ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.61:579.25

ВОЗМОЖНОСТЬ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ОСНОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ РАЙОНОВ ГЕНА 16S рРНК¹

© 2020 г. Е. С. Клименко^{1, *}, А. В. Погодина¹, Л. В. Рычкова¹, Н. Л. Белькова¹

 1 Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com Поступила в редакцию 11.09.2019 г. После доработки 16.01.2020 г. Принята к публикации 23.01.2020 г.

Бифидобактерии считаются ключевыми комменсалами кишечника человека, они доминируют в сообществе на самых ранних стадиях жизни и первыми реагируют на любые стрессовые факторы. Метасеквенирование V3–V4 участка гена 16S рРНК позволило определить в кишечном микробиоме подростков 11 филотипов бифидобактерий, на долю которых приходилось от 0.0001 до 0.9% от общего микробиома. Проведено филогенетическое исследование полученных филотипов, идентифицированы виды *B. angulatum, B. bifidum, B. longum, B. animalis,* а также подвид *B. animalis* subsp. *lactis*. Определены виды бифидобактерий, для которых идентификация по V3–V4 вариабельным участкам не разрешается. Филогенетический анализ разных вариабельных районов и их комбинаций показал, что топология дерева, построенного на основании фрагмента V2, наиболее сходна с топологией дерева, построенного по фрагментам V2–V6.

Ключевые слова: бифидобактерии, кишечный микробиом, ген 16S pPHK, вариабельные районы, рибосомная таксономия, высокопроизводительное секвенирование. **DOI:** 10.31857/S001667582008007X

Бифидобактерии считаются ключевыми комменсалами кишечника человека, выполняющими важную роль в поддержании его здоровья [1]. Более 60 охарактеризованных видов и подвидов представителей рода Bifidobacterium выделены в основном из пяти различных мест обитаний: это кишечник человека, насекомых и животных, ротовая полость человека, а также сточные воды. Также отмечалось присутствие ДНК бифидобактерий в крови человека [2, 3]. Разнообразие мест обитания отражает экологическое происхождение бифидобактерий, которое, в первую очередь, связано с кишечной микробиотой. Бифидобактерии доминируют в кишечнике человека на самых ранних стадиях жизни и первыми реагируют на любые стрессовые факторы, например такие как антибиотики и токсины. С возрастом отмечают не только постепенное снижение представленности бифидобактерий в суммарном микробиоме, но и смену внутрипопуляционной структуры [4, 5]. Перестройку микробиоценоза толстого кишечника наблюдают при формировании функциональных гастроинтестинальных расстройств у

детей и подростков [6–8] и как фактор техногенного прессинга [9, 10]. Так, для детского населения г. Иркутска определены в качестве доминирующих в кишечном биотопе четыре вида бифидобактерий – *Bifidobacterium bifidum, B. catenulatum, B. longum* и *B. adolescentis*. При этом установлено, что у здоровых детей преобладают многокомпонентные видовые ассоциации, у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами бифидобактерии вегетируют в моновидовом варианте [11].

В 2000-х годах внедрение методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) изменило представление о бактериальном разнообразии ассоциированной с хозяином микробиоты и подтвердило, что 80% бактерий, обнаруженных с помощью инструментов молекулярной биологии, являются некультивируемыми [12, 13]. NGS-технологии позволяют проводить высокопроизводительный анализ разнообразия бактериальных сообществ и благодаря снижению их себестоимости являются на сегодняшний день одним из основных методов изучения состава и структуры кишечной микробиоты. Анализ вариабельных участков гена 16S pPHK используется как рутинный подход для определения бактериальных

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S001667582008007Х для авторизованных пользователей.

таксонов [14]. В настоящее время разработан большой набор биоинформационных ресурсов для анализа микробных сообществ. На основании получаемого списка филотипов по индексам альфа-разнообразия получают информацию о структуре и равновесности сообщества, бета-разнообразие характеризует различия между сообществами, в то время как предсказание функциональных характеристик на основе сопоставления данных с известными геномными данными дает информацию о метаболических особенностях. В связи с этим выбор вариабельного района для получения списка бактериальных филотипов становится определяющим для корректного описания бактериальных сообществ.

