

УДК: 579.64

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.47

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ЧИРА (*COREGONUS NASUS*)

Воронов К.Е.^{1*} – инженер лаборатории генетики; Лукина Ю.Н.² – д-р биол. наук, директор института; Апаликова О.В.¹ – канд. биол. наук, зав. лабораторией генетики

¹ Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»
(«ГосНИОРХ» им. Л. С. Берга)

² Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН
(ФГБУН «ИВПС ФИЦ КарНЦ РАН»)

*stek486@yandex.ru

Ключевые слова: кишечная микробиота, филогенетические деревья, сиговые рыбы, секвенирование, ОТЕ.

Key words: gut microbiota, phylogenetic trees, whitefish, sequencing, OTU.

Поступила: 01.07.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Кишечная микробиота позвоночных животных представляет собой сложную биологическую систему, играющую ключевую роль в метаболизме и формировании иммунной защиты. Микробные сообщества осуществляют разложение сложных органических соединений, синтезируют витамины и обеспечивают стабильность внутренней среды организма, тесно взаимодействуя с его физиологическими процессами. Таким образом микробиота кишечника непосредственно влияет на здоровье организма хозяина. Изучение эволюционных связей в составе кишечной микробиоты чира (*Coregonus nasus*) посредством ампликонного секвенирования гена 16S рРНК способствует пониманию их трофических и конкурентных взаимодействий в организме хозяина. В рамках исследования были использованы следующие методы: NGS-секвенирование гена 16S рРНК по участкам V3-V4 и V4-V5 на платформе Illumina MiSeq в режиме PE, а также обработка полученных данных с помощью программного обеспечения Trimmomatic v0.39, VSEARCH v2.21.1, MAFFT v7.505, FastTree v2.1.11. Все анализы выполнялись на платформе Python 3.10.6 с использованием пакетов scipy, statsmodels, biopython. Полученные филогенетические деревья демонстрируют высокий уровень таксономической дифференциации, отражая как недавние эволюционные расхождения (характеризующиеся короткими ветвями и высокой поддержкой узлов), так и древние дивергенции, подтверждаемые значительной длиной ветвей в определенных кладах. Подобная организация указывает на множественные радиации внутри бактериальных таксонов, обусловленные адаптацией к различным экологическим нишам, что свидетельствует о сложности и взаимосвязанности микробных сообществ в исследуемых образцах. Высокое филогенетическое разнообразие обнаруженных таксонов, включая присутствие ОТЕ, классифицированных как *Candidatus* или относящихся к

малоизученным группам, подчеркивает недостаточную изученность микробиоты пресноводных рыб в существующих базах данных.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Кишечный микробиом играет важнейшую роль в поддержании здоровья рыб, обеспечивая их нормальное функционирование и устойчивость к различным стрессовым факторам. Микроорганизмы, населяющие пищеварительный тракт рыб, участвуют в процессе переваривания пищи, синтезе необходимых витаминов и аминокислот, а также в защите от патогенных бактерий. Сбалансированный состав кишечной микробиоты напрямую влияет на рост, развитие и иммунный ответ рыб, что особенно важно в условиях аквакультуры [6, 7].

Нарушение микробиома может привести к серьезным последствиям для здоровья рыб. Дисбаланс кишечной микробиоты часто возникает при изменении условий содержания, некачественном кормлении или стрессе. Это может проявляться в снижении иммунитета, замедлении роста, ухудшении усвоения питательных веществ и повышенной восприимчивости к заболеваниям [13, 17].

Для пресноводных видов характерен более широкий спектр бактериальных групп, включая *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, а также представителей семейств Enterobacteriaceae и облигатных анаэробов – *Fusobacterium*, *Clostridium* и *Bacteroides* [7]. Однако, несмотря на наличие генетических данных о микробиоме многих промысловых рыб, экологическая значимость его отдельных составляющих остается малоизученной [10, 11].

Операционные таксономические единицы (ОТЕ) являются фундаментальным инструментом в современной микробиологии и метагеномике, позволяющие классифицировать и сравнивать микробные сообщества. Филогенетический анализ ОТЕ позволяет проследить эволюционные связи между различными микроорганизмами, выявить их родственные отношения и понять механизмы дивергенции. Данные о филогенетических деревь-

ях могут иметь важное практическое значение для развития рыбоводческой отрасли и защиты биологического разнообразия. Понимание механизмов эволюции кишечной микробиоты рыб открывает возможности для изучения их адаптационных реакций на экологические изменения и создания научно обоснованных методов укрепления здоровья водных биологических ресурсов.

