. horikoshii* DSM 8719<sup>T</sup> ile aynı protein bant profilini verdiği, bu türler için türler arası ve tür içi farklılıkların protein profili ile elde edilemediği görülmektedir.
- Alkalifilik standart suşlar *B. alcaliphilus* DSM 485<sup>T</sup>, *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725<sup>T</sup>, *B. halodurans* DSM 497<sup>T</sup> ve *B. agaradhaerens* DSM 8721<sup>T</sup>'in *B. pseudofirmus* olarak tanımlanan APT35 kodlu izolat ile diğer türlerden ayrılarak benzer protein profili vermesi dikkat çekicidir.



Şekil 4.33. 18 saatlik toplam hücre protein profilleri



Şekil 4.34. *B. safensis* grubuna dahil 7 izolatın 72 saatlik proteinlerinin, proteazlar tarafından degrade edilmiş SDS-PAGE profilleri



Şekil 4.35. *Exiguobacterium* cinsine dahil izolatların 72 saatlik protein profilleri

## 5. SONUÇ

Tez kapsamında pH 7.0, 9.0 ve 10.0'lük Skim Milk Agar'da proteolitik zon oluşturan 25 adet alkalifilik Gram pozitif, endospore oluşturan çubuk şeklinde bakteri izole edilmiştir. Ayrıca kültür stoklarında bulunan ve değişik kaynaklardan izole edilmiş 31 adet Gram pozitif, endospor oluşturan basil izolat da pH 7.0, 9.0 ve 10.0'lük Skim Milk Agar'da proteolitik zon oluşturmaları nedeniyle araştırmaya dahil edilmiştir. Standart suşlarla birlikte toplam 68 bakteri örneği çalışmada materyal olarak incelenmiştir.

İzolat ve standart suşlar pH 7.5 ve pH 9.5 olmak üzere iki farklı pH değerine sahip, kazein ve nişasta içeren sıvı besiyerlerinde 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra, hücre dışı alkalen proteaz aktiviteleri substrat olarak %0.6 kazein içeren pH 9.0 ve 10.0'lük Glisin-NaOH tamponlarının kullanılmasıyla ölçülmüştür. Böylelikle her bir izolat ve standart suşun, yüksek kapasitede alkalen proteaz ürettiği gelişim koşulu ile enzimlerinin aktivite gösterdiği en uygun pH değeri belirlenmiştir.

E114 kodlu izolatın pH 7.5'lük, C265 kodlu izolatın ise pH 9.5'lük kazein içeren sıvı besiyerinde 48 saat gelişim sonrasında pH 9.0'lük Glisin-NaOH tamponu ile en yüksek alkalen proteaz aktivitesini (103125 U/ml/g) gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca incelenen parametrelerin her birinde 7 izolatın standart suşlardan daha yüksek kapasitede alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir. Bu izolatlar E114, C265, APT11, B65, APT43, C251 ve C234 kodlu izolatlardır.

Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten bu izolatlar nişastalı sıvı besiyerinde ürettikleri alkalen  $\alpha$ -amilaz üretimleri bakımından da incelenmiştir. En yüksek alkalen proteaz üreten iki izolattan biri olan C265 kodlu izolatın pH 7.5'lük nişasta içeren sıvı besiyerinde de 48 saat gelişim sonrasında pH 10.0'lük Glisin-NaOH tamponu ile en yüksek alkalen  $\alpha$ -amilaz üreten (377 U/ml/g) izolat olduğu belirlenmiştir.



İzolot ve standart suşların 16S rRNA gen dizileri temel alınarak evrimsel uzaklıklarını gösteren filogenetik ağaç oluşturulmuştur. İzolatlar *Bacillales* ordosuna dahil *Bacillaceae*, *Planococcaceae* ve *Paenibacillaceae* familyaları altında toplanmıştır. *Bacillaceae* familyasından 4 farklı cinse (*Bacillus*, *Virgibacillus*, *Lysinibacillus* ve *Exiguobacterium*) dahil türlerle taksonomik olarak gruplanırken, *Planococcaceae* ve *Paenibacillaceae* familyalarından ise 2 farklı cinse (sırasıyla *Sporosarcina* ve *Paenibacillus* cinsleri) dahil türler taksonomik olarak gruplandırılmıştır.

İzolotlar referans tip suşlarla % 98 ve 100 oranında benzerlik göstermiştir. Yüksek kapasitede alkalen proteaz üreten izolatlardan E114 *B. licheniformis*, C265 *B. mojavensis*, B65 *B. aerophilus*, APT11, APT43, C251 ve C234 izolatları ise *B. safensis* olarak taksonomik olarak gruplandırılmıştır. Bu izolatların patojen özellik taşımayan türlerle taksonomik olarak gruplandırılması endüstriyel kullanım potansiyellerini desteklemektedir. Özellikle *B. safensis* ve *B. aerophilus* türlerinin alkalen proteaz üretimi ile ilgili literatürden bilgi edinilememesi nedeniyle, bu türlere dahil edilen 5 izolatın yeni alkalen proteaz kaynakları olabileceği öngörülmüştür.

İzolot ve standart suşlar 16S rRNA genlerine göre filogenetik olarak gruplandırıldıktan sonra genotipik çeşitliliklerinin ortaya koyulması için ITS-PCR, BOX-PCR, (GTG)<sub>5</sub>-PCR, toplam hücre protein profilleri ve ARDRA analizleri ile de incelenmiştir.

ITS-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR teknikleri ile elde edilen bant profillerine göre sırasıyla 28, 33 ve 51 grup elde edilmiştir. Bu gruplar 16S rRNA geni gibi evrimsel olarak iyi korunmamış olan 16S-23S rRNA genleri arasındaki ITS bölgeleri ile (GTG)<sub>5</sub> ve BOX gibi tüm genom boyunca tekrar eden genetik elementlerle oluşturulduğu için izolat ve standart suşların genetik çeşitliliklerinin ortaya koyulmasında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. 16S rRNA geni grupları ile en fazla uyumu ITS-PCR gruplarının gösterdiği belirlenmiştir. Tür içi farklılıkların ortaya koyulmasında ise en fazla ayırım gücü (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile sağlanmıştır.

İzolat ve standart suşların 16S rRNA genleri üzerinden gerçekleştirilen PCR ürünleri, *AluI*, *TaqI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek sırasıyla 26, 24 ve 51 farklı ARDRA grubu elde edilmiştir. ARDRA analizlerinin gerçekleştirildiği 16S rRNA geninin evrimsel olarak oldukça korunmuş olması nedeniyle izolat ve referans türler birbirlerinden ITS, BOX ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR ile elde edilen gruplar kadar başarılı bir şekilde ayıramamıştır. Ayrıca izolat ve standart suşların 18 saatlik toplam hücre protein profillerine göre, özellikle *Exiguobacterium* cinsine ve *B. anthracis* grubuna dahil izolatların tür içi farklılıkları ortaya koyulmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada, endüstriyel öneme sahip enzimlerden biri olan alkalen proteaz aktivitesine sahip ait ülkemize özgü çok sayıda alkalifilik bakterinin alkalen proteaz üretim kapasiteleri standart suşlarla karşılaştırılmış ve potansiyel alkalen proteaz üreticisi izolatlar belirlenmiştir. Ayrıca izolatların ve standart suşların çoklu taksonomik analizlerinden elde edilen verileri kıyaslanarak uygulanan tekniklerin alkalifilik basillerin taksonomik olarak gruplandırılmasındaki etkinlikleri sistematik açıdan ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

- Aiba, S., Kılal, K., Imanaka, A. 1983. Cloning and Expression of Thermostable  $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microb*, 32:3059-1065.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59:143-169.
- Amara, A.A., Salem,S.R, Shabeb, M.S.A. 2009. The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2):104-114,
- Arellano-Carbajal, F., Olmos-Soto, J. 2002. Thermostable  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. Isolated from marine environment. *World J Microb Biot*, 18:791-795.
- Ausubel F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1997. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2.4.1-2.4.5, Preparation of Genomic DNA from Bacteria, pp;208-209
- Banyko, J., Vyletelova, M. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett Appl Microbiol*, 48:318–323.
- Beg, Q.K., Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microb Tech*, 32(2):294-304
- Berber, İ., Cokmus, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. *Microbiology*, 72(1):42-47.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 6:151-160.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Mer, C., Ashabil, A., Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem*, 38:1397-403.
- Caccamo, D., Maugeri, T. L., Guglisndolo, C. 2001. Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA. *J. Appl. Microbiol*, 91:520-24.
- Claus, D., Berkeley, C.W. 1986. The genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath pHA (Ed.). Williams, Wilkins, Baltimore, 34; 1105-1139, ISBN: 0-683-07893-9.

- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N., Cokmus, C. 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* subsp. nov., a thermophilic and  $\alpha$ -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. *J Gen Appl Microbiol*, 57:83-92.
- Cihan, A.C., Tekin, N., Ozcan, B., Cokmus, C. 2012. The Genetic Diversity Of Genus *Bacillus* And The Related Genera Revealed By 16s rRNA Gene Sequences And ARDRA Analyses Isolated From Geothermal Regions Of Turkey. *Braz J Microbiol*, 43(1):309-324.
- Chen, C., Wei, Y., Fan, T., Zhang, L. 2012. Characterization and identification of a *Bacillus* strain TS02 as bio-control agent of strawberry powdery mildew. *Afr J Microbiol Res*, 6(18):4017-4022.
- Chu, I.M., Lee, C., Li, T.S. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb Technol*, 14:755-61.
- Cowan, D. 1996. Industrial enzyme technology. *TIBTECH*, 14:177-178.
- Çalışkan, S. 2011. *Geobacillus* Sp. Tarafından Termostabil  $\alpha$ -Amilaz Üretimi (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Danışman; Prof.Dr. Cumhur Çökmüş.
- Daffonchio, D., S. Borin, A. Consolandi, D. Mora, P. L. Manachini. C. Sorlini. 1998a. 16S–23S rRNA internal transcribed spacers as molecular markers for the species of the 16S rRNA group I of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett*, 163:229–236.
- Daffonchio, D., S. Borin, G. Frova, P. L. Manachini, C. Sorlini. 1998b. PCR fingerprinting of whole genomes, the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveals a different in- traspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *Int J Syst Bacteriol*, 48:107-116.
- Daffonchio, D., Cherif, A., Borin,S. 2000. Homoduplex and Heteroduplex Polymorphisms of the Amplified Ribosomal 16S-23S Internal Transcribed Spacers Describe Genetic Relationships in the "*Bacillus cereus* Group". *Appl. Environ. Microbiol*, 66(12):5460.
- Daffonchio, D., Cherif, A., Brusetti, L., Rizzi, A., Mora, D., Boudabous, A., Borin, S. 2003. Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA Gene Intergenic Transcribed Spacer Fingerprinting of *Bacillus* and Related Genera. *Appl Environ Microbiol*, 69:5128-5137.
- , M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A., De Vos, P. 2004a. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:941-946.
- De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., De Vos, P. 2004(b). Isolation, Characterization, and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. *Appl Environ Microbiol*, 70:3664-3672.

- De Clerck, E., De Vos, P. 2004c. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. FEMS Microbiol Lett, 231:91-98.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H., Wanapat, M. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Mol Biol Rep, 35:265-274.
- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A., Erarslan, A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42:an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. J Appl Microbiol, 96:320-327.
- Erarslan, A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztürk, D.C., Karahan, N. 2005. Enzim Saflaştırmasında Temel Yöntemler.8.Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı. TÜBİTAK Fen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kocaeli.
- Esen, A. 1978. A simple method for quantitative, semi quantitative, and qualitative assay of protein. Anal. Biochem, 89:264-273.
- Flint, S.H., Ward, L.J.H., Walker, K.M.R. 2001. Functional Grouping of Thermophilic *Bacillus* Strains Using Amplification Profiles of the 16S–23S Internal Spacer Region. System Appl Microbiol, 24:539–548.
- Freitas, D.B., Reis, M.P., Lima-Bittencourt, C.I., Costa, P.S., Assis, P.S., 2, Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M. 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes, 1:92.
- Genersch, E. and Otten, C. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Apidologie, 34:195-206
- Gessesse, A., Gashe,B.A. 1997. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. Biotechnol Lett, 19 (5):479-481.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 59:15-32.
- Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. Microbiology, 142:3-16.
- Gürtler, V. 1999. The role of recombination and mutation in 16S–23S rDNA spacer rearrangement. Gene, 238:241–252.
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. Bioresource Technol, 100(13):3366-3373.
- Heyrman, J., Balcaen,A., Rodriguez-Diaz,M., Logan, N.A., Swings, J., De Vos, P. 2003. *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). Int J Syst Evol Microbiol, 53:459-463.

- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P., Hoste, B., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Aziz, A.M., Ali, N., Berkeley, R.C.W. 1995. *Paenibacillus* (Formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 Is a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (Formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: Emended Description of *P. validus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 45(4):661-669.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, Logan, N.A. 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 48:99-106
- Hodgson, J. 1994. The changing bulk biocatalyst market. *Biotechnol*, 12: 789-790.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric Biol Chem*, 36:1407-1414.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol R*, 63(4):735-750.
- Huang T-P., Tzeng, D.D-S, Wong, A.C.L., Chen, C-H., Lu, K-M. 2012. DNA Polymorphisms and Biocontrol of *Bacillus* Antagonistic to Citrus Bacterial Canker with Indication of the Interference of Phyllosphere Biofilms. *PLoS ONE*, 7(7): e42124.
- Jackson, P., Thornley M.J. Thompson, R.J. 1984. High-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of relationships between *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *Journal of General Microbiology*, 130:3189-3201.
- Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 945-952.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R., Chang, C.S. 2003. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. *J Appl Microbiol*, 95:267-272.
- Jukes, T. H., Cartor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, pp 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York.
- Kalisz, H.M. 1988. Microbial proteinases. *Advance Biochem Eng Biotechnol*, 36:1-65.
- Klappenbach, J.A.; Dunbar, J.M.; Schmidt, T.M. 2001. rDNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Nucl. Acids. Res*, 29:181-184.
- Krulwich, T.A, Guffanti, A.A. 1983. Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. *Adv Microb Physiol*, 24:173-214.
- Kuisiene, N., Raugalas, J., Citavicius, D. 2007. Identification of *Geobacillus stearothermophilus* by restriction digestion with *AluI* of the amplified 16S rRNA. *Biologija*. 53:62-66.

- Kumar, C.G., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv* 17:561-594.
- Kumar, S. Tamura, K., Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5: 150-163.
- Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I., Kilar, F. 1998. Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 19:2317-2323.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- , L., Pitre, M., Jacques, M., Roy, D. 2004. Identification of the Bacterial Community of Maple Sap by Using Amplified Ribosomal DNA (rDNA) Restriction Analysis and rDNA Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol*, 7(4):2052-2060.
- Logan, N.A., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodriguez-Diaz, M., Heyndrickx, M., De Vos, P. 2002. *Bacillus luciferensis* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1985-1989.
- Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kampfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., Ventosa, A. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:2114-2121.
- Mac Gregor, E.A. 1988.  $\alpha$ -Amylase structure and activity. *J. Protein Chem*, 7:399-415.
- Malhotra, R., Noorwez, S., Satyanarayana, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol*, 31:378-384.
- Manachini, P.L., Mora, D., Nicastro, G., Parini, C., Stackebrandt, E., Pukall, R., Fortina, M.G. 2000. *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1331-1337.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2007. *Brock Biology of Microorganisms*, Chapter 11, Microbial evolution and systematic, pp;300-326.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:433-446.

- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Manca, M. C., Prisco, G. and Gambacorta, A. 2004. “*Bacillus thermoantarticus*” sp. nov., from Mount Melbourne, Antartica: a novel thermophilic species. *Polar Biology*, 16:101-104.
- Nielsen, P., Fritze, D., Priest H.G. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141:1745-1761.
- Niemi, R.M., Niemela, S.I., Bamford, D.H., Hantula, J., Hyvarinen, T., Forsten, T. and Raateland, A. 1993. Presumptive fecal *Streptococci* in environmental samples characterized by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *App and Env Microbiol*, 59(7):2190-2196.
- Ohlsson, E. 1930. The two components of malt diastase, especially with reference to the mutarotation of the products formed in the hydrolysis of starch. *Physiol Chem*, 189:17-63.
- Özer, Ercüment. 2002. “Enzimler Yatırımcılarını Arıyor”. BİYOTEK Biyoteknoloji Sektör Dergisi (ISSN 1302-969X), No: 09, Volume: 2
- Pfaller, M.A., Bolows, A., Hansler, W.J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. 1991. *Manual of clinical microbiology*. ASM, Washington DC, 171-182.
- Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R*, 62(3):597-635.
- Reddy, L., Wee, Y-J., Ryu, H-W. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *J Chem Technol Biotechnol*, 83(11):1526-1533.
- Robertson, D.E., Mathur E.J, Swanson R.V., Mars B.L., Short J.M. 1996. The discovery of new biocatalysts from microbial diversity. *SIM News*, 46:3-4.
- Sarıkaya, E. 1995.  $\alpha$ -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. Doktora Tezi (Yayınlanmamış), Ankara.
- Sass, A.M., McKew, B.A. Sass, H., Fichtel, J., Timmis, K.N., McGenity, T.J. 2008. Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems*, 4:8.
- Scheldeman, P., Rodriguez-Diaz, M., Goris, J., Pil, A., De Clerck, E., Herman, L., De Vos, P., Logan, N., Heyndrickx, M. 2004. *Bacillus farraginis* sp. nov., *Bacillus fortis* sp. nov. and *Bacillus fordii* sp. nov., isolated at dairy farms. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1355-1364.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K, Marsh T.L. and Flynn S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol*, 13:109-122.



- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., El-Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M. 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 63(3):299-306.
- Stackebrandt, E., Fredericksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1043-1047.
- Suzuki, Y., Kishigami, T., Abe, S. 1976. Production of extracellular  $\alpha$ -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol*, 31:807-812.
- Thompson, J. D., Collins, M.D, Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.
- Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K, Marsh T.L., Flynn S.J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol*, 13:109–122.
- Tindall, B.J., Rosello-Mora, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. 2010. Notes on characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 249-266.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö. 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J Biol*, 24:79-93.
- Uehara, H., Yoneda, Y., Yamane, K., Murao, B. 1974. Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: Transformation of high protease productivity. *J Bacteriol*, 119:82-91.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60:407-438.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol*, 5:25-40.
- Vauterin, L., Vantomme, R., Pot, B., Hoste, B., Swings, J., Kersters, K. 1990. Taxonomic analysis of *Xhantomonas campestris* pv. *Begoniadae* and *X. Campestris* pv. *Pelargonii* by means of phytopathological phenotypic protein electrophoretic and DNA hybridization methods. *Systematic and Applied Bacteriol*, 13:166-167.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K. 1991. Grouping of *Xhantomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J Gen Microbiol*, 137:1677-1687.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, K., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Trüper, H.G., 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37:463-464.

- Woese, C.R and Wolfe,R.S. 1985. The bacteria, Volume VII, Academic Press, USA, ISBN: 0-12-307208-5.
- Woese, C. R. 1999. Prokaryote Systematics. The evolution of a science In: The procaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandth, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Wu, X.Y., Walker M.J., Hornitzky, M., James Chin, J. 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. J Microbiol Meth, 64:107–119.
- Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsyama, H., Nakajima, K., Suemori, A. 2003. *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. Int J Syst Evol Microbiol, 53:1531–1536.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Nilgün TEKİN  
**Doğum Yeri:** Finike  
**Doğum Tarihi:** 04/05/1983  
**Medeni Hali:** Bekar  
**Yabancı Dili:** İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise:** Antalya Özel Mahmut Celal Ünal Fen Lisesi (1998-2001)  
**Lisans:** Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2001-2005)  
**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ABD (2005-2008)

### Çalıştığı Kurum ve Yıl

A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, Devlet Planlama Teşkilatı tarafından desteklenen 2001K120240 kod numaralı 'İleri Araştırma ve Eğitim Programları' konulu projede Proje Destek Uzmanı (Sözleşmeli Personel) (2008 Mart-2008 Aralık).

Proje destek uzmanı; BM Laboratuvar Sistemleri ARGE Bölümü (2011 Şubat-Mayıs).

## Yayınları (SCI ve Diğer)

Arzu Coleri Cihan, Birgul Ozcan, **Nilgun Tekin** and Cumhuri Cokmus. 2010. Characterization of a thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* F84a. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Volume 2, Chapter 87, pages 945-955, Ed., Antonio Mendez Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, ISBN (13): 978-84-614-6195-0

Arzu Coleri Cihan, Birgul Ozcan, **Nilgun Tekin** and Cumhuri Cokmus. 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* subsp. nov., a thermophilic and  $\alpha$ -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. J Gen Appl Microbiol, 57(2):83-92.

Arzu Coleri Cihan, Birgul Ozcan, **Nilgun Tekin** and Cumhuri Cokmus. 2011. Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. World J Microb Biot, 27(11):2683-2696

Ozge Ozmen, Ibrahim Seker, Okan Ertugrul, Emel Ozkan and **Nilgun Tekin**. 2011. Prolactin receptor (PRLR) gene polymorphism in Chios, White Karaman and Awassi sheep breeds. Archiv Tierzucht, 4:381-390.

Arzu Coleri Cihan, **Nilgun Tekin**, Birgul Ozcan and Cumhuri Cokmus. 2012. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of Turkey. Braz. J. Microbiol, 43(1):309-324.

**Nilgun Tekin**, Arzu Coleri Cihan, Serpil Takac, Canan Yagci, Kenan Tunc and Cumhuri Cokmus. 2012. Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5. Turk J Biol, 36:430-440.

## Characterization of a thermostable $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* F84a

A. C. Cihan<sup>1\*</sup>, B. Ozcan<sup>2</sup>, N. Tekin<sup>3</sup> and C. Cokmus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, 06100, Tandogan, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Mustafa Kemal University, 31040, Hatay, Turkey

<sup>3</sup> Biotechnology Institute, Ankara University, 06500, Besevler, Ankara, Turkey

Isolation of novel thermophilic bacilli has received considerable attention among the scientific community in whole world because of their biotechnological importance as they possess unique enzymes with thermal activity and stability. Of the thermophilic enzymes, we were interested in  $\alpha$ -glucosidases which catalyze hydrolysis of terminal non-reducing  $\alpha$ -D-glucosidic linkages of oligo- and polysaccharides with the release of  $\alpha$ -D-glucose. Thermostable  $\alpha$ -glucosidases have a number of potential applications due to their wide range of substrate specificity and their ability of catalyzing transglucosylation reactions.

Our research group was isolated a significant amount of  $\alpha$ -glucosidase producing, thermophilic, facultative anaerobic, endospore-forming, rod-shaped bacterial strain F84a from a high-temperature well pipeline in Kizilcahamam, Turkey. The strain was able to grow at temperatures, pH and salinities ranging from 45 to 69 °C, 7.0 to 8.5 and 0 to 4.5 %, respectively. The G+C content of the genomic DNA was 49 mol %. In phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, strain F84a showed the most sequence similarity to *Geobacillus thermodenitrificans* (99.8 %) and to *Geobacillus subterraneus* (99.3 %) with DNA hybridization values of 80.5 % and 28.4 %, respectively. Based upon phylogenetic and chemotaxonomic evidences, strain F84a was proposed to be a member of *G. thermodenitrificans* species (Strain F84a = NCIMB 14581 = DSM 22628).

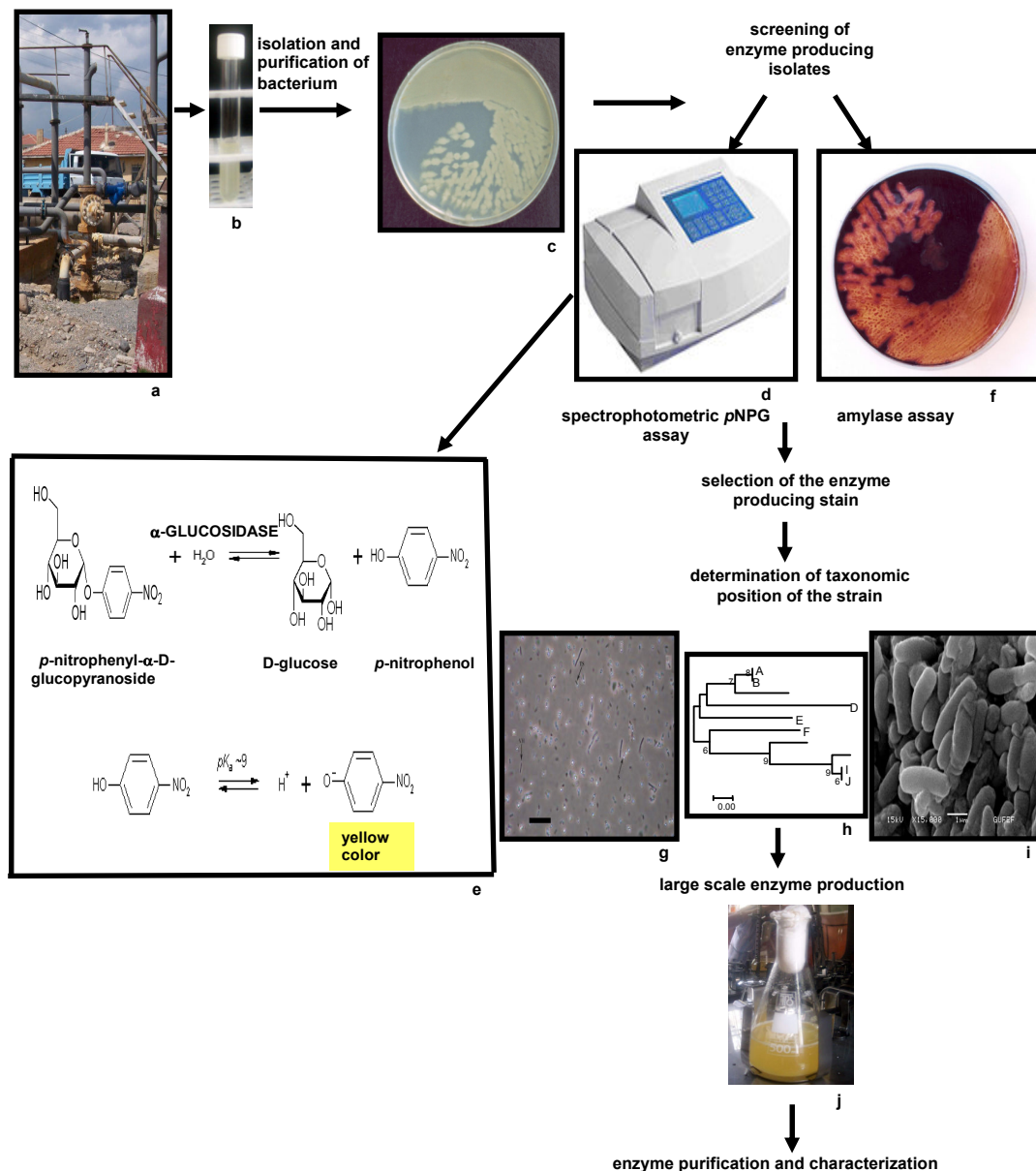
The thermostable exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase of strain F84a having optimum activity at 60 °C, pH 7.0 was also characterized. The enzyme remained active over a temperature range of 35-70 °C, and a pH range of 4.5-11.0. The relative activity was 68 % when incubated at 60 °C for 5 h. It also retained 58 % and 83 % of its activity at pH 4.5 and 11.0 for 15 h at 35 °C, respectively. The  $\alpha$ -glucosidase hydrolysed  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,3, and  $\alpha$ -1,4 bonds on substrates in addition to a high transglycosylation activity. Furthermore, enzyme was found to be resistant to most of the denaturing agents and inhibitors. By this research, a thermostable  $\alpha$ -glucosidase was isolated and characterized from newly isolated *G. thermodenitrificans* F84a as having biotechnological potential in transglycosylation reactions.

**Keywords** *Geobacillus*; taxonomy; thermostable  $\alpha$ - glucosidase; characterization

### 1. Introduction

The industrial demand for enzymes that can withstand harsh conditions has greatly increased over the past decade. Therefore, thermostable enzymes, which have been isolated mainly from thermophilic organisms, have found a number of commercial applications such as biocatalysis, biotransformation and biodegradation processes because of their extreme thermal activity and stability [1, 2]. In order to meet this demand, much work is left to microbiologists. Advances in this area have been achieved by the isolation of a large number of thermophilic microorganisms from different ecological niches and subsequent production of valuable enzymes [1, 3]. Consequently, both the discovery and characterization of new extremophilic enzymes provide the possibility that these enzymes will lead to novel applications [4]. On the other hand, to select the appropriate taxonomic group of microorganism which will be studied for further enzyme production process is also another important subject that must be considered. A characteristic enzyme production in the course of thermophilic, endospore-forming bacterial fermentation processes occur during a relatively short period of time, with very low-cost carbon and nitrogen sources. Thus, members of these thermophilic bacteria have been used in many researches aimed on screening and purification of thermostable enzymes [5].

\* Corresponding author: Dr. Arzu Coleri Cihan, Phone: +90-312-2126720 / 1095, Fax: +90-312-2232395, e-mail: arzucoleri@gmail.com



**Fig. 1** A flowchart demonstrating the isolation, screening, taxonomic characterization and enzyme purification stages of *Geobacillus thermodenitrificans* F84a, capable of producing thermostable  $\alpha$ -glucosidase of biotechnological importance. a) A photograph of Kizilcahamam high-temperature well pipeline, b) A turbid enrichment culture, c) A pure culture of F84a on Nutrient agar plate after 18 h of cultivation at 60 °C, d) Photograph of a spectrophotometer, e) The action mechanism of an  $\alpha$ -glucosidase on the *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) substrate and the principle of spectrophotometric *p*NPG assay, f) A Lugol's iodine dyed photograph of strain F84a showing the positive amylase activity on MI plate containing 1 % starch, g) Phase-contrast micrograph of strain F84a (VC, vegetative cell; MS, mature spore; TS, terminal sporulation; bar, 10  $\mu\text{m}$ ), h) A phylogenetic tree which shows the taxonomic position of a bacterial strain according to 16S rRNA gene sequence, i) Scanning Electron Micrograph of strain F84a after 18 h of cultivation at 60 °C in Nutrient Broth, j) Photograph of a F84a culture in Erlenmeyer flask containing MI medium for enzyme production.

$\alpha$ -Glucosidases (EC 3.2.1.20) are typical exo-type hydrolases that release  $\alpha$ -glucose from the non-reducing ends of the substrates such as oligo- and polysaccharides [6]. They are usually found in association with other amylolytic enzymes which accomplish complete degradation of starch, and occur in microorganisms as intracellular, extracellular, or cell-bound enzymes [7]. Some  $\alpha$ -glucosidases also catalyze transglucosylation reactions when high concentrations of glucosyl acceptor are present in the reaction [8]. They show diversity in substrate specificity and transglycosylation activities, and these specificities greatly differ with the enzyme source [7]. They have a number of potential applications in fundamental research, industrial starch processes,  $\alpha$ -amylase assay kits in clinical laboratories and synthesis of oligo-, di-, and trisaccharides. Some spore-associated thermostable glucosidases can also be used as a rapid biological indicator for sterilization control [6, 7, 9, 10].