Различные районы имеют разную вариативность последовательностей, которая меняется от рода к роду, что приводит к постоянным дискуссиям о наиболее универсальных и эффективных регионах для точного филогенетического анализа и таксономической классификации [14]. Кроме того, выбор анализируемого района также зависит от технологических ограничений используемых платформ NGS. Например, короткая длина участка V4 гена 16S рРНК (~250 пн) позволяет полностью считывать последовательности ДНК с обоих концов ампликона с использованием Illumina MiSeq, которая в настоящее время является наиболее часто используемой NGS-платформой, что значительно повышает точность прочтения.

Филогенетические деревья, широко используемые для выяснения систематических связей между различными видами, также позволяют находить взаимосвязи между различными участками гена 16S pPHK с точки зрения филогенетического разрешения. Корреляция различных вариабельных участков может быть выведена из геодезического расстояния их филогенетических деревьев. Сходство топологии можно оценить с помощью геодезического алгоритма, который способен проецировать структуру узла дерева в многомерную модель [15]. Геодезическое расстояние используется для количественной оценки различий между деревьями [14, 16].

Совершенно очевидно, что разрешающая способность вариабельных участков гена 16S рРНК различается, и возможность видовой или родовой идентификации бактерий на основании рибосомной филогении зависит как от вариативности участка, так и от его размера. Цель настоящего исследования — изучение разрешающей способности и оценка возможности видовой идентификации бифидобактерий на основании различных вариабельных участков гена 16S рРНК при использовании стандартной методики метагеномного секвенирования ампликона и обработки полученных данных. Настоящая работа проведена в рамках исследования кишечных микробиомов подростков с нормальной массой тела и ожирением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краткое описание материала исследований. ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск, Россия) реализует исследование кишечных микробиомов подростков с нормальной массой тела и ожирением [17]. Проведение исследования было одобрено Этическим комитетом ФГБНУ "Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека" (протокол № 6 от 21.12.2015 г.). Отбор проб фекалий и выделение суммарной ДНК выполняли согласно стандартным операционным процедурам (IHMS SOP 03 V2, IHMS SOP 06 V2), paspa6oтанным при реализации проекта международного консорциума "Международные стандарты микробиома человека" (International Human Microbiome Standards, IHMS) [17]. Амплификацию V3–V4 вариабельных районов гена 16S рРНК (структуры праймеров 341F 5'-X-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' и 806R 5'-Y-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3', где X и У – соответствующие последовательности баркодов), оценку качества ампликонов, приготовление библиотеки и ее секвенирование (Hiseq, PE250) проводили в компании "Novogene" (Пекин, Китай).

Биоинформационная обработка данных. Для генерации ASV и назначения таксономии использовали алгоритмы платформы QIIME2 2019.4 [18]. Качество последовательностей проверяли с помощью FastQC 0.11.8 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Обрезку праймеров, удаление прочтений с усредненным качеством ниже 25 и усечение прочтений при падении качества ниже 25 к концу последовательности, а также шумоподавление, удаление химерных последовательностей и выделение вариантов последовательности ампликона (amplicon sequence variant. ASV) осуществляли с использованием алгоритма DADA2, адаптированного для анализа парноконцевых чтений и интегрированного в платформу QIIME2 [19]. Оценку глубины секвенирования проводили с использованием аппроксимации моделью Михаэлиса-Ментен [20]. Референсную базу данных SILVA 132 (релиз от 13.12.2017) использовали для назначения таксономии.

Исследуемые нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных NCBI под номерами MN560070–MN560080.

Филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности (11 шт., V3–V4 вариабельный участок), идентифицированные с помощью сравнения с референсной базой данных SILVA 132 как принадлежащие представителям семейства Bifidobacteriaceae, были отобраны для построения деревьев. Для уточнения филогении ASV исполь-

Маркировка фрагмента	Позиции по <i>E. coli</i>		
	начало фрагмента	конец фрагмента	Длина фрагмента, пн
V2	97	306	209
V3	307	487	180
V4	488	746	258
V5	747	885	138
V6	886	1029	143
V3-V4	307	746	439
V3–V5	307	885	578

Таблица 1. Положение вариабельных участков гена 16S рРНК по последовательности типового штамма *Escherichia coli*

зовали последовательности полного гена 16S pPHK типовых штаммов всех видов рода *Bifidobacterium* (согласно http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html. Приложение, табл. 1). Множественное выравнивание было выполнено с использованием ClustalW [21]. Для построения деревьев использовали алгоритм объединения ближайших соседей (neighbor joining, NJ). Матрицы расстояний были рассчитаны с использованием однопараметрической модели Джукса– Кантора. Статистический анализ достоверности филогении был выполнен с помощью назначения бутстреп-поддержки для 1000 реплик. Достоверным считалось значение бутстреп-поддержки выше 75% [22].

