

УДК 636.085:577.17

DOI: 10.33284/2658-3135-104-3-57

**Микробиоценоз рубца – инструмент к построению искусственных биосистем.
Биореактор на основе рубца (обзор)**

М.С. Мирошникова¹, А.Е. Аринжанов²

¹*Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (г. Оренбург)*

²*Оренбургский государственный университет (г. Оренбург)*

Резюме. Попытки манипулирования микробиомом рубца крупного рогатого скота для решения глобальных сельскохозяйственных проблем продолжались десятилетиями с ограниченным успехом, в основном из-за отсутствия его детального понимания и отсутствия технологий культивирования большинства микроорганизмов за пределами рубца. Для создания такой искусственной биосистемы, как биореактор, имитирующий работу рубца жвачных животных, нам необходимы знания о составе микробиома рубца, взаимодействиях этих микроорганизмов между собой в зависимости от различных факторов. В данном обзоре рассматриваются исследования, посвящённые изучению повышения деградации микробиомом рубца растительного волокна, разработки по созданию рубцового ферментера непрерывного действия (Rumen continuous fermenter, RCF) с применением профилирования искусственного микробиома благодаря секвенированию следующего поколения (Next generation sequencing, NGS).

Ключевые слова: жвачные животные, микробиом рубца, ферментация микробиома рубца, биореактор, искусственные биосистемы.

UDC 636.085:577.17

Rumen microbiocenosis is a tool for the construction of artificial biosystems. Ruminant bioreactor (review)

Maria S Miroshnikova¹, Azamat E Arinzhanov²

¹*Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)*

²*Orenburg State University (Orenburg, Russia)*

Abstract. Attempts to manipulate the rumen microbiome of cattle to address global agricultural problems have continued for decades with limited success, largely due to a lack of detailed understanding of it and the lack of technologies for culturing most microorganisms outside the rumen. To create such an artificial biosystem as a bioreactor that imitates the work of the rumen of ruminants, we need knowledge about the composition of the rumen microbiome, the interactions of these microorganisms with each other, depending on various factors. This review examines studies on the increase in degradation of the rumen microbiome of plant fiber, developments on the creation of a rumen continuous fermenter (RCF) using artificial microbiome profiling through next generation sequencing (NGS).

Keywords: ruminants, rumen microbiome, fermentation of rumen microbiome, bioreactor, artificial biosystems.

Введение.

Жвачные растительоядные виды животных образуют симбиоз с микробными колонизаторами (микробиотой рубца), для которых они служат подходящей средой обитания. В свою очередь, микроорганизмы обеспечивают своего хозяина питательными веществами, вырабатывают белок и побочные продукты пищеварения из разнообразных растительных источников питания богатых клетчаткой (Bickhart DM and Weimer PJ, 2018).

Переваривание растительного материала достигается с помощью специализированных пищеварительных систем жвачных животных, состоящих из многокамерного желудка, который под-

держивает рост и ферментацию разнообразных анаэробных микроорганизмов. Основные процессы пищеварения осуществляются в первых двух отделах желудка, называемых ретикуло-рубец, представляющих собой узкоспециализированный анаэробный и метаногенный биореактор, где микробы колонизируют и разлагают кормовой растительный материал (Krause DO et al., 2003).

Группу комменсальных микроорганизмов, населяющих рубец, называют микробиомом рубца. Он принимает участие в ферментации высвобождаемых сахаров в летучие жирные кислоты (Volatile fatty acids, VFA) и микробный сырой белок (Microbial crude protein, MCP), которые всасываются из ретикуло-рубца и используются животным для стимулирования роста и образования пищевых и волокнистых продуктов. Микробиом рубца представлен бактериями, археями и эукариотами. Бактерии включают тысячи различных видов, составляют примерно 60 % микробной массы и в первую очередь ответственны (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*) за большую часть деградации биополимеров корма и ферментации полученных мономеров и олигомеров (Poulsen M et al., 2013). Кроме того, микроорганизмы рубца также могут синтезировать большинство витаминов группы В для удовлетворения пищевых потребностей хозяина (Santschi DE et al., 2005). Микробиом влияет на продуктивность животных и на качество конечного продукта (мясо, молоко) (Matthews C et al., 2019).

Микроорганизмы в рубце занимают различные экологические ниши, причём принципиально можно выделить две различные группы, живущих, соответственно, в жидкой и твёрдой фазах (Kong Y et al., 2010). Причём в твёрдой фазе может содержаться до 80 % или более всех бактериальных сообществ рубца.

Стоит отметить, что микробные сообщества рубца определяются генетическими особенностями организма хозяина (Bainbridge ML et al., 2016). Другим недавним открытием стало то, что соотношение архей и бактерий в рубце передается по наследству (Roehle R et al., 2016).

Хотя взаимодействия микроорганизмов в таком сложном и динамичном микросообществе трудно предсказать, изоляты, разлагающие волокна, хорошо изучены *in vitro*, а сокультуры или небольшие микробные консорциумы использовались в качестве инструментов для расшифровки положительных или отрицательных взаимодействий между ними и другими микроорганизмами, которые не могут разрушить клетчатку.

Очевидно, что фундаментальные знания формирования микробиомов рубца на всём протяжении рубцового пищеварения (Flint HJ et al., 2008) могут быть использованы при изучении и управлении такими экосистемами, как почва.

Микробные взаимодействия в свете деградации волокна.