$\alpha$ -Glucosidases, responsible for hydrolysis of *p*-nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*NPG), have also been found in a number of different thermophilic, endospore-forming, aerobic species from the genus *Geobacillus*. The genus *Geobacillus* falls into the thermophilic bacilli genetic group 5 according to their 16S rRNA gene sequences [11, 12]. The members of this genus can exhibit growth at temperatures ranging from 35 to 78 °C, and are widespread in various geographical locations. Of those, thermophilic members belonging to genus *Geobacillus*,  $\alpha$ -glucosidases of *Geobacillus caldovelax* DSM 411 [13], *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 [14], *Bacillus* sp. SAM 1606 [15], *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12016 [16], *G. stearothermophilus* ATCC 7953 [10], *G. thermodenitrificans* HR010 [17], *Geobacillus* HTA-462 [4], and *Geobacillus* sp. A333 [18] have been well-characterized.

In our previous studies, our research group was isolated more than five hundred thermophilic bacilli in order to screen the industrially important  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase producing strains from various geothermal regions of Turkey [19]. In the present study, we are interested in purification and characterization of a novel thermostable exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase of biotechnological importance from *Geobacillus thermodenitrificans* strain F84a as summarized in Fig. 1. The strain was able to produce significant levels of  $\alpha$ -glucosidase extracellularly (36.64 U/g) at the 15 h of cultivation, and the characteristics of F84a  $\alpha$ -glucosidases make it a good candidate for industrial applications. This study not only deals with the substrate specificity, temperature and pH activity and stability, catalytic property and effect of some inhibitors on this thermostable  $\alpha$ -glucosidase, but also displays the taxonomy position of the strain F84a with details of phenotypic, chemotaxonomic, and genetic characteristics.

## 2. Methods

### 2.1 Bacterial isolation and growth conditions

Strain F84a was obtained from a sediment sample of a high-temperature well pipeline in Kizilcahamam province of Ankara, which exists in the Middle Anatolian Region of Turkey. The water temperature and pH of this geothermal region were measured as 98 °C and 7.0-7.5, respectively. *Geobacillus thermoglucosidasius* medium MI (pH 8.0) containing 1 % soluble starch was used for isolation and obtaining the enrichment culture [20]. Cultures were purified from the same medium containing 3 % agar by subculturing four times, and the purity was confirmed microscopically. The pure culture of strain F84a was isolated on 8 September 2004 and the properties of F84a, which was selected among several isolates, will be presented here.

The type strain of *G. stearothermophilus* ATCC 12980<sup>T</sup> was kindly provided by Prof. Ali Osman Beldüz (Karadeniz Technical University, Turkey), and the type strains of *G. subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup>, and *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup> were acquired from DSMZ (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany).

### 2.2 Morphologic and physiologic characterization

Cytology and colony morphology analyses were carried out using 18 h-old cultures on Nutrient Agar plates (containing 3 % agar). The formation of spores was tested by using Nutrient Broth cultures of 18-24 h supplemented with 5 mg/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O and observed using phase-contrast microscopy. Scanning Electron Microscopy (SEM) was analyzed using Nutrient Broth culture of F84a cells, grown at 60 °C under shaking at 250 rpm for 18 h. The sample was prepared for electron microscopy using the procedure described by Hayat [21], and examined in the Jeol JSM 6060 LV Scanning Electron Microscope. The temperature range was determined by incubating the strain in Nutrient Broth at temperatures from 30 to 80 °C. The pH dependence of growth was tested in Nutrient Broth which was adjusted to different pH values from 4.0 to 11.0. The effect of salinity was also checked in Nutrient Broth supplemented with 0 to 5 % concentrations of NaCl.

Physiological characterization tests included: Gram staining, anaerobic growth, oxidase, catalase and amylase activity, casein, citrate, starch, tyrosine, gelatine and urea utilization, reduction of nitrate to nitrite, N<sub>2</sub> gas production from nitrate, acid production from sugars, methyl red test, Voges-Proskauer test, indole and H<sub>2</sub>S production, susceptibility to lysozyme. These tests were carried out by the methods of Claus and Berkeley as described previously [22]. Test results were observed at days 1, 2 and 7. A disk diffusion test was performed by using Nutrient Agar plates for antimicrobial susceptibility testing. Plasmid DNA isolation was carried out by the procedure of Anderson and McKay [23]. All assays were performed with pure culture in triplicates.

### 2.3 16S rRNA gene amplification and sequence analyses

The cultures growing on Nutrient Agar for 18 h at 60 °C were used for genomic DNA extraction (Genomic DNA purification kit, Fermentas). The gene encoding 16S rRNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with the 16S bacteria specific 27Fa forward primer and the 1492R reverse primer [24]. The sequence of the PCR-amplified 16S rRNA gene was determined by using ABI 3100 gene sequencer with Bigdye cycle sequencing kit. In the phylogenetic analysis, homology search was carried out using the basic BLASTN search program at the NCBI Web-

site. A neighbour-joining phylogenetic tree [25] was constructed with the MEGA package version 4 [26] according to Kimura 2-parameter method [27].

#### 2.4 Fatty acids and respiratory lipoquinone analyses

Fatty acids and respiratory lipoquinone analyses were performed by Dr. Brian Tindall (DSMZ Identification Service, Braunschweig, Germany) using minor modifications of the extraction method of Kuykendall et al., Miller and Tindall et al. [28, 29, 30]. Fatty acids were further determined using GC, and quinones were analyzed by HPLC.

#### 2.5 DNA base composition and DNA-DNA hybridization

DNA base composition and DNA-DNA hybridization analyses were carried out by the DSMZ Identification Service. DNA was extracted using the French press technique, and purified by the method of Cashion et al. [31]. In determining GC base composition of the genomic DNA, the DNA was hydrolysed with P1 nuclease and the nucleotides were dephosphorylated with bovine alkaline phosphatase [32]. The resulting deoxyribonucleotides were analyzed using HPLC. The GC content of the genomic DNA was calculated according to the method of Mesbah et al. [32]. Spectroscopic DNA-DNA hybridization was carried out as described by De Ley et al. [33] with the modifications described by Huss et al. [34].

#### 2.6 Purification of F84a $\alpha$ -glucosidase

Strain F84a was cultivated for 12 h in 1 liter enzyme production medium MII (2 % soluble starch from potato (Sigma S2004), 2 % peptone, 0.2 % yeast extract, 0.5 % meat extract, 0.3 %  $K_2HPO_4$ , and 0.1 %  $KH_2PO_4$ , at pH 8.0) at 60 °C under shaking at 250 rpm [20]. Cell-free supernatant of F84a was removed from the medium by centrifugation at 10.000 rpm for 15 min at +4 °C. Centrifuged supernatant was fractionated with solid ammonium sulphate and the precipitates from 40-65 %  $(NH_4)_2SO_4$  saturation were dissolved in cold 50 mM potassium phosphate-5 mM EDTA buffer (pH 7.0). The enzyme fraction was dialyzed overnight and this 195 ml dialyzed was centrifuged to remove insoluble residues. This sample was concentrated 6.5-fold by centrifugation at 4000 rpm for 3 h in a speed vacuum concentrator, then it was suspended in Tris-HCl buffer (pH 8.0) and applied to a cation-exchange chromatography column (Biorad S-6 column, 12 by 53 mm) which was equilibrated and eluted with a linear gradient of 0.1 M sodium chloride with the same buffer. Fractions of 400  $\mu$ l per tube were collected at a flow rate of 2 ml/min, and monitored for absorbance at 280 nm,  $\alpha$ -glucosidase activity and the conductivity. Fractions showing  $\alpha$ -glucosidase activity were pooled and used for enzyme characterization. Protein concentration was determined by using Bradford reagent (Sigma B6916), and as a protein standard 0.1 to 10 mg/ml concentrations of BSA (Sigma A2153) was used [18].

#### 2.7 Determination of *p*NPGase activity and glucose formation

The  $\alpha$ -glucosidase activity was determined spectrophotometrically by measuring the hydrolysis of *p*NPG (Sigma N1377) as described previously [19]. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme needed for hydrolysis of 1  $\mu$ mol *p*NPG per minute at 60°C, pH 7.0. The millimolar extinction coefficient of *p*NP at 400 nm, pH 7.0 and 60 °C was measured as 19.1  $mM^{-1}.cm^{-1}$  and used to calculate the product yield.

Glucose oxidase-peroxidase (GOPOD) reagent (Sigma GOGO-20) was used to determine glucose production from the other substrates except *p*NPG. The glucose liberated from the substrates was measured in  $\mu$ g glucose/ml after measuring at 540 nm. The enzymatic reaction proceeded for 10 min at 60°C and stopped by heating in boiling water for 3 min. Each determination was performed at least three times [18].

#### 2.8 Effect of temperature and pH on $\alpha$ -glucosidase activity and stability

The effect of temperature on enzyme activity was determined between 35 to 95 °C with 5 °C intervals. For stability tests, enzyme was heated for 10 min, 20 min and 5 h at different temperatures from 35 to 95 °C, then quickly chilled on ice and assayed for the remaining activity at 60 °C, pH 7.0. The effect of pH on the enzyme activity was determined using 0.02 M sodium-citrate (pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5), 0.1 M sodium phosphate (pH 7, 7.5, 8, 8.5), 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate (pH 9, 9.5) and Ringer (pH 10, 11) buffers at 60 °C, all instead of potassium phosphate buffer (pH 7.0) in the standard assay mixture. The effect of pH on  $\alpha$ -glucosidase stability was examined by incubating the enzymes in the same buffers (pH 3-11) at 35 °C for 15 h as reported in the activity test [18]. The activity of the not-heated and not pH-treated enzyme was expressed as 100 %.

#### 2.9 Substrate specificity tests and the mode of $\alpha$ -glucosidase action on the substrates

In substrate specificity experiments, substrates of phenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, isomaltose, isomaltotriose, panose, turanose, saccharose, maltitol, trehalose, lactose, raffinose, amylose, soluble starch (Sigma S2004), and dextrin (Sigma D4894) were used for



glucose formation. The mode of enzyme action, exo-type hydrolysis and transglycosylation activity analyses were performed using Thin Layer Chromatography (TLC) as described previously [18].

### 2.10 Effect of some denaturants and inhibitors on $\alpha$ -glucosidase activity and stability

The enzyme was treated with denaturants: urea (2-8 M), SDS (0.004-0.5 %), ethanol (10-40 %), EDTA (2 mM), para-chloromercuribenzoate (p-CMB, 50  $\mu$ M), with metal ions: CuCl<sub>2</sub>, HgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> (2 mM), and with substrate-analogue inhibitors: Glucono- $\gamma$ -lacton, L-Glutathione reduced, D-Glucose (5 mM), Tris and Histidine (10 mM) [18]. The activities under standard assay conditions found in the absence of these reagents were expressed as 100 %.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Characterization and identification of strain F84a

#### 3.1.1 Phenotypic characteristics of the strain

The colonies of strain F84a were cream, opaque, circular, and flat with lobate edges, with a dry-powdery surface when incubated on NA (3 % agar) at 60 °C. The phase-contrast and SEM micrographs of the isolate are shown in Fig. 1g and Fig. 1i, respectively. Microscopy observations revealed that the cells were Gram-positive, motile and straight rods with 0.71-0.93  $\mu$ m wide and 1.48-2.15  $\mu$ m long. The cell surface was observed to be smooth in SEM images. The cells occurred singularly. The terminal, ellipsoidal endospores were observed in non swollen sporangia.

F84a strain was catalase and oxidase positive, grew well aerobically, but was facultative anaerobic. It was moderately thermophilic within growth range between 45 and 69 °C with the optimum at 60 °C. The pH range was 7.0-8.5. The isolate F84a utilized a wide range of carbon sources including maltose, D-fructose, D-glucose, D-(+)-galactose, sucrose, D-xylose, D-mannose, L-arabinose, raffinose, and D-mannitol. It was not able to ferment: lactose and D-sorbitol. Starch utilization, and amylase activity were positive, but urea, casein, citrate, gelatin and tyrosine could not be utilized. It was able to reduce nitrate to nitrite, but N<sub>2</sub> gas production was not observed from nitrate. Methyl red and Voges-Proskauer (pH 6.9) tests were negative. Indole and H<sub>2</sub>S were not produced. The growth occurred between 0 to 4.5 % concentrations of NaCl with an optimum at 3 %. The isolate was found to be sensitive to lysozyme and to all antibiotics tested. The strain contained two plasmid bands of 11.9 and 15.6 kb.

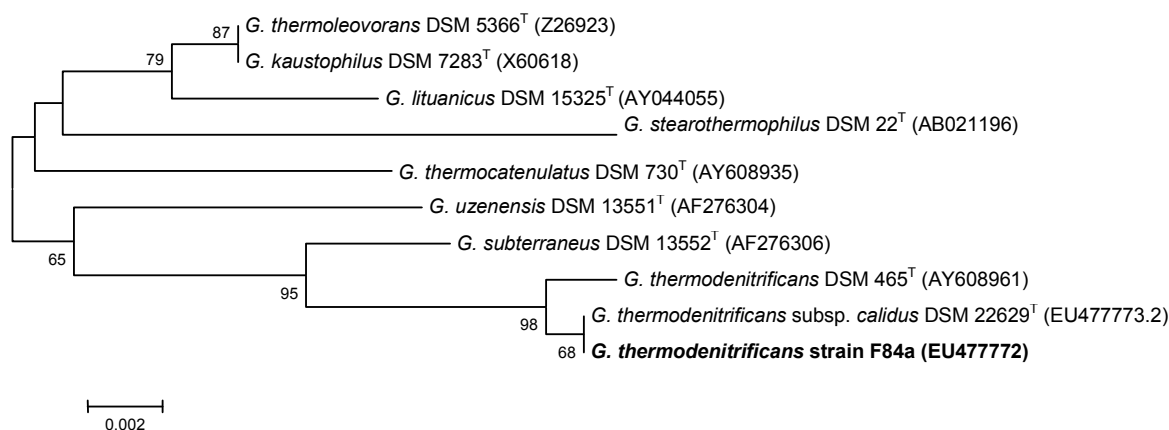
F84a was found to be negative for protease activity, but could produce starch-degrading enzymes with strong amylolytic and glycosidic activity. Strain F84a differed from its closely related species, *G. thermodenitrificans*, in some phenotypic characteristics such as spore shape, pH and NaCl requirement, gas production from nitrate, acid production from lactose and arabinose [35].

#### 3.1.2 Lipid and fatty acid composition

According to respiratory quinone analysis, the major menaquinone content was found to be MK-7. The dominant cellular fatty acids were: iso-C17:0 (36.72 %), iso-C15:0 (33.96 %), C16:0 (8.6 %), anteiso-C17:0 (8.26 %), and iso-C16:0 (5.92 %). The iso-branched fatty acids were the major membranous lipids present with a percentage of 76.6 of the total fatty acids which was in the range as described in genus *Geobacillus*.

#### 3.1.3 Phylogenetic position

The partial 16S rRNA gene sequence determined for strain F84a was 765 nucleotides long. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method. It showed the position of strain F84a among the species of genus *Geobacillus* which fell into the phylogenetic group 5 of endospore-forming bacteria (Fig. 2). According to the 16S rRNA gene sequence similarity, the strain was found to be closely related to *G. thermodenitrificans* (99.8 %), *G. subterraneus* (99.3 %), *Geobacillus uzenensis* (97.9 %), *Geobacillus thermocatenuatus* (97.6 %), *Geobacillus kaustophilus* (97.6 %), *Geobacillus thermoleovorans* (97.6 %), and *G. stearothermophilus* (96.9 %).



**Fig. 2** Neighbour-joining evolutionary distance phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain F84a and the representative members of genus *Geobacillus* of the family *Bacillaceae*. Bootstrap values (%) are based on 1000 replicates and shown for branches with more than 50 % bootstrap support. Bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position.

### 3.1.4 The G+C content and DNA-DNA hybridizations

The G+C content of the genomic DNA was 49.0 mol %, which is in the range of *Geobacillus* species. In addition, the G+C content of the 16S rRNA gene was found to be 59.8 %. In order to verify the taxonomic position of strain F84a, it was subjected to DNA-DNA hybridization analysis with its closely related species: *G. thermodenitrificans* and *G. subterraneus*. The DNA-DNA relatedness data were found to be 80.5 % and 28.4 % to the mentioned type strains, respectively. The *ad hoc* committee recommends a threshold value of 70 % DNA-DNA similarity for the definition of a novel bacterial species [36]. The DNA-DNA hybridization value between strain F84a and *G. thermodenitrificans* (80.5 %) could not differentiate F84a into a separate species of the genus *Geobacillus*. Thus, when the physiological, phylogenetical and chemotaxonomical data are considered, strain F84a was proposed to be a species of *Geobacillus thermodenitrificans*.

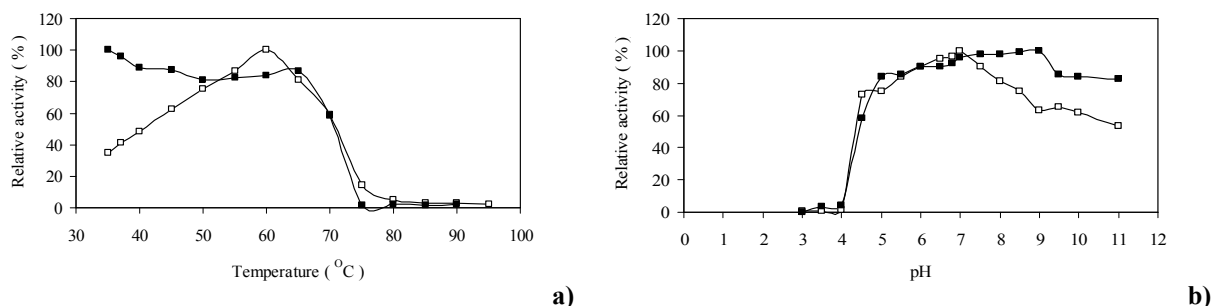
### 3.2 Purification results of F84a $\alpha$ -glucosidase

$\alpha$ -Glucosidase synthesis differs between thermophilic and endospore-forming species as either intracellular, extracellular or cell-bound. The extracellular  $\alpha$ -glucosidase activities of *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071 [14], *G. thermodenitrificans* HR010 [17], and *Geobacillus* sp. A333 [18] were detected outside of the cell after the late exponential growth phase as in the case of *G. thermodenitrificans* F84a.

*G. thermodenitrificans* F84a was able to produce 26.06 U/g  $\alpha$ -glucosidase extracellularly at the 12 h of cultivation. Thus, the cell-free supernatant of F84a was used as an extracellular enzyme source for further purification processes. After cation-exchange chromatography, fractions showing  $\alpha$ -glucosidase activity from 2 to 7 of peak I (major) and from 31-33 of peak IV (minor) were pooled for F84a anionic enzyme. Finally, the F84a  $\alpha$ -glucosidase was partially purified 5.22-fold with a specific activity of 0.99 U/mg and a yield of 37 %. The kinetic parameters of  $K_m$  and  $V_{max}$  values for *p*NPG were determined as 2.68 mM and 5.04 U/ml/min for F84a  $\alpha$ -glucosidase.

### 3.3 The effect of temperature and pH on $\alpha$ -glucosidase activity and stability

The  $\alpha$ -glucosidase of *G. thermodenitrificans* F84a was found to be active over a wide range of temperatures varying from 40 to 70 °C (Fig. 3a). The  $\alpha$ -glucosidase was also very stable on a similar temperature range of 35 and 70 °C. The enzyme showed maximum activity and stability at 60 °C, which is its optimal temperature for growth. When F84a  $\alpha$ -glucosidase was incubated at 60 °C for 10 min, 20 min and 5 h, its residual activity was measured as 100 %, 100 % and 68 %, respectively. The F84a enzyme also showed both activity and stability at a wide range of pH from 4.5 to 11.0, with an optimum pH of 7.0 (Fig. 3b). The  $\alpha$ -glucosidase was found to be 100 % stable at its optimum pH. In addition it retained 59 % and 83 % of its activity at pH 4.5 and 11.0 after 15 h incubation at 35 °C, respectively.



**Fig. 3** Effect of a) temperature and b) pH on activity and stability of F84a  $\alpha$ -glucosidase. Reaction was carried out at temperatures from 35 to 95 °C at pH 7.0 when assaying for temperature, whereas reaction was carried out at 60 °C at different pH ranges from 3 to 11 when testing for pH by using 2 mM pNPG (□, Activity; ■, Stability).

The  $\alpha$ -glucosidase of *G. stearothermophilus* ATCC 12016 had a high optimal temperature value (70 °C at pH 6.4) among *Geobacillus* species [16]. It was reported that ATCC 12016  $\alpha$ -glucosidase could only recover 7 % of its activity at its optimal temperature in 10 min. Investigations on *Geobacillus* HTA-462 [4] and *Geobacillus* sp. A333 [18]  $\alpha$ -glucosidases revealed that these enzymes were active at temperatures ranging from 40-80 °C (optimum 60 °C) and 40-70 °C (optimum 60 °C), and at pH values between 5.5-9.5 (optimum pH 9.0) and 4.5-10.0 (optimum pH 6.8). The residual activity of A333  $\alpha$ -glucosidase was measured as 52 % at pH 10.0, whereas F84a enzyme was found to be 83 % stable at pH 11.0 after 15 h incubation at 35 °C. While *Geobacillus* HTA-462  $\alpha$ -glucosidase was reported as the most active enzyme being active on alkaline pH, the half-life of these alkaliphilic  $\alpha$ -glucosidase was in a narrow pH range and determined between pH values from 8.0 to 10.0 [4]. Therefore, it can be concluded that strain F84a  $\alpha$ -glucosidase differed from the ATCC 12016 enzyme due to its high thermostability at its optimal temperature, from the HTA-462 enzyme due to its broad pH activity and stability values, and from the A333 enzyme due to its higher activity and stability values on these broad pH range.

### 3.4 The substrate specificity and mode of action of F84a $\alpha$ -glucosidase on various substrates

The substrate specificity of *G. thermodentirificans* F84a  $\alpha$ -glucosidase was determined to be maltose, dextrin, turanose, meltotetraose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose, phenyl- $\alpha$ -D-glycopyranoside, xylose, and soluble starch (Table 1). Enzyme hydrolyses  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,3 glycosidic linkages of the substrates releasing D-glucose monomers with more specificity to both substrates containing  $\alpha$ -1,4 glycosidic linkages and low molecular weight maltooligosaccharides. For the  $\alpha$ -glucans used, dextrin was preferred to soluble starch. Glucose liberation was not observed when the F84a  $\alpha$ -glucosidase was incubated with isomaltooligosaccharides. The continuous removal of glucose from the branched  $\alpha$ -glucans seemed to cease at the  $\alpha$ -1,6-branching points as the  $\alpha$ -1,6-bonds within isomaltoosaccharides and panose were hardly cleft by the  $\alpha$ -glucosidase. Furthermore, when the enzyme acted on maltooligosaccharides (10 mM) for 10 min, it yielded only three products on the chromatograms of the individual digests. One was glucose and the others were one glucose unit smaller and one glucose unit larger than the added maltooligosaccharide (shown in Fig. 4, hydrolysis of maltose, maltotriose and maltotetraose, Lane 2-6, Lane 7-11, and Lane 12-19, respectively).

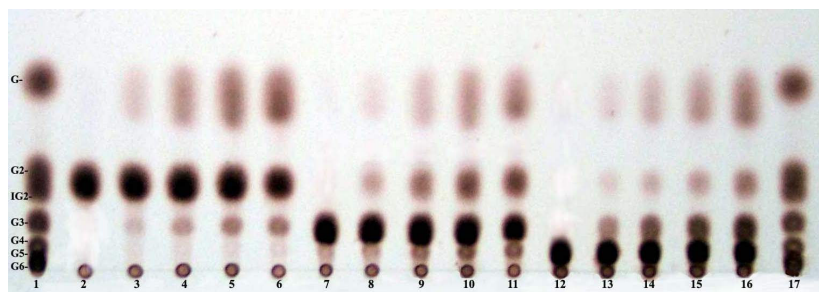
**Table 1** Substrate specificity of F84a  $\alpha$ -glucosidase.

Substrate	Glycosidic linkage of the substrate	Substrate concentration	Relative glucose formation (%)
Maltose <sup>a</sup>	Glu- $\alpha$ -1,4-Glu, n=2	10 mM	100
Dextrin <sup>c</sup>	(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	1%	63
Turanose <sup>c</sup>	Glu- $\alpha$ -1,3-Fruc	10 mM	63
Maltotetraose <sup>a</sup>	(Glu- $\alpha$ -1,4) <sub>3</sub> -Glu, n=4	10 mM	50
Maltotriose <sup>a</sup>	(Glu- $\alpha$ -1,4) <sub>3</sub> , n=3	10 mM	50
Maltopentaose <sup>a</sup>	(Glu- $\alpha$ -1,4) <sub>4</sub> -Glu, n=5	10 mM	38
Maltohexaose <sup>a</sup>	(Glu- $\alpha$ -1,4) <sub>6</sub> , n=6	10 mM	38
Phenyl- $\alpha$ -D-glucoside <sup>b</sup>	Glu- $\alpha$ -1-phenyl	10 mM	25
D-(+)-Xylose <sup>c</sup>		10 mM	25
Soluble starch <sup>c</sup>	(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	1%	25

These substrates were used for: <sup>a</sup> maltooligosaccharides (n=2-6), for non-reducing terminal  $\alpha$ -1,4 linkage hydrolysis; <sup>b</sup> glycosidic linkage hydrolysis; and <sup>c</sup> glucose formation.

Substrate specificity of the F84a  $\alpha$ -glucosidase closely resembled the *G. caldovelox* DSM 411  $\alpha$ -glucosidase, had activity on pNPG and maltose [13], the *G. stearothermophilus* ATCC 7953  $\alpha$ -glucosidase, displayed substrate

specificity on *p*NPG, maltose, maltooligosaccharides, nigerose, trehalose [10]), the *Geobacillus* HTA-462  $\alpha$ -glucosidase which showed activity on *p*NPG, maltose, maltooligosaccharides [4], and the *Geobacillus* sp. A333  $\alpha$ -glucosidase, had substrate specificity on *p*NPG, maltooligosaccharides, dextrin and phenyl- $\alpha$ -D-glucoside [18]. The F84a enzyme was much more specific for low molecular mass maltooligosaccharides than polysaccharides. In addition,  $\alpha$ -1,6 bonds in dextrin and soluble starch were not attacked. Therefore, depending on the similarities in substrate specificities with these mentioned enzymes, strain F84a  $\alpha$ -glucosidase could be classified into  $\alpha$ -glucosidases hydrolyzing only  $\alpha$ -1,4 linkages of maltooligosaccharides.



**Fig. 4** Time-course of F84a  $\alpha$ -glucosidase on maltooligosaccharide substrates showing glucose formation and transglycosylation activity during 2 h reaction (Lane 1 and 17: Standard sugar mixture (0.1 %), (G, glucose; G2, maltose; IG2, isomaltose; G3, maltotriose; G4, maltotetraose; G5, maltopentaose; G6, maltohexoase); Enzyme digests at the time of 0, 10, 30, 60 and 120 min on Lane 2-6: with maltose substrate; Lane 7-11: with maltotriose substrate; Lane 12-16: with maltotetraose substrate).

### 3.5 Exo-type hydrolysis

The enzymatic hydrolysis of the F84a  $\alpha$ -glucosidase on maltooligosaccharides ( $n=2-6$ ) was followed by TLC for 2h (Fig. 4). During the hydrolysis of maltooligosaccharides, while glucose concentrations increased continuously, substrate levels decreased. The F84a  $\alpha$ -glucosidase hydrolysed all of these substrates to glucose and one glucose unit smaller than the added substrate except maltose. In addition, the F84a  $\alpha$ -glucosidase was found to be capable of removing glucose molecules from a nitro phenyl derivate: phenyl- $\alpha$ -D-glycopyranoside by acting non-reducing ends of this substrate as observed in TLC (data not shown). These findings revealed that the F84a enzyme preferentially cleaved at the  $\alpha$ -1,4-linkages adjacent to non-reducing ends by degrading single glucose units, thus the action pattern of enzyme on substrates was the exo-type. This is a generally accepted catalysis feature of  $\alpha$ -glucosidases [37].

### 3.6 Transglycosylation activity

In addition to the hydrolysis activity of F84a  $\alpha$ -glucosidase, it also catalyzed a strong transglycosylation reaction when maltooligosaccharides were used as glucosyl acceptors. TLC analysis showed that the major product of transglycosylation activity was one glucose unit bigger than the added substrate. In the case of maltotriose, the substrate was first hydrolysed to maltose and then to the main hydrolysis product; glucose occurred, but the F84a  $\alpha$ -glucosidase did not convert all of the maltotriose to glucose in a hydrolysis reaction in order to produce its transglycosylation product; maltotetraose. Thus, enzyme could achieve the increase in the level of transglycosylation product by using some of this substrate for transglycosylation activity (Fig. 4, Lane 7-11).

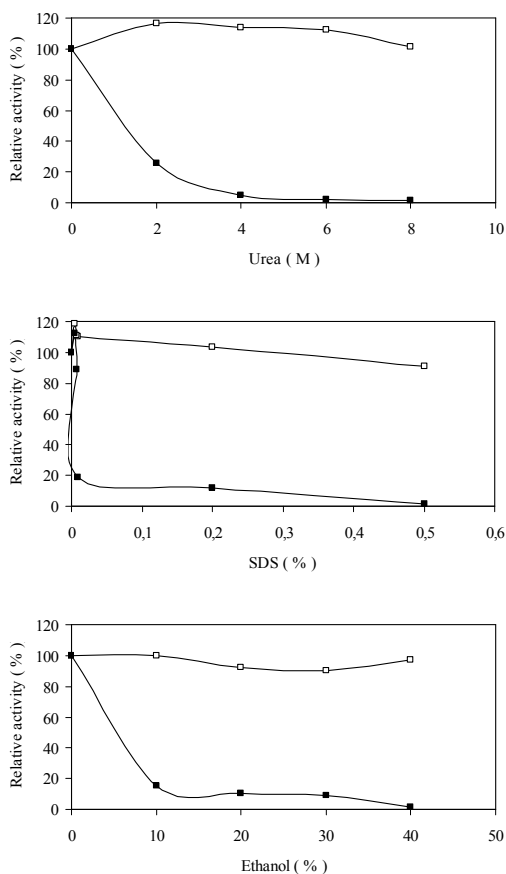
Interest in applications for the biosynthesis of bioactive compounds using the transglycosylation activity is growing because of the specificity, efficiency and safety of the enzymatic reactions. The transglycosylation activity of  $\alpha$ -glucosidases differ as in the case of substrates specificities [38]. Among the  $\alpha$ -glucosidases of thermophilic and endospore-forming bacteria, only some were stated as  $\alpha$ -glucosidases catalyzing transglycosylation reactions.  $\alpha$ -glucosidases owing high transglycosylation activities were reported as *Bacillus* sp. SAM1606 [15], *Geobacillus* sp. HTA-462 [4], and *Geobacillus* sp. A333 [18].