Чир (*Coregonus nasus*), является пресноводной рыбой из рода сига (*Coregonus*), которая обитает в реках и озерах в северной части Евразии. Этот вид играет значительную роль в промысле и экологии, являясь частью пищевых цепей и объектом рыболовства и разведения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Образцы кишечного содержимого отбирались у чира, содержащегося в рыбноводном хозяйстве, расположенном на оз. Суходольское Ленинградской области в сентябре 2022 г. Общее количество исследованных особей – 21 экземпляр. Все образцы были собраны в стерильные пробирки с ТЕ-буфером и транспортировались при +4 °C в течении одного часа.

Тотальная микробная ДНК была извлечена из 200 мг биопробы кишечника с использованием фенол-хлороформного метода с добавлением изоамилового спирта в соотношении 25:24:1. Качество и концентрация выделенной ДНК оценивались с использованием спектрофотометрии NanoDrop (Thermo Scientific, США) и флуориметрии Qubit (Invitrogen, США). Также проводился контроль на предмет деградации тотальной ДНК методом электрофореза в 1% агарозном геле.

Для амплификации переменных регионов гена 16S рРНК использовались праймеры [18]:

Tru16S_V3V4F (341F):
CTACACGACGCTCTTCCGATCT
CCTACGGGNGGCWGCAG,
Tru16S_V3V4R (785R):
CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

GACTACHVGGGTATCTAATCC,
Tru16S_V4V5F (515F):
CTACACGACGCTCTTCCGATCT
GTGYCAGCMGCCGCGGTAA,
Tru16S_V4V5R (926R):
CAGAAGTGTGCTCTTCCGATCT
CCGYCAATYMTTTRAGTTT.

Очистка ампликонов проводилась с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter). Индексирование и подготовка библиотек для секвенирования выполнялись по протоколу Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide. Качество библиотек проверялось на Bioanalyzer (Agilent Technologies) [16].

Библиотеки были секвенированы на платформе Illumina MiSeq в режиме PE.

Для первичной обработки парноконцевых прочтений применялась программа Trimmomatic PE [2]. В ходе обработки были удалены адаптеры Illumina, концевые нуклеотиды с низким качеством, осуществлена фильтрация качества посредством скользящего окна и удалены прочтения, чья длина была менее 150 п.н. Оценка качества производилась с использованием шкалы Phred+33 [1].

Уникальные последовательности были обработаны с использованием программного обеспечения VSEARCH. На первом этапе была выполнена дупликация для обнаружения уникальных последовательностей (--derep_fulllength), при этом последовательности, представленные менее двух раз (--minuniquesize 2), были удалены. Затем был осуществлен поиск и удаление химерных последовательностей в два этапа: сначала *de novo* с использованием алгоритма UCHIME3 (--uchime3_denovo) [4], а затем с использованием референсной базы (--uchime_ref) с использованием базы данных "Gold".

После удаления химер, специфические последовательности сгруппировали в операционные таксономические единицы (ОТЕ). Кластеризация выполнялась в VSEARCH с применением алгоритма, основанного на размере (--cluster_size), при уровне сходства 97% (--id 0.97).

Риды были сопоставлены с репрезен-

тативными ОТЕ-последовательностями. Файл с результатами в формате UC послужил основой для создания матрицы встречаемости ОТЕ. Для установления таксономической классификации каждой последовательности ОТЕ применялся алгоритм SINTAX, реализованный в программе VSEARCH (--syntax) [3]. В качестве эталонной базы данных использовалась база SILVA (версия 138).

Из итоговой таблицы были исключены ОТЕ, не получившие таксономического определения ("Unassigned"), а также те, чья классификация не соответствовала установленному порогу достоверности (0,6).

Для оценки филогенетических взаимоотношений между полученными ОТЕ, репрезентативные последовательности ОТЕ были выровнены с помощью MAFFT v7.505 с автоматическим выбором стратегии выравнивания с автоматическим выбором стратегии (--auto) [8, 19]. Филогенетические деревья были построены методом максимального правдоподобия (ML) в FastTree v2.1.11 с использованием модели GTR+CAT [19].

