

Endemik Tunceli Sarımsağı (*Allium tuncelianum*) Toprağından *Bacillus velezensis* İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Antimikrobiyal Özellikleri

Isolation, Molecular Identification, and Antimicrobial Properties of *Bacillus velezensis* from Endemic *Allium tuncelianum* Soil

Altuğ KARAMAN^{*1}, Şükran KILIÇ², Halit YÜCEL³, Ferit Can YAZDIÇ¹, Fadime YAZDIÇ⁴

¹Munzur Üniversitesi, Pertek Sakine Genç Meslek Yüksekokulu Veterinerlik Bölümü, Tunceli

²Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu Tıbbi Dökümantasyon ve Sekreterlik Bölümü, Tunceli

³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü, Kahramanmaraş

⁴Munzur Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, Tunceli

Eser bilgisi/Article Info

Araştırma makalesi/Research article

DOI: 10.17474/artvinofd.1650289

*Sorumlu yazar/Corresponding author

Altuğ KARAMAN

e-mail: altugkaraman@hotmail.com

Geliş tarihi / Received

03.03.2025

Düzeltilme tarihi / Received in revised form

28.05.2025

Kabul tarihi / Accepted

13.07.2025

Elektronik erişim / Online available

15.10.2025

Anahtar kelimeler:

Bacillus velezensis

İkincil metabolitler

16S rDNA geni

Antübakteriyel

Keywords:

Bacillus velezensis

Secondary metabolites

16S rDNA gene

Antibacterial

Özet

Antibiyotik direnci, yeni antimikrobiyal ajanların keşfini gerektiren, her geçen gün büyüyen küresel bir endişedir. Spor oluşturan gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus velezensis*, lipopeptitler (sürfaktin, fenjisin, iturin) ve poliketidler (difficidin, makrolaktin) gibi biyoaktif bileşikler üretmesiyle bilinmektedir. Bu maddeler geniş spektrumlu antimikrobiyal özellikler göstermekle beraber, bitki patojenlerini baskılar ve bitki büyümesini teşvik eder. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'deki endemik Tunceli sarımsağı (*Allium tuncelianum* (Kollmann) Özhatay, B. Mathew ve Şiraneci) ile ilişkili topraktan *B. velezensis*'in izolasyonunu, tanımlanmasını ve antimikrobiyal potansiyelini araştırmaktır. *B. velezensis* ŞK_B3 suşu, 16S rDNA dizilemesi kullanılarak tanımlandı ve gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite açısından test edildi. Streptomisin ve penisilin gibi standart antibiyotiklere kıyasla orta düzeyde aktivite gösterse de, etkinliği özellikle gram pozitif bakterilere karşı dikkat çekici olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, özellikle gram pozitif bakterilere karşı orta düzeyde inhibitör aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu da tarımda bir biyokontrol ajanı ve yeni antibiyotik kaynağı olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Etkin bileşiklerin aydınlatılması ve antimikrobiyal etkinliğin artırılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Abstract

Antibiotic resistance is a growing global concern that requires the discovery of new antimicrobial agents. *Bacillus velezensis*, a spore-forming gram-positive bacterium, is known for producing bioactive compounds such as lipopeptides (surfactin, phenjicin, iturin) and polyketides (difficidin, macrolactin). These substances exhibit broad spectrum antimicrobial properties, suppress plant pathogens and promote plant growth. This study investigates the isolation, identification and antimicrobial potential of *B. velezensis* from soil associated with the endemic *Allium tuncelianum* in Türkiye. *B. velezensis* strain ŞK_B3 was identified using 16S rDNA sequencing and tested for antimicrobial activity against gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. Although it has moderate activity compared to standard antibiotics such as streptomycin and penicillin, its activity against gram-positive bacteria has been found to be particularly remarkable. The results showed that it has moderate inhibitory activity especially against gram-positive bacteria. This highlights its potential as a biocontrol agent and a source of new antibiotics in agriculture. Further studies are needed to elucidate the active compounds and to increase the antimicrobial activity.

GİRİŞ

Dünya genelinde 1930'larda penisilinin ilk başarılı uygulamasından bu yana antibiyotikler, hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için birçok alanda kullanılmıştır (Allen ve ark. 2013). Antibiyotikler, keşfedildikleri günden bu yana bulaşıcı hastalıkları kontrol altına almak

ve tarımsal verimliliği artırmak için vazgeçilmez olmuşturlar. Ancak antibiyotiklerin tedavi amaçlı olmayan kullanımı günümüzde antibiyotik direncinde artışla ilişkilidir (Marshall ve Levy 2011). İlaç dirençli bakterilerin artışı antibiyotiklerin etkinliğini azaltmış, tedavi edilemeyen enfeksiyonlara ve büyük bir halk sağlığı sorununa yol açmıştır. Endemik bitkilerin yetiştiği toprak mikrobiyomuysa yeni antimikrobiyal ajanlar için

umut vadeden kaynaklar sunmaktadır (Byun ve ark. 2023).

