

Sarıkamış(Kars) Yöresinde *Pinus sylvestris* L. Orman Topraklarından İzole Edilen Ektraselüler Lakkaz Üreten *Bacillus megaterium* S1 İzolatının Karakterizasyonu

Erdal Ögün^{1*}, Kerem Özdemir¹, Necati Özok², Metin Ertaş¹, Fazlı Öztürk²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 65090 Van

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 65090 Van

*e-posta: eogun@yyu.edu.tr

Özet: Bu araştırmanın materyalini; Türkiye'nin, Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nden, Sarıkamış yöresine ait *Pinus sylvestris* ormanlarından toplanan toprak örnekleri oluşturdu. Toprak örneklerinden izole edilen, *Bacillus* S1 izolatının, lakkaz enzimi üretimi yönünden pozitif olduğu tespit edildi. İzolatın, lakkaz üretme yeteneği % 0.2mM ABTS ve % 0.1mM CuSO₄ içeren Tryptic Soy Agar kullanılarak test edildi. *Bacillus* S1 izolatının, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine ve 16S rDNA gen bölgesinin diziliş analizine göre *Bacillus megaterium* türüne ait olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Bacillus megaterium*, Lakkaz, Toprak

Characterization of *Bacillus megaterium* S1 Isolate Produced by Extracellular Laccase Isolated from *Pinus sylvestris* L. Forest Soils in Sarikamis (Kars) Region

Abstract: The material of this research; Turkey's northeastern region of Anatolia, the region has created Sarikamis of soil samples collected from *Pinus sylvestris* forests. It was determined that the *Bacillus* S1 isolate isolated from soil samples was positive for the production of laccase enzyme. The ability of the isolate to produce laccase was tested using Tryptic Soy Agar containing 0.2mM % ABTS and 0.1mM % CuSO₄. It was determined that the isolate *Bacillus* S1 belongs to the *Bacillus megaterium* strain according to the morphological, physiological and biochemical characteristics and the sequence analysis of the 16S rDNA gene region.

Key words: *Bacillus megaterium*, Laccase, Soil

Giriş

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Kıran ve ark., 2006).

Mikrobiyal enzimlerin bir çeşidi olan Lakkazlar (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) çok sayıda fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilen çoklu bakır içeren enzimlerdir (Claus, 2004). Lakkaz aktivitesinin belirlenmesinde, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehidazine (siringaldazin) veya 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) kullanılır (Claus, 2003).

Lakkaz enzimi, farklı substratları oksitleyebilme özelliğinden dolayı geniş bir yelpazede çeşitli, endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Lakkaz enzimi, gıda, kozmetik, kağıt, tekstil ve tekstil atıklarının azo boya içeren sularının biyolojik arıtılması yaygın bir şekilde kullanılır (Arık ve ark., 2008; Chandra ve Chowdhary, 2015; Demiralp ve ark., 2015).

Lakkaz enzimi, yüksek bitkilerde ve mantarlarda yaygın olarak bulunur. Fungusların Ascomycetes, Deuteromycetes ve Basidiomycetes sınıflarında ve ligninolitik beyaz-çürükçül mantarlarda bu enzim, bol miktarda bulunur (Shekher ve ark., 2011).

Lakkaz enzimi, funguslara ilave olarak birçok gram negatif, gram pozitif bakteriler ve aktinomycetler tarafından da üretilmektedir (Singh ve ark., 2011). Lakkaz enzimi üreten prokaryotların belirlenmesi ve lakkaz enziminin optimizasyonu ile ilgili çeşit araştırmalar mevcuttur. İlk bakteriyel lakkaz

