

Türkiye’deki Dibekli Sıcak Su Kaynağından Termofilik *Geobacillus sp.* DB2 Suşunun Fizyo-Biyokimyasal Karakterizasyonu ve 16S rRNA Sekanslaması

Fatma MATPAN BEKLER¹

ÖZET: Jeotermal kaynaklar termofillerin habitatlarındandır. Bu çalışmada aerobik, çubuk şeklinde, hareketli ve Gram-pozitif termofilik DB2 suşu Türkiye’deki Diyadin ilçesi Dibekli sıcak su kaynağından izole edilerek morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler ve 16S rRNA gen sekanslamayla tanımlandı. Optimal kültürasyon pH 6.0–6.5’da, 60 °C’de elde edildi. DB2 suşunun katalaz, nitrat redükleme, Metil red testi ve nişasta hidrolizi pozitif, oksidaz, üreaz aktivitesi, jelatin ve kazein hidrolizi negatif olarak belirlendi. 16S rRNA gen sekansına bağlı filogenetik analizler DB2 suşunun %98.97 sekans benzerliği ile *Geobacillus subterraneus subsp. aromaticivorans* Ge1(T)’e oldukça yakın olduğunu göstermektedir. Bu yeni tür, biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA geni, *Geobacillus*, tanımlama, termofilik

Physio-Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Thermophilic *Geobacillus sp.* stain DB2 from Dibekli Hot Spring, Turkey

ABSTRACT: Geothermal sites are habitat for thermophilic microorganisms. In this study, a novel aerobic, rod shaped, motile and Gram-positive thermophilic bacterium DB2 was isolated from the hot water in Dibekli in the town of Diyadin in Turkey and it was identified by morphological, physiological, biochemical tests and 16S rRNA gene sequencing. Optimal cultivation was obtained at pH 6.0–6.5 and 60 °C. Strain DB2 was positive for catalase activity, nitrate reduction, Methyl red test and starch hydrolysis, while it was negative for oxidase, urease, gelatine and casein hydrolysis. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that isolate DB2 was most closely related to *Geobacillus subterraneus subsp. aromaticivorans* Ge1(T) with a 98.97% sequence similarity. This novel strain can be used in biotechnological application.

Keywords: 16S rRNA, *Geobacillus*, identification, thermophilic

¹ Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, Diyarbakır, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Fatma MATBAN BEKLER, fatmatpan@hotmail.com

GİRİŞ

Mikrobiyal yaşam; sadece hava, toprak ve göller değil, kutuplardaki buzullar, yanardağ bacaları, tuz gölleri, sodalı sular ve yüksek asit ortamlarını içine alarak yayılmış durumdadır (Ercan Akkaya ve Kıvanç, 2008).

Termofiller, Yüksek sıcaklığa dayanıklı mikroorganizmalardır. Sıcak su kaynakları termofillerin izole edildiği temel alanlardan biridir (Rastogi et al., 2010). Ayrıca termofiller aşırı pH ve tuz konsantrasyonu gibi zorlu ortam koşullarında da yaşayabilirler (Futterer et al., 2004; Giaveno et al., 2013; Urbietta et al., 2015).

“Beyaz Biyoteknoloji” enerji, kimyasallar, materyallerin üretimi ve endüstriyel işlemler için enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanılması olarak tanımlanabilir. Termofillerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı tüm hücrenin kullanılması yada hücrenin makromoleküllerinin veya metabolitlerinin kullanılması olarak ikiye ayrılabilir. Ayrıca termofiller, biyoenerji, termozimler ve biyosürkafant üretiminde potansiyel olarak bilinmektedirler. Termofillerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmasında gelişmiş ürün oluşumuna yol açan yüksek metabolik aktiviteye sahip olmaları, mezofiliklerin ortadan kaldırılmasıyla patojenik/kirleticilerinin inaktivasyonu, sıcaklığa dayanıklı makromolekül ve metabolitlerin üretimi, ısıtma adımlarından sonra soğutma adımlarının gerekmemesi, kimyasalların çözünürlüğünün, iyonizasyonunun ve difüzyonunun artışı, düşük yoğunluk, yüzey gerilimi ve viskoziteyle reaksiyon oranının artışı, termostabil enzimlerin ekspresyonu gibi bazı avantajları bulunmaktadır.

