

Gradu Amaierako Lana
Biologiako Gradua

Giza Larruazaleko Mikrobiota:

Protokolo Metagenomikoen Optimizazioa eta Azal
Mikrobiotaren Dinamika Eguzki Irradiaziopean.

Egilea:

Josu Bizente Martín Fernández

Zuzendaria(k):

Santos Alonso Alegre eta Neskuts Izagirre Arribalzaga

© 2024, Josu Bizente Martín Fernández

Aurkibidea

Laburpena	3
Hitz gakoak.....	3
Sarrera	4
Larruazaleko Mikrobiotaren Konposizioa.....	5
Mikrobiota eta eguzki-erradiazio ultramorea (UVR).....	5
Hipotesiak.....	6
Helburuak.....	6
Metodologia	7
Larruazaleko mikrobiomaren protokolo metagenomikoen optimizazioa.....	7
Lagin Bilketa.....	7
DNA erauzteko prozedura.....	7
DNA Kuantifikazioa.....	8
Anlisi estatistikoa.....	8
Larruazaleko Mikrobiotak UVRpean duen Dinamikaren Azterketa.....	9
Lagin Bilketa.....	9
Sekuentziazioa eta Anlisi Bioinformatikoa.....	9
Dibertsitatearen azterketa estatistikoa.....	10
Alfa Dibertsitatea.....	10
Beta-Dibertsitatea.....	10
Ugaritasunaren Anlisi Diferentziala.....	10
Emaitzak	11
Protokolo Metagenomikoen Optimizazioaren Emaitzak.....	11
Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamikaren Azterketaren Emaitzak.....	12
Beta-Dibertsitatearen analisisa.....	12
Alfa-Dibertsitate Analisisak.....	13
Ugaritasunaren Anlisi Diferentziala.....	13
Eztabaida	14
Protokolo metagenomikoen optimizazioa.....	14
Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamika UVRpean.....	15
Alfa-Dibertsitatea.....	15
Beta-Dibertsitatea.....	15
Espezie (edo genero) zehatzen ugaritasunaren analisi diferentziala.....	17
Ondorioak	20
Bibliografia	20

Laburpena

Larruazaleko mikrobiotak, bakterioek, onddoek, arkeek eta birusek osatua, berebiziko garrantzia du larruazalaren osasunean eta defentsa immunitarioan. Azterketa honek protokolo metagenomikoak optimizatzen ditu DNA mikrobiarra azaletik erauzteko, eta eguzki-erradiazio ultramorearen (UVR) azpian larruazaleko mikrobiotaren dinamika aztertzen du. DNA erauzteko kit komertzialak eta belaunaldi berriko sekuentziazio-teknikak erabili ziren, larruazaleko urtaro eta eskualdeetan konposizio mikrobiarra ebaluatzeke. Emaitez erakusten dute UVRak eragin nabarmena duela mikrobiota-aniztasunean eguzkitan denbora luzez egoten den aldietan. Burkholderiaceae familian, eta *Macrococcus* eta *Bacillus* bezalako generoen ugaritasunean ezberdintasunak ikusi ziren UVRren eraginpean dauden eta ez dauden eremuen artean. Zenbait mekanismo proposatzen dira, hala nola konposatu foto-babesleak ekoiztea, entzima babesleen sintesia eta modulazio immunitarioa, genero horien prebalentzia azaltzeko. Aurkikuntza horiek larruazaleko mikrobiotak UVRaren aurkako babesean duen garrantzia azpimarratzen dute, baita tratamendu dermatologikoetan eta medikuntza pertsonalizatuko tratamenduetan aplikatzeko potentziala ere.

Hitz gakoak

Azaleko mikrobiota; Erradiazio ultramore (UVR); 16 SRNA; Dibertsitate mikrobianoa; DNA erauzketa; Urtaro bariazioak; Larruazaleko foto-babesa; Medikuntza pertsonalizatua.

Abstract

The skin microbiota, consisting of bacteria, fungi, archaea and viruses, plays a crucial role in skin health and immune defence. This study optimises metagenomic protocols for skin microbial DNA extraction and analyses skin microbiota dynamics under solar ultraviolet radiation (UVR). Commercial DNA extraction kits and next-generation sequencing techniques were used to assess microbial composition in different seasons and skin regions. The results show that UVR significantly affects microbial diversity during periods of high sun exposure. Differences in the abundance of genera such as *Macrococcus* and *Bacillus*, and families such as Burkholderiaceae were observed between UVR-exposed and non-UVR-exposed areas. Mechanisms such as production of photoprotective compounds, synthesis of protective enzymes and immune modulation are proposed to explain the prevalence of these genera. These findings highlight the importance of the skin microbiota in UVR protection and its potential in dermatological treatments and personalised medicine.

Key words

Skin microbiota; Ultraviolet radiation (UVR); 16 S rRNA; Microbial diversity; DNA extraction; Seasonal variations; Skin photoprotection; Personalized biomedicine.

1.Sarrera

Larruazala giza gorputzeko organorik handiena da, ekosistema konplexua eta dinamikoa. Ekosistema horrek bakterioak, onddoak, legamiak, arreak, birusak eta akaroak barneratzen ditu, larruazaleko mikrobiota deritzoguna [1, 2]. Jaiotzatik, larruazaleko mikrobiotak erditze-giroaren eragina izaten du. Ondoren, beste faktore batzuek ere izango dute eragina, hala nola adinak, sexuak, genetikak, larruazalaren propietate fisiko-kimikoak, bizimoduak edota immunitate-egoerak [3, 2]. Hala ere, larruazaleko mikrobiotaren dibertsitatea aldatu egiten da eremu anatomikoen arabera, eremu bakoitzaren baldintza ekologiko espezifikoen ondorioz [4, 2]. Azaleko mikrobiotan faktore intrintsekoak eta estrintsekoak eragina dute. Horiek, mikroorganismoen ugaritasuna, nagusitasuna eta dibertsitatea zehazten dute denboran zehar [5, 1]. Larruazal osasuntsuak, hotz-, azidotasun- eta lehortze-ezaugarriekin, mikroorganismoen hazkunderako aurkako ingurunea sortzen du. Hala ere, mikrobiota dinamiko bat du, zentimetro karratuko mila milioi bakterio dituen, ostalariarekin modu aktiboan elkarreagiten dutenak homeostasia mantentzeko [1, 6]. Mikrobiologiaren eta dermatologiaren arteko erlazioak, mikrobio-komunitateek giza osasunean eta gaixotasunean duten funtsezko zeregina nabarmentzen du [1, 3, 7].

Mikroorganismo komentsaleak funtsezkoak dira larruazaleko homeostasia mantentzeko eta defentsa immunitarioaren alde egiteko. Izan ere, zelula dermikoen funtzionamendua modulatu dute, baita hanturazko zitozinen ekoizpena ere, hala nola IFN-a eta IL-17A [8, 3]. Patogenoek, aldiz, normalean iragankorrak, gaixotasunak eragin ditzakete desoreka bat gertatzen bada, disbiosia deritzona [1]. Disbiosiak patogeno oportunistak kolonizatzen eta ugartzen lagun dezake, larruazalaren hantura-nahasmendu batzuei lotuak, hala nola dermatitis atopikoari, psoriasiari, akne arruntari, errosazeari eta hipersentikortasun-erreakzioei [8, 3, 10]. Testuinguru horretan, larruazaleko mikrobiotako mikroorganismo komentsaleek mikroorganismoen aurkako peptidoak askatzen dituzte, eta beste bakterio-espezie batzuen hazkundera inhibitzen dute [11, 12]. Adibidez, *Staphylococcus epidermidis*-ek patogenoen biofilmen sorrera inhibitzen dituzten konposatu antimikrobianoak sortzen ditu, *Staphylococcus aureus*-ena adibidez [6, 13]. Larruazal immunodeprimatuan, mikrobiotak zailtasunak izan ditzake modu egokian babesteko. Bestalde, larruazal osasuntsu batean, bakterio oportunista iragankorrek ez dute gaixotasunak eragiteko joerarik [13, 14, 15]. Mikroorganismo komentsalen eta ostalariaren immunitate-sistemaren arteko elkarrekintzek infekzioen aurka babesteaz gain, gehiegizko hantura prebenitzen duen oreka mantentzen ere laguntzen dute, baita larruazaleko hantura-gaixotasun kronikoak babesten ere [11, 15]. Interakzio horiek ulertzea funtsezkoa da estrategia terapeutiko eraginkorrak garatzeko, larruazalaren osasunari eusteko eta larruazaleko gaixotasunak tratatzeko.

Larruazaleko Mikrobiotaren Konposizioa

Giza azalaren mikrobiotako bakterioen konposizioari dagokionez, filo nagusiak: Aktinobakteria (% 51,8), Firmikutes (% 24,4), Proteobakteria (% 16,5) eta Bakterioidetes (% 6,3) dira [3, 12]. Mikroorganismo horien banaketa aldatu egiten da larruazalaren eremu desberdinen artean. Horrek eremu bakoitzeko mikroingurune paregabea islatzen du [3, 15].

Larruazaleko mikroinguruneak, oxigeno-mailak, pH-ak, temperaturak eta topografia bezalako faktoreek ezaugarritzen dutenak, mikrobiotaren konposizioa modulatzeko dute [1, 3]. Bakterioez gain, larruazaleko mikrobiotak birusak eta onddoak ditu. Birusek, batez ere bakteriofagoek, beren bakterio-ostalariak islatzen dituzten banaketa-patroiak dituzte, eta onddo ohikoak Ascomycota eta Basidiomycota filumak dira, bereziki *Malassezia* generokoak [8, 15]. Azaleko faktore fisiko-kimikoek mikroorganismo espezifikoaren hazkuntza errazten dituzten mikroinguruneak sortzen dituzte [16]. Adinarekin, genero-desberdintasunekin, jatorri etnikoarekin, kosmetikoen erabilerarekin eta eguzki-esposizioarekin lotutako aldaketek larruazaleko mikrobiotan aldakortasuna ere eragiten dute [5, 17, 18].

Mikrobiota eta eguzki-erradiazio ultramorea (UVR).

Larruazaleko mikrobiotaren kanpoko presio nagusietako bat erradiazio ultramorea (UVR) da. UVRak azaleko mikrobiotaren konposizio filogenetikoa eta genotipikoa aldatzen ditu, eta eragina du haren jardura metabolikoan [19, 10]. Ikerketa dibergenteek UVRak ondorio onuragarriak izan ditzakeela proposatzen dute, patogeno oportunistak murriztean eta UVR xurgatzen duten porfirinen ekoizpena handitzean [2, 20], baina, era berean, mikrobiotaren disbiosiaren ondorioz, hantura kronikoak eta larruazaleko gaixotasunak eragin ditzake [8, 15]. Larruazalak mekanismo endogenoak erabiltzen ditu UVRaren efektu/ondorioei aurre egiteko, hala nola loditze epidermikoak, DNA-konponketa, antioxidatzaileak eta pigmentuak ekoiztea, hala nola melanina [3]. Larruazaleko mikrobiotak ere defentsa gisa jarduten du, tumore-nekrosia α eta interleuzina-6 faktoreak askatuz [14], baita porfirinak eta erriboflabinak bezalako konposatu foto-babesleak ekoiztuz [10, 21]. *Micrococcus luteus*-en endonukleasak bezalako entzimek DNAREN konponketa hobetzen dute, eta argiak aktibatutako fotoliasak dituzten liposomek UVRak larruazalean eragindako eritema eta DNAREN kaltea murrizten dute [10].

Mikosporinaren antzeko aminoazidoek (MAA), larruazaleko bakterioek UVRari erantzunez sortutakoak, eguzki-iragazki mikrobiano gisa jarduten dute, eta UVR xurgatzen dute oxigeno erradikal erreaktiboak sortu gabe. Konposatu horiek, "melanina mikrobianoa" bezala ezagutzen direnak [19], UVRak DNAREN eragiten dituen kalteak prebenitzen dituzte, hala nola pirimidina-pirimidona eta pirimidina dimero fotoproduktuak [1, 18]. Zehazki, *Staphylococcus epidermidis*-ek 6-N hidroxiaminopurina (6-HAP) sortzen du, neoplasiaren eta UVRak eragindako zelulen proliferazioaren aurkako babes-propietateekin [6]. *Micrococcus*

luteus-ek UVRak eragindako azido zis-urokanikoa degradatzen du, haren efektu immunosupresoreak arinduz [13]. *Streptomyces* bezalako Aktinobakterioak, metabolito foto-babesleetan aberatsak direnak, ikertzen ari dira UVRaren aurkako mikrobiotan oinarritutako produktu babesleak eta larruazaleko tratamenduak garatzeko [14]. UVR bezalako ingurumen-faktoreetatik harago, *Staphylococcus epidermidis* eta *Micrococcus luteus* bezalako mikroorganismoek onuragarritzat jotzen dira larruazalaren osasunerako [22], haien metabolitoek UVRak eragindako DNAREN kaltea babesten eta murrizten dutela frogatu baitute, eta horrek azaleko minbiziaren aurka babesteko potentziala iradokitzen du [6].

Hipotesiak.

Aurrez aipatutako ikerketan oinarrituta, honako hipotesi hauek planteatzen dira:

1. **Larruazaleko mikrobiotaren dibertsitatea UVRpean:** UVR handiko urtarotetan (udan eta udaberrian, adibidez) larruazaleko mikrobiotaren dibertsitatea gutxitu egingo dela aurreikusten da, neguarekin alderatuta.
2. **Mikrobiotaren osaera larruazaleko hainbat eskualdetan:** mikrobiotaren osaeran desberdintasunak espero dira lagindutako eskualdeen artean (besaurre dortsalean eta bizepsaren barnealdean), UVRaren ondorioei egotz dakizkiekeenak.
3. **Mikroorganismoen genero espezifikoaren ugaritasuna:** UVRaren eraginpean egoteagatik ezagunak diren *Micrococcus* eta *Staphylococcus* bezalako genero espezifikoaren ugaritasunean desberdintasun esanguratsuak detektatzea espero da.

Helburuak.

1. **Azterlanaren onespenean etikia:** Giza laginekin ikerketa bat egiteko beharrezkoak diren memoriak eta protokoloak garatzea, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Irakaskuntzaren eta Ikerketen Etikarako Unibertsitate Batzordearen (IIEB) oniritzia lortuz.
2. **DNA Bakterianoa erazteko kit eraginkorra zehaztea:** DNA erazteko kitetatik (MagBio, MAgMax eta Mikrobiome Kit) zein den eraginkorra ebaluatzea eta zehaztea, *swabbing* bidez jasotako larruazaleko laginetatik DNA mikrobiarra lortzeko.
3. **Larruazaleko mikrobiotaren dinamikaren analisia UVRpean:** larruazaleko mikrobiotaren konposizioa hiru urtarotan (udan, neguan eta udaberrian) nola aldatzen den aztertzea. Aldakuntza horiek gorputzaren bi eremu desberdinetan alderatzea (besaurre dortsalean eta bizepsaren barnealdean).

2. Metodologia

Ikerketa funtsezko bi fasetan egituratu zen: lehenik, larruazaleko mikrobiometatik DNA erazteko protokolo metagenomikoak optimizatzena bideratu zen, biomasa mikrobiano baxuak eta giza DNAREN kutsadura altuak eragindako erronka teknikoaren ondorioz. Bigarren fasean, larruazaleko mikrobiotaren dinamika aztertu zen UVRpean. Belaunaldi berriko sekuentziazioa (NGS) eta QIIME2 bezalako plataforma bioinformatikoak erabiliz, datuak aztertu ziren dibertsitate metrika mikrobiarrak eta taxonomikoak kalkulatzeko.

Azterlanak UPV/EHUko Gizakiekin lotutako Ikerketetarako Etika Batzordearen (GIEB) oniritzia lortu zuen (GIEB eta IIEB), M10_2023_300 erreferentzia-zenbakiarekin, eta parte-hartzaile guztien Adostasun Informatua bermatu zen, Helsinkiko Adierazpenaren printzipio etikoaren eta datuak babesteko Europako araudien arabera (EU2016/679).

2.1. Larruazaleko mikrobiomaren protokolo metagenomikoaren optimizazioa.

Lagin Bilketa.