A study by Hung and colleagues reported that ATCC 12016  $\alpha$ -glucosidase converted all maltose (10 mM) to glucose, but in the case of the HTA-462 enzyme, the amount of transglycosylation products was high in the presence of non-sugar acceptors. Also, it was detected that the *Geobacillus* HTA-462 enzyme was able to convert maltose and maltotriose to isomaltose and an increase in the amount of transglycosylation product could be achieved by using only half of its substrate in hydrolysis reaction [4]. Besides these studies, *Geobacillus* sp. A333  $\alpha$ -glucosidase was reported as an enzyme having high transglycosylation activity on maltooligosaccharide substrates [18]. In accordance with the HTA-462  $\alpha$ -glucosidase, A333 enzyme was found to be successful in transglycoylation activity by using only some of its substrate in hydrolysis reaction.

The substrates specificities in transglycosylation reactions differentiated the F84a enzyme from ATCC 12016 and HTA-462  $\alpha$ -glucosidases, but the F84a  $\alpha$ -glucosidase seemed to be similar to the A333 enzyme in terms of transglycosylation catalysis.

### 3.7 Effect of some denaturants and inhibitors on the F84a $\alpha$ -glucosidase activity and stability

The effect of urea, SDS and ethanol on the stability of F84a  $\alpha$ -glucosidase at 25 °C and 60 °C are shown in Fig. 5. The F84a  $\alpha$ -glucosidase was very stable even after 5 h at 25 °C in 8 M urea, in 0.5 % SDS, and in 40 % ethanol with relative activities of 100 %, 91 %, and 98 %, respectively. When the temperature was increased to 60 °C after 5 h incubation, the activities were found to be 26 %, 89 %, and 16 % in the presence of 2 M urea, 0.008 % SDS and 10 % ethanol.



**Fig. 5** Effect of urea, SDS and ethanol on F84a  $\alpha$ -glucosidase stability at (□) 25 and (■) 60 °C.

**Table 2** Effect of inhibitors and metal ions on F84a  $\alpha$ -glucosidase.

Additives		Inhibition
Name	Concentration	rates (%)
Glucono- $\gamma$ -lactone	10 mM	46
L-Glutathione reduced	10 mM	17
Tris	5 mM	78
D-Histidin	5 mM	16
D-Glucose	10 mM	40
<i>p</i> -CMB	50 $\mu$ M	81
EDTA	2 mM	0
CuCl <sub>2</sub>	2 mM	6
HgSO <sub>4</sub>	2 mM	99
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	0
FeSO <sub>4</sub>	2 mM	10
MgSO <sub>4</sub>	2 mM	0
BaCl <sub>2</sub>	2 mM	0
ZnSO <sub>4</sub>	2 mM	0
MnSO <sub>4</sub>	2 mM	0

The effect of inhibitors and metal ions on F84a  $\alpha$ -glucosidase is presented in Table 2. Inhibition rate of *p*-CMB for F84a enzyme was found to be 81 %. In previous studies with thermostable glucosidases, it was proposed that enzymes having a site (or sites) specific for *p*-CMB apart from an active center, could bind mercury and altered both the entire molecular conformation and the structure of their active sites [38]. It is likely that the inhibition of the F84a enzyme by *p*-CMB may be achieved by acting on a sulphhydryl group which would play a role in the active site of the enzyme.

Hg<sup>+2</sup> was found to be the strongest inhibitor for F84a  $\alpha$ -glucosidase with a 99 % inhibition rate. None of the other metal ions used either inhibited or increased the activity of the F84a enzyme. A lack of increase in the activity values when the enzyme was treated with metal ions demonstrated that the F84a  $\alpha$ -glucosidase did not required these ions for its catalytic activity.

There was not a significant loss of enzyme activity in F84a,  $\alpha$ -glucosidases after incubation with chelator agent EDTA. This suggests that F84a  $\alpha$ -glucosidase was not a metalloprotein. Tris, glucono- $\gamma$ -lactone, glutathione-reduced, histidine and glucose were determined to be substrate-analogue inhibitors for some of the studied  $\alpha$ -glucosidases and these inhibitors compete with substrate for the active center of the enzyme [7]. Of these substrate-analogues mostly Tris affected the enzyme activity with an inhibition rate of 78 %.

In conclusion, the characteristics of F84a  $\alpha$ -glucosidases make it a good candidate for further enzyme engineering studies and industrial applications. Typical transglycosylation reactions have biotechnological importance for synthesizing new oligosaccharide compounds, and are required parameters in  $\alpha$ -glucosidases showing strong transglycosylation activity [39]. These findings revealed that, the F84a enzyme  $\alpha$ -glucosidase, which could show activity and stability at high temperatures and in a broad pH range, has a great potential in biotechnological processes

due to its high transglycosylation activity. It should be useful in enzymatic synthesis of novel tri- and oligosaccharides with its high conformational stability and its transglycosylation activity.

**Acknowledgements** The support by The Fundamental Research Group of The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (project numbers of TBAG-HD-320 (107T286) and TBAG-HD126 (105T039) is gratefully acknowledged.

## References

- [1] Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol*. 2001;5:144-151.
- [2] Zeikus JG, Vieille C, Savchenko A. Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles*. 1998;2:179-183.
- [3] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technol*. 2003;89:17-34.
- [4] Hung VS, Hatada Y, Goda S, Lu J, Hidaka Y, Li Z, Akita M, Ohta Y, Watanabe K, Matsui H, Ito S, Horikoshi K.  $\alpha$ -Glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68:757-765.
- [5] Arellano-Carbajal F, Olmos-Soto J. Thermostable  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. isolated from marine environment. *World J Microb Biot*. 2002;18:791-795.
- [6] Nashiru O, Koh S, Lee S, Lee D. Novel  $\alpha$ -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *J. Biochem and Mol Biol*. 2001;34:347-354.
- [7] Kelly CT, Fogarty WM. Microbial  $\alpha$ -glucosidases. *Process Biochem*. 1983;18:6-12.
- [8] Maarel van der MJEC, Veen van der B, Uitdehaag JCM, Leenhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *JBiotechnol*. 2002;94:137-155.
- [9] Kelly CT, Giblin M, Fogarty WM. Resolution, purification, and characterization of two extracellular glucohydrolases,  $\alpha$ -glucosidase and maltase of *Bacillus licheniformis*. *Can J Microbiol*. 1986;32:342-347.
- [10] Albert H, Davies DJG, Woodson LP, Soper CJ. Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *J Appl Microbiol*. 1998;85:865-874.
- [11] Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*. 1991;13:202-206.
- [12] Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:433-446.
- [13] Giblin M, Kelly CT, Fogarty WM. Thermostable- $\alpha$ -glucosidase produced by *Bacillus caldovelox* DSM 411. *Can J Microbiol*. 1987;33:614-618.
- [14] Suzuki Y, Yonezawa K, Hattori M, Takii Y. Assignment of *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071  $\alpha$ -glucosidase I to an exo- $\alpha$ -1,4-glucosidase, and its striking similarity to bacillary oligo-1,6-glucosidases in N-terminal sequence and in structural parameters calculated from the amino acid composition. *Eur J Biochem*. 1992;205:249-256.
- [15] Nakao M, Nakayama T, Harada M, Kakudo A, Ikemoto H, Kobayashi S, Shibano Y. Purification and characterization of thermostable alpha-glucosidase with transglucosylation activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;41:337-343.
- [16] Takii Y, Takahashi K, Yamamoto K, Suzuki Y. *Bacillus stearothermophilus* ATCC12016  $\alpha$ -glucosidase specific for  $\alpha$ -1,4 bonds of maltosaccharides and  $\alpha$ -glucans shows high amino acid sequence similarities to seven  $\alpha$ -D-glucohydrolases with different substrate specificity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;44:629-634.
- [17] Ezeji TC, Wolf A, Bahl H. Isolation and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10, an  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase producing thermophile. *Can J Microbiol*. 2005;51:685-693.
- [18] Cihan AC, Cokmus C, Ozcan B. Characterization of thermostable  $\alpha$ -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25:2205-2217.
- [19] Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akkoc N, Akcelik M. Isolations of  $\alpha$ -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*. 2009;78:56-66.
- [20] Suzuki Y, Kishigami T, Abe S. Production of extracellular  $\alpha$ -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*. 1976;31:807-812.
- [21] Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy. Volume 1. Edward Arlond Lt., London. 1981;522.
- [22] Claus D, Berkeley CW. The genus *Bacillus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2. Sneath pH A (Ed.) Williams, Wilkins, Baltimore, 1986;1105-1139.
- [23] Anderson DG, McKay LL. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol*. 1983;46:549-552.
- [24] Kuisiense N, Jomantiene R, Valiunas D, Chitavichius D. Characterization of thermophilic proteolytic spore-forming bacteria from a geothermal site in Lithuania based on 16S rRNA RFLP and ITS-PCR analyses. *Microbiology*. 2002;71:712-716.
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4:406-425.

- [26] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24:1596-1599.
- [27] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111-120.
- [28] Kuykendall LD, Roy MA, O'Neill JJ, Devine TE. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradorhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol.* 1988;38:358-361.
- [29] Miller LT. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J Clin Microbiol.* 1982;16:584-586.
- [30] Tindall BJ. A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol.* 1990;13:128-130.
- [31] Cashion P, Hodler-Franklin MA, McCully J, Franklin M. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem.* 1977;81:461-466.
- [32] Mesbah M, Premachandran U, Whitman W. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;39:159-167.
- [33] De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem.* 1970;12:133-142.
- [34] Huss VAR, Festl H, Schleifer KH. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol.* 1983;4:184-192.
- [35] Manachini PL, Mora D, Nicasastro G, Parini C, Stackebrandt E, Pukall R, Fortina MG. *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:1331-1337.
- [36] Stackebrandt E, Fredericksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1034-1047.
- [37] Chiba S, Kimura A, Matsui H. Quantitative study of anomeric forms of glucose produced by  $\alpha$ -glucosidases and glucoamylases. *Agric Biol Chem.* 1983;47:1741-1746.
- [38] Suzuki Y, Tomura Y. Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase. *Eur J Biochem.* 1986;158:77-83.
- [39] Hough WD, Danson MJ. Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol.* 1999;3:39-46.

## Full Paper

# ***Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov., a thermophilic and $\alpha$ -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey**

Arzu Coleri Cihan,<sup>1,\*</sup> Birgul Ozcan,<sup>2</sup> Nilgun Tekin,<sup>3</sup> and Cumhuri Cokmus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biology Department, Faculty of Science, Ankara University, 06100, Tandogan, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Biology Department, Faculty of Sciences and Letters, Mustafa Kemal University, 31040, Hatay, Turkey

<sup>3</sup> Biotechnology Institute, Ankara University, 06500, Besevler, Ankara, Turkey

(Received July 5, 2010; Accepted January 4, 2011)

An  $\alpha$ -glucosidase producing, thermophilic, facultatively anaerobic, and endospore-forming, motile, rod-shaped bacterial strain F84b<sup>T</sup> was isolated from a high temperature well-pipeline sediment sample in Kizilcahamam, Turkey. The growth occurred at temperatures, pH and salinities ranging from 45 to 69°C (optimum 60°C), 7.0 to 8.5 (optimum 8.0) and 0 to 5% (w/v) (optimum 3.5%), respectively. Strain F84b<sup>T</sup> was able to grow on a wide range of carbon sources. Starch and tyrosine utilization, amylase, catalase and oxidase activities, nitrate reduction, and gas production from nitrate were all positive. The G+C content of the genomic DNA was 49.6 mol%. The menaquinone content was MK-7. The dominant cellular fatty acids were iso-C17:0, iso-C15:0, and C16:0. In phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, strain F84b<sup>T</sup> showed high sequence similarity to *Geobacillus thermodenitrificans* (99.8%) and to *Geobacillus subterraneus* (99.3%) with DNA hybridization values of 74.3% and 29.1%, respectively. In addition, the Rep-PCR and the intergenic 16S–23S rRNA gene fingerprinting profiles differentiated strain F84b<sup>T</sup> from the *Geobacillus* species studied. The results obtained from the physiological and biochemical characters, the menaquinone contents, the borderline DNA–DNA hybridization homology, and the genomic fingerprinting patterns had allowed phenotypic, chemotaxonomic and genotypic differentiation of strain F84b<sup>T</sup> from *G. thermodenitrificans*. Therefore, strain F84b<sup>T</sup> is assigned to be a new subspecies of *G. thermodenitrificans*, for which the name *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov. is proposed (The type strain F84b<sup>T</sup> = DSM 22629<sup>T</sup> = NCIMB 14582<sup>T</sup>).

**Key Words**—DNA–DNA hybridization; genomic fingerprinting; *Geobacillus*; lipid; 16S rRNA gene; taxonomy; thermostable  $\alpha$ -glucosidase

## Introduction

The genus *Geobacillus* was first described by Nazina et al. (2001) with the type species of *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup>. The genus falls into the thermophilic bacilli genetic group 5 according to their 16S rRNA gene sequences and contains thermophilic, endospore-forming, aerobic members (Ash et al., 1991; Nazina et al., 2001). The members of the genus *Geoba-*

\* Address reprint requests to: Dr. Arzu Coleri Cihan, Biology Department, Faculty of Science, Ankara University, 06100, Tandogan, Ankara, Turkey.

Tel: +90 312 2126720/1095 Fax: +90 312 2232395

E-mail: arzucoleri@gmail.com

The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequence of strain F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 are EU477773.2, EU477772 and EU326497, respectively.



*cillus* can exhibit growth at temperatures ranging from 35 to 78°C, and are widespread in various geographical locations. They have been defined as a phylogenetically coherent group of thermophilic bacilli displaying very high intrageneric similarity among their 16S rRNA gene sequences (96.5–99.2%) (Nazina et al., 2001, 2004). Since then, new representatives of the genus *Geobacillus* have been described and now the genus comprises seventeen validly published species. Examples include *Geobacillus kaustophilus* (Nazina et al. 2001; Priest et al. 1988), *Geobacillus subterraneus* (Nazina et al., 2001), *Geobacillus thermocatenulatus* (Golovacheva et al., 1975; Nazina et al., 2001), *Geobacillus thermoglucosidasius* (Nazina et al., 2001; Suzuki et al., 1983), *Geobacillus thermoleovorans* (Nazina et al., 2001; Zarilla and Perry, 1987), *Geobacillus thermodenitrificans* (Manachini et al., 2000; Nazina et al., 2001), and *Geobacillus uzenensis* (Nazina et al., 2001).

Isolation of novel thermophilic bacilli has received considerable attention and the interest in thermozymes is of importance for industrial applications (Zeikus et al., 1998). Turkey is rich in geothermal sources which vary in typical temperatures and pH values in a range from 25 to 100°C and 4.0 to 11.0. During our previous search, we isolated and screened thermophilic bacilli which were able to produce industrially important  $\alpha$ -amylases and  $\alpha$ -glucosidases from different geothermal regions of Turkey (Coleri et al., 2009). Such a thermophilic bacterium was isolated from a sediment sample of a high-temperature well-pipeline in the Middle Anatolian Region of Turkey. This strain, called F84b<sup>T</sup>, was found to be unique in its ability to produce the highest amount of thermostable  $\alpha$ -glucosidase per cell yield (77.18 U/g) after 15 h of growth at 60°C, when compared with other amylolytic and thermophilic isolates and  $\alpha$ -glucosidase producing reference strains. The strain was capable of producing significant levels of  $\alpha$ -glucosidase extracellularly, which might promise biotechnological importance. The current paper describes the taxonomy of this  $\alpha$ -glucosidase-producing strain F84b<sup>T</sup> with details of phenotypic, chemotaxonomic, and genetic characteristics. On the basis of the presented data, it is proposed that F84b<sup>T</sup> should be classified as a novel subspecies, *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov. (type strain = DSM 22629<sup>T</sup> = NCIMB 14582<sup>T</sup>).

## Materials and Methods

**Isolation and growth conditions.** Strains F84b<sup>T</sup> and F84a were obtained from sediment samples of a high-temperature well-pipeline in Kizilcahamam Province of Ankara. The water temperature and pH of this geothermal region were measured as 98°C and 7.0–7.5, respectively. Strain A333 was isolated from a soil sample of a high-temperature well-pipeline in Germencik Province of Aydin. Both of these mentioned high-temperature well-pipelines exist in the Middle Anatolian Region of Turkey. The samples (0.1 g) were incubated at 60°C with 250 rpm shaking for 24 h in 5 ml of the *G. thermoglucosidasius* medium (MI) containing 1% soluble starch (pH 7.0) to obtain the enrichment culture (Suzuki et al., 1976). The turbid enrichments were streaked on plates of MI containing 3% agar and incubated aerobically at 60°C for 24 h. Cultures were purified from the same medium by subculturing four times and the purity was confirmed microscopically. The first pure cultures of strains F84b<sup>T</sup> and F84a were obtained on 8 September 2004, whereas strain A333 was isolated on 15 July 2004. Strains F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 were deposited in two culture collections with the deposition numbers of DSM 22629<sup>T</sup> = NCIMB 14582<sup>T</sup>, DSM 22628 = NCIMB 14581, and DSM 22625 = NCIMB 14578, respectively.

The following *Geobacillus* strains were used for references: *G. stearothermophilus* ATCC 12980<sup>T</sup>, *G. subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup>, *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *G. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>, and *Geobacillus toebii* E134 DSM 22627.

**Morphological and physiological characterizations.** Cytology and colony morphology analyses were carried out using exponentially grown cultures on Nutrient Agar plates (containing 3% agar). The formation of spores was tested by using Nutrient Broth cultures of 18–24 h supplemented with 5 mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O and observed using phase-contrast microscopy. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis used Nutrient Broth culture of F84b<sup>T</sup> cells, grown at 60°C under shaking at 250 rpm for 18 h. The sample was prepared for electron microscopy using the procedure described by Hayat (1981), and examined in the Jeol JSM 6060 LV Scanning Electron Microscope. The temperature range was determined by incubating the strains in Nutrient Broth at temperatures from 30 to 80°C. The pH dependence of growth was tested in Nutrient Broth which was adjusted with either NaOH or HCl to various

pH values from 4.0 to 11.0. The effect of salinity was also checked in Nutrient Broth supplemented with 0 to 5% (w/v) concentrations of NaCl. The optimal growth at different temperatures, pH values and salinities were determined spectrophotometrically by measuring the optic density of the turbid cultures at 600 nm. Physiological characterization tests included: Gram staining, anaerobic growth, oxidase, catalase and amylase activity, casein, citrate, starch, tyrosine, gelatine and urea utilization, reduction of nitrate to nitrite, N<sub>2</sub> gas production from nitrate, acid production from sugars, methyl red test, Voges-Proskauer test, indole and H<sub>2</sub>S production, susceptibility to lysozyme. These tests were carried out by the methods of Claus and Berkeley (1986). Test results were observed at days 1, 2 and 7. A disk diffusion test was performed by using Nutrient Agar plates for antimicrobial susceptibility testing. Plasmid DNA isolation was carried out by the procedure of Anderson and McKay (1983). All assays were performed with pure culture in triplicates.

**Enzyme assays.** Strain F84b<sup>T</sup> was cultivated for 12 h in 1 L enzyme production medium MII (2% soluble starch from potato, 2% peptone, 0.2% yeast extract, 0.5% meat extract, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) at 60°C, pH 8.0 under shaking at 250 rpm (Suzuki et al., 1976). Cell-free supernatant of F84b<sup>T</sup> was separated from the medium by centrifugation. The centrifuged supernatant was fractionated with 40–65% ammonium sulfate and dialyzed overnight and the 310 ml dialyzate was concentrated 20-fold by centrifugation in a speed vacuum concentrator. Then it was applied to a cation-exchange chromatography column as described previously (Cihan et al., 2009). Protein concentration was determined by using Bradford reagent, and as the protein standard 0.1 to 10 mg/ml concentrations of BSA were used (Cihan et al., 2009). When determining the molecular weight of the enzyme, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to the procedure of Laemmli (1970).

The  $\alpha$ -glucosidase activity was determined spectrophotometrically by measuring the hydrolysis of pNPG (*para*-nitrophenol  $\alpha$ -D-glucopyranoside, Sigma N1377) as described previously (Coleri et al., 2009). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme needed for hydrolysis of 1  $\mu$ mol pNPG per minute at 60°C, pH 6.8. The millimolar extinction coefficient of pNP (*para*-nitrophenol) at 400 nm, pH 6.8 and 60°C was measured as 19.1 mm<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> and used to calcu-

late the product yield.

The effect of temperature on enzyme activity was determined between 35 to 95°C with 5°C intervals. The effect of pH on the enzyme activity was determined using 0.02 M sodium-citrate (pH 3.0–6.5), 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0–8.5), 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate (pH 9.0–9.5) and Ringer (pH 10.0–11.0) buffers at 60°C, all instead of potassium phosphate buffer (pH 6.8) in the standard assay mixture.

**16S rRNA gene amplification and sequence analyses.** The cultures growing on Nutrient Agar for 18 h at 60°C were used for genomic DNA extraction (Genomic DNA purification kit, Fermentas). The gene encoding 16S rRNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with the bacterial 16S-specific 27F forward primer and the 1492R reverse primer (Kuisiene et al., 2002). The sequence of the PCR-amplified 16S rRNA gene was determined by using an ABI 3100 gene sequencer with a Bigdye cycle sequencing kit. In the phylogenetic analysis, homology search was carried out using the basic BLASTN search program at the NCBI Web-site. A neighbor-joining phylogenetic tree (Saitou and Nei, 1987) was constructed with the MEGA package version 4 (Tamura et al., 2007) according to the Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980).

**Fatty acids and respiratory lipoquinone analyses.** Fatty acids and respiratory lipoquinone analyses were performed by Dr. Brian Tindall (DSMZ Identification Service, Braunschweig, Germany) using minor modifications of the extraction method of Kuykendall et al. (1988), Miller (1982) and Tindall et al. (1990a, b). Fatty acids were further determined using Gas Chromatography (GC), and quinones were analyzed by HPLC.

**PCR-based fingerprinting analyses of REP elements and intergenic 16S–23S rRNA gene.** Rep-PCR genomic fingerprintings were performed with the (GTG)<sub>5</sub> and BOXA1R primers using the PCR conditions that were described by Versalovic et al. (1994). Primer sets S-D-Bact-1494-a-S-20 and L-D-Bact-0035-a-A-15 were used for the amplification of intergenic transcribed spacers (ITS) between 16S and 23S rRNA genes and PCR conditions were adjusted according to Daffonchio et al. (2003). The PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, using 1 × TBE buffer at 120 V for 4 h. The resulting Rep-PCR fingerprintings were analyzed by the Bionumerics version 6.1 software packages (Applied Maths, Belgium). The DNA fragments that ranged from 320 to 5,300 bp, and 320 to 6,100 bp generated with BOXA1 and (GTG)<sub>5</sub>-PCR

fingerprintings were included in the statistical analysis. Similarities of the digitized profiles were calculated using Pearson correlation and an average linkage (UP-GMA) dendrogram was obtained.

**DNA base composition and DNA-DNA hybridization studies.** DNA base composition and DNA-DNA hybridization analyses were carried out by the DSMZ Identification Service. DNA was extracted using the French press technique, and purified by the method of Cashion et al. (1977). In determining G+C base composition of the genomic DNA, the DNA was hydrolyzed with P1 nuclease and the nucleotides were dephosphorylated with bovine alkaline phosphatase (Mesbah et al., 1989). The resulting deoxyribonucleotides were analyzed using HPLC. The G+C content of the genomic DNA was calculated according to the method of Mesbah et al. (1989). Spectroscopic DNA-DNA hybridization was carried out at 67°C in 2× SSC as described by De Ley et al. (1970) with the modifications described by Huss et al. (1983).

## Results and Discussion

### Phenotypic characteristics of the strain

The morphological and physiological characteristics of strains F84b<sup>T</sup> are given in the subspecies description. The cells of F84b<sup>T</sup> are 0.6–0.9 μm wide and 1.6–2.9 μm long. The cell surface was observed to be smooth in SEM images. The phase-contrast and SEM micrographs of the isolate are shown in Fig. 1a and 1b, respectively. Microscopy observations revealed

that the cells of strains F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 were Gram-positive, motile and straight rods.

Strain F84b<sup>T</sup> differed from closely related species *G. thermodenitrificans*, *G. subterraneus*, and *G. stearothermophilus* in some phenotypic characteristics such as cell size, spore shape, temperature, pH and NaCl requirements, casein, tyrosine, and gelatin utilization, reduction of nitrate to nitrite, gas production from nitrate, methyl red test, acid production from lactose, xylose, arabinose, raffinose, galactose and mannitol (Table 1). Beside these phenotypic differences, while strain A333 and *G. thermodenitrificans* were found to be susceptible to all of the antibiotics tested, a kanamycin resistance was observed in strains F84b<sup>T</sup> and F84a. Furthermore, both strain F84b<sup>T</sup> and F84a had plasmid DNA contents of 15.6 and 12.0 kb, but strain A333 differed from these strains by containing the plasmid bands of 19.0 and 17.7 kb.

### α-Glucosidase activity

Strain F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 could produce starch-degrading enzymes with strong amylolytic and glycosidic activity, and α-glucosidase of strain A333 was characterized previously (Cihan et al., 2009). The α-glucosidase of strain A333 was found to be 45 kDa, having optimum activity at 60°C, and pH 6.8 in 16 h of cultivation. In the current study, fractions showing α-glucosidase activity from 2 to 7 of peak I was pooled for F84b<sup>T</sup> anionic enzyme after cation-exchange chromatography. Strain F84b<sup>T</sup> produced a significant amount of extracellular α-glucosidase with a specific

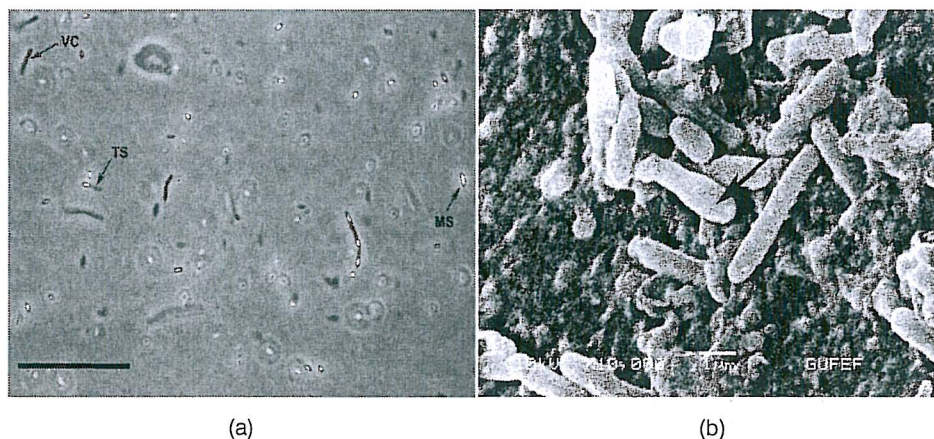


Fig. 1. (a) Phase-contrast (VC, vegetative cell; MS, mature spore; TS, terminal sporulation; bar, 10 μm), and (b) Scanning electron micrographs of strain F84b<sup>T</sup> after 18 h of cultivation at 60°C in Nutrient Broth medium.

Table 1. Differentiating characteristics of strain F84b<sup>T</sup> and the most phylogenetically related strains of *Geobacillus* species.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Cell width (µm)	0.6–0.9	0.7–0.9	0.6–0.8	0.5–1.0	0.8–1.2	0.6–1.0
Cell length (µm)	1.6–2.9	1.2–2.2	1.2–1.7	1.5–2.5	4.6–6.6	2.0–3.5
Spore shape	E	E	E	O	E	E
Growth conditions						
Temperature (°C)	45–69 (60)	45–69 (60)	45–69 (60)	45–70 (60)	45–65 (55)	37–65 (55)
pH	7.0–8.5 (8.0)	7.0–8.5 (8.0)	6.5–8.5 (7.5)	6.0–8.0 (7.7)	6.2–7.6 (7.0)	6.0–8.0 (7.0)
NaCl (%), (w/v)	0–5.0 (3.5)	0–4.5 (3.0)	0–4.5 (3.0)	0–3.0 (2.0)	0–3.0 (2.0)	0–5.0 (3.0)
Casein utilization	–	–	–	–	–	+
Tyrosine utilization	+	–	+	–	–	–
Gelatin utilization	–	–	–	–	–	+
Reduction of nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	–
Gas from nitrate	+	–	–	+	–	–
Methyl red	–	–	–	–	+	+
Acid production from						
Lactose	–	–	–	+	–	–
D-(+)-Xylose	+	+	+	+	–	–
L-Arabinose	+	+	–	–	–	–
Raffinose	+	+	+	+	–	+
D-(+)-Galactose	+	+	+	+	+	–
D-(–)-Mannitol	+	+	+	+	–	–
Protease production	–	–	–	+	–	+
α-Glucosidase production	+	+	+	+	–	+

1, strain F84b<sup>T</sup>; 2, strain F84a; 3, strain A333; 4, *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>; 5, *G. subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup>; 6, *G. stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup>. Abbreviations: +, positive reaction; –, negative reaction, W+, weakly positive reaction; E, ellipsoidal; O, oval. The tests for the reference strains were also done in the present study.

activity (3.01 U/mg with pNPG substrate) higher than the strain A333 in about 12 h of cultivation at 60°C. The molecular weight of the enzyme was estimated as 43 kDa. Maximum activity of the α-glucosidase was expressed between the late exponential and stationary phases. The enzyme showed maximum activity at 60°C, which is its optimal temperature for growth. The F84b<sup>T</sup> α-glucosidase also showed activity at a wide range of pH from 4.5 to 11.0, with an optimum pH value of 6.8.

#### Lipid and fatty acid composition

According to respiratory quinone analysis of strains F84b<sup>T</sup> and F84a, the isoprenoidquinone content was determined as MK-7 (100%). The predominant menaquinone content of strain A333 and *G. thermodenitrificans* were found to be MK-7 (98%) and MK-6 (2%). The dominant cellular fatty acids were iso-C17:0, iso-C15:0, C16:0, anteiso-C17:0, and iso-C16:0 in strains F84b<sup>T</sup>, F84a and A333. The iso-branched fatty acids (iso-C17:0, iso-C15:0 and iso-C16:0) were the major membranous lipids present with a percentage of 78 of

the total fatty acids, which was in the range described for genus *Geobacillus*. In fatty acid profiles, some slight differences were observed between strain F84b<sup>T</sup> and the other phylogenetically related *Geobacillus* species. This can be seen in Table 2.

