



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria **ETSE-UV**



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Alineamientos de genoma completo: su uso en la identificación taxonómica de aislados bacterianos y especiación de cepas del género *Bifidobacterium*

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN BIOINFORMÁTICA

Autor: Antonio Bahilo Gómez

Tutores: Alfonso Benítez Páez y Rosario Gil García

Índice

➤ Introducción

- Características del género *Bifidobacterium*
- Diversidad dentro de *Bifidobacterium*
- Análisis de la diversidad genética
- Análisis de genomas completos

➤ Objetivos

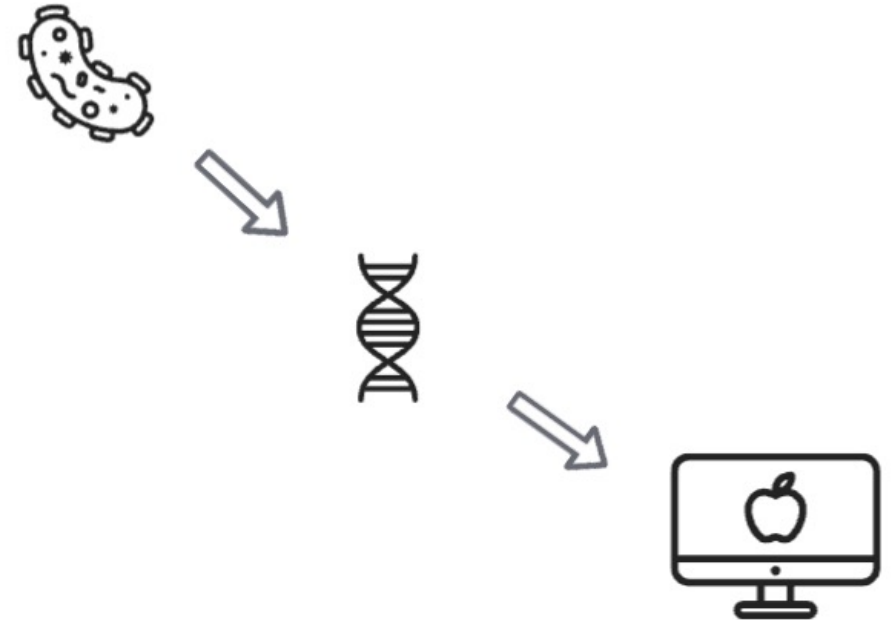
➤ Diseño metodológico

➤ Herramienta FastANI

➤ Resultados y discusión

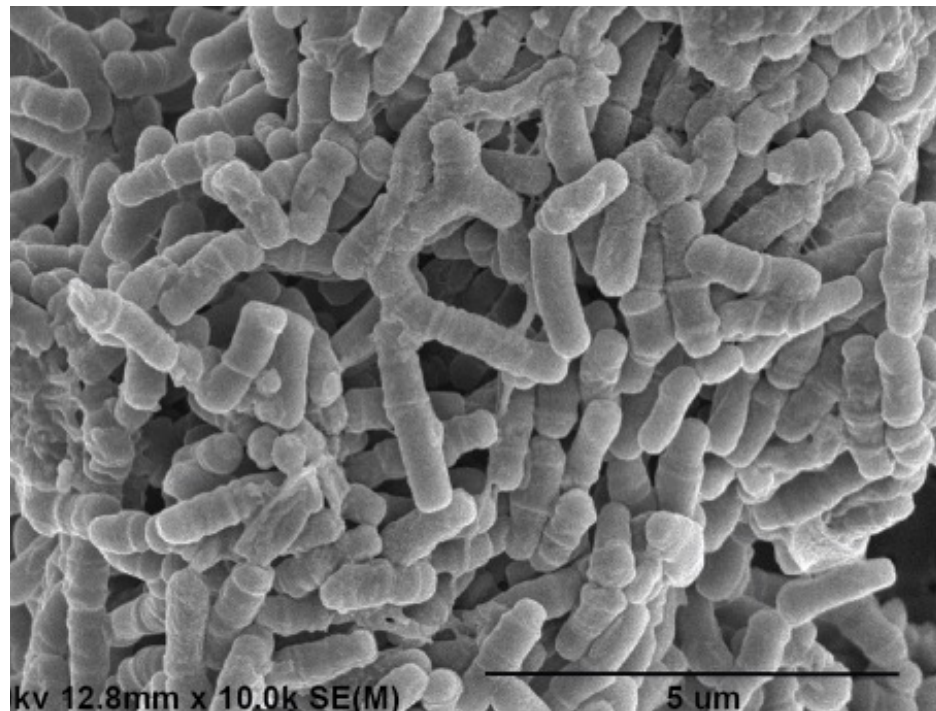
➤ Conclusión

➤ Agradecimientos

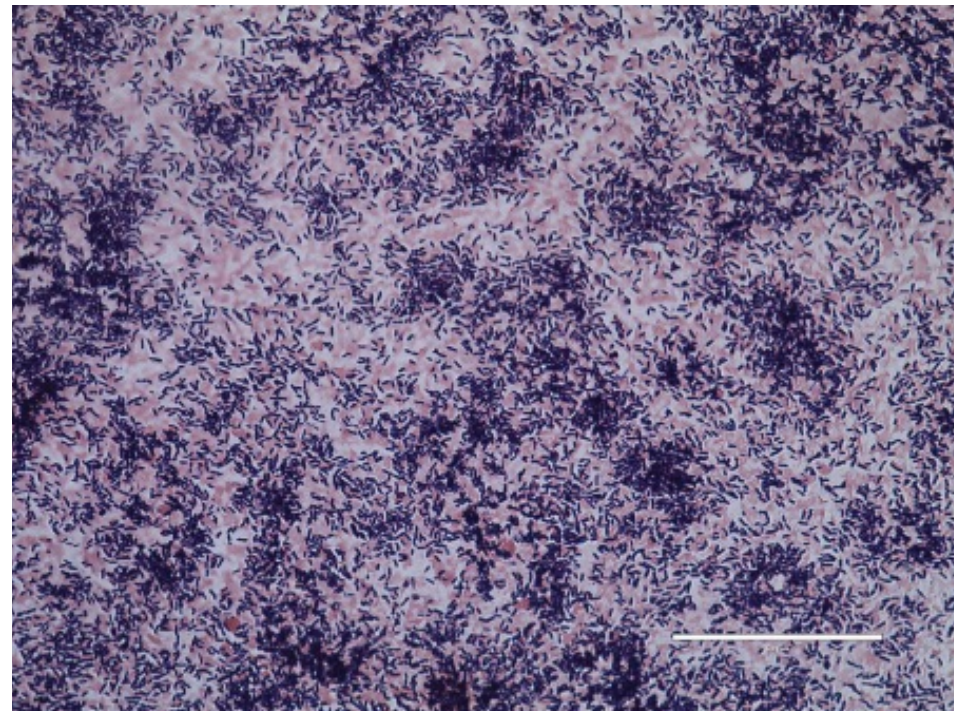


Características del género *Bifidobacterium*

B. infantis (Henrick et al; 2019). DOI: [10.1038/s41390-019-0533-2](https://doi.org/10.1038/s41390-019-0533-2)

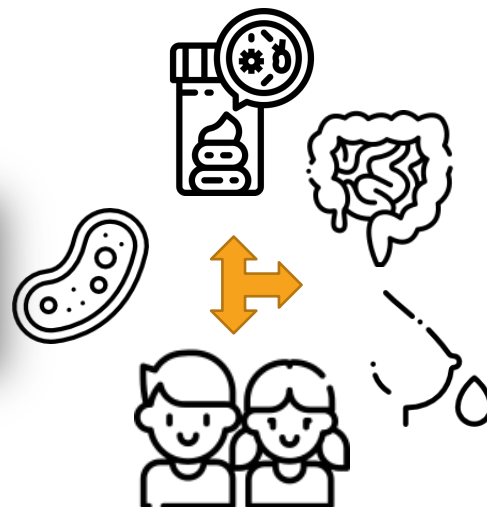


B. infantis (Henrick et al; 2019). DOI: [10.1038/s41390-019-0533-2](https://doi.org/10.1038/s41390-019-0533-2)



The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota

Christian Milani ¹, Sabrina Duranti ¹, Francesca Bottacini ², Eoghan Casey ²,



The human gut microbiota during the initial stages of life: insights from bifidobacteria

Francesca Turroni ¹, Christian Milani ², Marco Ventura ², Douwe van Sinderen ³

Breast-Milk Microbiota Linked to Celiac Disease Development in Children: A Pilot Study From the PreventCD Cohort

Alfonso Benítez-Páez ¹, Marta Olivares ¹, Hania Szajewska ², Małgorzata Pieścik-Lech ²,

Diversidad dentro de *Bifidobacterium*

Genomic insights into bifidobacteria

Ju-Hoon Lee ¹, Daniel J O'Sullivan

Species no. ^a	Name ^b	Subspecies	Origin ^c
1	<i>B. adolescentis</i>		Intestine of adult
2	<i>B. angulatum</i>		Human feces
3	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Animal feces Yogurt
