

УДК 579.26+57.083.18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ РЫЖЕЙ ВЕЧЕРНИЦЫ ПОСРЕДСТВОМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 16S рРНК

© 2024 г. И. В. Попов^{a, b, *}, И. М. Донник^c, Т. А. Липилкина^a, И. С. Березинская^d,
Е. В. Ткачева^a, Е. А. Лукбанова^a, А. В. Алешукина^d, Ю. А. Тихменева^a, Т. Н. Дерезина^a,
А. П. Евсюков^a, Т. И. Твердохлебова^d, А. М. Ермаков^a

^aДонской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, 344003, Россия

^bНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340, Россия

^cНаучно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

^dРостовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии,

Ростов-на-Дону, 344000, Россия

*e-mail: doc.igor.popov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Рукокрылые (*Chiroptera*) являются вторым по видовому разнообразию отрядом млекопитающих после грызунов, что обеспечивает их ключевую роль в функционировании экосистем. Микробиота рукокрылых, особенно бактериальная, является мало изученной, что не позволяет точно оценить роль летучих мышей в микробной экологии. В ходе этого исследования мы определили состав и разнообразие кишечной микробиоты рыжих вечерниц (*Nyctalus noctula*) г. Ростова-на-Дону методами бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования V3–V4 фрагментов гена 16S рРНК. В результате обнаружено, что микробное разнообразие, определяемое при помощи высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК, статистически значимо выше ($p < 0.001$) в сравнении с бактериологическим методом. Однако масс-спектрометрическая идентификация бактериальных изолятов позволила определить их видовую принадлежность, в то время как чувствительность использованного протокола секвенирования 16S рРНК ограничена достоверной идентификацией бактерий до ранга родов. Также бактерии родов *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lactococcus* и *Latilactobacillus* явились наиболее преобладающими в составе кишечной микробиоты рыжей вечерницы. Наше исследование предоставляет первые данные о составе культивируемой и некультивируемой микробиоты рыжей вечерницы, что является фундаментальным этапом в изучении особенностей микробиоты синантропных летучих мышей.

Ключевые слова: бактериология, биоинформатика, кишечная микробиота, летучие мыши, секвенирование

DOI: 10.31857/S0026365624060159

Рукокрылые (*Chiroptera*) являются вторым после грызунов (*Rodentia*) по видовому разнообразию отрядом млекопитающих и при этом одними из самых неизученных животных (Kruskop, 2021). Ряд исследований свидетельствует о том, что летучие мыши играют ключевую роль в возникновении эмерджентных инфекций в качестве природных резервуаров множества микроорганизмов (Nap et al., 2015; Donnik et al., 2021). Большинство эмерджентных инфекций, природным резервуаром

которых являются летучие мыши, имеют вирусную природу, например SARS, MERS, геморрагическая лихорадка Эбола, болезни, вызываемые вирусами Нипах и Хендра, и COVID-19 (Caron et al., 2018; Gazal et al., 2022; Li et al., 2023). В связи с этим большинство исследований микробиома рукокрылых направлены на описание особенностей виroma и отдельных вирусов, в то время как исследования бактерий и грибов в микробных сообществах этих животных ограничены. Однако бактерии и грибы

рукокрылых также могут представлять опасность для общественного здравоохранения и благополучия домашних животных за счет возникновения эмерджентных видов и штаммов и распространения генов резистентности к антимикробным препаратам (Ludwig et al., 2021; Devnath et al., 2022; Foti et al., 2023).

На территории Европы и России в основном обитают насекомоядные рукокрылые (Russo et al., 2016; Froidevaux, 2023), и одним из наиболее распространенных видов является рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*) (Lindecke et al., 2020). Кишечная микробиота рыжей вечерницы не изучена в полной мере, на данный момент исследования состава и свойств кишечной микробиоты этого вида рукокрылых ограничены, что не позволяет сделать окончательных выводов о роли этих животных в микробной экологии. При этом рыжие вечерницы являются синантропным видом, который находится в постоянном контакте с человеком и домашними животными (Lindecke et al., 2020), что обосновывает значимость изучения этих животных для ветеринарии и медицины.