Protokolo metagenomikoak optimizatzeko, Euskal Autonomia Erkidegoko (Espainia) 7 parte-hartzaile osasuntsuen (4 emakume eta 3 gizon) eskuineko besoaren larruazaleko mikrobiotaren laginak hartu ziren. Azken lau asteetan kortikoideen, antibiotikoen edo immunosupresoreen eraginpean egon ez diren eta larruazaleko gaixotasunik ez duten parte-hartzaileak hautatu ziren. Gizabanako bakoitzak 3 lagin bereizi eman zituen (15 egunean behin). Lagin horiek funtsezkoak dira mikrobio-dibertsitate normala berreskuratzeko [10], eta estatistikoki esanguratsuagoak diren korrelazioak ziurtatu ziren. Guztira 21 lagin lortu ziren. Laginak biltzeko, isipu esterilak (OMNI Gen SKIN® Qiagen) erabili ziren, eta larruazaleko mikrobio-komunitatea modu eraginkorrean harrapatzeko *swabbing* protokolo estandarizatuari jarraitu zitzaion [23, 24]. Laginak hartzean, isipu bakoitza Z formaz igurtzi zen larruazalean 2 minutuz, eta 5x20 cm²-ko azalera estali zen. Isipua 800 µl-ko "Elution Tube" kontserbazio-medioa zuten garraio-hodietan jarri ziren, eta gomendatutako baldintzetan biltegitatu ziren, 4°C-tan, DNA erazteko arte. Laginketa-tekniken azalpen zehatzagoa *II. Eranskina; 2.1.1.* atalean.

DNA erazteko prozedura.

Hiru kit komertzial ebaluatu ziren: QIAamp® DNA Microbiome Kit, HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit. Kit bakoitzak metodo desberdinak erabiltzen ditu lisi zelularerako eta DNA erazteko. DNA mikrobioa erazteko metodoek tratamendu kimikoak eta haustura fisikoa konbinatzen dituzte, hala nola beroa edo birrintze mekanikoa, zelulak lisatzeko eta haien DNA askatzeko. Prozesu hori lau urratsetan banatzen da: zelula-lisia metodo entzimatikoa, mekanikoa eta termikoen bidez; proteinen eta kutsatzaileen prezipitazioa; DNA matrize solido batean eraztea, hala nola

silikan edo partikula magnetikoetan, bereizgailu magnetikoak erabiliz; eta DNA purifikatuaren eluzioa buffer egoki batean. DNAREN erauzketaren eraginkortasuna funtsezkoa da mikrobiotaren azterketa zehatzerako. DNA kit bakoitzaren protokolo estandarizatuari jarraituz isolatu zen, eta erauzi ondoren, DNA -80°C-tan biltegitatu zen, kuantifikatu arte.

a) QIAamp® DNA Microbiome Kit-a lisi entzimatiakoan oinarritzen da, nahi ez diren osagai zelularrak degradatzeko eta DNA askatzeko. DNA garbitzeko, silize-mintzarekiko afinitate-zutabe bat erabili zen, eta gatz-eduki txikiko buffer batekin eluitu zen, mikrobioen berreskurapena optimizatzeko eta giza DNAREN kutsadura minimizatzeko. **b) HighPrep™ viral/Pathogen DNA Kit**-ak, lisi mekaniko eta entzimatiakoaren konbinazio bat erabiltzen du, agente kaotropikoak, detergenteak eta entzimak barne hartzen dituen lisi gogorreko tanpoi bat erabiliz. Askatutako DNA, *binding-beads* magnetikoetan oinarritutako metodoaren bidez purifikatu zen, DNAREN berreskuratze handia ahalbidetzen duena karga biral baxuko laginetarako. **d) MagMAX™ viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit**, HighPrep kitaren antzekoa, metodo honek ere lisi mekanikoa eta entzimatiakoa konbinatzen ditu. Baita partikula magnetikoen erabilera DNAREN purifikazioarako. Erauzketa-kit bakoitzaren deskribapen zehatza *II.Eranskina; 2.1.2.* atala.

DNA Kuantifikazioa.

Erauzitako DNA totalaren (mikrobia + ostalaria) eta bakterianoaren kuantifikazio zehatza funtsezkoa da erauzketa-kiten eraginkortasuna ebaluatzeko. Horretarako, Qubit eta qPCR kuantifikazio-teknikak konbinatu ditugu. **Qubit 4 Fluorometer®** delakoak DNA kontzentrazio totala neurtzen du, fluoroforo espezifikoak DNARI lotuz. Bestalde, qPCR probarako, **Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System 48-Well 4376374**, eta **Femto Bacterial DNA Quantification Kit®**, erabili ziren DNA mikrobianoa kuantifikatzeko. qPCR zikloen etapei buruzko xehetasun espezifikoak, *II.Eranskina; 2.1.2* atalean azalduta daude. Kit honek bakterioen 16 S rRNA eskualde kontserbatuetarako *primer*/hasle espezifikoak erabiltzen ditu, giza DNAREN presentzian DNA bakterianoaren kuantifikazio zehatza eta espezifikoa ahalbidetuz. Ondoren, Qubit eta qPCR emaitzak alderatuko ditugu, bakterioen DNA erauzteko kit eraginkorra zehazteko. Kuantifikazio-prozesuen zehaztasun espezifikoak *II.Eranskina; 2.1.3.* atalean azalduta.

Analisi estatistikoa.

DNA kuantifikatzeko datuak **Microsoft Excel v2016** erabiliz aztertu ziren, **Xreal Stats v8.9.1** osagarriarekin. Hiru estatistika-proba egin ziren. Lehenik, pertsona bakoitzak kit bakoitzerako ateratako DNA batez bestekoak kalkulatu ziren, protokolo metagenomikoak optimizatzeko bildutako hiru laginetak kontuan hartuta. Ondoren, **Shapiro-Wilk proba** erabili zen datuen banaketaren normaltasuna egiaztatzeko, analisi estatistiko

parametrikotarako funtsezkoa. Bete ezean, **Box-Cox** teknikaren bidez normalizatu ziren. Ondoren, **ANOVA** bat aplikatu zen, ebaluatutako kiten artean DNA erauzteko batez bestekoak alderatzeko. Azkenik, kola bikoitzeko **t-Student proba parekatua** erabili zen, kiten arteko batez beste nabarmenenak zehazteko. DNA erauzteko kiten eraginkortasunari buruzko analisi estatistiko horiek ikerketaren hurrengo faserako kit egokiena hautatzeko erabili ziren. Estatistikaren xehetasunak *II.eranskina; 2.1.3.* atalean azalduta.

2.2.Larruazaleko Mikrobiotak UVRpean duen Dinamikaren Azterketa.

Lagin Bilketa.

Hamar parte-hartzaile hautatu ziren, 18 eta 60 urte bitarteko 5 gizon eta 5 emakume, aurreko atalean aipatutako baldintzak betetzen zituztenak. Ezkerreko besoaren bi eremuren laginak hartu zitzaizkien: UVR erradiazio handiaren eraginpean (besurrearen dortsala) eta UVR baxuaren eraginpean (bizepsaren barrualdea). Gainera, UVRak larruazaleko mikrobiotan duen urtaroko eragina ere ebaluatu zen, laginak hiru urtarotan bilduz: uda ostean, neguaren erdialdean eta udaberriaren hasieran ("uda", "negua" eta "udaberria" deiturik). Lagin bakoitza aurretik deskribatutako "*swabbing*" teknika bera jarraituz hartu zen, eta 4°C-tan biltegitatu ziren DNA erauzketa arte. DNA kit komertzial eraginkorra erabiliz erauzi zen, eta -80°C-an esterilizatutako Eppendorf hodietan gorde zen, UPV/EHU SGIKER sekuentziazio masiboko zerbitzuetara bidali arte.

Sekuentziazioa eta Analisi Bioinformatikoa.

DNA laginak Euskal Herriko Unibertsitateko Ikerketa Zerbitzu Orokorra (SGIKER) bidali ziren sekuentziaziorako. **Illumina plataforma** erabili zen **16S rRNA genearen V3-V4** eremu hiperaldakorraren sekuentziaziorako, bakterio-komunitateen azterketa metagenomikoetarako onartutako markagailua. Sekuentziazio-teknologiari buruzko xehetasunak *II.Eranskina; 2.2.2* atalean.

Lortutako datuak bioinformatikoki prozesatu ziren, **QIIME2** softwarearen bidez [25]. QIIME2 plataforma bioinformatikoa, mikrobio-dibertsitatea eta taxonomia aztertzeke aukera ematen du, NGS bidez lortutako DNA sekuentzietatik abiatuta, mikrobio-espezieak identifikatzeko eta kuantifikatzeko. QIIME2n, *pipeline* estandarizatuak garatu ziren kalitate kontrolerako (**FASTQC** [26] eta **DADA2** [27] tresnen bidez), sekuentziak mihiztatzeko (DADA2ren denoising bidez aplikoiaren sekuentzia aldaerak (ASV) kalkulatzuz), taxonomia identifikatzeko (**VSEARCH** [28] bidez **Greengenes2 v.2022.10** datu-basearekin), filogenia sortzeko (**RAxML** bootstrapekin (n = 1000) [29] eta **FastTree** [30] bidez), dibertsitate-metrikak kalkulatzeko (Taldebarruko dibertsitatea (Alfa) eta taldeartekoa (Beta)), eta ugaritasunaren analisi diferentzialak egiteko (**ANCOM** (Analysis of Composition of

Microbiomes) [31] bidez). Erabilitako programa bioinformatikoetako *pipelineak* eta horien parametro espezifikoak zehaztuta daude *II.Eranskina; 2.2.2.* atalean.

Dibertsitatearen azterketa estatistikoa.

Alfa Dibertsitatea.

Shannon, Pileou eta Observed-OTU (Unitate taxonomiko operatiboa) indizeak erabili ziren mikrobioen aniztasuna ebaluatzeko. **Shannon** indizeak espezieen aberastasuna eta ekitatibotasuna neurtzen ditu; **Pileoukoak**, berriz, uniformetasuna. Behaketen indizeak (**Observed-OTU**) espezieen aberastan kualitatiboa (zenbat) kuantifikatzen du. **Kruskal-Wallisen** proba ez-parametrikoa erabili zen garrantzi estatistikoa aztertzeko, banaketa normalik gabeko datuetarako egokia, hainbat talde independenteren medianak alderatuz. Taldeen arteko desberdintasun espezifikoak identifikatzeko, **Kruskal-Wallis pairwise** proba aplikatu zen. Analisiaren eta alfa dibertsitate-indizeen azalpen zehatzagoa *II.Eranskina; 2.2.3.1.* atalean.

Beta-Dibertsitatea.

UniFrac distantzia ponderatuak eta ez-ponderatuak erabili ziren. Lehenengoek desberdintasun kuantitatiboak islatzen dituzte espezieen ugaritasun erlatiboan, eta bigarrenak, berriz, espezieen presentzia edo gabezia ebaluatzen dute. **Koordenatu Nagusien Azterketa** (PCOA) erabili dugu gorputz-eskualdeen eta urtaroen arteko mikrobiotaren egitura aztertzeko. PCOAn ikusitako joeren garrantzi estatistikoa **PERMANOVA**ren bidez ebaluatu zen, izan ere, datu metagenomikoen konplexutasuna eta heterogeneotasuna erabiltzea ahalbidetzen du, banaketa normala izan gabe. Osagarri gisa, **Pairwise PERMANOVA** erabili zen lagindutako eskualdeen eta urtaroen arteko alde espezifikoak ebaluatzeko. Beta-dibertsitate analisiaren eta indizeen azalpen zehatzagoa *II.Eranskina; 2.2.3.2* atalean.

Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.

QIIME2ko ANCOM erabili zen, urtaroen zein besurrearen eta bizepsaren laginen artean desberdintasun esanguratsuak identifikatzeko, espezie eta genero mailan. ANCOMek garrantzi estatistikoa eta ugaritasun erlatiboko diferentzia bistaratzen dituen **Volkano Plot** bat sortzen du. X ardatzak batez besteko logaritmikoaren eta ugaritasun erlatiboaren arteko aldea erakusten du, eta Y ardatzak garrantzi estatistikoa ($-\log_{10}$ (p-balioaren)). "**Percentile abundances of features by group**" taulek taxonomia-ezaugarri bakoitzak talde bakoitzean duen perzentil-ugaritasuna laburbiltzen dute, espezie edo genero desberdinak identifikatuz. ANCOMen analisi estatistikoaren zehaztapenak *II.Eranskina, 2.2.3.3* atalean azalduta daude.

3.Emaitzak

3.1. Protokolo Metagenomikoen Optimizazioaren Emaitzak.

Hiru kit komertzial ebaluatu ziren: **a)** QIAamp® DNA Microbiome Kit (Microbiome Kit), **b)** HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio), eta **d)** MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (MagMax). DNA totalaren eta bakterianoaren batez bestekoak 200 µl hasierako laginetik lortu ziren. Emaitzek erakutsi zuten **MagBiok** izan zuela DNA_{Totalaren} etekinik handiena (ikusi *I.Eranskina; 1.Taula*). **Microbiome Kit**-ak errendimendu baxuena izan zuen DNA totalari dagokionez, eta **MagMax**-ek, berriz, bitarteko errendimendua izan zuen. qPCR-ren bidez DNA bakterianoaren kopuruaren analisi espezifikoak aztertzeke aukera eman digu, eta horri esker DNA_{Total} eta DNA_{Bakteriano} arteko ratioa aztertu zen, erauzketaren “kalitate” adierazlea dena. Erauzketa kalitateari dagokionez, **Microbiome Kit**-ek ratio txikiagoa erakutsi zuen ($\text{DNA}_{\text{Totala}}/\text{DNA}_{\text{Bakterianoa}}=2,5324$), hau da DNA_{Bakteriano}-proportzio handia adierazi zuen. **MagMax** kitak, berriz, ratorik handiena izan zuen ($\text{DNA}_{\text{Totala}}/\text{DNA}_{\text{Bakterianoa}}=8,8434$), hau da, laginaren kalitate txikiena (1.Taula).

1.Taula: DNA_{Totala}/DNA_{Bakt} ratioaren emaitzak, erauzketa-kitek ateratako DNAREN kalitatea alderatzeko: QIAamp® DNA Microbiome Kit (Mikrobiome Kit), HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio) eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (Magmax). Aurkeztutako balioak 200µl lagineko bolumean ateratako DNA_{Totala/Bakt}-en batez bestekoa eta lagin bakoitzetik (hau da 800µl-tik) atera daitekeen DNA_{Totala/Bakteriano} maximoa (ng-tan).

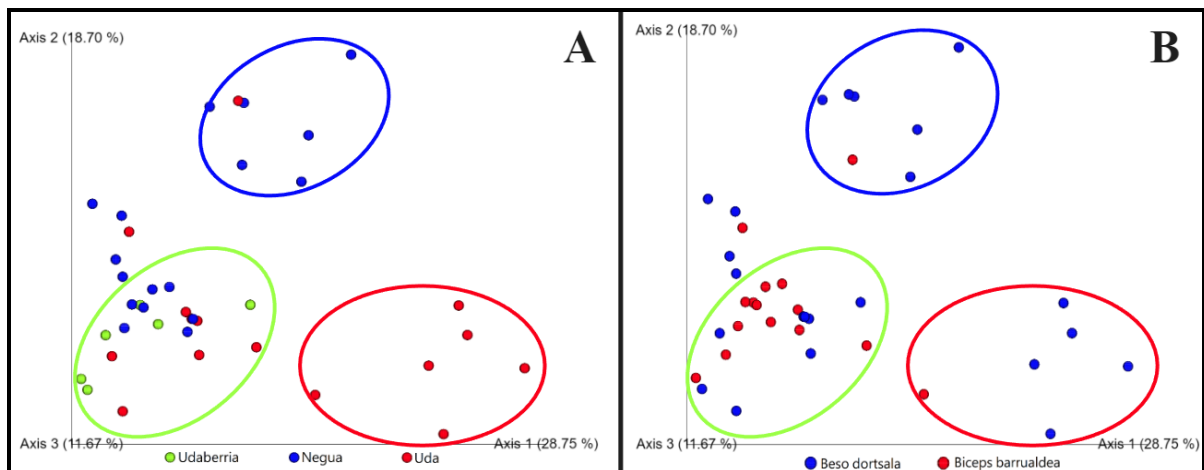
Kuantifikazio teknika	Guztizko DNA Batzbestekoa (ng DNA) "Elution Tube" 200µl-tan			Guztizko DNA Batzbestekoa (ng DNA) "Elution Tube" 800µl-tan		
	MagMax	MagBio	Mikrobiome Kit	MagMax	MagBio	Mikrobiome Kit
Qubit 4 Fluorometer	6,591287879	7,886098485	2,077135417	26,365151515	31,544393939	8,308541667
StepOnePlus Real-Time PCR System	0,745332421	1,483075271	0,820214976	2,981329685	5,932301084	3,280859906
Ratio ADN _{Totala} /ADN _{Bakteriano}	8,84342032	5,317395981	2,532428054	8,84342032	5,317395981	2,532428054

Bi ANOVA egin ziren hiru kiten arteko aldeak ebaluatzeko, kuantifikazioaren arabera: **a)** DNA bakterianoa: Real-Time PCR eta **b)** DNA totala: Fluorometria. ANOVAn, **qPCRaren batez bestekoetarako**, ez zen alde esangarririk aurkitu ($p > 0,05$; $F(2, 36) = 1,2285$, $p = 0.3046$), hau da, erauzketa-kitek ez dute eraginik erauzitako DNA_{Bakteriano} kantitatean. Hala ere, **fluorometriarako ANOVA**k kit-en artean alde esangarriak ($p < 0,05$) zeudela erakutsi zuen ($F(2, 51) = 10,7962$, $p = 0.0001$). Horrek esan nahi du DNA_{Totalaren} erauzketaren eraginkortasuna aldatu egiten dela erabilitako kitaren arabera (ikusi *I.Eranskina; 2.Taula*). Halaber, **t-Student analisi parekatuak** egin ziren hiru kitak alderatzeko. Berrito ere, **qPCR** (DNA bakterianoa) emaitzek ez zuten alde esangarririk erakutsi ($p > 0,05$) **MagMax-MagBio** ($p = 0.2514$), **MicrobiomeKit-MagBio** ($p = 0.3091$) eta **MicrobiomeKit-MagMaxen** ($p = 0.3014$) artean, eta horrek antzeko eraginkortasuna erakutsi zuen. Hala ere, fluorometriaren emaitzek (DNA_{Totala}) alde esanguratsuak erakutsi zituzten **MagMax-MagBio**-ren ($p = 0.0283$) eta **Microbiome Kit-MagBio**-ren ($p = 0.0012$) artean (ikusi *I.Eranskina; 3.Taula*). Beraz, 200µl-tik ateratako guztizko DNAREN eraginkortasunaren araberako beheranzko ordena honako hau izan zen: **MagBio > MagMax > Microbiome Kit** (1.Taula).