#### Phylogenetic position

The 16S rRNA gene sequence determined for the type strain F84b<sup>T</sup> was 1,400 nucleotides long and the G+C content of 16S rRNA gene was found to be 59 mol%. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. It showed the position of strains F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 among the species of genus *Geobacillus* which fell into phylogenetic group 5 of endospore-forming bacteria (Fig. 2). As shown in Fig. 2, strains F84b<sup>T</sup>, F84a, A333 and *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup> were branched within the same cluster in the phylogenetic tree with a bootstrap value of 99% and the 16S rRNA gene sequence similarity values of 93.3% to 99.8% were obtained between strain F84b<sup>T</sup> and the other members of the genus *Geobacillus*. According to the 16S rRNA gene se-

Table 2. Differences in cellular fatty acid methyl esters of strain F84b<sup>T</sup> and the related *Geobacillus* species.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
C17:0 iso	<b>37.09</b>	<b>36.72</b>	<b>35.88</b>	<b>34.23</b>	<b>21.52</b>	<b>18.50</b>
C15:0 iso	<b>34.51</b>	<b>33.96</b>	<b>32.34</b>	<b>35.64</b>	<b>33.46</b>	<b>37.80</b>
C16:0	<b>8.21</b>	<b>8.60</b>	<b>9.12</b>	<b>6.77</b>	<b>17.35</b>	1.70
C17:0 anteiso	<b>7.74</b>	<b>8.26</b>	<b>8.34</b>	6.40	<b>12.65</b>	5.80
C16:0 iso	5.94	5.92	6.37	<b>8.07</b>	6.43	<b>29.20</b>
C15:0 anteiso	1.48	1.65	1.56	1.28	4.14	2.30
C15:0	1.20	1.17	1.16	1.79	—	1.40
C17:0	1.04	0.93	1.29	1.61	—	0.40
C19:0 iso	0.67	0.82	0.65	0.74	—	—
C18:0	0.62	0.70	0.83	0.55	—	—
C14:0	0.44	0.48	0.51	0.41	1.32	—
C18:0 iso	0.30	0.36	0.37	0.34	1.75	—
C14:0 iso	0.21	0.22	0.26	0.38	—	2.90
C17:1 ω5c iso	0.20	—	0.58	0.98	—	—
C19:0 anteiso	0.17	0.22	0.21	—	—	—
Others	0.18	0	0.53	0.81	1.38	0

Strains: 1, F84b<sup>T</sup>; 2, F84a; 3, A333 (from this study); 4, *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>; 5, *G. stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup> (Manachini et al., 2000); 6, *G. subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup> (Nazina et al., 2001). Values are percentages of total fatty acids. Major fatty acids are shown in bold.

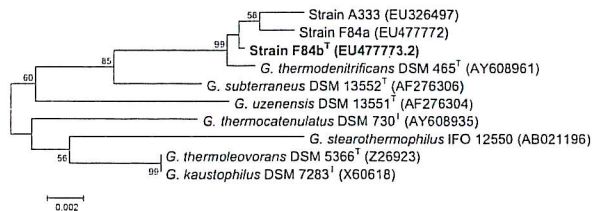


Fig. 2. Neighbor-joining evolutionary distance phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain F84b<sup>T</sup> and the representative members of genus *Geobacillus* of the family 'Bacillaceae.'

Bootstrap values (%) are based on 1,000 replicates and shown for branches with more than 50% bootstrap support. Bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position.

Table 3. DNA G+C content, 16S rRNA gene sequence similarity and DNA-DNA homology among the thermophilic isolates and the reference strains.

	G+C content (mol%)	F84b <sup>T</sup>			F84a			A333		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
F84b <sup>T</sup>	49.6	100								
F84a	49.0	100	<b>95</b>	3.7	100					
A333	45.1	99.9	<b>77.4</b>	4.1	99.9	<b>78.3</b>	3.5	100		
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup>	50.3 <sup>d</sup>	99.8	<b>74.3</b>	3.3	99.8	<b>80.5</b>	3.4	100	<b>100</b>	<b>3.9</b>
<i>G. subterraneus</i> DSM 13552 <sup>T</sup>	52.3 <sup>e</sup>	99.3	<b>29.1</b>	2.3	99.3	<b>28.4</b>	1.9	99.4	<b>29.5</b>	<b>6.7</b>

<sup>a</sup>, 16S rRNA gene sequence similarity (%); <sup>b</sup>, Reassociation (%) with DNA from; <sup>c</sup>, deviation (+/-) of DNA homology; G+C content data were taken from <sup>d</sup>, Manachini et al., 2000; and <sup>e</sup>, Nazina et al., 2001.

quence similarity, F84b<sup>T</sup> was found to be closely related to *G. thermodenitrificans* (99.8%), *G. subterraneus* (99.3%), *G. thermocatenulatus* (98.3%), *G. uzensis* (98.1%), *G. kaustophilus* (98.1%), *G. thermoleovorans* (98.0%), and *G. stearothermophilus* (98.0%). Furthermore, strain F84b<sup>T</sup> showed 100% and 99.9% 16S rRNA gene sequence similarity values with strains F84a and A333, as presented in Table 3.

#### The Rep-PCR and ITS fingerprintings

The Repetitive Extragenic Palindromic (REP) elements such as BOX and (GTG)<sub>5</sub> are known as evolutionary conserved sequences in prokaryotic genomes and can be used as oligonucleotide binding sites for PCR-mediated genomic fingerprinting (Rep-PCR). The Rep-PCR can be used to discriminate strains at the species and subspecies level (Versalovic et al., 1994). Rep-PCR has been used for the determination of the genetic diversity among the *Geobacillus* species (Meintanis et al., 2008). Beside these fingerprinting methods, the intergenic transcribed spacers (ITS) between the 16S and the 23S rRNA genetic loci are frequently used in PCR fingerprinting to discriminate at the species and intraspecies levels. The polymorphism in the ITS is due to the presence of tRNA genes that contain multiple ribosomal operons which differ in length and sequence (Daffonchio et al., 2003). This polymorphism was used for discriminating closely related *Geobacillus* species in previous studies of Daffonchio et al. (2003), Kuisiene et al. (2008) and Manachini et al. (2000).

Thus, strain F84a<sup>T</sup> and its phylogenetically related *Geobacillus* species were subjected to Rep-PCR and ITS fingerprinting analyses. The (GTG)<sub>5</sub> and BOX-PCR fingerprinting patterns and their cluster analyses derived from strain F84b<sup>T</sup> and its closely related *Geoba-*

*cillus* species are shown in Fig. 3a and 3b, respectively. The (GTG)<sub>5</sub> and BOX-PCR products generated a high number of bands giving discriminative information below species and subspecies level between these *Geobacillus* strains studied and as in the case of the phylogenetic tree obtained from the 16S rRNA gene, strain F84b<sup>T</sup>, F84a, A333 and *G. thermodenitrificans* were branched within the same cluster on the dendrogram generated by the Rep-PCR patterns. Beside these results, the Rep-PCR fingerprinting patterns of F84b<sup>T</sup> were the same as for strain F84a, whereas the banding patterns of strain A333 were very similar to those of *G. thermodenitrificans*. Therefore, the distinctive Rep-PCR bands were able to differentiate these strains genetically, and the *thermodenitrificans* cluster diverged into two groups, one of which was formed from strains F84b<sup>T</sup> and F84a. The other group consisted of strain A333 and *G. thermodenitrificans*.

Not only the rep-PCR, but also the ITS fingerprinting patterns of these strains confirmed the genotypic di-

versity between these strains which is presented in Fig. 4. As in the case of rep-PCR analyses, while the ITS banding patterns of strain F84b<sup>T</sup> and F84a (Fig. 4, Lanes 4 and 5) showed similar patterns, the fingerprinting profiles of strain A333 and *G. thermodenitrificans* (Fig. 4, Lanes 3 and 6) resembled each other. Both of these results derived from the Rep-PCR and ITS fingerprintings clearly showed the genetic divergence between strain F84b<sup>T</sup> and *G. thermodenitrificans*, and thus on the basis of these fingerprint methods, it can be concluded that type strain F84b<sup>T</sup> and strain F84a were genetically a distinct group, may not be assigned to the species *G. thermodenitrificans* and represent novel subspecies of *G. thermodenitrificans*, while strain A333 may belong to this species.

#### The G+C content and DNA-DNA hybridizations

The G+C content of the genomic DNA of strain F84b<sup>T</sup>, F84a and A333 were 49.6, 49.0 and 45.1 mol%, which are in the range of *Geobacillus* species (Table

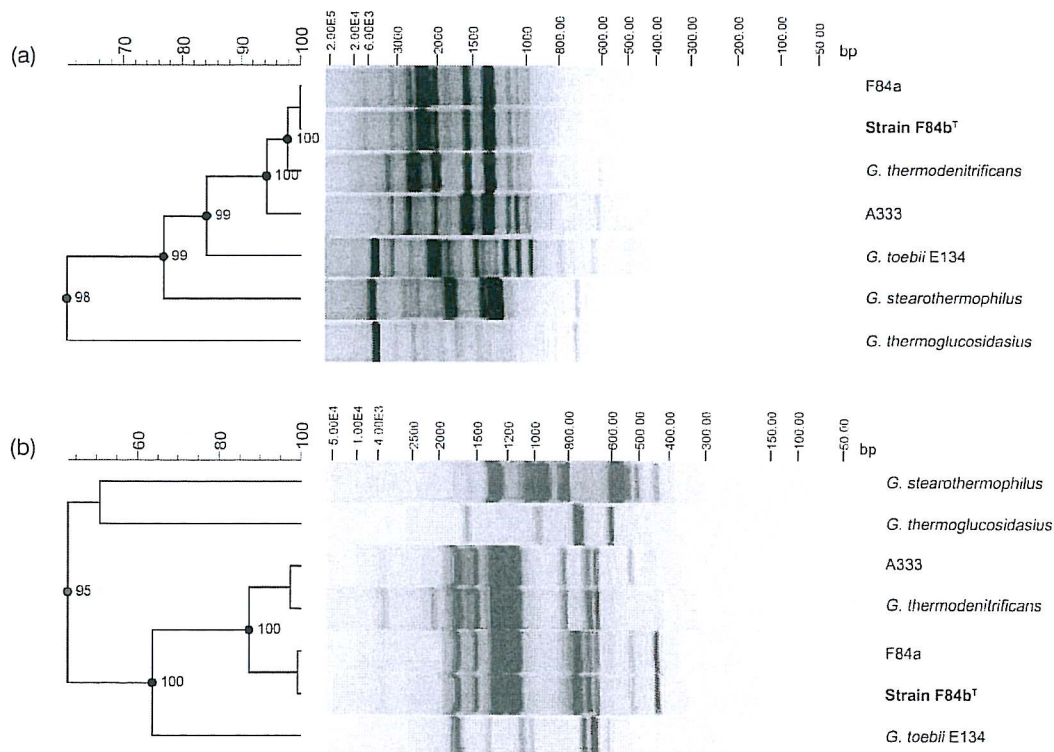


Fig. 3. Cluster analysis of digitized banding patterns, generated by rep-PCR using (a) the (GTG)<sub>5</sub> primer, and (b) the BOXA1R primer of strains from the genus *Geobacillus* (F84b<sup>T</sup>, F84a, A333, *G. thermodenitrificans* DSM 22<sup>T</sup>, *G. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>, *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *G. toebii* E134 DSM 22627). The dendrogram was constructed by using UPGMA, with correlation levels expressed as percentage values of the Pearson correlation coefficient.

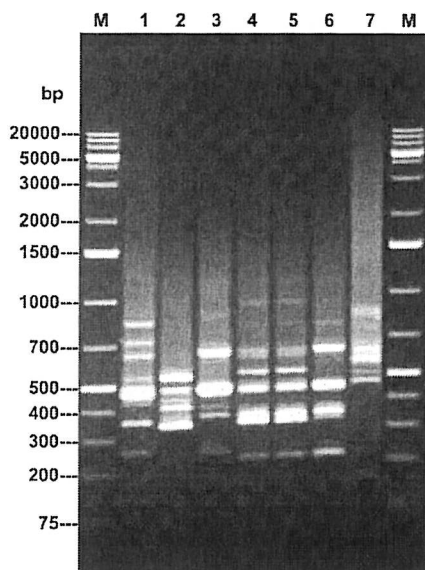


Fig. 4. ITS fingerprinting patterns of *Geobacillus* species, amplified by using the S-D-Bact-1494-a-S-20 and L-D-Bact-0035-a-A-15 primers (Lane M: 1 kb plus DNA ladder (SM1343, Fermentas), Lane 1: *G. stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup>, Lane 2: *G. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>, Lane 3: *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, Lane 4: F84b<sup>T</sup>, Lane 5: F84a, Lane 6: A333 and Lane 7: *G. toebii* E134 DSM 22627).

3).

In order to verify the taxonomic positions of these strains, they were subjected to DNA-DNA hybridization analyses with each other and with their closely related species: *G. thermodenitrificans* and *G. subterraneus*. The DNA-DNA homology data are given in Table 3. Strain A333 had DNA-DNA hybridization values of 100% with *G. thermodenitrificans* and 29.5% with *G. subterraneus*. In addition, 77.4% and 78.3% DNA reassociation values were found between strain A333 and strains F84b<sup>T</sup>, F84a, respectively. Thus, strain A333 is assigned to be a species of *G. thermodenitrificans* as a result of the data obtained from both phenotypic and genotypic characters and also from the complete DNA homology with this mentioned type strain.

On the other hand, strains F84b<sup>T</sup> and F84a were found to be 74.3% and 80.5% similar to *G. thermodenitrificans* and 29.1% and 28.4% to *G. subterraneus* according to the DNA-DNA hybridization results, respectively. They also shared a DNA homology of 95% with each other. The ad hoc committee recommends a threshold value of 70% DNA-DNA similarity for the definition of a novel bacterial species (Stackebrandt et

al., 2002). Nevertheless similarity values can be within an accuracy of about 10%, so values in close vicinity have to be regarded as critical. The critical DNA-DNA hybridization values between strains F84b<sup>T</sup>, F84a and *G. thermodenitrificans* could not differentiate F84b<sup>T</sup> and F84a from all the other species of genus *Geobacillus* into a separate species. But, when the physiologic, phylogenetic, genetic and chemotaxonomic data are considered, in addition to the borderline DNA homology, a novel subspecies of *Geobacillus thermodenitrificans* is proposed for which the name *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov. is recommended; the type strain is F84b<sup>T</sup>. A description of the new subspecies is given below.

#### Emendation of *Geobacillus thermodenitrificans* (Manachini et al., 2000) Nazina et al. (2001)

On the basis of the description of *Bacillus thermodenitrificans* given by Manachini et al. (2000), the following points are modified: Endospores are oval or ellipsoidal. Nitrate is reduced to nitrite. Gas from nitrate is variable. Protease production is variable.

#### Description of *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov.

*Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* (Etymologies: *ca' li. dus*, L. Masc. Adj., referring to [habitats] hot).

Cells are motile, spore-forming, straight rods with approximate sizes of 0.6–0.9 × 1.2–2.9 μm. They exist singly. Terminal, ellipsoidal endospores occur in non swollen sporangia. Colonies are cream, opaque, circular, and flat with lobate edges, with a dry-powdery surface. Catalase activity is positive. Grows well aerobically but is facultatively anaerobic. Gram-positive and thermophilic. Growth occurs at 45–69°C (optimum 60°C) and pH 7.0–8.5 (optimum 8.0). Growth range is within 0% to 4.5–5% (w/v) concentrations of NaCl, optimum being at 3.0–3.5% (w/v). Starch utilization, amylase and reduction of nitrate to nitrite are also positive. Citrate, gelatin and urea can not be utilized. Protease activity is negative. Methyl red and Voges-Proskauer tests are negative. Indole and H<sub>2</sub>S are not produced. Acid is produced from maltose, D-fructose, D-glucose, galactose, sucrose, D-xylose, D-mannose, L-arabinose, raffinose and D-mannitol, but not from lactose or D-sorbitol. Produces a high amount of thermostable α-glucosidase extracellularly and the amount of α-glucosidase production per cell yield for the strains

F84a and F84b<sup>T</sup> differs from 36.6 U/g to 77.2 U/g, respectively. It is sensitive to lysozyme. The following antibiotics: vancomycin (30 µg); bacitracin (10 µg); chloramphenicol (30 µg); rifampicin (30 µg); tetracycline (30 µg); penicillin G (10 µg); neomycin (30 µg); novobiocin (30 µg), and azithromycin (15 µg) inhibit the growth, but it is resistant to kanamycin (30 µg). The menaquinone content is MK-7 (100%). The dominant cellular fatty acids are iso-C17:0, iso-C15:0, C16:0, anteiso-C17:0, and iso-C16:0. The strain contains two plasmid bands of 12.0 and 15.6 kb. The G+C content of the genomic DNA is 49.0–49.6 mol%.

The type strain is F84b<sup>T</sup> (=DSM 22629<sup>T</sup> = NCIMB 14582<sup>T</sup>). It was isolated from a sediment sample of a high-temperature well-pipeline in Kizilcahamam Province of Ankara, Turkey.

*Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *thermodenitrificans* (Manachini et al., 2000) Nazina et al. 2001 is automatically created on the basis of the description of *Bacillus thermodenitrificans* given by Manachini et al. (2000).

#### Acknowledgments

This study was supported by grants from The Fundamental Research Group of The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (project numbers of TBAG-HD-320(107T286) and TBAG-HD126 (105T039)). We thank Dr. Mehlika Benli, Biology Department, Ankara University, Ankara, Turkey for performing the electron microscopy. In addition we are very grateful to Prof. Hans G. Trüper, University of Bonn, Germany for proposing and correcting the nomenclature of the new subspecies.

#### References

- Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 549–552.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., and Collins, M. D. (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.*, **13**, 202–206.
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J., and Franklin, M. (1977) A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.*, **81**, 461–466.
- Cihan, A. C., Cokmus, C., and Ozcan, B. (2009) Characterization of thermostable  $\alpha$ -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 2205–2217.
- Claus, D. and Berkeley, C. W. (1986) The genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, ed. by Sneath, P.H.A., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1105–1139.
- Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akkoc, N., and Akcelik, M. (2009) Isolations of  $\alpha$ -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*, **78**, 56–66.
- Daffonchio, D., Cherif, A., Brusetti, L., Rizzi, A., Mora, D., Boudabous, A., and Borin, S. (2003) Nature of polymorphisms in 16S–23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5128–5137.
- De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, **12**, 133–142.
- Golovacheva, R. S., Loginova, L. G., Salikhov, T. A., Kolesnikov, A. A., and Zaitseva, G. N. (1975) A new thermophilic species *Bacillus thermocatenulatus* nov. sp. *Microbiology* (English translation of *Mikrobiologiya*), **44**, 230–233.
- Hayat, M. A. (1981) Principles and Techniques of Electron Microscopy, Vol. 1, Edward Arnold Ltd., London, 522 pp.
- Huss, V. A. R., Festl, H., and Schleifer, K. H. (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.*, **4**, 184–192.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111–120.
- Kuisiene, N., Jomantiene, R., Valiunas, D., and Chitavichius, D. (2002) Characterization of thermophilic proteolytic spore-forming bacteria from a geothermal site in Lithuania based on 16S rRNA RFLP and ITS-PCR analyses. *Microbiology*, **71**, 712–716.
- Kuisiene, N., Raugalas, J., and Čitavičius, D. (2008) Comparative sequence analysis of 16S–23S rRNA internal transcribed spacers of the genus *Geobacillus*. *Biologija*, **54**, 1–6.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J., and Devine, T. E. (1988) Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradorhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 358–361.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Manachini, P. L., Mora, D., Nicastrò, G., Parini, C., Stackebrandt, E., Pukall, R., and Fortina, M. G. (2000) *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1331–1337.
- Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A. R., Lympelopoulou, D. S., Katsifas, E. A., Hatzinikolaou, D. G., and Karagouni, A. D. (2008) Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**, 395–401.
- Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 159–167.



- Miller, L. T. (1982) A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 584–586.
- Nazina, T. N., Lebedeva, E. V., Poltarau, A. B., Tourova, T. P., Grigoryan, A. A., Sokolova, D. S. H., Lysenko, A. M., and Osipov, G. A. (2004) *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2019–2024.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., and Ivanov, M. V. (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 433–446.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., and Todd, C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1847–1882.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425.
- Stackebrandt, E., Fredericksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mo-  
ra, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., and Whitman, W. B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1043–1047.
- Suzuki, Y., Kishigami, T., and Abe, S. (1976) Production of extracellular  $\alpha$ -glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 807–812.
- Suzuki, Y., Kishigami, T., Inoue, K., Mizoguchi, Y., Eto, N., Takagi, M., and Abe, S. (1983) *Bacillus thermoglucosidasius* sp. nov., a new species of obligately thermophilic bacilli. *Syst. Appl. Microbiol.*, **4**, 487–495.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596–1599.
- Tindall, B. J. (1990a) A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**, 128–130.
- Tindall, B. J. (1990b) Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **66**, 199–202.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., and Lupski, J. R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth. Cell. Mol. Biol.*, **5**, 25–40.
- Zarilla, K. and Perry, J. J. (1987) *Bacillus thermoleovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 258–264.
- Zeikus, J. G., Vieille, C., and Savchenko, A. (1998) Thermozymes: Biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles*, **2**, 179–183.

# Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey

Arzu Coleri Cihan · Birgul Ozcan ·  
Nilgun Tekin · Cumhur Cokmus

Received: 3 March 2011 / Accepted: 1 April 2011 / Published online: 19 April 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** The phylogenetic diversity of 31 thermophilic bacilli belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* were investigated which were isolated from various geothermal sites of Turkey. Twenty-seven of these isolates were found to be belonged within the genus *Geobacillus*, whereas 4 of them were identified as *Aeribacillus pallidus*. The comparative 16S rRNA gene sequence analyses revealed that the *A. pallidus* isolates displayed sequence similarity values from 98.0 to 99.6% to their closest relative. Furthermore, *Geobacillus* isolates showed sequence similarity values from 88.9 to 99.8% with the reference type strains. According to the phylogenetic analysis, isolates belonging to genus *Geobacillus* were diverged into nine clusters and among these isolates, 19 of them were identified as strains related to *G. caldoproteolyticus*, *G. thermodenitrificans*, *G. stearotherophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. toebii* with the most abundant 13 isolates from *G. caldoproteolyticus*. Four of the *Geobacillus* isolates were named as unidentified mix group, as they found to be genetically very homogenous like their closely related type species: *G. thermoleovorans*, *G. vulcani*, *G. lituanicus*, *G. kaustophilus*, *G. caldovelox*, *G. caldotenax*, and *G. uralicus*. Moreover, the sequence comparisons of E173a,

E265, C161ab and A142 isolates demonstrated that they represented novel species among genus *Geobacillus* as they shared lower than 96.7% sequence similarity to all the described type species. The *AluI*-, *HaeIII*- and *TaqI*-ARDRA results were in congruence with the 16S rRNA gene sequence analyses. By ARDRA results, the isolates were able to be differentiated and clustered, the discriminative restriction fragments of these isolates and type species were determined and the novelty of E173, E265, C161ab and A142 isolates could be displayed. Some differentiating phenotypic characters and the ability of amylase, glucosidase and protease production of these bacilli were also studied and biotechnologically valuable thermostable enzyme producing isolates were introduced in order to use in further studies.

**Keywords** Isolation · Thermophilic · *Geobacillus* · *Aeribacillus* · 16S rRNA gene · ARDRA

## Introduction

Since Cohn established the genus *Bacillus* in 1872, it has undergone to major taxonomic rearrangements, and many novel phylogenetic groups have been defined or reclassified as the new genera which were related to this group of bacteria (Stackebrandt et al. 1987; Logan et al. 2009). The investigations on phylogenetic divergence of the genus *Bacillus* and especially its thermophilic members indicated the need for further and extensive studies to place some of these bacilli in appropriate taxonomic levels (Ash et al. 1991; Rainey et al. 1994; Nazina et al. 2001). With the accumulation of further 16S rRNA gene sequence data, *Bacillus* has been divided into more manageable and better-defined groups (Logan et al. 2009). Molecular analysis

A. C. Cihan (✉) · C. Cokmus  
Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University,  
06100 Tandogan, Ankara, Turkey  
e-mail: arzucoleri@gmail.com; acihan@science.ankara.edu.tr

B. Ozcan  
Department of Biology, Faculty of Sciences and Letters,  
Mustafa Kemal University, 31040 Hatay, Turkey

N. Tekin  
Biotechnology Institute, Ankara University, 06500 Besevler,  
Ankara, Turkey

showed that the majority of such thermophilic bacteria described in the literature belonged to the genus *Bacillus* genetic group 5 (Ash et al. 1991; Nazina et al. 2001). As a consequence in 2001, the thermophilic, endospore-forming, aerobic bacteria belonging to *Bacillus* genetic group 5 were reclassified as being members of the genus *Geobacillus* (Nazina et al. 2001). The members of the genus *Geobacillus* can exhibit growth at temperatures ranging from 35 to 78°C, and are widespread in various geographical locations. They have been defined as a phylogenetically coherent group of thermophilic bacilli displaying very high intragenic similarity (96.5–99.2%) among their 16S rRNA gene sequences (Nazina et al. 2001; Nazina et al. 2004). Since then, new representatives of the genus *Geobacillus* have been described with the type species of *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22<sup>T</sup> and the genus comprises seventeen validly published species now. Finally, in 2010 Miñana-Galbis et al. reclassified *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus*, and a new genus: *Aeribacillus* was introduced and separated from genus *Geobacillus*.

Isolation of novel thermophilic bacilli has received considerable attention and also the interest in thermozyms is of importance for industrial applications (Zeikus et al. 1998). Thermophilic bacilli are the natural sources of many thermostable enzymes, such as amylases, glucosidases (Cihan et al. 2009), proteases (Chen et al. 2004), lipases (Lee et al. 1999), chitinases (Sandalli et al. 2008), xylanases (Touzel et al. 2000), restriction endonucleases (Pugatsch and Weber 1979) and DNA polymerases (Stenesh and Roe 1972). These thermozyms have been used in a number of industrial applications as they possess thermal stability to harsh industrial processes at high temperatures (Demirjian et al. 2001). During a previous research, we isolated more than five hundred bacilli from different geothermal regions of Turkey (Coleri et al. 2009). Of those from previous isolates, 115 bacilli were randomly selected and their 16S rRNA gene sequence analyses were carried out in order to study by a polyphasic approach. Among 115 endospore-forming bacilli, data including the 31 isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* are presented in this paper. The *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates were screened for their amylolytic, glucosidic and proteolytic activities which might have biotechnological potential. The taxonomic data of these thermophilic isolates presented in this research were derived from the phenotypic characteristics, 16S rRNA gene sequences and *AluI*-, *HaeIII*- and *TaqI*-Amplified Ribosomal DNA Restriction (ARDRA) patterns. This study contains comprehensive phenotypic and genotypic data derived from a large number of isolates belonging to two thermophilic and endospore-forming genera all of which were isolated from wide geothermal regions of Turkey.

## Materials and methods

### Sampling, isolation and growth conditions

A total of 28 water (2), sediment (8), soil (17) and tree branch (1) samples were collected aseptically from 9 hot springs and 7 high-temperature well pipelines located in two geographically separated areas in Turkey: Aegean Region and Middle Anatolian Region. Of those geothermal regions, Aydin (Region A; 27° 51' E, 37° 51' N), Manisa (Region B; 27° 26' E, 38° 36' N), Denizli (Region C; 29° 06' E, 37° 46' N) and Izmir (Region D; 27° 09' E, 38° 25' N) provinces are in the Aegean Region, whereas Nevsehir (Region E; 34° 43' E, 38° 38' N) and Ankara (Region F; 32° 52' E, 39° 56' N) province is located in the Middle Anatolian Region of Turkey. The water temperature and pH of these geothermal areas were measured between 50–100°C and 6.0–9.0, respectively.

One ml water and sediment sample or approximately 1 g soil and tree branch sample from each place was incubated in 5 ml of the MI medium containing 1% soluble starch (pH 7.0) at 60°C with 250 rpm shaking for 24 h to obtain the enrichment culture, after each sample was heat-treated at 80°C for 10 min to kill vegetative cells (Coleri et al. 2009). The turbid enrichments were streaked on plates of MI medium containing 3% agar and incubated aerobically at 60°C for 24–48 h. The single colonies showing different colony morphology were then picked and subcultured at least three times until a pure culture was obtained. The purity of the isolates was also confirmed by microscopic observation. All of the isolates were routinely maintained at 4°C on MI agar slants and stored at –80°C in MI broth cultures supplemented with 20% glycerol.

Isolates were designated according to their geothermal origin, the sample number taken from that origin and the number of the isolates obtained in that sample. The designation of the 31 isolates, their geothermal sampling locations and the reference strains used in this study are presented in Table 1.

### Morphologic and physiologic characterization

The temperature range was determined by incubating the strains in MI medium at temperatures from 20 to 80°C for 24–72 h. After the temperature range was determined, all the incubation conditions were adjusted to the temperature requirements of the bacteria, from 50 to 65°C. The cell morphology, motility and spore formation were observed with freshly prepared wet mounts using phase-contrast microscopy. The active cultures grown in MI broth under shaking for 18–24 h were used when describing the cell morphology and motility. The formation of endospores was

**Table 1** Diversity and origin of the thermophilic bacilli isolated from various geothermal regions of Turkey and the reference strains used in this study

Bacterial isolates	Origin	Number of the isolates and strains
A113 <sup>a</sup> , A142 <sup>b</sup> , A146 <sup>b</sup> , A333 <sup>a</sup> , A335 <sup>a</sup>	Omerbeyli, Germencik, Aydin, Turkey	5
A353 <sup>b</sup> , A364 <sup>a</sup> , A392b <sup>a</sup> , A394 <sup>a</sup> , A403 <sup>a</sup> , A404 <sup>a</sup> , A412b <sup>a</sup> , A413 <sup>a</sup>	Yavuzkoy, Salavatli, Aydin, Turkey	8
B84a <sup>c</sup>	Urganli, Turgutlu, Manisa, Turkey	1
C161ab <sup>a</sup> , C196 <sup>a</sup> , C226 <sup>a</sup> , C304 <sup>b</sup>	Buharkent, Tekkehamam/Tekkekoy, Denizli, Turkey	4
D195 <sup>b</sup> , D494 <sup>b</sup> , D504 <sup>b</sup> , D621 <sup>a</sup> , D623 <sup>a</sup> , D642 <sup>a</sup>	Dikili, Kaynarca, Kocaoba, İzmir, Turkey	6
D413 <sup>a</sup>	Dikili, Camur Hot Spring, Izmir, Turkey	1
E134 <sup>d</sup> , E265 <sup>b</sup> , E334 <sup>d</sup>	Altinsu, Kozakli, Nevsehir, Turkey	3
E173a <sup>a</sup> , E173b <sup>a</sup>	Baglica Kozakli, Nevsehir, Turkey	2
F84a <sup>b</sup>	Kizilcahamam, Ankara, Turkey	1
	Total number of the bacterial isolates	31
Reference strains		
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 22 <sup>T</sup>	Kindly provided by Prof. A. O. Belduz (Karadeniz Technical University, Turkey)	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 43223	Kindly provided by Prof. A. O. Belduz	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 5934	DSMZ	
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 2542 <sup>T</sup>	DSMZ	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup>	DSMZ	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i> DSM 22629 <sup>T</sup>	From our collection	
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup>	DSMZ	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7 <sup>T</sup>	DSMZ	

<sup>a</sup> Soil sample, <sup>b</sup> sediment sample, <sup>c</sup> water sample, <sup>d</sup> branch of a tree in the hot spring

also tested by using MI broth cultures of 18–48 h supplemented with 5 mg/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O.

The colony morphologies were determined using cultures grown aerobically on MI plates (supplemented with 3% agar) for 18–24 h. Gram staining and catalase activity were carried out by the methods of Claus and Berkeley as described (Claus and Berkeley 1986). The reference strains were used as control groups in all the phenotypic characterization tests, and the phenotypic analyses were carried out in triplicates.

