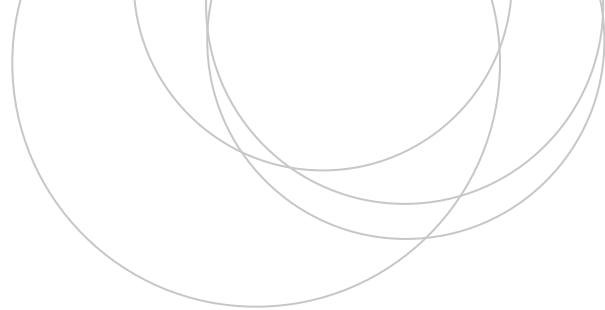




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Metagenomika bidezko bakterio-komunitateen azterketa Txakolinaren hartzidura alkoholikoan

Egilea:

Xabier Simón Martínez de Goñi

Zuzendaria:

Miren Andone Estomba Recalde

Zuzendarikidea:

Iratxe Zarraonaindia Martinez

AURKIBIDEA

1. SARRERA ETA HELBURUAK	1
2. MATERIAL ETA METODOAK	3
2.1. LAGINKETA	3
2.2. DNA ERAUZKETA, PCR ANPLIFIKAZIOA ETA ILLUMINA-SEKUENTZIAZIOA	3
2.3. DATUEN ANALISIA.....	4
3. EMAITZAK.....	5
4. EZTABAIDA	11
5. ONDORIOAK	14
6. ERREFERENTZIAK.....	14
7. ERANSKINA	16
7.1. ERABILITAKO KOMANDOAK	16
7.2. IRUDI ETA TAULAK	18

1. SARRERA ETA HELBURUAK

Gaur egun, tokian tokiko ardo-ekoizleek, gero eta lehiakorragoa den merkatu batean bide egiteko helburuarekin, beren produktuei gune geografikoaren arabera nortasuna ematerantz jo dute^[1]. Horren eraginez, *terroir* hitza ardoa eta horren ezaugarri organoleptikoak ekoiztutako jatorri geografikoarekin lotzeko sortu zen^[2]. Horrek, ardogintzako teknikez eta klimaz gain, lurzorua, mahats barietateak eta mikrobiomak ardoaren ezaugarrietan duten eragina barneratzen ditu^[3].

Ardoaren berezko hartidura alkoholikoaren hasierako etapetan legamien espezie ugari gainartzaileak dira, baina hartidurak aurrera egin ahala etanol kopurua handitu eta *Saccharomyces* legamiak dira nagusitasuna lortzen dutenak^[4]. Hori dela eta, *Saccharomyces* legamiak dira ardoaren ekoizpenerako gehien erabiltzen eta ikertuenak izan diren anduiak. Hala ere, berezko hartiduran gertatzen dena oinarritzat hartuta, zenbait ardo ekoizteko hasierako etapetan legamia ugariaren inokulazio sekuentziala burutzen da, onuragarriak diren metabolitoen sorrera eragiten dutelako^[5]. Horren adibide da *Torulaspota delbrueckii*, azidotasun eta azukre urriko ardo beltz eta gorrien ekoizpenerako erabiltzen dena^[6]. Era berean, berezko hartidura alkoholikoetan azido malikoa azido laktiko bihurtu daiteke, hartidura malolaktiko deritzon prozesuan^[7]. Hartidura mota hori ardo beltz ugari eta ardo zuri batzuk sortzeko erabiltzen da, ardoaren zapore garratza murriztu eta usain gozoa hobetzen dituelako^[8].

Mahatsen eta horien hartiduren mikroorganismoen komunitateen azterketa oso ikertua izan da kultiboetan oinarrituriko ohiko metodoaren bidez^[9]. Ikerketa horiek, batez ere, hartidura alkoholikoa burutzen duten legamietan jarri dute arreta, eta baita hartidura malolaktikoa burutzen duten bakterio azido laktikoetan. Nolanahi ere, genomika eta metagenomikaren arloko ikerketek laborategian soilik mikroorganismoen %1a hazi daitekeela erakutsi dute^[10]. Mikroorganismoen %99a kultibaezina denez gero, ohiko metodoek mugak aurkitzen dituzte bakterio-komunitateen egitura taxonomikoa zehazterakoan, horien bidez aztertutako bakterio-komunitateen dibertsitatea osatugabe dagoen dibertsitate bat baita. Kultiboetik independenteak diren *Next Generation Sequencing* (NGS) metodoen bidez, ingurune laginetatik DNA zuzenean erauziz eta sekuentziatuz, mikroorganismo-komunitateen inguruko informazio osatuagoa lortzen da.

Kultiboetik independenteak diren metodoen artean *Shotgun* metagenomika eta *Amplicon* metagenomika daude^[11]. *Shotgun* bidezko hurbilketak bakterio-komunitatearen funtzio potentzialak bilatzeaz gain, “Zer da mikroorganismoek potentzialki egin dezaketena?” galderari erantzuna ematen dio^[12]. Bestalde, *Amplicon* metagenomika gene bakarraren dibertsitatean

oinarrituriko ikerketa filogenetikoa da^[12]. Ondorioz, “Zein mikroorganismo aurkitzen dira ekosisteman?” galderari erantzuna emateko baliogarria da.

Bakterioak *Amplicon* hurbilketaren bidez ikertzean, markatzaile filogenetikoa den 16S rRNA genea amplifikatzen eta sekuentziatzen da. 16S rRNA amplifikatzeko hasleak horren gune kontserbatuei lotzeko eta gune aldakorren amplifikazioa egiteko daude diseinatuta^[12]. 16S rRNAren gune aldakorrek talde taxonomiko desberdinak bereizteko aukera ematen dute, baina gune horiek oso antzekoak dira harreman taxonomiko hurbila erakusten duten taldeetan. Ondorioz, taxonomikoki desberdinak diren taldeak bereizteko baina harreman taxonomiko hurbila duten taldeak multzo berean biltzeko aukera ematen du^[13]. Nolanahi ere, 16S rRNAk dauzkan kopia aldakorren eraginez, komunitatearen emaitzak aztertzean zehar hartasunak sor daitezke, zenbait taxa gainadierazita ager daitezkeelako^[14]. Edonola ere, 16S rRNA prokarioto guztietan agertzen denez eta mikroorganismoen arteko sailkapen taxonomikoak egiteko aukera ematen duenez, horren erabileraren abantailek egon daitezkeen desabantailek baino garrantzi handiagoa dute. Sekuentziatu ostean, markatzaile polimorfiko horien sekuentziak datu-baseetan dagoeneko sailkatuta dauden mikroorganismoen sekuentziekin alderatzen dira, sekuentzien sailkapen taxonomikoa egiteko.

16s rRNA genearen amplifikazioan oinarrituriko ikerketek, hartidura malolaktikoa burutzen duten azido laktikoko bakterioez gain, kultiboetan oinarrituriko metodoen bidez behatu ezin diren bakterio ugari dagoela frogatu dute^[3, 9]. Alabaina, NGS tekniken erabilera mahatsen hartidura prozesuen mikroorganismo-komunitateen azterketa burutzeko berritzailea den arlo bat da, horien ekarpena esparru horretan oraindik ikertzeke dagoelarik^[9]. Ondorengo ikerketan 16s rRNA genearen amplifikazioa erabili da hartidura alkoholikoko eta malotaktikoko bakterio-komunitatearen dibertsitatea eta konposaketa aztertzeko. Alde batetik, *Saccharomyces cerevisiae* komertziala erabiliz burututako hartidura alkoholikoan zehar gertatzen diren bakterioen presentzia eta kopuru aldaketak aztertu ditugu, prozesuaren etapa desberdinetan agertzen diren bakterioak identifikatuz; bigarrenik, hartidura malolaktikoa burutu duten mahatsen hartigarrien mikrobioma hartidura alkoholikoko hartigarrien mikrobiomarekin alderatu dugu; eta azkenik, *T. delbrueckii* eta *S. cerevisiae* legamia komertzialen inokulazio sekuentziala eduki duten hartidura alkoholikoko laginen mikrobioma *S. cerevisiae* komertziala soilik erabili duten hartidura alkoholikoko laginen mikrobiomarekin alderatu dugu. Beste lan batzuetan ikusi den klimaren, lurzoruaren edota mahatsak jasotzeko moduak mikrobioman duen eragina ekiditeko^[3], gure ikerketa burutzeko bata bestearen ondoan dauden mahastietatik hartutako 4 mahats barietateen (2 zuri eta 2 beltzen) mikrobioma aztertu da.

