

Влияние лактобацилл и бифидобактерий на кишечную микробиоту мышей: сравнительный анализ методов секвенирования с использованием платформ Illumina и Oxford Nanopore Technologies

Климина К.^{1*}, Зорук П.¹, Строкач А.¹, Веселовский В.¹, Бабенко В.¹, Колдман С.^{1,3}, Колдман В.^{1,3}, Одорская М.², Даниленко В.², Селезнева О.¹, Захаревич Н.¹, Ларин А.¹, Морозов М.¹, Олехнович Е.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

³ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

* ppp843@yandex.ru

Ключевые слова: Микробиота кишечника; Oxford Nanopore Technologies; Illumina; бактериальное разнообразие; 16S рPHK; *Lacticaseibacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium adolescentis*

Мотивация и цель: Микробиом кишечника является одним из крупнейших бактериальных сообществ в человеческом организме и влияет как на поддержание здоровья, так и на развитие различных заболеваний [1]. Известно, что комменсальные бактерии, такие как бифидобактерии и лактобациллы, оказывают благотворное влияние на состояние организма хозяина, модулируя иммунные реакции, укрепляя кишечный барьер и подавляя рост патогенных микроорганизмов [2]. Таким образом, изучение микробиоты кишечника является важной и перспективной областью исследований. Технологии секвенирования нового поколения произвели революцию в изучении микробиоты, так как с помощью них была получена детальная информация о микробных сообществах. В последние годы был достигнут большой прогресс в определении состава бактериальных сообществ кишечника благодаря развитию технологий секвенирования с использованием приборных комплексов различных типов таких как Illumina и Oxford Nanopore Technologies (ONT). Основными методами для идентификации микробных сообществ служат анализ последовательности гена 16S рPHK и полногеномное секвенирование (whole genome sequencing (WGS)). Цель данного исследования заключается в изучении воздействия штаммов *Lacticaseibacillus rhamnosus* K32 и *Bifidobacterium adolescentis* 150 на микробиоту кишечника мышей, а также сравнение методов секвенирования на платформах Illumina и ONT для определения наиболее эффективного подхода к анализу состава микробиоты кишечника.

Методы и алгоритмы: 36 самок мышей линии C57BL/6 были приобретены в филиале «Столбовая». Животных содержали в карантине в течение 14 дней, затем их случайным образом разделили на три группы: контрольная группа; мыши, получавшие лактобациллы; мыши, получавшие бифидобактерии. Образцы фекалий мышей собирали в стерильный эппендорф на 0, 5, 8, 12, 15, 19, 21, 25, 28 дни эксперимента. Образцы хранили при температуре –80 °С. Штамм

L. rhamnosus K32 (GenBank JNNV000000000) выращивали в анаэробных условиях (10 % CO₂, Anaerobic System Mark II, HiMedia, Мумбаи, Индия). Штамм *B. adolescentis* 150 (GenBank LBHQ000000000) также выращивали в анаэробных условиях с добавлением 0.5 % цистеина. Штаммы культивировали при температуре +37 °C на среде MRS (HiMedia). ДНК выделяли с использованием набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США). ДНК амплифицировали с использованием праймеров 27F, bif27F, 8F, 1492R с помощью набора Tersus Plus PCR в 25 мкл. Библиотеки для ONT готовили в соответствии с протоколом (Ligation sequencing amplicons). Секвенирование гена 16S rRNA проводили на платформе MinION на ячейке R9.4.1 (FLO-MIN106; ONT). Использовалось программное обеспечение MINKNOW версии 22.12.7 (ONT). Подготовка библиотеки на регион V3-V4 гена 16S рPHK и секвенирование проводились в соответствии с протоколом Illumina [3]. Для подготовки WGS библиотек использовали 100 нг ДНК и набор KAPA HyperPlus Kit (Roche, Швейцария). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на платформе HiSeq 2500 (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя, используя следующие наборы реагентов: HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2, HiSeq Rapid SBS Kit v2 (200 циклов) и HiSeq Rapid PE FlowCell v2 и 2 % PhiX. Длинные риды получали с помощью секвенирования на PromethION (ONT, Великобритания) согласно протоколу производителя, с реагентами NEB. Полученные риды обрабатывали с использованием Guppy v6.5.7. с использованием стандартных параметров. Fastp использовали для обрезки последовательностей низкого качества и фильтрации технических последовательностей [4]. Анализ данных проводили с использованием DADA2 pipeline [5] и базы данных SILVA [6]. Различия между сиквенсовыми технологиями определяли с помощью LefSe [7].

