

АНАЛИЗ СИСТЕМ ПРАЙМЕРОВ НА ГЕН 16S рРНК ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

© 2019 г. А. Ю. Меркель^{а,*}, И. Ю. Тарновецкий^б, О. А. Подосокорская^а, С. В. Тощак^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

^бМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alexandrmerkel@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2018 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята к публикации 02.07.2019 г.

Термофильные микроорганизмы представляют особый интерес с точки зрения филогенетики и изучения эволюции прокариот, так как многие из них являются представителями глубоких филогенетических ветвей дерева жизни. Этим обстоятельством обусловлено то, что многие широко применяемые универсальные праймерные системы на ген 16S рРНК элиминируют из спектра детекции те или иные группы термофильных прокариот. В данной работе мы проанализировали известные на сегодняшний день системы праймеров на ген 16S рРНК с целью оценки их способности выявлять представителей глубоких филогенетических линий прокариот, содержащих термофильные микроорганизмы. Показано, что использование большинства из опубликованных систем праймеров может вести к элиминации тех или иных групп термофильных прокариот. На основании *in silico* анализа уже существующих систем праймеров была выбрана система праймеров на V3–V4 регион гена 16S рРНК, которая обладает минимизированным эффектом элиминации групп термофильных прокариот. При использовании высокопроизводительного секвенирования проведен анализ предложенной системы праймеров в сравнении с ранее опубликованными системами. В результате статистического анализа результатов секвенирования, основанного на подсчете индекса Шеннона и значения *Chao1*, показана высокая эффективность использования предложенной системы при анализе микробных сообществ высокотемпературных источников Камчатки.

Ключевые слова: ПЦР, праймеры, ген 16S рРНК, термофильные микробные сообщества, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.1134/S0026365619060119

За последние несколько лет благодаря технологии высокопроизводительного секвенирования и метагеномным подходам к исследованию микробных сообществ, а также успехам в культивировании микроорганизмов новых глубоких филогенетических линий, наши представления о филогенетическом разнообразии прокариот были значительно расширены (Mori et al., 2009; Parks et al., 2017; Sorokin et al., 2018). Одновременно с этим возрастает необходимость и востребованность модификации и улучшения имеющихся методов качественной и количественной оценки состава микробных сообществ с целью повышения их инклюзивности в отношении новых таксонов и филогенетических линий микроорганизмов.

На сегодняшний день стандартом высокоинформативного анализа состава микробных сообществ является метод профилирования по гену 16S рРНК с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования (Carpaso et al., 2011). Главным преимуществом этого метода является возможность анализировать сотни об-

разцов, получая при этом тысячи последовательностей для каждого образца, при относительно невысокой себестоимости самого анализа (de Muinck et al., 2017). Благодаря этому за последние годы было проведено огромное количество исследований состава как симбиотических, так и свободноживущих микробных сообществ (Hugert, Andersson, 2017). Одним из главных недостатков данного метода является значительная обусловленность получаемых результатов выбором той или иной праймерной системы (Yang et al., 2016; Thijs et al., 2017; Peng et al., 2018). К сожалению, на сегодняшний день так и не удалось создать систему универсальных праймеров на ген 16S рРНК, которая бы позволяла с одинаковой эффективностью амплифицировать участки этого гена всех известных филогенетических линий прокариот.

Термофильные микроорганизмы и их сообщества вызывают живой интерес ученых на протяжении четырех последних десятилетий, что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, ряд теорий основывается на предположении, что

именно термальные места обитания стали местом зарождения жизни на нашей планете (Russell et al., 1988; Martin, Russell, 2003; Martin et al., 2008; Mulkiidjanian et al., 2012). Во-вторых, многие экотопы, ассоциированные с геотермальной активностью, способны существовать независимо от энергии Солнца (McCullom, Shock 1997; Preiner et al., 2018). В-третьих, исследование термофильных микроорганизмов имеет важное практическое значение, поскольку они способны синтезировать термостабильные внеклеточные ферменты, ценные для биотехнологии (Dalmaso et al., 2015; Counts et al., 2017; Wohlgenuth et al., 2018). Наконец, ряд термофильных микроорганизмов представляют особый интерес для филогенетики и изучения эволюции прокариот, так как являются представителями глубоких филогенетических ветвей дерева жизни (Miroshnichenko, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Takai, Nakamura, 2011; Weiss et al., 2017). Именно последним обстоятельством объясняется тот факт, что многие широко применяемые универсальные праймерные системы на ген 16S рРНК элиминируют ряд глубоких филогенетических групп термофильных прокариот.