2. MATERIAL ETA METODOAK

2.1. LAGINKETA

Bilbotik 25 km-ra, Enkarterriren eskualdeko Zalla udalerrian (Bizkaia), aurkitzen den Zallako frutagintza estazioan (43° 12' 21.3" N; 3° 08' 38.9" W) lau mahats barietateen laginketak egin dira: bi zuri (*Hondarrabi Zuria* eta *Petit Courbu*) eta bi beltz (*Hondarribi Beltza* eta *Pinot Noir*). Laginketak mahats barietate guztien hartzidura alkoholikoko prozesuan zehar burutu dira, *Saccharomyces cerevisiae* legamia komertziala (Lallemand Bio-Ingredients: Bio products and Yeasts; Cross Evolution YSEO) inokulatu ondoren: hasieran (+/- 1090 dentsitatea), erdialdera (+/-1040 dentsitatea) eta bukaeran (+/-995 dentsitatea). Gainera, *Hondarribi Zuria*-ko mahats barietateen ohiko hartzidura alkoholikoko laginez gain, *Torulaspota delbrueckii* (Lallemand, Biodiva™) eta *Saccharomyces cerevisiae* legamien inokulazio sekuentziala eduki duten hartzigarrien laginketak ere egin dira aurre-hasierako, hasierako, erdiko eta bukaerako etapetan. Inokulazio sekuentziala burutzeko, *T. delbrueckii* gehitzen da lehenengo (aurre-hasierako etapa), eta 5 egun igaro ondoren *S. cerevisiae*. Era berean, *Pinot Noir* barietatearen hartzidura alkoholikoaren ostean gertatutako hartzidura malolaktikoko laginak jaso dira.

Beraz, guztira 35 lagin hartu dira: 14 *Hondarribi Zuria* (ohiko hartzidura alkoholikoko hasieran, erdian eta bukaeran bina; eta legamien inokulazio sekuentzialerako aurre-hasieran, hasieran, erdian eta bukaeran beste bina), 6 *Hondarribi Beltza* (2 hasieran, 2 erdian eta 2 bukaeran), 6 *Petit Courbu* (2 hasieran, 2 erdian eta 2 bukaeran) eta 9 *Pinot Noir* (hartzidura alkoholikoko hasieran, erdian eta bukaeran bina; eta hartzidura malolaktikorako hiruna). Laginen inguruko informazioa **Eranskina 1 Taula**-n aurkitu daiteke.

2.2. DNA ERAUZKETA, PCR ANPLIFIKAZIOA ETA ILLUMINA-SEKUENTZIAZIOA

DNA erauzteko *PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit*-a (*MoBio*) erabili da, laginen 0.25g-tik hasita. 16S rRNA genearen V4 domeinuaren anplifikazioa egin da *515f/806r* hasleak erabiliz. Hasle hauek Earth Microbiome Project-ean (<http://www.earthmicrobiome.org>) diseinatu ziren, eta V4 gunearakiko espezifikokoak diren hasleez gain, Illumina sekuentziazioa ahalbidetzeko adaptadoreak eta reverse haslean 12 bp-tako *barcode*-ak dituzte. *Barcode* horiek lagin batetik bestera desberdinak dira, eta aldi berean 2.167 lagin sekuentziatzeko aukera ematen dute.

16S rRNA genea anplifikatzeko PCR erreakzio bakoitzean erabili diren 25 µl-ak ondorengo osaera eduki dute: 7.5 µl *MoBio PCR Water*, 5.4 µl erreakzio-tanpoia, 2.7 µl MgCl₂ (25 mM), 2.7 µl dNTP (10 µM), 0.32 µl *blocking primer* (0.75 nM), 0.3 µl Taq polimerasa, Forward

Haslearen 2.7 µl (10 µM), 2.7 µl Reverse Haslea (10µM) eta DNA moldearen 1 µl. PCR-aren baldintzak ondorengoak izan dira: 3 minutuz 92 °C-tan, 30 ziklorekin 45 s 92 °C-tan, 60 s 50 °C-tan eta 90 s 72 °C-tan; 72 °C-ko 10 minutuko bukaerarekin. Ostean, PCR lagin bakoitzeko 10 µl hartu, multzokatu (*pool*) eta *PicoGreen* (*Invitrogen*) eta plaka-irakurle bat erabiliz kuantifikatu dira. Behin kuantifikatuta, produktu bakoitzaren bolumen desberdinak hodi bakarrean bildu dira, lagin bakoitzak adierazpen berbera edukitzeko. Ondoren, *CleanPCR* (*CleanNA*) erabiliz purifikatu eta *Qubit* (*Invitrogen*) erabiliz kuantifikatu dira. Kuantifikatu eta gero, multzoaren molaritatea zehaztu eta 2 nM arte diluitu dira. Bukatzeko, sekuentziazioa EHU/UPV-ko SGiker-eko *Illumina MiSeq* (150bp x 2 *pair end*) plataforman egin da.

2.3. DATUEN ANALISIA

Sekuentziak, nukleotidoen sekuentziazio gain horien kalitate puntuazioak ere badituen Fastq fitxategi batean lortu dira. Datuen analisia QIIME-ren 1.9.1 bertsioa^[15] erabiliz egin da.

Lehenengo, sekuentziak *demultiplexing* deritzon prozesuaren bidez tratatu dira. Prozesu horretan sekuentzien kalitatearen araberako garbiketa egiten da: sekuentzia motzegiak, sekuentzia akastunak edota anbiguotasunak dituzten sekuentziak (A, T, G edo C eduki beharrean, N duten *barcode*-ak) deuseztatu egiten dira. Fastq fitxategietan aurkitzen diren eta jatorri ezezaguna duten sekuentzien jatorrizko laginak zeintzuk diren zehazteko, fitxategi bakarrean batu da Forward eta Reverse sekuentzien eta *barcode*-en fastq fitxategien informazioa. *Demultiplexing* prozesua egiteko erabili den komandoa *split_libraries_fastq.py* izan da.

Ondoren, *pick_open_reference_otus.py* komandoaren bidez, *open reference* motako OTU (*Operational Taxonomic Units*) taula bat sortu da. Komando horrek lortutako sekuentziak antzekotasun mailaren (%97ko nukleotido-antzekotasunaren) arabera OTUetan taldekatzen ditu. Orobat, OTU horiek *Greengenes* datu-basean eskuragarri dauden 16S rRNA-ren gene sekuentziekin alderatzen ditu, horiei taxonomia bat esleitzeko.

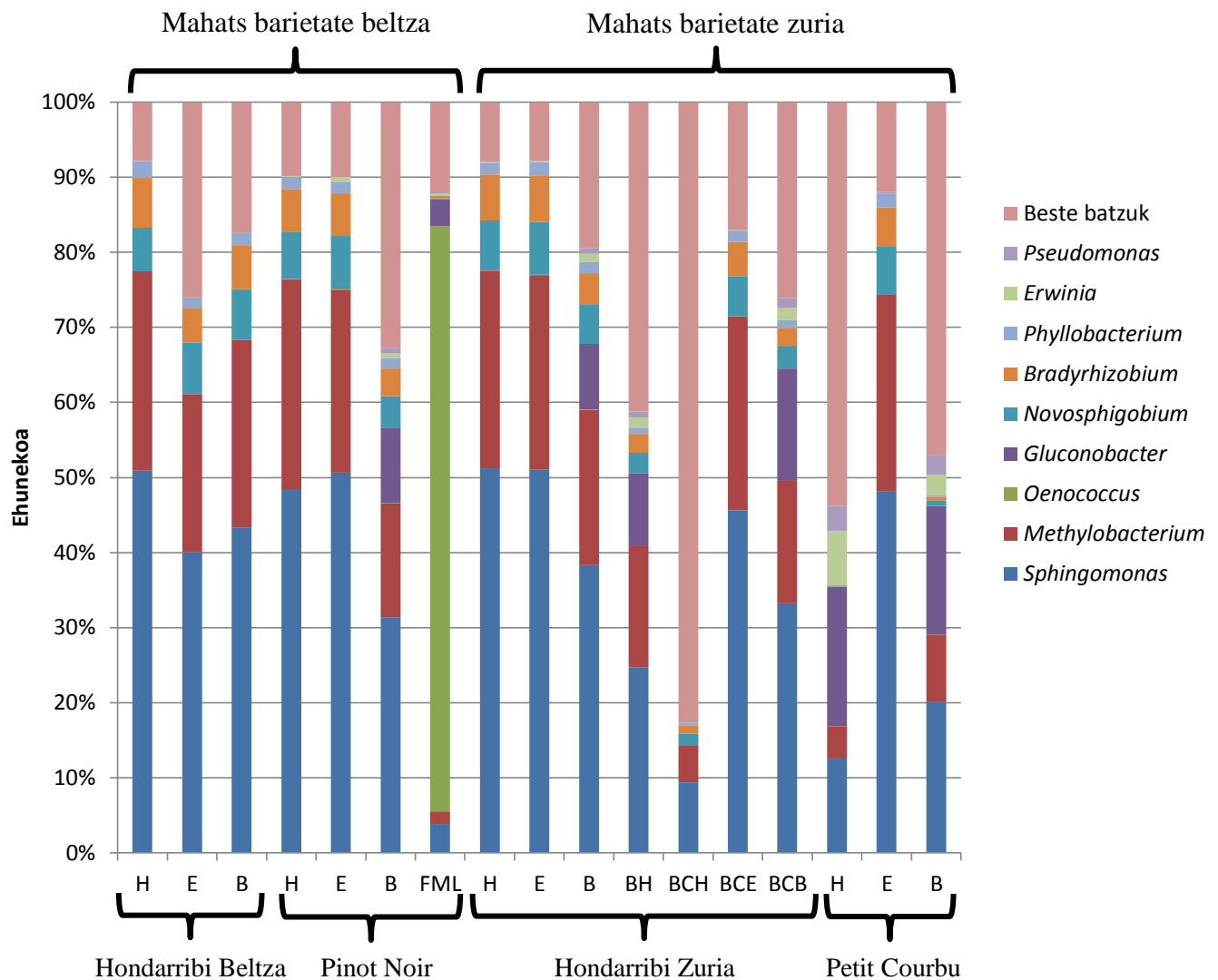
Gero, *single_rarefaction.py* komandoaren bidez, lagin bakoitzeko 20000 sekuentzia dituen bigarren OTU taula bat sortu da. Era horretan, lagin bakoitzean sekuentzia kopuru desberdina egotearen ondorioz sor daitezkeen zehartasunak ekiditen dira.