Целью данной работы является определение состава и разнообразия кишечной микробиоты рыжих вечерниц (*N. noctula*) на основе методов бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков V3–V4 гена 16S рНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения состава кишечной микробиоты в марте 2022 года в стерильные пробирки объемом 1.5 мл было отобрано 26 образцов фекалий (весом не менее 0.5 г) у рыжих вечерниц, содержащихся в Центре реабилитации рукокрылых ДГТУ, половина из которых ($n = 13$) была использована для бактериологического анализа, а другая половина ($n = 13$) для высокопроизводительного секвенирования.

Для бактериологического анализа образцы асептически извлекали из пробирок для последующей экстракции путем измельчения в стерильно фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) в соотношении 1 : 10. Затем экстракты были изучены качественно-количественным методом с высевом суспензий биоматериала по 0.1 мл на дифференциально-диагностические плотные питательные среды: кровяного агара, желточно-солевого агара, агара Сабуро, агара Эндо, агара де Ман, Рогосса и Шарпе (MRS), висмутсульфитного агара, агара Плоскирева, агара Шедлера, агара Uriselect 4, среды Гивенталья–Ведьминой (AGV), среды Вильсона Блэра и полужидкой среды Бифидум. Затем культуры инкубировали в микроаэрофильной камере при 37°C в течение 24–48 ч.

Выбор колоний для дальнейших исследований осуществляли на основании морфологии колоний и микроскопии с окраской по Граму, а также с учетом их роста на селективных дифференциально-диагностических средах, что являлось приоритетным критерием для отбора схожих по морфологии и окраске колоний. Подсчет количества выросших колоний бактерий проводился количественным методом с учетом результатов на 1 г кала по формуле: $Z = Y \times 10 \times N \times M$, где Z – количественная оценка одного вида бактерий на 1 г исследуемого материала (КОЕ/г), Y – количество выросших бактерий, 10 – коэффициент пересчета из расчета посевной дозы 100 мкл, N – степень разведения кала в жидкой буферной среде, M – степень разведения в пробирке, из которой взята проба для подсчета бактерий.

С помощью настольного масс-спектрометра Microflex с базой данных MALDI Biotyper Realtime Classification и программного обеспечения FlexControl (“Bruker Daltonics”, Лейпциг, Германия) была произведена идентификация видов бактерий. Пробоподготовку для исследования чистых культур штаммов проводили согласно протоколу производителя. Суточные чистые культуры бактерий в виде одиночных колоний наносились тонким слоем непосредственно на целевую точку, начиная с середины. Целевые точки покрывали 1 мкл НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) матричным раствором до полного высыхания при комнатной температуре. После высыхания мишень с культурой помещали в масс-спектрометр. Уровень идентификации бактерий интерпретировался по критериям, указанным в инструкции Score: 2.300–3.000 – высокая вероятность идентификации вида; 2.000–2.299 – надежная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1.700–1.999 – вероятная идентификация рода; 0.00–1.699 – ненадежная идентификация. Для дальнейшего анализа были отобраны культуры, идентифицированные со Score: 2.300–3.000.

Для молекулярно-биологического изучения состава микробиоты посредством профилирования генов прокариот были секвенированы ампликоны V3–V4 гена 16S рНК метагеномной ДНК, выделенные из образцов фекалий летучих мышей. Для этого из всех образцов фекалий была выделена метагеномная ДНК с помощью набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (“Qiagen”, Венло, Нидерланды), далее проводили амплификацию участков V3–V4 гена 16S рНК с использованием праймеров 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013) и последующим баркодированием полученных ампликонов, и впоследствии секвенировали полученные библиотеки ДНК на платформе Illumina MiSeq в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina”, Сан-Диего, США).

Полученные результаты в формате FASTQ файлов были проанализированы с использованием программного обеспечения Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME-2, версия 2023.5) (Bolyen et al., 2019). Денотинг прочтений с определением вариантов прочтений ампликонов был проведен в программном обеспечении DADA2 (Callahan et al., 2016). Таксономическая идентификация вариантов прочтений ампликонов была проведена с использованием референсной базы данных Silva (версия 138) (Quast et al., 2012; Yilmaz, 2014).