Горячие источники Камчатки являются модельными объектами изучения термофильных микробных сообществ. Целью настоящего исследования было проанализировать известные на сегодняшний день системы праймеров на ген 16S рРНК для оценки их способности амплифицировать гены представителей глубоких филогенетических линий прокариот, содержащих термофильные микроорганизмы, на примере микробных сообществ горячих источников Камчатки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования — три термофильные микробные сообщества, образцы которых были получены в ходе экспедиции в кальдере Узон (Кроноцкий государственный заповедник, Камчатка) в 2015 году. Образцы были отобраны из горячих источников “Солнечный” (температура 52°C; рН 6.1; Eh –34 мВ), “Термофильный” (температура 67°C; рН 6.1; Eh –90 мВ) и “Извилистый” (температура 77°C; рН 5.85; Eh 20 мВ). Образцы отбирали в 50 мл стеклянные флаконы с газонепроницаемыми пробками, которые были затем герметично запечатаны и транспортированы в лабораторию при температуре окружающей среды. Кроме того, в некоторых экспериментах использовали образец человеческого кала как пример мезофильного микробного сообщества.

Секвенирование библиотек 16S рРНК. ДНК из образцов выделяли по ранее описанной методике (Lever et al., 2015). Приготовление библиотек фрагментов 16S рРНК осуществляли путем одного раунда амплификации согласно методике Fadrosh et al. (2014). В качестве последовательностей, фланкирующих V3–V4 гипервариабельный уча-

сток гена 16S рРНК, были использованы участки отжига праймеров Pro-341F–Pro-805R (Takahashi et al., 2014). Помимо праймеров Pro-341F–Pro-805R проводили анализ эффективности профилирования для пары праймеров 341F (Frey et al., 2016) и Pro-mod-805R (эта работа), а также I-341F–Pro-mod-I-805R. В качестве последовательностей, фланкирующих только V4 гипервариабельный участок гена 16S рРНК, использовали участки отжига праймеров UNIV-515F–UNIV-806R (Sarasano et al., 2012). Для постановки ПЦР использовали 5× Taq Red buffer и HS Taq полимеразу (“Евроген”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Конечная концентрация праймеров во всех случаях была 1 мкМ. Конечный объем реакции составлял 30 мкл. Каждый образец ДНК был амплифицирован в трех повторностях. Затем повторности объединяли и визуализировали в 2% агарозном геле при длине волны 470 нм. Нужную полосу ДНК вырезали и очищали при помощи набора Standard Cleanup Gel Extraction Kit (“Евроген”, Россия). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Qubit® 2.0 с набором реагентов HS Assay Kit (“Life Technologies”, США). Перед секвенированием библиотеки эквимольно смешивали и разводили полученный раствор ДНК до 4 нМ. Дальнейшую денатурацию пула библиотек и подготовку к секвенированию проводили согласно стандартному протоколу Illumina Sample Preparation Guide на платформе MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов) (“Illumina”, США). Первичная обработка данных, формирование ОТЕ-таблицы, анализ таксономического состава и альфа-метрик разнообразия были проведены с помощью QIIME (версия 1.9.1; Sarasano et al., 2010) и сервиса SILVA online data analysis service (Quast et al., 2013). Все полученные данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA546132.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор региона гена 16S рРНК для разработки универсальных праймеров. На первом этапе работы нами *in silico* были проанализированы 85 уникальных последовательностей праймеров на ген 16S рРНК, считающихся универсальными для бактерий, архей или для обоих прокариотических доменов жизни (табл. 1). Все праймеры были разбиты на группы в зависимости от участка гена 16S рРНК, на который они были разработаны авторами. Затем для каждого участка было подсчитано среднее покрытие этими праймерами филогенетического разнообразия бактерий и архей по отдельности. Анализ производили с использованием online ресурса Silva TestProbe 3.0 (Quast et al., 2013).

На основе полученных данных в качестве левого был выбран V3–V4 регион гена 16S рРНК: этот регион фланкируется 337–365 и 781–806

Таблица 1. Анализ среднего покрытия разнообразия бактерий и архей праймерами в зависимости от консервативного участка гена 16S рРНК

Участок*	Количество проанализированных праймеров	Покрытие, %			
		праймеры, специфичные к домену <i>Bacteria</i>	праймеры, специфичные к домену <i>Archaea</i>	универсальные праймеры	
				бактерии	археи
967–985	3	62.0	–	–	–
906–935	12	84.7	80.7	–	–
7–38	10	79.4	67.9	–	–
781–806	12	81.2	86.7	91.3	90.7
515–540	17	89.6	86.4	91.0	54.7
337–365	12	90.5	66.1	87.4	73.8
1492–1510	3	–	–	71.1	78.4
1390–1407	5	–	–	78.9	72.5
1091–1114	2	85.6	–	–	–
1061–1080	4	89.0	–	–	–
1046–1070	5	62.4	–	–	–

* Нумерация нуклеотидов 16S рРНК основана на номенклатуре *Escherichia coli*.