20000 sekuentzia dituen OTU taula sortu ostean, horretatik abiatuta laginen alfa eta beta dibertsitatearen analisia burutu da, laginen barne dibertsitatea eta laginen arteko bakterio-komunitateen desberdintasunak aztertzeke. Halaber, lagin desberdinen arteko OTUen proportzioak aztertzeke barra-diagramak sortu dira, eta baita lagin zehatz bakoitzean zenbat OTU agertzeaz gain, horien artean amankomunak zenbat diren jakiteke Venn diagramak. Era berean, mahats barietate eta hartxidura etapa aldagaien araberako laginen analisi estatistikoa

egin da, Adonis eta ANOSIM testak burutuz. Analisi horiei dagozkien komandoak **Eranskina** atalean deskribatu dira. Zenbait bakterio-generoen barneko espezieen sailkapena egiteko, NCBI web-orriko BLAST tresna (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erabili da.

3. EMAITZAK

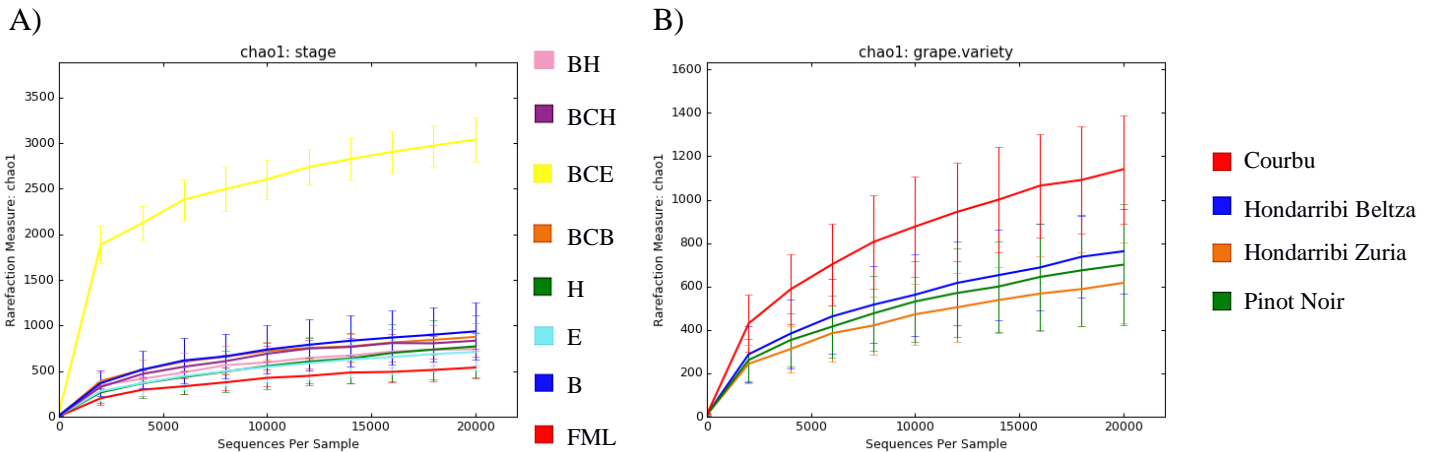
Lagin guztiak kontuan hartuz, batezbeste 52555 OTU aztertu dira (OTU gutxieneko laginak 23408 OTU ditu, gehienekoak 149349 OTU). Mahatsen lagin guztietako bakterioen komunitateko genero ugariak *Sphingomonas* (%34.4) eta *Methylobacterium* (%18.1) dira (*Proteobacteria* filumekoak eta *Alphaproteobacteria* klasekoak) (ikusi **1 Irudia**). Guztira, generoen %52.5a osatzen dute. Hala ere, zenbait laginetan mikroorganismoen proportzioa aldatu egiten da: hala nola, hartzidura malolaktikoko *Pinot Noir* laginen kasuan, *Oenococcus* generoa (*Firmicutes* filuma eta horri dagokion *Bacilli* klasea) da ugariena (%77.73). Era berean, *Hondarribi Zuria*-ko inokulazio sekuentziala eduki duten laginen hartzidura alkoholikoko aurrehasierako eta hasierako laginetan “Beste batzuk” multzoan bildutako generoen ehuneko asko handitzen da (%41 eta %79.95, hurrenez hurren). *Petit Courbu* mahatsen hasierako eta bukaerako laginetan ere, “Beste batzuk” multzoko generoen ugaritasuna asko handitzen da (%53.35 eta %46.25, hurrenez hurren).



1 Irudia. Mahatsen hartidura etapa desberdinetarako bakterio-komunitateen genero-egitura erakusten duten barra-diagramak. Komunitatearen genero ugarienen kopuru erlatiboak erakusten dira *Hondarribi Beltza*, *Pinot Noir*, *Hondarribi Zuria* eta *Petit Courbu* mahatsen barietateetako hartidura alkoholikoko hasierako (H), erdiko (E) eta bukaerako (B) etapetarako. Halaber, *Pinot Noir*-eko hartidura malolaktikoko etapako laginak (FML) eta *Hondarribi Zuria*-ko inokulazio sekuentziala eduki duten laginen hartidura alkoholikoko aurre-hasierako (BH), hasierako (BCH), erdiko (BCE) eta bukaerako (BCB) etapetako laginak ere erakusten dira. Diagrametan lagin guztien artean $\geq 0.5\%$ eko ugaritasuna duten eta datu-basean ezagunak diren generoak erakusten dira; gainerakoak "Beste batzuk" sailkapenean bildu dira.

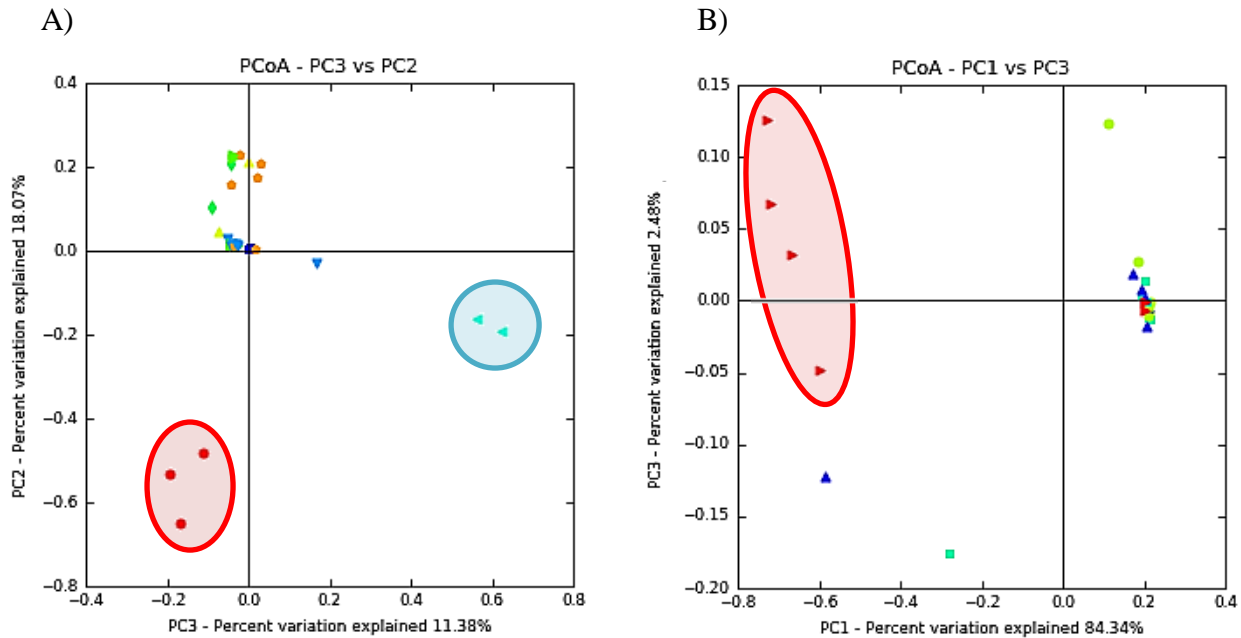
Alfa dibertsitatea aztertzean, desberdintasun handiak aurkitu dira legamien inokulazio sekuentzialeko hartidura alkoholikoko hasierako etapako laginetan, horien alfa dibersitatea handiagoa delarik (ikusi **2A Irudia**). Lagin guztiak kontuan hartuz, mahatsen barietatearen arabera alfa dibersitateak ez du desberdintasun esanguratsurik erakutsi (ikusi **Eranskina 1 Irudia**), baina inokulazio sekuentzialeko laginak filtratzean, ordea, *Petit Courbu* mahats

