

УДК 636.082.11

DOI: 10.33284/2658-3135-103-4-174

### **Основные представители микробиома рубца (обзор)**

*М.С. Мирошникова<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Оренбургский государственный университет (г. Оренбург)*

<sup>2</sup>*Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (г. Оренбург)*

**Аннотация.** В связи с такими проблемами, как рост численности населения, нехватка ресурсов и вопросы изменения климата возможность разработки и внедрения в животноводческую практику технологий, имитирующих работу рубца жвачных животных, которые будут способствовать увеличению производства продовольствия, на сегодняшний день вызывает особый интерес. Именно по этой причине важным является всестороннее изучение видового состава и механизма комменсальных взаимодействий микроорганизмов микробиома рубца жвачных животных в зависимости от различных факторов. Секвенирование генома этих организмов и сборка черновых геномов из метагеномных данных приблизит нас к завершению всеобъемлющей эталонной коллекции генома для возможности искусственного воспроизведения сообщества микроорганизмов. Данный обзор направлен на анализ результатов новейших метагеномных, метатаксономических и метатранскриптомных исследований, основанных на секвенировании следующего поколения (NGS), затрагивающих различные аспекты микробиома рубца, такие как влияние кормовой добавки или рациона на микробиом рубца, зависимость состава микробиома рубца от генетики хозяина, ранние признаки колонизации молодого рубца, разнообразие ферментов и т. д. Фундаментальные вопросы относительно состава микробиома рубца, способности его сообществ собираться в течение жизни животного и предсказуемости процессов сборки всё ещё не решены. Дальнейшие исследования, способствующие глубокому пониманию структуры и функционирования микробиома рубца, позволят нам потенциально предсказать и определить, как и когда мы можем вмешиваться в процесс сборки микробиома для модуляции этой экосистемы.

**Ключевые слова:** жвачные животные, крупный рогатый скот, состав микробиома рубца, биореактор, секвенирование, генетика.

UDC 636.082.11

### **The main representatives of the rumen microbiome (review)**

*Maria S Miroshnikova<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Orenburg State University (Orenburg, Russia)*

<sup>2</sup>*Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)*

**Summary.** In connection with such problems as population growth, scarcity of resources and climate change problems, possible development and implementation of livestock technologies that simulate the work of the rumen of ruminants and increase food production, is of particular interest today. For this reason, it is important to have a comprehensive study of species composition and mechanism of commensal interactions of microorganisms in the rumen microbiome of ruminants, depending on various factors. Genome sequencing of these organisms and assembling draft genomes from metagenomic data will bring us closer to completing a comprehensive genome reference collection for the possibility of artificial reproduction of the microbial community. This review is aimed at analyzing the results of the latest metagenomic, metataxonomic and metatranscriptome studies based on next generation sequencing (NGS), affecting various aspects of the rumen microbiome, such as the effect of feed additive or diet on the rumen microbiome, the dependence of the composition of rumen microbiome on host genetics, early signs of

young rumen colonization, a variety of enzymes, etc. Fundamental questions regarding the composition of the rumen microbiome, the ability of its communities to assemble during the life of an animal and the predictability of assembly processes are still not resolved. Further research that furthers a deeper understanding of the structure and function of the rumen microbiome will enable us to potentially predict and determine how and when we can interfere with the microbiome assembly process to modulate this ecosystem.

**Key words:** ruminants, cattle, rumen microbiome composition, bioreactor, sequencing, genetics.

### **Введение.**

По различным оценкам население нашей планеты к 2050 году достигнет 9,7 миллиардов человек, что сопряжено с увеличением потребления продовольствия на величину до 70 % (Sharon A et al., 2018). Очевидно, что в современных условиях, при существующем состоянии сельскохозяйственного производства, исчерпанию природных ресурсов и глобальном потеплении климата столь значительное наращивание производства продовольствия невозможно без кардинальных изменений в организации производства пищи.

Анализ возможных подходов к решению этой проблемы позволяет прийти к пониманию того, что перспективные технологии производства продуктов питания и будущее сельскохозяйственное производство – это не что иное, как интерпретация уже существующих природных технологий. В связи с этим ожидаемо, что перспективные решения по наращиванию производства продовольствия в ближайшие годы станут возможными через создание промышленных технологий, построенных на принципах работы пищеварительного аппарата жвачных. Это умозаключение базируется на историческом опыте выживания человека как вида, что стало возможным через опору на жвачных, способных перерабатывать биологические субстраты, не доступные для ферментативных систем человека. При этом не сам макроорганизм жвачных трансформирует растительные субстраты, а миллиарды микроорганизмов, многократно превышающие организм хозяина по ферментативной вооружённости (Bickhart DM and Weimer PJ, 2018).