Дальнейший биоинформатический и статистический анализ данных был произведен с использованием языка статистического программирования R v4.2.3 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Количественные данные состава бактериальной микробиоты (КОЕ/г и количество вариантов прочтений ампликонов) были использованы для расчета относительно-го изобилия бактерий на рангах порядка, рода и вида. Определение альфа-разнообразия было проведено с использованием пакета vegan. Сравнение показателей альфа-разнообразия с использованием U-теста Манна–Уитни. Поправку на множественную проверку гипотез проводили с использованием метода Беньямини–Хохберга. Различия были приняты статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам выполнения исследования был определен состав кишечной микробиоты рыжих вечерниц города Ростов-на-Дону бактериологическим (культуральным) и молекулярно-биологическим (высокопроизводительное секвенирование 16S рРНК) методами. Таксономическая идентификация до ранга бактериальных видов была произведена только на основании данных протеомного масс-спектрометрического анализа кишечных изолятов, поскольку высокопроизводительное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК было ограничено гипервариабельными участками V3 и V4, что не позволяет проводить идентификацию исследуемой микробиоты до ранга видов с достаточным уровнем достоверности (Katiraei et al., 2022). Для определения состава кишечной микробиоты рыжих вечерниц на ранге бактериальных видов методами метапрофилирования необходим анализ данных секвенирования ампликона всего гена 16S рРНК, что возможно при использовании технологий высокопроизводительного секвенирования третьего поколения (Wagner et al., 2016; Zhang et al., 2023), или анализ данных секвенирования тотальной метагеномной ДНК (Durazzi et al., 2021). Также стоит отметить, что определение состава микробиоты посредством культивирования бактерий

на множестве твердых сред не является оптимальным ввиду возможности роста нескольких видов бактерий на разных средах, что само по себе является смешивающим фактором для количественной оценки бактериальных сообществ. В связи с этим при определении состава микробиоты в первую очередь необходимо ориентироваться на данные более статистически обоснованных методов, таких как метапрофилирование по гену 16S рРНК (Athanasopoulou et al., 2023).

На ранге бактериальных порядков в кишечной микробиоте рыжих вечерниц были среди наиболее представленных бактерий идентифицированы *Lactobacillales* (33.5%), *Enterobacterales* (29.3%), *Clostridiales* (13.4%), *Bacteroidales* (9.7%), *Oscillospirales* (3.7%), *Lachnospirales* (3.5%) и другие. При анализе состава микробиоты на ранге бактериальных родов с разной представленностью были обнаружены роды *Latilactobacillus* (12%), *Citrobacter* (11%), *Lactococcus* (9%), *Hafnia*–*Obesumbacterium* (8%), *Bacteroides* (7%), *Enterococcus* (6%), *Pediococcus* (6%) и другие. На ранге видов при помощи масс-спектрометрической идентификации бактериальных изолятов были обнаружены *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus sakei*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter aerogenes* и другие. Мы должны отметить разницу в детекции бактерий, принадлежащих разным таксонам, с использованием методов культивирования и метапрофилирования. Наиболее ярким различием является отсутствие бактерий, принадлежащих порядку *Bacillales* в составе микробиоты по результатам биоинформатического анализа данных высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК, в то время как, согласно масс-спектрометрическому анализу бактериальных изолятов, данные бактерии были выделены из фекалий рукокрылых. Данное различие возможно объяснить естественными ограничениями применения высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков гена 16S рРНК: секвенирование этих участков, а не одного гена вносит некоторую неопределенность в ходе таксономической идентификации ампликонов с использованием референсных генетических баз данных прокариот, что нивелируется только при высокопроизводительном секвенировании всего гена 16S рРНК (Yang et al., 2016; Hung et al., 2022; Athanasopoulou et al., 2023). Определенный в ходе нашего исследования состав кишечной микробиоты рыжих вечерниц отображен на рисунке.