#### Enzyme assays

All of the isolates were screened for their amylase,  $\alpha$ -glucosidase and protease activities qualitatively on agar plates. Amylolytic activity was tested on MI agar plates after incubation for 48 h. Then the plates were treated with 0.2% I<sub>2</sub> in 2% KI, and isolates having starch digestion zones around their colonies were determined as amylolytic (Coleri et al. 2009). When determining  $\alpha$ -glucosidase activity, a screening was carried out on MI plates by searching *para*-nitrophenol  $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) activity on blotting filter paper as described previously (Cihan et al. 2010). The paper disk was incubated at 60°C

and the yellow color formation, the color of which was caused by the reaction of  $\alpha$ -glucosidase on the substrate, was observed and selected for the positive  $\alpha$ -glucosidase reaction. In the screening of protease activity, isolates were grown on Skim Milk Agar (pH 7.0) plates (Denizci et al. 2004) for 72 h. Protease producing isolates which gave a clear zone around their colonies due to the hydrolysis of skim milk were selected. The diameters of halo zones and the amount of yellow color formation were also confirmed and compared with the reference strains which were able to produce the mentioned enzymes.

#### 16S rRNA gene amplification and sequencing analyses

Genomic DNA was extracted from the cultures growing on MI plates for 18 h at 60°C by using genomic DNA purification kit (Fermentas). The gene encoding 16S rRNA was amplified by PCR with the 16S bacteria specific 27F forward and the 1492R reverse primer as described previously (Kuisiene et al. 2002). The amplification products were purified from agarose gel using Gel Extraction Kit (Omega Ezna). The sequences of the PCR-amplified 16S rRNA gene were determined by using ABI 3100 gene sequencer with Bigdye cycle sequencing kit. In the phylogenetic

analysis, homology search was carried out using the basic BLASTN search program at the NCBI Web-site. Phylogenetic analysis were performed using the maximum-likelihood and neighbor-joining methods with bootstrap values based on 1,000 replications and the phylogenetic tree (Saitou and Nei 1987) was constructed with the MEGA package version 4 (Tamura et al. 2007) according to Jukes-Cantor method (Jukes and Cantor 1969). For most of the isolates, their almost complete 16S rRNA genes were sequenced (1,383–1,407 bp) and the GenBank accession numbers are given below.

The GenBank accession numbers: The 16S rRNA gene sequences presented in this study were obtained from the following isolates: A113 (FJ429596), A142 (FJ429990), A146 (FJ429568)<sup>P</sup>, A333 (EU326497)<sup>P</sup>, A335 (FJ429994), A353 (FJ429997), A364 (FJ429998), A392b (FJ430002), A394 (FJ430003), A403 (FJ429570)<sup>P</sup>, A404 (FJ430005), A412b (FJ429571)<sup>P</sup>, A413 (FJ430006), B84a (FJ430009), C161ab (FJ430012), C196 (FJ430014), C226 (FJ430015), C304 (FJ429574)<sup>P</sup>, D195 (FJ430023), D413 (FJ430040), D494 (FJ430045), D504 (FJ430047), D621 (FJ430050), D623 (FJ430051), D642 (FJ430052), E134 (EU477771)<sup>P</sup>, E173a (FJ430056), E173b (FJ430057), E265 (FJ429590), E334 (FJ429594)<sup>P</sup>, F84a (EU477772)<sup>P</sup>, (<sup>P</sup>: the partial 16S rRNA gene sequences).

#### Amplified ribosomal DNA restriction analysis

ARDRA analysis of the 16S rRNA gene primed by 27F/1492R was carried out on the amplified PCR products by single enzyme digestion, according to the manufacturer's instructions, with Fast digest *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* restriction enzymes (MBI Fermentas). The ARDRA profiles of the digested DNA were analyzed by electrophoresis through 2% (w/v) agarose gel using 1× TBE buffer at 120 V for 1.5 h (Caccamo et al. 2001). The ARDRA patterns were analyzed by the Bionumerics version 6.1 software packages (Applied Maths, Belgium). The experimental restriction fragments higher than 75 bp were included in the statistical analysis, in order to avoid confusion with primer dimmer bands. Similarities of the digitized profiles were calculated using Dice correlation and an average linkage (UPGMA) dendrogram was obtained. All the restriction analyses and their agarose gel electrophoresis were carried out in triplicates. In addition to experimental restriction analyses, the theoretical restriction mapping of the analyzed 16S rRNA gene sequences was also carried out by using an online restriction mapping service (<http://restrictionmapper.org/>). The developed theoretical-ARDRA groups were abbreviated as G-A-#; (*Geobacillus-AluI*-group number), G-H-#; (*Geobacillus-HaeIII*-group number) and G-T-#; (*Geobacillus-TaqI*-group number).

## Results

### Selection of *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates according to the 16S rRNA gene sequence analyses

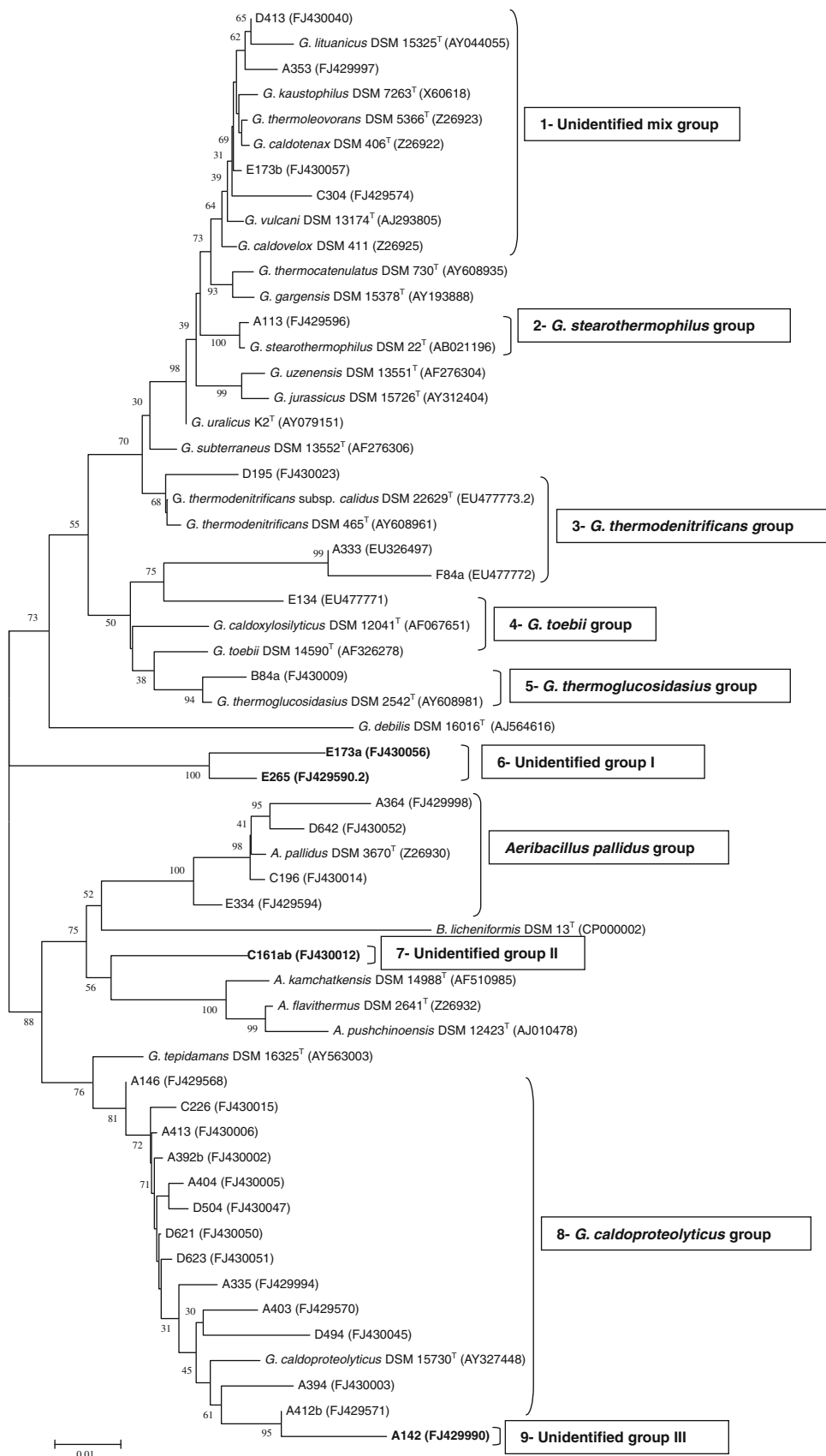
The phylogenetic diversity of one hundred and fifteen aerobic and endospore forming isolates were analyzed using 16S rRNA gene nucleotide sequences in order to avoid the repeated examination in the same bacterial taxon. All the isolates were phylogenetically clustered on the basis of their individual 16S rRNA gene sequence homologies to their closest relatives. According to the phylogenetic analysis of these sequences, most of the identified isolates from geothermal regions of Turkey fell into *Bacillus* genetic group 5 along with thermophilic species. The other isolates clustered in *Bacillus* genetic group 1 and 3 with their mesophilic and facultative thermophilic counterparts. Comparison of the generated sequences with those in the GenBank database indicated that all were clustered among the 7 genera: *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Aeribacillus*, *Paenibacillus*, and *Thermoactinomyces* with 52, 16, 13, 27, 4, 1 and 2 isolates.

Among these isolates, thirty-one aerobic, thermophilic, endospore-forming isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* were selected and taken into further researches in this study. As *G. pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 was reclassified as *A. pallidus* by Miñana-Galbis et al. in 2010, the ARDRA results of this reclassified group were taken into consideration together with the other isolates within the genus *Geobacillus*. These selected isolates were totally obtained from 16 geothermal sampling stations located in the Aegean Region and Middle Anatolian Region in Turkey. The 16S rRNA gene sequence data of 31 isolates have been deposited in the GenBank databases and their accession numbers in relation to the isolates were given in the material and methods section and in the phylogenetic tree which was obtained using the neighbor-joining method (Fig. 1).

### The phylogenetic diversity of the isolates and type strains belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

Nearly all the validly published 20 type species from genus *Geobacillus* and one type species from genus *Aeribacillus* were included in comparative sequence analysis among with our isolates as presented in Fig. 1. The phylogenetic analyses revealed that the type species from genus *Geobacillus* showed 16S rRNA gene sequence similarities from 88.9 to 99.8%. Furthermore, some of the type species of genus *Geobacillus* were determined to share high 16S rRNA gene sequence similarities as they could not be

**Fig. 1** A phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences between isolates belonging to genera *Geobacillus*, *Aeribacillus* and all the representative members from these genera. The tree was generated by neighbour-joining method. Bootstrap values (%) are based on 1,000 replicates and shown for branches with more than 30% bootstrap support. Bar indicates 0.01 substitutions per 100 nucleotide positions



**Table 2** The species groups of the *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates, the intragenic sequence similarity values and the number of the bacteria belonging to these groups derived from 16S rRNA gene nucleotide sequences

Genus	16S rRNA gene grouping	16S rRNA gene sequence similarities of the isolates to the closest relative (%)	Number of the isolates
<i>Geobacillus</i>	1-Unidentified mix group	>99.0 (similarity to more than 3 type strains)	4
	2- <i>G. stearothermophilus</i> group	99.3	1
	3- <i>G. thermodenitrificans</i> group	97.6–98.7	3
	4- <i>G. toebii</i> group	98.5	1
	5- <i>G. thermoglucosidasius</i> group	99.2	1
	6-Unidentified group I (E173a and E265)	94.3–95.6 (similarity to <i>G. toebii</i> )	2
	7-Unidentified group II (C161ab)	<96.3 (similarity to <i>G. caldoproteolyticus</i> )	1
	8- <i>G. caldoproteolyticus</i> group	97.7–99.9	13
	9-Unidentified group III (A142)	<96.7 (similarity to <i>G. caldoproteolyticus</i> )	1
<i>Aeribacillus</i>	1- <i>A. pallidus</i> group	Isolates belonging to genus <i>Geobacillus</i>	27
		Isolates belonging to genus <i>Aeribacillus</i>	4
		Total	31

differentiated without DND-DNA hybridization analyses. According to these results: a 98.1–99.9% sequence similarity between type strains of *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>, *Geobacillus vulcani* DSM 13174<sup>T</sup>, *Geobacillus lituanicus* DSM 15325<sup>T</sup>, *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263<sup>T</sup>, *Geobacillus caldovelox* DSM411<sup>T</sup>, *Geobacillus caldotenax* DSM 406<sup>T</sup> and *Geobacillus uralicus* K2<sup>T</sup>; a 99.3% similarity value between *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup> and *Geobacillus subterraneus* DSM 13552<sup>T</sup>; a 98.5% similarity between *Geobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup> and *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>; and a 98.2% sequence similarity value between *Geobacillus tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup> and *Geobacillus caldoproteolyticus* DSM 15730<sup>T</sup> were observed.

The 16S rRNA gene sequence analysis revealed that 27 of the isolates were belonged to genus *Geobacillus* and 4 to genus *Aeribacillus* as showed in phylogenetic tree in Fig. 1. The phylogenetic analyses derived from the neighbor-joining method were essentially consistent with those obtained using the maximum-likelihood algorithm, thus only the phylogenetic tree revealed by the neighbor-joining algorithm is presented in this study. The divergence of the species in these two genera, their 16S rRNA gene sequence similarity values to their closest relatives and the number of the isolates belonging to the species groups are also given in Table 2. Among the isolates, four of the isolates were found to be belonged to *A. pallidus* type species with sequence similarity values from 98.0 to 99.6% to their closest relative. These isolates also showed sequence similarity values between 97.1 and 98.9% to each other.

The comparative sequence analyses also revealed that the sequence similarity values between isolates from genus

*Geobacillus* and the reference type strains were determined as 88.6–99.3%. In addition, *Geobacillus* isolates demonstrated 16S rRNA gene sequence similarities from 89.0 to 99.8% to each other. Based on this phylogenetic analysis, isolates from genus *Geobacillus* clustered into 9 distinct lineages according to the similarity values to their closely related type species (Fig. 1). On the basis of the 16S rRNA gene sequence similarity values, 4 isolates demonstrated from 98.6 to 99.7% sequence similarity to *G. thermoleovorans*, *G. vulcani*, *G. lituanicus*, *G. kaustophilus*, *G. caldovelox*, *G. caldotenax* and *G. uralicus*. These isolates showed more than 99.0% sequence similarity to at least three of these mentioned closest relatives and could not be included to any of these species, unless DNA hybridization analyses were performed. Thus, these 4 isolates from Group 1 were named as unidentified mix group. Although *G. stearothermophilus* is commonly accepted as the most abundant thermophilic strain in the literature, there was only one isolate which was found to be belonging to this species (Group 2: *G. stearothermophilus* group). Group 3, 4 and 5 were consisted of species from *G. thermodenitrificans* (3 isolates), *G. toebii* (1 isolate) and *G. thermoglucosidasius* (1 isolate). Group 6 was named as unidentified group I and contained 2 isolates: E173a and E265 which showed very low sequence similarity to only *G. toebii* type strain with similarity values of 94.3 and 95.6%, respectively. These isolates were thought to be novel species belonging to genus *Geobacillus* as they showed very low sequence similarities to their closest relative, as they displayed a 97.5% sequence similarity to each other and as they branched together and formed a distinct cluster from the other isolates and thermophilic bacilli type strains in the phylogenetic tree. Moreover, strain C161ab represented a novel species;

forming a distinct cluster among other isolates and type strains, and also sharing less than 96.3% full sequence similarity to only the *G. caldoproteolyticus* type species. Thus, isolate C161ab was clustered as Group 7; with a new group name of unidentified group II. Majority of our isolates (13) belonging to this genus were found to be from species *G. caldoproteolyticus* with sequence similarity values from 97.7 to 99.9% to this closest relative (Group 8: *G. caldoproteolyticus* group). And finally, a ninth group named as unidentified group III was consisted of isolate A142, which comprised the fourth novel species among the isolates from genus *Geobacillus*. This novel isolate solely showed a 96.6% sequence similarity to *G. caldoproteolyticus* and branched out from this type species in the phylogenetic tree.

Phenotypic characteristics of the *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates

All of the isolates and reference strains from genus *Geobacillus* were found to be Gram-positive or variable staining, endospore-forming and motile bacilli. They were also positive in catalase activity. In addition, all of the isolates were determined to be thermophilic with temperature ranges for growth from 30 to 70°C (T<sub>opt</sub> = 50–70°C). Colony morphologies and spore formation differed depending on the species.

Some differentiating phenotypic characters of these isolates were investigated and presented in Table 3. Species of *A. pallidus* had circular and cream to pale yellow colored colonies. They had central to subterminally located ellipsoidal endospores in swollen or non swollen sporangia. Starch was not hydrolyzed. Isolates from *Geobacillus* unidentified mix group displayed round and cream to yellow colored colony morphology. Terminally located ellipsoidal endospores were observed in swollen or non swollen sporangia. They could hydrolyze starch as a dominant character. Furthermore, they had both amylolytic and glucosidic activity. Among the unidentified mix group isolates, α-glucosidase production of E173b, amylase production of C304 were all important characters of these isolates. All the isolates from *G. caldoproteolyticus* had round and cream colored colonies on MI plates. They produced terminally located ellipsoidal or oval spores in swollen sporangia. All the *G. caldoproteolyticus* isolates could able to hydrolyzed starch. The isolates belonging to this species might have a biotechnological potential due to their amylolytic and proteolytic activities. D504, D621, D623 isolates were able to produce amylase. Furthermore, all the isolates produce extracellular proteases except A335 isolate. Of those from protease producers: D403, A412b, A392b, A394, A404 and A413 displayed a significant level of protease zones when compared with reference strains.

**Table 3** Differentiating phenotypic characteristics of the isolates and type strains from the genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

Differentiating character	16S rRNA gene groups of the isolates belonging to genus <i>Geobacillus</i>										<i>Aeribacillus</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Colony morphology	Circular, cream to yellow colored	Round cream colored	Cream colored, circular, flat with lobate edges and dry-powdery surface	Circular and yellowish	Circular and yellowish	Round cream colored	Cream colored	Round and cream	Cream colored	Cream colored	Circular, cream to pale yellow colored	
Spore position	T	T	T	T	T	T	St	T	T	T	St, C	
Spore shape	E	E	E	E	E	E	E	E, O	E	E	E	
Temperature requirement (°C)	35–70	37–65	50–65	45–70	37–70	40–70	37–65	35–65	37–65	37–65	30–70	
Amylase activity	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	
Glucosidase activity	+	V	+	+	+	–	+	V	+	+	–	
Protease activity	V	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	

1 Unidentified mix group, 2 *G. stearothermophilus* group, 3 *G. thermodenitrificans* group, 4 *G. toebii* group 5 *G. thermoglucosidasius* group, 6 Unidentified group I (E173a and E265) 7 Unidentified group II (C161ab) 8 *G. caldoproteolyticus* group 9 Unidentified group III (A142), 10 *A. pallidus* group



E134 from *G. toebii* and B54a from *G. thermoglucosidasius* had circular colonies with yellowish pigmentation. Their spores were ellipsoidal, located terminally in swollen sporangia. They could hydrolyze starch. In addition, both of these isolates could produce significant amount of  $\alpha$ -glucosidase. *G. thermodenitrificans* species had very typical colony morphology such as; cream colored, circular, flat with lobate edges and with a dry-powdery surface. They could produce terminally located ellipsoidal endospores in non swollen sporangia. Starch hydrolysis was a dominant character and all of the *G. thermodenitrificans* isolates and type strain were able to produce high levels of yellow color in  $\alpha$ -glucosidase assay. A113 isolate and reference strains from *G. stearothermophilus* had round colonies in cream color, produced terminally located ellipsoidal endospores in non swollen sporangia, and could able to hydrolyzed starch. Although, both A113 and DSM 22<sup>T</sup> could produce high amount of amylolytic zones, only DSM 22<sup>T</sup> could able to form yellowish color in  $\alpha$ -glucosidase reaction. E173a and E265 isolates from unidentified group I had round and cream colored colonies, produced terminally located ellipsoidal endospores in swollen sporangia. Starch hydrolysis was found to be positive on both of the isolates, but they were negative for amylolytic and glycosidic activity. C161ab isolate from unidentified group II and A142 isolate from unidentified group III possessed cream colored colonies, gave positive reaction in starch degradation, produced ellipsoidal endospores in swollen sporangia, but they differed from each other in their spore locations. While endospores of A142 located terminally, subterminal endospore location was observed in C161ab isolate.

#### *AluI*-ARDRA groups of the isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

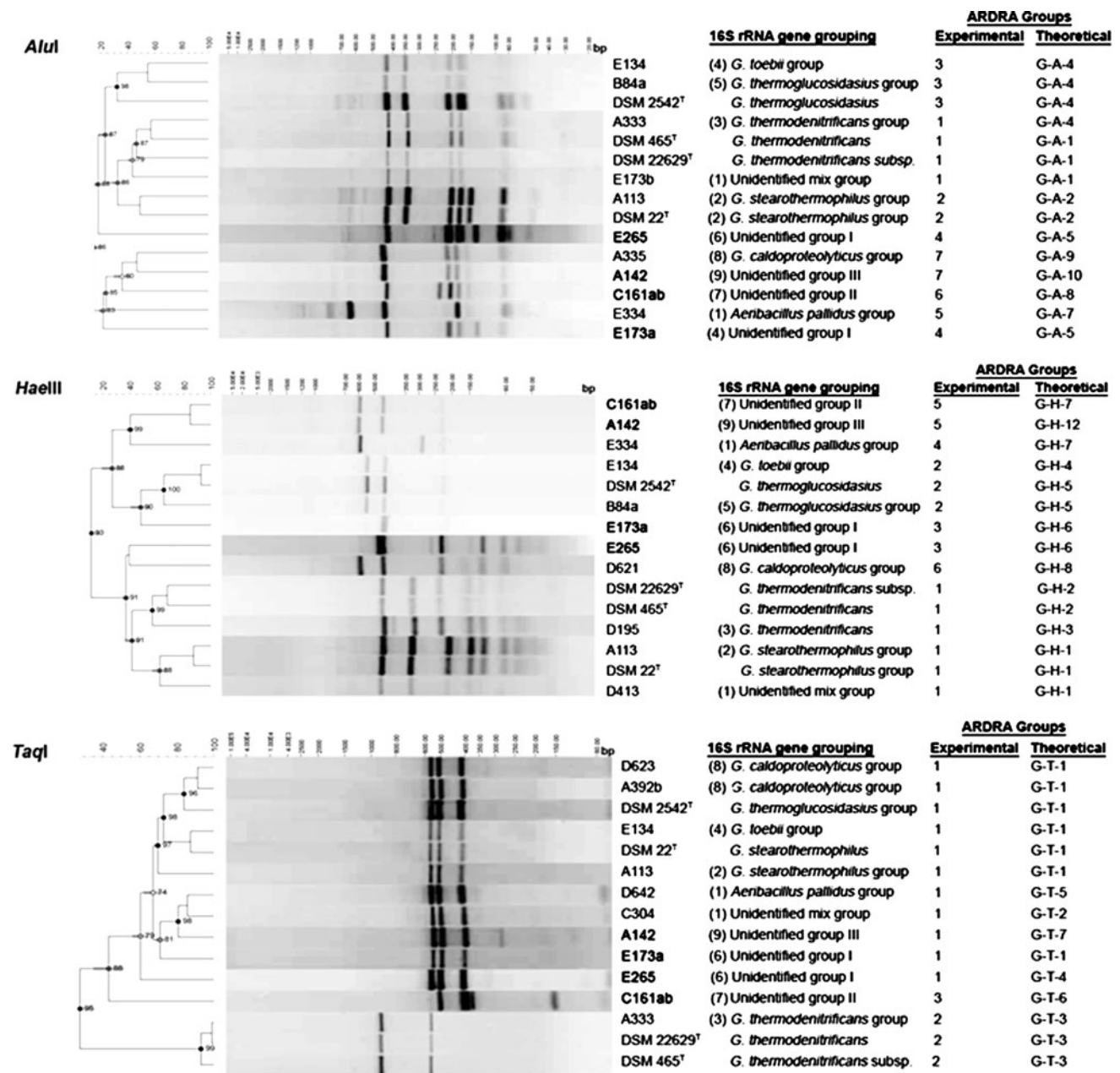
The amplified 16S rRNA genes of the isolates and reference strains from genus *Geobacillus* and *Aeribacillus* were digested with *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* restriction enzymes. In Fig. 2, *AluI*-, *HaeIII*- and *TaqI*-ARDRA cluster analyses of some digitized banding patterns derived from representative *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates and reference strains were presented. The 16S rRNA gene groups, experimental and theoretical ARDRA groups of these representative strains were also indicated beside Fig. 2.

According to the cluster analysis of the 27 *Geobacillus*, 4 *Aeribacillus* isolates and reference strains based on the *AluI* ARDRA profiles of the amplified 16S rRNA gene, totally 7 experimental and 10 theoretical patterns were observed according to these restriction fragments and some of these representatives were presented in Table 4. Although there were 10 theoretical groups, G-A-3 of D195, G-A-6 of A364 and G-A-10 of A142 could not be

differentiated by the experimental analyses. As presented on a similarity dendrogram in Fig. 2, the experimental digitized banding patterns from *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates and type strains were diverged into 7 clusters. Cluster 1 diverged into two groups which contained strains belonging to *G. thermodenitrificans* and unidentified mix group. These two 16S rRNA gene groups could not be able to differentiate not only by experimental, but also by the theoretical-ARDRA analyses. The theoretical restriction group of cluster 1 was mostly composed of G-A-1. This group of isolates could be differentiated by the presence of a 75 bp (6th) restriction fragment. Furthermore, the absence of a 165 bp restriction fragment was a distinctive character of Cluster 1, which was determined in the isolates belonging to Cluster 2 and 7. The second cluster contained only isolates and strains from *G. stearothermophilus* which formed the G-A-2 theoretical group. In the restriction profiles, only isolates from cluster 2 and 7 shared the restriction fragment of 165 bp, but members of cluster 2 differed in cluster 7 by the presence of a 346 bp fragment. The third cluster was branched into two groups belonging to isolates from *G. thermoglucosidasius* and *G. toebii*. These isolates displayed a G-A-4 theoretical-ARDRA group and experimentally differed from the other clusters by the presence of a 175 bp (5th) restriction fragment. Unidentified group I members of E173a and E265 formed a fourth cluster which contained a distinctive 150 bp (5th) restriction fragment and displayed a unique G-A-5 theoretical-ARDRA profile. The isolates from genus *Aeribacillus* branched out into a new cluster apart from the members of the genus *Geobacillus*: cluster 5. The presence of the first restriction fragment (648 bp) was the most distinctive character for the isolates from cluster 5, and they generally shared the G-A-7 theoretical-ARDRA profile. Cluster 6 comprised solely the C161ab isolate from unidentified group II. This group was unique by means of its second restriction fragment (239 bp) and by means of its G-A-8 theoretical-ARDRA profile. Finally, cluster 7 was composed of strains from *G. caldoproteolyticus* and the isolate A142 from unidentified group III. Although they showed different theoretical-ARDRA profiles such as G-A-9 and G-A-10, they displayed similar restriction patterns in experimental analysis. These isolates contained a 4th restriction fragment (165 bp) as in the case of cluster 2, but differed in cluster 2 by the absence of a 346 bp fragment.

#### *HaeIII*-ARDRA groups of the isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

The *HaeIII*-ARDRA analyses of the isolates and reference strains belonging to genus *Geobacillus* and *Aeribacillus* resulted in 6 experimental and 12 theoretical groups (Table 5), but these additional theoretical groups could not



**Fig. 2** Cluster analysis of some representative digitized banding patterns, generated by restriction digestions with *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* enzymes of the amplified 16S rRNA genes of isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*. The dendrogram was constructed by using UPGMA, with correlation levels expressed as

percentage values of the Dice coefficient. The 16S rRNA gene and the ARDRA groups derived from both experimental and theoretical restriction digestions were also indicated beside the designation of the isolate. The novel strains were written in *bold character*

be differentiated in the experimental analysis. As can be seen in the similarity dendrogram in Fig. 2, the members of these genera formed 6 clusters. Of those clusters, cluster 1 was composed of species from *G. thermodenitrificans* (G-H-2 and G-H-3), *G. stearothermophilus* (G-H-1) and unidentified mix group (G-H-1). The presence of the second restriction fragment of 326 bp was the distinctive

property of this cluster. Cluster 2 was diverged into two species groups: *G. toebii* (G-H-4) and *G. thermoglucosidasius* (G-H-5), whose first restriction fragment (581 bp) differed this group from other *Geobacillus* species. Cluster 3 was comprised from unidentified group I isolates of E173a and E265. The unique theoretical G-H-6 profile and the double 466 bp (1st) restriction fragments were the most

**Table 4** Some representative theoretical and experimental 16S rRNA gene *AluI* restriction fragments of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

16S rRNA gene sequence grouping	Bacteria	Experimental <i>AluI</i>								Grouping	Theoretical <i>AluI</i>							Grouping
		Fragments (bp)									Fragments (bp)							
		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	
1-Unidentified mix group	E173b	426	346	207	185	91	<b>75</b>			1	426	349	210	185	88	85		G-A-1 <sup>b</sup>
2- <i>G. stearothermophilus</i> group	A113	426	346	210	187	<b>165</b>	95			2	427	367	210	185	103 <sup>a</sup>	89		G-A-2 <sup>b</sup>
3- <i>G. thermodenitrificans</i> group	A333	421	342	204	183	89	<b>77</b>			1	429	349	210	185	87	85		G-A-1 <sup>b</sup>
	D195	426	346	210	187	93	<b>70</b>			1	349	336	210	189	91	87	85	G-A-3
4- <i>G. toebii</i> group	E134	420	341	207	190	<b>180</b>	90	82	70	3	428	349	210	185	173	<u>106</u>		G-A-4 <sup>b</sup>
5- <i>G. thermoglucosidasius</i> group	B84a	420	341	207	190	<b>177</b>	90	82	70	3	416	349	209	185	173			G-A-4 <sup>b</sup>
	DSM 2542 <sup>T</sup>	415	337	205	190	<b>175</b>	90	82	70	3	638	349	185	172	75 <sup>a</sup>			X
6-Unidentified group I	<b>E173a</b>	433	213	186	68	<b>150</b>	97	70		4	426	214	208	182	142	87	85	G-A-5 <sup>b</sup>
	<b>E265</b>	436	256	216	188	<b>152</b>	92			4	433	215	210	186	143	88	88	G-A-5 <sup>b</sup>
7-Unidentified group II	<b>C161ab</b>	433	<b>239</b>	210	188	169	93	70		6	420	208	206	185	<u>175</u>	87	85	G-A-8 <sup>b</sup>
8- <i>G. caldoproteolyticus</i> group	A335	458	223	199	<b>165</b>	100	70			7	426	<u>383</u>	208	185	87	84		G-A-9 <sup>b</sup>
9-Unidentified group III	<b>A142</b>	443	216	192	<b>165</b>	95	70			7	<u>383</u>	250	208	185	179	88	84	G-A-10 <sup>b</sup>
1- <i>Aeribacillus pallidus</i> group	A364	<b>648</b>	448	188	89	80				5	641	<u>386</u>	274	85				G-A-6
	E334	<b>648</b>	448	190	89	80				5	635	<u>382</u>	185	84				G-A-7 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The 5' fragment of the 16S rRNA gene sequence

<sup>b</sup> The dominant theoretical profile among the distinct 16S rRNA gene groups

G-A-# *Geobacillus-AluI*-#nd theoretical group

**Bold fragment** the distinctive *AluI* restriction fragment

Underlined fragment the 3' fragment of the 16S rRNA gene sequence

The designation of the novel isolates were showed in bold character

distinctive characters of this group. Cluster 4 contained isolates belonging to *A. pallidus* due to the presence of an unmatched 320 bp (2nd) restriction fragment and G-H-7 theoretical-ARDRA profile. The fifth cluster included isolates of C161ab and A142 from unidentified group I and II, respectively. Although both of these isolates had a common 90 bp fifth restriction fragment, they displayed different theoretical profiles such as G-H-8 (C161ab) and G-H-12 (A142). The cluster 6 was only composed of *G. caldoproteolyticus* isolates with a dominant G-H-8 theoretical-ARDRA profile with exceptions of G-H-9 from D494, G-H-10 from A394 and G-H-11 from A412b, but theoretical groups from G-H-9 to G-H-11 were indistinguishable from each other in the experimental analysis. Isolates belonging to this cluster differed from the others by the presence of a 145 bp (5th) fragment.