barietateak gainerako mahats barietateek baino alfa dibertsitate handiagoa erakutsi du, nahiz eta desberdintasuna oso handia ez izan (ikusi **2B Irudia**). Sekuentziazioan lorturiko sekuentzien kopuru altuari esker, alfa rarefakzioak adierazten du lan honetan hartidura prozesuko bakterio dibertsitate gehiena aztertu dela, sekuentzien kurbak *plateau*-ra heltzen baitira.



2 Irudia. Laginen alfa dibertsitatea sekuentzia kopuruaren arabera erakusten dituzten grafikoak. A) Hartzidurako etapen arabera alfa dibertsitatearen grafikoak erakusten dira, *chao1* estatistikoaren bidez kalkulatuak, ondorengo laburdurekin: BH: *T. delbrueckii* duen inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako etapa; BCH: *T. delbrueckii* eta *S. cerevisiae* dituen inokulazio sekuentzialeko hasierako etapa; BCE: *T. delbrueckii* eta *S. cerevisiae* dituen inokulazio sekuentzialeko erdiko etapa; BCB: *T. delbrueckii* eta *S. cerevisiae* dituen inokulazio sekuentzialeko bukaerako etapa; H: hasierako etapa; E: erdiko etapa; B: bukaerako etapa; eta FML: hartidura malolaktikoko etapa. B) Inokulazio sekuentzialeko laginik gabeko barietatearen arabera alfa dibertsitatearen grafikoak, *chao1* estatistikoaren bidez kalkulatuak.

Oro har, beta dibertsitateari dagokionez, mahatsetako lagin guztien bakterio-komunitateen arteko desberdintasunak aztertzean, hartidura prozesuaren etapek bakterioen komunitateen egiturari eta konposaketari eragina duela ikusi da (ikusi **3A Irudia**). Guztira, hartidura etapen arteko desberdintasunak laginen aldakortasun osoaren %18.07a osatzen dute, ezberdintasun handienekoak hartidura malolaktikoko eta inokulazio sekuentzialeko hasierako etapetako laginak izanik. Aldiz, ez da desberdintasun handirik topatu mahats barietate desberdinen bakterio-komunitateetan (ikusi **Eranskina 2 Irudia**). Hartzidura malolaktikoko eta inokulazio sekuentzialeko laginak kentzean, ordea, *Petit Courbu* barietateko hasierako eta bukaerako etapetako laginen bakterio-komunitateak beste laginekiko desberdinak direla ikusi da (ikusi **3B Irudia**).



3 Irudia. Mahatsen laginak hartidura etaparen eta filtratu ostean barietatearen arabera biltzen dituzten 2D-ko PCoA grafikoak. A) grafikoan lagin guztiak erakusten dira hartidura etapen arabera, eta B) grafikoan hartidura malolaktikoko eta inokulazio sekuentzialeko laginik gabeko barietatearen araberako grafikoak. Laginek ondorengo sailkapena dute: A) ● Hartidura malolaktikoa; ◆ Inokulazio sekuentzialaren aurre-hasierako etapa; ▲ Inokulazio sekuentzialaren hasierako etapa; ■ Inokulazio sekuentzialaren erdiko etapa; ▲ Inokulazio sekuentzialaren bukaerako etapa; ◆ Hasierako etapa; ▼ Erdiko etapa; ● Bukaerako etapa; eta B) ■ Hondarribi Zuria, ● Hondarribi Beltza, ▲ Courbu eta ▲ Pinot Noir. Borobilduta erakusten dira adierazgarriak diren laginak: A) hartidura malolaktikoko (gorriz) eta inokulazio sekuentzialaren hasierako etapako (urdin argiz) laginak; eta B) Courbu barietatearen hasierako eta bukaerako etapak (gorriz).

Etapa eta mahats barietateen bakterio-komunitateak esanguratsuki desberdinak diren aztertzeko, *Bray Curtis* distantziaren araberako Adonis eta ANOSIM testak burutu dira (ikusi **1 Taula**). Lagin guztiak kontutan hartuz (hartidura alkoholikoak, hartidura alkoholiko sekuentzialekoak eta hartidura malolaktikokoak), aldagaia “etapa” deneko testetan, bai Adonis eta bai ANOSIM testetako R^2 eta R balioak (0.508 eta 0.331, hurrenez hurren) oso esanguratsuak dira (Adonis $p=0.0009$ eta ANOSIM $p=0.0009$). Aldagaia “mahats barietatea” denean, ordea, Adonis testeko R^2 balioa baino ez da esanguratsua (Adonis $R^2=0.201$, $p=0.016$ eta ANOSIM $R=0.069$, $p=0.145$). Hala ere, inokulazio sekuentzialik gabeko hartidura alkoholikoko laginak beren artean alderatzean (ikusi **1 Taula**), “mahats barietate” aldagaiaren Adonis balioa ($R^2=0.36445$) esanguratsua da ($p=0.021$), eta baita horren ANOSIM testeko R balioa ($R=0.122$ eta $p=0.037$). Era berean, ez da desberdintasunik aurkitu *Saccharomyces* komertziala erabili

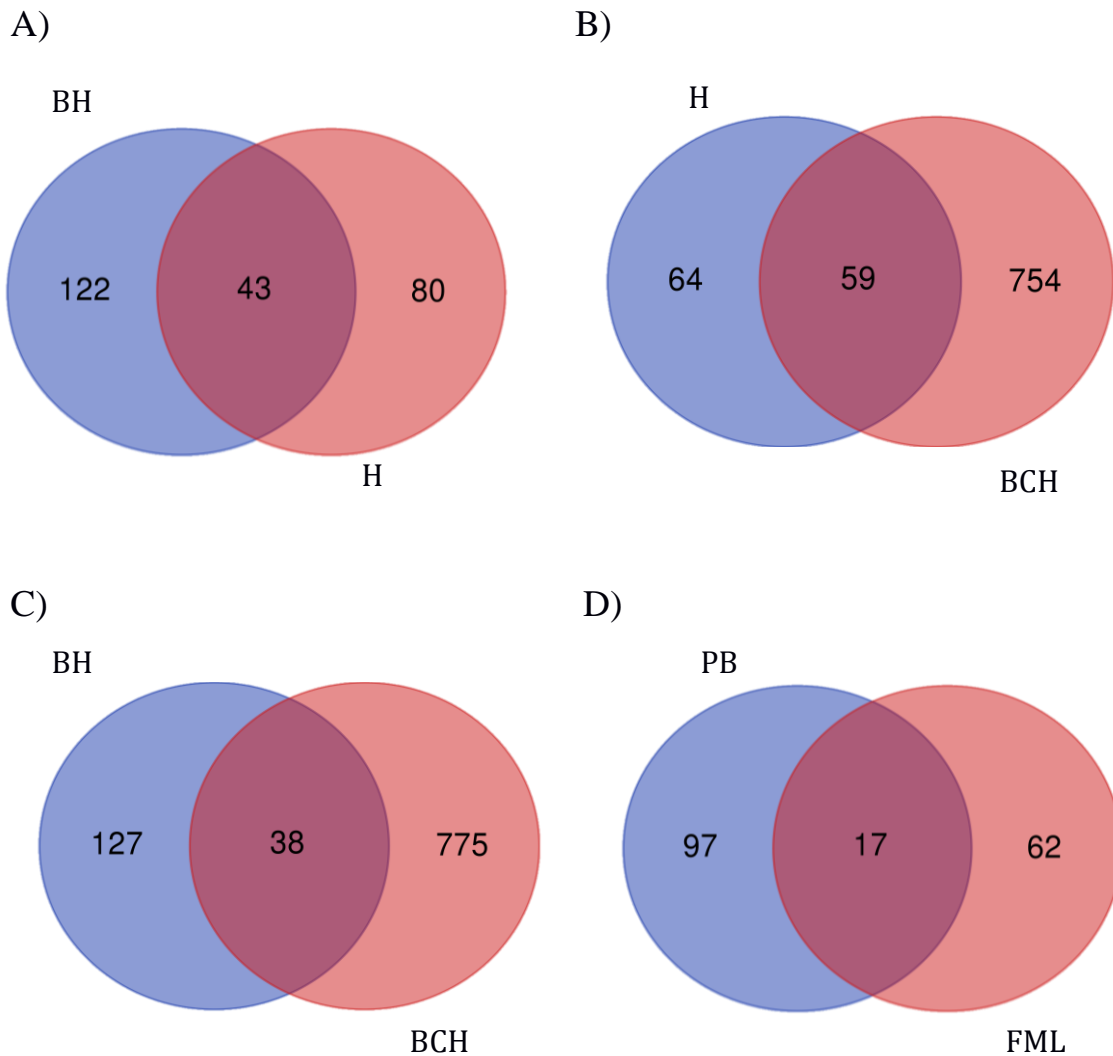
deneko hartzidura alkoholikoko etapa desberdinen (hasiera, erdia, bukaera) arteko bakterio-komunitateen artean (Adonis $p=0.1339$ eta ANOSIM $p=0.116$).