Основные процессы пищеварения у жвачных осуществляются в преджелудках, в целом представляющих собой узкоспециализированный биореактор, где микробы колонизируют и трансформируют растительный материал (Krause DO et al., 2003). Внутренняя часть одного из основных отделов преджелудков – рубца выстлана многослойным плоским эпителием (Baldwin RL et al., 2004). Преджелудки способны длительное время удерживать твёрдые частицы корма, обеспечивая условия для микробной ферментации потребляемых кормов (Yeoman CJ and White BA, 2014; Brulc JM et al., 2009). При этом процесс регулируется таким образом, что происходит только частичная ферментация. Это позволяет организму хозяина поглощать и использовать промежуточные продукты ферментации для собственного метаболизма (Attwood GT et al., 2019). Помимо вклада в переваривание корма, микроорганизмы рубца синтезируют большое количество ценных для организма животного биологических соединений, в числе которых витамины группы В (Santschi DE et al., 2005).

Учитывая, что целлюлоза является наиболее распространённым органическим полимером на Земле, способность эффективно ферментировать целлюлолитические материалы позволяет жвачным животным использовать огромные ресурсы и тем самым расширять экологическую нишу человека (Hess M et al., 2011).

Ферментативная активность, способствующая пищеварению крупного рогатого скота, обеспечивается разнообразной группой комменсальных микроорганизмов, населяющих рубец, под общим названием микробиомом рубца, который характеризуется высокой плотностью населения, обширным разнообразием и сложностью взаимодействий (Brulc JM et al., 2009).

В рубце обнаружены три пересекающиеся микросреды, в которых содержатся микроорганизмы: жидкая фаза составляет 25 % микробной массы, твёрдая фаза составляет 70 % микробной массы и эпителиальные клетки в совокупности с простейшими, содержащие 5 % микробной массы (Ishler V et al., 1996).

Микробиота твёрдой фазы, прикрепленная к растительному материалу, играет ключевую роль в переваривании клетчатки (McAllister TA et al., 1994) в то время как жидкая фаза содержит бактерии, которые активно участвуют в метаболизме растворимых питательных веществ (De Mulder T et al., 2017). Микробиота эпителиальной фракции выполняет разные функции, в том числе поглощение кислорода (Cheng KJ et al., 1979), гидролиз мочевины (Cheng KJ and Wallace RJ, 1979) и переработку эпителиальной ткани (Dinsdale D et al., 1980).

Состав микробиома рубца определяется генотипом хозяина, его возрастом, диетой, сезоном и целым рядом других факторов. Микробиота рубца состоит из базового набора микроорганизмов и варибельной микробиоты (Creevey CJ et al., 2014; Henderson G et al., 2015). Основная микробиота встречается в широком географическом диапазоне и состоит из различных таксонов, которые увеличивают или уменьшают свою численность в зависимости от рациона питания (Henderson G et al., 2015), что в конечном итоге обеспечивает быструю и адекватную адаптацию к новым условиям питания (Dieho K et al., 2017; Schären M et al., 2017). Считается, что переменная или индивидуальная микробиота является результатом взаимодействия генетических и негенетических атрибутов (Malmuthuge N et al., 2017).

#### **Микробиом рубца.**

Микробиом рубца – это сложное сообщество микроорганизмов, примерно на 95 % представленное бактериями, на 2-5 % – археями и на 0,1-1,0 % – эукариотами, которые активно разлагают или используют различные компоненты корма (Kim M et al., 2011; Mizrahi I, 2013). В настоящее время учёными активно изучается механизм функционирования микробиома рубца. Благодаря идентификации микроорганизмов, которые участвуют на определённых этапах пути анаэробной деградации, наукой накоплен значительный багаж знаний по данной проблеме. Так, в рамках глобального проекта Hungate1000 выявлено и описано около 75 % таксонов на уровне рода бактерии и архей из основного микробиома (Henderson G et al., 2015; Stewart RD et al., 2018). Организмы, способные к разложению волокон, были описаны в каждой из этих групп. Было показано, что основные бактерии, разлагающие волокна, появляются в рубце уже через несколько дней после рождения, при этом экосистема рубца функционально готова к разрушению растительных волокон в этом раннем возрасте (Jami E et al., 2013; Guzman CE et al., 2015).

Крупномасштабные исследования, проведённые на разных жвачных животных, в разных странах выявили наличие некоего базового микробиома, содержащего микроорганизмы основных деструкторов целлюлозы и гемицеллюлозы (Henderson G et al., 2015).

#### **Бактериальные деструкторы.**

Бактерии, населяющие рубец представлены тысячами различных видов, на их долю приходится примерно 60 % всей микробной массы рубцового содержимого. Причём бактерии расщепляют большую часть биополимеров в рубце с последующей ферментацией образующихся мономеров и олигомеров. Большинство бактерий в рубце являются облигатными анаэробами, чувствительными к кислороду (Kamra DN and Pathak NN, 2005).