консервативными участками гена 16S рРНК в соответствии с нумерацией нуклеотидов, основанной на номенклатуре для *Escherichia coli*. Участок 781–806 имеет наилучшие показатели покрытия бактерий и архей – 91.3 и 90.7% соответственно, тогда как участок 337–365 дает 87.4 и 73.8% покрытия соответственно. Показатели по покрытию других участков были значительно хуже: участок 515–540 показывает относительно слабое покрытие архей (54.7%), тогда как участки 1492–1510 и 1390–1407 демонстрируют относительно слабое покрытие бактерий (71.1 и 78.9% соответственно). Средняя длина ампликона при использовании консервативных участков 337–365 и 781–806 составляет 464 нуклеотида (Klindworth et al., 2013), что хорошо подходит для широко используемого высокопроизводительного секвенатора Illumina MiSeq с применением наборов реактивов, обеспечивающих общую длину чтения 500 нуклеотидов и более. Кроме того, такая длина ампликона обеспечивает более высокую информативность анализа, в сравнении с часто применяющимся анализом V4 региона. Наши выводы согласуются с данными многих публикаций, в которых применимость V3–V4 региона для анализа микробных сообществ оценивалась выше по сравнению с другими регионами: анализ этого региона давал большее количество таксонов прокариот в природных микробных сообществах и более адекватное описание искусственно сформированных микробных ассоциаций (Castelino et al., 2017; Graspeuntner et al., 2018).

***In silico* анализ опубликованных универсальных праймеров на V3–V4 регион гена 16S рРНК.** Нами было *in silico* проанализировано 13 часто применяющихся праймеров на 337–365 позицию гена 16S рРНК и 15 часто применяющихся праймеров

на 781–806 позицию гена 16S рРНК (табл. 2). В результате этого анализа было показано, что использование всех опубликованных систем праймеров может вести к элиминации тех или иных групп термофильных прокариот и/или других экологически значимых групп микроорганизмов. Анализ производился с использованием online ресурса Silva TestProbe 3.0 (Quast et al., 2013).

Для подбора праймерной системы с минимизированным эффектом элиминации групп термофильных прокариот были получены консенсусные последовательности для всех проанализированных праймеров на 337–365 и 781–806 позиции гена 16S рРНК. Для позиции 337–365, таким образом, была получена последовательность 5'-CCTAYGGRNBGCWSCAG-3', кодирующая смесь из 192 индивидуальных олигонуклеотидов, а для позиции 781–806 последовательность 5'-GACTACNVGGGTHTCTAAKCC-3', кодирующая смесь из 72 индивидуальных олигонуклеотидов. Каждый из этих индивидуальных олигонуклеотидов затем был отдельно проанализирован с использованием online ресурса Silva TestProbe 3.0 (Quast et al., 2013) с целью выявления последовательностей, необходимых для наиболее полного покрытия разнообразия термофильных прокариот и других экологически значимых групп микроорганизмов.

Для позиции 337–365 было получено 19 значимых вариантов индивидуальных олигонуклеотидов, а для позиции 781–806 – 20 значимых вариантов. Затем для данного набора индивидуальных олигонуклеотидов были сгенерированы консенсусные последовательности. Для позиции 337–365, таким образом, получена последовательность 5'-CCTAYGGGDBGWSCAG-3', а для позиции 781–806 – последовательность

Таблица 2. Анализ опубликованных праймеров на 337–365 и на 781–806 участки гена 16S рРНК

Олигонуклеотидная последовательность (5'–3')	Ссылка	Пример элиминируемых групп термофильных прокариот (покрытие разнообразия менее 70%)	Пример элиминируемых экологически значимых групп прокариот (покрытие разнообразия менее 50%)
Позиция 337–365*			
CCTACGGGNBGCASCAG	Takahashi et al., 2014	p_Acetothermiia	p_Thaumarchaeota; p_Planctomycetes
GGCCCTAYGGGGYGCASCAGGC	Kublanov et al., 2009	d_Bacteria; p_Nanoarchaeaeota	d_Bacteria
ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	el Fantroussi et al., 1999	d_Archaea	d_Archaea
CCTACGGGRSGCAGCAG	Baker et al., 2003	p_Korarchaeota; p_Nanoarchaeaeota	p_Thaumarchaeota; p_Planctomycetes
GYGCASCAGKCGMGAAW	Takai, Horikoshi, 2000	d_Bacteria; p_Korarchaeota	d_Bacteria
CCTACGGGAGGCAGCAG	Juck et al., 2000	d_Archaea	d_Archaea
TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Li et al., 2010	d_Archaea	d_Archaea
CCTACGGGNGGCWGCAG	Herlemann et al., 2011	d_Archaea	d_Archaea
TACGGRAGGCAGCAG	Nossa et al., 2010	d_Archaea	d_Archaea
CCCTACGGGGYGCASCAG	Ovreås et al., 1997	d_Bacteria; p_Thaumarchaeota	d_Bacteria
TGCTGCCTCCCGTAGGAGT (RC)	Fierer et al., 2008	d_Archaea	d_Archaea
GGAGGCAGCAGTRRGAAT	Nossa et al., 2010	d_Archaea	d_Archaea
CCTAYGGGDBGCWSCAG	Frey et al., 2016	p_Korarchaeota	—
Позиция 781–806 ¹			
GGACTACSSGGGTATCTA (RC)	Baker et al., 2003	d_Bacteria; p_Nanoarchaeaeota	d_Bacteria
GGACTACVSGGGTATCTAAT	Wang, Qian, 2009	d_Bacteria; p_Nanoarchaeaeota	d_Bacteria
GGACTACCAGGGTATCTAAT	Wang, Qian, 2009	d_Archaea; p_Thermotogae	d_Archaea
GGACTACHVGGGTATCTAAT	Walters et al., 2011	p_Acetothermia; p_Nanoarchaeaeota	p_Chloroflexi
AGGATTAGATACCCTGGTA	Andersson et al., 2008	d_Archaea; p_Thermosulfidibacteraeota p_Thermotogae	d_Archaea
TACNVGGGTATCTAATCC	Claesson et al., 2010	—	p_Chloroflexi
CTACCAGGGTATCTAATCC	Juck et al., 2000	d_Archaea; p_Acetothermia	d_Archaea
TACHVGGGTATCTAAKCC	Lucena et al., 2010	p_Acetothermia; p_Hydrothermae	p_Chloroflexi
GGACTACCAGGGTATCTAATCCT-GTT	Li et al., 2010	d_Archaea; p_Thermotogae	d_Archaea
GACTACCAGGGTATCTAAT	Frank et al., 2007	d_Archaea; p_Acetothermia; p_Deinococcus-Thermus	d_Archaea
GACTACHVGGGTATCTAATCC	Herlemann et al., 2011	p_Nanoarchaeaeota	P_Chloroflexi