*TaqI*-ARDRA groups of the isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

Totally nine 16S rRNA species group from *Geobacillus* and 1 from *Aeribacillus* comprised only 3 experimental and

7 theoretical *TaqI*-ARDRA groups (Table 6). Most of the isolates and reference strains were branched within cluster 1 with a dominant G-T-1 theoretical group as presented in a similarity dendrogram in Fig. 2. Cluster 1 contained isolates and species from unidentified mix group (G-T-1, G-T-2), *G. stearothermophilus* (G-T-1), *G. toebii* (G-T-1), *G. thermoglucosidasius* (G-T-1), E173a (G-T-1) and E265 (G-T-4) from unidentified group I, *G. caldoproteolyticus* (G-T-1), A142 (G-T-7) isolate from unidentified group III, and finally *A. pallidus* (G-T-1, G-T-5). All of these groups of bacteria in cluster 1 included a unique 504 bp (2nd) restriction fragment, but the distinct species in this cluster could not be differentiated from each other. Cluster 2 solely comprised of *G. thermodenitrificans* isolates having a unique *TaqI* restriction profile from the other *Geobacillus* species. The 929 bp first restriction fragment and the G-T-3 theoretical-ARDRA profile were only peculiar to *G. thermodenitrificans* species. The last cluster was only comprised from the isolate C161ab from unidentified group II. Not only the specific 520 bp (1st) and 393 bp (3th) fragments, but also the G-T-6 theoretical profiles differed isolate C161ab in all the other species.

**Table 5** Some representative theoretical and experimental 16S rRNA gene *Hae*III restriction fragments of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

16S rRNA gene sequence grouping	Bacteria	Experimental <i>Hae</i> III								Grouping	Theoretical <i>Hae</i> III						Grouping
		Fragments (bp)									Fragments (bp)						
		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	
1-Unidentified mix group	D413	457	<b>326</b>	214	162	135	89	80	70	1	460	325	151	150 <sup>a</sup>	84	G-H-1 <sup>b</sup>	
2- <i>G. stearothermophilus</i> group	A113	453	<b>326</b>	210	158	131	86	80	70	1	461	324	152	152 <sup>a</sup>	84	G-H-1 <sup>b</sup>	
3- <i>G. thermodenitrificans</i> group	A333	453	<b>325</b>	228	157	127	95	77	70	1	460	325	176 <sup>a</sup>	153	84	G-H-2 <sup>b</sup>	
	D195	447	<b>325</b>	229	157	130	98	80	70	1	460	325	175 <sup>a</sup>	153	84	G-H-3	
4- <i>G. toebii</i> group	E134	<b>581</b>	469	230						2	563	460	213 <sup>a</sup>	<u>138</u>		G-H-4 <sup>b</sup>	
5- <i>G. thermoglucosidasius</i> group	B84a	<b>586</b>	475	236						2	584	460	175 <sup>a</sup>			G-H-5 <sup>b</sup>	
6-Unidentified group I	<b>E173a</b>	<u>469</u>	221	160	130	85	70			3	467	342	174 <sup>a</sup>	133	81	G-H-6 <sup>b</sup>	
	<b>E265</b>	<u>466</u>	236	160	133	87	70			3	468	348	183 <sup>a</sup>	135	85	G-H-6 <sup>b</sup>	
7-Unidentified group II	<b>C161ab</b>	631	481	236	171	<b>90</b>	70			5	589	440	171 <sup>a</sup>	<u>82</u>	77	G-H-8 <sup>b</sup>	
8- <i>G. caldoproteolyticus</i> group	D621	621	467	241	176	<b>140</b>	91	75		6	594	458	170 <sup>a</sup>	77		G-H-8 <sup>b</sup>	
	D494	630	473	245	179	<b>143</b>	94	70		6	458	397	201	179 <sup>a</sup>	77	G-H-9	
	A394	636	481	236	180	<b>145</b>	95	70		6	458	360	235	170 <sup>a</sup>	77	G-H-10	
	A412b	656	496	257	188	<b>151</b>	100	70		6	458	167				G-H-11	
9-Unidentified group III	<b>A142</b>	641	486	232	174	<b>90</b>	70			5	458	361	174 <sup>a</sup>	138	98	G-H-12 <sup>b</sup>	
1- <i>Aeribacillus pallidus</i> group	E334	631	<b>320</b>	230						4	<u>562</u>	300	174 <sup>a</sup>	155	109	77	G-H-7 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The 5' fragment of the 16S rRNA gene sequence

<sup>b</sup> The dominant theoretical profile among the distinct 16S rRNA gene groups

*G-H-# Geobacillus-HaeIII-#nd* theoretical group

*Double underlined fragment* double restriction fragment

*Bold fragment* the distinctive *Hae*III restriction fragment

*Underlined fragment* the 3' fragment of the 16S rRNA gene sequence

The designation of the novel isolates were showed in bold character

## Discussion

16S rRNA gene sequencing is a widely used standard technique in bacterial taxonomy and it is also routinely used in 'polyphasic approach' when new descriptions of bacterial species or higher taxa are made (Ludwig and Schleifer 1999; Rosselló-Mora 2005). There are also some limitations when comparing the 16S rRNA gene sequences of phylogenetically homogeneous groups of bacteria as the structurally conserved sequences found in 16S rRNA gene might not allow strains to identify up to species level in closely related microorganisms. Moreover, it was accepted that species having 70% or greater DNA similarity usually have more than 97% sequence identity. Thus, the Ad Hoc Committee strongly recommended the DNA-DNA hybridizations in cases of species descriptions when 16S rRNA gene sequences of the novel strains show 97% or more similarity with its closest relatives (Stackebrandt and Goebel 1994; Stackebrandt et al. 2002; Logan et al. 2009).

The 16S rRNA gene sequence analyses of the 31 *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates carried out in this study

revealed that genus *Geobacillus* was more predominant on genus *Aeribacillus* with its 27 members in the mentioned geothermal regions of Turkey. The phylogenetic analyses based on the individual 16S rRNA gene sequence homologies to their closest relatives showed that all the isolates fell into *Bacillus* genetic group 5 along with other thermophilic species. The comparative sequence analyses also revealed that the sequence similarity values between isolates from genus *Geobacillus* and the reference type strains were determined as 88.9–99.8%. In addition, *Geobacillus* isolates demonstrated 16S rRNA gene sequence similarities from 89.0 to 99.8% to each other. Based on this phylogenetic analysis, isolates from genus *Geobacillus* clustered into nine distinct lineages and 19 of the *Geobacillus* isolates could be identified within some of the described type species. The most abundant species was *G. caldoproteolyticus* with 13 isolates, followed by *G. thermodenitrificans* with 3 isolates, and *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*, *G. toebii* all of which contained one isolate.

Moreover, eight of the isolates could not be belonged to any of the described type species due to their high or low

**Table 6** Some representative theoretical and experimental 16S rRNA gene *TaqI* restriction fragments of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus*

16S rRNA gene sequence grouping	Bacteria	Experimental <i>TaqI</i>					Grouping	Theoretical <i>TaqI</i>				Grouping
		Fragments (bp)						Fragments (bp)				
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	
1-Unidentified mix group	D413	555	<b>503</b>	406			1	497	<u>490</u>	406 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
	C304	562	<b>504</b>	406			1					G-T-2
2- <i>G. stearothermophilus</i> group	A113	555	<b>504</b>	406			1	<u>499</u>	497	409 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
3- <i>G. thermodenitrificans</i> group	A333	<b>929</b>	567				2	<u>907<sup>a</sup></u>	<u>492</u>			G-T-3 <sup>b</sup>
	DSM 465 <sup>T</sup>	<b>929</b>	560				2	<u>590</u>	500	409		Y
4- <i>G. toebii</i> group	E134	569	<b>513</b>	417			1	<u>501</u>	498	408		G-T-1 <sup>b</sup>
5- <i>G. thermoglucosidasius</i> group	B84a	575	<b>513</b>	422			1	<u>498</u>	484	406 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
6-Unidentified group I	<b>E173a</b>	569	<b>506</b>	412			1	<u>500</u>	497	401 <sup>a</sup>		G-T-1
	<b>E265</b>	563	<b>507</b>	410	75		1	<u>515</u>	503	319	92	G-T-4
8-Unidentified group II	<b>C161ab</b>	<b>520</b>	417	<b>393</b>	172	82	3	489	402 <sup>a</sup>	<u>334</u>	157	G-T-6 <sup>b</sup>
9- <i>G. caldoproteolyticus</i> group	A392b	555	<b>503</b>	406			1	496	<u>493</u>	401 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
	D623	564	<b>506</b>	402			1	495	<u>493</u>	401 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
10-Unidentified group III	<b>A142</b>	555	<b>507</b>	408	75		1	<u>492</u>	406 <sup>a</sup>	269	230	G-T-7 <sup>b</sup>
1- <i>Aeribacillus pallidus</i> group	A364	552	<b>505</b>	400	91		1	501	<u>496</u>	405 <sup>a</sup>		G-T-1 <sup>b</sup>
	D642	544	<b>504</b>	399	88		1	<u>988</u>	404 <sup>a</sup>			G-T-5

<sup>a</sup> The 5' fragment of the 16S rRNA gene sequence, G-T-# *Geobacillus-TaqI*-#nd theoretical group

<sup>b</sup> The dominant theoretical profile among the distinct 16S rRNA gene groups

**Bold fragment** the distinctive *TaqI* restriction fragment

Underlined fragment the 3' fragment of the 16S rRNA gene sequence

The designation of the novel isolates were showed in bold character

level 16S rRNA gene sequence similarities. Among these unidentified isolates, 4 of them demonstrated sequence similarity values from 98.6 to 99.7% to *G. thermoleovorans*, *G. vulcani*, *G. lituanicus*, *G. kaustophilus*, *G. caldovelox*, *G. caldotenax* and to *G. uralicus* type species. As these isolates showed more than 99.0% sequence similarity to at least three of these closest relatives and as they could not be identified without DNA hybridization analyses, they were named as unidentified mix group. Furthermore, 4 of the unidentified isolates showed sequence similarity values lower than 97.0%, thus they were represented as potentially novel *Geobacillus* species. Of those from novel isolates, E173a and E265 formed a distinct cluster from all the *Geobacillus* isolates and the type species, displayed similarity values of 94.3 and 95.6% to *G. toebii* type strain, respectively and also showed 97.5% identity to each other. In addition, C161ab and A142 isolates separated and formed distinct branches from each other and from their closest relative *G. caldoproteolyticus*, therefore represented as novel *Geobacillus* strains as they showed low level sequence identity (<96.7%) to this type species. As a consequence, the sequence comparisons of E173a, E265, C161ab and A142 isolates revealed that they represented

novel species among genus *Geobacillus* and these data will to their further genotypic and phenotypic analysis.

The polyphasic approach has been taking attention not only in microbial ecological researches and in taxonomic studies (Mora et al. 1998). This approach clusters a great number of similar bacteria belonging to the same genus and includes obtaining information about these clusters with definitive phenotypic and DNA-directed genotypic fingerprinting methods such as amplified ribosomal DNA restriction analysis (Vaneechoutte et al. 1992; White et al. 1993; Mora et al. 1998). ARDRA profiles of the genus *Bacillus* and *Geobacillus* have been well-studied among the thermophilic, spore-forming bacteria, and shown to be a valuable, easy and accurate technique for the identification of genus *Geobacillus* (Mora et al. 1998; Caccamo et al. 2001; Kuisiene et al. 2002, 2007). In these previous studies, restriction endonucleases of *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *RsaI*, *TaqI* were used when genotyping the genus *Geobacillus*. Of those from enzymes, *AluI* and *HaeIII* are the most frequently used enzymes for ARDRA in the genus *Geobacillus*, as they produced the highest number of differentiating bands (Kuisiene et al. 2007). It is also known that rDNA genes are organized as a multigene family and

expressed with a copy number from 1 to 15 (Klappenbach et al. 2001). As there might be sequence heterogeneity among multiple 16S rRNA genes, this will probably affect the recognition sites of the restriction endonucleases. Consequently, it was recommended that the theoretically and experimentally obtained digestion profiles should be compared (Caccamo et al. 2001; Kuisiene et al. 2007).

For this reasons, the amplified 16S rRNA gene products of the isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* were also subjected to both experimental and theoretical digestions with *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* restriction enzymes. The gel electrophoresis of *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* profiles allowed us to distinguish most of the *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolates and the reference strains within 7, 6 and 3 experimental groups, respectively (Fig. 2). According to these results, *AluI* ARDRA patterns of *G. stearothermophilus*, *G. caldoproteolyticus*, *A. pallidus*, E173, E265 and C161ab; *HaeIII* ARDRA patterns of *G. caldoproteolyticus*, *A. pallidus*, E173, E265, C161ab and A142 and finally *TaqI* ARDRA patterns of *G. thermodontirificans* and C161ab were all unique. However, isolates from the *G. thermoglucosidasus*, *G. toebii* groups, and isolates from unidentified mix group could not be differentiated from their closest relatives as they displayed high intergenic sequence similarities within genus *Geobacillus*. It is obvious that the potential of proposed *AluI* and *HaeIII* ARDRA techniques are superior on ARDRA profiles obtained using *TaqI* due to the number of restriction fragments, but species from *G. thermodontirificans* could only be distinguished from other *Geobacillus* species by its unique *TaqI* profile. In addition, some differences in the theoretical and experimental ARDRA profiles can be explained by the size of the 16S rRNA genes sequenced by us and the ones published in databases. The other reason may also be some technical and functional errors in sequences, which might contain the disappearance or appearance of one or more nucleotides (Rodas et al. 2003). This kind of ARDRA techniques was not always found useful when identifying genetically polymorphic groups of strains such as *G. toebii* and *G. thermoglucosidasus* or *G. thermoleovorans*, *G. vulcani*, *G. lituanicus*, *G. kaustophilus*, *G. caldovelox*, *G. caldotenax* and *G. uralicus*, for which DNA hybridization remains the needed method for identifying these closely related taxa at the species level (Wayne et al. 1987). As a consequence, although there were some limitations, such as ARDRA analyses were carried out on conserved 16S rRNA genes, we were able to differentiate and cluster our isolates by using their ARDRA patterns. The ARDRA results also showed resemblance with the 16S rRNA gene sequence analyses. By ARDRA results, not only the discriminative restriction fragments of these isolates and type species were determined, but also the novelty of our

E173, E265, C161ab and A142 isolates could be demonstrated.

## Conclusions

The phylogenetic diversity of a large number of thermophilic isolates from genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* in geothermal areas of Turkey were presented, some of which are phylogenetically novel by this study. Certain differentiating phenotypic characters and the ability of amylase, glucosidase and protease production of these isolates were studied and biotechnologically valuable thermostable enzyme producing isolates were determined in order to use in further studies. The reliability of species identification scheme of proposed ARDRA techniques were also proved in congruence with the phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences.

**Acknowledgments** This study was supported by Fundamental Research Group of The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK); project number TBAG/HD-320 (107T286). In addition we are very grateful to Prof. Dr. Hakan Akbulut (Ankara University, Faculty of Medicine, Oncology Department, Ankara, Turkey) and Associated Prof. Dr. Hilal Ozdag (Ankara University, Biotechnology Institute Central Laboratory, Genomic Unite, Ankara, Turkey) for their contributions.

## References

- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* 13:202–206. doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00608.x
- Banat IM, Marchant R, Rahman TJ (2004) *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2197–2201. doi:10.1099/ijs.0.63231-0
- Caccamo D, Maugeri TL, Guglisndolo C (2001) Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rRNA. *J Appl Microbiol* 91:520–524. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01410.x
- Chen XG, Stabnikova O, Tay JH, Wang JY, Tay STL (2004) Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles* 8:489–498. doi:10.1007/s00792-004-0412-5
- Cihan CA, Cokmus C, Ozcan B (2009) Characterization of thermostable  $\alpha$ -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. *World J Microbiol Biotechnol* 25:2205–2217. doi:10.1007/s11274-009-0127-y
- Cihan AC, Ozcan B, Cokmus C (2010) *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an  $\alpha$ -glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey. *J Basic Microbiol* 50:1–11. doi:10.1002/jobm.201000115
- Claus D, Berkeley CW (1986) The genus *Bacillus* In: Sneath pH (Ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore, ISBN: 0-683-07893-934, 1105–1139

- Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akkoc N, Akcelik M (2009) Isolations of  $\alpha$ -glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology* 78:56–66. doi:10.1134/S002626170901008
- Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol* 5:144–151. doi:10.1016/S1367-5931(00)00183-6
- Denizci AA, Kazan D, Abeln ECA, Erarslan A (2004) Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *J Appl Microbiol* 96:320–327. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02153.x
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, pp 21–132
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2001) rDNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Nucleic Acids Res* 29:181–184. doi:0099-2240/00/\$04.00+0
- Kuisiene N, Jomantiene R, Valiunas D, Chitavichius D (2002) Characterization of thermophilic proteolytic spore-forming bacteria from a geothermal site in lithuania based on 16S rRNA RFLP and ITS-PCR analyses. *Microbiology* 71:712–716. doi:10.1023/A:1021440208887
- Kuisienė N, Raugalas J, Čitavičius D (2007) Identification of *Geobacillus stearothermophilus* by restriction digestion with *AluI* of the amplified 16S rRNA. *Biologija* 53:62–66
- Lee D, Koh Y, Kim K, Kim B, Choi H, Kim D, Suhartono MT, Pyun Y (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1 FEMS. *Microbiol Lett* 179:393–400. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08754.x
- Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, de Vos P, Fritze D, Heyndrickx MRA, Kämpfer P, Rabinovitch L, Salkinoja-Salonen MS, Seldin L, Ventosa A (2009) Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2114–2121. doi:10.1099/ijs.0.013649-0
- Ludwig W, Schleifer KH (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* 65:752–757
- Miñana-Galbis D, Pinzón DL, Lorén JG, Manresa A, Oliart-Ros RM et al (2010) Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1600–1604. doi:ijs.0.003699-0
- Mora DM, Fortina MG, Nicastrò G, Parini C, Manachini PL (1998) Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study of new soil isolates and several reference strains. *Res Microbiol* 149:711–722. doi:10.1016/S0923-2508(99)80018-7
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarauš AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:433–446
- Nazina TN, Lebedeva EV, Poltarauš AB, Tourova TP, Grigoryan AA, DSh Sokolova, Lysenko AM, Osipov GA (2004) *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2019–2024. doi:10.1099/ijs.0.02932-0
- Pugatsch T, Weber H (1979) A thermostable, sequence-specific restriction endonuclease from *Bacillus stearothermophilus*: BstPI. *Nucleic Acids Res* 7:1429–1444. doi:10.1093/nar/7.6.1429
- Rainey FA, Fritze D, Stackebrandt E (1994) The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rRNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 115:205–211. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06639.x
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* 26:412–422. doi:10.1078/072320203322497446
- Rosselló-Mora R (2005) Updating prokaryotic taxonomy. *J Bacteriol* 187:6255–6257. doi:10.1128/JB.187.18.6255-6257.2005
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sandalli C, Kacagan M, Canakci S, Belduz AO (2008) Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. *Ann Microbiol* 58:245–251
- Scholz T, Demharter W, Hensel R, Kandler O (1988) *Bacillus pallidus* sp. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 24. *Int J Syst Bacteriol* 38:136–137
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J System Bacteriol* 44:846–849. doi:10.1099/00207713-44-4-846
- Stackebrandt E, Ludwig W, Weizenegger M, Dorn S, McGill TJ, Fox GE, Woese CR, Schubert W, Schleifer K (1987) Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *J Gen Microbiol* 133:2523–2529
- Stackebrandt E, Fredericksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1034–1047. doi:10.1099/ijs.0.02360-0
- Stenesh J, Roe BA (1972) DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. I. Purification and properties of DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta* 272:156–166. doi:10.1016/0005-2787(72)90240-7
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Touzil JP, O'Donohue M, Debeire P, Samain E, Breton C (2000) *Thermobacillus xylanilyticus* gen. Nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:315–320
- Vanechoutte M, Rossau R, De Vos P, Gills M, Janssens D, Paepe N, De Rouck A, Fiers T, Claeys G, Kersters K (1992) Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* 93:227–234. doi:10.1016/0378-1097(92)90467-3
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LM, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG (1987) Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463–464. doi:0020-7713/87/040463-02\$02.00/
- White D, Sharp RJ, Priest FG (1993) A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:357–386. doi:10.1007/BF00873093
- Zeikus JG, Vieille C, Savchenko A (1998) Thermozyymes: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* 2:179–183

# Prolactin receptor (*PRLR*) gene polymorphism in Chios, White Karaman and Awassi sheep breeds

Ozge Ozmen<sup>1</sup>, Ibrahim Seker<sup>1</sup>, Okan Ertugrul<sup>2</sup>, Emel Ozkan<sup>3</sup> and Nilgun Tekin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine, Firat University, Elazig, Turkey, <sup>2</sup>Department of Genetic, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey, <sup>3</sup>Department of Animal Science, Agriculture Faculty, Namik Kemal University, Tekirdag, Turkey, <sup>4</sup>Central Laboratory Genomics Unit, Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

## Abstract

The objective of the present study was to determine the polymorphism in the prolactin receptor (*PRLR*) gene in Chios, White Karaman and Awassi, which are native sheep breeds in Turkey. By means of *PRLR* gene sequence homology between sheep and humans, two primer pairs were designed for polymerase chain reaction (PCR) amplification within intron 1 and exon 10 of the *PRLR* gene in sheep. A total of 160 amplicons (99 for intron 1 and 61 for exon 10) were subjected to DNA sequence analysis. For intron 1, 6 different haplotypes were determined. For exon 10, 7 different haplotypes were obtained. Some variations determined for exon 10 (g.14A>T p.Q14L; g.160G>A p.D160N; g.166G>A p.E166K; g.167A>T p.E167V; g.176A>T p.H176L; g.206G>A p.S206N; g.208G>A p.G208R) led to changes in the amino acids, but no amino acid changes were determined in g.2A>T, g.81A>G, g.138A>G, g.186C>T, g.207T>C. It was noted in particular that White Karaman and Awassi were similar to each other in both *PRLR* exon 10 and intron 1 haplotypes, whereas the Chios breed had a different variation.

**Keywords:** Turkish sheep breeds, prolactin receptor gene, polymorphism

## Zusammenfassung

### Prolaktin-Rezeptor (*PRLR*) Gen-Polymorphismus in Chios, White Karaman und Awassi Schafrassen

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Polymorphismus in der Prolaktin-Rezeptor (*PRLR*)-Gen in Chios, White Karaman und Awassi, die einheimischen Schafrassen in der Türkei sind zu bestimmen. Durch *PRLR* Gen Sequenzhomologie zwischen Schafen und Menschen, wurden zwei Primerpaare für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) im Intron 1 und Exon 10 des Gens *PRLR* bei Schafen entwickelt. Insgesamt 160 Amplikons (99 für Intron 1 und 61 für Exon 10) wurden DNA-Sequenz-Analyse unterzogen. Für Intron 1 wurden 6 verschiedene Haplotypen bestimmt. Für Exon 10 wurden 7 verschiedene Haplotypen erhalten. Einige Variationen für Exon 10 (g.14A>T p.Q14L bestimmt; g.160G>A p.D160N; g.166G>A p.E166K; g.167A>T p.E167V; g.176A>T p. H176L; g.206G>A p.S206N; g.208G>A p.G208R), um Änderungen in der Aminosäuren führten, aber keine Aminosäure Veränderungen wurden in g.2A>T, g.81A>G, g bestimmt 138A>G, g.186C>T, g.207T>C. Es war insbesondere zu



beachten, dass White Karaman und Awassi einander ähnlich in beiden *PRLR* Exon 10 und Intron 1 Haplotypen wurden, während die Chios Rasse hatte eine andere Variante.

**Schlüsselwörter:** Turkish Schafrassen, Prolaktin-Rezeptor-Gen, Polymorphismus

## Introduction

Prolactin is an anterior pituitary peptide hormone involved in many different endocrine activities and is essential for reproductive performance. This action is mediated by its receptor. The prolactin receptor (*PRLR*) has been detected in various tissues including brain, ovary, placenta and uterus in several mammalian species (Shirota *et al.* 1990, Tzeng & Linzer 1997, Cassy *et al.* 1998). The prolactin receptor, encoded by the *PRLR* gene, is a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family containing regions of identical sequences (Bole-Feysot *et al.* 1998). The prolactin and growth hormone receptors are homologous to receptors for members of the cytokine superfamily (Clevenger *et al.* 1998). Mice homozygous for null mutations in *PRLR* are sterile due to a failure of embryonic implantation, demonstrate irregular cycles, have reduced fertilization rates and defective embryonic development (Ormandy *et al.* 1997, Bole-Feysot *et al.* 1998, Baran *et al.* 2002, Grosdemouge *et al.* 2003), and show impaired maternal behaviour (Lucas *et al.* 1998). These characteristics make *PRLR* a strong candidate gene for reproductive traits (Kmiec *et al.* 2001, Kovaks *et al.* 2010).

The gene coding for ovine *PRLR* was mapped on chromosome 16 (Jenkins *et al.* 2000). In ovine, there are two distinct prolactin receptor isoforms: long *PRLR* and short *PRLR* produced by alternative splicing mechanism (Bignon *et al.* 1997)

The Chios sheep breed has a high milk yield and an outstanding prolificacy. The average litter size is 2.3 and found in western region in Turkey. The Awassi is principally a milk breed, but meat production from this breed is also important and the twinning rate is 10-20% and found southeast Anatolia in Turkey. The White Karaman is a breed indigenous to Turkey with a twinning rate of 20-30% and found in central Anatolia in Turkey. (Akcapinar 2000).

It is well known that Chios sheep are highly prolific in comparison with many other breeds.

The objectives of the present study were investigating polymorphisms in the *PRLR* gene exon 10 and intron 1 by using DNA sequence analysis. Exon 10 encodes most of the cytoplasmic domain, which is essential for signal transductions (Bole-Feysot *et al.* 1998).

## Material and methods

### *Animal resources and DNA isolation*

Fifty blood samples each from Chios, White Karaman, and Awassi ewes, with a total of 150 samples were used. Jugular blood samples (2 ml per ewe) were collected from each of the animals. These individuals were chosen at randomly to prevent the relationship. Blood samples from sheep representing 10 subpopulations from 3 Turkish native sheep breeds were collected from remote villages belonging to 3 geographic regions in Turkey (Figure 1). Genomic DNA was extracted from the whole blood using the Phenol-chloroform method and then it was dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

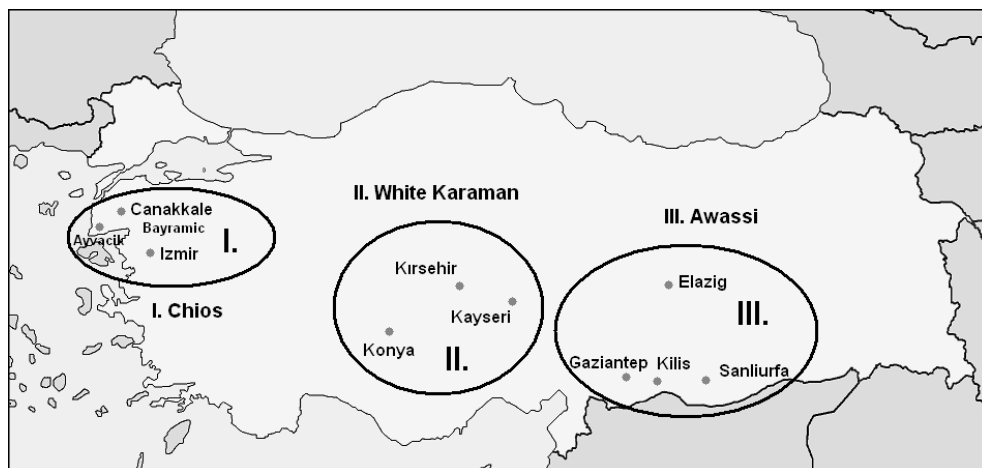


Figure 1  
Geographic distribution of Turkish sheep samples

#### *PCR amplifications and sequence analysis*

PCR amplification for exon 10 and intron 1 (267 and 391bp in length) of the *PRLR* gene was amplified and sequenced using primers and the PCR conditions described by Chu *et al.* (2007). The PCR products, after being purified with the GeneClean Turbo PCR Purification Kit, were sequenced in CEQ 8000 capillary electrophoresis system (Beckman Coulter). The sequencing was done at the Ankara University Biotechnology Institute. Fifty blood samples each of breeds were used for sequence analysis, however, successful results were obtained in only 34 (White Karaman), 37 (Awassi) and 29 (Chios) samples for intron 1 and 18 (White Karaman), 15 (Awassi) and 28 (Chios) samples for exon 10. Sequences were analysed using the BIOEDIT software (Hall 2007, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) for sequence alignment. NETWORK 4.5.1.6. (Bandelt *et al.* 1999, <http://www.fluxus-engineering.com>) was used to build the network of intron 1 and exon 10 haplotype groups using the median joining algorithm. MEGA version 4.1 (Tamura *et al.* 2007, <http://www.megasoftware.net>) was used for the phylogenetic sequence analyses of haplotypes by the Neighbour-Joining method based on Kimura-2P model and the reliability of the inferred tree was assessed by bootstrap (1 000 replicates) (data not shown).

The DnaSP software 5 (Rozas *et al.* 2003) was used to calculate haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ); Watterson's theta estimator for the studied species separately using a haplotype sequence was obtained. Pi is based on the average number of nucleotide differences between the sequence, and theta is based on the total number of segregating sites in the sequence (Iso-Touru *et al.* 2009).

To estimate the effect of selection, we calculated Tajima's D (Tajima 1989), Fu and Li's  $D^*$  and  $F^*$  test (Fu & Li 1993) and Fu's  $F_s$  test (Fu 1997) for each group separately. Tajima's D test compares the difference between the number of segregating sites and average number of pairwise (Tajima 1989). Under neutrality Tajima's D value is assumed to be zero; under

positive selection there is an excess of rare polymorphisms and Tajima's D value is negative. Negative D values can also be due to population expansion. If there is balancing selection, intermediate frequency genetic variants are kept and Tajima's D value is positive (Iso-Touru *et al.* 2009). The statistical analysis package DnaSP 5 (Rozas *et al.* 2003) was used for the neutrality tests.

The impact of amino acid variants on protein structure via analysis of multiple sequence alignments was done with SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), which uses sequence homology to predict whether an amino acid substitution will affect protein function and hence, potentially alter the phenotype. It gives a normalized probability score value that the amino acid change is tolerated. If the score value is less than 0.05, the amino acid change is predicted to be deleterious. The median conservation value for the diversity of the sequence in the alignment is measured as well, and the default value is 3.0. Higher conservation values can lead to higher false positive error (Pauline & Henikoff 2003).