4	<i>B. asteroides</i>		Intestine of honeybee
5	<i>B. bifidum</i>		Infant feces
6	<i>B. bombi</i>		Intestine of bumblebee
7	<i>B. boum</i>		Rumen of cattle
8	<i>B. breve</i>		Intestine of infant
9	<i>B. catenulatum</i>		Intestine of adult
10	<i>B. choerinum</i>		Porcine feces
11	<i>B. coryneforme</i>		Intestine of honeybee
12	<i>B. crudilactis</i>		Raw milk
13	<i>B. cuniculi</i>		Feces of rabbit
14	<i>B. dentium</i>		Human dental caries
15	<i>B. gallicum</i>		Human feces
16	<i>B. gallinarum</i>		Chicken cecum
17	<i>B. indicum</i>		Intestine of honeybee
18	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	Intestine of infant Intestine of adult Porcine feces
19	<i>B. magnum</i>		Rabbit feces
20	<i>B. merycicum</i>		Bovine rumen
21	<i>B. minimum</i>		Sewage
22	<i>B. pseudocatenulatum</i>		Infant feces
23	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Bovine rumen Porcine feces
24	<i>B. psychraerophilum</i>		Porcine feces
25	<i>B. pullorum</i>		Chicken feces
26	<i>B. ruminantium</i>		Bovine rumen
27	<i>B. saeculare</i>		Rabbit feces
28	<i>B. scardovii</i>		Human blood
29	<i>B. subtile</i>		Sewage
30	<i>B. thermophilum</i>		Porcine feces
31	<i>B. thermacidophilum</i>	<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> <i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Porcine feces Sewage

Beneficios para la salud humana

Acidified milk formula supplemented with bifidobacterium lactis: impact on infant diarrhea in residential care settings

Jean-Pierre Chouraqui ¹, Louis-Dominique Van Egroo, Marie-Claire Fichot

Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects

T He ¹, M G Priebe, Y Zhong, C Huang, H J M Harmsen, G C Raangs, J-M Antoine, G W Welling,

Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects

Asal Ataie-Jafari ¹, Bagher Larijani, Hamid Alavi Majd, Farideh Tahbaz

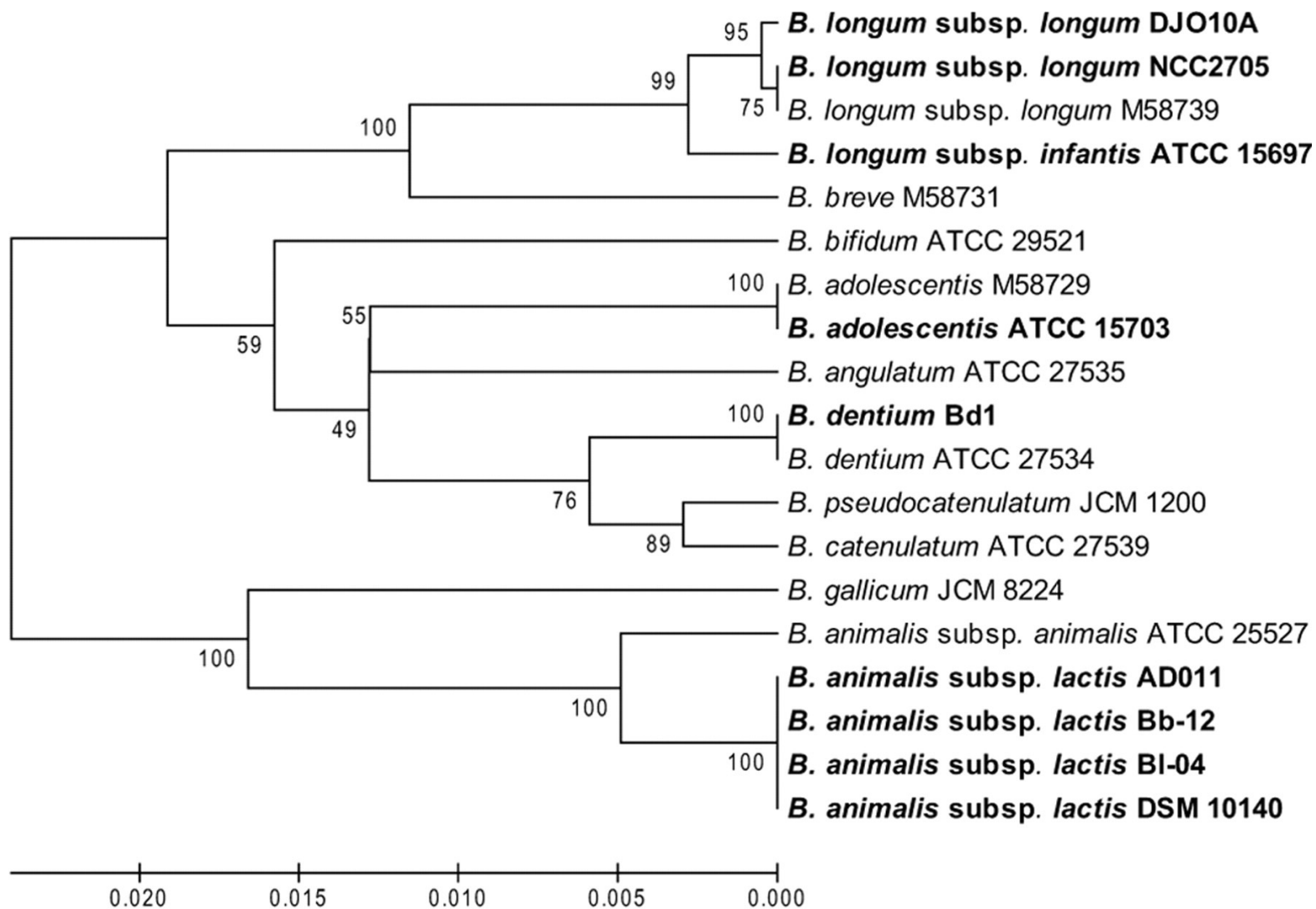
Immunomodulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults

Hanne Risager Christensen ¹, Charlotte Nexmann Larsen, Pernille Kaestel, Lisbeth Buus Rosholm,

Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats

Richard K Le Leu ¹, Ying Hu, Ian L Brown, Richard J Woodman, Graeme P Young

Análisis de la diversidad biológica



Extraído de (Lee & O'Sullivan; 2010). DOI: [10.1128/MMBR.00004-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-10)

Cronología de las técnicas de análisis filogenético

DHH

1961

ARN
ribosómico
16S

1977

MLST de genes
codificantes

1998

ANI (identidad
nucleotídica
media)

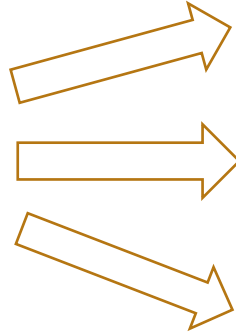
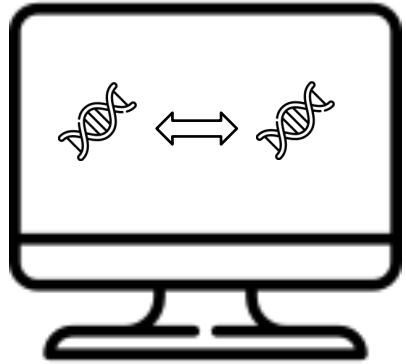
2005

**Determinación
de especie**

- DHH >70%
- ARNr 16S > 97%
- ANI > 95%

Extraído de (Hugenholtz et al; 2021). DOI: [10.1038/s41396-021-00941-x](https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x)

Análisis de genomas completos



ANIm

ANIb

FastANI

A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity

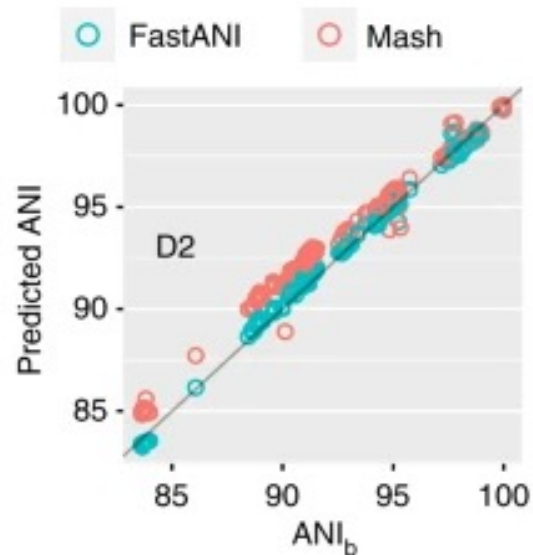
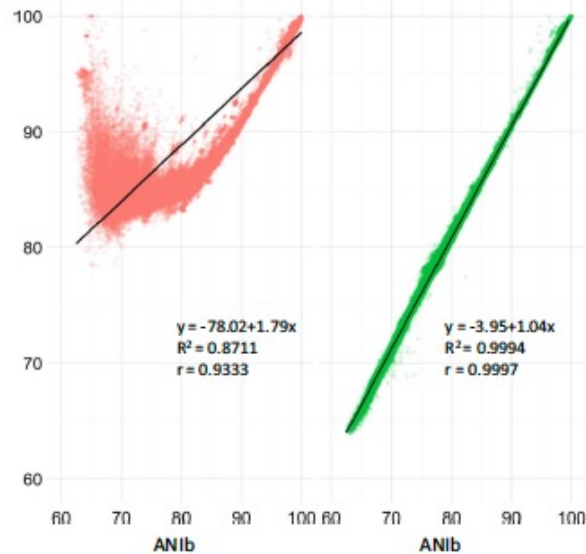
[Seok-Hwan Yoon](#)^{1,2}, [Sung-Min Ha](#)^{1,2}, [Jeongmin Lim](#)², [Soonjae Kwon](#)², [Jongsik Chun](#)^{3,4}

High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries

[Chirag Jain](#), [Luis M. Rodriguez-R](#), [Adam M. Phillippy](#), [Konstantinos T. Konstantinidis](#) & [Srinivas Aluru](#)

(A) ANIm

(B) OrthoANIb



ANIm VS ANIb

- ANIm comete errores en rangos <90% de ANI.
- ANIm es 4,7x más rápido que ANIb.

FastANI VS ANIb

- FastANI misma precisión que ANIb.
- FastANI 782x más rápido que ANIb.
- FastANI permite comparar genomas incompletos.

Objetivos

- El objetivo general es realizar un **análisis comparativo de más de 800 genomas de cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*** con el estándar **ANI**. Los objetivos específicos son:
 - Establecer **relaciones filogenéticas más robustas** entre las diferentes especies de bifidobacterias con la herramienta **FastANI**.
 - **Detectar inconsistencias** generadas a partir de **anotaciones taxonómicas erróneas** entre los genomas descargados de la base de datos BV-BCR.
 - **Establecer** distribución de **valores ANI intra- e interespecie** en el grupo de datos analizado.

Diseño metodológico

CBV-BRC 3.28.9 ORGANISMS SEARCHES TOOLS & SERVICES All Data Types Find a gene, genome, microarray, etc

Genome List View
GENOMES: (822 Genomes)

Overview Genomes Sequences AMR Phenotypes Features Proteins Specialty Genes Pathways Subsystems

DOWNLOAD KEYWORDS ADV Search FILTERS APPLY

<input type="checkbox"/>	Genome Name	Strain	GenBank Accessions	Size	CDS	Collection Year	Isolation Country	Host Common Name
<input type="checkbox"/>	Bifidobacterium longum strain Bifidobact	Bifidobacterium_longum_BgEED06	CABFLL000000000	2426212	2164			Human
<input type="checkbox"/>	Bifidobacterium longum subsp. longum s	67B	JAERWH000000000	2386390	2139	2020	Italy	Human
<input type="checkbox"/>	Bifidobacterium longum subsp. longum s	108B	JAERWG000000000	2305647	1991	2020	Italy	Human
<input type="checkbox"/>	Bifidobacterium longum subsp. suis strai	209B	JAERWE000000000	2300337	2041	2020	Italy	Human