Azospirillum lipoferum türünde tanımlanmıştır (Givaudan et al. 1993). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda; *Bacillus licheniformis* LS04 (Lu ve ark., 2012), *Bacillus amyloliquefaciens* (Lončar ve ark., 2013), *Bacillus pumilus* ve *Bacillus licheniformis* (Singh ve ark., 2014), *Bacillus cereus* B5 (Allos ve ark., 2015) *Bacillus* sp. (Abari ve ark., 2012; Kaushik ve Thakur 2014; Shukur, 2015; Rajeswari ve Bhuvaneswari, 2016; Siroosi ve ark., 2016; Shah ve Jobanputra, 2017), *Bacillus subtilis* WD23 (Wang ve ark., 2014), *Bacillus tequilensis* SN4 (Sondhi ve ark., 2014), *Bacillus Subtilis* MTCC 1039 (Mishra ve Srivastava, 2016), *Brevibacillus* sp.(Z1) (Bozoğlu ve ark., 2013), *Streptomyces lavendulae* REN-7 (Suzuki ve ark., 2003), *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 (Arias ve ark., 2003), *Streptomyces coelicolor* (Machczynski ve ark., 2004), *Streptomyces psammoticus* (Niladevi ve ark., 2008), *Streptomyces ipomoea* (Molina-Guijarro ve ark., 2009), *Streptomyces lavendulae* (Jing, 2010), *Streptomyces lydicus* (Mahmoud, 2014), *Streptomyces* sp. (Demissie ve Kumar, 2014) türlerinin lakkaz enzimi ürettiği bildirilmiştir.

Materyal ve Metod

Toprak Örnekleri

Toprak örnekleri Türkiye'nin, Kuzeydoğu Anadolu bölgesinden, Sarıkamış yöresine ait *Pinus sylvestris* ormanlarından toplandı.

Toprak örneklerinden bakteri izolasyonu

Toprak örneklerinden Ringer Solusyonu içerisinde 1/10'lük toprak çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan toprak çözeltisinden dilüsyon yöntemi ile seyreltmeler yapıldı. 10⁴'lük seyreltmeden 100µl, Tryptic Soy Agar içeren petri plaklarının yüzeyine eğri cam çubuk yardımıyla yayıldı. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip elde edilen karışık kültürlerden,

saf kültürler elde edildi. Saf kültürlerden stok kültürler hazırlandı ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere içerisinde %5 oranında gliserol bulunan kriyojenik tüpler içerisinde -20°C'de muhafaza edildi.

Lakkaz enzimi üreten izolatların belirlenmesi

İzolatlar, içerisinde % 0.2mM ABTS ve % 0.1mM CuSO₄ bulunan Tryptic Soy Agar plaklarına yoğun bir şekilde ekildi. Petri plakları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip ABTS'yi oksitleyen izolatların çevresinde yeşil renkli halelerin varlığı, lakkaz enzimi üretimi yönünden, pozitif olarak değerlendirildi (Soden, at all. 2002).

Lakkaz enzimi üreten izolatların identifikasyonu

Bakteriyel izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* eserinin üçüncü cildi referans alındı (Vos et al. 2011).

Genomik DNA İzolasyonu

Genomic DNA izolasyonu için, Tryptic Soy Broth içerisinde 30°C'de 24 saat inkübe edilen kültür 2dk santrifüj edildi. Bakteriyel lizis TE tampon içerisinde %10 SDS ve 20 mg/ml proteinaz K ilave edilerek ve 1 saat 37°C'de inkübe edilerek gerçekleştirildi. NaCl (5M) ve CTAB/NaCl ilave edildi ve 65°C'de 24 10 dk inkübe edildi. DNA, fenol / kloroform / izoamil alkol kullanılarak ekstrakte edildi (Gomaa and Momtaz, 2007; William ve ark., 2012).

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması

16S rDNA bölgesinin 1428 bazlık bölgesi uygun universal primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi. Bu amaçla *bacteria domaini* için spesifik 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' ve 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' pirimerleri kullanıldı. PCR karışımı, 50 µl

polimeraz tampon içerisinde her tampondan 30 pikomol, kromozomal DNA'dan 10ng ve 200 µM dNTPs ve 2.5 ünite Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Tüm amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn bağlanma ve 72°C'de 10 sn uzamadan oluşan 30 döngü lükamplifikasyon ve 72°C'de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde programlandı. PCR işlemi tamamlandıktan sonra, PCR karışımının bir kısmı, agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntüledi (Nikiforov ve Howles, 2001).