Таблица 2. Окончание

Олигонуклеотидная последовательность (5'–3')	Ссылка	Пример элиминируемых групп термофильных прокариот (покрытие разнообразия менее 70%)	Пример элиминируемых экологически значимых групп прокариот (покрытие разнообразия менее 50%)
CTACCRGGGTATCTAATCC	Nossa et al., 2010	d_Archaea; p_Acetothermia	d_Archaea; p_Cyanobacteria
GACTACNVGGGTATCTAATCC	Takahashi et al., 2014	c_Anaerolineae	–
GGACTACHVGGGTWTCTAAT	Caporaso et al., 2011	p_Acetothermia; p_Hydrothermae	–
GGACTACNVGGGTHTCTAAT	Frey et al., 2016	–	p_Omnitrophicaeota

* Нумерация нуклеотидов 16S рРНК основана на номенклатуре *E. coli*; приставка “d_” перед таксономической группой указывает на ранг домена, “p_” – на ранг филума. Классификация дана в соответствии с базой данных SILVA SSU r132.

5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3'. Именно эти последовательности праймеров были задействованы для дальнейшего анализа. Полученная последовательность для позиции 337–365 точно соответствует последовательности праймера 341F (Frey et al., 2016), а праймер на позиции 781–806 назван нами Pro-mod-805R (по аналогии с Takahashi et al., 2014). Далее был проведен сравнительный анализ покрытия отдельных филогенетических групп прокариот парой праймеров 341F – Pro-mod-805R и двумя другими наиболее широко применяемыми парами праймеров: Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014) и UNIV515F–UNIV806R (Caporaso et al., 2012) (табл. 3). Этот вид анализа был проведен с использованием online ресурса Silva Test-Prime 1.0 (Quast et al., 2013).

Проведенный анализ показал, что система 341F–Pro-mod-805R дает наибольший процент покрытия разнообразия как архей, так и бактерий в целом. При этом разнообразие некоторых групп архей и бактерий лучше покрывается парой праймеров UNIV515F–UNIV806R (Caporaso et al., 2012). В частности, недавно предложенный филум *Asgardaeota* (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017; здесь и далее классификация дана в соответствии с базой данных SILVA SSU r132) покрывается парой праймеров UNIV515F–UNIV806R на ~78%, тогда как анализированные пары праймеров на V3–V4 регион почти полностью элиминируют эту группу архей. Прирост в покрытии разнообразия при использовании пары праймеров UNIV515F–UNIV806R наблюдается и для двух других групп архей – филума *Korarchaeota* и класса *Woesearchaeia*. В сравнении с парой праймеров 341F–Pro-mod-805R покрытие возрастает от 33.3 до 45.5% и от 49.2 до 79.2% соответственно. Однако в целом пара праймеров UNIV515F–UNIV806R покрывает архейное разнообразие значительно хуже, чем пара праймеров 341F–Pro-mod-805R: 52.9 и 81.6% соответственно. В частности, пара праймеров UNIV515F–UNIV806R почти полностью эли-

нирует филумы *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota*, а также класс *Nanoarchaeia*. Значительный прирост в покрытии разнообразия при использовании пары праймеров UNIV515F–UNIV806R наблюдается также для двух групп бактерий – филума *Cyanobacteria* и филума *Planctomycetes*, однако в целом пара праймеров UNIV515F–UNIV806R покрывает бактериальное разнообразие несколько хуже, чем пара праймеров 341F–Pro-mod-805R: 86.8 и 88.1% соответственно. Так, например, пара праймеров UNIV515F–UNIV806R элиминирует значительную часть разнообразия флотипов филумов *Acetothermia*, *Caldiserica*, *Hydrothermae* и др.