Состав бактериальных популяций в рубце определяется различными факторами, в том числе составом рациона, возрастом «хозяина», временем года и др. (Krizova L et al., 2011). Бактерии могут быть классифицированы в соответствии с их функциональным потенциалом, что позволяет выделить фибролитические, амилотические, протеолитические и сахаролитические виды. Крахмал- и сахарразлагающие бактерии в норме составляют большую часть популяции рубца. Несмотря на их несомненное значение, бактерии, специализирующиеся на деградации волокон, обычно менее распространены в рубце (Puniya AK et al., 2015). Хотя наукой накоплена информация о нескольких видах бактерий, которые способны разрушать кристаллическую целлюлозу в изолированных культурах. Но всё же разложение органического вещества, поглощённого животным-хозяином, невозможно только одним организмом, это требует функциональных возможностей и взаимодействия многих микроорганизмов, тесно увязанных синергическими взаимодействиями в рубце (Mackie RI et al., 2002).

Основные бактериальные деструкторы целлюлозы относятся к трём различным видам: *Ruminococcus flavefaciens* (Sasson G et al., 2017). *Ruminococcus albus* и *Fibrobacter succinogenes* (Mizrahi I, 2013). Они обладают множественными гликозид гидролазами (Glycoside hydrolase, GH), необходимыми для разрушения сложной химической структуры растительной биомассы. Интересно, что в то время как *R. flavefaciens* собирает невероятно сложный ферментативный механизм на стенке своей бактериальной клетки для разложения целлюлозы (Artzi L et al., 2017; Israeli-Ruimy V et al., 2017), *R. albus* и *F. succinogenes* используют альтернативные ферментативные парадигмы (Dassa B et al., 2014; Arntzen MØ et al., 2017).

Следует отметить, что бактериальные деструкторы целлюлозы в рубце не ограничиваются только этими тремя ферментативными стратегиями, и некоторые бактерии могут использовать отдельные локусы утилизации полисахаридов для разложения целлюлозы, как это было показано для различных видов типа *Bacteroidetes* (Naas AE et al., 2014). Было показано, что эти наборы генов в основном относятся к роду *Prevotella* в рубце крупного рогатого скота (Rosewarne CP et al., 2014).

Разложение гемицеллюлозы осуществляется более разнообразным набором бактерий, что может отражать большое количество и сложность типов гемицеллюлозы в клеточной стенке. Два самых распространённых рода бактерий в рубце *Prevotella* и *Butyrivibrio* (*Pseudobutyrvibrio*), являются высокоэффективными деструкторами гемицеллюлозы. Отдельные животные-хозяева, как правило, содержат несколько видов и штаммов (от десятков до сотен) этих двух родов (Pitta DW et al., 2010; Jami E et al., 2013), что определяет чрезвычайно широкий набор ферментов (Avgustin G et al., 1992). При этом широкий перечень гидролаз гемицеллюлозы ещё не значит высокую эффективность расщепления этого субстрата. Например, недавно было показано, что штаммы *Prevotella*, которые считаются менее гемицеллюлолитическими, чем *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* или *Fibrobacter*, доминируют в консорциумах обогащённого гемицеллюлозой рубца (Emerson EL and Weimer PJ, 2017).

Были секвенированы геномы многих видов *Prevotella*, *Butyrivibrio* и других родов микроорганизмов, в результате чего выявлено, что их геномы содержат несколько GH из разных семейств (Seshadri R et al., 2018), и они производят свободные ферментные субъединицы (без образования целлюлосом). Поскольку деструкторы гемицеллюлозы связаны как с планктонными фракциями, так и с фракциями микробов, сорбированных на волокнах в рубце (Klevenhusen F et al., 2017), очевидно, что производство свободных ферментов является наиболее подходящей стратегией для деградации субстрата, независимо от расположения бактерий.

Эти виды имеют различную ферментативную вооружённость, изменяющуюся в зависимости от ситуации. Так, например, некоторые деструкторы целлюлозы, такие как *R. flavefaciens* и *F. succinogenes*, продуцируют гемицеллюлазы, даже если они не обязательно обладают способностью перерабатывать пентозы, которые содержат мономерные звенья полимеров гемицеллюлозы (таких как ксилоза) (Matte A et al., 1992). В этом случае предполагается, что, поскольку целлюлоза может быть физически встроена в гемицеллюлозы, эти ферменты будут служить только для того, чтобы дать целлюлазам доступ к целлюлозным волокнам.

В рубце обитает большое количество бактериальных деструкторов крахмала – *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinimonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium* и *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hobson PN and Stewart CS, 1997), продуцирующие свободные ферментные субъединицы (Seshadri R et al., 2018). Резистентный крахмал специфически разлагается *Ruminococcus bromii*, который производит амилосомные комплексы, аналогичные целлюлосомам (Ze X et al., 2015, Mukhopadhyaya I et al., 2018). Простейшие и грибы также проявляют амилотическую активность, но не являются необходимыми для разложения крахмала (Hobson PN and Stewart CS, 1997).

#### **Грибковые деструкторы.**

Грибы рубца (от  $10^3$  до  $10^6$  зооспор/мл) класса *Neocallimastigomycetes*, состоящего из 6 родов (*Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* и *Piromyces*), включают по крайней мере 21 вид. В последние годы дополнены двумя новыми родами (Krause DO et al., 2013) –

*Oontomyces* (Dagar SS et al., 2015) и *Buwchfawromyces* (Callaghan TM et al., 2015). Грибы составляют только ~ 1 % микробной массы в рубце жвачных животных (Kong Y et al., 2010).