B. velezensis, lipopeptitler ve poliketidler de dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif ikincil metabolitler üretme yeteneğiyle bilinen, antimikrobiyal, antifungal ve bitki büyümesini teşvik edici aktiviteler gösteren çok yönlü çoğunlukla toprak, su, bitki kökleri ve fermente gıdalar gibi çeşitli kaynaklardan sıklıkla izole edilen, aerobik, gram pozitif, endospor oluşturan bir bakteridir (Fazle ve ark. 2020, Alenezi ve ark. 2021). Rabbee ve ark. (2019) atfen *B. velezensis* ilk olarak Ruiz-García ve ark. (2005) tarafından İspanya'nın Malaga kentinde bulunan Vélez nehrinin çevresel örneklerinden iki yeni *Bacillus* türünün izole edilmesiyle tanımlandığını ifade etmişlerdir (Rabbee ve ark. 2019). Bu bakterinin çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin üretimi yoluyla bitki patojenlerine karşı antagonistik etkiler gösterdiği bilinmektedir (Cao ve ark. 2018). Tarihsel olarak 2016 yılında, daha önce *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus* ve *B. oryzicola* olarak sınıflandırılan diğer birkaç *Bacillus* türü, *B. velezensis* suşları olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Dunlap ve ark. 2016). RNA polimeraz beta alt birim gen dizisine ve çekirdek genomuna dayanan filogenetik analizler, bu bakterinin *B. methylotrophicus* ve *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42'den oluşan bir türdeş gruba ait olduğunu ortaya koymuştur (Fan ve ark. 2017). *Bacillus* spp., çeşitli yapısal formlara sahip antimikrobiyal maddeler üretme yeteneğine sahiptirler (Pereira ve ark. 2019). Özellikle *B. velezensis*, fitopatogenik mantarlar ve bakteriler de dâhil olmak üzere çok çeşitli patojenlerin büyümesini engelleyen surfaktin, fengycin, basilibaktin, difficidin, basililen, makrolaktin, basilsin, asetoin ve birçok uçucu organik bileşik gibi birçok ribozomal ve ribozomal olmayan biyoaktif metabolit sentezlediği bildirilmiştir (Rabbee ve ark. 2019, Tu ve ark. 2024). Tarımda biyogübre ve biyopestisit olarak kullanımı çeşitli çalışmalarla doğrulanmıştır (Rabbee ve ark. 2023, Li ve ark. 2024). Bu çalışmalarda *B. velezensis*'in ürün verimini iyileştirme, bitkinin biyotik ve abiyotik streslere karşı direncini artırmadaki rolü gösterilmiştir (Rabbee ve ark. 2023, Li ve ark. 2024). Ayrıca genom analizleri, çok sayıda biyosentetik gen kümesinin varlığını ortaya çıkarmış ve bu da *B. velezensis*'in yeni ilaç keşfi ve

ekolojik uygulamalar için potansiyelini göstermiştir (Liu ve ark. 2024).

Kapsamlı araştırmalara rağmen, *B. velezensis* tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitlerin tam spektrumu ve çeşitli patojenlere karşı spesifik etki biçimleri hakkında bilgi boşlukları devam etmektedir. Genom madenciliği, karakterize edilmemiş metabolitlere sahip biyosentetik gen kümelerini belirlemiş olsa da, bunların biyolojik işlevleri ve patojen baskılanmasındaki rolleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Tu ve ark. 2024). Tunceli endemik sarımsak toprağı gibi benzersiz ekosistemlerdeki *B. velezensis* gibi bakterilerin ürettikleri sekonder metabolitlerin tanıtılması için daha fazla çalışma gerekmektedir. Bu tarz bölgelerdeki bakteri örneklerinin ürettikleri sekonder metabolitlerin bitkilerde indüklenmiş sistemik direnci tetikleyebildiği ve böylelikle de bitkilerin kendilerini patojen mikroorganizmaların tekrarlayan saldırılarına karşı savundukları belirtilmiştir (Yazdıç ve ark. 2018, Wang ve ark. 2020).

Endemik bitkilerin yetiştikleri topraklardaki mikrobiyal ekosistemiyle nasıl etkileşime girdiğini anlamak, biyolojik kontrol potansiyelleri ve ekolojik uyumlulukları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile endemik *Allium tuncelianum* toprağından *B. velezensis* suşları izole edilmiş, biyokimyasal ve moleküler tanımlama yapılarak antimikrobiyal özellikleri değerlendirilmiştir. Bulgular, çevre dostu tarım uygulamalarının geliştirilmesine katkıda bulunmakla beraber farmasötik kullanımlar için metabolit üretiminin optimize edilmesi gibi daha ileri biyoteknolojik uygulamalar için de temel oluşturacaktır.