На основании анализа гена 16S рРНК типовых штаммов *Bifidobacterium* была проведена оценка разрешающей способности его вариабельных участков [16]. Позиции и размер соответствующих районов представлены в табл. 1. Для каждого фрагмента в отдельности, а также для комбинаций V3–V4 и V3–V5 было построено дерево. Из анализа были исключены участки V1, V7–V9, так как для некоторых типовых штаммов имеются только неполные последовательности гена 16S рРНК, полученные разными методами секвенирования.

Геодезическое расстояние между филогенетическими деревьями рассчитывали с помощью программного обеспечения на основе алгоритма Geodesic Treepath Problem (GTP) [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Статистическая обработка метагеномных данных

В ходе молекулярно-генетического анализа было выполнено 2590453 прочтения нуклеотидных последовательностей. Количество чтений в пробах варьировало от 52945 до 77290 (Приложение, табл. 2). Всего было выделено 28890 филотипов (ASV), при этом их число в каждом образце изменялось от 342 до 564, более детальная информация представлена в Приложении, табл. 2.

Таблица частот была нормализована по минимальной библиотеке. Оценка глубины секвенирования с использованием аппроксимирования Михаэлиса—Ментен показала, что состав микробиомов на уровне ASV в среднем был недооценен на 2.04%.

Габлица 2. Идентификация фи	лотипов бифидобакте-
рий рода <i>Bifidobacterium</i> , детек	тированных в микро-
биоме кишечника у подросткое	\$

Идентификация по SILVA 132	Рибосомная филогения
UI	Bifidobacterium
UI	B. animalis subsp. lactis
UI	B. animalis
UI	B. angulatum
B. bifidum	B. bifidum
UC	B. longum
UC	
UC	
UC	
UC	Bifidobacterium
UC	Bifidobacterium
	Идентификация по SILVA 132 UI UI UI UI B. bifidum UC UC UC UC UC

Примечание: UI – неидентифицированные последовательности, UC – некультивируемые формы.



Рис. 1. Представленность (%) доминирующих фил в кишечных микробиомах подростков. *1 – Proteobacteria*, *2 – Bacteroidetes*, *3 – Firmicutes*, *4 – Actinobacteria*, *5 –* другие.

Таксономическое разнообразие кишечных микробиомов на основе V3–V4 вариабельных районов

Сравнительный анализ полученных последовательностей с референсной базой данных показал, что в кишечном микробиоме подростков домен Bacteria был преимущественно представлен четырьмя филами — *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* (рис. 1), суммарная доля

ГЕНЕТИКА том 56 № 8 2020

которых варьировала от 95.47 до 99.87% соответственно.

Доля актинобактерий в среднем в микробиомах составляла 1.9%. Среди актинобактерий были идентифицированы ASV, которые отнесены к пяти классам — Actinobacteria, Coriobacteriia, Rubrobacteria, Thermoleophilia, Acidimicrobiia и к кандидатной группе MB-A2-108 (<0.005%). Максимальное количество ASV было отнесено к классу



Рис. 2. Представленность ASV, идентифицированных как бифидобактерии, в кишечных микробиомах подростков.

Actinobacteria, который также имел наибольшую представленность в микробиоме.

Бифидобактерии в среднем составляли две трети от всех актинобактерий. Идентифицировано 11 ASV, на долю которых приходилось от 0.0001 до 0.9% в общем микробиоме. Наиболее представленными ASV были d7ab, 43e3 и 1bc4. Такие ASV как 5231, 5e09, 8881 и ab65 были обнаружены только в единичных образцах (рис. 2).

Среди филотипов, отнесенных к роду *Bifidobacterium* на основании сравнительного анализа по базе данных SILVA 132, до вида была определена только 5cd2 – *B. bifidum*, остальные 10 ASV идентифицированы как *Bifidobacterium* spp., шесть из которых определены как некультивируемые бактерии (табл. 2). Все последовательности ASV в дальнейшем использовали для филогенетического анализа.

