

**СЕКВЕНИРОВАНИЕ 16S-ITS-23S ФРАГМЕНТА РИБОСОМАЛЬНОГО
ОПЕРОНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ НЕОБХОДИМЫЕ И ДОСТАТОЧНЫЕ
УСЛОВИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ**

Огарков О.Б.

Жданова С.Н.

Орлова Е.А.

Хромова П.А.

Белькова Н.Л.

Синьков В.В.

Кондратов И.Г.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»,
Иркутск, Россия

**16S-ITS-23S RRNA OPERON SEGMENT SEQUENCING PROVIDES
NECESSARY AND SUFFICIENT CONDITIONS FOR BACTERIAL
SPECIES-SPECIFIC IDENTIFICATION**

Ogarkov O.B.

Zhdanova S.N.

Orlova E.A.

Khromova P.A.

Belkova N.L.

Sinkov V.V.

Kondratov I.G.

Federal State Public Scientific Institution «Scientific Centre for Family Health and
Human Reproduction Problems», Irkutsk, Russia

Резюме. Введение. Секвенирование гена 16S рРНК является преобладающим методом количественной оценки состава микробных сообществ и молекулярной идентификации отдельных штаммов. При этом технология на основе коротких прочтений (секвенирование 2-го поколения) не позволяет выходить за рамки гена 16S рРНК, а уровень таксономической идентификации образцов обычно остается на уровне рода или даже семейства. В последние годы предлагается использование технологий длинных прочтений (Oxford Nanopore MinION, PacBio) для секвенирования ампликонов почти полного рибосомального оперона, включающего гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS). К настоящему моменту этот подход изучен недостаточно, кроме того предполагает ПЦР амплификацию весьма протяженного участка ДНК (более 4000 п.н.).

Материалы и методы. Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная идентификация осуществлена в 2019-2021 гг. Штаммы получены при высеве на среду Левенштейна-Йенсена положительных культур с бактериологического анализатора Bactec MGIT 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo *Mycobacteria* (Viracell, Испания) по протоколу производителя. В настоящей работе применяются как известные, так и разработанные вновь, универсальные бактериальные праймеры, фланкирующие почти полный ген 16S рРНК, ITS и начало гена 23S рРНК.

Результаты и обсуждение. Секвенированием по Сэнгеру полученных ампликонов (около 2000 п.н.) показан уровень таксономической идентификации, достаточный для определения до вида 8 штаммов нетуберкулезных микобактерий, выделенных от людей, вызвавших клинически и бактериологически подтвержденные заболевания.

Предложенная методика ПЦР амплификации фрагмента бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация методического подхода по исследованию микробных сообществ из материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т.д.). Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей разрешающей способности использованного подхода, чем классическое секвенирование гена 16S рРНК.

Ключевые слова: молекулярная таксономия бактерий, секвенирование, 16S, ITS, rRNA operon, *Mycobacterium*.

Abstract. Introduction. Sequencing of the 16S rRNA gene is the predominant method for assessing microbial communities and strain molecular identification. The short reads (2nd generation sequencing)-based technology does not allow analysis beyond the 16S rRNA gene. The taxonomic verification level of samples usually remains at the genus or even family level. Currently, there have been proposed the latest versions of long-read technologies (Oxford Nanopore MinION, PacBio) for amplicon sequencing of near-complete ribosomal operon, including genes 16S, 23S, 5S, and internal transcribed spacer (ITS). At the moment, this approach has not been sufficiently studied, in addition, it involves PCR amplification of a very extended DNA region (more than 4000 bp-long).

Materials and methods. The collection of non-tuberculous mycobacteria strains and their primary identification was carried out in the years 2019-2021. The strains were obtained by inoculation of positive cultures from the Bactec MGIT 960 bacteriological analyzer lacking MPT64 antigen in the MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, USA) on Lowenstein-Jensen medium. Preliminary species strain identification was carried out with the Speed-oligo Mycobacteria kit (Vircell, Spain) according to the manufacturer's protocol. In this work, both known and newly developed universal bacterial primers flanking the near-complete 16S rRNA

gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene are used. In the present study, both known and newly developed universal bacterial primers are used to flank the near-complete 16S rRNA gene, ITS, and start of the 23S rRNA gene.