Yüzyılın başlarında basil şeklindeki tüm organizmalar *Bacillus* olarak tanımlanırdı. Ancak ilerleyen teknoloji ve moleküler düzeydeki gelişmiş teknikler sayesinde yeni tanımlamalar yapılmaktadır. Nazina et al., (2001) 8 farklı *Geobacillus* türü tanımlamışlardır ve günümüze kadar toplam 24 farklı *Geobacillus* türü ile 4 farklı alt türü tanımlanmıştır. Bunlar: *Geobacillus stercophilus* DSM 22^T, *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730^T, *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T, *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542^T, *Geo-*

bacillus thermodenitrificans DSM 465^T, *Geobacillus subterraneus* DSM 13552^T, *Geobacillus subterraneus* subsp. *subterraneus*, *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T ve *Geobacillus uzensis* DSM 13551 (Nazina et al., 2001), *Geobacillus caldxylosilyticus* DSM 12041^T (Fortina et al., 2001), *Geobacillus toebii* DSM 13551 (Sung et al., 2002), *Geobacillus gargensis* DSM 15378 ve *Geobacillus vulcani* DSM 13174 (Nazina et al., 2004), *Geobacillus debilis* DSM 16016^T ve *Geobacillus palidus* (Banat et al., 2004), *Geobacillus lituanicus* DSM 15325^T (Kuisiene et al., 2004), *Geobacillus tepidamans* (Schaffer et al., 2004), *Geobacillus jurassicus* DSM 15726^T (Nazina et al., 2005), *Geobacillus zalihae* DSM 18318^T (Abd Rahman et al., 2007), *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* ve *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *thermodenitrificans* (Cihan et al., 2011), *Geobacillus kaue*, *Geobacillus anatolicus* ve *Geobacillus bogazici* (Çağlayan and Bilgin 2011) *Geobacillus galactosidasius* DSM 18751 (Poli et al., 2011), *Geobacillus thermoantarcticus* DSM 9572^T (Coorevits et al., 2012), *G. subterraneus* subsp. *aromaticivorans* (Poli et al., 2012), *Geobacillus icigianus* (Bryanskaya et al., 2015) olarak databankta kayıtlıdır.

Bu çalışmada, Ağrı İli, Diyadin İlçesi'ne bağlı Dibekli Köyü sıcak su kaynağından termofilik mikroorganizma izole edilerek morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA analizlerine dayalı tanımlama yapılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

Termofilik bakterileri izole etmek amacıyla Ağrı ili, Diyadin ilçesine 15 km uzaklıktaki Dibekli Köyü'nde bulunan sıcak su kaynağından su örneği alındı. Su sert bir araziden akmaktadır. Alınan su örneğinin pH metre ile pH'sı ve termometre ile suyun sıcaklığı ölçülerek su örnekleri 50 mL'lik steril şişelerde aseptik ortam koşullarında saklanarak laboratuvar ortamına taşındı.

Su örneklerinden 5 mL alınarak, 250 mL'lik erlenlerde bulunan steril 45 mL Nutrient Broth (NB) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) besi ortamına ekim yapıldı ve termotolerant mikroorganizmaların izolasyonu için

55 °C’de inkübasyona bırakıldı. 48 saat inkübasyondan sonra gelişen kültürlerden steril distile suda 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} ’e şeklinde seyreltmelerden 1 mL alındı ve katı NB besiyerine ekim yapıldı. Petriler 55 °C de 24 saat inkübe edildikten sonra gelişen karışık kültürlerden izolatların saf kültürleri elde edildi. Elde edilen izolatlar kod verilerek gliserol içeren Cryotüplerde Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarından -80 °C’de muhafaza edildi.