FastANI



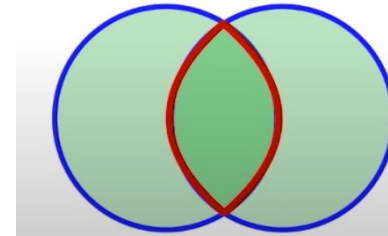
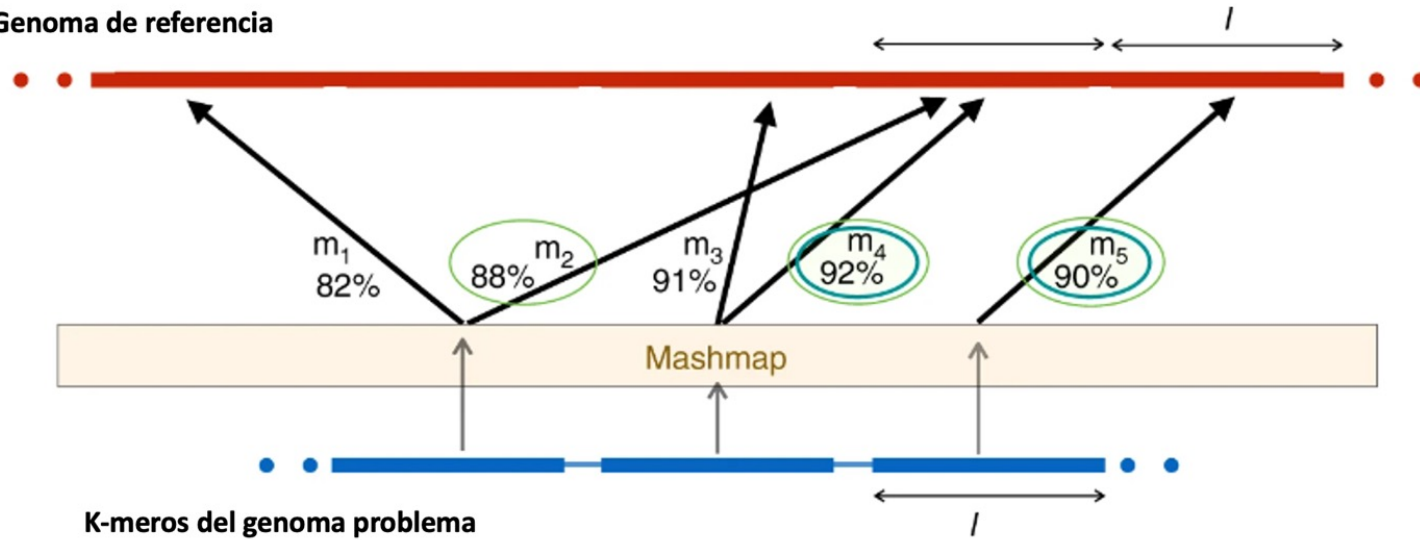
Interpretación
resultados