Materyal ve Metot

Toprak Örnek Toplanması

Bu çalışmada, Tunceli Ovacık ilçesinde Köşeler ve Koyungölü köylerinde ~1200 rakım üzeri yayılış gösteren dağ sarımsağı toprak örneklerinden bakteri izole edilmiştir. Toprak örnekleri Tunceli'nin Ovacık ilçesindeki beş farklı dağ sarımsağı dağılım alanından toplanmıştır. Bu örnekler dağın ovacık ilçesine bakan

kısından uygun olan en steril şekilde toplanarak, toplama kaplarıyla birlikte laboratuvara getirilmiştir.

Toprak Bakterilerinin İzolasyonu

Her toprak örneğinin yaklaşık 200 g'ı fizyolojik suda (10 g toprak başına 9 mL) süspanse edilerek spor oluşturmeyen bakterileri ortadan kaldırmak için 63°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım soğutulduktan sonra 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} şeklinde dilüsyonlar hazırlanarak Plate Count Agar besiyerine yüzeysel ekim yapılmıştır. Daha sonrasında bakteri gelişimi için petriler 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Saf kültür, sonraki çalışmalar için 4 °C'de saklanmıştır. Farklı morfolojik özellik gösteren koloni örnekleri Nutrient Broth besiyerine ekilerek 30°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen örneklerden steril ependorflara %30'luk steril gliserol kullanılarak stok alınmıştır (Yazdıç ve ark. 2018).

İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu

İzole edilen tüm bakteri örneklerinin tanımlanması için gram boyama ve endospor boyamanın yanı sıra katalaz, karbonhidrat fermentasyon, nişasta hidroliz, üreaz aktivite, nitrit-nitrat ve amonyak testleri yapılmıştır (Collins ve Lyne 1970).

Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Sıvı besiyerinde bir gece boyunca geliştirilen tek koloni örnekleri, 2 ml'lik mikro santrifüj tüpüne aktarılmış ve 10.000×g'de 3 dakika santrifüj edilerek peletler toplanmıştır. Aynı işlem, yeterli miktarda hücre toplamak (~100 mg) için tekrarlanmıştır. Daha sonrasında DNA izolasyonu ticari bakteri DNA izolasyon kiti (AllPrep Bacterial DNA/RNA/Protein Kit-QIAGEN) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri 4 °C'de depolanmıştır. İzole edilen genomik DNA örnekleri, 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometre kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca genomik DNA örnekleri %1'lik agaroz jel kullanılarak

etidyum bromür ile boyanmış ve fotoğraflanmıştır (Bektas ve ark. 2024).

16S rDNA Amplifikasyonu ve Dizilemesi İle Bakterilerin Moleküler Tanımlanması

Evrensel primerler UB_16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve UB_16SR (5'-GTACGCTACCTTGTACGAC-3') 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılmıştır (Mauti ve ark. 2013) PCR şartları olarak 94 °C'de 5 dakikalık ilk denatürasyon, ardından 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika yapışma ve 72 °C'de 2 dakika uzatma bu basamaklar 35 döngü, daha sonrasında 72 °C'de 5 dakikalık son uzatma şeklinde gerçekleştirilmiştir. rDNA amplifikasyon reaksiyon karışımı (40 µl), her izolatin toplam 10 ng DNA, ileri ve geri primerler yaklaşık 10 pmol ile 2X master mix kullanılarak (FIREPol Master Mix) gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyona uğramış PCR ürünleri %1.5 agar jel üzerinde elektroforeze edilmiştir. Jel etidyum bromür ile boyanarak fotoğraflanmıştır. Amplifikasyonu yapılan 16S rDNA gen parçası saflaştırılmış ve PCR amplifikasyonu için kullanılan aynı primer kullanılarak DNA dizileme Sanger dizileme yöntemi kullanılarak, DNA dizilemesi 3130xl Genetik Analiz Cihazı (Applied Biosystems, ABD) yardımıyla çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen dizileri, mevcut karakterize edilmiş referans dizileriyle eşleşmeleri belirlemek için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nin (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) web sitesinden edinilebilen "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) aracı kullanılarak tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Bektas ve ark. 2024).