Грибы рубца не являются обязательными обитателями рубца и у некоторых животных не обнаруживаются. Тем не менее они обладают очень высоким потенциалом разложения волокон, поскольку кодируют множество ферментов, разрушающих растительные волокна. Действительно, сообщалось, что клеточная стенка растений становится «слабее» после инкубации с грибами по сравнению с инкубацией с прокариотами рубца (бактериями и археями). Это объясняется способностью грибов проникать через клеточную стенку растений с растворением лигнинового комплекса, при этом образующиеся фенольные соединения не метаболизируются этими организмами (Akin DE and Borneman WS, 1990). Грибы таким образом инициируют расщепление корма с последующим образованием метаболитов, доступных для организма животного (Kittelman S et al., 2012). Тем не менее следует отметить, что в анаэробных условиях солюбилизация лигнина весьма ограничена (Susmel P and Stefanon B, 1993).

Поскольку лигнин ковалентно связан с гемицеллюлозой через ферулированные мостики, первый препятствует микробной деградации полисахаридов волокон, действуя как физический барьер. Поэтому считается, что грибы рубца играют важную роль в начальном разложении крупных частиц, тем самым увеличивая доступ бактерий рубца к полисахаридам клеточной стенки растений (Akin DE et al., 1989). Анаэробные грибы также производят широкий спектр ферментов, разлагающих полисахариды (Dehority BA, 2003), и некоторые исследования показывают, что их вклад в ферментацию больше, чем у бактерий (Lee SS et al., 2000). Грибы рубца активны как в отношении целлюлозы, так и гемицеллюлозы. Для рубца описано шесть родов: *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* и *Cyllamyces*, причём наибольшая эффективность наблюдается у *Neocallimastix* и *Piromyces* (Puniya AK et al., 2015). Анализ генома некоторых видов анаэробных грибов показал, что перечень гидролаз, синтезируемых грибами, чрезвычайно богат гемицеллюлазами и целлюлазами (Youssef NH et al., 2013; Kameshwar AKS and Qin W, 2018). Было высказано предположение, что ГН были приобретены анаэробными грибами посредством горизонтального переноса генов от бактерий.

Грибковые «целлюлосомы» были описаны для видов *Neocallimastix*, *Piromyces* и *Orpinomyces*. В отличие от последнего рода, система грибковых скаффолдинов широко консервативна во всем анаэробном грибном типе, обеспечивая межвидовые взаимодействия, которые могут происходить в среде рубца (Fanutti C et al., 1995).

#### **Простейшие в рубце.**

Простейшие в рубце – это строго анаэробные и узкоспециализированные инфузории, расщепляющие до 40 % общего объёма сырой клетчатки (Dehority BA, 2003). Инфузории рубца при относительно небольшом количестве – от  $10^4$  до  $10^6$  в виду значительного размера клеток способны в совокупности достигать до 50 % общей микробной биомассы (Jouany JP and Ushida K, 1999; McSweeney CS and Mackie R, 2012).

Реснитчатые простейшие в рубце усиливают метаногенез (Newbold CJ et al., 2015) и способствуют протеолизу и, в частности, внутрирубцовому рециклингу микробного белка (Hartinger T et al., 2018). Некоторые инфузории вносят значительный вклад в деградацию клетчатки (Newbold CJ et al., 2015). Однако процедуры дефаунации продемонстрировали, что экосистема рубца функционирует без простейших, что позволяет предположить, что они не важны для экосистемы. Следовательно, как и грибы, простейшие не являются обязательными обитателями рубца. Тем не менее подавление простейших сопровождается нарушением экосистемы рубца с подавлением метаногенеза и нарушением внутрирубцовой рециркуляции азота (Hristov AN et al., 2013). В обширном исследовании на модели 742 образцов, охватывающих 32 вида животных из 35 стран, показано, что простейшие в рубце относятся к 12 видам. Наиболее доминирующими и преобладающими родами являются *Entodinium* и *Epidinium*, последние выявлены у 90 % всех обследованных животных и 54 % секвенированных данных (Henderson G et al., 2015).

Простейшие в рубце подразделяются на 2 группы, а именно энтодиноморфы и голотрихи. Эти простейшие отличаются своими фенотипическими и поведенческими адаптациями, которые позволяют выжить в анаэробной среде (García JJ et al., 2018). Доминирование того или иного вида определяется составом рациона. Так, на фоне преобладания в рационе зерновых наибольшее развитие получает род простейших *Entodinium*. Этот род быстро разлагает крахмал с образованием йодофильного полимера (McSweeney CS and Mackie R, 2012). Некоторые из родов являются целлюлолитическими (например, *Epidinium*, *Ophryoscolex* и *Eudiplodinium*), ксиланолитическими (например, *Epidinium*, *Ophryoscolex* и *Eudiplodinium*) или амилолитическими (например, *Entodinium*). Метаболизм, физиология, экология, равно как и величина их вклада в экосистему рубца являются недостаточно изученными (Williams A and Coleman G, 1992).