Filtrado

Algoritmo FastANI

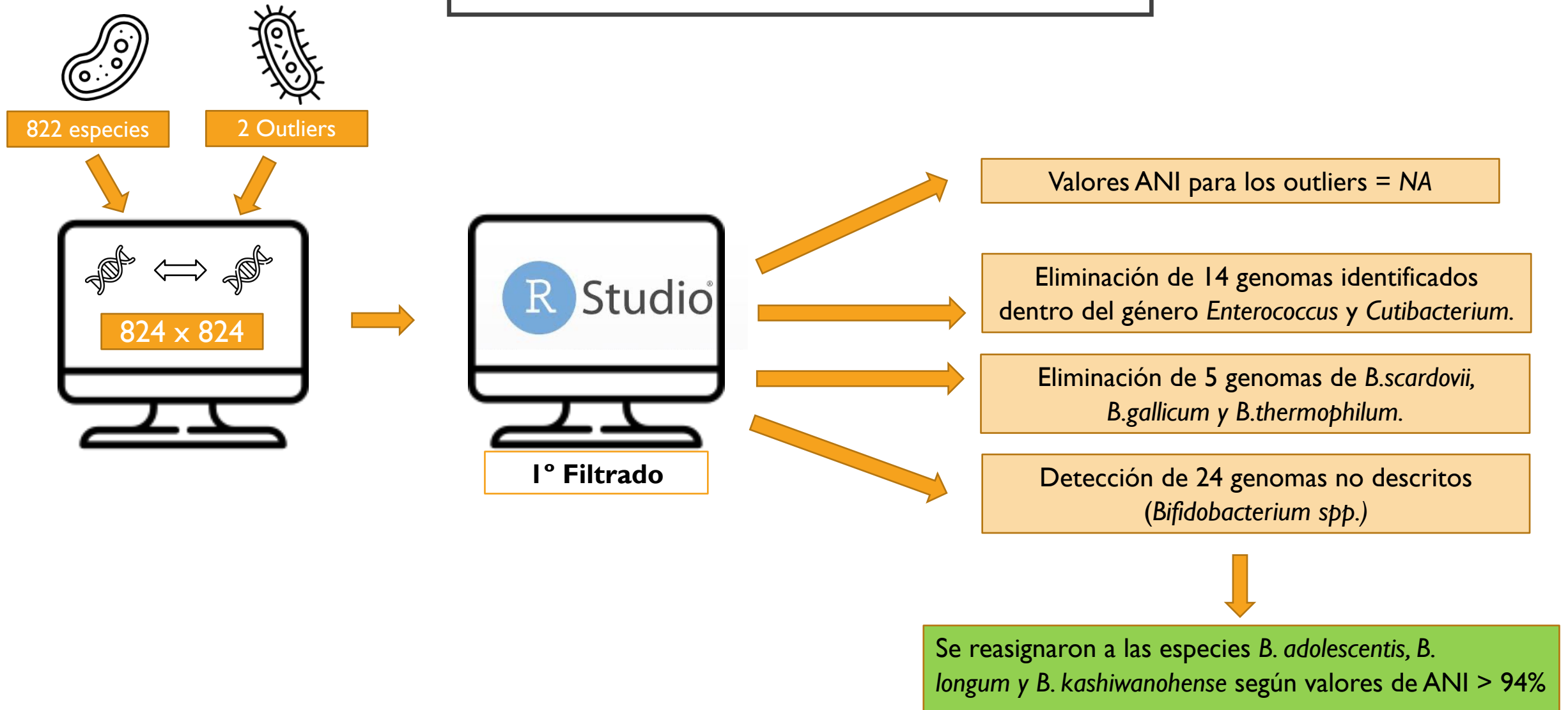
Genoma de referencia



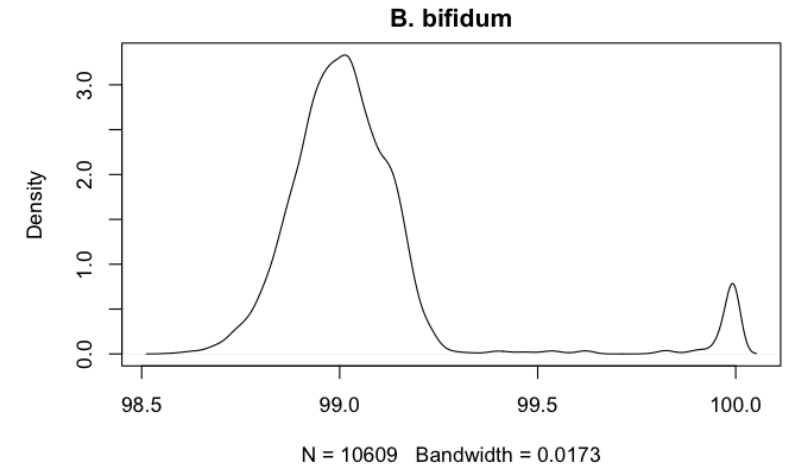
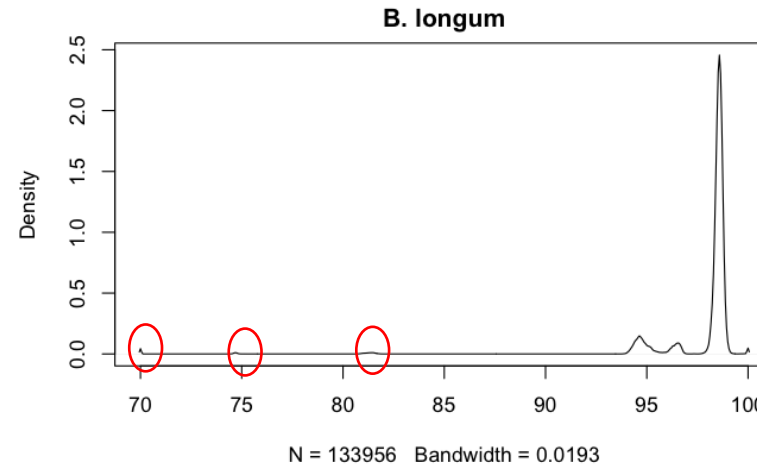
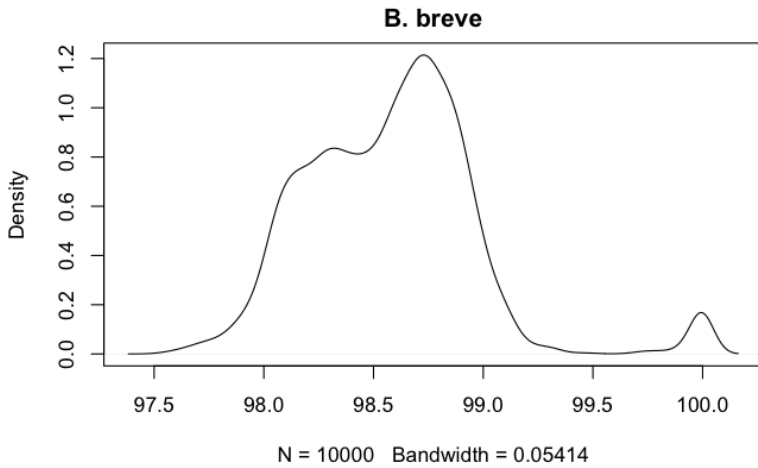
$$\frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} = J$$

J is the Jaccard coefficient

Resultados y discusión



Resultados y discusión



Relaciones Intraespecie

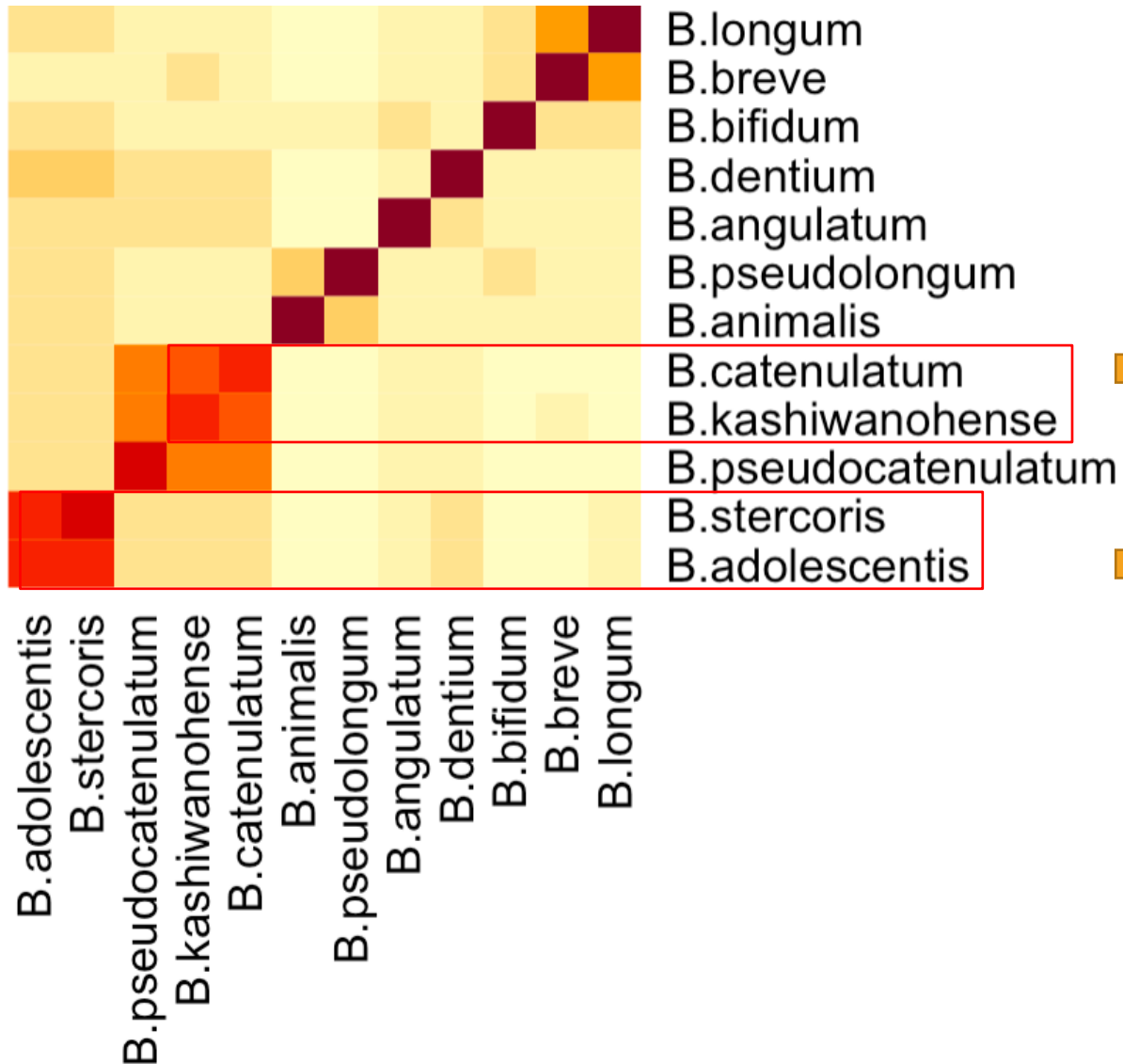
	<i>B.breve</i>	<i>B.kashiwanohense</i>	<i>B.animalis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>B.longum</i>
Tamaño_N	10000	16	1444	10609	7225	133956
Media_ANI_intra	98,57	96,31	99,60	99,05	98,22	97,89
Desviación	0,39	2,40	1,19	0,24	0,36	2,59
CI 95%	98,56-98,57	95,13-97,48	99,53-99,65	99,04-99,05	98,21-98,22	97,87-97,90
Mínimo	97,54	93,99	95,95	98,56	97,15	70,00
Mediana	98,59	95,04	99,99	99,01	98,22	98,53
Cuartil Q1	98,29	94,53	99,99	98,93	98,01	98,36
Cuartil Q3	98,80	98,03	100,00	99,09	98,39	98,66
	<i>B.pseudocatenulatum</i>	<i>B.pseudolongum</i>	<i>B.angulatum</i>	<i>B.catenulatum</i>	<i>B.dentium</i>	<i>B.stercoris</i>
Tamaño_N	4900,00	4,00	9,00	49,00	529,00	1,00
Media_ANI_intra	98,47	98,97	99,37	98,22	99,01	100,00
Desviación	0,42	1,19	0,74	1,34	0,45	NA
CI 95%	98,45-98,48	97,79-100	98,88-99,85	97,83-98,59	98,97-99,05	NA-NA
Mínimo	96,73	97,92	98,56	96,01	98,14	100,00
Mediana	98,50	98,97	99,99	98,40	98,82	100,00
Cuartil Q1	98,26	97,94	98,60	98,13	98,70	100,00
Cuartil Q3	98,69	100,00	100,00	98,61	99,17	100,00