16S rRNA gen bölgesinin dizi ve filogenetik analizi

PCR ürününün dizi analizi SOYGEN Biyoteknoloji Şirketi'ne yaptırıldı. Dizi analizi sonucunda 1428 bazlık dizileri belirlendi. S1 izolatının elde edilen dizisi, Mega 7 paket programı ile GenBank'ta depolanan *Bacillus* cinsine ait bazı suşların 16S rDNA verileri ile karşılaştırıldı. (Lane ve ark., 1985).

Bulgular

Lakkaz enzimi üreten izolatların belirlenmesi

Toprak örneklerinden izole edilen sadece bir izolat, lakkaz enzimi yönünden pozitif bulundu ve *Bacillus* S1 izolatı olarak adlandırıldı (Şekil 4.1).



Şekil 1. ABTS içeren TSA ortamında *Bacillus* S1 izolatının lakkaz aktivitesi

Bacillus S1 izolatının morfolojik ve fizyolojik ve Biyokimyasal özellikleri

Bacillus S1 izolatının, aerobik, endosporlu, gram pozitif çomak morfolojiye sahip olduğu belirlendi. *Bacillus* S1 izolatının, oksidaz ve katalaz pozitif, sitrat negatif, hareketli, %2.5-7.5 NaCl konsantrasyonunda, 10°C–45°C ve 7.0-9.0 pH aralığında ürediği belirlendi. Ayrıca kazein ve jelatin proteinlerini hidrolize ettiği belirlendi. İlave olarak glukoz, fruktoz ve sukroz şekerinden asit oluşturduğu tespit edildi (Çizelge 4.1; Şekil 4.2).

Çizelge 1. *Bacillus* S1 izolatının morfolojik ve fizyolojik ve Biyokimyasal özellikleri

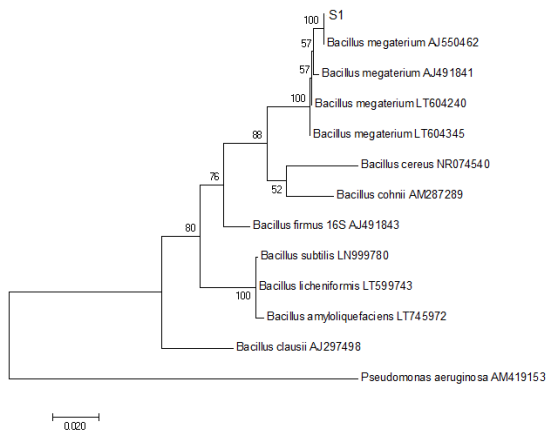
Hücre Morfolojisi	çomak
Gram Boyama Özelliği	+
Parasporal Kristal	-
Endospor şişkin	+
Anaerobik büyüme	-
Hareket	+
% NaCl 2.5-7.5'de üreme	+
10°C-45°C'de üreme	+
pH 7.0-9.0'da üreme	+
Katalaz	+
Oksidaz	+
Asit Oluşturma	
D-Galaktoz	-
D-Glukoz	+
D-Maltoz	-
D-Mannoz	-
D-Trehaloz	-
D-Xyloz	-
Laktoz	-
L-Arabinoz	-
L-Fruktoz	+
Sukroz	+
Hidroliz	
Eskulin	-
Kazein	+
Jelatin	+
Nişasta	-
Üre	-
İndol	-
Nitrat	-
Sitrat	-
Voges-Proskauer	-



Şekil 2. *Bacillus* S1 izolatının bazı biyokimyasal özellikleri.