3.2. Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamikaren Azterketaren Emaitzak.

Beta-Dibertsitatearen analisia.

UniFrac distantzia ponderatuen PCOAn (**kuantitatiboa**), laginak hiru taldetan biltzeko joera ikusi zen 1. ardatzean (% 28,75) eta 2. ardatzean (% 18,70) (ikus *I.Eranskina*; *1A.Irudia*). Banaketa hori eragin zuen faktorea zein zen zehazteko, PCOAAk aztertu ziren: urtaroaren, sexuaren, lagindutako eskualdearen, adinaren eta subjektuaren arabera. PCOAtan, **adinaren**, **sexuaren** eta **subjektuen** arabera, ez zen joerarik ikusi taldekatzeetan. Izan ere, laginen banaketa homogeneoa izan zen aipatutako taldekapetan (ikus *I.Eranskina*; *1B.Irudia*, *1D.Irudia* eta *1E.Irudia*). Bestalde, **urtaroaren** arabera, hiru multzo ikusi ziren: **a)** talde berdea, "1.Multzoa" deiturik, udaberriko laginez eta neguko eta udako barne-bizepsaz osatua. **b)** Talde urdina, "2.Multzoa" deiturik, neguko besaurreko laginez osatua. **d)** Talde gorria azkenik, "3.Multzoa" deiturik, udako besaurreko laginez osatua (*1A.Irudia*). Azkenik, PCOAn, **lagindutako eskualdearen** arabera, ikusi zen besaurreko laginak urrunen dauden taldeetan sailkatzen direla (2.Multzoa eta 3.Multzoa), eta bizepsaren barrualdeko laginak, berriz, 1.Multzoan, udaberriko laginekin batera. Horrek iradokitzen du neguko eta udaberriaren besaurreko mikrobioten artean aldeak daudela (*1B.Irudia*).



1.Irudia: Beta-dibertsitate Koordinatu Nagusien Analiaren emaitzak, UniFrac distantzia ponderatuak erabiliz, laginek 1. ardatzean (azaldutako bariantzaren % 28.75) eta 2. ardatzean (azaldutako bariantzaren % 18.70) duten banaketa erakutsiz. (A) PCOaren banaketa urtaroaren arabera (uda: kolore gorria, negua: kolore urdina eta udaberria: kolore berdea). (B) Banaketa PCOAn lagindutako eskualdearen arabera (besaurre dorsala: kolore urdina, bicepsaren barnealdea: kolore gorria). 60 laginetatik 40 bakarrik irudikatu dira, arazo bat sortu baitzen udaberriko 14 eta neguko 6 muetren sekuentziazioan.

PERMANOVA analisi **kuantitatiboak** (espezieen ugaritasun erlatiboa), urtaroaren arabera, alde esangarriak daude ($p_{\text{Kuantitatiboa}} = 0,001$), eta **kualitatiboki** (espezieen presentzia edo gabezia), berriz, ez ($p_{\text{Kualitatiboa}} = 0,065$). Bestalde, analisisiek lagindutako eskualdearen arabera, **kuantitatiboki** desberdintasun esangarriak daudela zehaztu zuten ($p_{\text{Kuantitatiboa}} = 0,018$), aldiz, **kualitatiboki** ez ($p_{\text{Kualitatiboa}} = 0,12$). Azkenik, parte-hartzaileen arabera, analisi estatistikoak, **kuantitatiboki** alde esangarriarik ez dagoela zehaztu zuten ($p_{\text{Kuantitatiboa}} = 0,074$), eta **kualitatiboki**, berriz, badaude ($p_{\text{Kualitatiboa}} = 0,012$) (ikus *I.Eranskina*; *4.Taula*). Osagarri

gisa, **Pairwise PERMANOVA** bat egin zen, Unifrac-Ponderatuen distantzietan oinarritua, bizepsaren barrualdeko laginen arabera. Analisiaren arabera, bizeps barruko laginen artean, **kuantitatiboki**, ez ziren alde estatistiko esangarririk aurkitu ($p_{\text{Kuantitatiboa (All groups)}} = 0,374$) urtaroetan zehar (*I.Eranskina; 5.Taula*).

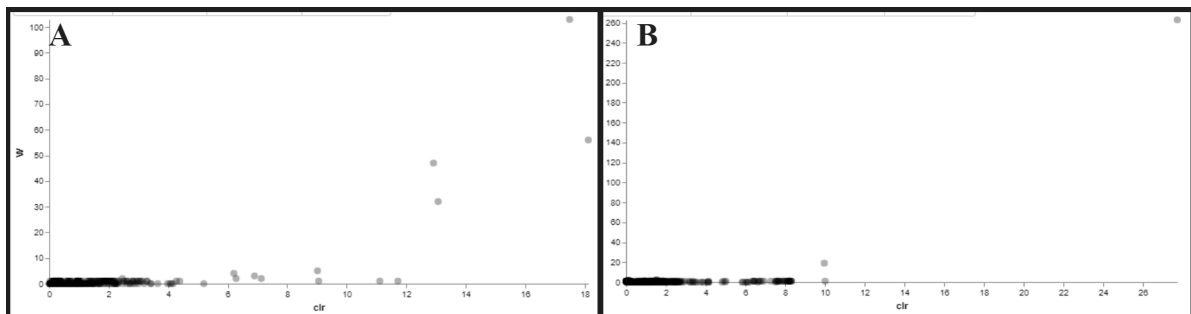
Alfa-Dibertsitate Analisiak.

Pileouren (Indize **Kuantitatiboa**), Shannonen (Indize **Kuantitatiboa**) eta behatutako OTUsen (Indize **Kualitatiboa**) bidezko Boxplot multzoek, lagindutako eskualdearen eta urtaroaren arabera, laginek mikrobiotaren espezieen arteko ekitatibotasun handia, hau da espezieen uniformetasuna, (ikus *I.Eranskina; 2A.Irudia: Pileu_Evenness* = 0,90-0,94) dutela, dibertsitate handia (ikusi *I.Eranskina; 2B.Irudia: Shannon_Entropy* = 6,4-7,2) eta espezie kopuru handia (ikusi *I.Eranskina; 2D.Irudia: Observed_OTU* = 150-200) adierazi zuten.

Kruskal-Wallisen test estatistikoaren bidez (ez-parametrikoa), zehaztu zen ez zegoela desberdintasun estatistikoki esangarririk alfa dibertsitate indizeetan (**kuantitatibo** zein **kualitatiboetan**): Pileouren ekitatibitatean ($p > 0,05$; $p = 0,7786$), Shannonen ($p > 0,05$; $p = 0,4219$) eta Behatutako OTUetan ($p > 0,05$; $p = 0,7531$) (ikusi *I.Eranskina; 6.Taula*).

Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.

Lehenko Volcano Plots multzoan (ikus *I.Eranskina; 3.Irudia*), bizeps barrualdeko eta besaurreko laginen arteko espezie ugaritasun aldeak adierazten dira, hartutako urtaro bakoitzean. Udako eta neguko laginetan *Micavibrionaceae generoan* eta *Abiotrophia defectiva* espezieen abundantzian joera diferentziala ikusi arren, ez ziren estatistikoki esangarriak izan (ikus *I.Eranskina; 3A.Irudia, 3D.Irudia*). **Bigarren Volcano Plots** multzoan bizeps barrualdearen eta besaurrearen laginak bananduta aztertu ziren hiru urtaroetan zehar. Analisi horiek ikuspegi dinamikoa eskaini zuten, espezieen ugaritasuna nola aldatu zen denboran zehar UVR esposiziopean (3.Irudia). Besaurrearen dortsalean, aldakuntza estatistikoki esangarria izan zen *Macrocooccus_B* eta *Bacillus_A* generoen ugaritasunean, eta Burkholderiaceae familian (3A.Irudia). Bizeps barrualdean, berriz, *Macrocooccus_B* generoan soilik ikusi zen (3B.Irudia). Ugaritasun analisi diferentzialaren xehetasunak *I.Eranskina; 7.Taulan* azaltzen dira.



3.Irudia: Volkano Plotaren emaitzak, biceps eta besaurreko larruazaleko mikrobiotaren laginak banandurik, hiru urtarotetan zehar (udan, neguan eta udaberrian). X ardatzak ugaritasunaren batezbesteko logaritmikoan (log-ratio) dagoen aldea adierazten du, eta Y ardatzak (W) garrantzi estatistikoaren balioa erakusten du ($-\log_{10}(p\text{-balioa})$). (A) Besaurreko larruazaleko mikrobiotaren laginen ugaritasun-aldea. (B) Ugaritasun-diferentziala biceps barruko laginetan.

Volkano Ploten osagarri, talde bakoitzeko **ugaritasun diferentzialeko pertzentilen taulak** kalkulatu ziren (ikusi *I.Eranskina; 7.Taula*). **Besaurrearen dortsaleko** laginetan, *Micrococcus_B* generoak prebalentzia nabarmena erakutsi zuen udan. Bestalde, *Bacillus_A* generoak hazkunde nabarmena izan zuen udaberrian, eta, azkenik, Burkholderiaceae familiak estatistikoki beherakada esangarri handia izan zuen udako eta udaberriko urtarotetan; neguan, berriz, estatistikoki gorakada esangarria izan zen. **Bicepsaren barrualdeko** laginetan, *Macroccus_B* generoak besaurreko laginetan ikusitako dinamikaren parekoa erakutsi zuen (estatistikoki esangarria), udan eta udaberrian ugaritasun-maila altuenak izanik.

4. Eztabaida

4.1.Protokolo metagenomikoen optimizazioa.

DNA erauzketarako kit komertzialen azterketa konparatiboan, alde nabarmenak ikusi dira erauzitako DNAREN kantitatean eta kalitatean. Analisi estatistikoek baieztatu dutenez, kit guztiak DNA bakterianoa erauzteko eraginkortasun berdina izan duten bitartean, alde nabarmenak izan dira erauzitako DNA totalaren kantitatean. Zehazki, alde esanguratsuak aurkitu ziren Microbiome Kit eta MagBio-ren ($p = 0.0282$) eta Microbiome Kit-aren eta MagMax-en ($p = 0.006$) artean, MagBio eraginkorra izanik. Azpimarratu behar da aurkikuntza horiek, ikerketaren helburuen arabera, DNAREN erauzketa-kit egokia hautatzearen garrantzia nabarmentzen dutela. Izan ere, eraginkortasuna nabarmen aldatzen da ebaluatutako kiten artean, lortutako DNAREN kantitateari eta kalitateari eragiten diena. Horrek, erauzitako DNA bakterianoaren purutasunaren eta kantitatearen mende dauden ikerketentzako berebiziko garrantzia du, hala nola analisi metagenomikoetarako. Gure kasuan, estatistikoki erauzitako bakterioen DNA kantitatean alde esanguratsurik ikusi ez zen arren, MagBio kita erabiltzea erabaki zen, DNA totala eruzteko eraginkorra zelako.

Beraz, larruazaleko mikrobiotatik lortzen den DNA kantitate txikia dela eta, MagBio kitak bakterioen DNA gehiago berreskuratzeko onuragarria da, baita ostalariaren DNA proportzio handiagoa badakar ere. Izan ere, azterlan metagenomikoetan proportzio hori oso garrantzitsua bada ere, 16S genearen sekuentziazioan oinarritutako azterlanetan proportzio hori ez hain kritikoa, gure ikerketa kasu. Gainera, MagBio kita merkeagoa da eta ez da prozesatzeko hain zaila, eta horrek ere eragina izan zuen bere hautaketan. Ondorioz, ikerketa honetako protokolo metagenomikoen optimizazioan MagBio kita hautatu zen. Kit horrek oreka optimoa erakutsi baitzuen erauzitako DNA bakterianoaren kantitate eta kalitatearen artean, baita kostu ekonomiko txikiagoa eta erabilera-sinpletasun handiagoa ere.

4.2.Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamika UVRpean.

Alfa-Dibertsitatea.

Urtaroen eta ingurumen-faktoreen (UVR, esaterako) arteko beta-dibertsitatean (kuantitatiboa) desberdintasun esanguratsuak hauteman ziren arren, ez zen desberdintasun estatistikoki esangarririk aurkitu alfa-dibertsitatean, dortsalaren eta bizepsaren laginen artean, ezta urtaroen artean ere. Bestalde, ugaritasun analisi diferentzialetik lortutako emaitzak eta Willmott et al.-en (2023) [10] ikerketa kontuan hartuta, alfa-aniztasunean desberdintasun esanguratsurik ez egoteak faktore alternatiboek egotz dakieke. Horietako bat da erabilitako testaren potentzia estatistikorik eza, laginen dibertsitate handia dela eta. Bestaldetik, banakoen eta laginen kopurua mugatuak estatistikoki desberdintasun esanguratsuak detektatzeko gaitasunean eragin ziezaiokeen, eta, hala, emaitzetan eragina izan zezakeen. Faktore horiek, elkarren artean baztertzailak ez direnak, etorkizuneko ikerketetan landu daitezke lagin kopuru handiago baten bidez, alfa aniztasunari buruzko azterlanen sendotasun estatistikoa hobetzeko. Garrantzitsua da nabarmentzea emaitza horiek ez dutela nahitaez esan nahi desberdintasun horiek existitzen ez direnik, alfa aniztasunak lagin bakoitzaren proportzioak alderatzen baititu, proportzio horiek espezie berekoak diren kontuan hartu gabe.

Beta-Dibertsitatea.

Sekuentziatutako laginen beta-dibertsitatea (1A irudia) aztertzean, hiru talde identifikatu ziren, laginketaren urtaroen arabera. Horrek iradokitzen du azaleko mikrobiotari kanpoko ingurumen-baldintzek nabarmen eragiten diotela, hala nola UVRa [3]. Erradiazio ultramorea (UVR) komunitate mikrobiarren konposizio filogenetiko eta genotipikoari eragiten dioten kanpoko presio nagusietako bat da [19]. Horrek azal lezake UniFrac distantzietan oinarritutako PCOA analisisian, hiru eremu nagusitan multzokatzeak: udako laginak (3.Multzoa), negukoak (2.Multzoa), eta udaberrikoak (1.Multzoa). Hala ere, udaberriko taldean neguko eta udako lagin batzuk ere ikusi ziren, erradiazio ultramorearen antzeko esposizioak azal dezakeena. Izan ere, udaberriko laginak Aste Santuko oporren ondoren lortu ziren, eta oporretan portaerari lotutako UVR esposizio handiagoa dagoela behatu da, zehazki beltzarantzeko jarrerekin [10]. Hala ere, neguko laginen presentziak iradokitzen du beste faktore batzuek eragina izan dezaketela laginen banaketan.