In vitro анализ предложенной системы праймеров в сравнении с ранее опубликованными. На следующем этапе работы мы провели экспериментальный анализ системы 341F–Pro-mod-805R в сравнении с ранее опубликованными системами Pro341F–Pro805R и UNIV515F–UNIV806R. Кроме того, в качестве эксперимента нами был использован аналог пары праймеров 341F–Pro-mod-805R, но с заменой высоковырожденных нуклеотидов (D, B, V и N) на дезоксиинозин. Дезоксиинозин был впервые обнаружен на 5'-конце антикодонов тРНК, что позволяет им узнавать разные кодоны матричной РНК в ходе биосинтеза белка. Эта позиция известна как “колеблющееся” (англ. wobble) положение Уотсона–Крика (Crick, 1966). Дезоксиинозин образует водородные связи с любым из четырех основных нуклеотидов, однако термодинамическая стабильность таких пар будет не одинакова (Watkins, SantaLucia, 2005). Тем не менее, замена вырожденных оснований в ПЦР праймерах на дезоксиинозин была успешно применена во многих случаях, при этом было зафиксировано значимое повышение эффективности ПЦР в сравнении со стандартными вырожденными праймерами (Patil, Dekker, 1991; Palva et al., 1994). Последовательность использованных нами праймеров с дезоксиинозином была следующая:

Таблица 3. Сравнительный анализ покрытия отдельных филогенетических групп прокариот широко применяемыми праймерами на ген 16S рРНК

341F (Frey et al., 2016) CCTAYGGGDBGCWSCAG Pro-mod-805R (это исследование) GACTACNVGGGTMTCTAATCC	Pro341F CCTACGGGNBGCASCAG Pro805R GACTACNVGGGTATCTAATCC (Takahashi et al., 2014)	UNIV515F GTGCCAGCMGCCGGGTAA UNIV806R GGACTACHVGGGTWTCTAAT (Caporaso et al., 2012)
d_Archaea (81.6) d_Bacteria (88.1)	d_Archaea (65.2) d_Bacteria (85.8)	d_Archaea (52.9) d_Bacteria (86.8)
Домен Archaea		
p_Altiarchaeota (25.8) p_Asgardaota (2.6) p_Crenarchaeota (75.1) p_Diapherotrites (39.2) p_Euryarchaeota (89.0) p_Hadesarchaeota (85.5) p_Hydrothermarchaeota (93.4) p_Korarchaeota (33.3) p_Nanoarchaeota (53.0) c_Nanoarchaeia (88.9) c_Nanohaloarchaeia (53.2) c_Woesearchaeia (49.2) p_Thaumarchaeota (89.8)	p_Altiarchaeota (25.8) p_Asgardaota (2.4) p_Crenarchaeota (73.1) p_Diapherotrites (38.2) p_Euryarchaeota (88.9) p_Hadesarchaeota (84.7) p_Hydrothermarchaeota (92.9) p_Korarchaeota (33.2) p_Nanoarchaeota (47.7) c_Nanoarchaeia (0.0) c_Nanohaloarchaeia (51.7) c_Woesearchaeia (48.9) p_Thaumarchaeota (7.8)	p_Altiarchaeota (0.0) p_Asgardaota (77.8) p_Crenarchaeota (3.3) p_Diapherotrites (16.7) p_Euryarchaeota (87.8) p_Hadesarchaeota (83.9) p_Hydrothermarchaeota (87.6) p_Korarchaeota (45.5) p_Nanoarchaeota (51.9) c_Nanoarchaeia (0.0) c_Nanohaloarchaeia (20.1) c_Woesearchaeia (79.2) p_Thaumarchaeota (0.5)
Домен Bacteria (выборочно)		
p_Acetothermia (90.9) p_Caldiserica (91.6) p_Chloroflexi (59.4) p_Cyanobacteria (78.5) p_Hydrothermae' (89.4) p_Nitrospirae (91.6) p_Patescibacteria (62.4) p_Planctomycetes (75.4)	p_Acetothermia (63.6) p_Caldiserica (91.6) p_Chloroflexi (40.0) p_Cyanobacteria (76.4) p_Hydrothermae' (86.8) p_Nitrospirae (91.4) p_Patescibacteria (48.0) p_Planctomycetes (2.5)	p_Acetothermia (23.6) p_Caldiserica (5.3) p_Chloroflexi (53.7) p_Cyanobacteria (80.3) p_Hydrothermae' (50.0) p_Nitrospirae (66.8) p_Patescibacteria (17.4) p_Planctomycetes (81.1)

Примечание. Жирным шрифтом выделен самый высокий процент покрытия группы среди проанализированных праймерных систем. Приставка "d_" перед таксономической группой указывает на ранг домена, "p_" — на ранг филума, "c_" — на ранг класса. Классификация дана в соответствии с базой данных SILVA SSU r132.

I-341F 5'-ССТАУГГГПГСВSCAG -3' и Pro-mod-I-805R 5'-GACTACIIGGGTMTCTAATCC-3'.