16S rDNA gen bölgesinin dizi ve filogenetik analiz sonuçları

16S rDNA dizilerinin analizi (Şekil 3), S1 izolatının ve *Bacillus megaterium* türlerinin sıkı bir kümelenme göstermesini ve *Bacillus* cinsinin diğer üyelerinden farklı bir küme oluşturduğunu açıkça ortaya koymuştur. Sekans verilerini analiz etmek için Maximum Olasılık algoritması tipi uzaklık matrisi kullanılmıştır. S1 izolatının ve *B. megaterium* türlerinin oluşturduğu kümelenmenin bütün durumlarda tutarlı kalması ve diğerlerinden daha derine dallanmış olması nedeniyle benzer sonuç vermiştir. S1 izolatının *B. megaterium*'a benzerlik oranı % 99,6 olarak tespit edilmiştir. Biyokimyasal ve 16S rDNA analizi sonucunda S1 izolatı *B. megaterium* olarak teşhis edilmiştir.



Şekil 3. 16S rDNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç. Ağaçlar Maximum Likelihood yöntemiyle oluşturulmuştur. Maximum Likelihood algoritması için filogenetik uzaklık matrisi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirildi. *Pseudomonas aeruginosa* dış grup olarak dahil edildi.

Tartışma ve Sonuç

Biyokatalizör olarak lakkazlar, oksitleyici fenolik ve diğer aromatik bileşikler oksitleyici özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedir. Bu avantaj, lakkazları metoksifenoller, anilinler ve benzeniyoller de dahil olmak üzere ksenobiyotik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması gibi biyoteknolojik uygulamalar için uygundur (Chandra ve Chowdhary, 2015). Fungal lakkazların aksine, bakteriyel lakkazlar yüksek derecede aktiftir ve yüksek sıcaklıklarda ve yüksek pH değerlerinde daha kararlıdır. Tekstil endüstrisinin atık suları nötr ila alkali (pH 7-11) karakterdedir (Arık ve ark., 2008). *B. megaterium* S1 izolatı lakkazı, alkalik koşullarda yüksek bir termostabiliteye ve yüksek stabiliteye sahiptir. *B. megaterium* S1 izolatının bu özellikleri, biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir öneme sahip olabilir.

B. megaterium S1 izolatının % 7.5 NaCl konsantrasyonunda büyümesi bu izolata nispeten yüksek tuz konsantrasyonunda ürediğini göstermektedir. *B. megaterium* S1 izolatının bu kabiliyeti tuzlu atık suların arıtımında kullanılmasında büyük bir avantaj sağlayabilir.

Günümüze kadar, bakteriyel lakkazlar sadece *A. lipoferum*, *Alteromonas* sp. MMB-1, *Pseudomonas* sp. KU03, *E. coli* ve *Streptomyces* ve *Bacillus* genusunun birkaç türünde tanımlanmıştır. Orman topraklarından izole edilen bakterilerde lakkaz taraması ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu araştırmada *B. megaterium* S1 izolatı organik madde bakımından zengin Sarıkamış yöresine ait orman topraklarından izole edilmiştir. Wang ve ark. (2010), daha önceki araştırmalarda, lakkaz aktivitesini gösteren bakteri türlerinin, pirinç rizosferinden, deniz suyundan, akarsu sedimentlerinden, boya ve tekstil sanayi atıklarından ve lignoselülöz atıklarla kirlenmiş topraklardan izole edildiğini bildirmişlerdir.

Ülkemizde lakkaz enzimi üreten bakterilerle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bozoglu ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Diyardin Termal Kaplıcasından izole edilen ve tekstil boyaalarının giderilmesinde kullanılan lakkaz enzimini üreten, *Brevibacillus* Z1 izolatının karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çeşitli araştırmalarda; *B. megaterium* suşlarının kalitatif ve kantitatif lakkaz enzimi üretme kabiliyeti taranmaksızın, bu bakteriye ait suşların çeşitli endüstrilerde kullanılan boyaaları biyodegradasyona uğrattığı bildirilmiştir (Praveen Kumar, ve Bhat Sumangala, 2012; Joshi ve ark., 2013; Shah, 2014). Bu çalışmada, Sarıkamış yöresine ait orman topraklarından izole *B. megaterium*'un kalitatif olarak lakkaz enzimi ürettiği belirlendi. Araştırma bu yönü ile milli gen kaynaklarımızın tespiti açısından önemlidir.