Kontuan hartu beharreko faktoreetako bat adina da, larruazaleko mikrobiota nabarmen alda baitaiteke adinarekin [5,17]. Nerabeek, adibidez, sebo-jariaketa areagotuarekin, *Cutibacterium acnes* gehiago dituzte, eta adineko banakoek, berriz, murrizketak dituzte Firmicutes, Proteobacteria eta Azinetobakterioan [18]. Hala ere, PCOA adinaren arabera aztertzean, banaketa homogenea ikusi zen, eta horrek adierazi zuen adina ez zela faktore erabakigarria (*I.Eranskina*; *1B.Irudia*). Beste faktore garrantzitsu bat sexua da; sexu-desberdintasunek, izerdiaren ekoizpenak eta hormonon gorabeherek ere eragin

baitezakete mikrobiotaren dibertsitatean [17, 18]. Hala ere, laginak sexuaren arabera aztertzean, banaketa homogenea ikusi zen hiru taldeetan (*I.Eranskina*; *1D.Irudia*). Beraz, ebidentzia guztiek adierazten dute laginen banaketa batez ere urtaroei zor zaiela eta, ondorioz, UVRkiko esposizioari, ikerketekin bat datorrena [2, 10, 19].

Azken faktore gisa, lagindutako besoko eremuak aztertu ziren. Izan ere, larruazaleko mikrobiotaren osaeran eta banaketan joera desberdinak hauteman dira larruazaleko leku batetik bestera [12,29]. Hori bat dator besaurre dortsalaren laginetan ikusitako joerarekin (UVR esposizio handiagoa), PCOAn neguko eta udako multzoak batez ere besaurreko laginek osatzen baitzituzten (*1B.Irudia*). Era berean, horiei dagozkien biceps barrualdeko laginak udaberriko laginekin batera taldekatu ziren. Beraz, bicepsaren barrualdea UVR txikiago baten eraginpean dagoenez, mikrobioaren konposizioan eragina txikiagoa du, eta beraz udako biceps barnealdeko laginak udaberrikoen antzekoak dira. Horrek indartu egiten du larruazaleko bakterioek eguzki-erradiazio ultramoreari zuzenean edo zeharka erantzuten diotelaren ideia, eta horrek eragina duela mikrobioak denboran zehar duen konposizio dinamikoan [1, 4].

Udaberriko taldekatze gatazkatsuak (*1.Multzoa*), espero zenaren aurka, neguko lagin batzuk, besaurrekoak zein biceps barrualdekoak ere hartzen ditu. Hala ere, lagin horiek PCOA **kuantitatiboaren** goiko aldera mugituta daude, batez ere besaurrekoaren laginak. Udaberriko eta udako laginek (biceps barrualdekoak), berriz, *1.Multzoaren* zentroa osatzen dute (*1A.Irudia*). Beraz neguko laginak *1.Multzoaren* zentrotik urrun egonik, neguko laginen konposizio proportzioetan aldea dagoela adierazten du, *1.Multzoaren* zentroko laginekin alderatuta. Duela gutxi egindako ikerketen arabera, larruazaleko mikrobiotako espezie proportzioen denbora-aldakortasuna, lagindutako gunearen eta jasotako erradiazio ultramorearen arabera dela diote [10, 16]. Beraz lagindutako eskualdeen eta urtaroen arteko aldeak UVRarekiko esposizioak eragin dezake. Hau horrela izanda, neguko laginetan ikusitako joerak, batez ere besaurrean, *2.Multzorako* trantsizioa islatzen du, besaurrearen neguko laginez osatuta dagoena (*2B.Irudia*).

Halaber, QIIME2rekin EMPeror [32] bidez sortutako PCOAen analisi estatistikoek gure hipotesiak indartzen dituzte. UniFrac ponderatuen distantzietan oinarritutako Pairwise PERMANOVA bidezko analisiak alde estatistikoki esangarriak ($p = 0.0001$) erakutsi zituen larruazaleko mikrobiotaren konposizioan urtaroen artean. Aurkikuntza honek eguzki-erradiazioak mikrobiotaren egituran duen eragin esangarria bermatzen du, urtaro bakoitzean larruazaleko mikrobiotaren beta-aniztasunean ikusitako aldakortasunak berresten duena [25, 39]. Bestalde, UniFrac ez-ponderatuan (kualitatiboa) oinarritutako analisiak ez zuen estatistikoki alde esangarririk erakutsi ($p = 0.065$). Horrek, banako bakoitzaren barruan, urtaroetan zehar mikrobiota espezie berdinez osatuta dagoela iradokitzen du [3, 16].

UniFrac ponderatuan (kuantitatibo) oinarritutako PERMANOVA analisiak alde estatistikoki esangariak erakutsi zituen ($p = 0.018$) larruazaleko mikrobiotaren konposizioan, bizeps barnealdetik (UVR esposizio baxuagoa) eta besaurreko dortsaldetik (UVR esposizio altuagoa), hiru urtarotetan zehar, lortutako laginen artean. Hala ere, kualitatiboki ez zen alde esangaririk ikusi ($p = 0.1200$). Emaiza horiek berresten dute mikrobiotaren osaera ez dela bakarrik kuantitatiboki aldatzen urtaroekin [10, 19], baita eremuaren UVR-esposizioaren mailaren arabera ere [3, 16]. Gainera, bizepsaren barne-eremuaren azterketa espezifikoa ez zuen alde esanguratsurik erakutsi ($p = 0.1503$), beraz mikrobiotaren konposizioaren egonkortasun erlatiboa adierazi zuen, UVR esposizio konstante eta baxuaren ondorioz. Aurkikuntza horrek iradokitzen du bizepsaren laginek antzeko konposizio-ezaugarriak izan ditzaketela ikertutako urtarotetan. Azkenik, banakoen arabeko analisi kuantitatiboak ez zuen estatistikoki alde esangaririk erakutsi ($p = 0.074$). Horrek, urtarotetan zehar, pertsonen larruazaleko mikrobiota antzera aldatzen dela UVRpean iradoki zuen [10]. Bestaldetik, distantzia kualitatiboetan oinarritutako analisiak gizabanakoen arteko desberdintasun esangarriak adierazi zituen ($p = 0.012$), mikrobiotaren konposizioak pertsona bakoitzeko bakarrak direla berresten duena [5].

Laburbilduz, laginen taldekatzearen eragina duten aldagai nagusiak urtaroen eta besoaren eskualdearen ondorio direla proposatzen dugu. Bi faktore horien konbinazioak hiru taldeen artean (uda, negua eta udaberria) ikusitako ezberdintasunak eta udaberriko elkartzearen anomaliak azaltzen ditu. Hori bat dator Willmott et al. -ek 2023an egindako azterketarekin [10]. Azterketa horretan ikusi zen aldaketa esanguratsua egon zela mikrobio-aniztasunetan oporraldien ondorengo 28 egunetan, eta eguzkia hartu zuten parte-hartzaileen larruazaleko mikrobiotaren dibertsitatea murriztu egin zela. Azpimarratzekoa da emaitza horiek ez dutela adierazten UVRk eragindako konposizioak edo espezieak berdinak direnik banako bakoitzean. Honek ANCOM bidez espezie espezifikoa identifikatzeko beharra azpimarratzen du urtaroen eta beso-eremuen aldaketak hobeto ulertzeko.

Espezie (edo genero) zehatzen ugaritasunaren analisi diferentziala.

Azpimarratzekoa da azaleko mikrobiotari buruz egin diren azterlan urrien eta sekuentziazioaren mugen ondorioz, azterketa askok filum edo familia nagusien arteko desberdintasunak identifikatzen dituztela, espeziearen edo generoen arabeko sailkapen taxonomikora iritsi gabe. Ezagutza falta horrek zuzenean zailtzen du larruazaleko mikrobiotaren espezieek eta generoek gure osasunean dituzten mekanismo eta efektu espezifikoa identifikatzea eta eztabaidatzea.

Bizepsaren barrualdeko eta besaurreko eskualdeetako laginak alderatzean, ez zen alde esangaririk aurkitu urtaro bakoitzeko espezie ugaritasunean. Horrek adierazten du

mikrobiotak bizepsean eta besaurrean antzeko konposizioa duela urtaro bakoitzean, ziurrenik larruazalaren berezko faktore biologikoen ondorioz, giro konstantea eskaintzen baitute [16, 12]. Bestalde, hiru urtaroetan zehar besaurreko laginak aztertzean, *Macrocooccus_B* eta *Bacillus_A* generoen eta Burkholderiaceae familiaren ugaritasunean ezberdintasun esangarriak aurkitu ziren. Alde batetik, *Macrocooccus_B* generoak udan markatutako prebalentzia erakusten du, ziurrenik UVR altuari erantzunez [10, 33]. Bestalde, *Bacillus_A* generoak hazkunde nabarmena erakusten du udaberrian, urtaro-aldaketa espezifikotara egokitzea iradokiz, UVRaren gehikuntza barne. Aurkikuntza horiek bat datoz aurreko ikerketetan ikusitakoarekin [10, 22]. Burkholderiaceae familian, aldiz, ugaritasun nabarmen txikia hauteman zen udan eta udaberrian, UVRrekiko esposizio handia ezaugarri zutela; neguan, berriz, UVRa txikiagoa denean, nabarmen handitu zen haren presentzia. Horrek UVRrekiko sentikortasuna adieraz lezake, eta aurreko azterlanetan ikusitako dinamikarekin bat dator. Izan ere, ingurumen-faktoreen ondorioz, hala nola UVR handia, larruazaleko bakterio komentsaleak, hala nola *Burkholderia* spp., askotan *Staphylococcus* eta *Micrococcus* generoengatik ordezkutzen dira. Horiek Staphylococcaceae familietakoak dira, lehen aipatutako *Macrocooccus* generoa barne ere hartzen duena [10, 19].

Bestalde, bizepsaren barrualdea hiru urtaroetan aztertu ondoren, *Macrocooccus_B* generoaren ugaritasunean patroia esangarri bat baino ez da azaldu. Hori bat dator espero zenarekin. Izan ere, eguzkiaren esposizioa txikiagoa denez, besaurrea bezalako eremu agerikoagoekin alderatuta, urtaro-aldaketa gutxiago espero ziren larruazaleko mikrobiotaren konposizioan. Hala ere, azpimarratzekoa da *Macrocooccus_B* generoan ikusitako dinamika besaurreko dortsalean aurkitutakoaren parekoa dela, udan eta udaberrian izandako ugaritasun-maila altuagoak nabarmenduz. Hain zuzen ere, *Macrocooccus_B* generoak ugaritasun handiagoa erakutsi du besaurrean bizepsean baino UVR altuko urtaroetan (udan eta udaberrian). Aldakuntza hori bat dator lehen aipatutako dinamikarekin. Izan ere, Burkholderiaceae familiako bakterio komentsaleak, *Macrocooccus*-aren familia bereko generoek (*Staphylococcus* eta *Micrococcus*) ordezkutzen dituzte maiz [10, 22]. Beraz, aldaketa horrek korrelazio posible bat iradokitzen du *Macrocooccus*-en igoeraren eta Burkholderiaceae gutxitzearen artean, UVR handiko baldintzetan. Emaitza horiek urtaroko dinamikak azpimarratzen dituzte mikrobioen konposizioan, ingurumen-faktoreek eta faktore biologikoen eraginda, eta mikrobiotaren erantzun diferentziala iradokitzen dute, bizeps barrualdearen (UVR esposizio handiagoa) eta besaurrearen dortsalaren (UVR esposizio txikiagoa) artean, UVR esposizioaren aldakuntzaren ondorioz [4, 33].

Burkholderiaceae familiari dagokionez, Gammaproteobacteria klaseko bakterio gram negatiboen askotariko taldea da. Larruazaleko mikrobiotaren testuinguruan, Burkholderiaceae familiako bakterioak ingurumen-faktoreek eragindako komunitate espezifikotetan egon daitezke, eta giza osasunari dagokionez, espezie batzuk *Burkholderia* spp. bezalako

komentsaleak dira; beste batzuk, berriz, gaixotasun gastrointestinalekin eta kardiobaskularrekin, hala nola fibrilazio aurikularra lotutako patogeno oportunistak dira [34]. Behatutako patroiak iradokitzen du UVRk inhibitzaile efektua eragin dezakeela familia horretako espezie batzuetan, eta horrek horien hazkundera muga dezakeela UVR handiko baldintzetan. Beraz, neguak hazteko baldintza hobeak adieraz ditzake, presio selektibo txikiagoa dela eta. Hori bat dator gure emaitzekin eta aurreko azterlanekin, UVR altuetan *Burkholderia* spp., patogeno oportunistengatik ordezkatzen dela ikusi baitute, [33, 34].

Macrococcus generoa ugaztunen eta hegaztien larruazalean ohikoak diren bakterio gram positiboek osatzen dute, eta gero eta gehiago ikertzen ari da larruazalaren ekologian eta gizakien osasunean [22]. Udako eta udaberriko hilabeteetan, UVR esposizio handiko aldietan, ugaritasuna handitzea UVRarekiko erresistentzia bakterianoko mekanismoekin lotuta egon daiteke. Hala nola *Micrococcus* generoko, *Macrococcus*-aren familia berekoa, *Micrococcus luteus*-ek ekoiztutako endonukleasak edota argi ikusgarriaren bidez aktibatutako fotoliasak dituzten liposomak, zeinak kaltetutako DNA konpontzeko balio izateaz gain, UVRk eragindako larruazaleko eritemak murrizten dituzte [5, 10]. Bestalde, *Macrococcus* generoak pigmentu foto-babesleak sortzeko gai diren espezieak ez baditu ere, bere familia bereko *Micrococcus* eta *Staphylococcus* generoek horiek sortzen dituzten espezieak biltzen dituzte, hala nola riboflavina (*Micrococcus luteus*) [10], eta mikosporinaren antzeko aminoazidoak (*Staphylococcus epidermidis*) [21], UVRak sortutako estresa arintzeko [18, 21]. Beraz, posible liteke *Macrococcus* generoko espezieek horietako egokitzapenen bat izatea, eta horrek azal dezake espezie horien ugaritasuna UVR altuko baldintzetan, larruazaleko mikrobiotaren konposizioan eta larruazalaren osasunean eragina izan dezakeelarik.

Bestalde, *Bacillus* generoak bakterio gram positiboak hartzen ditu, esporak osatzeko gaitasunagatik ezagunak, erresistentzia ematen diena muturreko ingurumen-baldintzei. Hala nola UVRri eta beroari [35]. *Bacillus subtilis*, genero honen barruan, uretako lurzoruetan eta inguruneetan egon ohi da, nahiz eta aldi baterako gizakiaren larruazalean ere egon daitekeen, bereziki esku eta besoetan. Konposatu antimikrobianoak eta espora erresistenteak sortzeko duen gaitasunak eragina izan dezake larruazaleko mikrobiotaren konposizioan [7, 36]. Nahiz eta *Bacillus_A* generoa ez den espezifikoki bereizten UVRrekiko erresistentziagatik, ezta pigmentu foto-babesleen sintesiagatik ere, *Bacillus* generoko espezie batzuek egokitzapen horiek dituzte. Adibidez, *Bacillus pumilus*ek eskualenoa ekoitz dezake, UVRk eragindako oxidazio-estresetik babesten diona [37]. Egokitzapen horrek lehia-abantaila ekar liezaieke *Bacillus_A*ko andui batzuei eguzkitan denbora luzez egon ondoren, udan eta udaberrian ugaritasuna handitu egin baita.

5.Ondorioak

1. Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Gizakiekin Ikertzeko Etika Batzordearen (GIEB) aldeko txostena lortu da, M10_2023_300 erreferentzia-zenbakiarekin. Eraitza horrek lehen helburua betetzen du, hau da, azterlana etikoki onartzeko behar diren memoriak eta protokoloak garatzea.
2. Erauzketa-kit eraginkorrena, erauzitako DNA osoari eta DNA bakterianoari dagokienez, HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio) izan zela zehaztu da. Honek, bigarren helburuari erantzuten dio, "swabbing" bidez lortutako larruazal-laginetatik mikrobioen DNA erauzteko kit eraginkorrena identifikatzea baitzen.
3. Espero zen bezala, *Micrococcus* generoetan alde nabarmenak hauteman dira, *Micrococcus* eta *Staphylococcus* generoen familia berekoak baitira. Horrez gain, desberdintasunak hauteman dira Burkholderiaceae familian eta *Bacillus* generoan. Eraitza horiek hirugarren helburua betetzen dute, hau da, eguzki-erradiaziopeko larruazaleko mikrobiotaren konposizioaren dinamika aztertzea uda, negua eta udaberriaren urtarotan zehar. Baita lagindutako besaurre dortsalaren eta bizeps barnealdearen artean ere.

Denbora-mugak eta sekuentziazioko arazoak izan dugun arren, zailtasun horiek etorkizunean ikerketa metagenomikoen bidez gaindi daitezke. Azterketa horiek ikuspegi zehatzagoa eskainiko liokete larruazaleko mikrobiotari, baita UVRrekiko esposizioari buruzko galdera konplexuagoei ere. Hala ere, gure aurkikuntzek UVR, larruazaleko mikrobiota eta larruazal osasunaren arteko harreman konplexua azpimarratzen dute, mikrobiotaren egokitzapen posible bat iradokiz. Funtsezkoa da mikroorganismoen (*Bacillus* eta *Micrococcus* besteak beste) eta UVRren arteko elkarrekintza espezifikoak ikertzea. Izan ere, UVRk giza mikrobiotan duen eragina ulertzeak aukera oparoak eskaintzen ditu larruazalaren osasuna maneiatzeko, eta UVRren ondorio kaltegarrien aurkako babes-estrategiak garatzeko. Hala ere, esparru honetan ikerketa gehiago behar da urtaroen arteko fluktuazio mekanismoak eta horien garrantzi klinikoa ulertzeko.