При анализе альфа-разнообразия статистической значимости в показателях индекса выравнимости Пиелу не обнаружено ($p = 0.91$) при наличии ожидаемой разницы с использованием

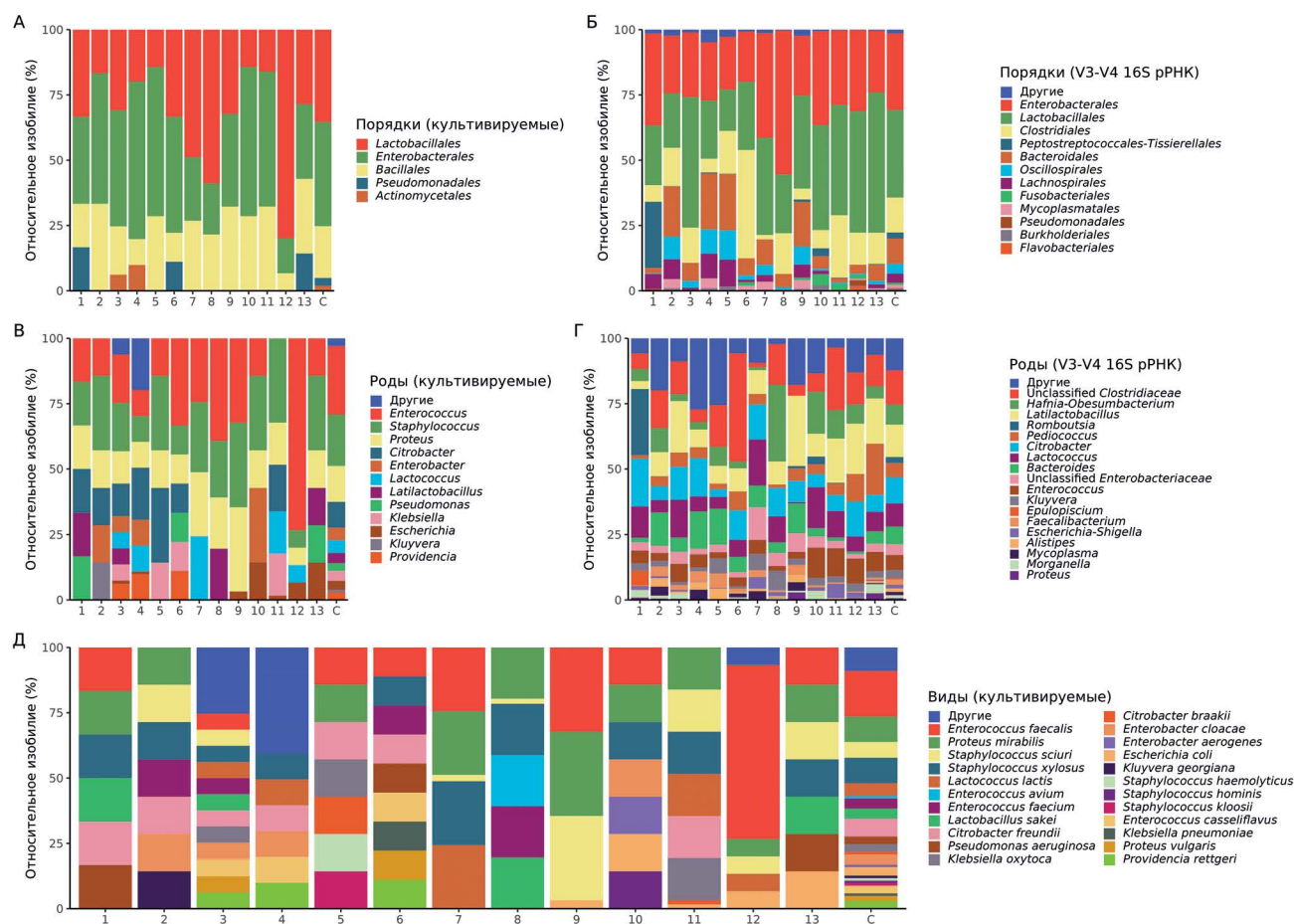


Рисунок. Состав идентифицированных бактерий в каждом изученном образце кишечной микробиоты рыжих вечерниц бактериологическим ($n = 13$, культивирование) и молекулярно-биологическим ($n = 13$, высокопроизводительное секвенирование V3–V4 16S рНК) методами на ранге порядка (А и Б), рода (В и Г) и вида (Д).