Results and discussion. Sanger sequencing of the amplicons (about 2000 bp) obtained shows the taxonomic level sufficient to determine species up to 8 strains of non-tuberculous mycobacteria isolated from humans that caused clinically and bacteriologically confirmed diseases. The method proposed for PCR amplification of a bacterial operon a fragment containing most of the 16S rRNA gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene is considered by us as an approbation of a methodological approach to study microbial communities in material with a high degree of degradation (necrotic foci, etc.). The results obtained indicate a significantly higher resolution of the approach used than the classical 16S rRNA gene sequencing.

Keywords: Production of biofilms, sequencing, 16S, ITS, rRNA operon, *Mycobacterium*.

1 **Введение.**

2 Ген 16S рРНК десятилетиями используется для филогенетической
 3 классификации бактерий и архей. В этом отношении ген выделяется своей
 4 универсальностью, устойчивостью к горизонтальному переносу генов и
 5 высокой степенью сохранности [7, 15]. Высококонсервативные области
 6 перемежаются с высоковариабельными, что в ряде случаев позволяет
 7 проводить филогенетическую классификацию по видам и более высоким
 8 таксономическим уровням. Кроме того, этот ген оказался отличной мишенью
 9 для исследований, направленных на количественную оценку
 10 таксономического состава микробных сообществ с помощью
 11 высокопроизводительного секвенирования ампликонов ПЦР [6]. Праймеры
 12 обычно конструируются таким образом, чтобы они гибридизовались с
 13 участками консервативных сайтов, фланкирующих вариабельную область,
 14 это позволяет извлечь наиболее полную информацию при изучении
 15 микробных сообществ. Несмотря на свои многочисленные преимущества,
 16 ген 16S рРНК имеет ограниченное количество филогенетически
 17 информативных сайтов. Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК
 18 чувствителен к стохастической ошибке и демонстрирует разрешение, во
 19 многих случаях ограниченное родом микроорганизма [3, 5]. Нуклеотидная
 20 последовательность гена 16S рРНК широко используется платформами на
 21 основе секвенирования коротких прочтений [4], однако эта технология не
 22 позволяет расширить рамки мишени [9]. Для секвенирования ампликонов
 23 полного рибосомального оперона в последние годы предлагается
 24 использование технологий длинных прочтений, таких как Oxford Nanopore
 25 MinION и PacBio [2, 9]. Этот подход позволяет включить в исследование
 26 гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS).
 27 Область полного рибосомального оперона 16S-ITS-23S имеет в четыре раза
 28 больше вариабельности, чем одна только область 16S, и может
 29 использоваться для таксономической классификации на уровне вида, а в

30 некоторых случаях на уровне штамма [2]. В настоящее время ведется
 31 активная работа по разработке инструментов для анализа результатов NGS
 32 микробных сообществ полных рибосомальных оперонов бактерий [10, 12], в
 33 том числе в очагах туберкулеза [11]. Существенным недостатком этого
 34 подхода является почти предельная для стандартной ПЦР длина ампликона
 35 (более 4000 п.н.), что может существенно исказить количественную оценку
 36 исследуемых видов при изучении микробных сообществ. Задачей настоящего
 37 исследования был дизайн и апробация эубактериальных праймеров для
 38 амплификации участка 16S-ITS-23S рибосомального оперона при длине
 39 ампликона около 2000 п.н., оптимальной для большинства коммерческих Таq
 40 полимераз.

41 **Материалы и методы.**

42 Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная
 43 идентификация осуществлена в рамках некоммерческого сотрудничества с
 44 ОГБУЗ Иркутская Областная Туберкулезная Больница в 2019-2021 гг.
 45 Штаммы получены при высеве на среду Левенштейна-Йенсена
 46 положительных культур с бактериологического анализатора Bactec MGIT
 47 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT
 48 TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая
 49 идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo *Mycobacteria*
 50 (Vircell, Испания) по протоколу производителя. Данный тест предполагает
 51 ПЦР амплификацию ДНК фрагментов 16S рРНК и ITS с последующей
 52 гибридизацией ампликонов с олигонуклеотидными зондами на
 53 хроматографической тест-полоске. Секвенирование по Сэнгеру фрагментов
 54 16S-ITS-23S рРНК проведено на базе ЗАО «Евроген». В работе изначально
 55 планировалось использовать 9 культур нетуберкулезных микобактерий
 56 (MOT – *Mycobacterium other than tuberculosis*), однако одна из культур по
 57 результатам секвенирования по Сэнгеру была исключена, как смесь
 58 нескольких видов микроорганизмов. В дальнейшем исследовались 5

59 медленно растущих (MOT1, MOT2, MOT6, MOT7, MOT9) и 3 быстро
 60 растущих штамма микобактерий (MOT3, MOT4, MOT8).

