

Projekto bioinformacinė ataskaita: **MEF-24-01**

16S ir ITS duomenys – Fermentuotų produktų analizė

A. Zaiko

2025 m. sausio 18 d

Mėginių apdorojimas, sekoskaita ir bioinformatikos rezultatai (Klientas – Memelio Fermentuotas)

Fonas

Klientas **Memelio Fermentuotas** kreipėsi į **SEQUENCH**, kad būtų suteiktos šios paslaugos:

- DNR ištraukimas iš 48 mėginių (DNR ekstraktai), paimtų iš fermentuotų produktų, kuriuos pagamino 7 skirtingi gamintojai, imant mėginius mažiausiai 2 skirtingais laiko momentais.
- PGR amplifikacija naudojant du žymenis: **16S** – bendros bakterinės įvairovės analizei ir **ITS** – grybų įvairovės įvertinimui mėginiuose.
- Aukšto našumo sekoskaitos (HTS) bibliotekų paruošimas (valymas, indeksavimas, kokybės užtikrinimas/kontrolė – QA/QC), HTS paruošimas ir teigiamų amplikonų analizė **Illumina sekoskaitos platformoje**.
- HTS rezultatų kokybės užtikrinimas (QA) ir gautos HTS duomenų bioinformacinė analizė pagal nusistovėjusią protokolą.

Žemiau pateikiame trumpą ataskaitą apie abiejų žymenų analizės rezultatus.

Sample processing - DNA extraction and PCR amplifications

Laboratorijoje mėginiai buvo apdoroti DNR išskyrimui ir polimerazės grandininės reakcijos (PGR) atlikimui, siekiant amplifikuoti COI ir 16S rRNR genų regionus. PGR produktų kokybė buvo įvertinta naudojant gelinę elektroforezę. Po to PGR produktai buvo išgryninti, siekiant pašalinti neįtrauktus nukleotidus ir reagentus, indeksuoti, kiekybiškai įvertinti, patikrinti kokybę ir paruošti aukšto našumo sekoskaitai NextSeq sekoskaitos platformoje, naudojant 2 × 300 bazių porinės sekos chemiją. Visi mėginiai davė geros kokybės amplifikacijos produktus ir buvo sėkmingai paruošti sekoskaitai.

Neigiami kontroliniai mėginiai (molekulinio lygio distiliuotas vanduo) buvo pridėti prie bibliotekos, siekiant kontroliuoti galimą laboratorinį užterštumą bibliotekos paruošimo metu (DNR išskyrimo, PGR, gryninimo, jungimo ir kitais etapais).

Sekoskaitos rezultatai

Sekoskaitos procesas buvo užbaigtas be klaidų, atitinkant visus „Illumina“ nustatytus specifikacijų kriterijus. Neapdoroti sekų failai buvo bioinformatiškai apdoroti: pašalinti pradmenys iš sekų, sekos buvo filtruotos, apkarpytos, išvalytos nuo triukšmo, sujungtos pirmyn ir atgal nukreiptos sekos. Gautos unikalios sekos arba amplikonų sekų variantai (ASV) buvo priskirti rūšims, lyginant ASV su atskaitos taksonomijos failu.