Bibliografia:

1. Kong, H. H., & Segre, J. A. (2012). Skin microbiome: looking back to move forward. *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 2), 933–939. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.417>
2. Souak, D., Barreau, M., Courtois, A., André, V., Duclairoir Poc, C., Feuilloley, M. G. J., & Gault, M. (2021). Challenging Cosmetic Innovation: The Skin Microbiota and Probiotics Protect the Skin from UV-Induced Damage. *Microorganisms*, 9(5), 936. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050936>
3. Skowron, K., Bauza-Kaszewska, J., Kraszewska, Z., Wiktorczyk-Kapischke, N., Grudlewska-Buda, K., Kwiecińska-Piróg, J., Walecka-Zacharska, E., Radtke, L., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms*, 9(3), 543. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030543>
4. Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A., Green, E. D., Turner, M. L., & Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>
5. Dimitriu, P. A., Iker, B., Malik, K., Leung, H., Mohn, W. W., & Hillebrand, G. G. (2019). New Insights into the Intrinsic and Extrinsic Factors That Shape the Human Skin Microbiome. *mBio*, 10(4), e00839-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00839-19>
6. Nakatsuji, T., Chen, T. H., Butcher, A. M., Trzoss, L. L., Nam, S. J., Shirakawa, K. T., Zhou, W., Oh, J., Otto, M., Fenical, W., & Gallo, R. L. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Science advances*, 4(2), eaao4502. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4502>
7. Torres-Sánchez, A., Pardo-Cacho, J., López-Moreno, A., Ruiz-Moreno, Á., Cerk, K., & Aguilera, M. (2021). Antimicrobial Effects of Potential Probiotics of *Bacillus* spp. Isolated from Human Microbiota: In Vitro and In Silico Methods. *Microorganisms*, 9(8), 1615. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081615>
8. Isler, M. F., Coates, S. J., & Boos, M. D. (2023). Climate change, the cutaneous microbiome and skin disease: implications for a warming world. *International journal of dermatology*, 62(3), 337–345. <https://doi.org/10.1111/ijd.16297>
9. Ferretti, P., Farina, S., Cristofolini, M., Girolomoni, G., Tett, A., & Segata, N. (2017). Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Experimental dermatology*, 26(3), 211–219. <https://doi.org/10.1111/exd.13210>
10. Willmott, T., Campbell, P. M., Griffiths, C. E. M., O'Connor, C., Bell, M., Watson, R. E. B., McBain, A. J., & Langton, A. K. (2023). Behaviour and sun exposure in holidaymakers alters skin microbiota composition and diversity. *Frontiers in aging*, 4, 1217635. <https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1217635>
11. Boxberger, M., Cenizo, V., Cassir, N., & La Scola, B. (2021). Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome*, 9(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01062-5>
12. Flowers, L., & Grice, E. A. (2020). The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. *Cell host & microbe*, 28(2), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017>
13. Patra, V., Wagner, K., Arulampalam, V., & Wolf, P. (2019). Skin Microbiome Modulates the Effect of Ultraviolet Radiation on Cellular Response and Immune Function. *iScience*, 15, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.026>
14. Sánchez-Suárez, J., Coy-Barrera, E., Villamil, L., & Díaz, L. (2020). *Streptomyces*-Derived Metabolites with Potential Photoprotective Properties-A Systematic Literature Review and Meta-Analysis on the Reported Chemodiversity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(14), 3221. <https://doi.org/10.3390/molecules25143221>
15. Schommer, N. N., & Gallo, R. L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in microbiology*, 21(12), 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.001>
16. Cundell A. M. (2018). Microbial Ecology of the Human Skin. *Microbial ecology*, 76(1), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0789-6>

17. Dunn, A. B., Jordan, S., Baker, B. J., & Carlson, N. S. (2017). The Maternal Infant Microbiome: Considerations for Labor and Birth. *MCN. The American journal of maternal child nursing*, 42(6), 318–325. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000373>
18. Li, M., Budding, A. E., van der Lugt-Degen, M., Du-Thumm, L., Vandeven, M., & Fan, A. (2019). The influence of age, gender and race/ethnicity on the composition of the human axillary microbiome. *International journal of cosmetic science*, 41(4), 371–377. <https://doi.org/10.1111/ics.12549>
19. Rai, S., Rai, G., & Kumar, A. (2022). Eco-evolutionary impact of ultraviolet radiation (UVR) exposure on microorganisms, with a special focus on our skin microbiome. *Microbiological research*, 260, 127044. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127044>
20. Wang, Y., Zhu, W., Shu, M., Jiang, Y., Gallo, R. L., Liu, Y. T., & Huang, C. M. (2012). The response of human skin commensal bacteria as a reflection of UV radiation: UV-B decreases porphyrin production. *PloS one*, 7(10), e47798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047798>
21. Kageyama, H., & Waditee-Sirisattha, R. (2019). Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Aging Properties of Mycosporine-Like Amino Acids: Molecular and Cellular Mechanisms in the Protection of Skin-Aging. *Marine drugs*, 17(4), 222. <https://doi.org/10.3390/md17040222>
22. Mazhar, S., Hill, C., & McAuliffe, O. (2018). The Genus *Macrocococcus*: An Insight Into Its Biology, Evolution, and Relationship With *Staphylococcus*. *Advances in applied microbiology*, 105, 1–50. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.002>
23. Prast-Nielsen, S., Tobin, A. M., Adamzik, K., Powles, A., Hugerth, L. W., Sweeney, C., Kirby, B., Engstrand, L., & Fry, L. (2019). Investigation of the skin microbiome: swabs vs. biopsies. *The British journal of dermatology*, 181(3), 572–579. <https://doi.org/10.1111/bjd.17691>
24. Verbanic, S., Kim, C. Y., Deacon, J. M., & Chen, I. A. (2019). Improved single-swab sample preparation for recovering bacterial and phage DNA from human skin and wound microbiomes. *BMC microbiology*, 19(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1586-4>
25. QIIME2: Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
26. Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
27. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
28. Richardson, B. N., Lin, J., Buchwald, Z. S., & Bai, J. (2022). Skin Microbiome and Treatment-Related Skin Toxicities in Patients With Cancer: A Mini-Review. *Frontiers in oncology*, 12, 924849. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.924849>
29. Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
30. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
31. Mandal, S., Van Treuren, W., White, R. A., Eggesbø, M., Knight, R., & Peddada, S. D. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 27663. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>
32. Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A., & Knight, R. (2013). EMPEROR: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>
33. Callewaert, C., Ravard Helffer, K., & Lebaron, P. (2020). Skin Microbiome and its Interplay with the Environment. *American journal of clinical dermatology*, 21(Suppl 1), 4–11. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00551-x>

34. Voronina, O. L., Kunda, M. S., Ryzhova, N. N., Aksenova, E. I., Chuchalin, A. G., Lunin, V. G., & Gintsburg, A. L. (2015). The Variability of the Order Burkholderiales Representatives in the Healthcare Units. *BioMed research international*, 2015, 680210. <https://doi.org/10.1155/2015/680210>
35. Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of Bacillus spp. and plants--with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological research*, 164(5), 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
36. Moskovicz, V., Ben-El, R., Horev, G., & Mizrahi, B. (2021). Skin microbiota dynamics following B. subtilis formulation challenge: an in vivo study in mice. *BMC microbiology*, 21(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02295-y>
37. Jigna, C.; Mira Gordhanbhai, P.; Kurian K., N. Bacterial Melanin with Immense Cosmetic Potential Produced by Marine Bacteria *Bacillus pumilus* MIN3. *Preprints* 2022, 2022050296. <https://doi.org/10.20944/preprints202205.0296.v1>

I.Eranskina: Emaitzetarako Irudi eta Taula Osagarriak

Aurkibidea

1.Protokolo Metagenomikoen Optimizazioaren Emaitzak.....	3
1.Taula: DNA kantitatearen batez bestekoa.....	3
2.Taula: ANOVA.....	4
3.Taula: Student-en t proba.....	4
2.Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamikaren Azterketaren Emaitzak.....	5
2.1.Beta-Dibertsitatearen analisisa.....	5
4.Taula: PERMANOVA.....	6
5. taula: pairwise PERMANOVA.....	6
2.2.Alfa-Dibertsitate Analisiak.....	6
2.Irudia: Alfa-dibertsitatearen Boxplot.....	7
2.3.Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.....	8
3.Irudia: Volcano Plots.....	8

1. Protokolo Metagenomikoen Optimizazioaren Emaitzak.

1.Taula: QIAamp® DNA Microbiome Kit (Mikrobiome Kit), HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio) eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (MagMax) erauzketa-kitek ateratako guztizko DNA kantitatearen eta bakterio-kantitatearen batez bestekoaren emaitzak. Ezkerretara aurkeztutako balioak 200µl laginean ateratako ADN_{Totala} (Subjektuarena + bakterianoa) batez bestekoa dira, fluorometria bidezko kuantifikakoa, eta eskuinetara lagin bereko $ADN_{Bakteriano}$ absolutua, RT-PCR bidez kuantifikatua.

Partehartzailea	Guztizko DNA Erlatiboa "Elution Tube" 200µl-tan (ng DNA)			16S DNA Absolutoa "Elution Tube" 200µl-tan (ng DNA)		
	MagMax	MagBio	Mikrobiome Kit	MagMax	MagBio	Mikrobiome Kit
NI (27/10)	6,55000	6,05000	1,67000	0,67201	3,05608	0,33382
NI (10/11)	3,45000	6,80000	1,27500	0,43750	0,00013	0,64530
NI (27/11)	1,72000	6,10000	3,24500	0,01007	4,07671	0,95773
SA (03/10)	6,50000	15,42500	5,09250	1,49628	0,74149	0,70193
SA (27/10)	1,44000	3,48000	3,68500	4,83412	7,12163	1,15284
SA (10/11)	0,00000	2,66000	1,65500	0,88069	1,15336	0,91909
SA (27/11)	2,41000	8,95000	1,25500	0,04670	1,78399	1,72942
JM (03/10)	2,40000	9,40000	1,82750	0,96747	1,60501	1,42603
JM (10/11)	4,03000	8,40000	3,69000	0,35030	0,65799	0,96567
JM (28/11)	2,41000	8,95000	1,25500	0,02340	0,01038	2,23575
AM (20/10)	5,90000	8,60000	3,57750	0,04203	0,51089	0,01904
AM (02/11)	4,20000	1,54000	2,11000	0,99579	1,35106	0,60264
AM (18/11)	1,66000	11,10000	3,38000	0,53497	1,61644	0,05533
LA (20/10)	9,70000	7,10000	0,77000	0,24307	0,46934	0,22136
LA (16/11)	2,56000	12,20000	3,75000	0,49455	0,87911	0,25502
MM (13/11)	2,91000	1,75000	4,20000	0,83199	0,85555	0,55953
MM (27/11)	1,03000	16,90000	0,90000	0,09521	0,39598	0,99409
JS (30/10)	5,95000	21,40000	7,82500	0,61505	0,07276	0,36944
JS (13/11)	2,37000	1,90000	0,99250	0,46976	0,64129	0,81282
JS (27/11)	4,65000	16,90000	0,90000	0,29873	0,16014	2,12578
Partehartzaileen Batezbesteko ng DNA Erlatiboa/Absolutoa "Elution Tube" 200µl-tan						
NI	3,9067	6,0750	2,0633	0,22378	3,56640	0,64562
SA	2,5875	7,6288	2,1983	1,81445	4,45281	1,26712
JM	2,9467	8,9167	2,4725	0,44706	0,01038	1,54248
AM	3,9200	7,0800	2,7450	0,52426	1,15946	0,22567
LA	6,1300	9,6500	2,2600	0,36881	0,67422	0,23819
MM	2,8900	6,6967	2,1367	0,46360	0,39598	0,77681
JS	4,3233	13,4000	0,9463	0,46118	0,11645	1,10268
Batezbestekoa	6,591287879	7,886098485	2,077135417	0,745332421	1,483075271	0,820214976

2.Taula: QIAamp® DNA Microbiome Kit (Mikrobiome Kit), HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio) eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (MagMax) erauzketa-kitek erazitako DNA totalaren eta bakterio-kopuruaren batez bestekoa alderatzeko bariantzaren analisiaren emaitzak (ANOVA). Hauek dira aurkeztutako balioak: karratuen batura (SS) eta karratuen batez bestekoa (MS), askatasun-graduak (df), F estatistikoa eta p-balioa. Estatistikoki adierazgarritzat jo ziren $p < 0.05$ balioa duten aldeak.

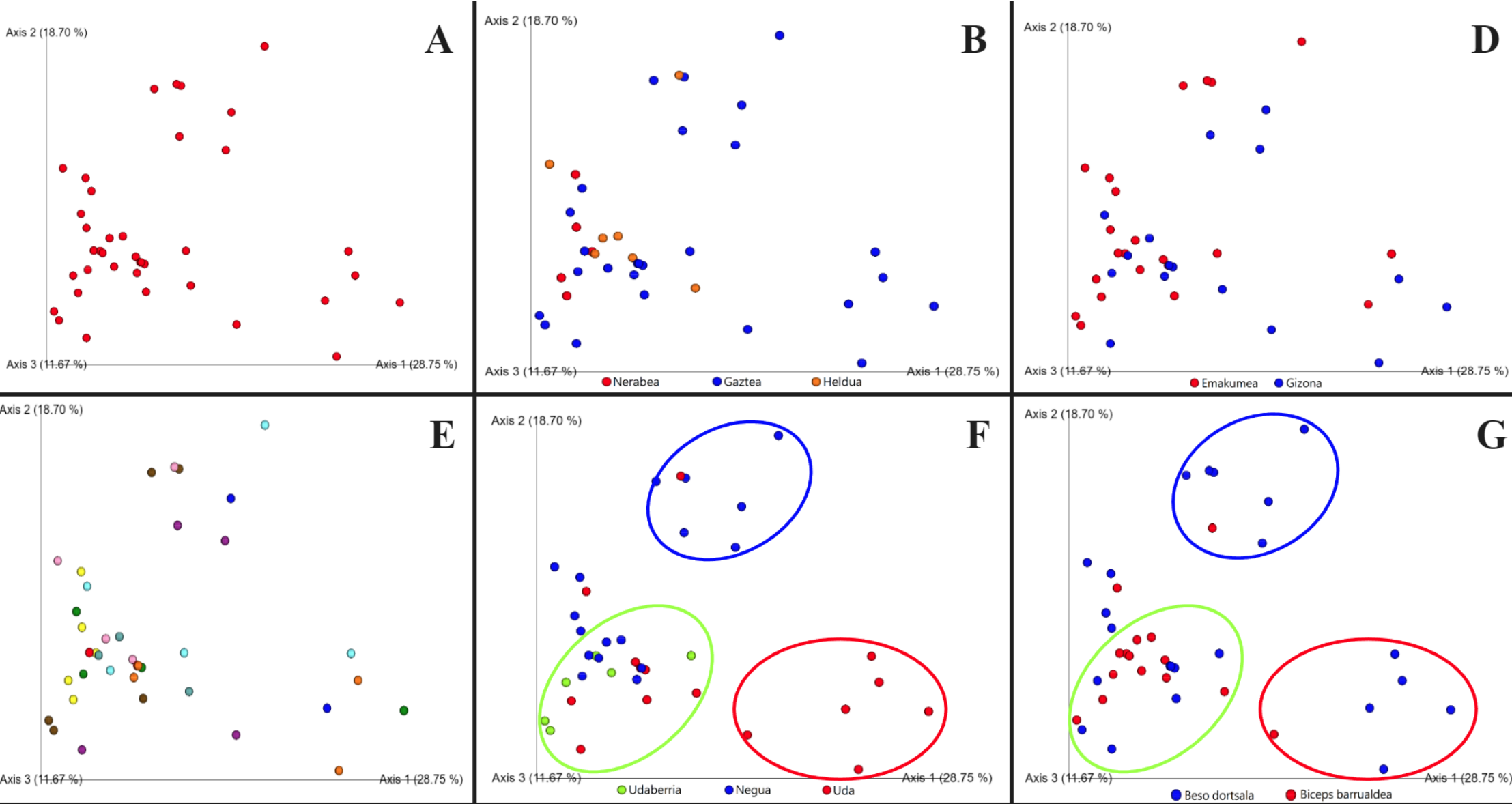
<i>ANOVA Testa</i>						
Kuantifikazio Teknika	Aldakuntza iturria	Karratuen Batura (SS)	Askatasun Graduak (df)	Batez besteko Karratuak (MS)	F	p-balioa
Fluorometria (Qubit 4)	Taldeen artekoa (SSartean)	1,171202298	2	0,585601	10,7962	0,000123
	Talde barnekoa (SSbarnean)	2,766300311	51	0,054241		
	Totala	3,937502609	53			
Real Time PCR (StepOne Plus)	Taldeen artekoa (SSartean)	0,403834119	2	0,20191706	1,2285545	0,30469519
	Talde barnekoa (SSbarnean)	5,916720774	36	0,164353355		
	Totala	6,320554893	38			

3.Taula: Student-en t proben emaitzak, DNA osoaren eta bakterianoaren konparazioetarako, erauzketa-kiten artean: QIAamp® DNA Microbiome Kit (Mikrobiome Kit), HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit (MagBio) eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (MagMax). Aurkeztutako balioak t estatistikaren balioak, askatasun mailak (df), t estatistikaren balio kritikoa eta p balorazioa dira. Estatistikoki adierazgarritzat jo ziren $p < 0.05$ balioa duten aldeak.