Результаты: В ходе эксперимента было исследовано влияние двух пробиотических штаммов, *L. rhamnosus* K32 и *B. adolescentis* 150, на кишечную микробиоту мышей линии C57BL/6. Изменения бактериального состава оценивали путем секвенирования гена 16S рPHK и WGS на двух платформах – Illumina и ONT. Для секвенирования гена 16S рPHK на ONT использовали 5 известных комбинаций праймеров, и проводили сравнительный анализ эффективности определения бактериального разнообразия с помощью данных комбинаций. Все 5 исследуемых комбинаций праймеров на ген 16S рPHK позволили выявить сопоставимое альфа-разнообразие кишечной микробиоты мышей. Мы провели попарное сравнение данных, полученных с разных платформ для секвенирования и с разной исходной ДНК (обычная и высокомолекулярная). Результаты исследования демонстрируют высокую степень корреляции между данными, полученными с одной платформы и с разным типом исходной ДНК. Однако данные WGS, полученные с платформ Illumina и ONT, имеют высокий уровень сходства. В целом, использование комбинированных данных с двух платформ секвенирования позволяет более полно и точно оценивать бактериальное разнообразие в анализируемых образцах. Введение бактериальных штаммов *L. rhamnosus* K32 и *B. adolescentis* 150 значительно влияет на состав микробиоты у мышей. Статистический анализ с использованием индекса Шеннона выявил существенные различия между контрольной группой и группами, которым вводили лиофилизированные культуры этих штаммов. Наблюдаемое увеличение альфа-разнообразия в экспериментальных группах

может свидетельствовать о потенциально благоприятном влиянии лечения на микробиоту кишечника. В ходе комплексного исследования микробиоты мышей, которым вводили штаммы *L. rhamnosus* K32 и *B. adolescentis* 150, было показано, что оба штамма оказывают положительное влияние на микробиоту кишечника. Примечательно, что введение этих штаммов привело к заметному увеличению популяции рода *Anaerotignum*, включая такие виды, как *Anaerotignum lactatifermentans*, *Anaerotignum aminivorans* и *Anaerotignum faecicola*, которые известны выработкой полезных метаболитов, оказывающих благотворное влияние на пищеварение: пропионата, ацетата и бутирата [8, 9]. Также в кишечнике мышей, получавших лактобациллы и бифидобактерии, наблюдалось значительное увеличение *Bacteroides acidifaciens*, которая может способствовать усилению барьерной функции кишечника и снижению интенсивности воспалительных процессов [10, 11].

Выводы: Наблюдаемые изменения в сочетании с общим физическим самочувствием мышей свидетельствуют о благотворном влиянии введенных бактериальных культур *L. rhamnosus* K32 и *B. adolescentis* 150 на здоровье. Данное исследование подчеркивает важность выбора подходящих стратегий секвенирования для тщательного изучения микробиома. Использование гибридного подхода к сборке увеличивает количество идентифицированных контигов.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10125 <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>.