Использованные версии программ

Программное обеспечение: Trimmomatic v0.39, VSEARCH v2.21.1, MAFFT v7.505, FastTree v2.1.11.

Все анализы выполнялись на платформе Python 3.10.6 с использованием пакетов scipy, statsmodels, biopython.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Секвенирование амплифицированных регионов 16S рПНК гена позволило получить 75 072 (V3-V4) и 27 382 (V4-V5) качественных прочтений. Из-за недостаточного качества или отсутствия первичных данных, информация для трех образцов в области V4-V5 не была получена, поэтому дальнейшие исследования для данной области проводились на 18 образцах.

После очистки и аннотации данных для регионов V3-V4 и V4-V5 было выделено 88 и 25 операционных таксономических единиц (ОТЕ) соответственно, которые были классифицированы при помощи алгоритма SINTAX.

На основании полученной таксономии была проведена фильтрация таблиц ОТЕ для удаления последовательностей, принадлежащих к неквалифицированным таксонам ('Unassigned'). В результате фильтрации для дальнейшего анализа были оставлены 81 ОТЕ для региона V3-V4 и 23 ОТЕ для региона V4-V5.

Филогенетические деревья были реконструированы на основе репрезентативных последовательностей 81 ОТЕ (V3-V4) и 23 ОТЕ (V4-V5). Построенные деревья аннотировались на основе таксономической классификации и использовались для визуализации эволюционных связей между выявленными ОТЕ.

Представленное на рисунке 1 филогенетическое дерево отражает филогенетические связи между таксонами, обнаруженными в исследуемых образцах, и демонстрирует высокую степень таксономического и экологического разнообразия. Дерево получено на основе алгоритмов кластеризации с учетом длины ветвей (эволюционных расстояний) и статистической поддержки узлов, что позволяет оценить надежность полученных группировок. Дублирующиеся позиции обозначают разные, но неидентифицированные штаммы одного вида.

На базовом уровне дерево делится на две крупные клады. Первая из них включает двух представителей таксона, обозначенного как *Simkaniaceae uncultured*, объединенных узлом с максимальной поддержкой (1.000) и обладающих сравнительно короткими ветвями, что свидетельствует об их близком эволюционном родстве. Вторая основная клада характеризуется значительно более сложной структурой, включающей несколько подклад, каждая из которых объединяет таксоны, принадлежащие к различным бактериальным группам.

В рамках клады можно выделить следующие основные подразделения:

Клада *Gemellaceae* и связанные таксоны.

В данном подразделении таксоны рода *Gemellaceae Gemella* объединены с представителями семейств

Streptococcaceae и *Staphylococcaceae*. Обнаруженные здесь филогенетические линии, имеющие высокую статистическую поддержку (близкую к 1.000), указывают на тесное родство между морфологически и функционально схожими представителями данных таксонов. Дополнительно выявлена интеграция таксонов, относящихся к порядку *Peptostreptococcales-Tissierellales*, что указывает на возможные общие эволюционные траектории в анаэробных сообществах.

Клада представителей *Gammaproteobacteria* и смежных групп.

В этом кластере наблюдается объединение таксонов, характерных для таких родов, как *Sienotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas*, а также представителей *Escherichia-Shigella* и *Vibrio*. Разветвленная структура данной клады, включающая несколько амплифицированных ОТЕ, отражает высокий уровень экогеографического разнообразия и множественность функциональных адаптаций, характерных для микроорганизмов, обитающих в водных и прилегающих экосистемах.

Клада, включающая таксоны семейств *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae* и сопутствующих групп.

Разнообразный состав этой группы определяется наличием таксонов, принадлежащих к *Oxalobacteraceae* (например, *Undibacterium*, *Janthinobacterium*), а также представителей *Polynucleobacter*, *Dechloromonas* и родов из семей *Aquabacterium* и *Rhodofera* (*Comamonadaceae*). Высокая статистическая поддержка узлов и значительные эволюционные расстояния свидетельствуют о древнем расхождении и функциональном разнообразии данных таксонов, что может быть связано с их участием в окислительных и редуцирующих процессах в различных средах [15].