Некоторые простейшие могут потреблять частицы субстрата вместе с другими микроорганизмами и обладают явной целлюлолитической активностью, которая может происходить от проглоченных фибролитических микроорганизмов или их собственных ферментов, разрушающих волокна. Целлюлозолитическая активность простейших в рубце была измерена для нескольких видов, и наиболее эффективными разрушителями целлюлозы являются *Eudiplodinium maggii*, *Epidinium ecaudatum* и *Ostracodinium dilobum* (Dehority BA, 2003). Ни один из этих видов ещё не был секвенирован. Тем не менее было показано, что целлюлолитическое простейшее *Polyplastron multivesiculatum* кодирует собственные ксиланазы (Devillard E et al., 1999; Devillard E et al., 2003). Позже был предположен горизонтальный перенос генов GH от бактерий к простейшим (Ricard G et al., 2006). Двенадцать предполагаемых генов ксиланаз были обнаружены в энтодиноморфидах *Polyplastron multivesiculatum*, *Epidinium ecaudatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Diploplastron affine* и *speedei Metadinium*, с высокой гомологией с генами *Clostridium acetobutylicum*. Девять предполагаемых целлюлаз были обнаружены также у энтодиноморфидов *E. ecaudatum* и *P. multivesiculatum* из семейств GH5 и GH9. Метаногенный скрининг в сочетании с биохимической характеристикой позволил извлечь и охарактеризовать гемицеллюлазы из *E. ecaudatum* (Findley SD et al., 2011). Другое исследование, изучавшее метагеном рубца овцебыка, выявило протозойные последовательности из GH5, GH9, GH10, GH11 и GH13, что указывает на активность целлюлазы, гемицеллюлазы и амилазы, кодируемую этими микроорганизмами рубца (Qi M et al., 2011). В отличие от бактериальных и грибковых деструкторов волокна количество генов GH у простейших, по-видимому, невелико, что свидетельствует либо о технической предвзятости, либо о том, что их вклад в деградацию волокон не зависит от их ферментативного потенциала.

Рассматривая амёбы как один из элементов экосистемы рубца, следует отметить, что роль последних пока остается не ясной (Indikova I et al., 2015). Очевидно, что одним из компонентов биологического участия амёб в метаболизме и экологии рубца сводится к эндосимбиозу с бактериями (Lambie SC et al., 2015), в частности с бактериями *Campylobacter jejuni* (Olofsson J et al., 2013).

Между тем, судя по отрывочным свидетельствам, амёбы (*C. jejuni* и *C. fetus*) способны оказывать непосредственное влияние на организм жвачных, иммунитет и воспроизводительные качества животных (Sahin O et al., 2012). Таким образом, присутствие амёб в рубце может иметь важное значение в жизни крупного рогатого скота.

#### **Вирусы рубца.**

В рубце жвачных с числом до  $10^9$  частиц/грамм содержимого получил широкое распространение бактериофаг – облигатный вирус, поражающий бактериальные клетки и клетки архей (Klieve AV et al., 1996). Популяция бактериофага и вируса, обнаруженная в образце, называется виромом (Ross EM et al., 2013). Сложные взаимодействия между бактериальным хозяином и связанными с ними вирусными фагами определяют экологическую динамику и поведение во многих природных системах (Lenski RE, 1988). Вирусные модификации метаболизма микроорганизмов и цианобактерий (Thompson LR et al., 2011; Hurwitz BL et al., 2016) были выявлены в значительном числе природных систем, включая морские экосистемы, инфекционные заболевания человека, водоносные слои и кишечные экосистемы животных (De Smet J et al., 2016; Howe A et al., 2016). Вирусы воздействуют на кишечные и рубцовые микробные экосистемы у крупного рогатого скота

посредством целого ряда механизмов, включая лизис клеток, выработку энергии, размножение и перепрограммирование микробного метаболизма с помощью вспомогательных метаболических генов (Auxiliary metabolic genes, AMG) (Berg Miller ME et al., 2012; Parmar NR et al., 2016). Исследования последних лет показали, что вирусные AMG усиливают расщепление сложных растительных углеводов и повышают выработку и сбор энергии, ускоряя репликацию вируса внутри хозяина (Anderson CL et al., 2017). Однако полное понимание сложного взаимодействия виромикробиома и роли AMG в метаболическом перепрограммировании хозяина всё ещё находится в зачаточном состоянии. Однако очевидно, что вирусы обеспечивают перенос генов, тем самым формируя новые качества у представителей микробиома (Garcia-Vallve S et al., 2000; Berg Miller ME et al., 2012). Для рассматриваемой проблемы этот факт интересен закономерным влиянием вирусов на генотип простейших с переносом от бактерий качеств по расщеплению клетчатки (Berg Miller ME et al., 2012).