<i>T-student Testa</i>					
Kuantifikazio Metodoa	Konparaketa	Kalkulatutako t balioa	Askatsun Graduak (df)	t-rako Balio Kritikoa	p-balioa (buztan bikoitza)
Real Time PCR	MagMax vs MagBio	-1,217240644	13	2,160368656	0,245148291
	Mikrobiome Kit vs MagBio	1,058336409	13	2,160368656	0,309171807
	MagMax vs Mikrobiome Kit	-1,062220522	19	2,093024054	0,301451176
Fluorometria (Qubit 4)	MagMax vs MagBio	-2,328030217	25	2,059538553	0,02829702
	Mikrobiome Kit vs MagBio	3,94742274	16	2,119905299	0,00115272
	MagMax vs Mikrobiome Kit	1,263040919	16	1,263040919	0,02246710

2.Larruazaleko Mikrobiotaren Dinamikaren Azterketaren Emaitzak.

2.1.Beta-Dibertsitatearen analisia.



1.Irudia: Beta-Dibertsitate Koordinatu Nagusien Analsiaren (PCOA) emaitzak, UniFrac distantzia haztatuak erabiliz, laginek 1.Ardatz (azaldutako bariantzaren % 28.75) eta 2.Ardatzaren (azaldutako bariantzaren % 18.70) arabera duten banaketa erakutsiz. (A) Kontuan hartutako aldagaiek koloreztatu gabeko jatorrizko PCOA. (B) PCOaren banaketa adinaren arabera (Nerabeak: kolore gorria, Gazteak: kolore urdina eta Helduak: kolore laranja). (D) PCOaren banaketa sexuaren arabera (Emakumea: kolore gorria, Gizona: kolore urdina). (E) PCOaren banaketa subjektuaren arabera (Kolore bat x Subjektua). (F) PCOaren banaketa urtaroaren arabera (uda: kolore gorria, negua: kolore urdina eta udaberria: kolore berdea). (G) Banaketa PCOan lagindutako eskualdearen arabera (besaurre dorsala: kolore urdina, bicepsaren barrualdea: kolore gorria).

4.Taula: Aldagai anitzeko bariantza permutazionalaren analisiaren emaitzak (PERMANOVA), UniFrac distantzia haztatuak erabiliz, estazioak, eskualdeak eta lagindutako banakoak mikroorganismo-konposizioan duten eragina ebaluatzeko. Estatistikoki adierazgarritzat jo ziren $p < 0.05$ balioa duten aldeak.

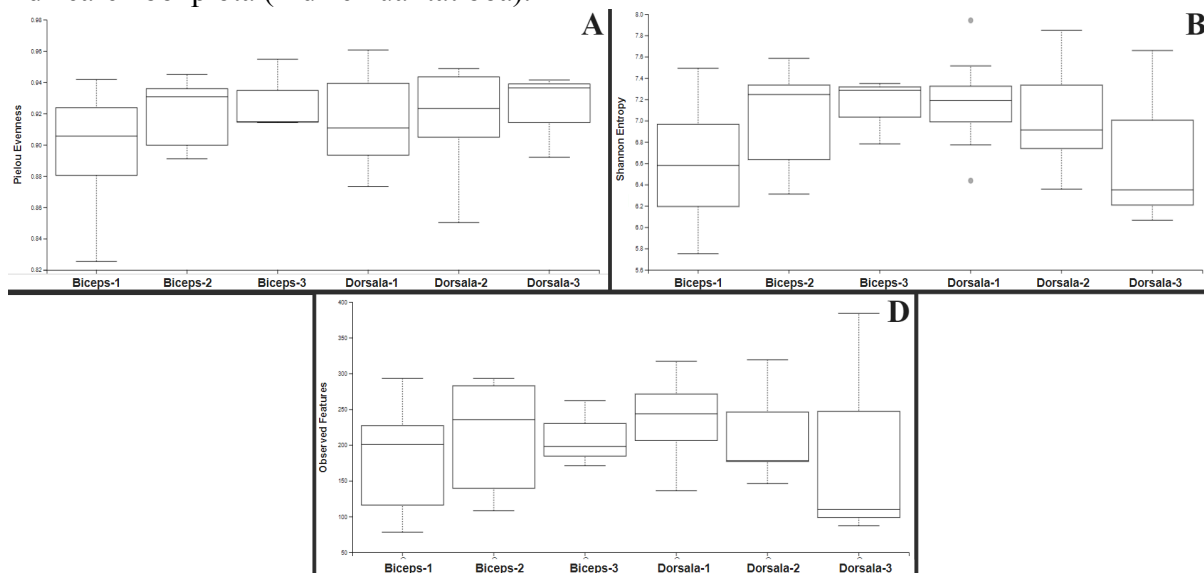
Anlisi Mota	PERMANOVA Test						
	Metodoaren Izena	Lagin Taimaina	Talde Kopurua	Test Estadistiko Izena	Test Estadistikoa	p-balioa	Permutazio Kopurua
Unifrac-Ponderatua (Kuantitatiboa)	PERMANOVA-URTARO-Significance	38	3	pseudo-F	3,389173	0,001	999
	PERMANOVA-ZONALDE-Significance	38	6	pseudo-F	1,643438	0,018	999
	PERMANOVA-INDIBIDUO-Significance	38	10	pseudo-F	1,321699	0,074	999
Unifrac-Ponderatu Gabea (Kualitatiboa)	PERMANOVA-URTARO-Significance	38	3	pseudo-F	1,176687	0,065	999
	PERMANOVA-ZONALDE-Significance	38	6	pseudo-F	1,092506	0,12	999
	PERMANOVA-INDIBIDUO-Significance	38	10	pseudo-F	1,151356	0,012	999

5. taula: Aldagai anitzeko bariantza permutazionalaren analisiaren emaitzak binaka (pairwise PERMANOVA)), UniFrac distantzia haztatuak erabiliz, urteko urtaroen eta lagindutako bikepsaren barruko aldearen arteko mikrobio-konposizioaren desberdintasunak ebaluatzeko. Estatistikoki adierazgarritzat jo ziren $p < 0.05$ balioa duten aldeak.

Distantzia Mota	Pairwise-PERMANOVA-ZONALDE-Significance						
	Taldea Kopurua		Lagin Tamaina	Permutazioak	pseudo-F	p-balioa	q-balioa
	Taldea 1	Taldea 2					
Unifrac-Ponderatua (Kuantitatiboa)	Biceps-Uda	Biceps-Negua	15	999	1,203554	0,288	0,374
	Biceps-Uda	Biceps-Udaberria	10	999	1,536868	0,162	0,304
	Biceps-Negua	Biceps-Udaberria	11	999	1,152330	0,266	0,374
Pairwise PERMANOVA (All groups)							
Unifrac-Ponderatua (Kuantitatiboa)	3		36	999	1,297584	0,239	0,374

2.2.Alfa-Dibertsitate Analisiak

2.Irudia: Laginen Alfa-dibertsitatearen boxplot bateratuen emaitzak, lagindutako eskualdearen eta estazioaren arabera. (A) Pielouren ekitatibotasun-indizearen boxplota (indize kuantitatiboa). (B) Shannon indizearen boxplota (Indize Kuantitatiboa). (D) Behatutako OTU indizearen boxplota (Indize kualitatiboa).

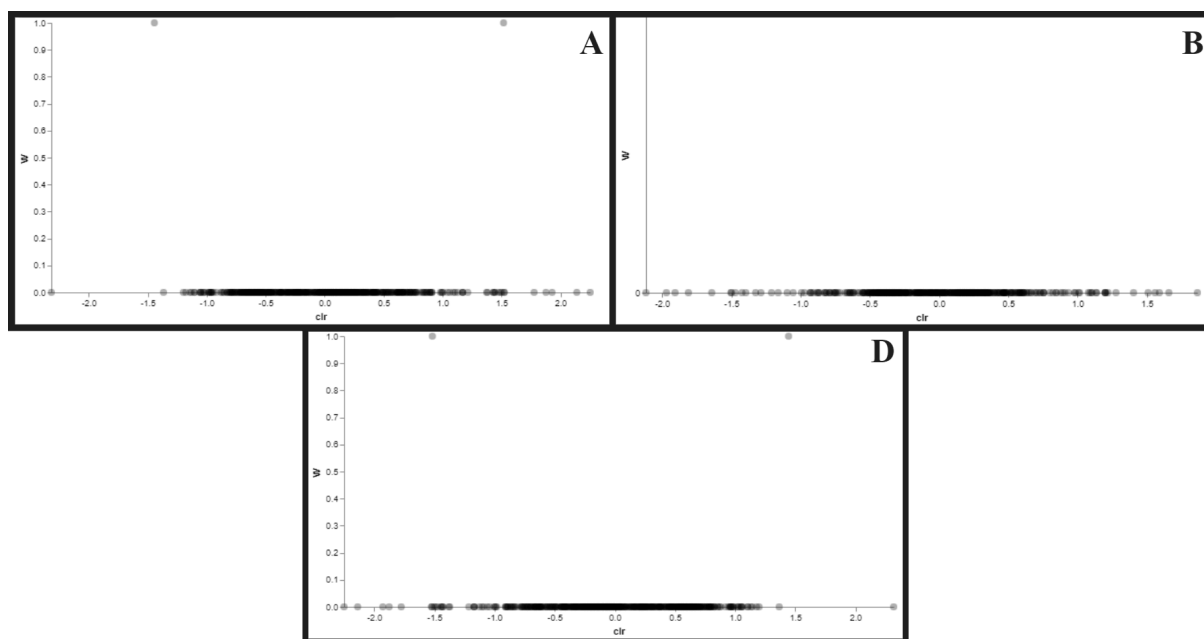


6.Taula: Kruskal-Wallisen testaren emaitzak alfa aniztasunean dauden desberdintasunak ebaluatzeko (Indizeak: Pielou, Shannon, eta Observed OTUs) lagindutako eskualdearen eta estazioaren arabera. H estatistikoaren balioak eta metrika bakoitzari dagozkion p balioak aurkezten dira. Estatistikoki adierazgarritzat jo ziren $p < 0.05$ balioa duten aldeak.

Kruskal-Wallis Test (pairwise)					
Distantzia Mota	Talde Kopurua		H Estadistikoa	p-balioa	q-balioa
	Taldea 1	Taldea 2			
Shannon (H) (Kuantitatiboa)	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Negua (n=8)	2,263393	0.132464	0.573775
	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Udaberria (n=3)	2,194805	0.138477	0.573775
	Biceps-Negua (n=8)	Biceps-Udaberria (n=3)	0,041667	0.838256	0.981813
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Negua (n=9)	0,592593	0.441418	0.900486
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	1,041667	0.307434	0.772943
	Dorsala-Negua (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	1,034188	0.309177	0.772943
Pielou Evenness (Kuantitatiboa)	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Negua (n=8)	0,857143	0.354539	0.838256
	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Udaberria (n=3)	1,051948	0.305059	0.838256
	Biceps-Negua (n=8)	Biceps-Udaberria (n=3)	0,166667	0.683091	0.838256
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Negua (n=9)	0,333333	0.563703	0.838256
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	0,041667	0.838256	0.838256
	Dorsala-Negua (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	0,076923	0.781511	0.838256
Observed OTUs (Kualitatiboa)	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Negua (n=8)	0,969365	0.324839	0.898132
	Biceps-Uda (n=7)	Biceps-Udaberria (n=3)	0,116883	0.732440	0.898132
	Biceps-Negua (n=8)	Biceps-Udaberria (n=3)	0,041667	0.838256	0.898132
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Negua (n=9)	0,753695	0.385309	0.898132
	Dorsala-Uda (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	0,666667	0.414216	0.898132
	Dorsala-Negua (n=8)	Dorsala-Udaberria (n=3)	0,694737	0.404558	0.898132
Kruskal-Wallis Test (all groups)					
Shannon (H) (Kuantitatiboa)	6		4,9505815	0,4219410	
Pielou Evenness (Kuantitatiboa)	6		2,4860067	0,7786010	
Observed OTUs (Kualitatiboa)	6		2,6539928	0,7531455	

2.3. Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.

3. Irudia: Volkano Plotaren emaitzak, bicepsaren eta besaurrearen arteko azaleko mikrobiomaren laginak konparatuz, estazio bakoitzean. X ardatzak ugaritasunaren batezbesteko logaritmikoan (log-ratio) dagoen aldea adierazten du, eta Y ardatzak (W) garrantzi estatistikoaren balioa erakusten du (-log₁₀ bilakatutako p balioa). (A) Ugaritasunaren diferentziala larruazaleko mikrobiomaren laginetan bicepsaren eta udan. (B) Ugaritasun-diferentziala neguan. (C) Ugaritasun-diferentziala udaberrian.



8. Taula: ANCOMen bidezko ugaritasun-analisi diferentzialaren bidez lortutako mikrobio-ugaritasuneko inflanteak. Taulan, biceps eta besaurrearen larruazal-laginetan prebalentzia handiena duten mikrobio-generoen ugaritasun erlatiboa erakusten da (% 0, % 25, % 50, % 75 eta % 100), hiru urtaroetan aztertuak. Ilara bakoitzak ugaritasun diferentzialerako erabilitako analisisia irudikatzen du, eta zutabeek genero bakoitzerako zehaztutako pertzentiletako ugaritasun-balioak adierazten dituzte. Taula horri esker, genero bakoitzaren ugaritasun-mailak identifika daitezke, eta haien banaketaren ikuspegi orokorra ematen da, urtaro- eta anatomia-baldintza desberdinetan.