Отдельные и редко встречающиеся таксоны.

Некоторые ветви дерева, такие как таксон *T34_T34*, демонстрируют значительные эволюционные расхождения, подтвержденные длинными ветвями, что

указывает на их вероятно ранее не охарактеризованные филогенетические линии или адаптацию. Кроме того, подразделение, обозначенное как *Clade III*, объединяет представителей *Sphingomonadaceae*, а также таксоны из *Rhizobiaceae*, *Beijerinckiaceae* и *Caulobacteraceae*, что характерно для микроорганизмов, ассоциированных с почвенными и водными экосистемами.

Клада *Spirosomaceae* и *Flavobacteriaceae*.

Данный раздел дерева, представленный разветвленной структурой, содержит таксоны *Spirosomaceae* (например, *Pseudarcicella*) вместе с разнообразными представителями

Flavobacteriaceae *Flavobacterium*. Обилие вложенных узлов с высокими значениями поддержки указывает на глубокое диверсификационное разделение внутри этих групп, что отражает их высокую экологическую пластичность и адаптивность.

Клада таксонов, ассоциированных с кишечным и поверхностным микробиомом.

В этой части дендрограммы объединены таксоны, характерные для микробиоты кишечника и кожных покровов, такие как представители *Prevotella*, *Lactobacillus*, а также роды, включающие представителей *Ruminococcaceae* и *Muribaculaceae*. Такие объединения подчеркивают возможные функциональные связи между микроорганизмами, участвующими в переработке сложных органических веществ и метаболизме углеводов [14].

Клада таксонов, характерных для поверхностных сообществ.

Здесь наблюдается группировка таксонов, связанных с кожной микробиотой – представителей *Cutibacterium*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и других. Это говорит о наличии адаптивных стратегий, позволяющих микроорганизмам успешно колонизировать внешние среды хозяев, а также о вероятном участии этих таксонов в патогенных и комменсальных процессах.

Низкоизученные таксоны и ОТЕ с обозначением «*Candidatus*».

Особое внимание заслуживают небольшие ветви, включающие таксоны с пометкой *Candidatus Nomurabacteria* и неопределенные ОТЕ. Их положение в дереве может свидетельствовать о существовании ранее не охарактеризованных эволюционных линий, что требует дальнейшего исследования в контексте функциональной экологии и адаптивных механизмов.

Представленное на рисунке 2 филогенетическое дерево иллюстрирует эволюционные взаимоотношения между бактериальными таксонами, выявленными в исследуемой выборке, и демонстрирует высокую степень таксономического разнообразия с учетом эволюционных расстояний и статистической поддержки внутренних узлов. Дублирующиеся позиции обозначают разные, но неидентифицированные штаммы одного вида.

На базовом уровне дерево делится на несколько крупных клад, каждая из которых объединяет таксоны, характеризующиеся схожими морфологическими и функциональными особенностями. Эволюционные расстояния (отраженные в длине ветвей) варьируются от относительно коротких значений, свидетельствующих о недавнем родстве, до сравнительно длинных ветвей, указывающих на глубокие эволюционные расхождения.

В рамках клады можно выделить следующие основные подразделения:

Клада *Sphingomonadaceae* и *Beijerinckiaceae*.

В первом подразделении объединены таксоны *Sphingomonadaceae* *Sphingomonas* и *Beijerinckiaceae* *Bosea*, что указывает на относительно близкое эволюционное родство между представителями этих групп. Длина ветвей в этом кластере невелика, что соответствует сравнительно небольшим эволюционным изменениям.

Клада, включающая таксоны *Phycisphaeraceae*, *Chitinophagaceae*, *Weeksellaceae* и *Flavobacteriaceae*.



Рисунок 1 – Филогенетический анализ региона V3-V4 методом максимального правдоподобия

Второе подразделение характеризуется наличием таксона *Phycisphaeraceae*_CL500-3, который объединен с рядом потомков: сначала - таксон *Chitinophagaceae*_Sediminibacterium, далее - группировка, в которую входят представители *Weeksellaceae*_Chryseobacterium и, на завершающем уровне, два отдельных представителя *Flavobacteriaceae*_Flavobacterium. Здесь наблюдаются как умеренные, так и более выраженные эволюционные ветвления, отражающие исторические разделения между таксонами, ассоциированными преимущественно с водной и осадочной средой.