#### **Выводы.**

Рубец жвачных как биореактор, способный переваривать структурные углеводы, несомненно, представляет интерес для биотехнологии как пример уникальной живой экосистемы – прототипа будущих природоподобных технологий. При относительно многочисленном микробном населении рубца для жвачных описан базовый, основной состав микробиома, который является общим для различных видов в различных природных условиях. Роль бактериальных и грибных компонентов в рубце в деле расщепления структурных углеводов хорошо изучена. В то же время наука располагает крайне малой информацией о роли простейших и вирусов рубца. Дальнейшим продолжением работ по проблеме является детальное изучение механизмов взаимодействия организма хозяина и микробиома рубца, что принципиально важно для воспроизведения рубца в искусственных условиях.

**Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда проект (№ 20-16-00088)**

#### Литература

1. Akin DE, Borneman WS. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J Dairy Sci.* 1990;73(10):3023-3032. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78989-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78989-8)
2. Akin DE, Lyon CE, Windham WR et al. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(3):611-616. doi: 10.1128/AEM.55.3.611-616.1989
3. Anderson CL, Sullivan MB, Fernando SC. Dietary energy drives the dynamic response of bovine rumen viral communities. *Microbiome.* 2017;5:155. doi: 10.1186/s40168-017-0374-3
4. Arntzen MØ, Várnai A, Mackie RI et al. Outer membrane vesicles from *Fibrobacter succinogenes* S85 contain an array of carbohydrate-active enzymes with versatile polysaccharide-degrading capacity. *Environ Microbiol.* 2017;19(7):2701-2714. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13770>
5. Artzi L, Bayer EA, Morais S. Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15:83-95. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.164>
6. Attwood GT, Wakelin SA, Leahy SC et al. Applications of the soil, plant and rumen microbiomes in pastoral agriculture. *Front Nutr.* 2019;6:107. doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00107>
7. Avgustin G, Flint HJ, Whitehead TR. Distribution of xylanase genes and enzymes among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;99(2-3):137-143. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05556.x>
8. Baldwin RL, McLeod KR, Klotz JL et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J Dairy Sci.* 2004;87(S):E55-E65. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70061-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70061-2)

9. Berg Miller ME, Yeoman CJ, Chia N et al. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environ. Microbiol.* 2012;14(1):207–227. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02593.x>
10. Bickhart DM, Weimer PJ. Symposium review: Host–rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 2018;101(8):7680-7689. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13328>
11. Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(6):1948-1953. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0806191105>
12. Callaghan TM, Podmirseg SM, Hohlweck D et al. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys.* 2015;9(34):11-28. doi: [10.3897/mycokeys.9.9032](https://doi.org/10.3897/mycokeys.9.9032)
13. Cheng KJ, Mccowan RP, Costerton JW. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1979;32(1):139-148. doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.1.139>
14. Cheng KJ, Wallace RJ. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British Journal of Nutrition.* 1979;42(3):553-557. doi: <https://doi.org/10.1079/BJN19790147>
15. Creevey CJ, Kelly WJ, Henderson G et al. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microb. Biotechnol.* 2014;7(5):467-479. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12141>
16. Dagar SS, Kumar S, Griffith GW et al. A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal Biol.* 2015;119(8):731-737. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.005>
17. Dassa B, Borovok I, Ruimy-Israeli V et al. Rumen cellulosomes: divergent fiber-degrading strategies revealed by comparative genome-wide analysis of six ruminococcal strains. *PLoS One.* 2014;9(7):e99221. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099221>
18. De Mulder T, Goossens K, Peiren N et al. Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: Solid adherent, fluid and epimural. *FEMS Microbiology Ecology.* 2017;93(3):fiw251 doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw251>
19. De Smet J, Zimmermann M, Kogadeeva M et al. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *ISME J.* 2016;10:1823-1835. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.3>
20. Dehority BA. *Rumen Microbiology.* Nottingham: University Press; 2003:382 p.
21. Devillard E, Bera-Maillet C, Flint HJ et al. Characterization of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. *Biochem J.* 2003;373(2):495-503. doi: <https://doi.org/10.1042/bj20021784>
22. Devillard E, Newbold CJ, Scott KP et al. A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* shows close sequence similarity to family 11 xylanases from gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;181(1):145-152. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08837.x>
23. Dieho K, van den Bogert B, Henderson G et al. Changes in rumen microbiota composition and in situ degradation kinetics during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *J Dairy Sci.* 2017;100(4):2695-2710. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11982>
24. Dinsdale D, Cheng KJ, Wallace RJ et al. Digestion of epithelial tissue of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. *Applied and Environmental Microbiology.* 1980;39(5):1059-1066. doi: [10.1128/AEM.39.5.1059-1066.1980](https://doi.org/10.1128/AEM.39.5.1059-1066.1980)
25. Emerson EL, Weimer PJ. Fermentation of model hemicelluloses by *Prevotella* strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(10):4269-4278. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8150-7>