		EZAUGARRIEN PERTZENTILE UGARITASUNA TALDEKA						
Ezaugarri Diferentziala	Analisirako Ikuspegi Mota	Metodoaren Izena	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	W Estadistikoa
d_Bacteria; p_Firmicutes_D; c_Bacilli; o_Staphylococcales; f_Staphylococcaceae; g_Macrocooccus_B	DORSAL laginak (Urtaroen zehar)	Dorsala (Uda)	61.0	134.75	174.0	643.0	3684.0	103
		Dorsala (Negua)	1.0	1.0	38.0	63.0	186.0	
		Dorsala (Udaberria)	1.0	1.0	1.0	22.5	44.0	
	BICEPS laginak (Urtaroen zehar)	Biceps barnealdea (Uda)	74.0	92.0	148.0	319.0	3676.0	485
		Biceps barnealdea (Negua)	0.0	28.0	44.0	72.25	142.0	
		Biceps barnealdea (Udaberria)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	BICEPS + DORSAL (Urtaroen zehar)	Biceps barnealdea (Uda)	74.1	92.1	148.1	319.1	3676.1	486
		Biceps barnealdea (Negua)	0.1	28.1	44.1	72.26	142.1	
		Biceps barnealdea (Udaberria)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		Dorsala (Uda)	61.1	134.76	174.1	643.1	3684.1	
		Dorsala (Negua)	1.0	1.0	38.1	63.1	186.1	
		Dorsala (Udaberria)	1.0	1.0	1.0	22.6	44.1	
d_Bacteria; p_Firmicutes_D; c_Bacilli; o_Bacillales_B_310392; f_Bacillaceae_G_310392; g_Bacillus_A	DORSAL laginak (Urtaroen zehar)	Dorsala (Uda)	1.0	1.0	1.0	3.5	11.0	56
		Dorsala (Negua)	1.0	1.0	1.0	1.00	17.0	
		Dorsala (Udaberria)	22.0	26.5	31.0	35.0	39.0	
d_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Burkholderiales_592524; f_Burkholderiaceae_A_580492	DORSAL laginak (Urtaroen zehar)	Dorsala (Uda)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	263
		Dorsala (Negua)	1.0	7.0	14.0	26.0	33.0	
		Dorsala (Udaberria)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

II.Eranskina: Metodologiaren Zehaztasun Osagarriak

Aurkibidea:

2.Metodologia:	2
2.1.Larruazaleko mikrobiotaren protokolo metagenomikoen optimizazioa	2
2.1.1.Lagin Bilketa.....	2
2.1.2.DNA erazteko prozedura.....	3
2.1.3.DNA Kuantifikazio Teknikak.....	4
2.1.4.Analisi estatistikoa.....	4
2.2.Larruazaleko Mikrobiotak UVRpean duen Dinamikaren Azterketa	5
2.2.1.Lagin Bilketa.....	5
2.2.2.Sekuentziazioa eta Analisi Bioinformatikoa.....	5
2.2.3.Dibertsitatearen azterketa estatistikoa.....	8
2.2.3.1.Diversidad alfa.....	8
2.2.3.2.Beta-Dibertsitatea.....	9
2.2.3.3.Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.....	9

2. Metodologia:

Ikerketa funtsezko bi fasetan egituratu zen: lehenik, larruazaleko mikrobiometatik DNA erauzteko protokolo metagenomikoak optimizatzeraz bideratu zen, biomasa mikrobiano baxuak eta giza DNAREN kutsadura altuak eragindako erronka teknikoen ondorioz. Bigarren fasean, larruazaleko mikrobiotaren dinamika aztertu zen UVRpean. Belaunaldi berriko sekuentziak (NGS) eta QIIME2 bezalako plataformak bioinformatikoak erabiliz, datuak aztertu ziren dibertsitate metrika mikrobianoak eta taxonomikoak kalkulatzeko. Azterlanak Euskal Herriko Unibertsitateko batzorde etikoen oniritzia lortu zuen (CEISH eta CEID), M10_2023_300 erreferentzia-zenbakiarekin, eta parte-hartzaile guztien adostasun informatua bermatu zen, Helsinkiko Adierazpenaren printzipio etikoen eta datuak babesteko Europako araudien arabera (EU2016/679).

2.1. Larruazaleko mikrobiotaren protokolo metagenomikoen optimizazioa

2.1.1. Lagin Bilketa.

Protokolo metagenomikoak optimizatzeko, Euskal Autonomia Erkidegoko (Espainia) 7 parte-hartzaileren eskuineko besaurreko larruazaleko mikrobiotaren laginak hartu ziren. Gizabanako bakoitzak 3 lagin bereizi eman zituen (15 egunean behin), dibertsitate mikrobiano normala berreskuratu ahal izateko, eta horrek estatistikoki korrelazio esanguratsukoak ziurtatu zituen. Beraz, 21 lagin bildu ziren guztira (3 pertsona bakoitzeko), 15 eguneko tartearekin hartualdi bakoitzaren artean, erabakigarria larruazaleko mikrobiota behar bezala berreskuratzeko eta, beraz, emaitzen fidagarritasunerako. Ikerketarako aurrekontu- eta denbora-mugak kontuan hartuta, lagin-kopurua maximizatzea erabaki zen, erauzketa-teknika eta -kit egokienak gutxi gorabehera zenbatesteko. 7 parte-hartzaile hautatu ziren estatistikoki esanguratsua den azterketa bat ziurtatzeko, 20-60 urteko emakumeak eta gizonak barne. Zehazki, 4 emakume eta 3 gizonen laginak hartu ziren. Nahiago izan zen berez jaiotako parte-hartzaileak hautatzea, ez zesarea, hiri-inguruneetan bizi ez direnak eta maskotarik ez dutenak. Kortikoide topikoak, ahotiko antibiotikoak edo topikoak bildu baino astebete lehenago hartu ez dituztenei eta hilabete lehenago immunodepresore-medikaziorik hartu ez dutenei lagundu zitzaizkien. Gainera, kanpoan utzi ziren larruazaleko gaixotasunak zituztenak. Faktore horiek guztiak kontuan hartu ziren larruazaleko mikrobiotan eragin zuzena izan zezaketelako.

"Swabbing" teknika erabili zen besaurreko larruazaleko mikrobiotaren laginketa egiteko; izan ere, teknika hori ez da inbaditzailea, eta, aurreko ikerketen arabera, ez du alde nabarmenik erakusten larruazaleko mikrobiotaren kantitatean, biopsia eta zinta-tira

teknikekin alderatuta [241]. Beste ikerketa batzuetan, metodo ez-inbaditzaile hori mikrobiota biltzeko eraginkortasunean konparagarria dela frogatu da, prozesuan lesioak izateko arriskua minimizatuz [250, 251]. "Swabbing" delakoa hobetsi zen, bere sinpletasunagatik eta konplexutasun txikiagoagatik, "Tape-Stripping" prozesamenduarekin alderatuta, soluzio esteriletan bakterioak aplikatzea eta disolbatzea baitakar. Gainera, isipuak merkeagoak dira eta merkatuan erraz eskura daitezke, "Tape-Stripping" en erabiltzen diren zerrenda itsasgarriekin alderatuta [250, 252]. Laginketa Z forman egin zen larruazalean isipua esterilekin (**OMNI Gen SKIN® Qiagen**), 5x20 cm²-ko eremuan, bi minutuz, mikrobiotaren harrapaketa maximizatzen. Isipuak pH7.2 "Wetting solution" erako tanpoi-disoluzio antzu batean busti ziren azalaren kontra igurtzi aurretik. Ondoren, isipuak prozesatu ziren QIA gen Omni Gene SKIN® kitaren protokolo estandarren arabera, 800 µl-ko "Elution Tube" bilduma esterileko hodietan jarriz eta gomendatutako baldintzetan biltegituz, 4 °C-tan DNA ateratu arte. DNA erauzteko, hiru kit komertzialen eraginkortasuna ebaluatu zen: QIAamp® DNA Microbiome Kit, HighPrep™ Viral/Pathogen DNA Kit eta MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit.

2.1.2. DNA erauzteko prozedura.

DNAREN erauzketa eraginkorra funtsezkoa da protokolo metagenomikoak optimizatzen, bereziki bakterio-proporzio txikiko larruazaleko mikrobiotaren laginetan. DNAREN kalitateak eta kantitateak zehazten dute mikroorganismoak identifikatzeko eta kuantifikatzeko zehaztasuna, eta komunitatearen irudikapen fidela ziurtatzen dute. DNA mikroorganismoaren erauzketa eraginkorra funtsezkoa da larruazaleko mikrobiotaren datu fidagarriak lortzeko, ikerketaren kalitatean eta baliozkotasunean zuzenean eraginez. Aldez aurreko azterketetan frogatu da erauzitako DNA mikroorganismoaren kantitatea eta purutasuna aldatu egiten direla erabilitako erauzketa-kitaren arabera, ostalariaren DNAk ($DNA_{Totala}/DNA_{Bakterianoa}$) eraginda. Azpimarratzekoa da gure laginetan larruazaleko mikrobiota eta ostalariaren zelula epitelialak daudela. Sekuentziaziorako 16S genean fokotuta, mikroorganismoen DNA maximizatzea eta giza DNA minimizatzea bilatzen dugu. Giza DNA metagenomika shotgun moduan mugatzailea ez den arren, giza DNAk gutxiago murrizten du zarata sekuentziazioan zehar, amplifikazioaren eta sekuentziazioaren eraginkortasuna hobetuz. Beraz, kuantitatiboki mikroorganismoen DNA maximizatu nahi dugu eta kualitatiboki $DNA_{Totala}/DNA_{Bakterianoa}$ ratio baxua lortu. Hiru kit komertzial erabili ziren mikroorganismoen DNA erauzteko: **QIAamp® DNA Microbiome Kit, HighPrep™ viral/Pathogen DNA Kit** eta **MagMAX™ viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit**. "Elution Tube" lagin bakoitza homogeneizatu egin zen eta 200 µl-ko bolumena aplikatu zen, kiten protokoloen gomendioaren arabera. Mikroorganismoen DNA kit bakoitzaren protokolo

estandarizatu egi jarraituz isolatu zen. Laginen metodologia eta prozesamendua aldatu egin ziren erabilitako kitaren arabera, eta horri esker jakin ahal izan genuen zein metodo izan zen eraginkorra mikroorganismoen DNA erauzteko.

Ikerketa honetan ebaluatutako kit komertzialek urrats sekuentzial komunak partekatzen dituzte, lisi zelularra barne metodo entzimatico, mekaniko eta termikoen bidez, ondoren DNA prezipitazioa eta purifikazioa matrize solidoak erabiliz, hala nola silika edo partikula magnetikoak, eta DNAREN eluzioa ondorengo analisisetarako egokia den buffer batean. Antzekotasun horiek gorabehera, lisi- eta harrapaketa-metodoetan desberdinak dira, eta hainbat ingurune eta prozesamendu-sistemataraz egokitzen dira, baldintza esperimentalen arabera abantaila espezifikoak eskaintzeko. Adibidez, **QIAamp® DNA Microbiome Kit**-ek lisozima eta K proteinasa erabiltzen ditu, silikazko zutabeak, eta gatz-eduki txikiko buffer batekin saihesten du, mikrobiana berreskuratzea optimizatzeke eta giza DNAREN kutsadura minimizatzeke. **HighPrep™ viral/Pathogen DNA Kit**-ek agente kaotropikoak eta tratamendu termikoa erabiltzen ditu, partikula magnetikoekin harrapatuz karga biral baxuko laginetan, oso egokia hainbat analisisetarako. **MagMAX™ viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit**-ek detergenteak eta partikula magnetikoak erabiltzen ditu patogenoen lisi eraginkorra egiteke, aplikazio kliniko eta ikertzailetarako eluzio egokiarekin. Erauzi ondoren, DNA -80°C-tan biltegitatu zen, eta mikroorganismoen DNAREN analisi osorako kuantifikatu zen.

2.1.3. DNA Kuantifikazio Teknikak.

DNA mikrobioa erauzteke kit komertzialen eraginkortasuna ebaluatzeke orduan, funtsezkoa da giza DNA zelularra eta mikrobiotikoa bereiztea. Horretarako, zehatz-mehatz kontrastatzen dugu laginetan dagoen genoma mikrobiotikoaren kantitate zehatza, bi kuantifikazio-metodo osagarriren bidez: guztizko DNAREN kuantifikazio erlatiboa (mikrobioa + ostalaria) fluorometria bidez, **Qubit 4 Fluorometer®** sistemako dsDNA High Sensitivity erabiliz, eta DNA mikrobiotiko espezifikoaren kuantifikazio absolutua qPCR bidez, **DNA Quantification Kit® Femto Bacterial kitarekin**. Teknika horiei esker, DNAREN eta DNA mikrobiotikoaren guztizko kontzentrazioaren neurketa zehatzak egin ziren, hurrenez hurren. DNA mikrobiarraren kuantifikazio espezifikoari dagokionez, qPCR erabiltzen dugu DNA Quantification Kit® Femto Bacterial kitarekin, bakterioen 16S gen erribosomal eskusiboa anplifikatzeko optimizatua. PCR teknika honek, denbora errealean, DNA bakterianoa espezifikoki anplifikatzea eta kuantifikatzea ahalbidetzen du, gizakitik eta beste kutsatzaile batzuetatik bereiziz. Erreakzio plakak diseinatzeke, **Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System 48-Well 4376374** termozikladorea eta **Step One v2.3** softwarea

erabiliko ditugu. PCR zikloak 40 ziklo izan zituen, hasierako desnaturalizazioarekin hasi zen 95 ° C-an 10 minutuz, ondoren banakako desnaturalizazio-zikloak zeuden 95 ° C-an 30 segundoz, 50 ° C-an lerrotatuta 30 segundoz eta 72 ° C-ra luzatuta minutu batez. Amaitzeko, 72 ° C-ra hedatu zen 7 minutuz, eta tenperatura 20 ° C-ra jaitsi zen 30 segundoz, laginak egonkortzeko.

Ondoren, Qubit eta qPCR emaitzak alderatuko ditugu, mikrobioen DNA erauzteko kit eraginkorrena zehazteko. Ikuspegi zehatz horrek gure protokoloak optimizatu zituen kalitate handiko DNA mikrobianoa lortzeko, erabakigarria baita eguzki-erradiazioak larruazaleko mikrobioman iraganean izan zuen eraginari buruzko gure ikerketarako.

2.1.4. Analisi estatistikoa.

Erauzitako DNAREN kuantifikazio erlatiboaren eta absolutuaren datuak ebaluatzeko, **Microsoft Excel v1808** erabili zen, **Xreal Stats v8.9.1** osagarriarekin. Hiru proba estatistiko egin ziren: lehenik, kit bakoitzerako pertsonako batez besteko DNAREN batez bestekoak kalkulatu ziren, protokolo metagenomikoen optimizazioan hiru hartualdiak kontuan hartuta. Hasierako analisi horri esker, metodo bakoitzarekin lortutako DNA kantitatearen neurri zentrala lortu ahal izan zen, errendimenduaren ikuspegi orokorra eskainiz. Gero, **Shapiro-Wilk**-en proba aplikatu zen datuen banaketaren normaltasuna egiaztatzeko, erabakigarria analisi estatistiko parametrikotarako eta emaitzen interpretazio zehatzerako. Datuek normaltasuna betetzen ez bazuten, **Box-Cox** teknikaren bidez normalizatu ziren. Ondoren, **ANOVA** (Bariantzaren Analisia) bat aplikatu zen kiten artean DNA erauzteko batez bestekoak alderatzeko, taldeen arteko aldakortasuna ebaluatuz eta ateratako DNA kantitateari dagokionez alde esanguratsuak detektatuz. Azkenik, zein batezbesteko ziren elkarren artean nabarmen desberdinak zehazteko, **Student-en t proba parekatua** erabili zen, kola bikoitzekoa, eta DNAREN erauzketan zein kit izan ziren eraginkorrenak identifikatu zen.

2.2. Larruazaleko Mikrobiotak UVRpean duen Dinamikaren Azterketa.

2.2.1. Lagin Bilketa.

Ikerketaren bigarren fasea eguzki-erradiazio desberdinetako mikrobiomaren dinamikan zentratu zen. Bi konparazio nagusi egin ziren: lehenik, parte hartzaile bakoitzaren beso bereko bi eremutako laginak hartu ziren: bat UVR erradiazio altuaren eraginpean (besaurreko dortsala) eta bestea behekoan (bizepsaren barruko zatia), mikrobiomaren aniztasuna aztertzeko. Bigarrenik, UVRaren eragina hiru urtarotan ebaluatu zen, bakoitzean laginak hartuz: udaren ostekoa, neguaren erdialdekkoa eta udaberriaren hasierakoa.

Garrantzitsua da nabarmentzea emaitzen analisisan eta eztabaidan urtaro bakoitzeko laginak "uda", "negu" eta "udaberri" gisa aipatu zirela. Ikerketa diseinatu zen lagin kopurua aurrekontu- eta denbora-mugen barruan maximizatzeko, analisi estatistiko sakona eta esanguratsua bermatuz. Guztira 10 parte-hartzaile izan ziren, 20 eta 60 urte bitarteko gizon eta emakumeak. Laginak "swabbing" bidez bildu ziren, eta "Omni gene Collection Tube" hodi esteriletan biltegitatu ziren, 4 ° C-tan. Ondoren, DNA atera zen, deskribatutako kitak eta aipatutako prozesu estandarra erabiliz. Atera ondoren, DNA Eppendorf hodi esterilizatueta gorde zen, -80 ° C-an, SGIKERen sekuentziazio masiboko zerbitzuetara bidali arte.

2.2.2. Sekuentziazioa eta Analisi Bioinformatikoa.

Ikerketa honetarako prozesatutako laginak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Ikerketa Zerbitzu Orokorrera (**SGIKER**) bidali ziren, sekuentziatzeko. Sekuentziatorako **Illumina plataforma** erabiliz egin zen. Azterketa honetan, sekuentziazioa larruazaleko mikrobiomaren 16S rRNA genean zentratu zen espezifikoki. Illumina sekuentziatio-teknologiak, belaunaldi berriko sekuentziatio-plataformak (NGS), milioika DNA zatiren sekuentziatio paraleloa ahalbidetzen du, estaldura sakona eta datuen kalitate handia emanez. Sekuentziatio-prozesurako, DNA liburutegiak SGIKER zerbitzuko teknikariek prestatu zituzten, material genetikoaren osotasuna eta adierazgarritasuna bermatzen duten berriazko kitak erabiliz. Ondoren, liburutegiak Illumina sekuentziagailuan kargatu ziren, eta bertan zubiko amplifikazioa eta sintesi bidezko sekuentziazioa egin ziren. Metodologia horrek sekuentzia-datuak sortzen ditu irakurketa laburreko formatuan (short-read), eta datu horiek ondorengo analisi bioinformatikorako erabili ziren.

