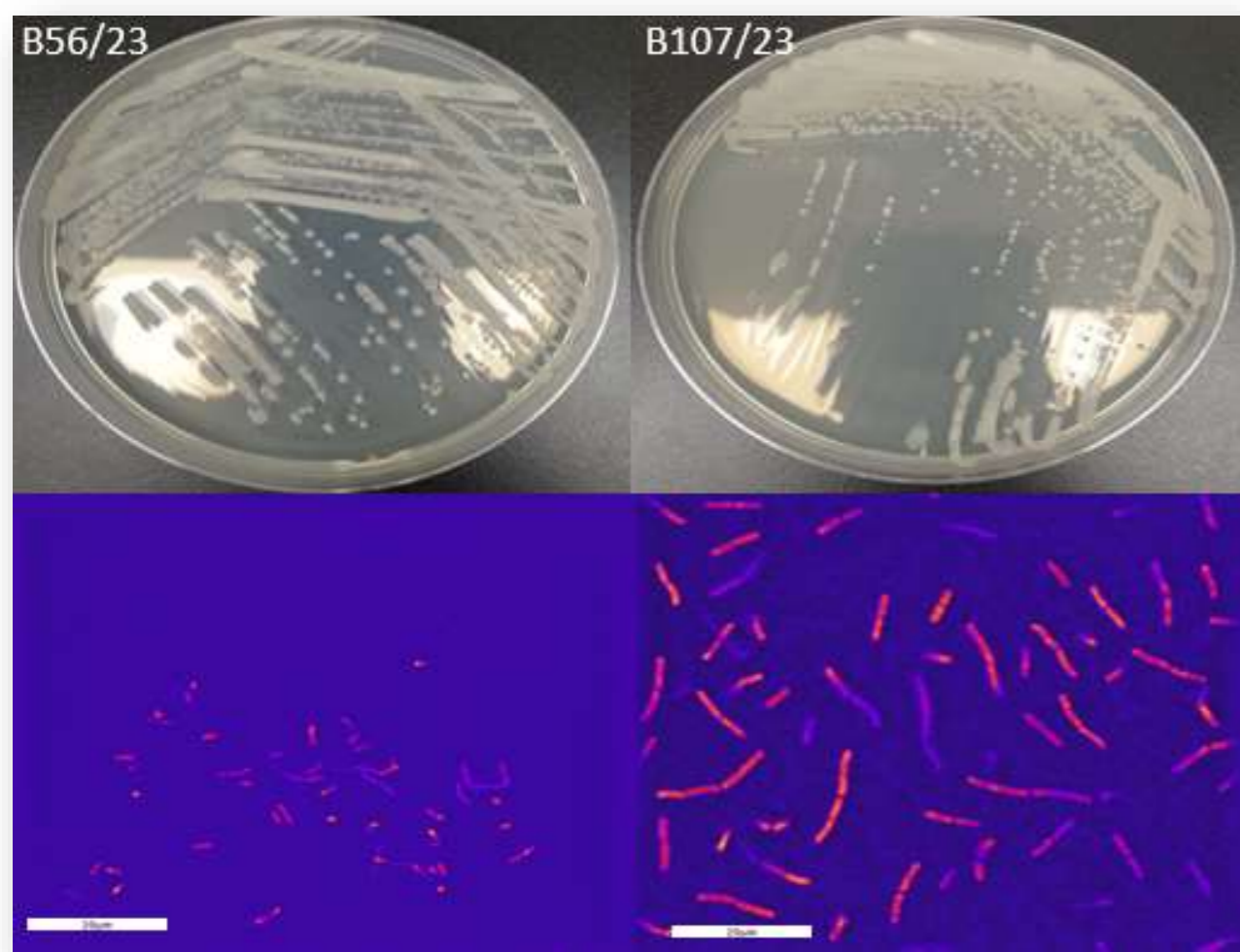


*Microgreens*, określane jako młode sadzonki roślin gatunków jadalnych, zbierane po rozwinięciu się pierwszych liści kotyledarnych, oferują liczne korzyści zdrowotne oraz przyciągają zainteresowanie konsumentów ze względu na swój ciekawy wygląd i kuszący smak. Ponadto idelanie wpisują się w założenia rolnictwa miejskiego. Jednak pomimo licznych zalet, są wysoce podatne na stresy abiotyczne, w szczególności stres suszy, który prowadzi do szybkiej utraty świeżości oraz wysokiej podatności na gnicie i wędnięcie. Obecne dane literaturowe oferują ograniczoną liczbę rozwiązań tego problemu. Rewolucyjnym podejściem jest wzbogacanie holobiontu *microgreens* o gatunki mikroorganizmów oferujące geny związane z mechanizmami adaptacji roślin do warunków suszy, poprzez inokulacje wybranym szczepem. Bakterie związane z roślinami odpornymi na suszę często obejmują gatunki z rodzaju *Bacillus*. Liczne badania nad gatunkami *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* oraz *Bacillus megaterium* wykazały ich pozytywny wpływ na plony w warunkach stresu suszy, a także poprawę ich jakości i trwałości, co stanowi podstawę do podobnych badań w ujęciu *microgreens*.

Prezentowane badania koncentrują się na analizie transkryptomu szczepów wyizolowanych z produktów mlecznych i fermentowanych, przy użyciu platformy Illumina MiSeq, w celu selekcji izolatu o najlepszym potencjale kolonizacyjnym względem tkanek roślinnych, oraz z najlepszym profilem fenotypowym, który zagwarantuje poprawę jakości, trwałości oraz oporności względem stresu suszy *microgreens*.



24-godzinne hodowle bakteryjne na podłożu BC

Zdjęcia szczepów wykonane za pomocą holotomografu NanoLive