Bu çalışmada; Lakkaz enzimi üreten *Bacillus* S1 izolatının, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine ve 16S rRNA diziliş analizine göre *B. megaterium* türüne ait olduğu belirlendi. 16S rDNA dizilimi, rDNA sekans veritabanında bilinen organizmalarla cins ve tür düzeylerinde evrimsel ilişkileri çıkararak yeni izole edilmiş organizmaları tanımlamak için rutin olarak kullanılır (Lane ve ark., 1985). Yayınlanan literatürde yer almayan yeni cins ve türlerin tarifi için, izolatlar daha sonra, biyokimyasal ve DNA-DNA ilişkili çalışmalar başta olmak üzere diğer taksonomik kriterlerle değerlendirilir ve teşhis edilir. S1 izolatının 16S rDNA sekans analizi yapıldı. S1 izolatının dizisi, Mega 7 paket programı ile GenBank'ta depolanan *Bacillus* cinsine ait bazı suşların 16S rDNA verisi ile karşılaştırılarak, filogenetik pozisyonu belirlendi.

Kaynaklar

Abari, A. H., Emtiazi, G., Roghanian, R. (2012). Production of none germinate spore ghost from a novel marine *Bacillus* with thermostable

laccase activity. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2): 393-402.

Allos, M. M., Hussein, A. A. Optimum Conditions for Laccase Production by Local Isolate of *Bacillus Cereus* B5. *Journal of Al-Nahrain University* Vol.18 (2), June, 2015, pp.133-140

Arık, B., Körlü, A. E., Duran, K. (2008). Lakkaz Enzimlerinin Tekstil Kullanım Alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2(2): 17-22.

Arias, M. E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A. S., Hernández, M. (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4):1953-1958.

Bozoglu, C., Adiguzel, A., Nadaroglu, H., Yanmis, D., Gulluce, M. (2013). Purification and characterization of laccase from newly isolated thermophilic *Brevibacillus* sp.(Z1) and its applications in removal of textile dyes. *Research Journal of Biotechnology*, 8(9): 56-66.

Chandra, R., Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2): 326-342.

Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of microbiology*, 179(3):145-150.

Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1): 93-96.

Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., Cansaran-Duman, D. (2015). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4): 351-368

Demissie, A. G., Kumar, A. (2014). Isolation of Novel Bacteria Isolate from Soil for Production of Extra-

- Cellular Laccase Enzyme. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, 4(11): 404-407.
- Dias, A. A., Matos, A. J., Fraga, I., Sampaio, A., Bezerra, R. M. (2017). An Easy Method for Screening and Detection of Laccase Activity. The Open Biotechnology Journal, 11(1): 89-93.
- Ghumro, P. B., Shafique, M., Ali, M. I., Javed, I., Ahmad, B., Jamal, A., Hameed, A. (2011). Isolation and screening of protease producing thermophilic *Bacillus* strains from different soil types of Pakistan. African Journal of Microbiology Research, 5(31): 5534-5539.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. L., Bally, R. (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiology Letters, 108(2): 205-210.
- Gomaa, O. M., Momtaz, O. A. (2007). 16S rRNA characterization of a *Bacillus* isolate and its tolerance profile after subsequent subculturing. Arab J Biotech, 10: 107-116.
- Jing, D. (2010). Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. Bioresource technology, 101(19): 7592-7597.
- Joshi, B., Kabariya, K., Nakrani, S., Khan, A., Parabia, F. M., Doshi, H. V., Thakur, M. C. (2013). Biodegradation of turquoise blue dye by *Bacillus megaterium* isolated from industrial effluent. American Journal of Environmental Protection, 1(2): 41-46.
- Kaushik, G., Thakur, I. S. (2014). Production of laccase and optimization of its production by *Bacillus* sp. using distillery spent wash as inducer. Bioremediation Journal, 18(1): 28-37.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler Ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Ksü. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1):12-19.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82(20): 6955-6959.
- Lončar, N., Božić, N., Lopez-Santin, J., Vujčić, Z. (2013). *Bacillus amyloliquefaciens* laccase—from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization. Bioresource technology, 147: 177-183.
- Lu, L., Zhao, M., Wang, T. N., Zhao, L. Y., Du, M. H., Li, T. L., Li, D. B. (2012). Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. Bioresource technology, 115: 35-40.
- Machczynski, M. C., Vijgenboom, E., Samyn, B., Canters, G. W. (2004). Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. Protein science, 13(9): 2388-2397.
- Mahmoud, M. G., Rifaat, H. M., El Sayed, O. H., El Beih, F. M., Selim, M. S. (2014). Production, and Characterization of Neutral Laccase from Marine *Streptomyces lydicus*. International Journal of PharmTech Research, 6(4): 1383-1391.
- Mishra, S. K., Srivastava, S. K. (2016). Production of Extracellular Laccase from Bacterial Strain *Bacillus Subtilis* MTCC 1039 using Different Parameter. Biosciences