других индексов разнообразия, что свидетельствует о равномерной представленности бактериальных таксонов, идентифицируемых двумя разными методами. Таким образом, можно утверждать, что хоть рутинный бактериологический метод на основе культивирования и позволяет определить меньшее разнообразие кишечной микробиоты рыжих вечерниц в сравнении с высокопроизводительным секвенированием 16S рНК в связи с невозможностью выделять некультивируемые бактерии, выравнивание бактериальных сообществ, детектируемых этими двумя методами, равнозначна.

Стоит отметить, что в составе кишечной микробиоты рыжих вечерниц нами были обнаружены потенциально патогенные бактерии *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* и другие (рисунок). В рамках реализации данного исследования не был проведен анализ патогенности и вирулентности полученных изолятов, что не позволяет судить об их опасности

для человека и домашних животных. Вполне возможно, что данные микроорганизмы являются представителями комменсальной микробиоты рыжих вечерниц, однако это необходимо проверить в ходе будущих исследований.

Таким образом, в ходе реализации этого исследования были получены первые сравнительные данные о составе культивируемой и некультивируемой кишечной микробиоты рыжих вечерниц, а также получены биоинформатическая база данных, которая может быть использована в качестве референса в будущих исследованиях, и коллекция культивируемых кишечных микроорганизмов рыжих вечерниц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00316; <https://rscf.ru/project/23-14-00316/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Athanasopoulou K., Adamopoulos P.G., Scorilas A.* Unveiling the human gastrointestinal tract microbiome: the past, present, and future of metagenomics // *Biomedicines*. 2023. V. 11. Art. 827.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodriguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durrall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciorek T., Kreps J., Langille M.G. I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Lofthfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimy A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Priesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swofford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vazquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2 // *Nature Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 852–857.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature Methods*. 2016. V. 13. P. 581–583.
- Caron A., Bourgarel M., Cappelle J., Liégeois F., De Nys H.M., Roger F.* Ebola virus maintenance: if not (only) bats, what else? // *Viruses*. 2018. V. 10. Art. 549.
- Devnath P., Karah N., Graham J.P., Rose E.S., Asaduzzaman M.* Evidence of antimicrobial resistance in bats and its planetary health impact for surveillance of zoonotic spillover events: a scoping review // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022. V. 20. Art. 243.
- Donnik I., Popov I.V., Sereda S., Popov I.V., Chikindas M., Ermakov A.* Coronavirus infections of animals: future risks to humans // *Biol. Bull.* 2021. V. 48. P. 26–37.
- Durazzi F., Sala C., Castellani G., Manfreda G., Remondini D., De Cesare A.* Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 3030.
- Foti M., Grasso R., Fisichella V., Mascetti A., Colnaghi M., Grasso M., Spina M.T.* Antimicrobial resistance in physiological and potentially pathogenic bacteria isolated in southern Italian bats // *Animals*. 2023. V. 13. Art. 966.
- Froidevaux J.S., Toshkova N., Barbaro L., Benítez-López A., Kerbirou C., Le Viol I., Pacifici M., Santini L., Stawski C., Russo D.* A species-level trait dataset of bats in Europe and beyond // *Sci. Data*. 2023. V. 10. Art. 253.
- Gazal S., Sharma N., Gazal S., Tikoo M., Shikha D., Badroo G.A., Rashid M., Lee S.-J.* Nipah and Hendra viruses: deadly zoonotic paramyxoviruses with the potential to cause the next pandemic // *Pathogens*. 2022. V. 11. Art. 1419.
- Han H.-J., Wen H.-I., Zhou C.-M., Chen F.-F., Luo L.-M., Liu J.-W., Yu X.-J.* Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases // *Virus Res.* 2015. V. 205. P. 1–6.
- Hung Y.M., Lyu W.N., Tsai M.L., Liu C.L., Lai L.C., Tsai M.H., Chuang E.Y.* To compare the performance of prokaryotic taxonomy classifiers using curated 16S full-length rRNA sequences // *Comput. Biol. Med.* 2022. V. 145. Art. 105416.
- Katiraei S., Anvar Y., Hoving L., Berbée J.F., van Harmelen V., Willems van Dijk K.* Evaluation of full-length versus V4-region 16S rRNA sequencing for phylogenetic analysis of mouse intestinal microbiota after a dietary intervention // *Curr. Microbiol.* 2022. V. 79. Art. 276.
- Klindworth A., Priesse 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–e1.
- Kruskop S.V.* Diversity aspects in bats: genetics, morphology, community structure // *Diversity* 2021. V. 13. Art. 424. <https://doi.org/10.3390/d13090424>
- Li K.S., Lau S.K., Woo P.C.* Bats – the magnificent virus player: SARS, MERS, COVID-19 and beyond // *Viruses*. 2023. V. 15. Art. 2342.
- Lindecke O., Currie S.E., Fasel N.J., Fritze M., Kravchenko K., de Assis C.K., Lehnert L.S., Röleke M., Voigt-Heucke S.L., Voigt C.C.* Common noctule *Nyctalus noctula* (Schreber, 1774) // *Handbook of the Mammals of Europe* / Eds. K. Hackländer, F.E. Zachos. Springer, 2020. P. 1–25.
- Ludwig L., Muraoka J., Bonacorsi C., Donofrio F.* Diversity of fungi obtained from bats captured in urban forest fragments in Sinop, Mato Grosso, Brazil // *Braz. J. Biol.* 2021. V. 83. Art. e247993.