Morfolojik ve Fizyo-Biyokimyasal Karakterizasyon

Seçilen kolonilerin şekil, boyut, renk, yüzey, yükseklik, hücre çeperi, ışık ve yoğunluk temelindeki fenotipik hücre morfolojisi incelenerek karakterize edildi. Hücre morfolojisi ve hareketlilik incelemeleri ışık mikroskobu kullanılarak incelendi.

Gram boyama, ışık mikroskobu kullanılarak Dus-sault’a (1955) göre gerçekleştirildi. Sporların oluşumu malaşit yeşil boyama ile mikroskopik gözlemlerle test edildi.

Seçilen izolat, farklı sıcaklık (20 ila 80 °C) ve farklı pH (4.0-11.0)’da inkübe edilerek optimum büyüme koşulları belirlendi. Ayrıca % 0.5-5 NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) içeren besi ortamına izolattan inokülasyon yapılarak NaCl’nin bakteri gelişimine etkisi incelendi.

Seçilen izolata biyokimyasal özellikleri katalaz, indol, oksidaz, sitritaz ve üreaz aktivitesi, metil kırmızı testi, Voges-Proskauer testi, jelatin, nişasta, kazein, kullanımı ve farklı karbon kaynaklarının (glikoz, galaktoz, laktoz, fruktoz, maltoz, arabinoz) kullanılması test edildi. Bütün fizyolojik, biyokimyasal testler ikili olarak üç defa tekrar edildi.

DNA İzolasyonu

Genomik DNA, Marmur’un (1961) fenol-kloroform yöntemine göre izole edildi. Spektrofotometrede DNA’nın miktarı ve saflık derecesi ölçülerek PCR reaksiyonu için hazır hale getirildi. DNA’nın saflığının kontrolü için %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek analiz edildi.

16S rRNA Geninin Amplifikasyonu

Genomik DNA izole edildikten sonra evrensel primerler 16S-F (5’-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3’)- 16S-R (5’-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3’) kullanılarak 16S rRNA geni PCR ile çoğaltıldı. 16S rDNA geninin amplifikasyonu ve saflaştırma işlemleri Reiney et al., (1994)’e göre gerçekleştirildi. Tüm amplifikasyon koşulları 94 °C’de 5 dakikalık ön denaturasyon, 94 °C’de 30 sn denaturasyon, 50 °C’de 30 sn bağlanma ve 72 °C’de 10 sn uzamadan oluşan 35 sikluluk amplifikasyon ve 72 °C’de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde programlandı.

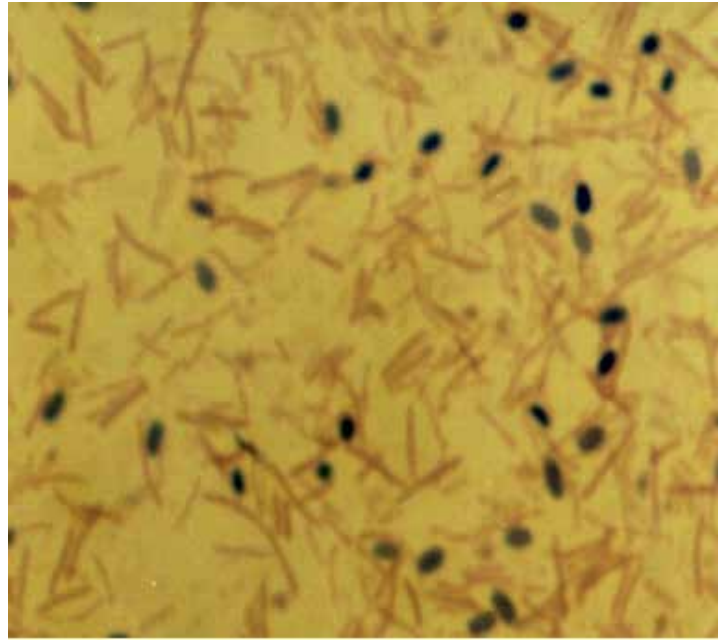
Biyoinformatik Analizi ve Filogenetik Ağaç Yapımı