26. Fanutti C, Ponyi T, Black GW et al. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J Biol Chem.* 1995;270(49):29314-29322. doi: 10.1074/jbc.270.49.29314
27. Findley SD, Mormile MR, Sommer-Hurley A et al. Activity-based metagenomic screening and biochemical characterization of bovine ruminal protozoan glycoside hydrolases. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(22):8106-8113. doi: 10.1128/AEM.05925-11
28. García JJ, Bartolomé DJ, Posado R et al. Weather conditions and rumen temperature and pH in lidia cattle. *J Vet Sci Technol.* 2018;9(3):532. doi: 10.4172/2157-7579.1000532
29. Garcia-Vallve S, Romeu A, Palau J. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Mol Biol Evol.* 2000;17(3):352-361. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026315>
30. Guzman CE, Bereza-Malcolm LT, De Groef B. Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133048. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133048>
31. Hartinger T, Gresner N, Südekum KH. Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. *J Anim Sci Biotechnol.* 2018;9:33. doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0249-x>
32. Henderson G, Cox F, Ganesh S et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep.* 2015;5:14567. doi: <https://doi.org/10.1038/srep14567>
33. Hess M, Sczyrba A, Egan R et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science.* 2011;331(6016):463-467. doi: 10.1126/science.1200387
34. Hobson PN, Stewart CS, editors. *The Rumen Microbial Ecosystem.* Netherlands: Springer Science & Business Media; 1997:719 p. doi: 10.1007/978-94-009-1453-7
35. Howe A, Ringus DL, Williams RJ et al. Divergent responses of viral and bacterial communities in the gut microbiome to dietary disturbances in mice. *ISME J.* 2016;10:1217-1227. doi:10.1038/ismej.2015.183
36. Hristov AN, Oh J, Firkins JL et al. Special topics-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci.* 2013;91(11):5045-5069. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
37. Hurwitz BL, U'Ren JM. Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 2016;31:161-168. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.002
38. Indikova I, Humphrey TJ, Hilbert F. Survival with a helping hand: campylobacter and microbiota. *Front Microbiol.* 2015;6:1266. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01266>
39. Ishler V, Heinrichs AJ, Varga G. From feed to milk: Understanding rumen function. Pennsylvania State University Extension Circular 422. University Park, Pa.: Pennsylvania State University; 1996:27 p.
40. Israeli-Ruimy V, Bule P, Jindou S et al. Complexity of the *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 cellulosome reflects an expansion of family-related protein-protein interactions. *Sci Rep.* 2017;7:42355. doi: <https://doi.org/10.1038/srep42355>
41. Jami E, Israel A, Kotser A et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 2013;7(6):1069-1079. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.2>
42. Jouany JP, Ushida K. The role of protozoa in feed digestion: review. *Asian Australas J Anim Sci.* 1999;12(1):113-128. doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.1999.113>
43. Kameshwar AKS, Qin W. Genome wide analysis reveals the extrinsic cellulolytic and bi-hydrogen generating abilities of neocallimastigomycota fungi. *J Genomics.* 2018;6:74-87. doi: 10.7150/jgen.25648
44. Kamra DN, Pathak NN. Improvement in livestock productivity by use of probiotics: a review. *Indian J Anim Sci.* 2005;75(1):128-134.
45. Kim M, Morrison M, Yu Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011;76(1):49-63. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x>

46. Kittelmann S, Naylor GE, Koolaard JP et al. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS One*. 2012;7(5):e36866. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036866>
47. Klevenhusen F, Petri RM, Kleefisch MT et al. Changes in fibre-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017;93(9):fix100. doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix100>
48. Klieve AV, Swain RA, Nolan JV. Bacteriophages in the Rumen; types present, population size and implications for the efficiency of feed utilisation. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 1996;21:92-94.
49. Kong Y, Teather R, Forster R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;74(3):612-622. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00977.x>
50. Krause DO, Denman SE, Mackie RI et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(5):663-693. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
51. Krause DO, Nagaraja TG, Wright ADG et al. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J Anim Sci*. 2013;91(1):331-341. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5567>
52. Krizova L, Richter M, Trinacty J et al. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. *Czech J Anim Sci*. 2011;56(1):37-45.
53. Lambie SC et al. The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanosarcina barkeri* CM1. *Stand Genomic Sci*. 2015;10(1):57. doi: <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0038-5>
54. Lee SS, Ha JK, Cheng K. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(9):3807-3813. doi: 10.1128/AEM.66.9.3807-3813.2000
55. Lenski RE. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. In: Marshall KC, editor. *Advances in Microbial Ecology*. Boston, MA: Springer; 1988;10: p. 1-44. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5409-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5409-3_1)
56. Mackie RI. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integr Comp Biol*. 2002;42(2):319-326. doi: <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.319>
57. Malmuthuge N, Guan LL. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017;8:8. doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0135-3>
58. Matte A, Forsberg CW, Verrinder Gibbins AM. Enzymes associated with metabolism of xylose and other pentoses by *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* strains, *Selenomonas ruminantium* D, and *Fibrobacter succinogenes* S85. *Can J Microbiol*. 1992;38(5):370-376. doi: <https://doi.org/10.1139/m92-063>
59. McAllister TA, Bae HD, Jones GA et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. 1994;72(11):3004-3018. doi: <https://doi.org/10.2527/1994.72113004x>
60. McSweeney C, Mackie R. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. Background study paper No. 61. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, Italy; 2012:62 p.
61. Mizrahi I. Rumen symbioses. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S et al., editors. *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 p. 533-544. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_1)
62. Mukhopadhyaya I, Moraes S, Laverde-Gomez J et al. Sporulation capability and amylosome conservation among diverse human colonic and rumen isolates of the keystone starch-degrader *Ruminococcus bromii*. *Environ Microbiol*. 2018;20(1):324-336. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14000>
63. Naas AE, Mackenzie AK, Mravec J et al. Do rumen Bacteroidetes utilize an alternative mechanism for cellulose degradation? *mBio*. 2014;5(4):e01401-01414. doi: 10.1128/mBio.01401-14