Статистический анализ системы 341F–Pro-mod-805R, в сравнении с ранее опубликованными системами Pro341F–Pro805R и UNIV515F–UNIV806R, был проведен на образцах тотальной ДНК микробных сообществ трех горячих источников Камчатки и одного образца человеческого кала. Результаты представлены в табл. 4. Анализируемыми показателями были индекс Шеннона и значение Chao1. Индекс Шеннона – это показатель разнообразия видов (типов) живых существ в экосистеме, который основан на средне-взвешенном геометрическом значении пропорциональной доли вида в сообществе (Tuomisto, 2010). Достоинством этого индекса является то, что он учитывает как общее количество видов, так и неоднородность их представленности в экосистеме. Значение Chao1 – это прогнозируемое количество видов (типов) в сообществе, которое основывается на имеющейся выборке и учитывает количество видов, представленных единожды или дважды в выборке (Chao, 1984). Таким образом, Chao1 – это показатель количества видов в сообществе при минимизации эффекта влияния объема выборки. Для всех проанализированных образцов была взята стандартизованная выборка в 10000 последовательностей.

Из анализа полученных результатов следует, что в трех из четырех типов микробных сообществ показатель Chao1 имеет наибольшее значение при использовании подобранной нами системы праймеров 341F–Pro-mod-805R. Исключением является образец микробного сообщества источника “Солнечный”, где системы Pro341F–Pro805R и UNIV515F–UNIV806R дают более высокие значения Chao1. Наибольший индекс Шеннона был получен при использовании системы 341F–Pro-mod-805R для образцов микробных сообществ источников “Извилистый” и “Термофильный” (температура 77 и 67°C соответственно). В случае ист. “Солнечный” (температура 52°C) наибольшее значение индекса Шеннона было достигнуто при использовании пары праймеров UNIV515F–UNIV806R, а в случае анализа образца кала – при использовании пары праймеров – Pro805R. Таким образом, на данном этапе мы можем говорить о том, что использование системы 341F–Pro-mod-805R будет оправдано при анализе микробных сообществ, адаптированных к высоким температурам, тогда как при анализе мезофильных микробных сообществ (кал) или умеренно термофильных микробных сообществ (ист. “Солнечный”) положительный эффект не наблюдается. Интересно, что при анализе индекса Шеннона система I-341F–Pro-mod-I-805R ни в одном из случаев не показывает лучший результат. При анализе источников с высокой температурой она показывает средний результат, в случае мезофильных микробных сообществ

(кал) или умеренно термофильных микробных сообществ (ист. “Солнечный”) – худший результат. По всей видимости, это связано со значительной разницей в термодинамической стабильности пар I–C, I–G, I–A и I–T (Watkins, SantaLucia, 2005). Отметим также, что показатели индекса Шеннона и значение Chao1, полученные при использовании системы UNIV515F–UNIV806R, имеют сильный провал в случае анализа источников с высокой температурой в сравнении с системой 341F–Pro-mod-805R, что позволяет сделать вывод о нежелательности использования системы праймеров UNIV515F–UNIV806R при анализе экстремально термофильных микробных сообществ. В случае же мезофильных микробных сообществ (кал) или умеренно термофильных микробных сообществ (ист. “Солнечный”) падение значений индекса Шеннона при использовании системы 341F–Pro-mod-805R оказалось незначительным.

В результате проведенной работы нами было показано, что использование широко применяемых на сегодняшний день систем праймеров может вести к элиминации из спектра детекции ряда групп термофильных прокариот. Использование пары праймеров, предложенной в статье Caropaso et al. (2012), может вести к элиминации таких важных для экологии термофильных прокариот филумов как *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Acetothermia*, *Caldiserica* и классов *Methanopyri*, *Archaeoglobi*, *Nanoarchaeia* и *Thermococci*. Использование пары праймеров, предложенной в статье Takahashi et al. (2014), может вести к элиминации таких важных для экологии термофильных прокариот групп, как *Nanoarchaeia*, *Thaumarchaeota*, *Chloroflexi*, а также к недооценке количественной представленности филума *Acetothermia*. Кроме того данная пара праймеров крайне слабо покрывает разнообразие филума *Planctomycetes*. Подобранная нами система праймеров на V3–V4 регион гена 16S рРНК обладает минимальным эффектом элиминации из спектра детекции этих групп микроорганизмов (см. табл. 3). Следует также отметить, что все три системы праймеров достаточно слабо (менее чем на 50%) покрывают разнообразие филума *Korarchaeota*.