## Results and discussion

In this study, the sequence analysis of the intron 1 and exon 10 of the *PRLR* gene revealed interesting variations in the studied populations and subpopulations. For exon 10, except for reference sequence (AF041257 haplotype 1 [H1]), seven different haplotypes were obtained (Table 1). The most common haplotype was haplotype 5 (H5) for the Chios breed and haplotype 3 (H3) for White Karaman and Awassi. Haplotypes 4-8 (H4-H8) were not detected in either the White Karaman or Awassi breeds. For intron 1, 6 different haplotypes were determined (Table 2). The most common haplotypes were haplotype 2 (H2) for White Karaman and haplotype 4 (H4) for Awassi. However, haplotype 6 (H6) was the most common for the Chios breed. These haplotypes were determined based on reference sequence AF042358 and called H1 in this study. Twelve variations were determined in exon 10, of which seven were non-synonymous mutations: g.14A>T p.Q14L; g.160G>A p.D160N; g.166G>A p.E166K; g.167A>T p.E167V; g.176A>T p.H176L; g.206G>A p.S206N and g.208G>A p.G208R; while five variations (g.2A>T, g.81A>G, g.138A>G, g.186C>T, g.207T>C) were determined as synonymous mutations (Table 1). The *PRLR* haplotype sequences from these sheep breeds have been deposited in the GeneBank database under the acc. no. HM437203 - HM437214.

Based on the observed mismatch distributions and the constructed radiation tree (Figure 2), two main groups were determined with each primer (Table 3). Neutrality tests were applied separately to these haplotype groups.

Neutrality tests at *PRLR* gene, Tajima's D value, Fu and Li's D\* and F\* values and Fu's Fs values are shown in Table 3. Tajima's D value, Fu and Li's D\* and F\* values and Fu's Fs values for intron 1 group A are positive and the others negative. Artificially selected populations, like livestock species, do not fulfil the assumptions of random mating and constant population size for the neutrality test, hence positive Tajima's D values are likely due to the demographic histories of these species or breeds rather than true balancing selection (Iso-Touru *et al.* 2009). Haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity ( $\pi$ ) and Watterson's theta estimator were calculated separately for the studied species using the haplotype sequences obtained. Since in all groups nucleotide diversities were low but haplotype diversities were high, recent population growth is suggested.

Table 1

Polymorphic sites (excluding the ambiguous ones) and amino acid changes at the *PRLR* gene exon 10 for the Turkish sheep breeds. Nucleotides are numbered from 1 to 225, using AF041257 as the reference sequence.

Haplotypes (Genebank acc. no.)	Haplotype frequency												
	White Karaman (n:18)	Awassi (n:15)	Chios (n:28)	2	1	8	1	1	1	1	1	2	2
				4	1	3	6	6	6	7	8	0	0
				8	0	8	0	6	7	6	6	6	8
			AA change	Q		D	E	E	H		S	G	
				1		1	1	1	1		2	2	
				4		6	6	6	7		0	0	
				L		0	6	7	6		6	8	
						N	K	V	L		N	R	
H1 (AF041257)				A	A	A	A	G	G	A	A	C	G
H2 (HM437203)	9	7	1	T	.	G	G	.	A	.	.	.	.
H3 (HM437204)	9	8	2	T	.	G	G	.	.	.	.	.	.
H4 (HM437205)	0	0	2	T	.	.	G	A	.	.	T	T	A
H5 (HM437206)	0	0	12	T	.	.	G	A	.	.	T	T	A
H6 (HM437207)	0	0	1	T	.	.	G	A	.	T	T	T	A
H7 (HM437208)	0	0	8	T	T	.	G	A	.	.	T	T	A
H8 (HM437209)	0	0	2	T	T	.	G	A	.	.	T	T	A

Table 2

Polymorphic sites (excluding the ambiguous ones) at the *PRLR* gene intron 1 for the Turkish sheep breeds. Nucleotides are numbered from 1 to 302, using AF042358 as the reference sequence.

Haplotypes (Genebank acc. no.)	Haplotype frequency												
	White Karaman (n:34)	Awassi (n:37)	Chios (n:29)	4	5	2	2	2	2	2	3		
				9	8	0	3	4	7	8	0		
							1	4	2	2	1	0	
H1 (AF042358)	2	1	2	C	A	G	C	C	C	C	A	A	
H2 (HM437210)	21	10	0	.	.	.	.	.	T	.	.	.	
H3 (HM437211)	4	8	1	T	.	.	.	.	T	.	.	.	
H4 (HM437212)	7	17	5	.	.	A	.	.	T	.	.	.	
H5 (HM437213)	0	1	0	T	.	A	.	.	T	.	.	.	
H6 (HM437214)	0	0	21	.	C	.	T	G	T	T	G		

Table 3

Diversity and neutrality indices in intron 1 and exon 10 *PRLR* gene

	Intron 1 group B	Intron 1 group A	Exon 10 group B	Exon 10 group A
Haplotype number	1	5	5	3
Nucleotide diversity ( $\pi$ )	0.00063	0.00219	0.00348	0.00515
Haplotype diversity (Hd)	0.186	0.584	0.610	0.695
Theta ( $\theta_w$ )	0.55590	0.60570	0.79450	1.19773
Tajima's D	-1.51414	0.18769	-0.04533	-0.09643
Fu & Li's F*	-2.21420	0.75032	-0.18302	-0.60514
Fu & Li's D*	-2.08204	0.84631	-0.20284	-0.70220
Fu's Fs	-1.920	0.171	-1.486	-0.955

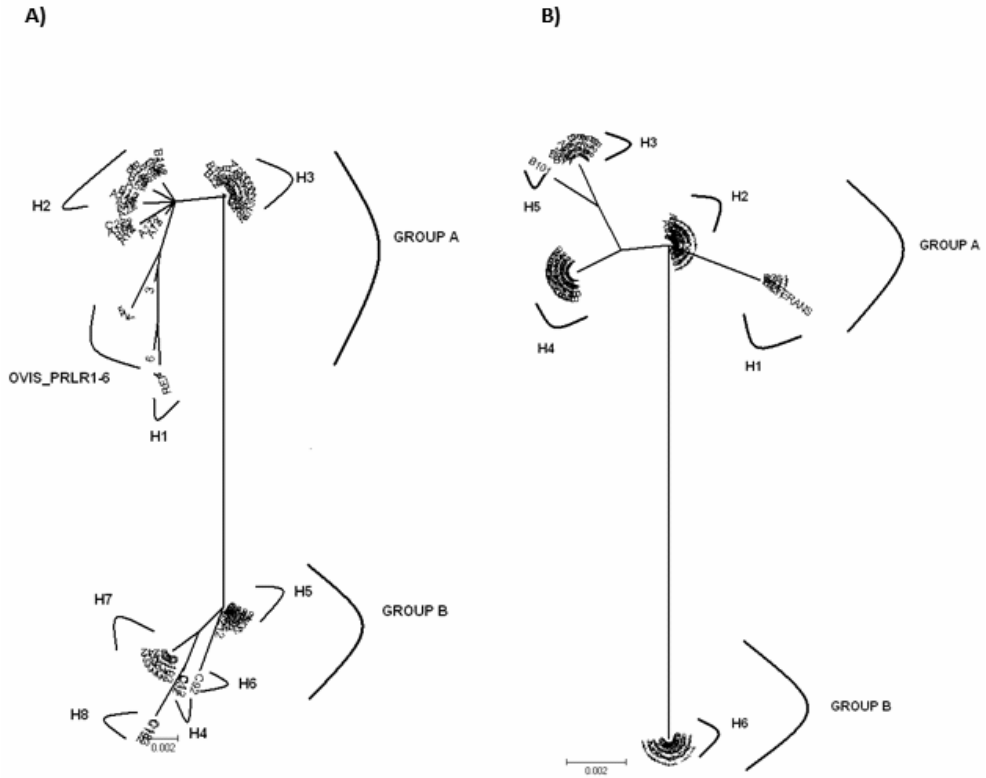


Figure 2  
A neighbour-joining phylogenetic tree (radiation style) constructed from exon 10 (A) and intron 1 (B) sequences of *PRLR* genes from Turkish sheep breeds.

A median joining network for intron 1 and exon 10 is presented in Figure 3 and Figure 4 respectively. For intron 1 haplotypes, H2 differs from the H1 by one nucleotide; H3 and H4 differ from H1 by two nucleotides; H5 differs from H1 by three nucleotides; H6 differs by six nucleotides. The most common haplotype for intron 1 is haplotype 2. Haplotype 6 was observed only in the Chios breed.

The most common haplotype for exon 10 is haplotype 3. For exon 10 haplotypes, H2 differs from H1 by four nucleotides; H3 differs from H1 by three nucleotides; H5 differs from H1 by seven nucleotides; H4, H6 and H7 differ from H1 by eight nucleotides; H8 differs from H1 by nine nucleotides. Haplotypes 4-8 were observed only in the Chios breed.

We studied the possible impacts of the amino acid changes for the protein structure with the methods implemented in SIFT programs. The substitution p.Q14L and p.E167V was predicted to affect the protein function by SIFT analysis (Table 4). These substitutions were observed only in the Chios breed.

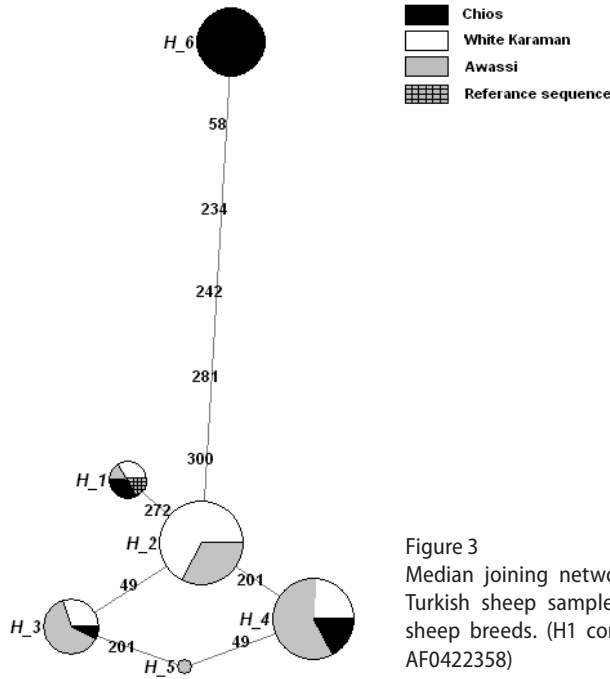


Figure 3  
Median joining network for intron 1 haplotype observed in Turkish sheep samples. Different colours represent different sheep breeds. (H1 contains the reference sequence, which is AF0422358)

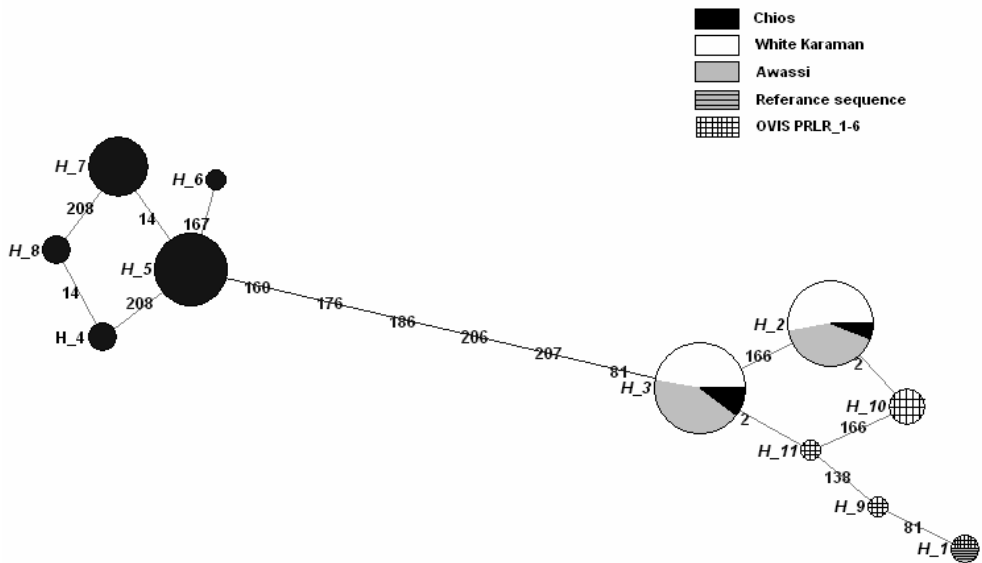


Figure 4  
Median joining network for exon 10 haplotype observed in Turkish sheep samples. Different colours represent different sheep breeds. (Quadratic field represents sheep breeds from Russian, Poland and Finland; H1 contains AF041257 and FJ901299; H9 contains FJ901301; H10 contains FJ901296, FJ901297, FJ901300; H11 contains FJ901298 sequence)

Table 4  
Predicted affection status for the amino acid substitutions from *PRLR* gene exon 10

	SIFT			
	Prediction	Score	MSC	n
Q14L	Affect protein function	0.01	3.45	10
D160N	Tolerated	1.00	3.45	25
E166K	Tolerated	0.15	3.45	17
E167V	Affect protein function	0.03	3.45	1
H176L	Tolerated	1.00	3.45	25
S206N	Tolerated	0.54	3.45	25
G208R	Tolerated	0.34	3.47	4

Studies on the *PRLR* gene have concentrated more on porcine breeds (Kernerova *et al.* 2009). A mutation was identified in the porcine *PRLR* gene (Vincent *et al.* 1998). An *AluI* PCR-RFLP polymorphism was identified in the porcine 457 bp-long fragment of the *PRLR* gene (Vincent *et al.* 1997). A new *HpaI* PCR-RFLP polymorphism was identified in the porcine *PRLR* gene (Putnova *et al.* 2002).

The prolactin receptor (*PRLR*) gene was studied as a candidate gene for the prolificacy of Jining Grey goats. Five pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphisms of exon 10 by PCR-SSCP. Only the products amplified by primers P1, P2, P4 displayed polymorphisms. For primer P1 and primer P2 sequencing revealed two mutations (g.186G>A and g.220T>C; g.52G>A and g.122G>A, respectively) and for primer P4, sequencing revealed one mutation (g.143A>G) of the *PRLR* gene (Zhang *et al.* 2007).

The sheep *PRLR* gene has been screened for polymorphisms by PCR-SSCP (Mu *et al.* 2006). Three genotypes (AA, AB and BB) were detected by three primer pairs. Chu *et al.* (2007) had detected ovine *PRLR* gene polymorphism by PCR-SSCP. Three primer pairs were designed for PCR amplification within intron 1 and exon 10 of the *PRLR* gene in sheep.

The mutations we noticed (g.272 C>T) were identical for each breed to those reported by Chu *et al.* (2007) who found position g.84 T>C in intron 1. These investigators had used two primer pairs (termed primer 1 and primer 2) for intron 1 of the ovine *PRLR* gene amplification. In the present study, we used one primer pair (391bp) for intron 1 *PRLR* gene amplification.

Iso-Touru *et al.* (2009) sequenced *PRLR* gene exon 10 (891bp), coding for the major part of cytoplasmic domain, from 6 different sheep breeds (Romanov breed, Wrzosowka breed, Dagestan local, Andi, sheep from Komi village, Finnsheep and Alandsheep). These researchers were found 6 different haplotypes, which is OVIS\_PRLR1-OVIS\_PRLR6 (GenBank acc. no.: FJ901296-FJ901301).

For exon 10, network analysis was performed with Iso-Touru *et al.* (2009) haplotypes (Figure 4). Accordingly, these haplotypes [H1 (FJ901299), H9 (FJ901301), H10 (FJ901296; FJ901297; FJ901300), H11 (FJ901298)] differ from H2 by g.2A>T variation. H2 appeared in the White Karaman and Awassi breeds. Moreover, g.81A>G, g.138A>G and g.166G>A were determined in the White Karaman and Awassi breeds, as reported for the Russian, Finnish and Polish sheep breeds, which appeared to be the same group based on Haplotype 2 and 3. The Chios breed differs from the White Karaman, Awassi, Russian, Polish and Finnish breeds.

As a result, this suggests that population expansion can be based on the negative neutrality test values obtained in intron 1 group B and exon 10 groups A and B. Under positive selection there is an excess of rare polymorphisms and Tajima's D, Fu and Li's D and F values and Fu's Fs

values are negative. Both population and subpopulation variations for intron 1 and exon 10 of the *PRLR* gene polymorphisms were found in Chios, White Karaman and Awassi ewes. It was interesting to note that White Karaman and Awassi sheep were similar to each other in terms of both intron 1 and exon 10 haplotypes, whereas the Chios breed had different variations.

The Chios breed showed greater and different haplotype diversity and different variations in comparison with White Karaman and Awassi. Whether other gene(s) or quantitative trait loci (QTL) regulating ovulation are also present requires further research. We propose that this difference is probably the consequence of different environmental conditions, selection and possibly even QTL or gene(s) regulating ovulation rate.

In the present study, intron 1 and exon 10 of the ovine *PRLR* gene polymorphisms were screened by the sequencing technique. We have reported here for the first time single nucleotide polymorphisms of the *PRLR* gene for both intron 1 and exon 10 in Turkish sheep breeds. We concluded that the identified SNPs lend themselves readily for further research regarding physiological impacts such as milk production and reproductive traits in livestock.

## Acknowledgements

The sequence experiments were carried out at the Ankara University Biotechnology Institute Genomics Unit. The Project was supported by Tubitak and Scientific Research Projects Council of Firat University (Project code Tubitak 107O894; Fubap: 1502 ).

## References

- Akcapinar H (2000) Sheep Breeding, 2nd ed., Ankara, Turkey
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37-48
- Baran N, Kelly PA, Binart N (2002) Characterization of a prolactin-regulated gene in reproductive tissues using the prolactin receptor knockout mouse model. *Biol Reprod* 66, 1210-1218
- Bignon C, Binart N, Ormandy C, Schuler LA, Kelly PA, Djiane J (1997) Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. *J Mol Endocrinol* 19, 109-120
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225-268
- Cassy S, Charlier M, Belair L, Guillomot M, Charron G, Bloch B, Djiane J (1998) Developmental expression and localization of the prolactin receptor (*PRLR*) gene in ewe mammary gland during pregnancy and lactation: Estimation of the ratio of the two forms of *PRLR* messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 58, 1290-1296
- Chu MX, Mu YL, Fang L, Ye SC, Sun SH (2007) Prolactin receptor as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Anim Biotechnol* 18, 65-73
- Clevenger CV, Freier DO, Kline JB (1998) Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol* 157, 187-197
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709
- Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA, Binart N (2003) Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 12
- Hall T (2007) BioEdit 7.0.9, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> [last accessed 29.08.2011]



- Iso-Touru T, Kantanen J, Li MH, Gizejewki Z, Vilkki J (2009) Divergent evolution in the cytoplasmic domains of *PRLR* and *GHR* genes in Artiodactyla. *BMC Evol Biol* 9, 172
- Jenkins ZA, Henry HM, Sise JA, Montgomery GW (2000) Follistatin (*FST*), growth hormone receptor (*GHR*), and prolactin receptor (*PRLR*) genes map to the same region of sheep chromosome 16. *Anim Genet* 31, 280
- Kernerová N, Matoušek V, Čermáková A, Forbelská M (2009) Role of genetic markers in the prediction of classification of Czech Large White gilts to a hyperprolific line. *Arch Tierz* 52, 40-50
- Kmiec M, Dybus A, Terman A (2001) Prolactin receptor gene polymorphism and its association with litter size in Polish Landrace. *Arch Tierz* 44, 547-551
- Kovacs K, Fesus L, Zsolnai A, Nyiri A, Anton I (2010) Porcine prolactin receptor genotypes and production and reproduction traits in Hungarian Large White and Landrace sows (Brief Report). *Arch Tierz* 53, 497-499
- Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinol* 139, 4102-4107
- Mu YL, Chu MX, Su SH, Fang L, Ye SC (2006) PCR-SSCP Analysis on prolactin receptor gene in sheep. *Acta Vet Zoot Sin* 10, 956-960 [in Chinese]
- Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11, 167-178
- Pauline CN, Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31, 3812-3814
- Putnová L, Knoll A, Dvořák J, Čepica S (2002) A new HpaII PCR-RFLP within the porcine prolactin receptor (*PRLR*) gene and study of its effect on litter size and number of teats. *J Anim Breed Genet* 119, 57-63
- Rozas J, Sanchez DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinform* 19, 2496- 2497
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA (1990) Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol Endocrinol* 4, 1136-1143
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genet* 123, 585-595
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599
- Tzeng SJ, Linzer DI (1997) Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 48, 45-52
- Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Robic A, Rothschild MF (1997) Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm Genome* 8, 793-794
- Vincent AL, Evans G, Short TH, Southwood OI, Plastow GS, Tuggle CK, Rothschild MF (1998) The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. *Proceeding 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Armidale 27, 15-18
- Zhang GX, Chu MX, Wang JY, Fang L, Ye SC (2007) Polymorphism of exon 10 of prolactin receptor gene and its relationship with prolificacy of Jining Grey goats. *Yi Chuan* 29, 329-336 [in Chinese]

*Received 30 November 2010, accepted 7 March 2011.*

---

Corresponding author:

Ozge Ozmen

email: oozmen@firat.edu.tr or ozgeozmen@gmail.com

Department of Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine, Firat University, TR-23119 Elazig, Turkey

---

## Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5

Nilgün TEKİN<sup>1</sup>, Arzu ÇÖLERİ CİHAN<sup>2</sup>, Zekiye Serpil TAKAÇ<sup>3</sup>, Canan YAĞCI TÜZÜN<sup>2</sup>,

Kenan TUNÇ<sup>4</sup>, Cumhuri ÇÖKMÜŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Institute, Ankara University, 06500 Ankara - TURKEY

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, 06100 Tandoğan, Ankara - TURKEY

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, 06100 Tandoğan, Ankara - TURKEY

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Sakarya University, 54187 Esentepe, Sakarya - TURKEY

Received: 08.04.2011 • Accepted: 29.02..2012

**Abstract:** An obligate alkaliphilic *Bacillus* strain was isolated from a soil sample and identified as *Bacillus cohnii* APT5 based upon phylogenetic and phenotypic analyses. The optimum growth pH of *B. cohnii* APT5 was 10.0. *B. cohnii* APT5 was also found capable of producing an extracellular alkaline protease that showed optimum activity (693,318 U/min) at 50 °C and pH 11.0 when grown in a medium containing casein. The enzyme was partially purified 3.22-fold with a yield of 78.74% after acetone precipitation and cation exchange column chromatography, respectively. The partially purified enzyme maintained its activity when incubated at 50 °C for 2 h. It was stable at pH 11.0 at room temperature for 72 h. Furthermore, the alkaline protease activity was not completely inactivated by the specific inhibitors of serine alkaline proteases and metalloproteases such as PMSF and EDTA. While 1 mM PMSF had no effect on the enzyme activity, a 10 mM concentration of PMSF slightly decreased the activity, producing a relative activity of 76%. In addition, the enzyme was found to be very stable toward surface active agents such as SDS, Tween 20, Tween 80, and Triton X-100. None of the metal ions used (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>) showed an inhibitory effect on enzyme activity. On the contrary, APT5 alkaline protease activity increased 53% when treated with Mn<sup>2+</sup>. It was concluded that the active center of APT5 alkaline protease required Mn<sup>2+</sup> as a cofactor. Based on the thermostability, pH stability, and resistance of *B. cohnii* APT5 alkaline protease against inhibitors, this enzyme may be very useful in commercial applications, particularly in the detergent industry.

**Key words:** Alkaliphilic *Bacillus*, alkaline protease, enzyme purification, 16S rRNA gene sequence, phylogenetic analysis

### Introduction

Proteolytic enzymes play a specific catalytic role in the hydrolysis of proteins. They are widespread in all living organisms as they are essential for cell growth and differentiation (1). Proteases are categorized as serine proteases, aspartic proteases, cysteine proteases, and metalloproteases depending on their catalytic mechanism. They are also classified into different families and clans depending on their amino acid sequences and evolutionary relationships. Based

on their optimal pH activity, they are referred to as acidic, neutral, or alkaline proteases (2). Moreover, bacterial proteases are now among the largest classes of industrial enzymes, accounting for 60% of total worldwide enzyme sales (2).

Among proteases, alkaline proteases (EC 3.4.21-24) are defined as enzymes that are active from the neutral to the alkaline pH range (1). These enzymes are generally active between pH 9.0 and 11.0, with the exception of a few higher pH values of about 12.0

and 13.0 (3). Alkaline proteases are a physiologically and commercially important group of enzymes used in various branches of industry, such as the detergent, food, leather tanning, pharmaceutical, and textile industries (3,4).

Alkaliphilic *Bacillus* strains constitute an important source of extracellular enzymes that are useful for numerous industrial processes (5,6). This group includes facultative and obligate alkaliphilic species that grow well at pH values higher than 9.0. Alkaliphilic *Bacillus* strains secrete large amounts of alkaline proteases with a high stability at elevated pH and temperature values. In the 1960s, the first detergent containing a bacterial protease appeared on the market. This enzyme, subtilisin Carlsberg, is one of the validly characterized subtilisins from *Bacillus licheniformis* (7). Because of the extreme properties of bacterial - alkaline proteases produced by *Bacillus* strains in particular are considered as compatible additives for laundry detergents (2,8). Some examples of industrially important alkaliphilic *Bacillus* strains were also studied, including a protease-producing strain, *Bacillus* sp. D-6 (JCM 9154) (9); a cyclomaltodextrinase producer strain, *Bacillus* sp. 199 (10); a serine protease-producing strain, *Bacillus* sp. Y (11); an oxidatively stable alkaline protease-producing strain, *Bacillus* sp. SD 521 (12); an alkaline protease-producing strain, *Bacillus pumilus* (13); an alkaline protease-producing strain, *Bacillus cereus* (14); an alkaline serine protease-producing strain, *Bacillus licheniformis* BA17 (15); and an alkaline serine protease-producing strain, *Bacillus clausii* GMBE 22 (16). Among the above-mentioned enzymes, the alkaline protease from *Bacillus* sp. SD 521 was also patented (US 7.371.839.B2).

Here we report the physiologic and phylogenetic characters of an obligate alkaliphilic, *Bacillus cohnii* APT5, as well as the partial purification and characterization results from its novel, extremely stable alkaline protease. Data including thermal and pH activity and stability and the effect of some inhibitors, metal ions, surface active agents, and oxidizing agents on APT5 alkaline protease are also reported. Results show that enzymatic properties distinct from other characterized alkaliphilic bacilli alkaline proteases were produced.

## Materials and methods

**Bacterial strains:** In this study, a total of 57 bacterial isolates were screened for alkaline protease activity. Of these isolates, 46 thermophilic and 2 halophilic isolates were obtained from our microbiology research laboratory culture stocks. In addition, 9 isolates from APT1 to APT9, including APT5, were newly isolated from a soil sample taken at a car wash in the Beşevler area of Ankara, Turkey. The protease-producing standard strain, *Bacillus licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>, was obtained from the DSMZ (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

**Isolation and the screening for protease production:** The soil samples (0.2-0.4 g) were inoculated in nutrient broth for all isolation and enrichment procedures. The pH of the medium was adjusted to 10.0 by adding 1 N NaOH solution aseptically after sterilization. Inoculated samples were cultivated at 37 °C by shaking at 200 rpm for 48 h. The turbid cultures were diluted with saline solution and transferred onto skim-milk agar (pH 10.0) plates (17). Skim-milk agar medium (pH 10.0) was also used for purification and screening isolates for protease production. The inoculated plates were incubated for 72 h at 37 °C for mesophilic isolates and at 55 °C for thermophilic isolates. Protease-producing strains, which gave a clear zone around colonies due to the hydrolysis of skim milk, were selected. The zone diameters were also compared with standard strain *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>.

**Culture conditions for alkaline protease production and determination of alkaline protease activity:** Medium containing 0.5% casein was used for enzyme production as described by Gessesse and Gashe (18). The pH of the medium was adjusted to pH 7.0 and 9.0 by adding sterile 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution after sterilization. Actively growing cells were suspended in 0.85% sterile NaCl to an absorbance value of 0.2-0.4 at 660 nm, and then 500 µL of the resulting suspension was inoculated into 5 mL of enzyme production medium and cultivated at 37 °C for mesophilic isolates and at 55 °C for thermophilic isolates by shaking at 200 rpm for 72 h. The cells were removed from the culture medium by centrifugation at 5000 rpm for 20 min at 4 °C, and the wet weights of the cells were determined. The resulting supernatants were used for the extracellular enzyme source. In

addition, alkaline protease activity was measured as described by Takami et al. (19), by using casein (Sigma C7078) as a substrate. One unit of alkaline protease activity was defined as the amount of the enzyme capable of producing 1 µg of tyrosine in 1 min under standard assay conditions. All enzyme activity assays were carried out in triplicate.

**Morphologic and physiologic characterization analysis:** Cells actively growing on nutrient agar plates (pH 7.0 and 9.0) were used for cell and colony morphology. The formation of spores was tested by using nutrient broth cultures of 18-24 h supplemented with 5 mg/L of  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  and observed under a phase-contrast microscope. Temperature (15-60 °C), pH (6.5-12.5), and salinity (2%-10% NaCl) ranges for growth were tested in nutrient broth, and after 24 h of incubation at 37 °C the optic density of the cells at 600 nm was measured. Physiological characterization tests including Gram staining; anaerobic growth; catalase and amylase activities; casein, citrate, starch, tyrosine, gelatin, and urea utilization; reduction of nitrate to nitrite;  $N_2$  gas production from nitrate; acid production from sugars; the methyl red test; the Voges-Proskauer test; indole and  $H_2S$  production; and susceptibility to lysozyme were carried out according to the methods of Claus and Berkeley (20), as previously described. A disk diffusion test was performed using nutrient agar plates for antimicrobial susceptibility testing. The disks (Oxoid) and their contents were as follows: vancomycin (30 µg), bacitracin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), rifampicin (30 µg), tetracycline (30 µg), penicillin G (10 U), neomycin (30 µg), novobiocin (30 µg), kanamycin (30 µg), and azithromycin (15 µg). Plasmid DNA isolation was carried out according to the method of Anderson and McKay (21). All assays were performed with pure cultures in triplicate.

**16S rRNA gene amplification and sequencing:** Genomic DNA was extracted from the cultures growing in nutrient broth for 18 h at 37 °C using a genomic DNA purification kit (Fermentas). The gene encoding 16S rRNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the 16S bacteria-specific primers of 27F forward and the 1492R reverse primer (22). The reaction mixture contained 1X Taq buffer with  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.2 mM dNTP mix, 0.25 µM forward and 0.25 µM reverse primer, 1.25 U Taq

polymerase (Fermentas), 200 ng genomic DNA, and 1 mM  $MgCl_2$  for a total volume of 50 µL. The reaction conditions were as follows: after initial denaturation at 94 °C for 2 min, 30 cycles were carried out with a denaturation step at 94 °C for 45 s, an annealing step at 55 °C for 45 s, and an elongation step at 72 °C for 1.5 min. Amplification was completed with a final extension step at 72 °C for 7 min. The amplification products were purified with a PCR purification kit (Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System). The sequence of the PCR-amplified 16S rRNA gene (1420 bp) was determined with the Beckman Coulter CEQ Genetic Analyzer.