64. Newbold CJ, de la Fuente G, Belanche A et al. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front Microbiol.* 2015;6:1313. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
65. Olofsson J, Axelsson-Olsson D, Brudin L et al. *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. *PLoS One.* 2013;8(11):e78873. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078873>
66. Parmar NR, Jakhesara SJ, Mohapatra A et al. Rumen virome: an assessment of viral communities and their functions in the rumen of an Indian buffalo. *Curr. Sci.* 2016;111(5):919-925. doi: [10.18520/cs/v111/i5/919-925](https://doi.org/10.18520/cs/v111/i5/919-925)
67. Pitta DW, Pinchak WE, Dowd SE et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol.* 2010;59(3):511-522. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9609-6>
68. Puniya AK, Singh R, Kamra DN, editors. *Rumen microbiology: from evolution to revolution.* New Delhi: Springer India; 2015:379 p. doi:10.1007/978-81-322-2401-3
69. Qi M, Wang P, O'Toole N et al. Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen a metatranscriptomic approach. *PLoS One.* 2011;6(5):e20521. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020521>
70. Ricard G, McEwan NR, Dutilh BE et al. Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics.* 2006;10;7:22. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-22>
71. Rosewarne CP, Pope PB, Cheung J.L et al. Analysis of the bovine rumen microbiome reveals a diversity of Sus-like polysaccharide utilization loci from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Ind Microbiol Biotechnol.* 2014;41(3):601-606. doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1395-y>
72. Ross EM, Petrovski S, Moate PJ et al. Metagenomics of rumen bacteriophage from thirteen lactating dairy cattle. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):242. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-242>
73. Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S et al. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):680-687. doi: [10.1128/JCM.06167-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06167-11)
74. Santschi DE, Berthiaume R, Matte JJ et al. Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005;88(6):2043-2054. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72881-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72881-2)
75. Sasson G, Kruger Ben-Shabat S, Seroussi E et al. Heritable bovine rumen bacteria are phylogenetically related and correlated with the cow's capacity to harvest energy from its feed. *mBio.* 2017;8(4):e00703-00717. doi: [10.1128/mBio.00703-17](https://doi.org/10.1128/mBio.00703-17)
76. Schären M, Kiri K, Riede S et al. Alterations in the rumen liquid-, particle- and epithelium-associated microbiota of dairy cows during the transition from a silage- and concentrate-based ration to pasture in spring. *Front. Microbiol.* 2017;8:744. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00744>
77. Seshadri R, Leahy SC, Attwood GT et al. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nat Biotechnol.* 2018;36(4):359-367. doi: [10.1038/nbt.4110](https://doi.org/10.1038/nbt.4110)
78. Sharon A, Creevey CJ, Oyama LB et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Front Microbiol.* 2018;9:2161. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161>
79. Stewart RD, Auffret MD, Warr A et al. Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nat Commun.* 2018;9(1):870. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03317-6>
80. Susmel P, Stefanon B. Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. *J Biotechnol.* 1993;30(1):141-148. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90035-L](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90035-L)
81. Thompson LR, Zeng Q, Kelly L et al. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(39):E757-E764. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1102164108>

82. Williams AG, Coleman GS. The rumen protozoa. Brock Springer Series in Contemporary Bioscience. New York: Springer-Verlag; 1992:441 p.
83. Yeoman CJ, White BA. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. *Annu Rev Anim Biosci.* 2014;2:469-486. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114149>
84. Youssef NH, Couger MB, Struchtemeyer CG. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(15):4620-4634. doi: 10.1128/AEM.00821-13
85. Ze X, Ben David Y, Laverde-Gomez JA et al. Unique Organization of Extracellular Amylases into Amyloosomes in the Resistant Starch-Utilizing Human Colonic Firmicutes Bacterium *Ruminococcus bromii*. *mBio.* 2015;6(5):e01058-15. doi: 10.1128/mBio.01058-15

**Мирошникова Мария Сергеевна**, магистрант, Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13; лаборант-исследователь, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, сот.: 8-922-867-57-10, e-mail: [marymiroshnikova@mail.ru](mailto:marymiroshnikova@mail.ru)

Поступила в редакцию 24 ноября 2020 г.; принята после решения редколлегии 14 декабря 2020 г.; опубликована 31 декабря 2020 г. / Received: 24 November 2020; Accepted: 14 December 2020; Published: 31 December 2020