1 Taula. Mahatsen laginetarako lorturiko Adonis eta ANOSIM proben R^2 , R eta p balioak. Proba bakoitzak etaparen eta barietatearen arabera desberdintasunak erakusten ditu. Hartzidura alkoholikoko laginak aztertzeko inokulazio sekuentzialeko eta hartzidura malolaktikoko laginak filtratu egin dira. Esanguratsuak diren emaitzak $p \leq 0.01$ direnean "****"-rekin eta $p \leq 0.05$ direnean "*" -rekin daude adierazita.

	Aldagaia	Adonis		ANOSIM	
		Bray Curtis		Bray Curtis	
		R^2	p balioa	R	p balioa
Lagin Guztiak	Etapa	0.5081	0.0009***	0.3317	0.0009***
	Barietatea	0.20125	0.0160*	0.0694	0.1458
Hartzidura alkoholikoko laginak	Etapa	0.1632	0.1339	0.0540	0.1160
	Barietatea	0.3644	0.0210*	0.1221	0.0370*

Venn diagramen bidez, *Hondarribi Zuria*-ko ohiko hartzidura alkoholikoko hasierako etapako laginak (*S. cerevisiae* komertzialaren inokulazioa soilik eduki duenak) eta inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako (*T. debrueckii* inokulatuta) eta hasierako (*S. cerevisiae* komertziala *T. debrueckii* bota eta 5 egunetara inokulatuta duen) etapako laginak beren artean alderatu dira (ikusi **5A**, **5B** eta **5C Irudia**). Guztira, ohiko hasierako etapen 123, inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako etapen 165 eta inokulazio sekuentzialeko hasierako etapen 813 bakterio daudela ikusi da. Aurre-hasierako eta ohiko hasierako etapen artean, amankomunak diren 43 bakterioetatik, *Sphingomonas* generokoak (*Proteobacteria* filuma eta *Alphaproteobacteria* klasea) dira gehien errepikatzen direnak (18 bakterio). Era berean, ohiko hasierako eta inokulazio sekuentzialeko hasierako laginen artean amankomunak diren 59 bakterioetatik eta inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako eta hasierako laginen artean amankomunak diren 38 bakterioetatik, *Sphingomonas* generoa da gehien agertzen dena (33 eta 15, hurrenez hurren). Halaber, *Pinot Noir* hartzidura alkoholikoko bukaerako etapako laginak, ondoren jasan duten hartzidura malolaktikokoekin alderatu dira (ikusi **5D Irudia**): *Pinot Noir*

hartzigarrietan 114 bakterio daude, eta hartzidura malolaktikokoetan 79. Horien artean, amankomunak diren 17 bakterioetatik, gehien agertzen diren bakterioak *Sphingomonas* generokoak dira (4 bakterio). Hartzidura malolaktikoko laginetan soilik agertzen diren 62 bakterioetatik, *Acetobacteraceae* generoa (*Proteobacteria* filuma eta *Alphaproteobacteria* klasea) da gehien agertzen dena (13 bakterio). *Oenococcus* generoa, ordea, 6 bider agertzen da.



5 Irudia. Etapen arteko bakterio amankomunak (Venn diagrama). Laginak etapa desberdinen arabera kolore desberdinetako zirkunferentziatan antolatu dira: alde batetik, *Hondarribi Zuria*-ko A) Inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako etapa (urdinez) eta ohiko inokulazioko hasierako etapa (gorriz); B) Ohiko inokulazioko hasierako etapa (urdinez) eta inokulazio sekuentzialeko hasierako etapa (gorriz); eta C) Inokulazio sekuentzialeko aurre-hasierako etapa (urdinez) eta hasierako etapa (gorriz); bestetik, D) *Pinot Noir*-eko bukaerako etapa (urdinez) eta hartzidura malolaktikoko etapa (gorriz). Zirkunferentzien batura guneetan alderatzen diren etapetarako amankomunak diren bakterioen kopuruak erakusten dira.

4. EZTABAIDA

16S rRNA genearen *Amplicon* sekuentziazioan oinarrituriko ikerketen bidez, kultiboetan oinarrituriko metodoak erabilia aztertutako mahatsen bakterio-komunitatea uste baino dibertsoagoa dela ikusi ahal izan da. Hau da, orain arte laborategietan hazitako azido azetikoko eta hartzidura malolaktikoa burutzen duten azido laktikoko bakterioez gain, beste hainbat bakterio aurkitu dira mahatsen hartzigarrietan^[3, 9].

Orokorrean, ikerlan honetako hartzidura alkoholikoko mahatsaren etapa edozein izanda, proportzio altueneko *Sphingomonas* eta *Methylobacterium* generoen kopuruak berdin mantendu dira. Ehuneko baxuagoan *Gluconobacter* (%4.8), *Novosphigobium* (%4.3), *Bradyrhizobium* (%3.7) eta *Phyllobacterium* (%1.2) generoko bakterioak agertu dira. Beste ikerketa batzuen emaitzekin alderatzean, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* eta *Gluconobacter* generoak ere agertzen diren generoak direla ikusi da^[9, 16, 17]. Hala ere, horien proportzioak aldakorrak dira ikerlanaren arabera: alde batetik, *Sphingomonas* eta *Methylobacterium* generoak lan honetako hartzidura alkoholikoko laginetan nagusienak diren arren, beste ikerketetan ehuneko oso baxuan agertu dira (%1 inguru); bestetik, *Gluconobacter* da hartzidura alkoholikoko bakterio nagusia bai Marzano et al.-ek (2016) egindako ikerketan, bai Portillo eta Mas-ek (2016) eginikoan. Lan honetan identifikatutako *Gluconobacter* generoari dagokion sekuentzia adierazgarriena NCBI web-orriko BLAST tresnarekin aztertzean, *Gluconobacter oxydans* bakterio azido azetikoa dela ikusi da (%99ko identifikazioa, E balioa= $2e^{-126}$), Morgan eta bere kideek (2017) beren laginetan behatutako bakterio espezie berbera, alegia. Gainerako ikerketekin alderatzean bakterio-komunitateetan behatutako ugaritasunen desberdintasunen jatorria ikerlan bakoitza burutzeko erabilitako mahatsen ingurumenak (klimak eta lurzoru motak) edota horiek jazotzeko teknikek mikrobioman eduki dezaketen eraginean egon daitekeela uste da.

Orobat, lagin guztien aldakortasunaren %50.81a etapa motari dagokiola eta etapa ezberdinetako komunitateen artean desberdintasun oso esanguratsuak daudela ikusi da, baita datu guztien aldakortasunaren %20.12a mahats bariatateari dagokiola. Dena dela, desberdintasun horiek hartzidura malolaktikoko eta inokulazio sekuentzialeko laginen bakterioen dibertsitatea eta konposaketa ohiko hartzidura alkoholikoko laginekiko ezberdinak direlako da. Izan ere, soilik ohiko hartzidura alkoholikoko laginak aztertzean, ez da desberdintasun esanguratsurik aurkitu etapa ezberdinen komunitateen artean.