Saflaştırılmış PCR ürünleri elektroforeze tabi tutularak saflığı kontrol edildi ve GATC Biotech (<http://www.gatc.biotech.com>) tarafından dizilendi. Elde edilen diziler bir BLAST arama aracı [NCBI: Biyoteknoloji Ulusal Merkezi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] veritabanı kullanılarak karşılaştırıldı. İzole suşunun 16S rRNA dizi çoklu sekans hizalama programı kullanılarak NCBI veritabanından dizi homolojisi gösteren bir referans dizisi ile hizalandı. İzolat 16S rRNA dizi verilerine dayanarak EzTaxon sunucusu (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim ve ark., 2012) kullanılarak tanımlandı. Filogenetik ağaç Felsenstein’a göre (1993) komşu birleştirme yöntemi (neighbour-joining method) kullanılarak çizildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Dibekli sıcak su kaynağından dilüsyon yöntemiyle kültürde baskın olan termofilik bakteri izole edilerek karakterize edildi. Elde edilen izolata DB2 kodu verilerek gliserol içeren cryotüplerde -80 °C’de Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Prof. Dr. Yavuz Ensari Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında muhafaza edildi. Seçilen DB2 suşu morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA analizlerine göre karakterize edildi.

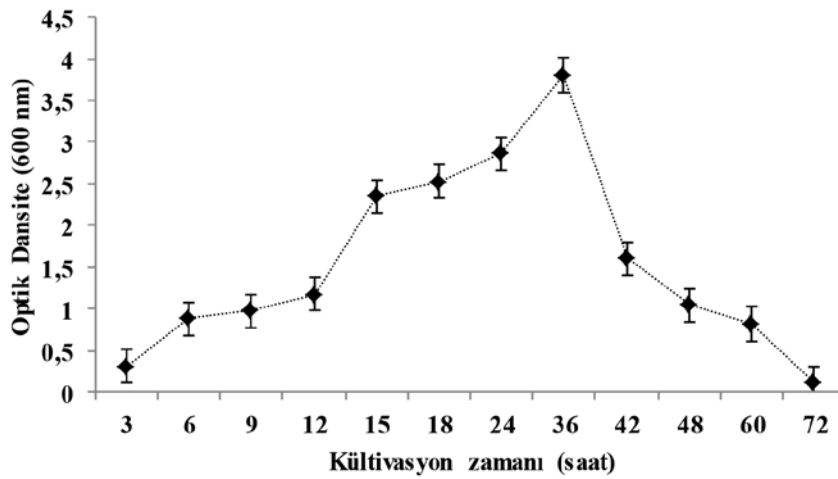
DB2 suşunun, koloni morfolojisi incelendiğinde küçük, yuvarlak, mat ve krem olduğu belirlendi. DB2 hücreleri çubuk şeklinde, Gram pozitif, hareketli ve sporelidir (Şekil 1).



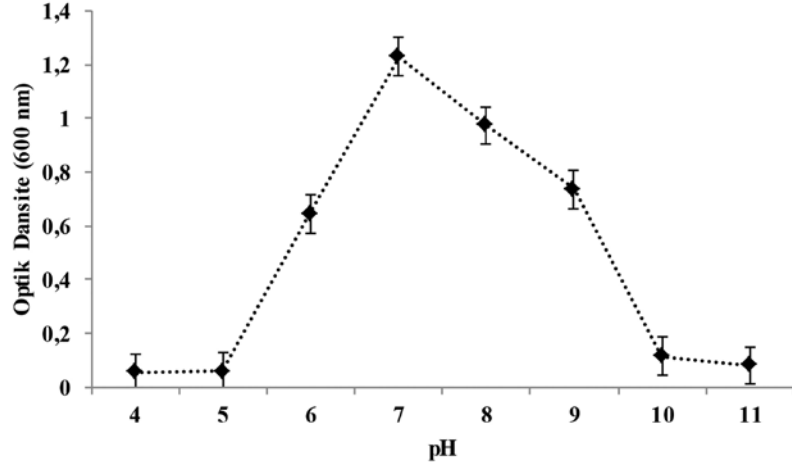
Şekil 1: DB2 suşunun hücreleri ve vejetatif sporları