Test Organizmaları ve Büyüme Koşulları

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar Munzur Üniversitesi Moleküler Genetik Laboratuvarından temin edilmiştir. *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Bacillus subtilis* (DSM 1971) suşları kullanılmıştır. Testlerde kullanılan mikroorganizmalar Mueller Hinton Broth (Merck Darmstadt, Germany)'da geliştirilerek 10^6 koloni

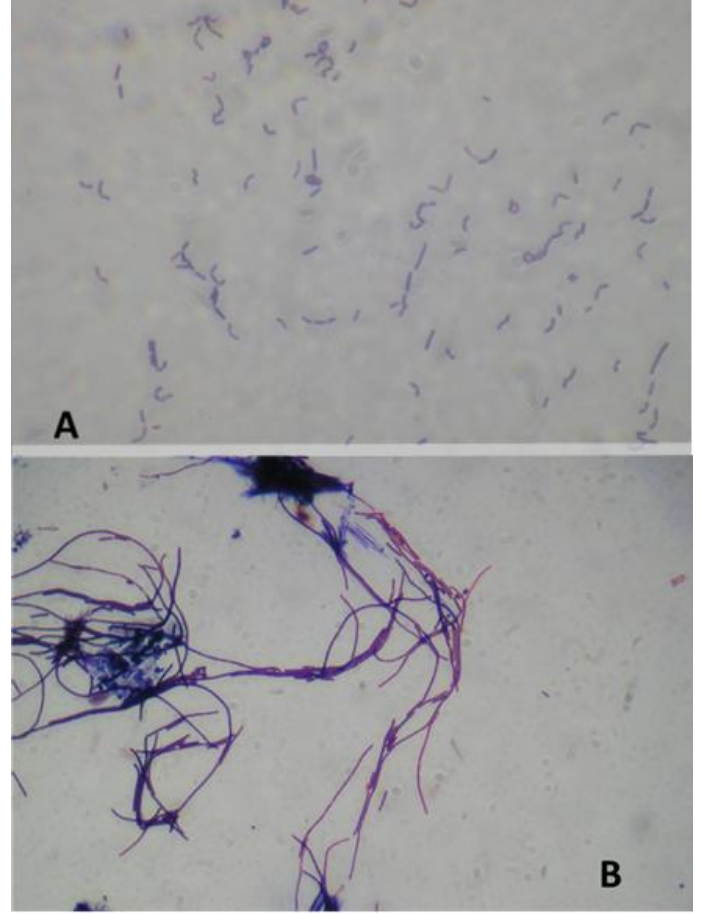
oluşturma birimi (KOB)/mL olacak şekilde seyrettiler kullanılmıştır.

Agar Kuyu Difüzyon Testi Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu yöntem daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi kullanılmıştır (Karaman ve ark. 2023, Taşar ve ark. 2023). Kısacası taze bakteri kültürleri (106 kob/mL) petrilerdeki Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine steril swaplar yardımıyla yayma ekim yöntemi kullanılarak ekilmiştir. Petri yüzeyinin bakteri örneklerini tamamen emmesi için 15 dakika kadar beklenmiştir. Daha sonrasında MHA petrilere oyuk açmak için steril mantar delici (6 mm çap) kullanılmış ve her kuyuya 10 µL uçucu yağ asidi ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak standart antibiyotikler Streptomisin ve Penisilin (10 mcg/ml) 10 µL kullanılarak test edilen organizmaların duyarlılıkları da belirlenmiştir. Hazırlanan petri kutuları 1 saat +4 °C'de bekletildikten sonra inkübatöre yerleştirilerek, +37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda antibakteriyel aktivite, her bir kuyunun etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Antibakteriyel aktivite testleri üç kopya halinde yapılmış ve kuyucuk etrafındaki şeffaf zon alanlarının çapı ölçülerek değerlendirilmiştir (Yazdıç ve ark. 2023).

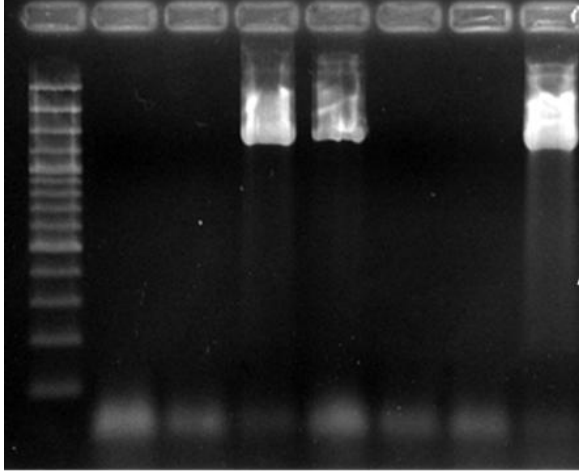
BULGULAR

Bu çalışmada Ovacık ilçesinden toplanan 5 farklı toprak örneğinden farklı morfolojilere sahip toplam 20 farklı izolat elde edilmiştir. Her bir habitattan elde edilen morfortip sayısı 1 ile 4 arasında değişmiştir. Agarlı besiyerinde büyüyen kolonilerden çizgi yöntemi ile tek koloniler başarı ile elde edilmiştir ve başarıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış izolatların morfolojik karakterizasyonu saf kolonilerin mikroskopik incelemesiyle gerçekleştirilmiştir. Ancak gerek Gram boyama (Şekil 1) gerekse biyokimyasal test sonucunda 10 adet saf *Bacillus* spp. elde edilmiştir.