Клада с комплексной структурой, включающей несколько внутренних подразделений.

Третья крупная клада демонстрирует многоуровневую организацию:

А. Подразделение *Chitinibacteraceae* и смежных таксонов.

На начальных ветвях данного разделения объединены представители

*Chitinibacteraceae*_Iodobacter, за которыми следует дальнейшая диверсификация: выделяются таксоны, принадлежащие к *Oxalobacteraceae* (в частности, *Undibacterium* и *Massilia*) и таксоны, представляющие *Rhodocyclaceae*_Dechloromonas в сочетании с представителями *Comamonadaceae* (*Rhodoferax* и *Aquabacterium*). Эти узлы поддерживаются достаточно высокими значениями, что говорит о древнем расхождении и функциональной специализации групп.

В. Подразделение, содержащее ОТЕ и таксоны, связанные с *Vibrionaceae* и *Moraxellaceae*.

В данном сегменте выделяется ОТЕ (обозначенный как OTU_V4V5_2), объединенный с таксонами *Vibrionaceae*_Vibrio и *Moraxellaceae*_Moraxella. Эволюционные расстояния и средняя поддержка узлов в этой ветви указывают на возможную адаптацию организмов к специализированным экологическим нишам, предположительно, связанным с водной средой.

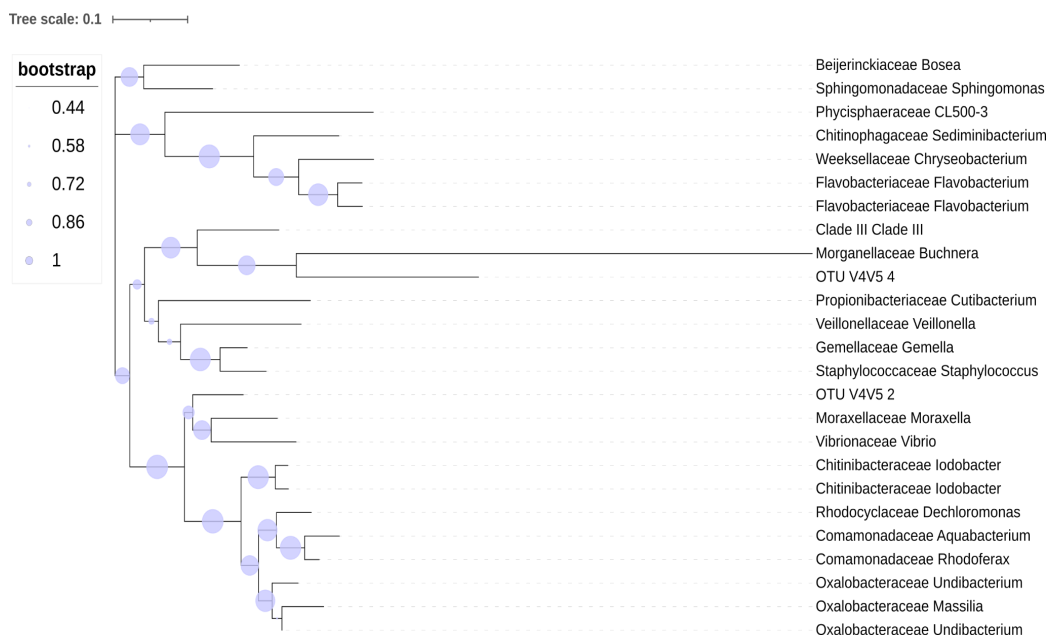


Рисунок 2 – Филогенетический анализ региона V4-V5 методом максимального правдоподобия

С. Подразделение *Clade III* и таксоны, ассоциированные с кожной и кишечной микробиотой.