Nazina et al. 2001 yılında 8 farklı *Geobacillus* tanımlamışlardır ve günümüze kadar toplam 24 farklı *Geobacillus* türü ve 4 farklı alt türü tanımlanmıştır. Yapılan *Geobacillus* tanımlamalarında; çubuk şekilli, Gram pozitif, hareketli ve sporlu oldukları ve genellikle pH 6.0-9.0 arasında gelişen termofi-

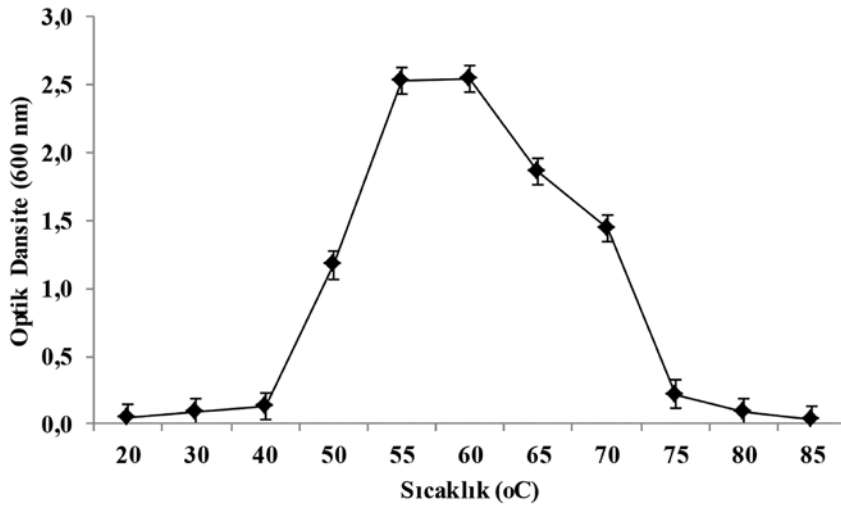
lik bakteriler oldukları belirtilmiştir (Nazina et al., 2001; Kuisiene et al., 2004; Banat et al., 2004). Elde ettiğimiz DB2 suşu 36 saatte (Şekil 2a), 50-70 °C arasında (optimum 55-60 °C'de), ve pH 6.0-9.0 arasında (optimum 7.0'de) gelişme göstermektedir (Şekil 2b ve 2c).



Şekil 2a: DB2'nin kültüvasyon zamanı



Şekil 2b: pH'nin DB2 suşunun üremesine etkisi



Şekil 2c: Sıcaklığın DB2'nin üremesine etkisi

Nazina et al., (2001)'in yaptıkları çalışmada izole edilen *G. thermodenitrificans* DSM 465^T ve *G. subterraneus* DSM 13552^T ayrıca Coorevits et al., (2012)'nin elde ettikleri *G. thermoantarcticus* DSM 9572^T'nin optimum 55-60 °C arasında gelişen termofilik bakteriler oldukları belirtilmiştir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında DB2'nin termofilik özellikte olduğu belirlendi.

Yapılan biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre; katalaz aktivitesi, nitrat redüksiyonu, jelatin ve ni-

şasta hidrolizi ile glukoz, galaktoz, maltoz ve ksiloz gibi karbon kaynaklarını kullanımı pozitif iken, oksidaz, üreaz, sitritaz aktivitesi, indol üretimi, Voges proskauer/Metil Red testi, kazein hidrolizi ile sükröz, laktoz ve arabinoz gibi karbon kaynaklarını kullanımı negatiftir. Bu sonuçlar ayrıntılı şekilde diğer *Geobacillus* türleriyle karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de verildi. DB2 suşunun biyokimyasal özelliklerine bakıldığında diğer *Geobacillus* türleriyle benzer özellikler gösterdiği görülmektedir.