Şekil 1. İzole edilen bazı bakterilerin Gram boyama sonuçları (A-B)

Saflaştırılmış izolatlardan çıkarılan genomik DNA, 16S rDNA geninin PCR amplifikasyonu ve dizilenmesi moleküler tanımlama için kullanıldı. Yaklaşık 1500 bp'lik bakteri DNA'larına ait PCR amplifikasyon bantları, Şekil 2'de gösterildiği gibi DNA belirteci ile karşılaştırıldığında yaklaşık 1500 bp pozisyonunda UV transillüminatör altında agar jel elektroforezinde gözlenmiştir. 16SrDNA geninin dizileri Chromas (sürüm 2.6.6) kullanılarak düzenlendi ve NCBI'da BLAST arama aracı kullanılarak analiz edilmiştir. Diziler NCBI veritabanındaki dizilerle karşılaştırarak bakteri türlerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA dizi analizi, izolat ŞK_B3'ün *B. velezensis* olduğunu *B. velezensis* GMU231'e (NCBI erişim numarası OP364986.1) %97.8 benzerlikle doğrulanmıştır (Çizelge 1).



Şekil 2. PCR sonucu görüntüsü (%1.5 agarozda)

Çizelge 1. Elde edilen DNA dizinin NCBI Blast sonucu

Bakteri Kodu	NCBI Sonucu	Benzerlik Yüzdesi
ŞK_B3	<i>B. velezensis</i> strain A35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG598458.1)	97.54

Çizelge 2. Seçilen *B. velezensis*'in (ŞK_B3) patojen bakterilere karşı antibakteriyel etkileri (Veriler üç bağımsız örneğin ortalamaları ± standart sapması olarak sunulmuştur)

		<i>B. velezensis</i> (ŞK_B3)	Streptomycin (S10)	Penicillin (P10)
Gram -	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	7.7±0.78	16.70±1.12	33.56±4.56
	<i>P. aeruginosa</i> (DSM 50071)	8.68±1.10	12.61±2.09	35.50±2.57
Gram +	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 25923)	7.86±1.86	10.15±2.06	31.83±3.06
	<i>B. subtilis</i> (DSM 1971)	-*	11.43±3.23	32.16±3.55

Not: *-Herhangi bir aktivite tespit edilememiştir

TARTIŞMA

Bacillus cinsi ile ilişki birçok tür toprak mikroflorasında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu bakterilerin sıcaklık, kuruma ve radyasyon gibi aşırı çevre koşullarına dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu özelliklerinin dirençli kalın bir dış duvar yapısına sahip spor formları ile sağlamaktadırlar (Liu ve ark. 2020). Bu açıdan birçok çalışmada *Bacillus* türlerinin izolasyonunda ısı şok yönteminin kullanıldığı böylelikle toprak gibi karmaşık

Topraktan izole edilen ve tanımlanan *B. velezensis* (ŞK_B3) bakteri türünün, standart antibiyotikler olan streptomisin (S10) ve penisilin (P10) ile dört patojenik bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 2). *B. velezensis* (ŞK_B3), daha güçlü antibiyotiklerle karşılaştırıldığında dört bakterinin tamamına karşı orta düzeyde inhibitör aktivite göstermiştir. *B. velezensis*'den elde edilen ekstraksiyon gram pozitif bakteriler (*S. aureus*, *B. subtilis*), gram negatif bakterilerden (*E. coli*, *P. aeruginosa*) biraz daha duyarlıydı. Elde edilen *B. velezensis* ŞK_B3'ün ürettiği spesifik antimikrobiyal bileşiklere ilişkin daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bunun için daha sonra yapılacak çalışmalarda Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) testi, antibakteriyel aktivitenin daha niceliksel bir ölçümünü sağlayacağı için yapılması planlanmaktadır. *B. velezensis* (ŞK_B3) geniş spektrumlu bir antibakteriyel ajan olarak potansiyel göstermektedir. Ancak etkinliği özellikle gram-negatif bakterilere karşı konvansiyonel antibiyotiklere göre daha düşüktür. Aktif bileşiklerini aydınlatmak, etkinliğini geliştirmek ve kombinasyon tedavilerinde veya belirli hedeflere yönelik potansiyel uygulamaları araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

floralardaki diğer spor oluşturmeyen mikrobiyal izolatların baskılanmasında hızlı ve etkili bir yaklaşım olduğunu kanıtlamıştır (McHugh ve ark. 2017). Bu çalışmada da kullanılan ısı şok yöntemi ile endemik *Allium tuncelianum* toprağından *B. velezensis* başarılı bir şekilde izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bilinen tüm bakterilerde bulunan 16S rDNA geni genellikle bakterileri tanımlamak için kullanılmaktadır (Bartoš ve ark. 2024). 16S rDNA geninin fonksiyonunun zamanla değişmemiş olması ve 16S rDNA geninin uzunluğunun yeterli oluşu,

geleneksel yöntemlerin aksine yeni bakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemler için tam bir hazine gibidir. Bu açıdan bakteri filogenisini ve taksonomisini incelemek için en iyi araç olarak kabul edilir (Alyousif 2022). Çalışmadaki *B. velezensis* ŞK_B3'ün moleküler tanımlanması içinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