Resultados y discusión

Relaciones Interespecie

	<i>B.breve</i>	<i>B.kashiwanohense</i>	<i>B.animalis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>B.longum</i>
Tamaño_N	70200,00	3192,00	29032,00	71997,00	60945,00	159576,00
Media_ANI_inter	83,15	81,16	77,60	80,13	80,54	81,42
Desviación	3,60	4,00	0,44	1,01	1,68	3,02
CI 95%	83,12-83,18	81,02-81,29	77,59-77,60	80,11-80,13	80,52-80,54	81,40-81,43
Mínimo	70,00	74,81	70,00	70,00	70,00	70,00
Mediana	85,97	79,57	77,58	80,50	80,17	80,50
Cuartil Q1	79,75	79,26	77,47	79,77	79,81	79,60
Cuartil Q3	86,53	80,61	77,68	80,74	80,43	81,19
	<i>B.pseudocatenulatum</i>	<i>B.pseudolongum</i>	<i>B.angulatum</i>	<i>B.catenulatum</i>	<i>B.dentium</i>	<i>B.stercoris</i>
Tamaño_N	51240,00	1600,00	2397,00	5565,00	17917,00	801,00
Media_ANI_inter	80,18	78,11	79,95	80,93	79,56	82,38
Desviación	2,26	0,81	0,97	3,97	1,54	5,63
CI 95%	80,16-80,19	78,07-78,15	79,90-79,98	80,82-81,03	79,53-79,58	81,98-82,76
Mínimo	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	74,71
Mediana	79,55	77,95	79,82	79,27	78,96	80,20
Cuartil Q1	79,28	77,75	79,52	79,03	78,76	79,89
Cuartil Q3	79,85	78,31	80,09	80,04	79,18	80,56

Resultados y discusión



Comparative genomic analysis revealed genetic divergence between *Bifidobacterium catenulatum* subspecies present in infant versus adult guts

Jiaqi Liu ^{# 1}, Weicheng Li ^{# 1}, Caiqing Yao ¹, Jie Yu ¹, Heping Zhang ²

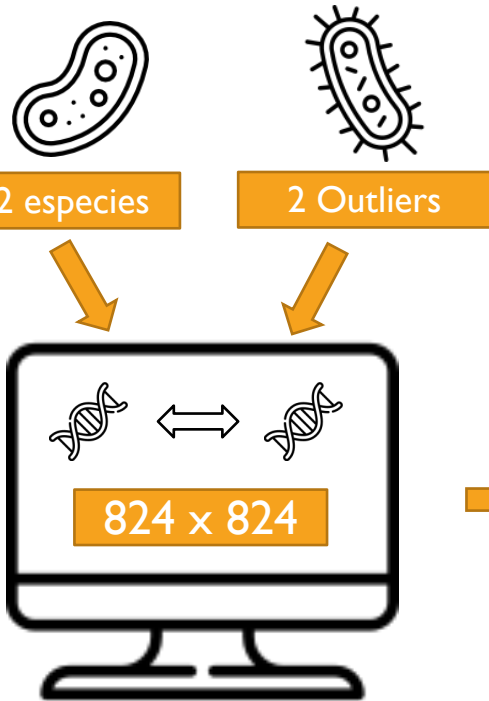
B. kashiwanohense y *B. catenulatum* tenían un valor de ANI interespecie > 95%

B. adolescentis y *B. stercoris* tenían un valor de ANI interespecie > 95%.

Reclassification of *Bifidobacterium stercoris* Kim et al. 2010 as a later heterotypic synonym of *Bifidobacterium adolescentis*

J Killer ^{1 2}, I Sedláček ³, V Rada ¹, J Havlík ¹, J Kopečný ²

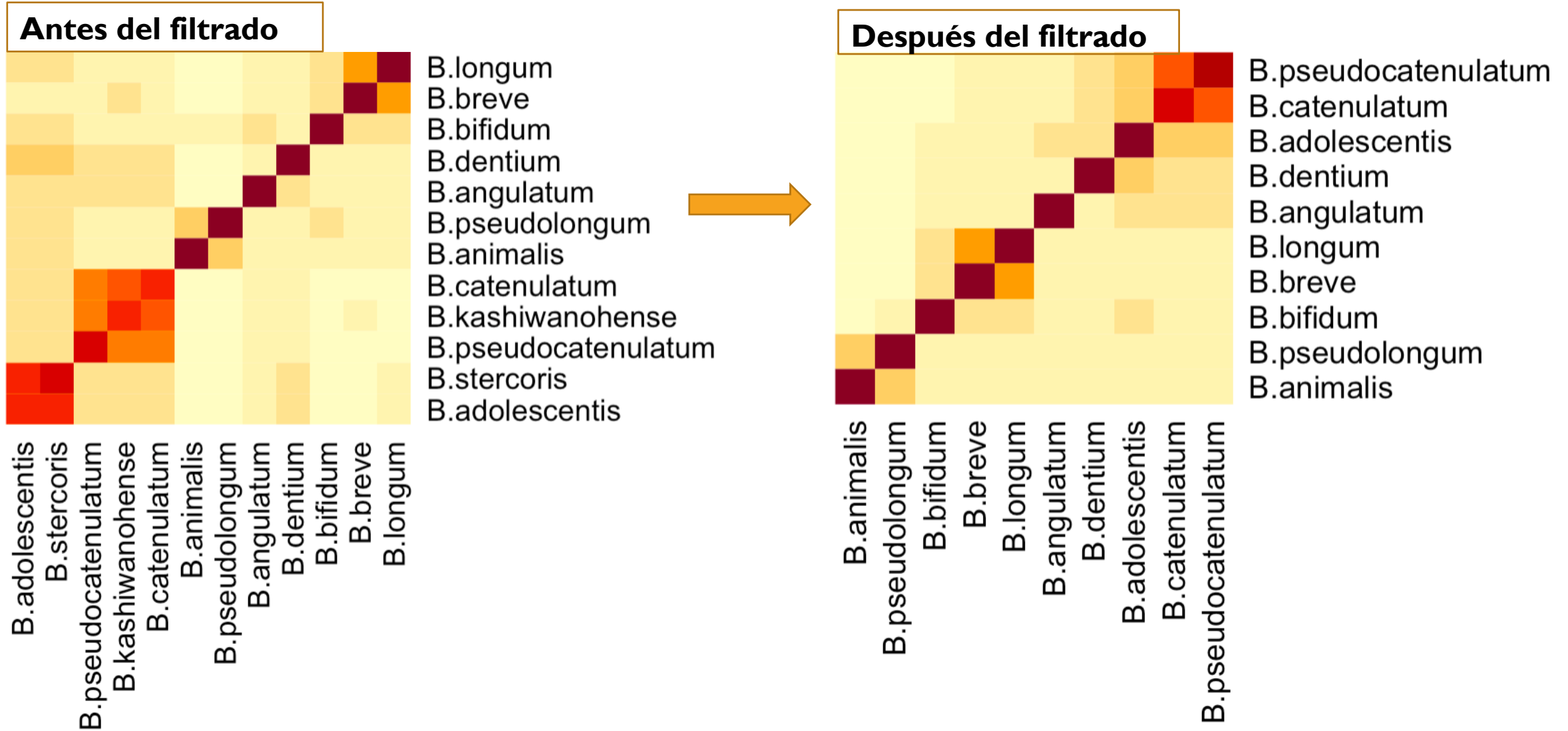
Resultados y discusión



-Se reunificaron las especies (*B. adolescentis* y *B. stercoris*) y (*B. kashiwanohense* y *B. catenulatum*)