Tablo1: DB2'nin diğ er *Geobacillus* türleriyle karşılaştırılması

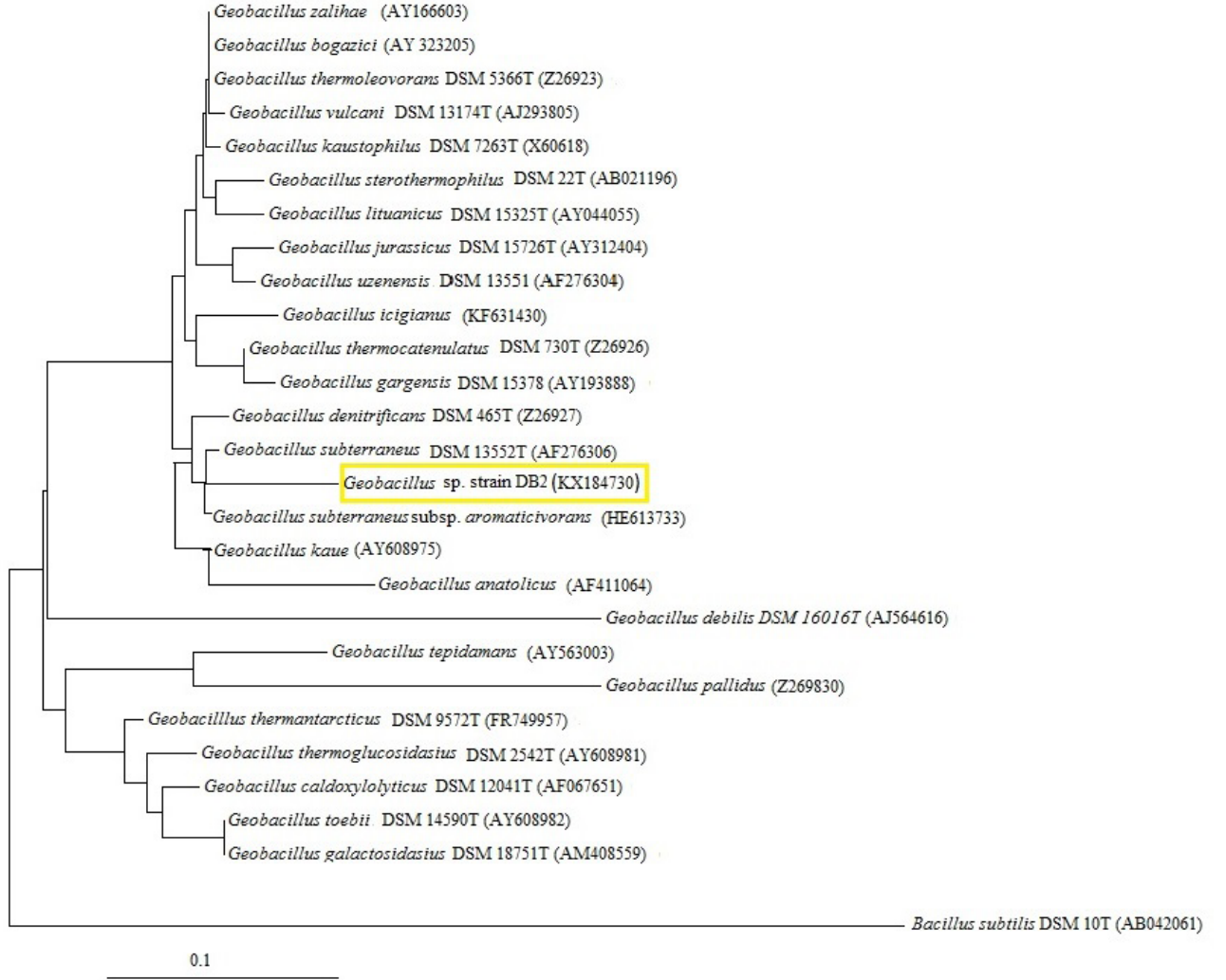
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Özellikler	DB2 suşu	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Hücre şekli	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Gram boyama	(+)	(+)	(-)	ND	(+)	(+)	ND	(+)	ND	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hareketlilik	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Spor oluşumu	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Sıcaklık (°C)	37-65	35-78	45-70	37-68	55-60	55-60	ND	45-65	50-65	45-70	45-70	37-72	45-60	50-70	30-70	55-70	39-67	57-62	50-75	50-75
pH	6.0-9.0	9.0	6.2-7.5	6.0-8.0	6.8-7.0	6.8-7.0	ND	6.2-7.8	7.0-9.0	6.0-9.0	5.5-7.5	5.5-9.0	ND	ND	ND	6.5	6.0-9.0	6.8-8.5	7.2	ND
NaCl toleransı (3.0%)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	ND	(-)	ND
Katalaz aktivitesi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	w	(+)	(+)	(+)
Oksidaz	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	w	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	w	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Üreaz	(-)	(-)	ND	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	ND	(-)	ND	ND	(+)
Stiirtaz	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	ND	(-)	(-)
İndol üretimi	(-)	ND	ND	(-)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	ND	ND	ND	ND	(-)	ND	ND	(-)	ND	(+)	ND
Nitrat redüksiyonu	(+)	(d)	(+)	(d)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Voges-Proskauer testi	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	v	v	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ND	w	ND	w
Metil red testi	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	ND	(+)	ND	(-)	ND	ND	ND	(-)
Hydrolysis of gelatin	(+)	(+)	(+)	(+)	D	w	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Kazein hidrolizi	(+)	(-)	d	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	v	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Nişasta hidrolizi	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	w	(-)	(-)	(-)
Karbon kaynaklarının kullanımı																				
Glukoz	(+)	(+)	ND	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	w
Sükroz	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	w	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	ND	w
Galaktoz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	ND	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Laktoz	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	ND	(-)
Maltoz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	ND	ND	(+)	ND	(-)	(-)	ND	(+)	ND	ND	ND
Arabinoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(d)	(+)	(+)	(-)	(-)	ND	ND	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	ND	(-)
Ksiloz	(+)	(-)	-	(+)	(-)	(+)	(d)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+): pozitif, (-): negatif, d: değ iş ken, w: zayıf, ND: Not determined