Hartzidura malolaktikoko laginen kasuan, *Oenococcus* generoa izan da laginetako ugaritasun nagusienekoa (%77.73). Gainera, hartzidura malolaktikoko lagin horiek hartzidura alkoholikoko laginekin alderatzean, beta dibertsitate desberdintasun handia izan dute. Lagin horien *Oenococcus* generoaren sekuentzia adierazgarrienak NCBI web-orriko BLAST-ekin aztertzean,

Oenococcus oeni bakterioa dela ikusi da (%100eko identifikazioa, E balioa= $4e^{-128}$). Emaitza horiek bat datoz kultiboetan oinarrituriko ikerketekin, mahatsen hartzidura malolaktikoetan nagusia den bakterioa hartzidura hori burutzen duen *Oenococcus* generoko eta *oeni* espezieko bakterio azido laktikoa dela erakutsi baitute^[18]. Era berean, lan honetako emaitzak bat datoz orain arte 16S rRNA genearen amplifikazioan oinarriz hartzidura malolaktikoko mikrobiomaren azterketa egin duten ikerlan bakarrekin alderatzean: bai Marzano et al.-ek (2016) eta bai Portillo et al.-ek (2016) egindako ikerketetan mahatsen hartzidura malolaktikoko laginetan ugaritasun handieneko bakterioa (%90-99 inguru) *Oenococcus oeni*-ri dagokiola ikusi da^[16, 19]. *O. oeni* bakterioez gain, *Sphingomonas* (%3.8), *Gluconobacter* (%3.8) eta *Methylobacterium* (%1.67) bakterioak ere aurkitu dira gure laginetan, ardoaren hartzidura prozesua biziraun dezaketen bakterioak^[20], alegia. Hala ere, Portillo eta bere kideen (2016) ikerketan *Methylobacterium* generoa hartzidura malolaktikoko laginetan aurkitu bada ere, horren ehuneko oso txikia izan da (%0.1). Marzano et al.-ek (2016) eginiko ikerketan, ordea, *Halomonas* bakterioa izan da (*O. oeni* generoaz gain) lagin horietan aurkitutako bakterio bakarra. Hartzidura malolaktikoko laginetan gertatzen den bakterio-komunitateen dibertsitate eta kopuru aldaketa hori *O. oeni* bakterioak burutzen duen hartzidura malolaktikoak, azidotasuna murriztuz, hartzigarrien medioen selektibotasuna aldatzen duelako gertatzen dela pentsatzen da. Venn diagramen emaitzak aztertzean, hipotesi hori berresten da: *Pinot Noir* barietateen bukaerako etapetan, hartzidura alkoholikoa gertatu ostean gertatzen den hartzidura malolaktikoko laginetan baino 35 bakterio gehiago daudela ikusi daiteke (97 eta 62, hurrenez hurren), horien artean *Oenococcus* generoa aurkitzen delarik.

Petit Courbu mahats-barietatearen emaitzetan ikusi da hartzidura alkoholikoko hasierako eta bukaerako etapetan “Beste batzuk” multzoko generoen ugaritasuna asko handitzen dela (%53.35 eta %46.25, hurrenez hurren). Dena den, horien ehuneko handi bat datu-basean *uncultured* bezala sailkaturiko *Chloroplast* klaseari (%22.9 hasierako etapan eta %21.95 bukaerako etapan) eta datu-basean *other* bezala sailkaturiko *Mitochondria* familiari (%15.3 hasierako etapan eta %7 bukaerako etapan) dagozkie. Horren eraginez, ondorioztatu da lagin horietan ez dela egon kloroplasto eta mitokondrioen 16S rRNAren amplifikazioa ekiditeko bezain beste *blocking primer*-ik. Gainera, laginen Kruskal-Wallis proba estatistikoaren emaitzek *Petit Courbu* laginen kloroplasto eta mitokondria horien eragina esanguratsua dela erakutsi dute ($P=0.009$ eta $P=0.04$, hurrenez hurren). Beraz, *Petit Courbu* laginek gainerako laginekiko erakutsitako alfa eta beta dibertsitateen ezohiko ezberdintasunak horien eraginezkoak direla ondoriozta daiteke. Era berean, nahiz eta mahats barietateak datuen aldakortasunaren %36.44a eragiten duela ikusi den arren, emaitza horiek behar bezala aztertzeke kloroplasto eta mitokondrien ezohiko kopuruak dituzten *Petit Courbu* laginak filtratzea beharrezkoa litzateke (ikusi **Eranskina 2 Taula**).

Bibliografia atertzean, beste ikerketetan mahats barietateen araberako bakterioen aldakortasuna dagoela ikusi da^[18, 21], klima, lurzoru mota edota mahatsen uztak jazotzeko modua direlarik aldakortasun horretan eragin nagusia duten faktoreak^[22]. Berebat, mahats barietatea edozein izanda ere, bakterio-komunitateen dibertsitatea handiagoa eta heterogeneoagoa ikusi da legamien inokulazioa burutu baino lehenago^[9, 16]. Gainera, nahiz eta mahatsen jatorri geografikoa, barietatea eta (ondorioz) mikrobioma desberdinak izan, hartzidura prozesua hastean mikroorganismo hartitzailen hazkuntza nagusitu eta ardoetako bakterio-komunitateen egitura, aberastasuna eta dibertsitatea murriztu egiten dira^[23]. Izan ere, bakterioen dibertsitate eta aberastasun altuek hartzidura alkoholikoa inhibitzeko gaitasuna duten bakterioen agerpena sustatu dezakete^[23]. Alabaina, legamien inokulazioak, medioko pHa murriztuz, horren selektibotasuna handitzen du, bakterio gutxiagoren hazkuntza eta komunitatearen homogeneotasunaren handipena gertatzen doazelarik^[9, 16]. Selektibotasun hori argi ikusten da bi inokulazio metodo desberdin erabili direneko hartziduren bakterio-komunitateak alderatzean. Izan ere *Hondarribi Zuria*-ko mahatsekin bi hartzidura alkoholiko desberdin burutu dira: ohiko inokulazioa, *Saccharomyces cerevisiae* komertziala erabiliz, eta inokulazio sekuentziala, *Torulasporea delbrueckii* eta ondoren *S. cerevisiae* baliatuz. Azken horren aurre-hasierako etapetan ugaritasun urriko eta datu-baseetan sailkatu gabe dauden generoen kopuru totala handia bada ere (%41), kopuru hori bikoiztu egiten da hasierako etapetan (%79.95). Gainera, alfa eta beta dibertsitateen emaitzek erakutsi dute inokulazio sekuentzialeko hasierako etapen bakterio-komunitatearen dibertsitatea eta konposaketa beste laginekiko desberdina dela. Berebat, Venn diagramen bidez, inokulazio sekuentzialeko hasierako etapetan agertzen diren bakterioak aurre-hasierako eta ohiko inokulazioko hasierako etapetan agertzen direnak baino 6 eta 12 bider gehiago direla ikusi da. Emaitza horiek erakusten dute *T. delbrueckii* legamiaren aurre-hasierako inokulazioaren bidez medioaren selektibotasuna horrenbeste handitzen ez dela, *S. cerevisiae* gehitu arte bakterio-komunitatearen dibertsitatea asko handitzen baita. *S. cerevisiae* gehitzean, ordea, medioaren selektibotasuna handitu eta dibertsitatea murrizten da, bai ohiko hasierako etaparekin alderatuta, bai inokulazio sekuentzialeko erdiko eta bukaerako etapekin alderatzean (ikusi **Eranskina 3 Irudia**). Hau da, *T. delbrueckii* legamiak, *S. cerevisiae* legamiak ez bezala, ez du medioko selektibotasuna horrenbeste handitzen, eta horregatik aurki daitezke bakterio-komunitateen dibertsitate handiagoa inokulazio sekuentzialeko hasierako etapetan. Izan ere, *T. delbrueckii*-k ardo zurietan laktona eta urriak diren esterren kontzentrazioa handitu eta ester nagusien kontzentrazioa murriztu egiten ditu^[24]. Era horretan, mahaspasa fruituaren aromak handitzea eta helduagoak diren ardoetan ohikoak diren usain gozoak lortzea ahalbidetzen du. Kontuan hartuta *T. delbrueckii* legamia inokulazioa burutu eta 2-3 egunetara desagertzen dela^[1, 5] eta *S. cerevisiae* *T. delbrueckii* inokulatu eta bost egun igaro arte ez dela inokulatzen, bi legamien inokulazio sekuentzial prozesuaren bidez ardoak lortzen dituen

ezaugarri organoleptikoen jatorria hasierako etapetako bakterioen dibertsitate horretan egon daitekeela pentsatzen da.