Еще одно важное подразделение объединяет таксоны, обозначенные как *Clade III Clade III*, где дополнительно выделяются ОТЕ (например, OTU_V4V5_4) и таксоны из семейства *Morganellaceae* (*Buchnera*). Непосредственно с данной группой интегрировано объединение, состоящее из представителя *Propionibacteriaceae Cutibacterium*, далее - таксоны *Veillonellaceae Veillonella* и, наконец, группа, где таксоны *Staphylococcaceae Staphylococcus* тесно связаны с представителями *Gemellaceae Gemella*. Этот кластер подчеркивает особенности таксонов, ассоциированных с микробиотой кожных покровов и слизистых оболочек [12], а также их возможное участие в патогенных или комменсальных взаимодействиях.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Полученные филогенетические деревья демонстрируют высокую степень таксономической дифференциации, отражая как недавние эволюционные расхождения (обусловленные короткими ветвями и высокой поддержкой узлов), так и древние дивергенции, подтвержденные значительной длиной ветвей в некоторых кладах. Такая кластеризация свидетельствует о множественных радиациях внутри бактериальных таксонов, обусловленных адаптацией к различным экологическим нишам, что может указывать на сложность и взаимосвязанность микробных сообществ в анализируемых выборках.

Таким образом, филогенетический анализ позволил не только реконструировать эволюционные взаимоотношения между изучаемыми таксонами, но и выявить потенциально новые эволюционные линии, требующие дальнейшей геномной и функциональной характеристики.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* обнаруженные при анализе региона V3-V4 согласуются с данными исследования метагеномов плотоядных рыб [9]. Что в свою очередь может косвенно свидетельствовать, о высоком

содержании продуктов животного происхождения в используемых комбикормах для производителей.

Стоит заметить, что ни в одной кладе не было обнаружено представителей *Clostridium* и *Aeromonadaceae*. Данные микроорганизмы ассоциированы с расщеплением целлюлозы в кишечнике рыб [9]. Эта молекула присутствует, как растительный компонент, практически во всех комбикормах для рыб. В связи с этим, можно предположить, что корма усваиваются в недостаточной степени, что в свою очередь снижает прирост массы и повышает финансовые затраты на корма.

Высокое филогенетическое разнообразие обнаруженных таксонов, в том числе присутствие ОТЕ, обозначенных как *Candidatus* или относящихся к малоизученным линиям, указывает на недостаточную представленность микробиоты пресноводных рыб в существующих базах данных. Это также подчеркивает потенциал дальнейшего метагеномного и метатранскриптомного анализа.

В кластере *Gammaproteobacteria* наблюдается разветвленная структура, включающая несколько ОТЕ, что отражает высокий уровень экогеографического разнообразия и множественность функциональных адаптаций, характерных для микроорганизмов, обитающих в водных и прилегающих экосистемах.

Полученные данные о филогенетическом разнообразии и кластеризации таксонов имеют важное практическое значение для аквакультуры и сохранения биоразнообразия. Понимание эволюционных закономерностей формирования кишечной микробиоты позволяет прогнозировать реакцию рыб на изменения среды обитания и разрабатывать эффективные стратегии поддержания их здоровья.

PHYLOGENETIC STUDY OF THE GUT MICROBIOME OF BROAD WHITEFISH (*COREGONUS NASUS*)

Voronov K.E.^{1*} – Genetics Lab Engineer (SPIN 7341-0679); Lukina Yu.N.² – Doctor of Biological Sciences, Institute Di-

rector (SPIN 3429-0446); **Apalikova O.V.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Head of the Genetics Lab (SPIN 6660-4950)

¹ St. Petersburg branch of the State Scientific Center of the Russian Federation FGBNU “VNIRO” (“GosNIORH” named after L. S. Berg)

² Institute of Water Problems of the North KarRC RAS (FGBI “IVPS FRC KarRC RAS”)

*stek486@yandex.ru

ABSTRACT

The intestinal microbiota of vertebrates is a complex biological system that plays a key role in metabolism and the formation of immune defense. Microbial communities decompose complex organic compounds, synthesize vitamins and ensure the stability of the internal environment of the body, closely interacting with its physiological processes. Thus, the intestinal microbiota directly affects the health of the host organism. The study of evolutionary relationships in the intestinal microbiota of broad whitefish (*Coregonus nasus*) by amplicon sequencing of the 16S rRNA gene contributes to an understanding of their trophic and competitive interactions in the host organism. The following methods were used in the study: NGS sequencing of the 16S rRNA gene in the V3-V4 and V4-V5 regions on the Illumina MiSeq platform in PE mode, as well as processing the obtained data using Trimmomatic v0.39, VSEARCH v2.21.1, MAFFT v7.505, FastTree v2.1.11 software. All analyses were performed on Python 3.10.6 using scipy, statsmodels, and biopython packages. The resulting phylogenetic trees demonstrate a high level of taxonomic differentiation, reflecting both recent evolutionary divergences (characterized by short branches and high node support) and ancient divergences supported by significant branch lengths in certain clades. Such organization indicates multiple radiations within bacterial taxa due to adaptation to different ecological niches, which indicates the complexity and interconnectedness of microbial communities in the studied samples. The high phylo-