61 ПЦР в течение 37 циклов выполняли с праймерами 27F и 189R
 62 (синтезированы ЗАО Евроген) в концентрации 500 нМ каждого с реактивами
 63 AmpliTaqGold 360 MasterMix (Applied Biosystems, США) в присутствии 1×
 64 раствора энхансера на амплификаторе CFX-96 (BioRad, США). Режим
 65 амплификации: 95° – 10 мин, активация полимеразы; 95° – 60 сек; 55° – 30
 66 сек; 72° – 120 сек. Нами использована структура широко известного
 67 эубактериального праймера 27F 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG [13, 14],
 68 берущего старт вначале гена 16S рРНК. Праймер 189R 5'-
 69 GGGAASTGAAACATCTHAGTA, гибридизующийся в начале гена 23S
 70 рРНК, сконструирован с учетом известной вариабельности гена 23S рРНК
 71 [8], структура праймера проверена в сервисах SILVA rRNA database
 72 (<https://www.arb-silva.de/>) и Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

73 Секвенирование по Сэнгеру выполнялось в ЦКП «Центр разработки
 74 прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ
 75 ПЗСРЧ, Иркутск», с использованием праймеров 27F, 189R и внутреннего
 76 800L 5'-AGGATTAGATACCCTGGTAGTC (ген 16S рРНК) [1].

77 **Результаты и обсуждение.**

78 Нуклеотидные последовательности фрагментов рибосомального
 79 оперона 16S-ITS-23S образцов MOT1, MOT2, MOT3, MOT4, MOT6, MOT7,
 80 MOT8, MOT9 размещены в GenBank под номерами MZ823582, MZ851786,
 81 MZ851787, MZ851788, MZ851789, MZ851790, MZ851791, MZ851792
 82 соответственно. Как видно из таблицы 1 в одном случае (MOT3) в рамках
 83 предлагаемого подхода определен вид возбудителя, ранее не установленный
 84 коммерческим тестом Speed-oligo *Mycobacteria* (Viracell, Испания). В двух
 85 случаях (MOT6 и MOT9) изменена видовая принадлежность штамма. В
 86 остальных случаях наблюдалось совпадения результатов коммерческого

87 теста с результатами секвенирования по Сэнгеру, при этом в двух случаях
88 (MOT1 и MOT8) удалось провести идентификацию таксонов до подвида.

89 **Таблица 1. Сравнительная идентификация секвенированием по**
90 **Сэнгеру и тест-системой Speed-oligo «Mycobacteria»**

91 Table 1. Comparative identification by Sanger sequencing and the Speed-
92 oligo test system of “Mycobacteria”

93 **Заключение.**

94 Предложенная методика ПЦР амплификации фрагмента
95 бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь
96 ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация
97 методического подхода по исследованию микробных сообществ из
98 материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т.д.).
99 Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей
100 разрешающей способности использованного подхода, чем классическое
101 секвенирование гена 16S рРНК. Авторы предполагают, что предложенный
102 подход может получить в дальнейшем широкое распространение при
103 исследовании микробных сообществ как секвенированием по Сэнгеру
104 клонированных образцов, так и с помощью NGS технологий длинных
105 прочтений, таких как Oxford Nanopore MinION и PacBio.

106 **Благодарности.**

107 *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-015-00078 А*

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Сравнительная идентификация секвенированием по Сэнгеру и тест-системой Speed-oligo «Mycobacteria»

Table 1. Sanger sequencing and the Speed-oligo test system of “Mycobacteria” for comparative identification

№ штамма	Мишень	Длина, п.н.	Сходство (NCBI Blastn, Genome DataBase; RefSeq; <i>Mycobacteria</i> (taxid:85007))	Результат по тестам Speed-oligo	Вид, определённый секвенированием
MOT 1	16S-ITS-23S	1904	>99% (1901/1904) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (36 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (MAC)
MOT 2	16S-ITS-23S	1900	>99% (1898/1899) <i>Mycobacterium gordonae</i> (8 штаммов) >99% (1891/1899) <i>Mycobacterium paragordonae</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
MOT 3	16S-ITS-23S	1960	100% (1960/1960) <i>Mycolicibacterium holsaticum</i> штамм M7 PROККА 95% (1882/1960) <i>Mycolicibacterium gadium</i> strain JCM 12688	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Mycolicibacterium holsaticum</i>
MOT 4	16S-ITS-23S	1475	>99% (1473/1475) <i>Mycolicibacterium fortuitum</i> (27 strains)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i>
MOT 6	16S-ITS-23S	1909	>99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonae</i> (6 штаммов) >99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonae</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium paragordoniae</i>
MOT 7	16S-ITS-23S	1920	>99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (32 штаммов) >99% (1918/1920) <i>Mycobacterium bouchedurhonense</i> штамм DSM 45439 >99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (37 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)
MOT 8	16S-ITS-23S	1917	>99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 штаммов) >99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 strains)	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>
MOT 9	16S-ITS-23S	1551	>99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 штаммов) >99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> (MAC)	<i>Mycobacterium mantenii</i> (MAC)