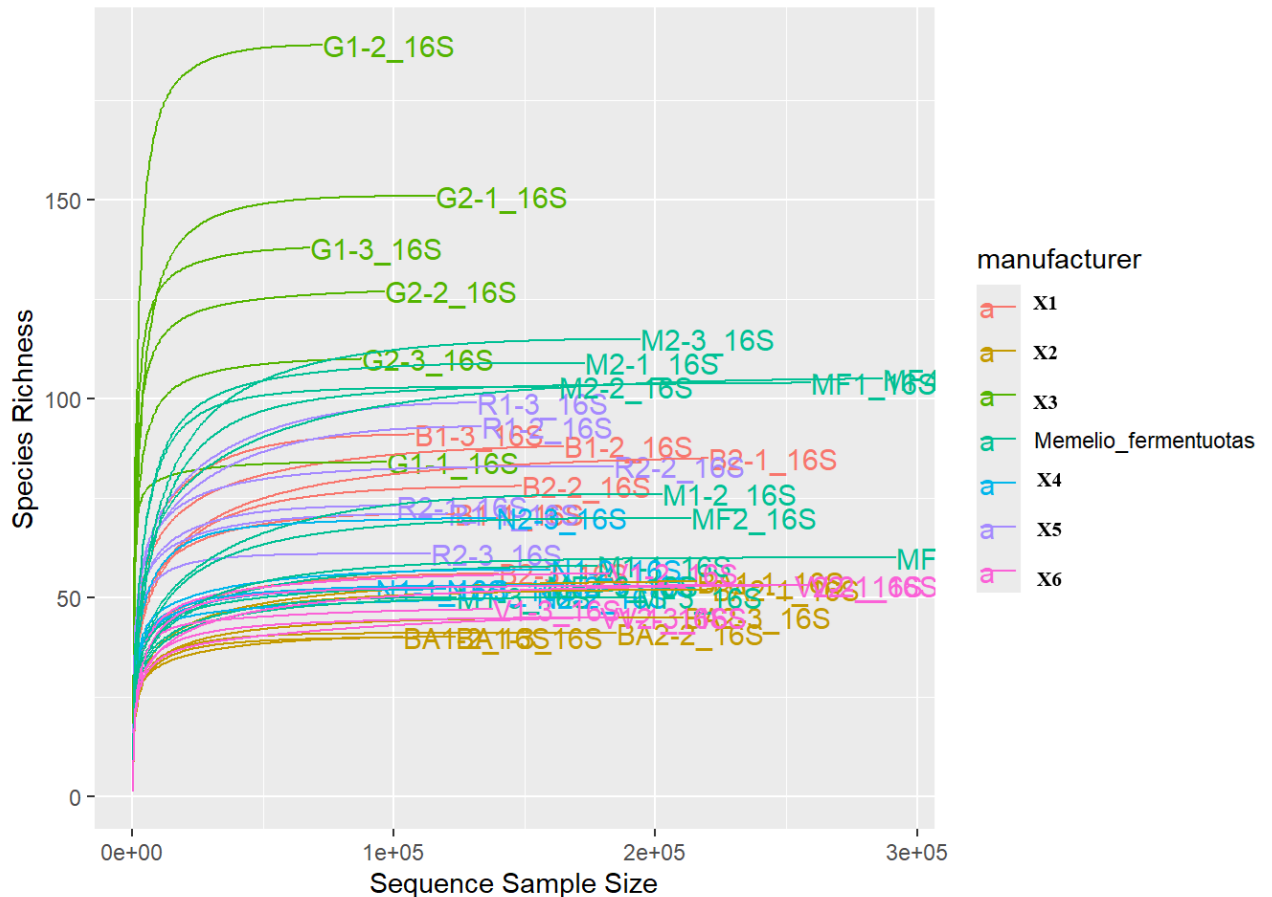
Žemiau pateikiame 16S (bakterinio) žymens, naudoto tyrime, duomenų analizės rezultatus.

16S (Bakterinė įvairovė)

Bendras skaičius sekų, išlaikytų duomenų rinkinyje po viso bioinformatinio apdorojimo ir triukšmo pašalinimo, yra 7 756 626, min = 679 820, vidutiniškai = 161 596 sekos kiekviename mėginyje.

Buvo sudaryta retifikacijos kreivė, siekiant įvertinti, kaip gerai mėginiuose užfiksuota įvairovė. Šis grafikas patvirtina pakankamą sekoskaitos aprėptį visose mėginiuose: visos kreivės išsilygino – tai reiškia, kad dauguma tirtų taksonų įvairovės mėginiuose yra gerai užfiksuota.

Pastaba: „X3“ gamintojo mėginiai parodė žymiai didesnę aptiktų rūšių įvairovę, kaip rodo retifikacijos kreivės, kurios Y ašyje yra aukštesnės.



Tuščiuose DNR ekstrahavimo ir PGR mėginiuose buvo pastebėtas nedidelis apdorojimo užterštumas. Buvo atliktas dekontaminacijos etapas (proporcingas sekų, rastų tuščiuose mėginiuose, pašalinimas), kurio rezultatai:

- Iš viso pašalintų ASV skaičius: 0
- Pašalintų ASV procentas: 0 %
- Iš viso pašalintų sekų skaičius: 0
- Pašalintų sekų procentas: 0 %

Tolimesnei duomenų analizei ir biologinės įvairovės palyginimui tarp mėginių, mėginiai buvo suvienodinti iki vienodo sekų skaičiaus (67 900 sekų), siekiant pašalinti šališkumą, kurį lemia skirtingas sekoskaitos gylis tarp mėginių. Šis duomenų apdorojimo etapas leidžia teisingiau

palyginti biologinę įvairovę tarp mėginių, nepaisant pradinio duomenų kiekio kiekviename mėginyje. Tai užkerta kelią neteislingam vertinimui, kai vienas mėginys atrodo įvairesnis tik dėl to, kad jame buvo daugiau sekų.