1: *G. sterothromophilus* DSM 22T, 2: *G. thermocatenulatus* DSM 730T, 3: *G. thermoleovorans* DSM 5366T, 4: *G. thermoglucosidarius* DSM 2542T, 5: *G. thermodenitrificans* DSM 465T, 6: *G. subterraneus* DSM 13552T, 7: *G. kaustophilus* DSM 7263T ve 8: *G. uzensis* DSM 13551 (Nazina et al., 2001), 9: *G. caldoolysilyticus* DSM 12041T (Fortina et al., 2001), 10: *G. iobii* DSM 13551 (Sung et al., 2002), 11: *G. gargasensis* DSM 15378 ve 12: *G. vulcani* DSM 13174 (Nazina et al., 2004), 13: *G. jurassicus* DSM 15726T (Nazina et al., 2005), 14: *G. debilis* DSM 16016T ve 15: *G. palidus* (Banat et al., 2004), 16: *G. lituanicus* DSM 15325T (Kuisiense et al., 2004), 17: *G. tepidamans* (Schaffer et al., 2004), 18: *G. thermoantarcticus* DSM 9572T (Coorevits et al., 2012), 19: *G. galactosidarius* DSM 18751 (Poli et al., 2011), 20: *G. icigianus* (Bryanskaya et al., 2015)

DB2 suşunun yapılan kısmi 16S rRNA sekans analizlerine göre *Geobacillus* türleri içinde %98.97 benzerlik oranıyla *G. subterraneus* subsp. *aromaticivorans* Ge1(T) ile oldukça yakın benzerlik gösterdiği belirlendi. 16S

rRNA sekansları GenBank’a eklendi (GenBank erişim numarası: KX184730). DB2 suşu ve diğer *Geobacillus* türlerinin yakınlığını gösteren filogenetik ağaç yakın bağlantı (neighbor-joining) metodu kullanılarak çizildi (Şekil 3).



Şekil 3: Diyardin sıcak su kaynağından elde edilen termofilik DB2 suşunun ve diğer *Geobacillus* türlerinin 16S rRNA sekans analizlerine dayalı Yakın bağlantı (neighbor-joining) metodu kullanılarak çizilen filogenetik ağaç. Erişim numaraları parantez içinde verilmiştir.