B. velezensis, çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretme yeteneğiyle bilinen bir bakteridir (Khalid ve ark. 2021). Bu bileşikler, tarım, su ürünleri yetiştiriciliği ve tıp dâhil olmak üzere farklı alanlarda patojenlerle mücadelede önemli bir potansiyele sahiptir. *B. velezensis*, surfaktin, iturin ve fengycin gibi bir dizi lipopeptidin yanı sıra diffididin, basilaen ve makrolaktin gibi poliketidler üretir. Bu bileşikler, bakteri ve mantarlara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteleriyle bilinirler (Guo ve ark. 2020). Bakteri ayrıca mersasidin ve amilosikliklin gibi bakteriosinler ve çeşitli patojenleri inhibe ettiği gösterilen basilobaktin gibi sideroforlar üretir. *B. velezensis*'ten elde edilen antimikrobiyal bileşikler, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı geniş spektrumlu aktivite gösterir. Bunlara metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve çeşitli balık ve bitki patojenleri gibi patojenler dâhildir (Taghavi ve ark. 2023). Bu bileşikler, farklı sıcaklıklar, pH seviyeleri ve yüzey aktif maddeler ve metal iyonlarının varlığında olmak üzere çeşitli koşullar altında kararlılıkları ile dikkat çeker ve bu da onları pratik uygulamalar için sağlam adaylar yapar (Keshmirshekan ve ark. 2024). *B. velezensis*, bitki patojenlerini baskılama ve bitki büyümesini teşvik etme yeteneği nedeniyle tarımda bir biyokontrol ajanı olarak kullanılır. Antimikrobiyal bileşikleri, pirinç kılıfı yanıklığı ve pirinç patlaması gibi hastalıkların yönetilmesine yardımcı olabileceği vurgulanmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde *B. velezensis*'in, bağırsaktaki zararlı patojenlerin bolluğunu azaltarak Nil tilapisi (*Oreochromis niloticus*) gibi balıklarda büyüme performansını ve hastalık direncini artırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2019).

Bakteriler gibi doğal kaynaklardan antimikrobiyal metabolitlerin araştırılması, insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde patojen enfeksiyonlarıyla mücadele için en umut verici alternatiflerden biri olarak kabul

edilmektedir (Pournejati ve ark. 2019). Önceki çalışmalara dayanarak, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* ve *B. pumilus* grubu, antimikrobiyal metabolit üretimiyle ilişkili en yaygın bakteri gruplarından birisini temsil etmektedir (Ngalimat ve ark. 2021). Son yıllarda, *B. velezensis* türü doğal ortamdan izolasyonu ve tanımlanması giderek artmaktadır (Liu ve ark. 2020). Biyolojik kontrol ajanları olarak pratik uygulamasının yanı sıra, *B. velezensis* suşları tarafından üretilen aktif maddelerin anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-viral özelliklere sahip olduğu ortaya çıkarılmaktadır (Wang ve ark. 2021). Bu çalışmadaki *B. velezensis* ŞK_B3 özellikle gram-pozitif bakterilere karşı orta düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu durum *B. velezensis* tarafından surfaktin ve fengycin gibi ikincil metabolitlerin üretimini vurgulayan önceki çalışmalarla uyumludur (Rabbee ve ark. 2019). Gram negatif bakterilere karşı azalmış aktivite ise antimikrobiyal ajanlara karşı gram negatif bakterilerin zar yapısından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. *B. velezensis*'in gen dizileme verilerinin tamamı veya bir kısmı 2019 yılından itibaren NCBI veritabanında bulunmaktadır. Genom madenciliği, çeşitli antibakteriyel maddelerin geliştirilmesinde kullanılabilecek antibakteriyel madde senteziyle ilişkili gen kümelerinin tanımlanmasını kolaylaştırmış ve böylelikle *B. velezensis* gibi tarımsal uygulamalarda kullanıma potansiyeli yüksek suşların da önemli özellikleri belirlenebilmiştir (Grady ve ark. 2019). Bu nedenle, yeni *B. velezensis* ŞK_B3 suşunun genom dizilimi sekonder metabolitlerin senteziyle ilgili yeni gen kümelerinin tanımlanmasına olanak sağlayabilir. Bu çalışmada gözlemlenen antimikrobiyal aktivite, ŞK_B3'ün tarımda biyokontrol ajanı olarak ve farmasötiklerde yeni antibiyotik kaynağı olarak potansiyel uygulamalarını göstermektedir. Ancak aktif bileşikler izole etmek ve karakterize etmek, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) analizleri yapmak ve biyoaktif metabolitlerin üretimini optimize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada, kesin tanımlama için moleküler teknikler kullanarak, endemik *Allium tuncelianum* ile ilişkili topraktan *B. velezensis* başarılı bir