При анализе состава микробных сообществ, развивающихся при умеренных температурах, необходимо учитывать и то, что использование праймеров с большим количеством вырожденных нуклеотидов нежелательно в связи со значительным в этом случае уменьшением действующих концентраций отдельных вариантов олигонуклеотидов. У системы 341F–Pro-mod-805R всего 8 вырожденных нуклеотидов, у системы, предложенной в статье Takahashi et al. (2014), – 5, а у системы, предложенной в статье Caropaso et al. (2012), – 4. К сожалению, система с дезоксиинозином, которая нами рассматривалась как возможная альтернатива системы 341F–Pro-mod-805R, но с отсутствием эф-

Таблица 4. Значения индекса Шеннона и Chao1 для проанализированных образцов в зависимости от использованной системы праймеров

Образец	Система праймеров	Индекс Шеннона	Chao1
Ист. “Солнечный”	Pro-mod-I	3.197	316
	Pro-mod	4.232	370
	Pro	4.294	512
	UNIV	4.296	437
Ист. “Термофильный”	Pro-mod-I	1.526	89
	Pro-mod	1.582	107
	Pro	1.262	83
	UNIV	0.527	68
Ист. “Извилистый”	Pro-mod-I	1.259	53
	Pro-mod	1.621	71
	Pro	1.108	43
	UNIV	0.922	65
Кал	Pro-mod-I	3.802	142
	Pro-mod	3.768	158
	Pro	3.855	153

Примечание. Серым цветом выделены наибольшие значения для данного образца. Pro-mod-I: I-341F 5'-CCTAYGGGIIIGCWSCAG-3' и Pro-mod-I-805R 5'-GACTACIIGGGTMTCTAATCC-3'; Pro-mod: 341F (Frey et al., 2016) 5'-CCTAYGGGDBGWCWSCAG-3' и Pro-mod-805R (эта работа) 5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3'; Pro: Pro341F 5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3' и Pro805R 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3' (Takahashi et al., 2014); UNIV: UNIV515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' и UNIV806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Caporaso et al., 2012).

фекта вырожденных нуклеотидов, показала свою непригодность в *in vitro* экспериментах.

Одним из важных достоинств подобранной в настоящей работе системы 341F–Pro-mod-805R является ее способность значительно покрывать разнообразие класса *Nanoarchaeia* (табл. 3). Это ее свойство позволило выявить присутствие в горячих источниках Камчатки наноархей и показать их значительную численность в этих экотопах (Merkel et al., 2017).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 17-74-30025, экспериментальные молекулярно-биологические работы) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (биоинформатические работы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Andersson A.F., Lindberg M., Jakobsson H., Bäckhed F., Nyrén P., Engstrand L. Comparative analysis of human gut

microbiota by barcoded pyrosequencing // PLoS One. 2008. V. 3. P. e2836.

Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 55. P. 541–555.

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // ISME J. 2012. V. 6. P. 1621–1624.

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 15. P. 4516–4522.

Castelino M., Eyre S., Moat J., Fox G., Martin P., Ho P., Upton M., Barton A. Optimization of methods for bacterial skin microbiome investigation: primer selection and comparison of the 454 versus MiSeq platform // BMC Microbiol. 2017. V. 17. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0927-4>

Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Stat. 1984. V. 11. P. 265–270.

Claesson M.J., Wang Q., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., Cole J.R., Ross R.P., O'Toole P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S

- rRNA gene regions // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq873>
- Counts J.A., Zeldes B.M., Lee L.L., Straub C.T., Adams M.W.W., Kelly R.M. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2017. V. 9. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1377>
- Crick F.H. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis // *J. Mol. Biol.* 1966. V. 19. P. 548–555.
- Dalmaso G.Z., Ferreira D., Vermelho A.B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. P. 1925–1965.
- de Muinck E.J., Trosvik P., Gilfillan G.D., Hov J.R., Sundaram A.Y.M. A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform // *Microbiome.* 2017. V. 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0279-1>
- el Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 982–988.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome.* 2014. V. 2. P. 6.
- Fierer N., Hamady M., Lauber C.L., Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 17994–17999.
- Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13780–13785.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. P. fiw018.
- Graspeuntner S., Loeper N., Künzel S., Baines J.F., Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27757-8>
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jürgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea // *ISME J.* 2011. V. 5. P. 1571–1579.
- Hugerth L.W., Andersson A.F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: from sampling to hypothesis testing // *Front. Microbiol.* 2017. V. 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>
- Juck D., Charles T., Whyte L.G., Greer C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. V. 33. P. 241–249.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. e1.
- Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya E.A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 286–291.
- Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 476.
- Li D., Li Z., Yu J., Cao N., Liu R., Yang M. Characterization of bacterial community structure in a drinking water distribution system during an occurrence of red water // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 7171–7180.
- Lucena T., Pascual J., Garay E., Arahal D.R., Macián M.C., Pujalte M.J. *Haliaea mediterranea* sp. nov., a marine gammaproteobacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 1844–1848.
- Martin W., Baross J., Kelley D., Russell M.J. Hydrothermal vents and the origin of life // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 805–814.
- Martin W., Russell M.J. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003. V. 29. P. 59–83.
- McCollom T.M., Shock E.L. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1997. V. 61. P. 4375–4391.
- Merkel A.Y., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Y., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // *Extremophiles.* 2017. V. 21. P. 307–317.
- Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A. Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents // *Extremophiles.* 2006. V. 10. P. 85–96.
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2894–2898.
- Mulkidjanian A.Y., Bychkov A.Y., Dibrova D.V., Galperin M.Y., Koonin E.V. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E821–E830.
- Nossa C.W., Oberdorf W.E., Yang L., Aas J.A., Paster B.J., Desantis T.Z., Brodie E.L., Malamud D., Poles M.A., Pei Z. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. P. 4135–4144.
- Ovreås L., Forney L., Daae F.L., Torsvik V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3367–3373.
- Palva A., Vidgren G., Paulin L. Application of PCR with oligonucleotide primers containing deoxyinosine for gene detection, isolation and sequencing // *J. Microbiol. Methods.* 1994. V. 19. P. 315–321.
- Parks D.H., Rinke C., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Woodcroft B.J., Evans P.N., Hugenholtz P., Tyson G.W. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // *Nat. Microbiol.* 2017. V. 2. P. 1533–1542.