5. ONDORIOAK

1. Hartzidura malolaktikoko mahatsetan azido maliko azido laktiko bihurtzen duen *Oenococcus oeni* espezieko (*Firmicutes* filumeko eta *Bacilli* klaseko) bakterio azido laktikoa da nagusia den bakterioa, nahiz eta *Sphingomonas*, *Gluconobacter* eta *Methylobacterium* ere badauden.
2. Inokulazio artifizialak bakterio-komunitatearen dibertsitatean eta konposaketan eragina du, *Saccharomyces cerevisiae* legamiaren inokulazioak eragindako medioaren selektibotasunak, bakterio-komunitatearen dibertsitatea urria izatea eginarazteaz gain, konposaketa homogeenoa mantentzen duelako ohiko hartzidura alkoholikoko prozesuan zehar (ez da desberdintasunik aurkitu hasierako, erdiko eta bukaerako etapen artean, ezta 4 mahats barietateen artean behin hartzidura hasita).
3. Hartzidura alkoholikoko hasierako etapetan inokulazio sekuentzian erabilitako *T. delbrueckii* legamiak *S. cerevisiae* legamiak baino bakterio-komunitateen dibertsitate altuagoa mantentzea ahalbidetzen du. Bakterioen dibertsitate horrek, ardoaren konposatu eta ezaugarri organoleptikoetan eragina edukiz, *T. delbrueckii* legamiak ardoaren konposaketa aromatikoan duen efektua handiagotu dezakeela pentsatzen da.

6. ERREFERENTZIAK

- [¹] Padilla, B., Zulian, L., Ferreras, À., Pastor, R., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., Mas, A. (2017). Sequential Inoculation of Native Non-Saccharomyces and *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Wine Making. *Front. Microbiol.* 8: 1293.
- [²] Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* 6: 905.
- [³] Belda, I., Zorraonandia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Front. Microbiol.* 8: 821.
- [⁴] Fleet, G.H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8: 979-95.
- [⁵] González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals J.M., Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non *Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food. Res. Technol.* 240: 999.
- [⁶] Minnaar, P.P., du Plessis, H.W., Paulsen, V., Jolly, N.P., du Toit, M. (2017). *Saccharomyces cerevisiae*, Non-Saccharomyces Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Sequential Fermentations: Effect on Phenolics and Sensory Attributes of South African Syrah Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 38: 1621.

- [7] Bartowsky, E. (2008). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust. J. Grape Wine R.* 11: 174 – 187.
- [8] Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M.V. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules.* 22: 189.
- [9] Morgan, H.H., du Toit, M., Setati, M.E. (2017). The Grapevine and Wine Microbiome: Insights from High-Throughput Amplicon Sequencing. *Front. Microbiol.* 11: 820.
- [10] Schloss, P.D., Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol.* 6: 229.
- [11] Di Bella, J.M., Bao, Y., Gloor, G.B., Burton, J.P., Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J. Microbiol. Methods.* 95: 401-414.
- [12] Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012). Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2: 3.
- [13] Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41: e1.
- [14] Kembel, S.W., Wu, M., Eisen, J.A., Green, J.L. (2012). Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. *PLoS Comput. Biol.* 8: e1002743.
- [15] Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widman, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7: 335-336.
- [16] Marzano, M., Fosso, B., Manzari, C., Grieco, F., Intranuovo, M., Cozzi, G., Mulè, G., Scioscia, G., Valiente, G., Tullo, A., Sbisà, E., Pesole, G., Santamaria, M. (2016). Complexity and Dynamics of the Winemaking Bacterial Communities in Berries, Musts, and Wines from Apulian Grape Cultivars through Time and Space. *PLoS One.* 11: e0157383.
- [17] Portillo, Mdel C. eta Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT.* 72: 317-321.
- [18] Ale, C.E., Farías, M.E., Strasser de Saad, A.M., Pasteris, S.E. (2014). Glycerol production by *Oenococcus oeni* during sequential and simultaneous cultures with wine yeast strains. *J. Basic Microbiol.* 54: S200-209.
- [19] Portillo, Mdel C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 219: 56-63.
- [20] Bokulich, N.A., Lucy, J.C.M., Allen, G., Benson, A.K., Mills, D.A. (2012). Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLOS ONE.* 7: e36357.
- [21] Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *PNAS.* 111: E139-148.
- [22] Stefanini, I. eta Cavalieri, D. (2018). Metagenomic Approaches to Investigate the Contribution of the Vineyard Environment to the Quality of Wine Fermentation: Potentials and Difficulties. *Front. Microbiol.* 16: 991.

[23] Bokulich, N.A., Collins, T.S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S.E., Mills, D.A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *mBio*. 7: e00631-16.

[24] Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Zamora, E., López-Piñeiro, A., Hernández, L.M. (2016). Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspota delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *Int. J. Food Microbiol.* 238: 311-319.

7. ERANSKINA

7.1. ERABILITAKO KOMANDOAK

alpha_rarefaciton.py: lagin bakoitzaren OTUen dibertsitatea aztertzen duen alfa dibertsitatea kalkulatzeko. Komando horrek, jatorrizko taulatik abiatuta, sekuentzia kopuru desberdinak hartu eta OTU taula berriak sortzen ditu. Taula berri bakoitzerako alfa dibertsitatea kalkulatu, eta grafiko bat sortzen du (X ardatzean sekuentzia kopurua eta Y ardatzean alfa dibertsitatea jarritz). Kasu honetan, alfa dibertsitatea kalkulatzeko *chao1* indizea erabili da.

beta_diversity.py: laginen arteko komunitate desberdintasunak erakusten dituen beta dibertsitatea kalkulatzeko. Zehazki, *Bray Curtis* indizearen arabera beta dibertsitatea lortu da.

make_prefs_file.py: beta dibertsitatearen bidez lorturiko emaitzen grafikoen sorrera prozesuan erabiliko ziren lehentasunen fitxategi bat sortzeko.

principal_coordinates.py: beta dibertsitatearen bidez lorturiko emaitzen grafikoen sorrerarako beharrezko Koordenatu Nagusien Analisisiko (ingeleraz PCoA siglak dituen) fitxategia sortzeko.

make_2d_plots.py: beta dibertsitatearen bidez lorturiko emaitzetan eta *make_prefs_file.py* eta *principal_coordinates.py* komandoen emaitzak erabiliz 2D-ko PCoA grafikoak sortzeko.

filter_samples_from_otu_table.py: laginak emaitzetatik baztertzeko.

split_otu_table.py: OTU taulak aldagai desberdinen (mahats barietatearen eta etaparen) arabera taldekatzeko.

summarize_taxa_through_plots.py: lagin bakoitzak aurkezten duen bakterioen komunitatea aztertzeko. Komando honen bidez lagin bakoitzaren mikroorganismoen konposizioa erakusten dituen diagramak eratzen dira, maila taxonomiko desberdinetan.

compare_categories.py: mahats eta etapa desberdinen komunitateetan desberdintasun esanguratsurik dagoen aztertzeko. Horren bidez, bi analisi egin ziren: Adonis eta ANOSIM, hurrenez hurren. Adonis aldagai zehatz batek laginetan duen eragina esanguratsua den edo ez zehazteko erabiltzen den proba estatistikoa da. Esangura estatistikoa zenbatekoa den jakiteko, Adonis probak bai R^2 balioa (aldagai baten arabera aldakortasuna ehunekotan adierazten

duena) eta bai p balioa kalkulatu. ANOSIM-ek datuak aldagai baten arabera taldeetan banatu, eta talde horien artean desberdintasun esanguratsurik dagoen aztertzen du. Adonis zein ANOSIM proben esangura 1000 permutazio eginez zehaztu zen. Ikerketa honetan erabilitako aldagaiak mahats barietatea (*Hondarribi Zuria*, *Hondarribi Beltza*, *Pinot Noir* eta *Petit Courbu*) eta hartiduraren etapa (hasiera, erdia eta bukaera) izan ziren.

compute_core_microbiome.py: mahats barietate eta hartidura etapa desberdinetako OTU amankomunak aztertzeko. Datu horiek erabiliz, Venn diagramak eraiki ziren <http://bioinformatics.psb.ugent.be/> web-orrian.

group_significance.py: laginen OTUen ugaritasunean desberdintasun esanguratsurik dagoen jakiteko. *Kruskal-Wallis* da testaturiko estatistikoa (P balioa < 0.05 bada, emaitza esanguratsua da).

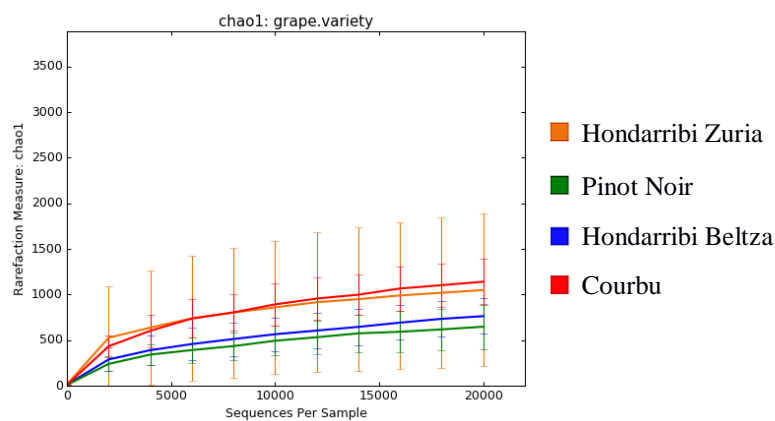
7.2. IRUDI ETA TAULAK

Eranskina 1 Taula. Laginen informazioa erakusten dituen taula. Izenen laburdurak mahats motaren (*Hondarribi Beltza*, *Hondarribi Zuria*, *Petit Courbu* edo *Pinot Noir*), hartziduraren etaparen (alkoholiko aurre-hasiera, hasiera, erdia eta bukaera; eta malolaktikoa) eta inokulu komertzialaren (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* eta *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae*) arabera bildu dira.