*Microgreens* rzodkiewki (*Raphanus sativus* var. *Sativus*)



## Metody

Na podstawie wcześniejszej analizy genomu dokonano identyfikacji wyizolowanych z kiszonek oraz produktów mlecznych szczepów, oraz selekcji izolatów, o potencjalnie najkorzystniejszym profilu genetycznym, w ujęciu inokulacji *microgreens*. Ze szczepów B56/23, który zostały zidentyfikowane jako *B. subtilis*, wyizolowanego z mleka z proszku, oraz szczepu B107/23, zidentyfikowanego jako *B. megaterium*, wyizolowanego z kiszonek buraków wyizolowano RNA, korzystając z komercyjnego zestawu RNeasy Extraction Kit (Qiagen). Jakość i ilość RNA oceniono za pomocą fluorometru Quantus oraz TapeStation 4200 System. Do przygotowania bibliotek zastosowano zestaw Illumina Stranded mRNA Prep, proces obejmował fragmentację RNA, syntezy cDNA pierwszej i drugiej nici, end-repair, A-tailowanie oraz ligację adapterów indeksujących oraz wzbogacenie bibliotek poprzez amplifikację PCR. Biblioteki zostały oczyszczone za pomocą AMPure XP Beads, a ich jakość i rozmiar oceniono ponownie na TapeStation System. Stężenie bibliotek zmierzono za pomocą fluorometru Quantus. Przygotowane biblioteki pochodzące z każdego szczepu znormalizowano do tej samej molarności i połączono w pulę. Sekwencjonowanie transkryptomu przeprowadzono na platformie Illumina MiSeq. Następnie przeprowadzono analizę bioinformatyczną - mapowanie odczytów RNA-seq przeprowadzono za pomocą narzędzia STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference), a kwantyfikację transkryptomu przeprowadzono przy użyciu programu Salmon. Obliczenia ekspresji przedstawiono jako surowe liczby odczytów. Otrzymane wyniki poddano skringowi w celu wyselekcjonowania genów podlegających ekspresji w największym stopniu.