Sekuentziatioa 16S rRNA genean zentratu zen espezifikoki. Zehazki, identifikazio taxonomikorako, sekuentziatioa **16S rRNA geneko V3-V4** eskualde hiperaldakorrera bideratu zen. 16S rRNA genea bakterio-erribosomaren funtsezko osagaia da, eta haren sekuentziak oso kontserbatuta dauden eskualdeak ditu, eremu hiperaldagaiekin tartekatuta. Kontserbatutako eskualdeek DNA erribosomalaren sekuentzien lerrokatze unibertsala ahalbidetzen dute; eskualde hiperaldagaiek, berriz, espezie bakterianoak bereizteko behar den espezifikotasuna ematen dute. 16S rRNA genearen V3-V4 eskualdea hautatu zen sekuentzia-luzeraren eta diskriminazio taxonomikorako gaitasunaren arteko balantze optimoa zuelako. Eskualde horien luzera konbinatua (~ 460 pb) egokia da Illumina plataformarako. Plataforma horrek 300 pb arteko DNA zatiak sekuentziatu ditzake paired-end moduan irakurriz gero, estaldura osoa eta sekuentzien mihiztatze zehatza ahalbidetuz. Sekuentziatio-protokoloak V3-V4 eskualdearen amplifikazio espezifikoa barne hartu zuen primer unibertsalak erabiliz (341F eta 806R), 16S rRNA genearen alboetan kontserbatutako

eskualdeekin lotzeko diseinatuak. Hasierako PCRa anplifikazioaren eraginkortasuna maximizatzeko eta alborapenak minimizatzeko baldintza optimoei jarraituz egin zen, bakterio-komunitatearen irudikapen zehatza lortzeko erabakigarria. Ondoren, anplifikatutako produktuak garbitu eta kuantifikatu egin ziren Illumina plataforman sekuentziatu aurretik.

Sekuentziazio masiboaren sekuentzia gordinak lortu ondoren, analisi bioinformatikoko prozesu bat egin zen datu metagenomikoetarako. Hasieran, kalitatearen aurretiazko azterketa bat egin zen **FastQC**rekin, datuen kalitate orokorra ebaluatzeko. Hutsuneak zituzten laginak identifikatu ziren, eta irakurketa eskasak zituztenak baztertu egin ziren. Analisi taxonomikoari dagokionez, sequence variants (**ASV**) erabiliz handitzea erabaki zen, unitate taxonomiko operatiboen ordeztuz (OTU), bereizmen taxonomiko maximoa lortzeko. **ASV**ek espezieen identifikazio zehatza ahalbidetzen dute, aniztasunaren laburpen orokorragoa eskaintzen duten OTUekin kontrastean. Ondoren, sekuentzien denoising bat egin zen, **DADA 2** erabiliz. Horren barruan, alde aurreko kalitate-iragazki bat eta forward eta reverse sekuentzien lotura zeuden. Reverse sekuentzietarako, 262 bp-ra eten ziren 25etik beherako Quality-Score baten ondorioz, eta forward sekuentziek, berriz, Quality-Score >30 bat mantendu zuten, bi norabideen arteko gainjartze eraginkorra ziurtatuz. Prozesu zorrotz horrek datuen fidagarritasuna eta sendotasuna bermatu zituen azterketa taxonomiko xehatua egin aurretik.

Azterketaren hurrengo urratsean, **Greengenes2 (2022.10)** datu-basea deskargatu zen, lortutako sekuentzien esleipen taxonomikoa egiteko. Datu-base hau bakterietako 16S genearen sekuentzia osoetan duen ikuspegiaren arabera hautatu zen espezifikoki, eta hori erabakigarria da gure ikerketa larrazaleko mikrobiomaren laginetan oinarritzen delako eta bakterio dermikoaren estaldura zabala eskatzen duelako. **VSEARCH** erabiltzen dugu sailkapen taxonomikorako, Greengenes2-ko sekuentzia guztien aurka lerrotzeko ahalmen globala duelako, **BLAST+**-k emandako tokiko lerrotzea ez bezala. Metodo honek kointzidentzia onena duten sekuentzien arteko adostasuna bermatzen du, **ASV**ak identifikatuz eta dagokien sailkapen taxonomikoa esleituz. Dibertsitate-metrikak lortzeko, filogenia bat eraiki zen bi tresna nagusi erabiliz: **FastTree** eta **RAxML**. **FastTree** sekuentziak **MAFFT**ekin lerrotatu zituen, informazio gutxiko sekuentziak estali eta zuhaitz filogenetikoa sortu ondoren, **CAT** algoritmoa erabiliz, sustraia barne. Ondoren, bootstrap bidezko **RAxML** erabili zen (n = 1000), eta lerrotatze- eta maskaratze-fitxategiak erabili ziren konfiantza handiko zuhaitzak sortzeko, **GTRCAT** ereduaren eta erreproduzigarritasunerako 2023 ausazko haziaren bidez. Tresna-konbinazio horrek oreka ezin hobea eman zuen zehaztasunaren eta eraginkortasun konputazionalaren artean, eta mikrobio-aniztasunaren eta gure azterketa-laginetan agertzen

diren erlazio ebolutiboen karakterizazio zehatza ahalbidetu zuen, analisi taxonomikoaren eta filogenetikoaren fasea optimizatuz, ikerketarako ezarritako denbora-mugen barruan.

Analisiaren azken fasean, **QIIME 2** tresna erabili zen dibertsitate-metrikek kalkulatzeko, "**diversity core-metrics-phylogenetic**" komandoa erabiliz. Prozesu hori RAXMLrekin sortutako sustraitutako zuhaitz filogenetiko batean oinarritzen da, eta zortzi dibertsitate-metrika sortu zituen, bai talde barnekoa (Alfa), bai taldeartekoa (Beta). Alfa metrikek, behatutako espezieen aberastasunak, Shannonen aniztasunak eta Pielouren ekitateak bezala, lagin bakoitzaren barruko aniztasuna ebaluatu zuten. Aldiz, Beta metrikek, UniFrac (Weighted eta Unweighted) kasu, laginen arteko aniztasuna aztertu zuten. Horiek desberdintasunak islatu zituzten mikrobio-komunitatearen osaeran eta egituran. QIIME 2ko tresna gehigarriak erabili ziren, hala nola "**diversity beta-group-significance**" eta "**diversity alfa-group-significance**", analisi horietan sakontzeko. Tresna horiek Box-Plots bidezko bistaratzea erraztu zuten, bai eta estatistikoki esanguratsuak diren aldeak identifikatzea ere, bai lagin-taldeen artean, bai horien barruan, hainbat faktoreren arabera: urtaroak, laginketa-eskualdeak, adina eta sexua. Ikuspegi horri esker, hobeto ulertu ahal izan zen zer aldagai espezifikoak eragiten duten mikrobio-aniztasunean espazio- eta populazio-maila desberdinetan. Azterketa xehatu horiek luze eta zabal eztabaidatu dira azterlanaren hurrengo atalean, Alfa eta Beta aniztasunari buruzko analisi estatistikoan zentratuta, eta horrek azal-mikrobiomari eta eguzki-erradiazioari emandako erantzunari buruzko azterketa honen testuinguruan ikusitako mikrobio-aniztasunaren ereduak sakonago ulertzen laguntzen du.

Azkenik, ugaritasunaren analisi diferentziala egin zen ANCOMekin QIIME 2 erabiliz, gorputzeko hainbat eremutan (bizeps eta dortsalak) eta urtaroetan (uda, negua eta udaberria) larruazaleko mikrobiomaren aldakortasuna ebaluatzeko. Hiru ikuspegi nagusi erabili ziren: bizepsen eta dortsalen arteko konparazioa estazio bakoitzean, hiru estazioetan bizkarraldean eta bizepsaren barruan dauden aldean ebaluazioa estazioetan zehar, eta bizepsen eta dortsalen arteko aldakortasunaren analisi konbinatua estazioetan zehar. Hasieran, "**qiime feature-table**" eta "**qiime filter-samples**" erabili ziren laginak urtaroen eta laginketa-eremuaren arabera iragazteko eta antolatzeke, analisi espezifikoak erraztuz. Gero, "**qiime taxa collapse**" aplikatu zen, datuak espeziearen eta generoaren maila taxonomikoetan sinplifikatzeko, funtsezkoa oparotasunean desberdintasunak identifikatzeko. Azkenik, konposizio diferentzialaren analisisia egin zen "**qiime composition ancom**" erabiliz, metadatuak erabiliz, hala nola "laginketa_eremua" eta "estazio", taldeen arteko desberdintasun esanguratsuak detektatzeko, larruazaleko mikrobiomaren aldakuntza zehatz-mehatz ulertzeko, gorputzaren kokapenaren eta urtaroaren arabera.

2.2.3. Dibertsitatearen azterketa estatistikoa.

2.2.3.1. Diversidad alfa.

Larruazaleko mikrobiomaren dibertsitatea ebaluatzeko, bizepsaren eta besaurreko dortsalaren barnealdeko eskualdeetan, udako, neguko eta udaberriko estazioetan, hiru indize erabili ziren: Shannon dibertsitate-indizea, Pielouren uniformetasun-indizea eta Observed-OTUs indize kualitatiboa. Hasieran, QIIME2 "diversity alpha-group-significance" tresna erabili zen "Shannon_vector.qza" eta "Evenness_vector.qza" fitxategiekin, aldez aurretik "diversity core-metrics-phylogenetic" bidez lortutakoak. **Shannon (H)** indizeak komunitate bateko espezieen aberastasuna eta ekitatibotasuna ebaluatzen ditu, eta formula hau erabiliz kalkulatzen da: $H = -\sum(p_i \cdot \ln p_i)$, p_i komunitatean dauden banako guztiekiko espezieko i banakoen proportzioa da, eta zenbat eta balio handiagoa izan, orduan eta aniztasun handiagoa islatzen du. Bestalde, **Pielouren indizeak (J')** neurri hori osatzen du, bertan dauden espezieen artean banakoen banaketaren uniformetasuna kuantifikatzen baitu. Formula honen bidez kalkulatua: $J' = H / \ln S$, non H Shannon indizea den eta S espezie kopuru osoa. Letik hurbil dauden balioek banaketa ekitatiboa adierazten dute; balio txikiek, berriz, espezie gutxi nagusi direla iradokitzen dute. Azterketa horiek mikrobio-komunitateen egiturari eta ekitateari buruzko informazio zehatza ematen dute, funtsezkoak baitira ulertzeko larruazaleko mikrobioma nola aldatzen den ingurumen-baldintza eta baldintza anatomiko desberdinetan. Ondoren, QIIME2 tresna bera erabili zen aldez aurretik "**diversity core-metrics-phylogenetic**" delakoarekin lortutako "**Observed_OTUs.qza**" indizea aztertzeko. Indize horrek lagin batean ikusitako espezie bakarren kopurua kuantifikatzen du, mikrobio-komunitate bateko espezieen aberastasun kualitatiboa islatuz. Behaketen balio handiagoak adierazten du espezie gehiago daudela. Gure azterlanean, indize hori kualitatibotzat jo zen espezieen presentzian edo gabezian duen ikuspegiagatik, haien ugaritasun erlatiboa kontuan hartu gabe.

Kruskal-Wallis testa alfa-aniztasunaren indizeen garrantzi estatistikoa ebaluatzeko erabili zen. Proba ez-parametrikoko honek hiru talde independente edo gehiagoko medianak konparatzen ditu, datuak normalean banatzen ez direnean eta ANOVA parametrikokoaren suposizioak betetzen ez dituztenean. Taldeen artean desberdintasun esanguratsurik dagoen ebaluatzen du, laginen batez besteko tartek alderatuz. Probako estatistikariak banaketa chi-karratua jarraitzen du $k-1$ askatasun-graduekin, non k talde kopurua den. **Kruskal-Wallis pairwise** erabili zen taldeen arteko konparazio anizkoitzetarako, p balioak doitu I. motako erroreak kontrolatzeko. Ikuspegi horrek aukera ematen du desberdintasun globalak aurkitu

ondoren zein talde diren nabarmen desberdinak identifikatzeko. Emaitzak interpretatzean laginen tamaina desberdina kontuan hartzea funtsezkoa da, testa sentikorra baita. Hala ere, taldeen artean desberdintasun orokorrik ba ote dagoen adierazten duen arren, proba gehigarriak behar dira beren artean zein talde diren desberdinak berariaz identifikatzeko.

2.2.3.2. Beta-Dibertsitatea.

Eguzkiaren eraginpean dagoen larruazaleko mikrobiomari buruzko ikerketan, **UniFrac distantzia haztatuak eta haztatu gabeak** erabiltzen ditugu aniztasun-beta aztertzeko. Disimilutasun-metrika horiek kontuan hartzen dituzte mikrobio-espezieen arteko harreman filogenetikoak. Distantzia haztatuak desberdintasun **kuantitatiboak** erakusten dituzte komunitateen arteko espezieen ugaritasun erlatiboan; haztatu gabekoak, berriz, espezieen presentzia edo gabezia ebaluatzen dute, eta alde **kualitatiboak** nabarmentzen dira mikrobioen konposizioan. **Koordenatuen Osagai Nagusien Analisisa (PCOA)** erabiltzen dugu ikusteko nola aldatzen den mikrobiomaren egitura gorputz-eremuen (bizeps eta dortsala) eta urtaroen artean (uda, negua eta udaberria). Ikuspegi horri esker, mikrobio-aniztasunaren ereduak esploratu ahal izan genituen, ingurumen-baldintza eta baldintza anatomiko espezifikoei dagokienez. PCOAn ikusitako desberdintasunen garrantzi estatistikoa zehazteko, "**diversity beta-group-significance**" aplikatu dugu **PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance)** bidez. Parametrikoa ez den test ezin hobe da datu metagenomikoetarako, mikrobio-komunitateen konplexutasuna eta heterogeneotasuna maneiatzeko gaitasuna duelako, datuen banaketa normala izan gabe. PERMANOVA analisiari esker, laginketa-taldeen (laginketa-eskualdearen, urtaroen eta subjektuaren arabera definituak) arteko mikrobio-konposizioaren aldaketak estatistikoki esanguratsuak ziren ebaluatu ahal izan genuen. Bestalde, "**--p-pairwise**" parametroarekin egindako "beta-group-significance" analisisia larruazaleko mikrobiomaren lagin taldeen arteko desberdintasun espezifikoa ebaluatzeko erabili zen, hala nola udako eta neguko dortsalen arteko desberdintasunak ebaluatzeko. Hurbilketa horri esker, binakako permutazio-probak egin ahal izan ziren, zein talde nabarmen desberdintzen ziren zehazteko. Prozedura hau bereiz aplikatu zen UniFrac distantzia haztatu eta haztatu gabeetan, analisiaren ikuspegiaren araberrako metadatu espezifikoa erabiliz. **Pairwise PERMANOVA**ren bi analisi egin ziren gorputzeko eskualde eta urtarotako laginen arteko alde kualitatiboak eta kuantitatiboak ebaluatzeko. Gainera, banakoen arteko larruazaleko mikrobiomaren beta dibertsitatearen aldakuntza aztertu zen, UniFrac distantzia-metrika berberak erabiliz.

2.2.3.3. Ugaritasunaren Analisi Diferentziala.

Ugaritasunaren analisi diferentzialerako, **QIIME2**ren **ANCOM (Analysis of Composition of Microbiomes)** erabili zen, bizkarreko besaurrearen laginen eta bizepsaren barneko eremuaren artean udan, neguan eta udaberrian desberdintasun esanguratsuak dituzten espezieak eta generoak identifikatzeko. **ANCOM Volcano Plot** bat sortzen du ugaritasun taxonomikoko ezaugarri diferentzialak bistaratzeko, eta W estatistikoa erabiltzen du garrantzia ebaluatzeko. W -ren balio altuak adierazten du konfiantza handia dagoela ezaugarria desberdina dela. Volcano Plotaren X ardatzak talde konparatuen arteko ugaritasun erlatiboaren batez besteko logaritmikoaren diferentzia erakusten du, eta Y ardatzak garrantzi estatistikoaren balioa erakusten du ($-\log_{10}(p\text{-balioa})$). Y ardatzean balio altuak eta X ardatzean zerotik urrun dauden ezaugarriak nabarmen diferentzialtzat jotzen dira, eta talde konparatuetako batean ugaritasun handiagoa edo txikiagoa adierazten da. "**Percentile abundances of features by group**" taulek taxonomia-ezaugarri bakoitzak talde bakoitzean duen perzentil-ugaritasunaren laburpen zehatza ematen dute, espezie edo generoen arteko abundantzia aldakuntzak identifikatzeko aukera emanez.