Филогенетическая идентификация бифидобактерий по V3—V4 вариабельным участкам

На первом этапе для филотипов, отнесенных к роду *Bifidobacterium*, была проведена филогенетическая идентификация на основании V3–V4 вариабельных участков гена 16S рРНК. На момент написания статьи род *Bifidobacterium* был представлен 64 видами, из которых следующие виды содержали подвиды: *B. animalis, B. longum*, *B. pseudolongum* и *B. thermacidophilum*.

На филогенетическом дереве было отмечено шесть кластеров, в которых последовательности ASV сформировали ветви либо самостоятельные, либо вместе с последовательностями типовых штаммов (рис. 3). Шесть ASV попали в кластеры, сформированные подвидами видов *B. animalis* и *B. longum*. В группе последовательностей, отнесенных к виду *B. longum*, в пределах V3–V4 вариабельных участков не разрешилась филогенетическая идентификация ни одного из четырех подвидов. Последовательности штаммов типовых подвидов не имели замен, так же как и последовательности ASV ab65 и lbc4. Последовательности ASV 8881 и b956 имели по одной замене в позициях 241 (Ц/Т) и 358 (Т/Ц) соответственно. Внутривидовая идентификация для группы последовательностей вида *B. longum* затруднительна по V3–V4 вариабельным участкам.

Кластер последовательностей вида B. animalis включал подвиды *B. animalis* subsp. lactis. *B. anima*lis subsp. animalis и две ASV. Последовательность ASV 5231 показала отсутствие замен с последовательностью типового штамма *B. animalis* subsp. lactis, и может быть идентифицирована как подвид B. animalis subsp. lactis (рис. 3, табл. 2). Вторая последовательность (ASV 5e09) по сравнению с последовательностями типовых штаммов имела одну замену в позиции 241 (Ц/Т) и сформировала собственную ветвь в данном кластере, поэтому разрешить ее идентификацию на уровне подвида затруднительно. Для последовательностей, отнесенных к группе B. animalis по V3-V4 вариабельным участкам, можно корректно разрешить идентификацию не только на уровне вида, но и в некоторых случаях до его подвидов.

ASV a516 и 5cd2 сформировали кластеры, общие с последовательностями типовых штаммов *B. angulatum* DSM 20098^T и *B. bifidum* JCM 1255^T соответственно. Их последовательности показали отсутствие замен с последовательность ASV a516 может быть идентифицирована как *B. angulatum*, а для последовательности ASV 5cd2 подтверждена



Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по V3–V4 вариабельным фрагментам гена 16S рPHK для филотипов, отнесенных к роду *Bifidobacterium*, и типовых штаммов бифидобактерий. Отображены значения бутстреп-поддержки выше 75%.

идентификация по референсной базе данных SILVA 132 как *B. bifidum* (рис. 3, табл. 2).

Наименее разрешенной оказалась идентификация ASV, попавших в кластер последовательностей, сформированный двумя группами штаммов, которые по V3–V4 вариабельным участкам имеют высокое сходство. Первая группа была представлена типовыми штаммами *B. catenulatum, B. kashiwanohense, B. pseudocatenulatum* и ASV

ГЕНЕТИКА том 56 № 8 2020

43е3. Вторая группа содержала виды *B. adolescentis, B. strecoris, B. faecale* и ASV d7ab. В этом же кластере последовательность типового штамма *B. ruminantium* так же, как и ASV 702с, формировала самостоятельные ветви (рис. 3). Полная идентичность последовательностей ASV d7ab и 702с с несколькими типовыми штаммами по V3–V4 вариабельным участкам не позволяет разрешить их видовую идентификацию с использованием дан-



Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное по V2—V6 вариабельным районам гена 16S рРНК для типовых штаммов бифидобактерий. Отображены значения бутстреп-поддержки выше 75%. Пунктирной линией объединены последовательности, находившиеся в одном кластере при использовании вариабельного фрагмента V3—V4.

ного фрагмента, эти последовательности могут быть определены только на уровне рода как *Bi*-*fidobacterium*.