genetic diversity of the detected taxa, including the presence of OTUs classified as *Candidatus* or belonging to poorly studied groups, highlights the insufficient study of the freshwater fish microbiota in existing databases.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological). V. 57(1). P. 289–300. <https://www.jstor.org/stable/2346101>
2. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. V. 30(15). P. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
3. Edgar R. C. 2016. SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences // bioRxiv. 074161. DOI: 10.1101/074161
4. Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C., Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // Bioinformatics. V. 27(16). P. 2194–2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381
5. Egerton S., Culloty S., Whooley J., Stanton C., Ross R. P. 2018. The gut microbiota of marine fish // Frontiers in Microbiology. V. 9. P. 873. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00873
6. Ghanbari M., Kneifel W., Domig K. J. 2015. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing // Aquaculture, V. 448. P. 464–475. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.033
7. Givens C. E., Ransom B., Bano N., Holibaugh J. T. 2015. Comparison of gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species // Marine Ecology Progress Series. V. 518. P. 209–223. DOI: 10.3354/meps11034
8. Katoh K., Standley D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // Molecular Biology and Evolution. V. 30(4). P. 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010
9. Kim, P. S., Shin, N. R., Lee, J. B., Kim,

- M. S., Whon, T. W., Hyun, D. W., Yun, J. H., Jung, M. J., Kim, J. Y., Bae, J. W. 2021. Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish // *Microbiome*. V. 9 (1). P. 166. DOI: 10.1186/s40168-021-01113-x
10. Li X., Yu Y., Feng W., Yan Q., Gong Y. 2012. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae // *The Journal of Microbiology*. V. 50(1). P. 29–37. DOI: 10.1007/s12275-012-1340-1
11. Liu Y., Li Y., Li J., Zhou Q., Li X. 2022. Gut microbiome analyses of wild migratory freshwater fish (*Megalobrama terminalis*) through geographic isolation // *Frontiers in Microbiology*. V. 13. P. 858454. DOI: 10.3389/fmicb.2022.858454
12. Maji U. J., Mohanty S., Mahapatra A. S., Mondal H. K., Samanta M., Maiti N. K. 2022. Exploring the gut microbiota composition of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*), under diverse culture conditions // *Genomics*. V. 114(3), P. 110354. DOI: 10.1016/j.ygeno.2022.110354
13. McFall-Ngai M., Hadfield M.G., Bosch T.C.G., Carey H.V., Domazet-Lošo T., Douglas A.E., Wernegreen J.J. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 110(9). P. 3229–3236. DOI: 10.1073/pnas.1218525110
14. Sadeghi J., Chaganti S. R., Johnson T. B., Heath D. D. 2023. Host species and habitat shape fish-associated bacterial communities: phylosymbiosis between fish and their microbiome // *Microbiome*. V. 11(1). P. 39. DOI: 10.1186/s40168-023-01697-6
15. Suhr M., Fichtner-Grabowski F.T., Seibel H., Bang C. 2023. Effects of plant-based proteins and handling stress on intestinal mucus microbiota in rainbow trout // *Scientific Reports*. V. 13. Article 50071. DOI: 10.1038/s41598-023-50071-x
16. Tarnecki A. M., Burgos F. A., Ray C. L., Arias C. R. 2017. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics // *Journal of Applied Microbiology*. V. 123(1). P. 2–17. DOI: 10.1111/jam.13415
17. Tsuchiya C., Sakata T., Sugita H. 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish // *Letters in Applied Microbiology*. V. 46(1). P. 43–48. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x
18. Wang A. R., Ran C., Ringø E., Zhou Z. G. 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research // *Reviews in Aquaculture*. V. 10(3). P. 626–640. DOI: 10.1111/raq.12191
19. Washburne A. D., Morton J. T., Sanders J., McDonald D., Zhu Q., Oliverio A. M., Knight R. 2018. Methods for phylogenetic analysis of microbiome data // *Nature microbiology*. V. 3(6). P. 652–661. DOI: 10.1038/s41564-018-0156-0