şekilde izole edilmiş ve tanımlanmıştır. İzole edilen suşun 16S rRNA gen dizilimi yoluyla kapsamlı karakterizasyonu, bunun *B. velezensis* ile taksonomik ilişkisini doğrulamış ve böylece *Allium tuncelianum* toprağıyla ilişkili mikrobiyal çeşitlilik hakkındaki bilgi birikimine katkıda bulunmuştur. *Bacillus* türlerinin yüksek enzimatik aktivitesi bulundukları topraklardaki bitkilerin doğal savunma mekanizmalarını uyarılmasında rol oynayabilir. Bu bakımdan *B. velezensis* ŞK_B3 suşu gibi bağışıklık sistemini destekleyen *Allium tuncelianum* gibi bitki toprakları yeni antimikrobiyal maddeler için önemli bir kaynaklar olarak görülebilir. Gelecekteki araştırmalar, *B. velezensis* ŞK_B3 suşu gibi sekonder metabolit üretme özeliği bulunan ve el değmemiş doğal arazilerindeki bitkilerle sinerjik etkileri bulunan bakterilerdeki bu metabolitlerin etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için ürettiği biyoaktif bileşiklerin biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonuna odaklanmalıdır. Ayrıca izole edilmiş *B.velezensis* suşunun antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması, bir dizi patojenik mikroorganizmaya karşı önemli önleyici etkiler ortaya çıkarmıştır. Gözlemlenen antimikrobiyal aktivite, *B. velezensis*'in tarımsal ve farmasötik uygulamalarda yeni antimikrobiyal ajanların veya biyokontrol ajanlarının geliştirilmesi için değerli bir kaynak olma potansiyelini vurgulamaktadır. Antibakteriyel metabolitlerinin nicel ve nitel değerlendirmeleri, uygulamasını optimize etmek için önemlidir. Biyoteknolojik potansiyelinin tam olarak kullanılabilmesi için ise daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK 2209/A-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı (Proje No: 1919B012220217) kapsamında desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Alenezi FN, Slama HB, Bouket AC, Cherif-Silini H, Silini A, Luptakova L ...Belbahri L (2021) *Bacillus velezensis*: a treasure house of bioactive compounds of medicinal, biocontrol and environmental importance. *Forests*, 12(12):1714. <https://doi.org/10.3390/f12121714>
- Allen HK, Levine UY, Looft T, Bandrick M, Casey TA (2013) Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.*, 21:114–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.001>
- Alyousif NA (2022) Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus* related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(2). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230209>

- Bartoš O, Chmel M, Swierczková I (2024) The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the “gold standard” for bacterial species identification. *Scientific Reports*, 14(1):9067. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59667-3>
- Bektas I, Yazdıç FC, Kusek M (2024) Molecular characterization of apple endophytic bacteria and biological effect on Alternaria rot on apple. *Journal of Phytopathology*, 172(3):e13323. <https://doi.org/10.1111/jph.13323>
- Byun H, Brockett MR, Pu Q, Hrycko AJ, Beld J, Zhu J (2023) An intestinal *Bacillus velezensis* isolate displays broad-spectrum antibacterial activity and prevents infection of both gram-positive and gram-negative pathogens in vivo. *Journal of Bacteriology*, 205(6):e00133-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00133-23>
- Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, Xiong H, Helmann JD, Cai Y (2018) Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.*, 8: 4360. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- Collins CH, Lyne PM (1970) Microbiological methods.
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP (2016) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66: 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
- Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R (2017) *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front. Microbiology*, 8:22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fazle Rabbee M, Baek KH (2020) Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*, 25(21):4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Grady EN, MacDonald J, Ho MT, Weselowski B, McDowell T, Solomon O (2019) Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19:1-14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Guo Y, Zhou J, Tang Y, Ma Q, Zhang J, Ji C (2020) Characterization and genome analysis of a zearalenone-degrading *Bacillus velezensis* strain ANSB01E. *Curr. Microbiol.*, 77:273–278. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01811-8>
- Karaman A, Taşar N, Yazdıç FC, Gedik O (2023) *Hypericum* L. cinsine ait bazı türlerin uçucu yağlarının antibakteriyel etkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(1):73-79. <https://doi.org/10.21597/jist.1136935>
- Keshmirshakan A, de Souza Mesquita LM, Ventura SP (2024) Biocontrol manufacturing and agricultural applications of *Bacillus velezensis*. *Trends in Biotechnology*, 42(8):986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.02.003>
- Khalid F, Khalid A, Fu Y, Hu Q, Zheng Y, Khan S (2021) Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: a review. *Journal of Microbiology*, 59:627-633. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1161-1>
- Li S, Hu J, Ning S, Li W, Jiang R, Huang J, Li Y (2024) *Bacillus velezensis* HY19 as a sustainable preservative in post-harvest citrus (*Citrus reticulata* Blanco L.) fruit management. *Food Control*, 155:110068. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110068>
- Liu Y, Teng K, Wang T, Dong E, Zhang M, Tao Y, Zhong J (2020) Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 128 (1):242-254. <https://doi.org/10.1111/jam.14459>