Рибосомная филогения бифидобактерий

В случае использования V3–V4 вариабельных участков филогению не удалось разрешить для кластеров *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* и *B. kashiwanohense*; *B. adolescentis*, *B. stercoris* и *B. faecale*; *B. anseris*, *B. choerinum*, *B. italicum* и *B. pseudolongum*. Не удалось разрешить филогению для таких пар видов, как *B. coryneforme* и *B. indicum*, *B. crudilactis* и *B. psychroaerophilum*, *B. gallinarum* и *B. saeculare*; *B. eulemuris* и *B. lemurum*; *B. thermacidophilum* и *B. thermophylum*, *B. saguini* и *B. imperatoris*, а также для *B. moukalabense* и *B. dentium*.

Построение филогенетического дерева для всех представителей рода *Bifidobacterium* по вариабельным участкам V2–V6 позволило разрешить филогению для кластеров *B. catenulatum*, *B. longum* и *B. adolescentis* (рис. 4). Последовательности *B. coryneforme* и *B. indicum* были полностью идентичны, и поэтому они являлись единственными видами, для которых филогения осталась не разрешена. На основании генетического расстояния, рассчитанного с использованием полногеномных последовательностей, ранее было предложено объединить эти два вида в один [23].



Рис. 5. Геодезическое расстояние между филогенетическими деревьями, построенными на основе вариабельных участков гена 16S рРНК и их сочетаний.

Для поиска наиболее оптимального участка гена 16S рРНК, позволяющего идентифицировать виды бифидобактерий, было проведено сравнение деревьев, построенных с использованием разных вариабельных участков и их комбинаций. Результаты показали, что попарное расстояние между вариабельным участком V2 и V2–V6 было наименьшим (рис. 5). Это свидетельствует о том, что топология дерева, построенного на основании вариабельного участка V2, наиболее сходна с топологией дерева, построенного по участку V2–V6. Наибольшее расстояние было получено для вариабельного участка V6, что предполагает большее отличие топологии дерева по данному участку от топологии дерева по участку V2–V6.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка возможности видовой идентификации бифидобактерий по различным вариабельным районам гена 16S рРНК

На сегодняшний день в международных базах данных присутствует большое число неполных последовательностей гена 16S рРНК для различных видов бактерий, в которых, как правило, от-

ГЕНЕТИКА том 56 № 8 2020

сутствуют начало и конец гена. Эта техническая проблема связана с методическими подходами, используемыми для рибосомной идентификации бактерий: амплификация на консервативных праймерах и секвенирование по Сэнгеру соответствующего ампликона. Для некоторых штаммов полную последовательность гена 16S рРНК можно получить только из аннотированной последовательности генома.

При NGS-секвенировании на платформе Illumina для оценки микробного разнообразия используют различные вариабельные участки гена 16S pPHK. Исследования показали, что длина анализируемой последовательности, наряду с конкретной комбинацией пар праймеров, используемых для секвенирования короткого ампликона, может существенно повлиять на точность и чувствительность таксономической дискриминации, а также на оценку численности бактериальных таксонов [24].

Анализ некоторых вариабельных фрагментов показал определенные недостатки их использования в микробной таксономии. Во-первых, некоторые районы содержат ГЦ-богатые участки, секвенирование которых на платформе Illumina происходит со значительно низким качеством. Положение одного из таких поли-Г-гомополимеров (ГГЦ <u>ГГГГГ</u>ЦЦГЦЦЦ) соответствует участку 948—962 и находится в пределах V6—V8 вариабельного района, что предполагает трудности в достижении точности секвенирования.

Еще одна сложность с корректной репрезентацией бифидобактерий в кишечных микробиомах связана с недостаточной гомологией стандартных праймеров, используемых для амплификации. Например, по фрагментам V1–V3 и V4–V6 затруднительно детектировать некоторые группы кишечной микробиоты, в том числе бифидобактерии и таксоны с высоким содержанием ГЦ [24, 25]. Праймеры, фланкирующие районы V1 и V6, не позволяют амплифицировать большинство видов бифидобактерий.

Для профилирования микробиома с помощью ампликонового секвенирования в последнее время чаще всего используют вариабельные участки V3–V4 [24]. В настоящей работе показано, что бифидобактерии по этому фрагменту преимущественно могут быть идентифицированы только до рода, видовая характеристика подтверждена рибосомной филогенией только для некоторых видов (рис. 3).