- Biotechnology Research Asia, 13(3): 1645-1650.
- Molina-Guijarro, J. M., Pérez Torres, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén Carretero, F., Moya Lobo, R., Hernández Cutuli, M., Arias Fernández, M. E. (2009). Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 12(1): 13-21.
- Nikiforov, Y. E., Howles, P. N. (2001). Polymerase chain reaction. In *Morphology Methods* (pp. 181-207). Humana Press.
- Niladevi, K. N., Jacob, N., Prema, P. (2008). Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 43(6): 654-660.
- Praveen Kumar, G. N., Bhat Sumangala, K. (2012). Decolorization of azo dye Red 3BN by bacteria. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(5): 46-52.
- Rajeswari, M., Bhuvaneshwari, V. (2016). Production of extracellular laccase from the newly isolated *Bacillus* sp. PK4. *African Journal of Biotechnology*, 15(34): 1813-1826.
- Shah, A. I., Jobanputra, J. B. 2017. Production and Partial Purification of Laccase Produced by *Bacillus* species Isolated from Contaminated Soil. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 6: 17862-17869.
- Shah, M. P. (2014). Bioremedial application of *Bacillus megaterium* PMS82 in microbial degradation of acid orange dye. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2(3): 93-99.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research. Enzyme(1)*: 1-11.
- Shukur, Y. N. (2015). Determination of Optimal Conditions for the Production of Laccase Enzyme by Local Isolate of *Bacillus* sp. *Iraqi Journal of Science*, 56(1A): 132-139.
- Singh, D., Narang, E., Chutani, P., Kumar, A., Sharma, K. K., Dhar, M., Viridi, J. S. (2014). Isolation, Characterization and Production of Bacterial Laccase from *Bacillus* sp. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 439-450). Springer India.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., Sharma, P. (2011). Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(4): 309-326.
- Siroosi, M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K. (2016). Purification and characterization of an alkaline chloride-tolerant laccase from a halotolerant bacterium, *Bacillus* sp. strain WT. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134: 89-97.
- Soden, D. M., O'callaghan, J., Dobson, A. D. W. (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 148(12): 4003-4014.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PloS one*, 9(5): e96951.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y. (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7:

- purification, characterization,
nucleotide sequence, and
expression. *Bioscience,
biotechnology, and
biochemistry*, 67(10): 2167-2175.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.
R., Ludwig, W., Rainey, F. A.,
Whitman, W. (Eds.).
(2011). *Bergey's Manual of
Systematic Bacteriology: Volume 3:
The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer
Science & Business Media.
- Wang, C. L., Zhao, M., Li, D. B., Cui, D.
Z., Lu, L., Wei, X. D. (2010).
Isolation and characterization of a
novel *Bacillus subtilis* WD23
exhibiting laccase activity from
forest soil. *African Journal of
Biotechnology*, 9(34): 5496-5502.
- Widsten, P., Kandelbauer, A. (2008).
Laccase applications in the forest
products industry: a review. *Enzyme
and Microbial Technology*, 42(4):
293-307.
- William, S., Feil, H., Copeland, A. (2012).
Bacterial genomic DNA isolation
using CTAB. *Sigma*, 50: 6876.