**Phylogenetic analysis:** Evolutionary history was designated using the neighbor-joining method (23). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken into the evolutionary history of the taxa analyzed (24). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% of bootstrap replicates were collapsed. Evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method (25) and are given in the units of the number of base substitutions per site. The phylogenetic tree was constructed with the MEGA package, version 4 (26).

**Partial purification of the enzyme:** Alkaline protease production was carried out using medium (pH 10.0) containing 0.5% casein as described by Gessesse and Gashe (18). Erlenmeyer flasks (500 mL) containing 100 mL of medium were inoculated by a culture of 18 h old with a 1% v/v ratio and cultivated at 37 °C by shaking at 200 rpm for 72 h. After cultivation, the culture was centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C), and the resulting supernatant was used as an enzyme source for further purification procedures, which were carried out at 4 °C. The supernatant was precipitated by the addition of cold acetone (-20 °C) with a saturation of 85% and stored at -20 °C overnight. The protein aggregates were collected by centrifugation, washed with 100% acetone, dried at room temperature, and then dissolved in 4.7 mL of 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.0). This sample was applied to a Bio-Rad UNO S column (Bio-Rad Duo Flow System) for cation exchange chromatography. The loading buffer of 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0) was used with a flow rate of 1.0 mL/min. The column was eluted with a linear gradient of the

same buffer containing 1 M NaCl with a flow rate of 1.0 mL/min. The fractions (0.4 mL) were collected using a fraction collector (Bio-Rad BioFrac Fraction Collector). The protein content and the proteolytic activity of the fractions were measured, and those showing proteolytic activity were pooled and used for enzyme characterization.

**Electrophoretic analysis:** Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE) was carried out according to the modified method of Kazan et al. (27). A 10% (w/v) concentration of resolving gel containing 1% skim milk was used in electrophoresis, which was run in duplicate. One side of the gel was stained using silver staining according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Silver Stain Plus Kit, 161-0449), while the other was developed for activity staining. The gel used for activity staining was stained with 0.2% Coomassie blue G250 solution as described by Kazan et al. (27), and a clear zone on the gel indicated the presence of alkaline protease activity.

**Effect of temperature and pH on enzyme activity:** Experiments on the effect of temperature and pH on purified enzyme activity were performed as described for the standard protease assay by using casein as a substrate. The temperature profile of the enzyme activity was measured from 30 to 85 °C using 50 mM glycine-NaOH buffer at pH 10.0. The effect of pH on the activity was studied over a range of pH levels, from 7.0 to 13.0, at 50 °C. When determining the pH profile, casein was dissolved in 50 mM glycine-NaOH buffer at pH values from 8.0 to 12.0, whereas 200 mM glycine-NaOH buffer was used for testing the activity at pH 12.5 and 13.0 (27).

**Temperature and pH stability of enzyme:** Thermal stability was determined by incubating the purified enzyme at its optimum temperature for 20 min and 4 h at 30 °C for 3 days. The pH stability of the enzyme was tested by treating the enzyme with 50 mM glycine-NaOH buffer at its optimum pH for 3 days at room temperature. The residual activities of the enzyme were then measured. The activity of the nonheated and non-pH-treated enzyme was expressed as 100% (27).

**Effects of metal ions on enzyme activity:** To determine the effect of metal ions on enzyme activity, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, and MnSO<sub>4</sub> were

used by adding these ions to the assay mixture at a concentration of 5 mM. Relative enzyme activities were measured at optimum temperature. The activity under these conditions in the absence of metal ions was expressed as 100%.

**Effect of inhibitors, surfactants, and hydrogen peroxide on enzyme activity:** Inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 1 and 10 mM), ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA, 2.5 mM), and urea (1 M); surfactants such as sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.5% and 1%), Tween 20 (1%), Tween 80 (1%), and Triton X-100 (1%); and oxidizing agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% and 5%) were used for sensitivity experiments. The proteases of *Bacillus* sp. (Sigma P5985) and *B. licheniformis* (Sigma P4860) were also treated with a 10 mM concentration of PMSF. When determining sensitivity to inhibitors, the purified protease was preincubated with the stock solutions of each reagent at a ratio of 1:1 at 30 °C for 2 h in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.5), and the protease activity was assayed as described previously in the standard assay. The residual activities were then determined, and activity under these conditions in the absence of these reagents was expressed as 100%.

## Results and discussion

**Alkaline protease producer isolates:** Of the 57 thermophilic, halophilic, and alkaliphilic bacterial isolates, 14 isolates were found to grow and produce a proteolytic zone on skim-milk agar plates at pH 9.0 and 10.0, as in the case of reference strain *B. licheniformis* DSM 13. These isolates were selected for further spectrophotometric protease assays. When determining the alkaline protease production capacities of these 14 isolates, enzyme activity values per pellet wet weight (U/mg) were determined, and it was revealed that an obligate alkaliphilic bacterium, APT5, produced higher amounts of alkaline protease (1555 U/mg) than reference strain *B. licheniformis* DSM 13 (1197 U/mg) at 37 °C and at pH 10.0 when their 48-h-old cultures were used. As a result, further purification and enzyme characterization experiments were carried out using strain APT5.

**Phenotypic characteristics of strain APT5:** Cells of isolate APT5 were gram-positive, motile, and rod-shaped with terminal, ellipsoidal endospores

occurring in a swollen sporangia. The APT5 strain was aerobic and obligate alkaliphilic. Growth was observed at 25-55 °C (optimum: 37 °C) and pH 9.0-12.0 (optimum pH 10.0), but the strain could not be grown below pH 9.0. Growth occurred under 2%-10% concentrations of NaCl. Isolate APT5 utilized a wide range of carbon sources including maltose, D-fructose, D-glucose, saccharose, and D-mannitol, but was not able to ferment lactose, D-xylose, raffinose, D-(+)-galactose, D-sorbitol, or L-arabinose. Casein, gelatin, starch, citrate utilizations and amylase and catalase activities were all positive, but urea and tyrosine could not be utilized. It was able to reduce nitrate to nitrite, but gas production was not observed from nitrate. The methyl red and Voges-Proskauer tests were negative. Indole and H<sub>2</sub>S were not produced. Isolate APT5 was found to be sensitive to lysozyme and all of the antibiotics tested.

**Phylogenetic analysis:** The 16S rRNA gene sequence of strain APT5 was analyzed to determine its phylogenetic position. The 16S rRNA gene sequence data of strain APT5 were deposited in the GenBank (accession number: JF689927). A 1406-bp 16S

rRNA gene sequence was compared with those of other related bacteria. The phylogenetic tree is shown in Figure 1. The 16S rRNA gene sequence similarity demonstrated that strain APT5 was a member of the genus *Bacillus*. A 100% 16S rRNA gene sequence similarity value with *B. cohnii* DSM 6307<sup>T</sup> and nonvalidly published strains of *Bacillus* sp. D6 (JCM 9154), *Bacillus* sp. 199 (JCM 9163), *Bacillus* sp. Y, *Bacillus* sp. SD521, and *Bacillus* sp. 12-1 was observed. In the 16S rRNA gene sequence analysis, strain APT5 was clustered within these industrially important alkaliphilic strains, and thus strain APT5 was identified as a species of *B. cohnii*.

**Partial purification of alkaline protease:** After cation exchange chromatography, alkaline protease activity was measured in the first 2 major protein peaks that came with the NaCl gradient in the elution activity profile. Fractions showing alkaline protease activity from fraction numbers 16 to 30 and 31 to 40 of peak 1 and peak 2, respectively, were pooled for anionic *Bacillus cohnii* APT5 enzyme. The elution profile of *B. cohnii* APT5 alkaline protease after cation exchange chromatography is shown in Figure 2.

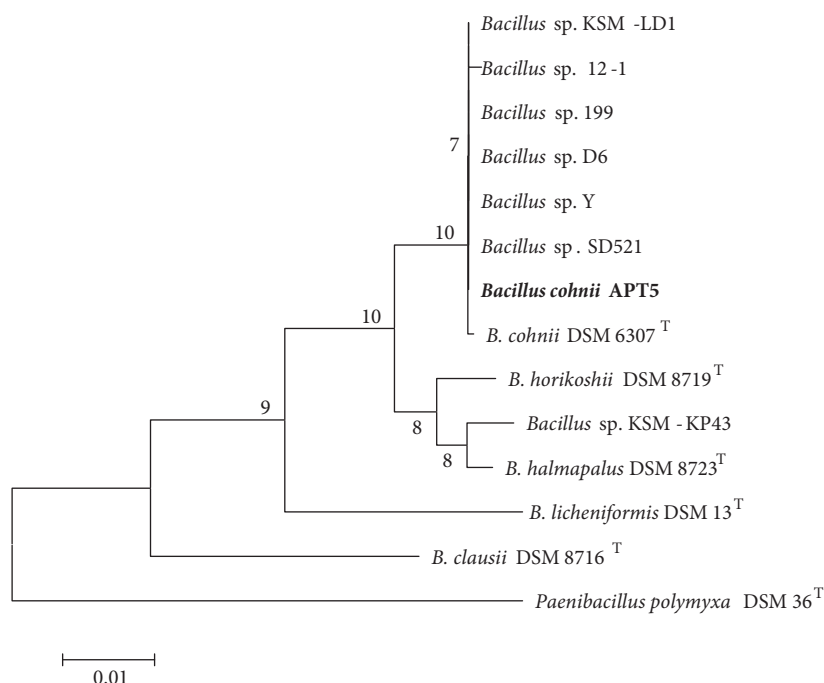


Figure 1. Phylogenetic tree of *Bacillus cohnii* APT5 associated with the other members of the genus *Bacillus*. Bootstrap values (%) are based on 1000 replicates and shown for branches with more than 50% bootstrap support. Bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position. The 16S rRNA gene sequence of *Paenibacillus polymyxa* DSM 36<sup>T</sup> was chosen arbitrarily as an outgroup.

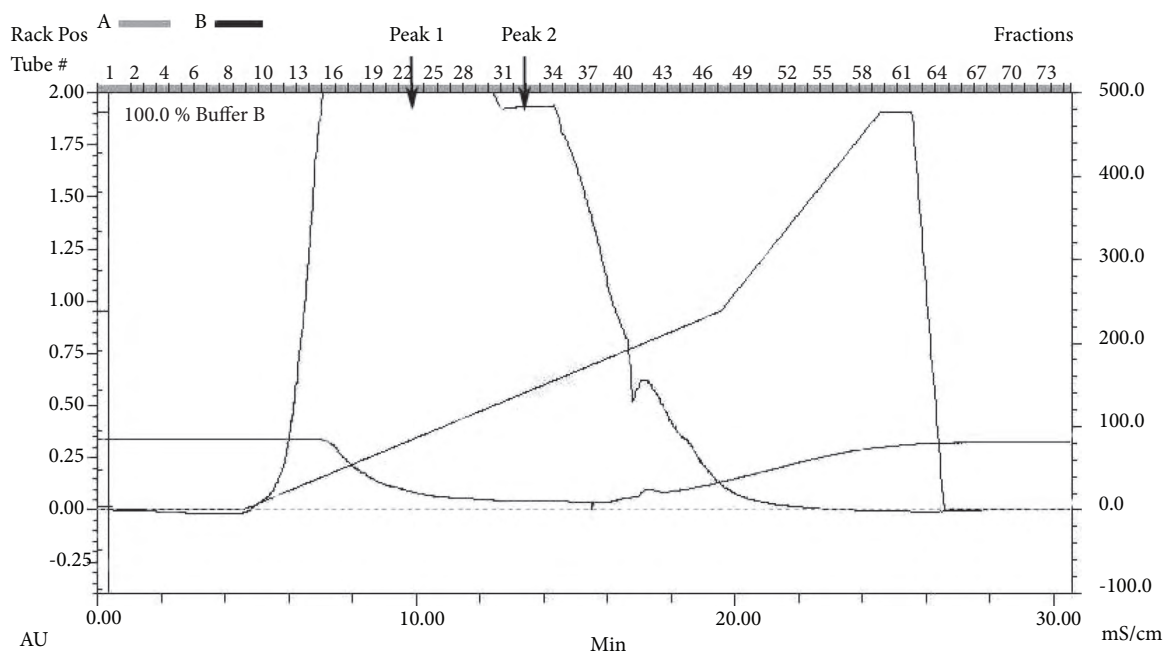


Figure 2. The elution profile of *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease after cation exchange chromatography. The first 2 major protein peaks show enzyme activity (peak 1: fractions showing alkaline protease activity from fraction numbers 16 to 30; peak 2: fractions showing alkaline protease activity from fraction numbers 31 to 40).

A 3.22-fold purification was achieved from the crude culture broth, with a recovery of 78.74% activity. The specific activity of the partially purified enzyme was 1342.17 U/mg (enzyme activity measured in glycine-NaOH buffer, pH 10.0, at 37 °C).

The partially purified fractions from each purification step were loaded onto native PAGE; activity-stained and silver-stained gel electrophoresis results are shown in Figures 3a and 3b, respectively. The culture supernatant, the acetone-precipitated enzyme sample, and the cation exchange-subjected enzyme fraction of *B. cohnii* APT5 all showed 4 bands with proteolytic activity on the skim milk-containing native gel developed at pH 10. The protease activity bands were visualized as clear colorless bands against a blue background on the destained side of the native PAGE (Figure 3a). The other side of the gel, which was silver-stained, also confirmed the presence of 4 bands, as shown in Figure 3b. In conclusion, the cation exchange chromatography profile was in congruence with the native PAGE results. These bands may belong to different proteases, may be different isomers of the same enzyme, or may be the protease artifacts of the same enzyme.

Rai and Mukherjee reported that a bacterium may produce arrays of extracellular protease isoenzymes for its survival and growth in a particular habitat (28). In relation to these findings, there are only a limited number of studies dealing with the isoenzymes of alkaline proteases produced by genus *Bacillus*. Among these studies, Mala and Srividya reported isolating 2 different isoenzymes with molecular weights of 66 kDa and 18 kDa from *Bacillus* sp. Y, which had a close homology with *Bacillus cohnii* YN-2000 protease (29).

**Effect of temperature on enzyme activity and stability:** Alkaline protease from *B. cohnii* APT5 was found to be active at a wide range of temperatures, between 30 and 75 °C. *B. cohnii* APT5 alkaline protease showed optimal activity at 50 °C and pH 10.0 (Figure 4). The enzyme was found to be stable from 40 to 75 °C and had a half-life of 4 h at 75 °C. It also showed 100% stability for up to 4 h at 50 °C as its optimal temperature and retained all of its activity and stability after 72 h at 30 °C.

In general, most of the commercially available alkaline proteases show optimum activity at temperatures ranging from 50 to 70 °C (1,3). The

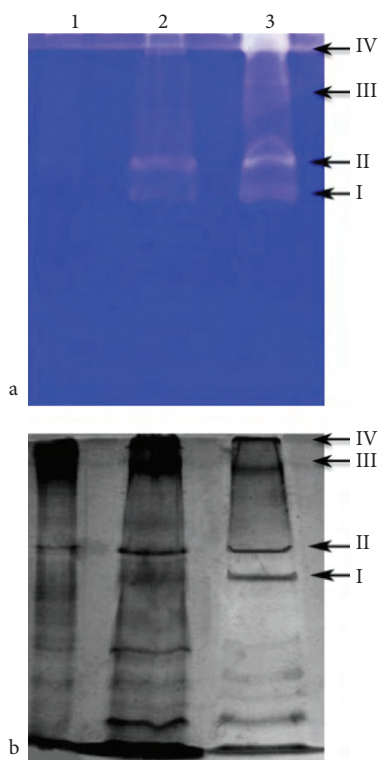


Figure 3. Native PAGE of partially purified *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease. Arrows I, II, III, and IV show 4 different proteolytic activity bands. a) Samples stained with Coomassie brilliant blue R-250, b) samples stained with silver native gel. Lane 1, crude extract; lane 2, acetone precipitation of crude extract; lane 3, partially purified enzyme from cation exchange chromatography.

alkaline protease of *Bacillus* sp. B18 is the enzyme with the highest optimal temperature value (85 °C) among alkaline protease-producing species from the genus *Bacillus* (3). Ferrero et al. reported an alkaline protease from *B. licheniformis* with optimum activity at 60 °C and stability for 10 min between 30 and 60 °C (30). A serine alkaline protease from *B. pumilus* was found to be most active at 55 °C; nevertheless, it retained only 50% of its activity after 30 min of incubation at 50 °C (31). Other studies of serine alkaline proteases from 2 different *B. clausii* strains revealed that both of their enzymes had optimum activity at 60 °C, but that they had different thermostability profiles. While *B. clausii* I-52 was found to be stable for 1 h at 55 °C, *B. clausii* GMBAE 42 showed 55% activity after 30 min of incubation at 60 °C and lost all its activity after 2 h of incubation (27,32). Therefore, it can be concluded

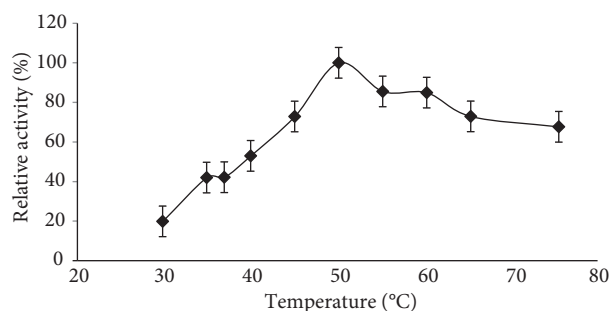


Figure 4. Effect of temperature on *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease.

that the alkaline protease of *B. cohnii* APT5 differs from the above-mentioned proteases of the *Bacillus* species due to its high thermostability at its optimal temperature.

**Effect of pH on enzyme activity and stability:** The effect of pH on enzyme activity is shown in Figure 5. The enzyme was active over a broad pH range, from 8.0 to 13.0, with an optimum of pH 11.0. Enzyme activity decreased below pH 8.0, and relative activity was measured as 9% at pH 7.0. On the other hand, relative activity began to increase at pH 8 (Figure 5). The highest enzyme activity was between pH 10.0 and 12.0, and at these pH values, the relative activity was 92% and 87%, respectively. The enzyme retained 100% of its activity after incubation at its optimum pH of 11.0 at 30 °C for up to 72 h.

The pH range for alkaline proteases were usually between pH 8.0 and 12.0, and the optimum pH values of various *Bacillus* species differed within the pH ranges from pH 10.0 to 11.0 (1). Nevertheless Nilegaonkar et al. reported that the dehairing

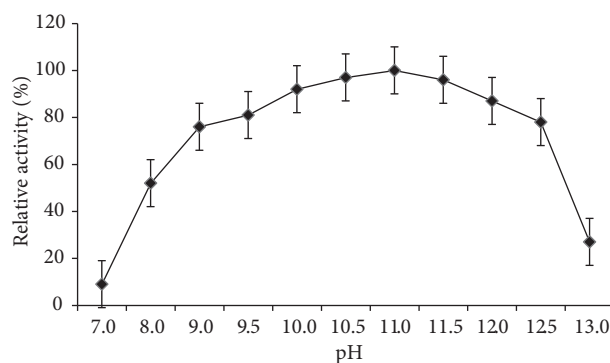


Figure 5. Effect of pH on the activity of *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease.



protease of *B. cereus* MCM B-326 had an optimum pH of 9.0 (33). Apart from this exception, optimal pH values for alkaline proteases from *Bacillus* sp. and *B. licheniformis* were in the range of pH 12.0-13.0 (30,34). On the other hand, the pH stabilities of *Bacillus* alkaline proteases were measured at temperatures varying from 25 to 40 °C for 60 min (34-36). Joo et al. reported a serine alkaline protease from *B. clausii* I-52, which was stable from pH 5.0 to 12.0 after incubation at 30 °C for 3 days (32). An alkaline protease from *B. mojavensis* was found to be stable at pH values ranging from 7.0 to 11.5 at 25 °C for 2 days (37). In addition, the pH stability of a serine alkaline protease from *B. clausii* GMBAE 42 was determined within the pH range of 9.0-11.5 after incubation at room temperature (27). The optimum pH of alkaline protease from *B. cohnii* APT5 was in the range of other bacilli proteases and was also found to be very stable at its optimal pH, which offers great potential, especially in the detergent industry.

**Effect of metal ions on enzyme activity:** The effect of metal ions on *B. cohnii* APT5 alkaline protease activity is presented in Table 1. The ion Ca<sup>2+</sup> is known to play a major role in enzyme stability by increasing the activity and thermal stability of alkaline proteases (38,39). In contrast to this finding, there was no effect of the metal ions Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on *B. cohnii* APT5 alkaline protease. In addition, the ions Mg<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> showed only a slight inhibitory effect on enzyme activity (4% and 3%, respectively). On the other hand, Mn<sup>2+</sup> increased enzyme activity by up to 53%. As in previous reports on alkaline proteases from *Bacillus* sp. RGR-14 and *B. clausii* GMBAE 42, *B. cohnii* APT5 alkaline protease activity was stimulated

Table 1. The effect of metal ions on *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease activity.

Metal ions	Relative activity (%)
Ca <sup>2+</sup>	101
Mg <sup>2+</sup>	96
Zn <sup>2+</sup>	100
Fe <sup>2+</sup>	97
Mn <sup>2+</sup>	153

when treated with Mn<sup>2+</sup> ion, and therefore it was revealed that the enzyme had a requirement for Mn<sup>2+</sup> as a cofactor (27,40).

**Effect of inhibitors, surfactants, and hydrogen peroxide on enzyme activity:** Inhibitors known to be specific to the different classes of proteases were used to determine the nature of protease produced by *B. cohnii* APT5. The effects of inhibitors, surfactants, and hydrogen peroxide on enzyme activity are shown in Table 2. Serine alkaline proteases are known to be completely inhibited by PMSF (41). Most of the earliest studies reported that 1-5 mM concentrations of PMSF generally completely inactivated serine alkaline proteases (31,34,36,42).

Table 2. The effect of some inhibitors, surfactants, and hydrogen peroxide on *Bacillus cohnii* APT5 alkaline protease activity.

Additives	Relative activity (%)
Oxidizing agent	
1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	113
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	102
Surface active agents	
0.5% (w/v) SDS	105
1% (w/v) SDS	107
1% (w/v) Tween 20	100
1% (w/v) Tween 80	108
1% (w/v) Triton X-100	116
Inhibitors	
2.5 M EDTA	105
1 M Urea	108
1 mM PMSF	100
10 mM PMSF	76
<i>Bacillus</i> sp. (Sigma P5985) + 10 mM PMSF	23
<i>Bacillus licheniformis</i> (Sigma P4860) + 10 mM PMSF	62

However, when the alkaline protease of *B. cohnii* APT5 was treated with 1 and 10 mM concentrations of PMSF, the 1 mM PMSF concentration had no effect on enzyme activity, whereas 10 mM PMSF slightly inhibited the activity with a relative enzyme activity value of 76%. Protease from *Bacillus* sp. (Sigma P5985) and protease from *B. licheniformis* (Sigma P4860) were also subjected to a 10 mM concentration of PMSF, and residual activities were measured at 23% and 62%, respectively (Table 2). Based on previous reports and findings, including the effect of PMSF on alkaline protease from *B. cohnii* APT5, we suggest that APT5 alkaline protease does not belong to the family of serine proteases because of its resistance to high concentrations of PMSF.

Some of the alkaline proteases were found to be metal ion-dependent in view of their sensitivity to chelating agents such as EDTA (43,44). No inhibition was detected when the metalloprotease inhibitor EDTA was added to the alkaline protease of *B. cohnii* APT5. The enzyme was also not inactivated with a 1 M concentration of urea. On the contrary, EDTA and urea activated the alkaline protease, producing relative activity values of 5% and 8%, respectively (Table 2). According to these results, the alkaline protease of *B. cohnii* APT5 does not seem to belong to the metalloproteases.

In addition to temperature and pH stability, a good detergent protease should be stable against various surface active agents and oxidizing agents used as detergent components (27). Investigations of *Bacillus* sp. alkaline protease revealed that a 0.5% concentration of SDS completely inhibited its activity (34). As in the case of *Bacillus* sp. alkaline protease (34), *Bacillus* sp. RKY3 protease was found to be inactivated by 23% with 1% SDS (42). On the other hand, Joo et al. reported a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52 that was stable under 1% SDS and could protect 78% of its activity when treated with 5% SDS (32). The enzyme of *B. cohnii* APT5 was treated with up to 1% concentrations of SDS and retained 93% of its activity (Table 2). It is obvious that the alkaline protease of *B. cohnii* APT5 is more resistant to SDS than most of the other bacilli proteases.

When the alkaline protease was subjected to Triton X-100 and the nonionic surfactants Tween 20 and Tween 80, no loss of enzyme activity was detected. Triton X-100 and Tween 80 activated the enzyme, producing relative activity of 16% and 8%, respectively (Table 2). This increase in enzyme activity may be due to the effect of surfactants on the unfolding of the substrate moiety as reported previously (45,46).

The oxidizing agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1% and 5% concentrations showed no inhibitory effect on enzyme activity. By contrast, the enzyme activated 2% and 13% with these H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (Table 2). A previous investigation of alkaline protease from *Bacillus* sp. RGR-14 by Oberoi et al. (40), which was incongruous with our findings, showed a 40% activity loss with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 1 h of incubation.

In this study, we partially purified and characterized the alkaline protease from a newly isolated *B. cohnii* APT5 strain that was found to be resistant to inhibitors, surfactants, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It also possesses high pH stability, thermostability, and laundry detergent compatibility. All of these results make *B. cohnii* APT5 alkaline protease suitable for use in the detergent industry as a potential additive.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Ankara University Biotechnology Institute, (project number 2004-133). In addition, we would like to thank Associate Prof Hilal Özdağ (Genomics Unit, Biotechnology Institute Central Laboratory, Ankara University) and Associate Prof Duygu Özel Demiralp (Proteomics Unit, Biotechnology Institute Central Laboratory, Ankara University) for their contributions.

#### Corresponding author:

Cumhur ÇÖKMÜŞ

Department of Biology,

Faculty of Science,

Ankara University,

06100 Tandoğan, Ankara - TURKEY

E-mail: cokmus@science.ankara.edu.tr

## References

- Gupta R, Beg QK, Khan S et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 381-395, 2002.
- Rao MB, Tanksale AM, Mohini SG et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R* 62: 597-635, 1998.
- Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Advances* 17: 561-594, 1999.
- Cowan D. Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol* 14: 177-178, 1996.
- Ito S, Kobayashi T, Ara K et al. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* 2: 185-190, 1998.
- Horikoshi K. Alkaliphiles: some application of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol R* 63: 735-750, 1999.
- Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T et al. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes and crystal structures. *J Biosci Bioeng* 6: 501-508, 2007.
- Moreira KA, Albuquerque BF, Teixeira MFS et al. Application of protease from *Nocardia* sp. as a laundry detergent additive. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 307-312, 2002.
- Horikoshi K, Akiba T. Alkaliphilic Microorganisms: A New Microbial World. Japan Scientific Societies Press. Tokyo; 1982.
- Yoshida A, Iwasaki Y, Akiba T et al. Purification and properties of cyclomaltodextrinase from alkaliphilic *Bacillus* sp. *J Ferment Bioeng* 71: 226-229, 1991.
- Shimogaki H, Takeuchi K, Nishino T et al. Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. *Y. Agric Biol Chem* 55: 2251-2258, 1991.
- Saeki K, Okuda M, Hatada Y et al. Novel oxidatively stable subtilisin-like serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* spp.: enzymatic properties, sequences, and evolutionary relationships. *Biochem Bioph Res Co* 2: 313-319, 2000.
- Wan MY, Wang HY, Zhang YZ et al. Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus*. *Appl Biochem Biotechnol* 159: 394-403, 2009.
- Prakash M, Banik RM, Koch-Brandt C. Purification and characterization of *Bacillus cereus* protease suitable for detergent industry. *Appl Biochem Biotechnol* 127: 143-155, 2005.
- Öztürk S, Özeren-Morgan M, Dilgimen AS et al. Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. *Ann Microbiol* 59: 83-90, 2009.
- Kazan D, Bal H, Denizci AA et al. Studies on alkaline serine protease produced by *Bacillus clausii* GMBE 22. *Prep Biochem Biotechnol* 39: 289-307, 2009.
- Denizci AA, Kazan D, Abeln ECA et al. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *J Appl Microbiol* 96: 320-327, 2004.
- Gessesse A, Gashe BA. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacterium isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnol Lett* 19: 479-481, 1997.
- Takami H, Akiba T, Horikoshi K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 120-124, 1989.
- Claus D, Berkeley CW. The genus *Bacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME et al. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins; 1986: pp. 1105-1139.
- Anderson DG, McKay LL. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microb* 46: 549-552, 1983.
- Bond PL, Smriga SP, Banfield JF. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66: 3842-3849, 2000.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425, 1987.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791, 1985.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *P Natl Acad Sci USA* 101: 11030-11035, 2004.
- Tamura K, Dudley J, Nei M et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599, 2007.
- Kazan D, Denizci AA, Kerimak Öner MN et al. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 335-344, 2005.
- Rai SK, Mukherjee AK. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. *Bioresour Technol* 100: 2642-2645, 2009.
- Mala M, Srividya S. Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. *Indian J Microbiol* 50: 309-317, 2010.
- Ferrero MA, Castro GR, Abate CM et al. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 327-332, 1996.

31. Huang Q, Peng Y, Li X et al. Purification and characterization of an alkaline serine protease from dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr Microbiol* 46: 169-173, 2003.
32. Joo HS, Kumar CG, Park GC et al. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I52: production and some properties. *J Appl Microbiol* 95: 267-272, 2003.
33. Nilegaonkar SS, Zambare VP, Kanekar PP et al. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technol* 98: 1238-1245, 2007.
34. Kumar CG, Tiwari MP, Jany KD. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry* 34: 441-449, 1999.
35. Gupta R, Gupta K, Saxena RK et al. Bleach-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* 21: 135-138, 1999.
36. Kamoun SA, Haddar A, El-Hadj AN et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol Res* 3: 299-306, 2008.
37. Beg KQ, Gupta R. Purification and characterization of an oxidant-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb Technol* 32: 294-304, 2003.
38. Kumar CG. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol* 34: 13-17, 2002.
39. Lee JK, Kim YO, Kim HK et al. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 840-846, 1996.
40. Oberoi R, Beg QK, Puri S et al. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 493-497, 2001.
41. Morihara K. Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv Enzymol* 41: 179-243, 1974.
42. Reddy LVA, Wee YJ, Ryu HW. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 1526-1533, 2008.
43. Steele DB, Fiske MJ, Steele BP et al. Production of a low-molecular-weight, alkaline-active, thermostable protease by a novel spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp. nov. *Enzyme Microb Technol* 14: 358-60, 1992.
44. Dhandapani R, Vijayaragavan R. Production of a thermophilic extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothersophilus* AP-4. *World J Microbiol Biotechnol* 10: 33-35, 1994.
45. Vita C, Dalzappo D, Fontana A. Limited proteolysis of thermolysin by subtilisin: isolation and characterization of a partially active enzyme derivative. *Biochemistry* 24: 1798-1806, 1985.
46. Chaphalkar SR, Dey S. Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. *Indian J Biochem Biophys* 35: 34-40, 1998.