SONUÇ

Türkiye fiziksel ve kimyasal yapısı farklı pekçok jeotermal alana sahiptir ve bu durum çok sayıda yeni termofilik mikroorganizmanın keşfi için iyi bir fırsat sunmaktadır. Çalışmamız ayrıca termofilik mikroor-

ganizmaların biyoçeşitliliği bakımından önemlilik arz etmektedir. Elde edilen *Geobacillus* DB2 suşu özellikleri bakımından biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir.

KAYNAKLAR

- Abd Rahman RNZR, Leow TC, Salleh AB, Basri M, 2007. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC Microbiology*, 7: 77.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 2197-2201.
- Bryanskaya AV, Rozanov AS, Slynko NM, Shekhovtsov SV, Peltek SE, 2015. *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 864-869.
- Çağlayan M, Bilgin N, 2011. Cloning and Sequence Analysis of Novel DNA Polymerases from Thermophilic *Geobacillus* Species Isolated from Hot Springs in Turkey: Characterization of a DNA Polymerase I from *Geobacillus kaue* Strain NB. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165: 1188-1200.
- Cihan AC, Ozcan B, Tekin N, Cokmus C, 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov., a thermophilic and α -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(2): 83-92.
- Coorevits A, Dinsdale AE, Halket G, Lebbe L, De Vos P, Van Landschoot A, Logan NA, 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidasius* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 1470-1485.
- Dussault HP, 1955. An improve technique for staining for halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 70: 484-485.
- Ercan Akkaya S, Kıvanç M, 2008. Isolation and Identification Methods of Gr(+) Bacils Living In Hot Springs. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 02: 61-70.
- Felsenstein J, 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5.1., Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fortina MG, Mora D, Schumann P, Parini C, Manachini PL, Stackebrandt E, 2001. Reclassification of *Saccharococcus caldoxylosilyticus* as *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Ahmad et al. 2000) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2063-2071.
- Futterer O, Angelov A, Liesegang H, Gottschalk G, Schleper C, Schepers B, 2004. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:9091-6.
- Giaveno MA,MSa Urbieta, Ulloa JR, EGI Toril, Donati ER, 2013. Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecology*, 65:336-46.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J, 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 716-721.
- Kuisiense N, Raugalas J, Chitavichius D, 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1991-1995.
- Marmur JA, 1961. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2): 208-IN201.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunya VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV, 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 433-446.
- Nazina TN, Lebedeva EV, Poltarau AB, Tourova TP, Grigoryan AA, Sokolova DS, 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 2019-2024.
- Nazina TN, Sokolova DS, Grigoryan AA, 6 other authors, 2005. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 43-53.
- Poli, A., Laezza, G., Gul-Guven, R., Orlando, P. & Nicolaus, B. 2011. *Geobacillus galactosidasius* sp. nov., a new thermophilic galactosidase-producing bacterium isolated from compost. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 419-423.
- Poli A, Guven K, Romano I, Pirinccioglu H, Gul Guven R, Euzeby JPM, Matpan F, Acer O, Orlando P, Nicolaus B, 2012. *Geobacillus subterraneus* subsp. *aromaticivorans* subsp. nov., a Novel Thermophilic and Alkaliphilic Bacterium Isolated from a Hot Spring in Sirnak, Turkey. *Journal of General and Applied Microbiology The Microbiology Research Foundation*. 58: 437-446.

- Rainey FA, Fritze D, Stackebrandt E, 1994. The Phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rRNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 115: 205-212.
- Rastogi G, Bhalla A, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Christopher LP, et al. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technology*, 101: 8798–806.
- Schäffer C, Franck WL, Scheberl A, Kosma P, McDermott TR, Messner P, 2004. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 2361-2368.
- Sung MH, Kim H, Bae JW, Rhee SK, Jeon CO, Kim K, Kim JJ, Hong SP, Lee SG, Yoon JH, Park YH, Baek DH, 2002. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 2251-2255.
- Urbietta MS, Donati ER, Chan KG, Shahar S, Sin LL, Goh KM, 2015. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*, 33: 633–647.