Разрешающая способность вариабельных участков гена 16S рРНК

Для филогенетических деревьев, построенных на основании последовательностей различных вариабельных участков гена 16S рРНК и их сочетаний для типовых штаммов бифидобактерий, наблюдаются отличия геодезических расстояний по сравнению со средними значениями для бактерий и архей, полученными ранее. Для бактерии и архей в целом наиболее близким по топологии к полноразмерной последовательности гена 16S рРНК является V4 вариабельный участок, в то время как для представителей рода Bifidobacterium таковым является участок V2. При этом наибольшие отличия у бактерий и архей определены для участка V2, а у бифидобактерий – V3–V4 [14]. Основные функциональные части малой субъединицы рибосомы – петля 690 и декодирующий центр – приходятся на V4, V5 и V6 вариабельные участки. Опубликованные данные позволяют объяснить полученные различия в изменчивости различных вариабельных участков. Петля 690 расположена на поверхности 30S-субъединицы и участвует в различных взаимодействиях: с тРНК, связанной с Р-сайтом, мРНК в Е-сайте, с белками S11 и IF3, а также участвует в РНК-РНК взаимодействиях с петлей 790 16S рРНК и доменом IV 23S рРНК. Данный участок является наиболее консервативным в V4 вариабельной области гена 16S рРНК [14]. Авторы указывают, что ранее не сообщалось о функциональной важности участка V2, поэтому для него характерна большая изменчивость [14]. Консервативность участка V2 у бифидобактерий теоретически можно подтвердить анализом вторичной структуры рибосомного оперона, что может представлять интерес для дальнейших исследований.

По сравнению с литературными данными, для бифидобактерий можно отметить очень высокое значение геодезического расстояния для участков V3, V4, V5 и V6. Участки V1 и V7-V9 не рассматривались в данной работе, так как присутствовали не во всех последовательностях типовых штаммов бифидобактерий (Приложение, табл. 1). Данное различие может быть вызвано тем, что участки V4, V5 и V6, задействованные в реакционном центре и являющиеся важными функциональными частями, обычно более стабильны и накапливают в себе меньше мутаций. В результате эти области могут позволить реализовать более стабильную филогенетическую топологию среди крупных бактериальных таксонов, что обозначает лучшее филогенетическое разрешение. Различия, возникающие в менее важных регионах, таких как участки V3 и V7, выполняющих структурную и стабилизирующую функции, могут разрешать филогению на более низких таксономических уровнях.

В данном случае можно сказать, что участок V3–V4 не является лучшим участком для идентификации бифидобактерий до уровня вида, так как при использовании данного фрагмента не удалось разрешить филогению для 23 видов, что составляет одну треть от всех валидированных видов *Bifidobacterium*. Филогенетический анализ вариабельного участка V2 позволяет разрешить на шесть видов больше и даже позволяет различить подвиды *B. thermacidophilum* и *B. animalis*.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Turroni F, Milani C., Van Sinderen D., Ventura M. Bifidobacteria: ecology and coevolution with the host // The Bifidobacteria and Related Organisms: Biology, Taxonomy, Applications. N.Y.: Acad. Press, 2018. P. 213–220.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00012-0

- Ventura M., Canchaya C., Tauch A. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2007. V. 71. № 3. P. 495–548. https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07
- 3. *Turroni F., van Sinderen D., Ventura M.* Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium* // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 149. № 1. P. 37–44. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010
- Turroni F, Peano C., Pass D.A. et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. P. e36957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036957
- Ракова Е.Б., Немченко У.М., Попкова С.М. и др. Видовая характеристика бифидобактерий в кишечном биотопе детей с функциональной диспепсией // Клинич. лаб. диагностика. 2015. Т. 60. № 10. С. 50–53.
- 6. *Немченко У.М., Савелькаева М.В., Ракова Е.Б. и др.* Микроэкологическая характеристика кишечного биоценоза у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта // Клинич. лаб. диагностика. 2016. Т. 61. № 6. С. 368–371.
- 7. Григорова Е.В., Ракова Е.Б., Савелькаева М.В. и др. Дизадаптивная перестройка микробиоценоза толстого кишечника у детей 3–6 месяцев жизни под влиянием бактерий рода *Klebsiella* // Журн. инфектологии. 2017. Т. 9. № 1S. С. 58.
- 8. Григорова Е.В., Иванова Е.И., Немченко У.М., Савелькаева М.В. Детекция факторов патогенности в штаммах Klebsiella spp. как основного этиологического агента при формировании функциональных гастроинтестинальных расстройств у детей первого года жизни // Журн. инфектологии. 2018. Т. 10. № S4-1. С. 70.
- 9. Ракова Е.Б., Попкова С.М., Немченко У.М. и др. Особенности микробиоценозов у детей, проживающих в условиях техногенного прессинга // Гигиена и санитария. 2011. № 4. С. 22–26.
- Немченко У.М., Ракова Е.Б., Попкова С.М. и др. Структура дисбиозов кишечника у детей дошкольного возраста за многолетний период наблюдений // Клинич. лаб. диагностика. 2015. Т. 60. № 2. С. 63–65.
- Немченко У.М. Микроэкологический статус кишечного биоценоза и видовая архитектоника бифидобактерий у детей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск: Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, 2014. 20 с.
- Lagier J.-C., Million M., Hugon P. et al. Human gut microbiota: repertoire and variations // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2012. V. 2. P. 136. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00136
- 13. *Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A. et al.* Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark