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

СЕКВЕНИРОВАНИЕ 16S-ITS-23S ФРАГМЕНТА РИБОСОМАЛЬНОГО
ОПЕРОНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ НЕОБХОДИМЫЕ И ДОСТАТОЧНЫЕ
УСЛОВИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

16S-ITS-23S RRNA OPERON SEGMENT SEQUENCING PROVIDES
NECESSARY AND SUFFICIENT CONDITIONS FOR BACTERIAL SPECIES-
SPECIFIC IDENTIFICATION

Блок 1. Информация об авторе, ответственном за переписку

Огарков Олег Борисович, д.м.н., г.н.с., заведующий отделом
Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции человека»

Ogarkov O.V., MD, Ph.D., Head of the Department of Epidemiology and
Microbiology, "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction
Problems"

Адрес для переписки: Огарков Олег Борисович, 664003, Иркутск ул.
Тимирязева 16, ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, тел. (3952) 20-73-67, e-mail
obogarkov@sbamsr.irk.ru

Contacts: Oleg V. Ogarkov, 664003, Timiryaseva 16 st., Irkutsk, Russia, tel.
+7(3952) 20-73-67, e-mail obogarkov@sbamsr.irk.ru

Блок 2. Информация об авторах

<p>Авторы:</p> <p>Огарков О.Б., д.м.н., г.н.с., заведующий отделом Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»</p> <p>Жданова С.Н., д.м.н., в.н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»</p> <p>Орлова Е.А., м.н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»</p> <p>Хромова П.А., м.н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»</p> <p>Белькова Н.Л., к.б.н., с.н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»</p> <p>Синьков В.В., к.м.н., с.н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии</p>	<p>Authors:</p> <p>Ogarkov O.B., MD, Ph.D., Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"</p> <p>Zhdanova S.N., MD, Ph.D. l.r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and</p> <p>Orlova E.A. j.r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"</p> <p>Khromova P.A. j.r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"</p> <p>Belkova N.L., MD, Ph.D. l.r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"</p> <p>Sinkov V.V. MD, Ph.D. s.r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"</p>
---	--

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Кондратов И.Г. , к.б.н., н.с. отдела Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»	Kondratov I.G. , Ph.D. r. of Department of Epidemiology and Microbiology of the "Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems"
--	--

Блок 3. Метаданные статьи

Сокращенное название статьи:

Секвенирование 16S-ITS-23S фрагмента

Sequencing 16S-ITS-23S part

Ключевые слова: молекулярная таксономия бактерий, секвенирование, 16S, ITS, рРНК оперон, *Mycobacterium*.

Keywords: Production of biofilms, sequencing, 16S, ITS, rRNA operon, *Mycobacterium*.

Статья содержит 7 страниц, 1 таблицу

Раздел «Методы»

24.01.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	<i>ФИО, название публикации и источника на английском</i>	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
1	Bel'kova N.L., Parfenova V.V., T Ia Kostopnova, L Ia Denisova, E F Zaïchikov. Microbial biodiversity in the Lake Baikal water // Microbiology. 2003. V. 72(2), P. 203–212. Translated from Mikrobiologiya, in Russian	Bel'kova N.L., Parfenova V.V., T Ia Kostopnova, L Ia Denisova, E F Zaïchikov. Microbial biodiversity in the Lake Baikal water // Microbiology. 2003. V. 72(2), P. 203–212. Translated from Mikrobiologiya, in Russian	https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1023224215929
2	Benítez-Páez A., Sanz Y. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer // Gigascience. 2017. V. 6(7). P. 1–12.	Benítez-Páez A., Sanz Y. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer // Gigascience. 2017. V. 6(7). P. 1–12.	https://doi.org/10.1093/gigascience/gix043