- Patil R.V., Dekker E.E. PCR amplification of an *Escherichia coli* gene using mixed primers containing deoxyinosine at ambiguous positions in degenerate amino acid codons // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3080.
- Peng W., Li X., Wang C., Cao H., Cui Z. Metagenome complexity and template length are the main causes of bias in PCR-based bacteria community analysis // *J. Basic Microbiol.* 2018. V. 58. P. 987–997.
- Preiner M., Xavier J.C., Sousa F.L., Zimorski V., Neubeck A., Lang S.Q., Greenwell H.C., Kleinermanns K., Tüysüz H., McCollom T.M., Holm N.G., Martin W.F. Serpentinization: connecting geochemistry, ancient metabolism and industrial hydrogenation // *Life (Basel)*. 2018. V. 22. <https://doi.org/10.3390/life8040041>
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. D590–D596.
- Russell M.J., Hall A.J., Cairns-Smith A.G., Braterman P.S. Submarine hot springs and the origin of life // *Nature*. 1988. V. 336. P. 609–611.
- Sorokin D.Y., Merkel A.Y., Abbas B., Makarova K.S., Rijpsstra W.I.C., Koenen M., Sinninghe Damsté J.S., Galinski E.A., Koonin E.V., van Loosdrecht M.C.M. *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and “*Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum*”, extremely halo(natrono)philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia* classis nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 2199–2208.
- Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e105592.
- Takai K., Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 5066–5072.
- Takai K., Nakamura K. Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents // *Curr. Opin. Microbiol.* 2011. V. 14. P. 282–291.
- Thijs S., Op De Beeck M., Beckers B., Truyens S., Stevens V., Van Hamme J.D., Weyens N., Vangronsveld J. Comparative evaluation of four *Bacteria*-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00494>
- Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity // *Ecography*. 2010. V. 33. P. 2–22.
- Walters W.A., Caporaso J.G., Lauber C.L., Berg-Lyons D., Fierer N., Knight R. PrimerProspector: *de novo* design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 1159–1161.
- Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e7401.
- Watkins N.E., Jr., SantaLucia J., Jr. Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 6258–6267.
- Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116>
- Wohlgemuth R., Littlechild J., Monti D., Schnorr K., van Rossum T., Siebers B., Menzel P., Kublanov I.V., Rike A.G., Skretas G., Szabo Z., Peng X., Young M.J. Discovering novel hydrolases from hot environments // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 2077–2100.
- Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis // *BMC Bioinformatics*. 2016. V. 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Bäckström D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U., Stott M.B., Nunoura T., Banfield J.F., Schramm A., Baker B.J., Spang A., Ettema T.J. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*. 2017. V. 541. P. 353–358.

Analysis of the 16S rRNA Primer Systems for Profiling of Thermophilic Microbial Communities

A. Yu. Merkel^{1,*}, I. Yu. Tarnovetskii², O. A. Podosokorskaya¹, and S. V. Toshchakov¹

¹*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

²*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: alexandrmerkel@gmail.com

Received December 12, 2018; revised June 10, 2019; accepted July 2, 2019

Abstract—Thermophilic microorganisms are of special interest for phylogenetics and research in prokaryotic evolution, since many of them belong to deep branches of the tree of life. For this reason a number of broadly used universal primer systems for the 16S rRNA gene eliminate certain groups of thermophilic prokaryotes from their detection spectra. In the present work, the known 16S rRNA gene primer systems were analyzed in order to determine their ability to reveal members of deep phylogenetic lineages containing thermophilic microorganisms. It was shown that application of most of the published primer systems could result in elimination of certain groups of thermophilic prokaryotes. *In silico* analysis of existing primer systems was used to select the primer system for the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, which minimized elimination of thermophilic prokaryotic groups. Comparison of the proposed system with the previously published ones was carried out using high-throughput sequencing. Statistical analysis of the sequencing results based on the Shannon and Chao1 indexes revealed high efficiency of the proposed system for analysis of microbial communities of Kamchatka hot springs.

Keywords: PCR, primers, 16S rRNA gene, thermophilic microbial communities, high-throughput sequencing