-Se eliminaron los genomas con un valor intraespecie < 94%.

Resultados y discusión



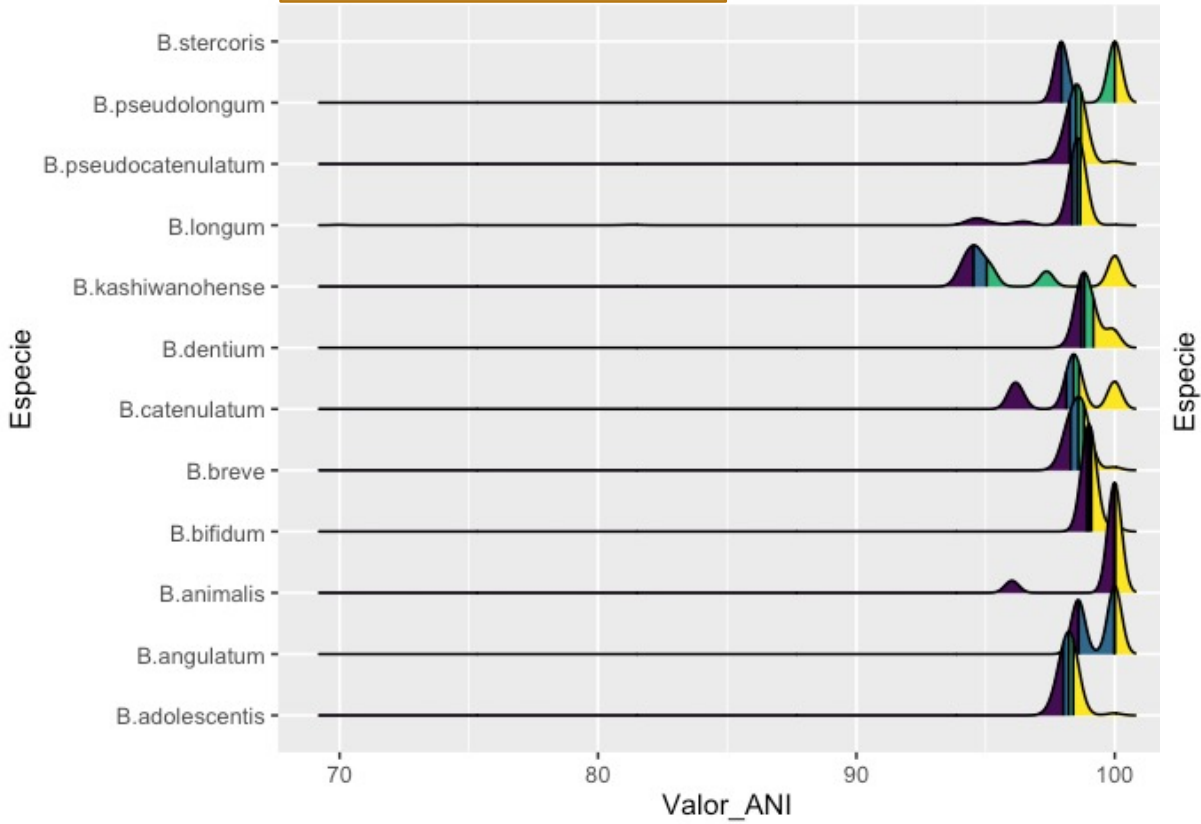
Resultados y discusión

Relaciones Interespecie

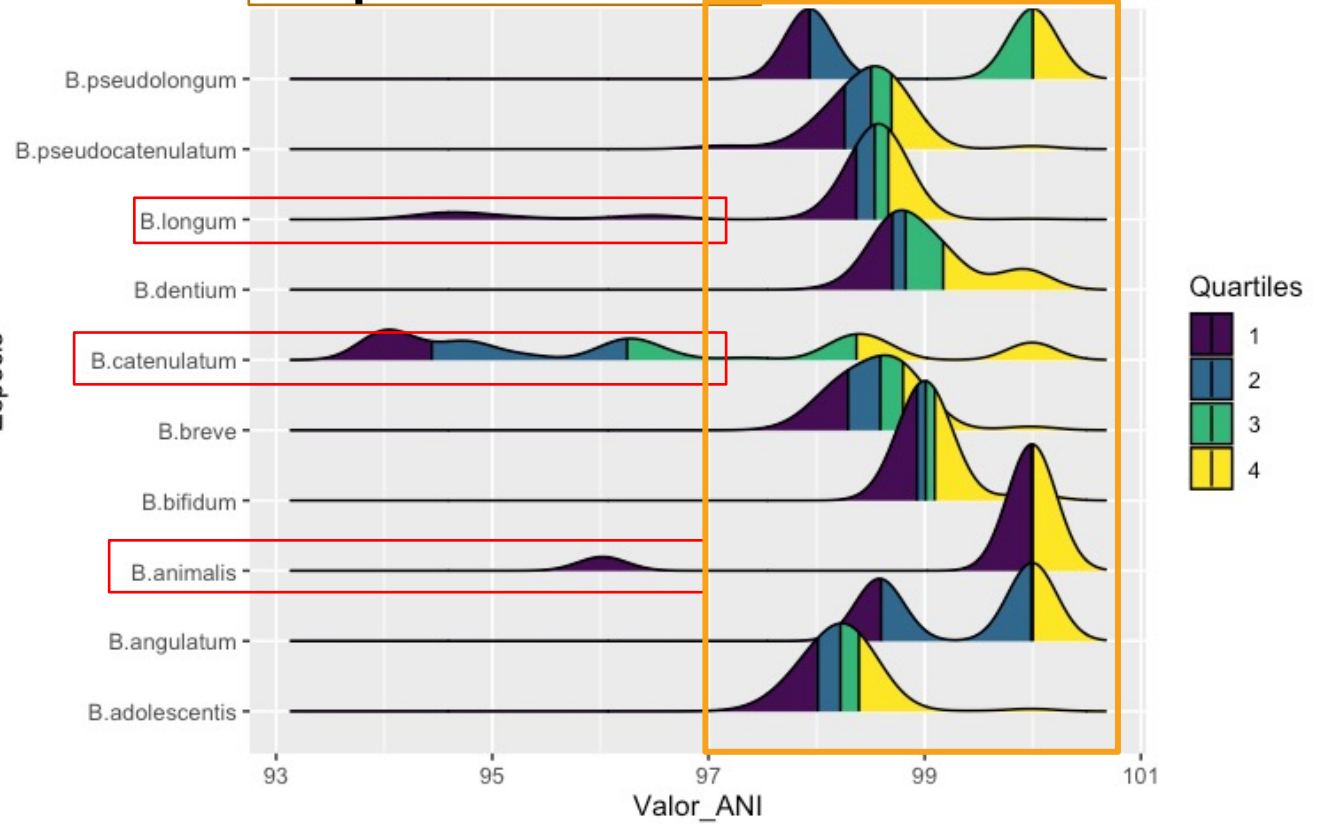
	<i>B.breve</i>	<i>B.catenulatum</i>	<i>B.animalis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.adolescentis</i>
Tamaño_N	70000,00	8679,00	28956,00	71791,00	61404,00
Media_ANI_inter	83	81	78	80	81
Desviación	3,57	3,83	0,34	0,94	1,50
CI 95%	83,14-83,20	80,85-81,01	77,60-77,61	80,13-80,14	80,51-80,53
Mínimo	76,80	77,12	76,74	77,45	77,35
Mediana	85,98	79,37	77,58	80,50	80,17
Cuartil Q1	79,75	79,08	77,47	79,78	79,81
Cuartil Q3	86,53	80,24	77,68	80,74	80,43
	<i>B.longum</i>	<i>B.pseudocatenulatum</i>	<i>B.pseudolongum</i>	<i>B.angularatum</i>	<i>B.dentium</i>
Tamaño_N	158704,00	51100,00	1596,00	2391,00	17871,00
Media_ANI_inter	81	80	78	80	80
Desviación	2,98	2,25	0,75	0,90	1,53
CI 95%	81,43-81,46	80,17-80,21	78,08-78,15	79,92-79,99	79,54-79,59
Mínimo	76,99	77,19	77,00	77,60	77,2
Mediana	80,51	79,55	77,95	79,82	78,97
Cuartil Q1	79,60	79,28	77,76	79,52	78,76
Cuartil Q3	81,20	79,85	78,31	80,09	79,18