3	Brown JR, Douady CJ, Italia MJ, Marshall WE, Stanhope MJ. Universal trees based on large combined protein sequence data sets // Nat. Genet. 2001. V. 28(3). P. 281–285.	Brown JR, Douady CJ, Italia MJ, Marshall WE, Stanhope MJ. Universal trees based on large combined protein sequence data sets // Nat. Genet. 2001. V. 28(3). P. 281–285.	https://doi.org/10.1038/90129
4	Burke C.M., Darling A.E. A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq // Peer J. 2016. V.4:e2492.	Burke C.M., Darling A.E. A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq // Peer J. 2016. V.4:e2492.	https://doi.org/10.7717/peerj.2492
5	Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6(5). P. 361–375.	Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6(5). P. 361–375.	https://www.nature.com/articles/nrg1603

6	Doolittle W.F. Phylogenetic classification and the universal tree // Science. 1999. V. 284(5423). P. 2124–2129.	Doolittle W.F. Phylogenetic classification and the universal tree // Science. 1999. V. 284(5423). P. 2124–2129.	https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2124
7	Green R., Noller H.F. Ribosomes and translation // Annu. Rev. Biochem. 1997. V. 66. P. 679–716.	Green R., Noller H.F. Ribosomes and translation // Annu. Rev. Biochem. 1997. V. 66. P. 679–716.	https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.679
8	Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72(3). P. 2221–2225.	Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72(3). P. 2221–2225.	https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.72.3.2221-2225.2006?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed

9	<p>Martijn J, Lind AE, Schön ME, Spiertz I, Juzokaite L, Bunikis I, Pettersson OV, Ettema TJG. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon // Environ. Microbiol. 2019. V. 21(7). P. 2485–2498.</p>	<p>Martijn J, Lind AE, Schön ME, Spiertz I, Juzokaite L, Bunikis I, Pettersson OV, Ettema TJG. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon // Environ. Microbiol. 2019. V. 21(7). P. 2485–2498.</p>	<p>https://doi.org/10.1111/1462-2920.14636</p>
10	<p>Milani C., Alessandri G. et al. Untangling Species-Level Composition of Complex Bacterial Communities through a Novel Metagenomic Approach // mSystems. 2020. V. 5(4):e00404-20.</p>	<p>Milani C., Alessandri G. et al. Untangling Species-Level Composition of Complex Bacterial Communities through a Novel Metagenomic Approach // mSystems. 2020. V. 5(4):e00404-20.</p>	<p>https://doi.org/10.1128/msystems.00404-20</p>

11	Orlova E.A., Ogarkov O.B., Suzdalnitskiy A.E., Khromova P.A., Sinkov V.V., Plotnikov A.O., Belkova N.L., Zhdanova S.N. Analysis of Microbial Diversity in Caseous Necrosis of Tuberculosis Foci. Mol. Genet. 2021. Microbiol. Virol. 36, 132–138.	Orlova E.A., Ogarkov O.B., Suzdalnitskiy A.E., Khromova P.A., Sinkov V.V., Plotnikov A.O., Belkova N.L., Zhdanova S.N. Analysis of Microbial Diversity in Caseous Necrosis of Tuberculosis Foci. Mol. Genet. 2021. Microbiol. Virol. 36, 132–138.	https://link.springer.com/article/10.3103/S0891416821030058 https://doi.org/10.3103/S0891416821030058
12	Peker N, Garcia-Croes S, Dijkhuizen B, Wiersma HH, van Zanten E, Wisselink G, Friedrich AW, Kooistra-Smid M, Sinha B, Rossen JWA, Couto N. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S-23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification // Front. Microbiol. 2019. V. 10:620.	Peker N, Garcia-Croes S, Dijkhuizen B, Wiersma HH, van Zanten E, Wisselink G, Friedrich AW, Kooistra-Smid M, Sinha B, Rossen JWA, Couto N. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S-23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification // Front. Microbiol. 2019. V. 10:620.	https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00620
13	Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA	Weisburg WG, Barns SM, Pelletier	https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-

	amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173(2) P. 697–703.	DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173(2) P. 697–703.	703.1991
14	Wilson K.H., Blichington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28(9). P. 1942–1946.	Wilson K.H., Blichington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28(9). P. 1942–1946.	https://doi.org/10.1128/jcm.28.9.1942-1946.1990
15	Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. 1987. V. 51. P. 221–271.	Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. 1987. V. 51. P. 221–271.	https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987