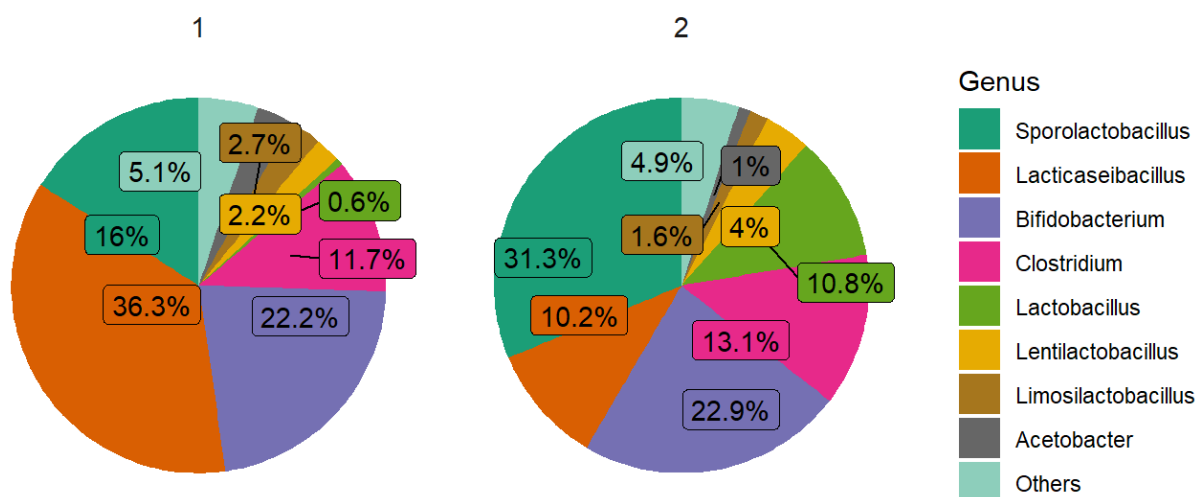
Taip pat pašalinome labai retas ASV (unikalias sekas), kurios visame duomenų rinkinyje buvo pateiktos mažiau nei 50 sekų. Labai retos bakterijų sekos tikėtina yra aplinkos triukšmas arba signalas, atsiradęs dėl produkto tvarkymo ir pakavimo, o ne būdingas produkto mikrobiomas.

Žemiau pateikiame pagrindinės bakterinės įvairovės grafinį apibendrinimą (vizualizuotas 8 dominuojančių genčių procentinis gausumas, o grupė „Kiti“ apima likusius). Analizuoti mėginiai pateikiami pagal gamintoją ir laiko pakartojimą.

Pastaba: „Memelio fermentuotas“ iš viso buvo tirti 4 skirtingų partijų mėginiai. Pirmieji du (1 ir 2) yra įprastos sudėties ir kokybės, mėginys 3 (išlaikytas 1.5 mėnesio labai šiltoje temperatūroje), kurio kamštis pokštelėjo atidarant, ir 4 – mėginys naudojant nekokybišką avižų partiją.

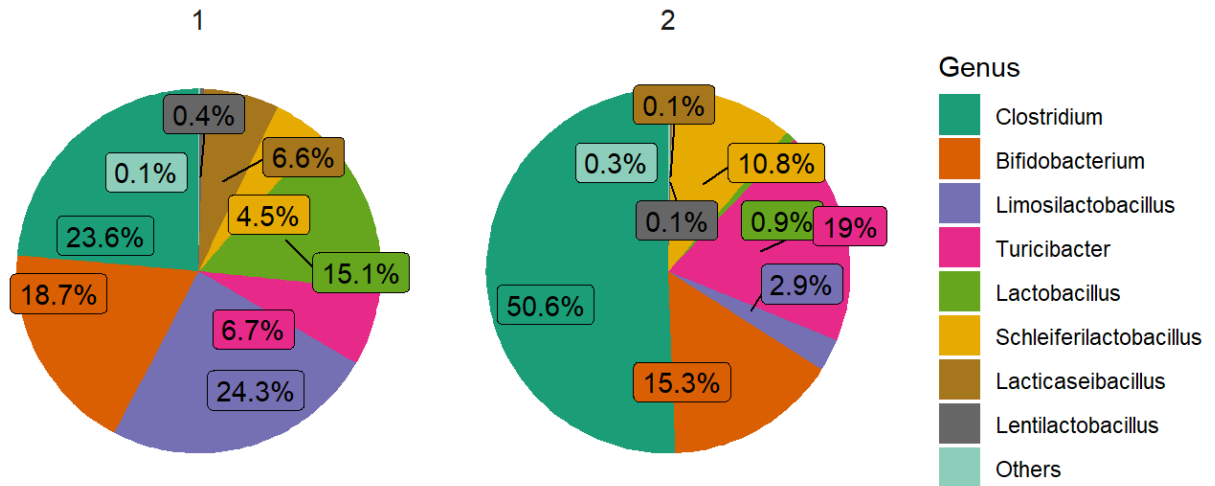
(X1)