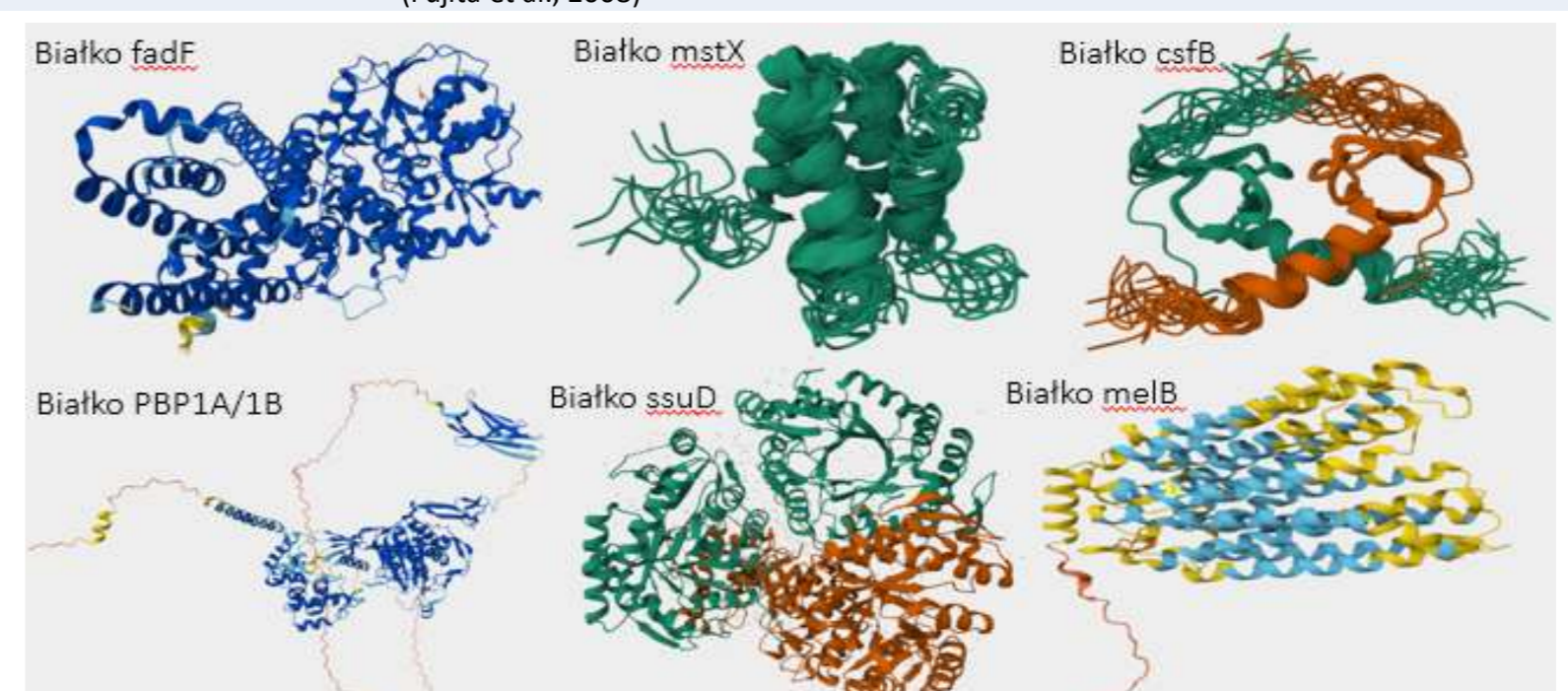
## Wyniki

Genami, które ulegały ekspresji w najwyższym stopniu w transkryptomie szczepu B56/23 były geny *ssrA*, *mstX*, *csfB*, *Isp1* oraz *fadF*. Gen *ssrA* koduje tmRNA, będącego znacznikiem peptydowym dołączanym na końcu wadliwych polipeptydów, co kieruje je do degradacji proteolitycznej. Zwiększona liczba niekompletnych lub uszkodzonych białek wymusza silniejszą aktywność tmRNA, by oznaczyć je do degradacji i zapobiec ich nagromadzeniu, co może być wskaźnikiem stresu, jednakże wysoki poziom ekspresji sugeruje wysokie właściwości adaptacyjne szczepu. Gen *mstX* koduje małe białko MstX (mistic-like), specyficzne dla *Bacillus* sp. Jest kluczowym elementem regulacji tworzenia biofilmu, jednego z kluczowych dla wydajnej kolonizacji tkanek roślinnych procesu. Gen *csfB* koduje małe białko-anty-sigma, wiążące jony  $Zn^{2+}$  i tworzące homodimer. Hamuje dwa alternatywne czynniki sigma:  $\sigma^G$  oraz  $\sigma^E$ , regulując proces sporulacji, będący kluczowym mechanizmem chroniącym przed stresami środowiskowymi. Gen *Isp1* koduje serynową proteazę wewnątrzkomórkową, występującą w postaci nieaktywnej we wczesnych fazach sporulacji. Wykazano, że degraduje białka takie jak ClpC i EF-Tu w fazie stacjonarnej, co sugeruje rolę w adaptacji do stresu i remodelingu proteomicznym. *Isp-1* pełni kluczową funkcję w degradacji niektórych białek w okresie fazy stacjonarnej, co wspiera adaptację i recykling zasobów wewnątrzkomórkowych. Gen *fadF* koduje białko *fadF* katalizujące oksydację kwasów tłuszczowych, co jest ważnym elementem adaptacyjnym na stres substratowy. Genami, które ulegały ekspresji w najwyższym stopniu w transkryptomie szczepu B107/23 *melB*, *ponA*, *ssuD*, *glcA* oraz *pbpX*. Gen *melB* reguluje system transportu melibiozy. System ten może wykorzystywać  $H^+$ ,  $Na^+$  oraz  $Li^+$  jako kationy sprzężone do wspólnego transportu, w zależności od konkretnego cukru, który jest transportowany, podczas gdy większość systemów kotransportu u mikroorganizmów wykorzystuje  $H^+$  jako kation sprzężony. Wskazuje to na możliwość efektywnego zapobiegania stresowi substratowemu. Gen *ponA* koduje białko PBP1A/1B, biorące udział w syntezie i transpeptydacji peptydoglikanu, kluczowe dla elongacji komórki i kontroli średnicy. Gen *ssuD* koduje enzym klasy