Impact of lactobacilli and bifidobacteria on mouse gut microbiota: comparative analysis of sequencing methods using Illumina and Oxford Nanopore Technologies platforms

Klimina K.^{1*}, Zoruk P.¹, Strokach A.¹, Veselovsky V.¹, Babenko V.¹, Koldman S.^{1,3}, Koldman V.^{1,3}, Odorskaya M.², Danilenko V.², Selezneva O.¹, Zakharievich N.¹, Larin A.¹, Morozov M.¹, Olekhovich E.¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

* ppp843@yandex.ru

Key words: Gut microbiota; Oxford Nanopore Technologies; Illumina sequencing; microbial diversity; 16S rRNA gene sequencing; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium adolescentis*

Motivation and Aim: The gut microbiome is one of the largest bacterial communities in the human body and influences both health maintenance and the development of various diseases [1]. It is known that commensal bacteria, such as bifidobacteria and lactobacilli, have a beneficial effect on the host's health by modulating immune responses, strengthening the intestinal barrier, and suppressing the growth of pathogenic microorganisms [2]. Therefore, the study of the gut microbiota is an important and promising field of research. Next-generation sequencing technologies have revolutionized the study of microbiota, providing detailed information about microbial communities. In recent years, significant progress has been made in determining the

composition of gut bacterial communities thanks to the development of sequencing technologies using various types of instrument platforms such as Illumina and Oxford Nanopore Technologies (ONT). The main methods for identifying microbial communities are 16S rRNA gene sequencing and whole-genome sequencing (WGS). The goal of this study is to investigate the impact of strains *Lactocaseibacillus rhamnosus* K32 and *Bifidobacterium adolescentis* 150 on the gut microbiota of mice, as well as to compare sequencing methods on the Illumina and ONT platforms to determine the most effective approach for analyzing the composition of the gut microbiota.

Methods and Algorithms: Thirty-six female C57BL/6 mice were acquired from the “Stolbovaya” branch. The animals were kept in quarantine for 14 days, after which they were randomly divided into three groups: a control group; mice receiving lactobacilli; and mice receiving bifidobacteria. Mouse fecal samples were collected into sterile Eppendorf tubes on days 0, 5, 8, 12, 15, 19, 21, 25, and 28 of the experiment and stored at -80°C . The strain *L. rhamnosus* K32 (GenBank JNNV000000000) was cultured under anaerobic conditions (10 % CO_2 , Anaerobic System Mark II, HiMedia, Mumbai, India). The strain *B. adolescentis* 150 (GenBank LBHQ000000000) was also cultured under anaerobic conditions with the addition of 0.5 % cysteine. Both strains were cultivated at $+37^{\circ}\text{C}$ in MRS medium (HiMedia). DNA was extracted using the PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). DNA was amplified using primers 27F, bif27F, 8F, and 1492R with the Tersus Plus PCR kit in a 25 μl reaction volume. Libraries for ONT were prepared according to the ligation sequencing amplicons protocol. 16S rRNA gene sequencing was performed on the MinION platform using the R9.4.1 flow cell (FLO-MIN106; ONT) with MINKNOW software version 22.12.7 (ONT). The preparation of libraries targeting the V3-V4 region of the 16S rRNA gene and sequencing were conducted according to the Illumina protocol [3]. For WGS library preparation, 100 ng of DNA was used with the KAPA HyperPlus Kit (Roche, Switzerland). DNA library sequencing was performed on the HiSeq 2500 platform (Illumina, USA) following the manufacturer's recommendations using the HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2, HiSeq Rapid SBS Kit v2 (200 cycles), and HiSeq Rapid PE Flow Cell v2, with a 2 % PhiX spike-in. Long reads were generated using PromethION sequencing (ONT, UK) according to the manufacturer's protocol with NEB reagents. The reads were processed using Guppy v6.5.7 with standard parameters. Fastp was used for trimming low-quality sequences and filtering technical sequences [4]. Data analysis was conducted using the DADA2 pipeline [5] and the SILVA database [6]. Differences between sequencing technologies were identified using LefSe [7].