Pastebėtas reikšmingas skirtumas tarp laiko replikacijų. Abi partijos turėjo dominuojančias bakterijų gentis: Sporolactobacillus, Lacticaseibacillus, Bifidobacterium ir Clostridium, tačiau antroje partijoje taip pat buvo pastebėta reikšminga Lactobacillus kiekio, o pirmoje partijoje – Bacteroides. Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 80 ASV (ampliconų sekos variantų), kurie buvo priskirti 43 bakterijų rūšims.



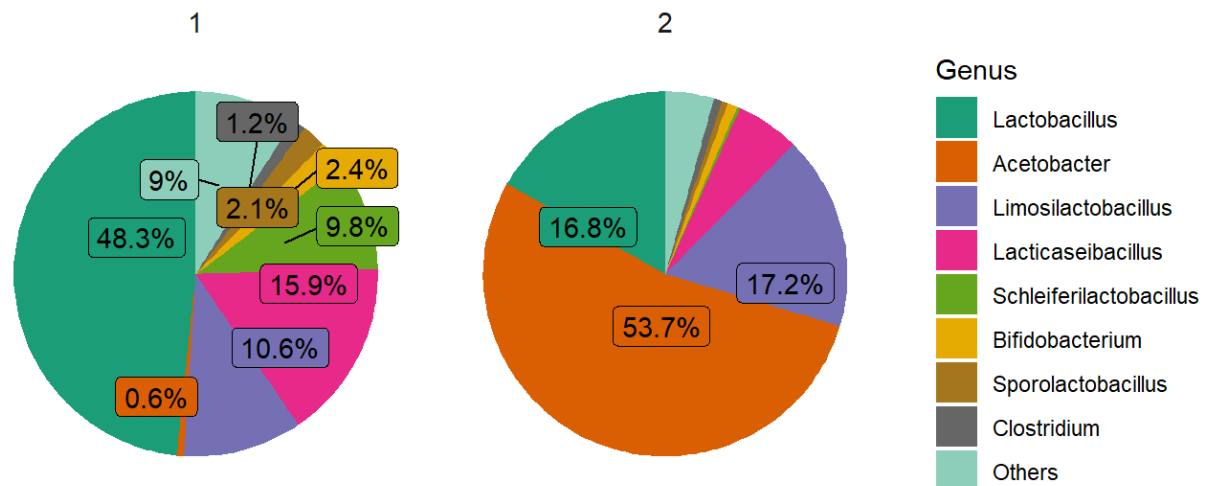
(X2)

Pastebėtas reikšmingas skirtumas tarp laiko replikacijų. Aukšti Clostridium kiekiai buvo aptikti abiejose partijose. Kitos gausiai pasitaikančios gentys buvo Bifidobacterium, Limosilactobacillus, Turicibacter, Lactobacillus ir Schleiferilactobacillus. Bifidobacterium ir Clostridium taip pat buvo aptikti, tačiau antroje partijoje buvo pastebėta reikšminga Lactobacillus kiekio, o pirmoje partijoje – Bacteroides. Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 54 ASV (ampliconų sekos variantų), kurie buvo priskirti 25 bakterijų rūšims.