Resultados y discusión

Antes del filtrado



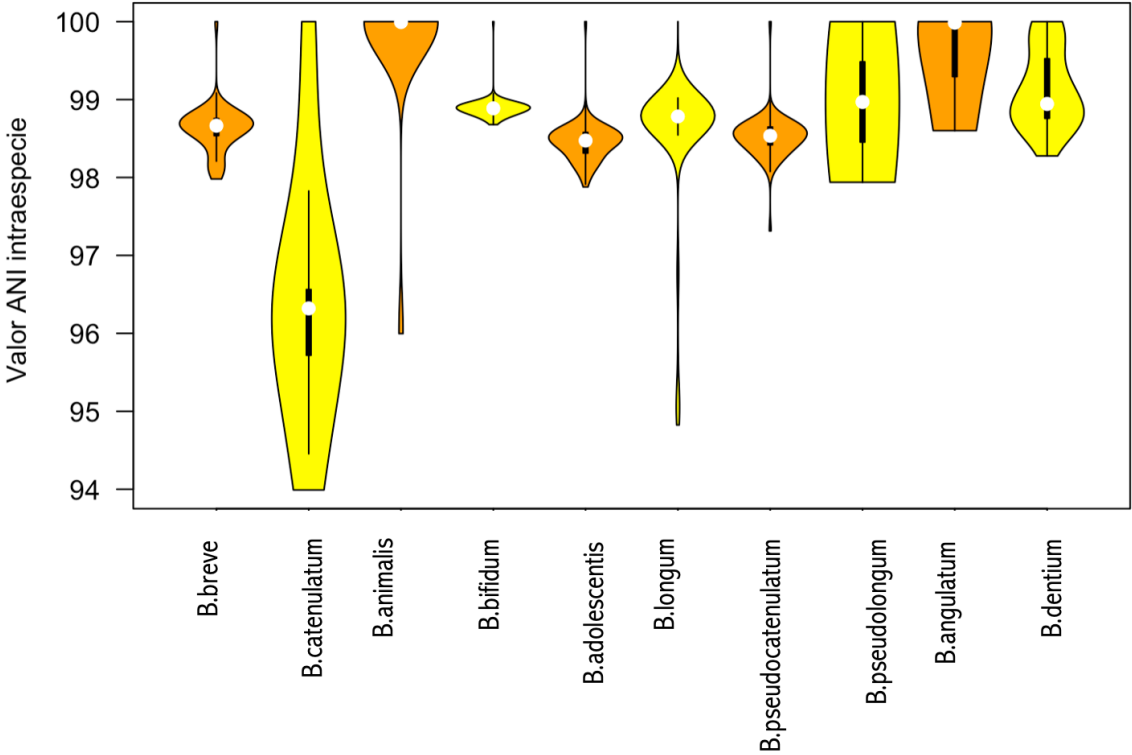
Después del filtrado



Resultados y discusión

Relaciones Intraespecie

	<i>B.breve</i>	<i>B.catenulatum</i>	<i>B.animalis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.adolescentis</i>
Tamaño_N	10000,00	121,00	1444,00	10609,00	7396,00
Media_ANI_intra	98,57	96,44	99,60	99,05	98,22
Desviación	0,39	2,10	1,19	0,24	0,36
CI 95%	98,56-98,57	96,06-96,81	99,53-99,65	99,04-99,05	98,21-98,22
Mínimo	97,5	94,0	95,9	98,6	97,1
Mediana	98,59	96,25	99,99	99,01	98,22
Cuartil Q1	98,29	94,44	99,99	98,93	98,01
Cuartil Q3	98,80	98,37	100,00	99,09	98,39
	<i>B.longum</i>	<i>B.pseudocatenulatum</i>	<i>B.pseudolongum</i>	<i>B.angulatum</i>	<i>B.dentium</i>
Tamaño_N	132496,00	4900,00	4,00	9,00	529,00
Media_ANI_intra	98,12	98,47	98,97	99,37	99,01
Desviación	1,19	0,42	1,19	0,74	0,45
CI 95%	98,11-98,12	98,45-98,48	97,79-100,13	98,88-99,85	98,97-99,05
Mínimo	94,1	96,7	97,9	98,6	98,1
Mediana	98,54	98,50	98,97	99,99	98,82
Cuartil Q1	98,37	98,26	97,94	98,60	98,70
Cuartil Q3	98,66	98,69	100,00	100,00	99,17



CONCLUSIÓN

1. Debería de ser necesario **realizar siempre un filtrado** inicial **antes** de realizar cualquier **estudio genómico**.
2. El uso de la **herramienta bioinformática FastANI** ha resultado ser un excelente método de análisis para las **relaciones intraespecies**, siendo el valor **ANI obtenido en este estudio mayor a 94%** para la clasificación de genomas dentro de una misma especie, y **de 97-98% para las especies con menor diversidad** entre sus genomas.
3. La **reasignación de especies** será una **fase necesaria para cualquier análisis genómico** que use genomas descargados de repositorios públicos.
4. El **establecimiento de la distribución de valores ANI interespecie** en el grupo de datos analizado, ha mostrado que **el intervalo de (80-94%) podría ser útil** para distinguir la variación género específica.

Agradecimientos