Results: During the experiment, the impact of two probiotic strains, *L. rhamnosus* K32 and *B. adolescentis* 150, on the gut microbiota of C57BL/6 mice was investigated. Changes in the bacterial composition were assessed through 16S rRNA gene sequencing and whole-genome sequencing (WGS) on two platforms – Illumina and ONT. For 16S rRNA gene sequencing on ONT, five known primer combinations were used, and a comparative analysis of the effectiveness of these combinations in determining bacterial diversity was conducted. All five primer combinations for the 16S rRNA gene allowed for the detection of comparable alpha-diversity in the gut microbiota (GM) of the mice. Pairwise comparisons of data obtained from different sequencing platforms and from different types of DNA (standard and high molecular weight) were conducted. The results demonstrate a high degree of correlation between data obtained from the same platform with different types of starting DNA. However, WGS data obtained from Illumina

and ONT platforms show a high level of similarity. Overall, using combined data from two sequencing platforms allows for a more comprehensive and accurate assessment of bacterial diversity in the analyzed samples. The introduction of bacterial strains *L. rhamnosus* K32 and *B. adolescentis* 150 significantly influences the composition of the microbiota in mice. Statistical analysis using the Shannon index revealed significant differences between the control group and the groups that were administered lyophilized cultures of these strains. The observed increase in alpha-diversity in the experimental groups may indicate a potentially beneficial effect of treatment on gut microbiota. In the comprehensive study of the microbiota of mice administered strains *L. rhamnosus* K32 and *B. adolescentis* 150, it was shown that both strains have a positive impact on the GM. Notably, the introduction of these strains led to a significant increase in the population of the genus *Anaerotignum*, including species such as *Anaerotignum lactatifermentans*, *Anaerotignum aminivorans*, and *Anaerotignum faecicola*, which are known for producing beneficial metabolites that positively affect digestion: propionate, acetate, and butyrate [8, 9]. Additionally, in the intestines of mice that received lactobacilli and bifidobacteria, there was a significant increase in *Bacteroides acidifaciens*, which may enhance the barrier function of the intestine and reduce the intensity of inflammatory processes [10, 11].

Conclusion: The observed changes, combined with the overall physical well-being of the mice, suggest a beneficial impact of the introduced bacterial cultures *L. rhamnosus* K32 and *B. adolescentis* 150 on health. This study highlights the importance of choosing appropriate sequencing strategies for thorough microbiome research. The use of a hybrid assembly approach increases the number of identified contigs.

Funding: Financial support for this study was provided by the Russian Science Foundation under the grant number № 23-75-10125 <https://rscf.ru/project/23-75-10125/>.

Список литературы/References

1. Blaut M., Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and Disease. *J Nutr.* 2007;137(3):751S-755S. doi 10.1093/jn/137.3.751S
2. O'Toole P.W., Marchesi J.R., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol.* 2017;2(5):16221
3. 16S metagenomic libraries preparation. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. Part # 15044223. Rev. B. 2013. [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf]
4. Chen Sh. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884-i890. doi 10.1093/bioinformatics/bty560
5. Callahan B., McMurdie P., Rosen M. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13:581-583. doi 10.1038/nmeth.3869
6. Quast C., Pruesse E. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590-D596. doi 10.1093/nar/gks1219
7. Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60. doi 10.1186/gb-2011-12-6-r60
8. Hosseini E., Grootaert C., Verstraete W., Van de Wiele T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev.* 2011;69(5):245-258. doi 10.1111/j.1753-4887.2011.00388.x
9. Ueki A., Goto K., Ohtaki Y. et al. Description of *Anaerotignum aminivorans* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, amino-acid-decomposing bacterium isolated from a methanogenic reactor, and reclassification of *Clostridium propionicum*, *Clostridium neopropionicum* and *Clostridium lactatifermentans* as species of the genus *Anaerotignum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(10):4146-4153. doi 10.1099/ijsem.0.002268
10. Yang J.Y., Lee Y.S., Kim Y. et al. Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. *Mucosal Immunol.* 2017;10(1):104-116. doi 10.1038/mi.2016.42
11. Zheng C., Zhong Y., Xie J. et al. *Bacteroides acidifaciens* and its derived extracellular vesicles improve DSS-induced colitis. *Front Microbiol.* 2023;14:1304232. doi 10.3389/fmicb.2023.1304232