(X3)

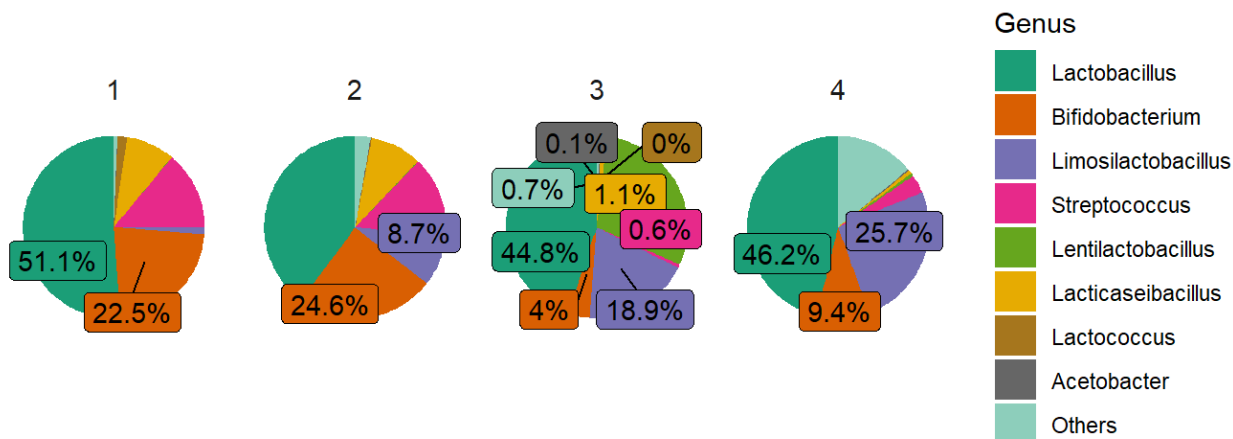
Pastebėtas reikšmingas skirtumas tarp laiko replikacijų. Pirmoje partijoje mikrobiomą dominuoja bakterijų gentys Lactobacillus, Lacticaseibacillus, Limosilactobacillus ir Schleiferilactobacillus. Antroje partijoje dominuojančia gentimi buvo Acetobacter, po jos sekė Limosilactobacillus ir Lactobacillus. Bifidobacterium ir Clostridium taip pat buvo aptikti, tačiau antroje partijoje buvo pastebėta reikšminga Lactobacillus kiekio, o pirmoje partijoje – Bacteroides. Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 241 ASV (ampliconų sekos variantų), kurie buvo priskirti 115 bakterijų rūšims.



MĖMELIO FERMENTUOTAS

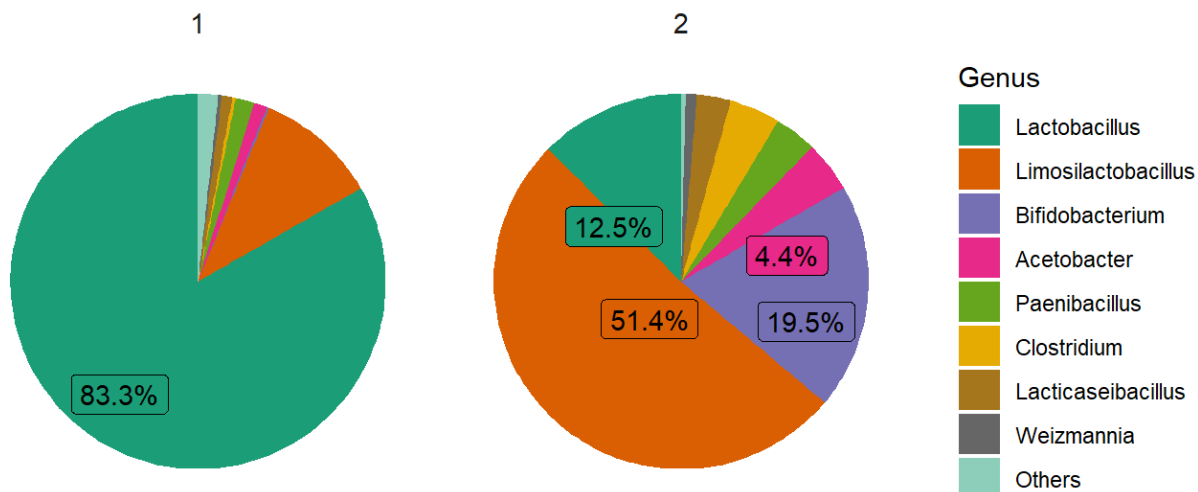
Tarp laiko pakartojimų taip pat buvo pastebėta kintamumo. Tačiau 1 ir 2 partijų rezultatai buvo nuoseklesni, o 3 ir 4 partijos labai skyrėsi. Dominuojančios gentys 1 ir 2 partijose buvo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Limosilactobacillus*, *Streptococcus* ir *Lacticaseibacillus*. 3 partijoje buvo nustatytas mažesnis *Streptococcus* kiekis. 3 partijoje taip pat buvo aptikta *Lentilactobacillus*.