FMNH<sub>2</sub>-zależnych monooxygenaz, które katalizują desulfonację alifatycznych sulfonianów, uwalniając aldehyd i siarkę. Gen ten jest kluczowym enzymem w katabolizmie sulfonianów, umożliwiającym wykorzystanie alternatywnych źródeł siarki, szczególnie w warunkach niedoboru. Gen *glcA* jest częścią operonu *glc* (*glcP*-*glcK*-*glcA*), który bierze udział w pobieraniu glukonianu, fosforylacji oraz kierowaniu go do centralnego metabolizmu węgla, co jest kolejnym mechanizmem adaptacji względem stresu substratowego. Gen *pbpX* jest jednym z białek PBP, które ulegają ekspresji jako odpowiedź na stres ściany komórkowej. Białka mają uczestniczą w transglekokonacji i transpeptydacji peptydoglikanu w warunkach stresowych. Ponadto poziom ekspresji genów szczepu B107/23 był znacząco wyższy od poziomu ekspresji genów szczepu B56/23, na co wskazują znacznie wyższa ilość odczytów.

## Wnioski

Szczep B107/23 wykazuje wyższy poziom ekspresji genów związanych z metabolizmem substratów, syntezą ściany komórkowej i pozyskiwaniem siarki, co wskazuje na jego większy potencjał adaptacyjny do stresów abiotycznych. Z kolei szczep B56/23 aktywuje geny związane z kontrolą jakości białek, biofilmem i sporulacją, co także wspiera jego przystosowanie, choć na innym poziomie funkcjonalnym. Geny o najwyższej ekspresji w obu szczepach mogą stanowić obiecujące markery odporności na stres środowiskowy.

B56/23			B107/23		
Nazwa genu	Ilość odczytów (poziom ekspresji)	Funkcja	Nazwa genu	Ilość odczytów (poziom ekspresji)	Funkcja
<b>ssrA</b>	147	Regulacja translacji i kontrola jakości białek (O' Grady et al., 2008)	<b>melB</b>	2737010	Pobieranie i metabolizm alternatywnych źródeł węglowodanów (Zhu et al., 2023)
<b>mstX</b>	113	Regulacja i tworzenie biofilmu (Manetsberger et al., 2025)	<b>ponA</b>	4113	Wzrost komórki/adaptacja do stresu (Eichhorn et al., 2002)
<b>csfB</b>	101	Regulacja sporulacji (Martínez-Lumbreras et al., 1998)	<b>ssuD</b>	3514	Pobieranie i transport siarki (Singh et al., 2008)
<b>Isp1</b>	96	Adaptacja do stresu/sporulacja (Dong et al., 2022)	<b>glcA</b>	2155	Pobieranie i metabolizm glukanów (Cao et al., 2002)
<b>fadF</b>	81	Metabolizm kwasów tłuszczowych (Fujita et al., 2008)	<b>pbpX</b>	1595	Adaptacja do stresu (Yazyu et al., 1984)



Przedstawione modele białek pochodzą z bazy UniProt. <https://www.uniprot.org/>