- Liu Y, Yin C, Zhu M, Zhan Y, Lin M, Yan Y (2024) Comparative genomic analysis of *Bacillus velezensis* BRI3 reveals genes potentially associated with efficient antagonism of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Genes*, 15(12):1588. <https://doi.org/10.3390/genes15121588>
- Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24:718–733. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-11>
- Mauti EM, Mauti GO, Ouno GA, Mabeya BM, Kiprono S (2013) Molecular identification of soil bacteria by 16srDNA sequence. *J. Natural Sci. Res*, 3(14): 51-58.
- McHugh TA, Compson Z, van Gestel N, Hayer M, Ballard L, Haverty M (2017) Climate controls prokaryotic community composition in desert soils of the southwestern United States. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(10):fix116. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix116>
- Ngalimat MS, Yahaya RSR, Baharudin MMA, Yaminudin SM, Karim M, Ahmad SA, Sabri S (2021) A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3):1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>
- Pereira JQ, Ritter AC, Cibulski S, Brandelli A (2019) Functional genome annotation depicts probiotic properties of *Bacillus velezensis* FTC01. *Gene*, 713:143971. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143971>
- Pournejati R, Gust R, Reza H, Heidari K (2019) An aminoglycoside antibacterial substance, S-137-R, produced by newly isolated *Bacillus velezensis* strain RP137 from the Persian Gulf. *Curr Microbiol*, 76(9):1028–37. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01715-7>
- Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek K (2019) *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24:046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rabbee MF, Hwang BS, Baek KH (2023) *Bacillus velezensis*: a beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture. *Agronomy*, 13(3):840. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030840>
- Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, Quesada E (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, Southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1):191-195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- Taghavi S, Montazeri EA, Zekavati R, Saffarian P (2023) Identification of a new compound (4-fluoro-2-trifluoromethyl imidazole) extracted from a new halophilic *Bacillus aquimaris* strain persiangulf ta2 isolated from the Northern Persian Gulf with broad-spectrum antimicrobial effect. *Iranian Journal of Biotechnology*, 21(4):e3359. <https://doi.org/10.30498/ijb.2023.338788.3359>
- Taşar N, Yazdıcı FC, Karaman A, Gedik O (2023) Determining the antimicrobial activities of the essential oils of some taxa used as thyme. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 7(2):52-55.
- Tu M, Zhu Z, Zhao X, Cai H, Zhang Y, Yan Y (2024) The versatile plant probiotic bacterium *Bacillus velezensis* SF305 reduces red root rot disease severity in the rubber tree by degrading the mycelia of *Ganoderma pseudoferreum*. *Journal of Integrative Agriculture*, 24(8): 3112–3126. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2024.09.027>
- Wang C, Zhao D, Qi G, Mao Z, Hu X, Du B, Liu K, Ding Y (2020) Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for promoting the growth of *Malus hupehensis* reh. and inhibiting *Fusarium verticillioides*. *Frontiers in Microbiology*, 10:2889. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02889>
- Wang B, Liu C, Yang X, Wang Y, Zhang F, Cheng H, Zhang L, Liu H (2021) Genomics-guided isolation and identification of active secondary metabolites of *Bacillus velezensis* BA-26. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1):895-904. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1934540>
- Yazdıcı FC, Karaman A, Yazdıcı F (2018) Farklı enerji kaynaklarında geliştirilen bazı bacillus suşları tarafından üretilen sekonder metabolitlerin antimikrobiyal etkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6 (10):1437-1443. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i10.1437-1443.2066>
- Yazdıcı FC, Karaman A, Torgut G, Ayhan NK (2023) Antibacterial activity of novel synthesized chitosan-graft-poly (N-tertiary butylacrylamide)/neodymium composites for biomedical application. *Journal of Basic Microbiology*, 63(9):1049-1056. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300004>
- Zhang D, Gao Y, Ke X, Yi M, Liu Z, Han X, Shi C, Lu M (2019) *Bacillus velezensis* LF01: in vitro antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:9023-9035. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10176-8>