„Memelio Fermentuotas“ mėginiuose iš viso buvo aptikta 119 ASV (ampliconų sekos variantų), kurie buvo priskirti 68 bakterijų rūšims.



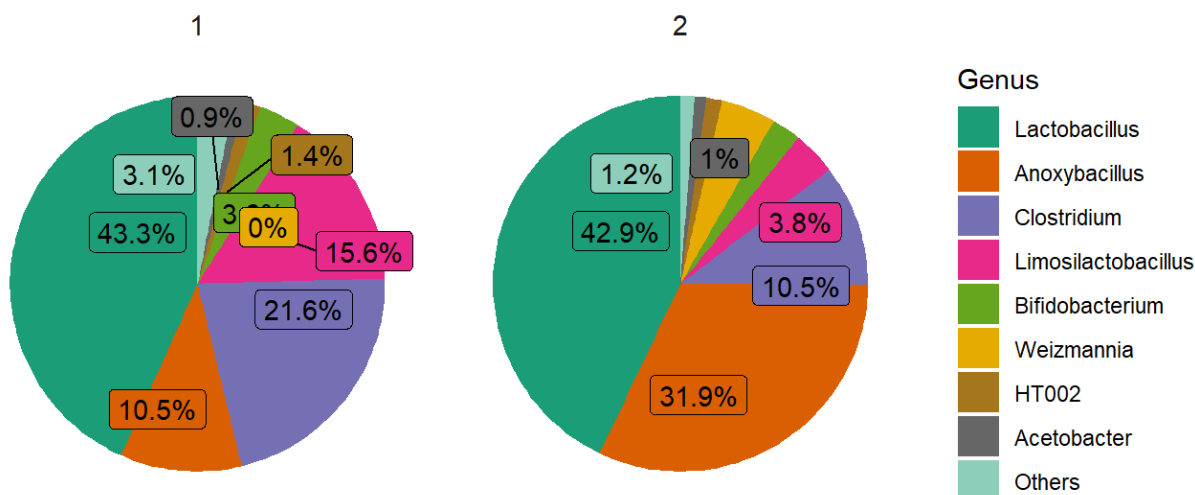
(X4)

Bakterinė įvairovė tarp laiko pakartojimų vėl buvo pastebimai skirtinga. Pirmojoje partijoje vyravo *Lactobacillus*, po jų sekė *Limosilactobacillus*, o antrojoje partijoje dominavo *Limosilactobacillus*, reikšmingai prisidėjęs *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium*. Antrojoje partijoje taip pat buvo aptikta pastebimų kiekių *Acetobacter*, *Paenibacillus*, *Clostridium* ir *Lacticaseibacillus*. Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 76 ASV (ampliconų sekos variantai), kurie buvo priskirti 39 bakterijų rūšims.



(X5)

Tarp laiko pakartojimų buvo pastebėta bakterinės įvairovės kintamumas. Pirmojoje partijoje aiškiai dominavo *Lactobacillus*, po jų sekė *Clostridium*, *Anoxybacillus* ir *Limosilactobacillus*, taip pat buvo nustatytas mažesnis, bet vis dar reikšmingas *Bifidobacterium* kiekis. Antrojoje partijoje *Lactobacillus* vis dar buvo dominuojanti gentis, tačiau *Anoxybacillus* buvo gausesnis nei pirmojoje, o *Limosilactobacillus* – mažiau paplitęs. Kitos svarbios gentys antrojoje partijoje buvo *Clostridium*, *Weizmannia* ir *Bifidobacterium*. Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 95 ASV (ampliconų sekos variantai), kurie buvo priskirti 47 bakterijų rūšims.



(X6)

Tarp laiko pakartojimų buvo pastebėtas tam tikras kintamumas. Dominuojanti bakterija buvo *Weizmannia*, po jos sekė *Clostridium*, *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium*.

Šiuose mėginiuose iš viso buvo aptikta 55 ASV (ampliconų sekos variantai), kurie buvo priskirti 29 bakterijų rūšims.