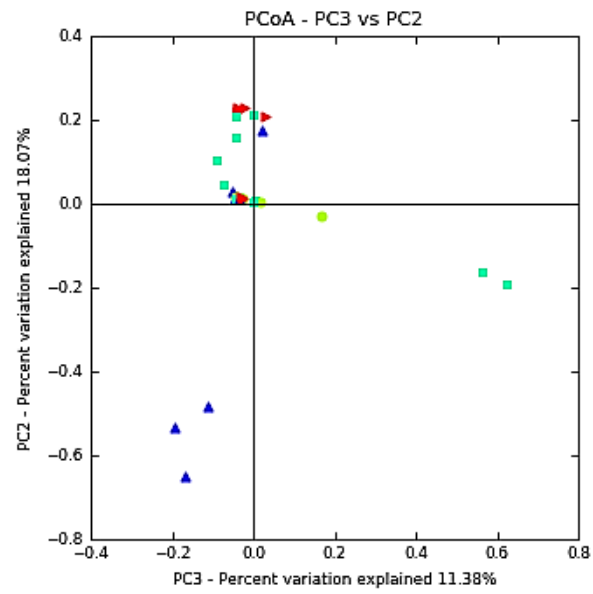
Laginen izen-laburdura	Mahats barietatea	Hartzidurako etapa	Inokulu komertziala
BH1	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
BH2	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
BE1	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
BE2	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
BB4	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
BB5	Hondarribi Beltza	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
ZEH1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
ZEH2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
ZEE1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
ZEE2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
ZEB1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
ZEB2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
ZBH1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko aurre-Hasiera	<i>T. delbrueckii</i>
ZBH2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko aurre-Hasiera	<i>T. delbrueckii</i>
ZBCH1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Hasiera	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
ZBCH2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Hasiera	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
ZBCE1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Erdia	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
ZBCE2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Erdia	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
ZBCB1	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Bukaera	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
ZBCB2	Hondarribi Zuria	Alkoholiko Bukaera	<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>
CH1	Petit Courbu	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
CH2	Petit Courbu	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
CE1	Petit Courbu	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
CE2	Petit Courbu	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
CB1	Petit Courbu	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
CB2	Petit Courbu	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
PH1	Pinot Noir	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
PH2	Pinot Noir	Alkoholiko Hasiera	<i>S. cerevisiae</i>
PE1	Pinot Noir	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
PE2	Pinot Noir	Alkoholiko Erdia	<i>S. cerevisiae</i>
PB1	Pinot Noir	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
PB2	Pinot Noir	Alkoholiko Bukaera	<i>S. cerevisiae</i>
PFML1	Pinot Noir	Malolaktikoa	Ez (berezkoa)
PFML2	Pinot Noir	Malolaktikoa	Ez (berezkoa)
PFML3	Pinot Noir	Malolaktikoa	Ez (berezkoa)

Eranskina 2 Taula. Hartzidura alkoholikoko laginetarako lorturiko Adonis eta ANOSIM proben R^2 , R eta p balioak. *Petit Courbu* mahats barietateko hasierako eta bukaerako etaparik eta inokulazio sekuentzialeko laginik gabeko lagin multzoaren emaitzak erakusten dira. Proba bakoitzak etaparen eta barietatearen arabera desberdintasunak erakusten ditu.

		<i>Adonis</i>		<i>ANOSIM</i>	
		Bray Curtis		Bray Curtis	
		R^2	p balioa	R	p balioa
Hartzidura alkoholikoko laginak	Etapa	0.19017	0.06294	0.077	0.0999
	Barietatea	0.09105	0.8691	-0.0647	0.795

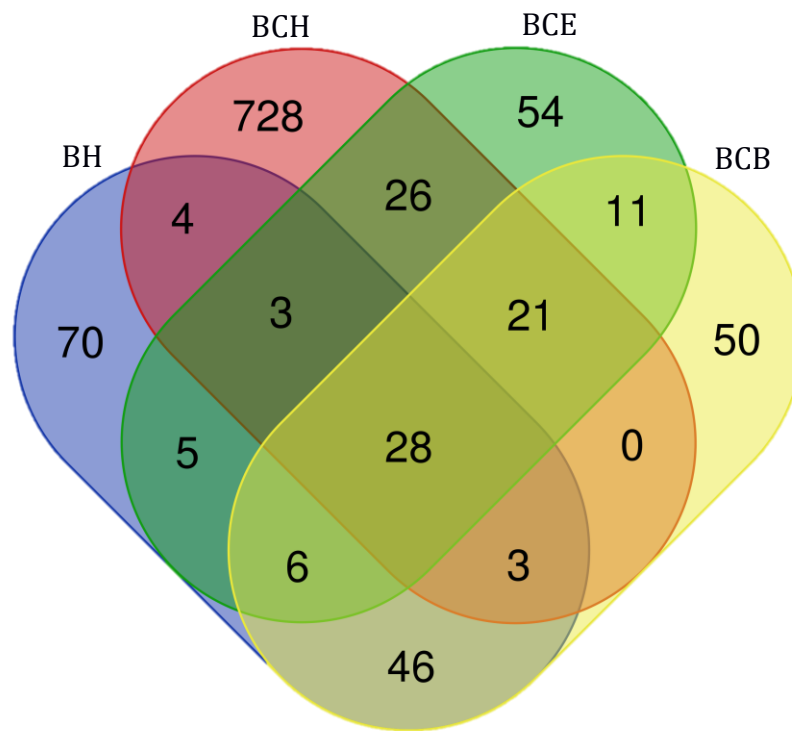


Eranskina 1 Irudia. Laginen alfa dibertsitatea sekuentzia kopuruaren arabera erakusten duen grafikoa. Mahatsen barietateen arabera alfa dibertsitatearen grafikoa erakusten dira, *chao1* estatistikoaren bidez kalkulatuak.

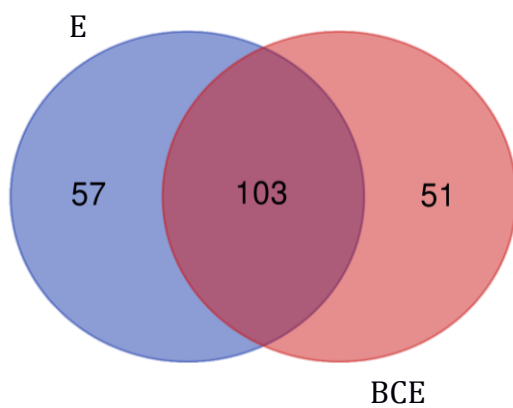


Eranskina 2 Irudia. Mahatsen laginak barietatearen arabera biltzen dituen 2D-ko PCoA grafikoa. Laginek ondorengo sailkapena dute: ■ Hondarribi Zuria, ● Hondarribi Beltza, ▶ Courbu eta ▲ Pinot Noir.

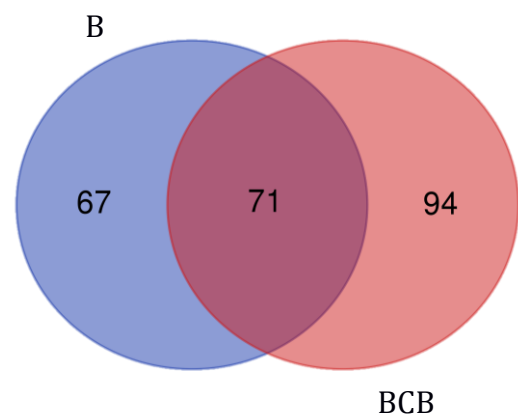
A)



B)



C)



Eranskina 3 Irudia. Etapen arteko bakterio amankomunak (Venn diagrama). *Hondarribi Zuria*-ko laginen bakterio amankomunak erakusten dira A) Inokulazio sekuentzialeko etapa guztietarako (aurre-hasierako etapa urdinez, hasierako etapa gorriz, erdiko etapa berdez eta bukaerako etapa horiz); B) Ohiko hartidura alkoholikoko (urdinez) eta inokulazio sekuentzialeko (gorriz) erdiko etapetarako; eta C) Ohiko hartidura alkoholikoko (urdinez) eta inokulazio sekuentzialeko (gorriz) bukaerako etapetarako. Elipseen eta zirkunferentzien batura guneetan alderatzen diren etapetarako amankomunak diren bakterioen kopuruak erakusten dira.