- 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.* 2012. V. 41. P. D590–D596.
- Russo D., Billington G., Bontadina F., Dekker J., Dietz M., Gazaryan S., Jones G., Meschede A., Rebelo H., Reiter G. Identifying key research objectives to make European forests greener for bats // *Front. Ecol. Evolut.* 2016. V. 4. Art. 87.
- Wagner J., Coupland P., Browne H.P., Lawley T.D., Francis S.C., Parkhill J. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification // *BMC Microbiol.* 2016. V. 16. P. 1–17.
- Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis // *BMC Bioinform.* 2016. V. 17. P. 135.
- Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. D643–D648.
- Zhang T., Li H., Ma S., Cao J., Liao H., Huang Q., Chen W. The newest Oxford Nanopore R10. 4.1 full-length 16S rRNA sequencing enables the accurate resolution of species-level microbial community profiling // *Appl. Environ. Microbiol.* 2023. V. 89. Art. e00605–00623.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Determination of the Gut Microbiota Composition of Common Noctule by Bacteriological Analysis and High-throughput Sequencing of 16s rRNA

I. V. Popov^{1, 2, *}, I. M. Donnik³, T. A. Lipilkina¹, I. S. Berezinskaia⁴,
E. V. Tkacheva¹, E. A. Lukbanova¹, A. V. Aleshukina⁴, I. A. Tikhmeneva¹,
T. N. Derezhina¹, A. P. Evsyukov¹, T. I. Tverdokhlebova⁴, A. M. Ermakov¹

¹Don State Technical University, Rostov-on-Don, 344003 Russia

²Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

³National research center “Kurchatov institute”, Moscow, 123182 Russia

⁴Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 344000 Russia

*e-mail: doc.igor.popov@gmail.com

Bats (*Chiroptera*) are the second most diverse order of mammals after rodents, which ensures their key role in the functioning of ecosystems. The microbiota of bats, especially the bacterial one, is poorly studied, which does not allow an accurate assessment of the role of bats in global microbial ecology. In this study, we determined the composition and diversity of the intestinal microbiota of the common noctule (*Nyctalus noctula*) in Rostov-on-Don using bacteriological analysis and metagenomic sequencing of the V3-V4 16S rRNA gene. As a result, we found that microbial diversity determined using metagenomic sequencing was statistically significantly higher ($p < 0.001$) compared to the bacteriological method. However, mass spectrometric identification of bacterial isolates made it possible to determine their species, while the sensitivity of the metagenomic sequencing protocol used is limited to reliable identification of bacteria to genus rank. Also, bacteria of the genera *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, and *Latilactobacillus* were the most prevalent in the intestinal microbiota of the common noctule. Our study provides the first data on the composition of the cultivated and uncultivated microbiota of the rufous noctule, which is a fundamental step in the study of the microbiota of synanthropic bats.

Keywords: bacteriology, bioinformatics, gut microbiota, bats, sequencing