REFERENCES

1. Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. V. 57(1). P. 289–300. <https://www.jstor.org/stable/2346101>
2. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. V. 30 (15). P. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
3. Edgar R. C. 2016. SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences // *bioRxiv*. 074161. DOI: 10.1101/074161
4. Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C., Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // *Bioinformatics*. V. 27(16). P. 2194–2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381
5. Egerton S., Culloty S., Whooley J., Stanton C., Ross R. P. 2018. The gut microbiota of marine fish // *Frontiers in Microbiology*. V. 9. P. 873. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00873
6. Ghanbari M., Kneifel W., Domig K. J. 2015. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing // *Aquaculture*, V. 448. P. 464–475. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.033
7. Givens C. E., Ransom B., Bano N., Hollibaugh J. T. 2015. Comparison of gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark spe-

- cies // *Marine Ecology Progress Series*. V. 518. P. 209–223. DOI: 10.3354/meps11034
8. Katoh K., Standley D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Molecular Biology and Evolution*. V. 30(4). P. 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010
9. Kim, P. S., Shin, N. R., Lee, J. B., Kim, M. S., Whon, T. W., Hyun, D. W., Yun, J. H., Jung, M. J., Kim, J. Y., Bae, J. W. 2021. Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish // *Microbiome*. V. 9 (1). P. 166. DOI: 10.1186/s40168-021-01113-x
10. Li X., Yu Y., Feng W., Yan Q., Gong Y. 2012. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae // *The Journal of Microbiology*. V. 50(1). P. 29–37. DOI: 10.1007/s12275-012-1340-1
11. Liu Y., Li Y., Li J., Zhou Q., Li X. 2022. Gut microbiome analyses of wild migratory freshwater fish (*Megalobrama terminalis*) through geographic isolation // *Frontiers in Microbiology*. V. 13. P. 858454. DOI: 10.3389/fmicb.2022.858454
12. Maji U. J., Mohanty S., Mahapatra A. S., Mondal H. K., Samanta M., Maiti N. K. 2022. Exploring the gut microbiota composition of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*), under diverse culture conditions // *Genomics*. V. 114(3), P. 110354. DOI: 10.1016/j.ygeno.2022.110354
13. McFall-Ngai M., Hadfield M.G., Bosch T.C.G., Carey H.V., Domazet-Lošo T., Douglas A.E., Wernegreen J.J. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 110(9). P. 3229–3236. DOI: 10.1073/pnas.1218525110
14. Sadeghi J., Chaganti S. R., Johnson T. B., Heath D. D. 2023. Host species and habitat shape fish-associated bacterial communities: phyllosymbiosis between fish and their microbiome // *Microbiome*. V. 11(1). P. 39. DOI: 10.1186/s40168-023-01697-6
15. Suhr M., Fichtner-Grabowski F.T., Seibel H., Bang C. 2023. Effects of plant-based proteins and handling stress on intestinal mucus microbiota in rainbow trout // *Scientific Reports*. V. 13. Article 50071. DOI: 10.1038/s41598-023-50071-x
16. Tarnecki A. M., Burgos F. A., Ray C. L., Arias C. R. 2017. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics // *Journal of Applied Microbiology*. V. 123(1). P. 2–17. DOI: 10.1111/jam.13415
17. Tsuchiya C., Sakata T., Sugita H. 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish // *Letters in Applied Microbiology*. V. 46(1). P. 43–48. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x
18. Wang A. R., Ran C., Ringø E., Zhou Z. G. 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research // *Reviews in Aquaculture*. V. 10(3). P. 626–640. DOI: 10.1111/raq.12191
19. Washburne A. D., Morton J. T., Sanders J., McDonald D., Zhu Q., Oliverio A. M., Knight R. 2018. Methods for phylogenetic analysis of microbiome data // *Nature microbiology*. V. 3(6). P. 652–661. DOI: 10.1038/s41564-018-0156-0