matter // Nature. 2013. V. 499. № 7459. P. 431–437. https://doi.org/10.1038/nature12352

- Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17. № 135. PMC4802574 https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y
- Billera L.J., Holmes S.P., Vogtmann K. Geometry of the space of phylogenetic trees // Adv. Appl. Math. 2001. V. 27 № 4. P. 733–767. https://doi.org/10.1006/aama.2001.0759
- 16. Owen M., Provan J.S. A fast algorithm for computing geodesic distances in tree space // IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform. 2011. V. 8. № 1. P. 2–13. https://doi.org/10.1109/TCBB.2010.3
- Белькова Н.Л., Немченко У.М., Погодина А.В. и др. Особенности состава и структуры кишечного микробиома подростков с ожирением и разной продолжительностью грудного вскармливания // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 6. С. 717–721.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. № 8. P. 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9
- 19. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nat. Methods. 2016. V. 13. № 7. P. 581. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869
- 20. *Raaijmakers J.G.* Statistical analysis of the Michaelis– Menten equation // Biometrics. 1987. V. 43. № 4. P. 793–803. https://doi.org/10.2307/2531533
- Thompson J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673
- 22. *Hillis D.M., Bull J.J.* An Empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis // Syst. Biol. 1993. V. 42. № 2. P. 182–192. https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182
- 23. Sun Z., Zhang W., Guo C. et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus bifidobacterium: a snapshot of its genetic diversity and evolution // PLoS One. 2015. V. 10. № 2. P. e0117912. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117912
- 24. *Alcon-Giner C., Caim S., Mitra S. et al.* Optimisation of 16S rRNA gut microbiota profiling of extremely low birth weight infants // BMC Genomics. 2017. V. 18. N

 1. P. 841.

https://doi.org/10.1186/s12864-017-4229-x

25. *Walker A.W., Ince J., Duncan S.H. et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota // ISME J. 2011. V. 5. № 2. P. 220–230.

https://doi.org/10.1038/ismej.2010.118

ГЕНЕТИКА том 56 № 8 2020

КЛИМЕНКО и др.

The Ability to Taxonomic Identify of Bifidobacteria Based on the 16S rRNA Gene Variable Regions

E. S. Klimenko^{*a*, *}, A. V. Pogodina^{*a*}, L. V. Rychkova^{*a*}, and N. L. Belkova^{*a*}

^aScientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia *e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com

Bifidobacteria are considered key commensals of the human intestinal tract, they dominate the community in the earliest stages of life and are the first to respond to stress factors. The metasequencing of the V3–V4 16S rRNA fragments made it possible to identify 12 phylotypes of bifidobacteria in the gut microbiome of adolescents, which accounted for from 0.0001 to 0.9% of the total microbiome. A phylogenetic analysis of the obtained phylotypes was conducted, such species as *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis* as well as subspecies *B. animalis* subsp. *lactis* have been identified. The species of bifidobacteria excluded from identification by V3–V4 variable regions have been identified. The phylogenetic analysis of different variable regions and their combinations showed that a tree topology based on V2 fragment is most similar to a tree topology based on the complete gene.

Keywords: bifidobacteria, intestinal microbiome, 16S rRNA gene, variable regions, ribosomal taxonomy, high throughput sequencing.