Предполагается, что биомасса клетчатки, хотя и является богатым ресурсом в экосистеме рубца, может быть и причиной конкуренции между микроорганизмами, занимающими одну и ту же экологическую нишу. Например, сообщалось в основном об отрицательных конкурентных взаимодействиях между деструкторами целлюлозы *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* при совместном культивировании *in vitro* на целлюлозных субстратах. Хотя имеется информация об отсутствии разницы в скорости прикрепления этих трёх видов *in vivo* (Roger V et al., 1990). Радиоактивная метка для наблюдения конкуренции за адгезией на целлюлозном субстрате между этими тремя основными бактериальными деструкторами целлюлозы показала, что между *R. flavefaciens*, *R. albus* и *F. succinogenes* были выявлены различные ингибирующие взаимодействия, которые варьировались в зависимости от способа их инокуляции, то есть одновременные или последовательные. Помимо конкуренции за адгезию, в другом исследовании изучался удельный рост каждой из этих трёх бактерий в сокультуре (Mosoni P et al., 1997). Количество клеток отдельных видов было примерно одинаковым при совместном культивировании (при избытке целлюлозного субстрата) *R. albus* с *R. flavefaciens*, *R. albus* с *F. succinogenes* или *R. flavefaciens* с *F. succinogenes*. Однако, когда содержание целлюлозы было ограничено, *F. succinogenes* превосходил *R. albus*, а *R. flavefaciens* превосходил обе бактерии (Shi Y et al., 1997).

В случае этих видов было показано, что дополнительные механизмы конкуренции, а не только использование питательных ресурсов, играют роль в их взаимодействии. Механизм наблюдаемого ингибирования был описан для *R. albus*, продуцирующей бактериоцин-подобный белок, который предотвращал рост конкурента (*R. flavefaciens*), причём специфическое действие этого белка зависело от штамма (Chan WW and Dehority BA, 1999).

Этот механизм описан у *R. Flavefaciens*, конкурирующего с *F. succinogenes* (Chen J and Weimer P, 2001) Точно так же множественные штаммы *Butyrivibrio fibrisolvens* продуцируют бактериоцин-подобные белки в качестве механизма конкуренции между штаммами (Kalmokoff ML and Teather RM, 1997). Эти мешающие конкурентные механизмы также наблюдались между царствами: *R. albus* и *R. flavefaciens*, которые оба подавляли активность грибов, конкурируя за целлюлозу (Bernalier A et al., 1993). Кроме того, многочисленные дополнительные отчёты показали, что фибролитические бактерии, по-видимому, не взаимодействуют синергетически с грибами. Сходным образом простейшие инфузорий и грибы, выращенные в сокультуре, демонстрировали в основном ингибирующие взаимодействия (Hobson PN and Stewart CS, 1997).

Клетчатка, межвидовые взаимодействия и микробное богатство рубца.

Наблюдаемая конкуренция показывает, что хотя функциональная избыточность обычно возникает в сложной среде рубца *in vivo*, в которой имеет место бесчисленное количество бактериальных взаимодействий, функциональная избыточность менее возможна *in vitro*, где экосистема рубца сведена к минимуму и включает в себя лишь несколько деструкторов клетчатки. Это говорит о том, что взаимодействия типа камень-ножницы-бумага могут иметь место в сложных экосистемах, таких как рубец.

В этой модели, несмотря на принципы конкурентного исключения (когда один микроорганизм конкурирует за общий ресурс и исключает другой), результат антагонизма и видовой состав встроены в конкурентные сети с множеством факторов, обеспечивающих сосуществование видов и увеличение их количества (Allesina S and Levine JM, 2011). Следовательно, стоит задаться вопросом, действительно ли конкурентные взаимодействия *in vitro* отражают взаимоотношения, которые происходят *in vivo* в присутствии большого видового разнообразия, где производство метаболитов может привести к мешающему механизму. Создавая более сложный бактериальный консорциум, Chen J и Weimer PJ (2001) изучили конкурентные отношения между *R. flavefaciens*, *R. albus* и *F. Succinogenes* в присутствии или в отсутствии нецеллюлолитических бактерий *S.ruminantium* и *Streptococcus bovis*. В непрерывном культивировании (в условиях, ограничивающих субстрат) на целлюлозе введение нецеллюлолитических бактерий не повлияло на результат культивирования, в котором *R. albus* доминировал. Однако в периодическом культивировании (условия, не ограничивающие субстрат) введение транзитной микрофлоры изменило пропорции трёх целлюлолитических бактерий в обоих случаях (*S. ruminantium* или *Streptococcus bovis*), чтобы обеспечить больший рост *R. flavefaciens* за счёт *F. succinogenes*. Это предполагает, что нецеллюлолитические бактерии влияли на конкурентное взаимодействие между целлюлолитическими видами, тем самым укрепляя представление о том, что сложные взаимодействия увеличивают видовое разнообразие в этой экосистеме (Chen J and Weimer P, 2001).

Дополнительные исследования противоречат данным о конкуренции, наблюдаемой в исследованиях *in vitro*. Эксперименты по дефаунации продемонстрировали симбиотические отношения между простейшими, анаэробными грибами и целлюлолитическими бактериями. Отсутствие простейших привело к снижению гидролиза целлюлозы в нескольких исследованиях (Flachowsky G, 2003), а также к снижению концентрации анаэробных грибов и некоторых целлюлолитических бактерий (*R. albus* и *R. flavefaciens*, но не *F. succinogenes*) (Yáñez-Ruiz DR et al., 2015). Хотя хорошо известно, что простейшие в рубце питаются бактериями и что они не могут расти в аксенической культуре, поскольку бактерии обеспечивают их необходимыми питательными веществами, и преимущества для бактерий ещё предстоит определить (Hobson PN and Stewart CS, 1997).

Другие исследования показали, что снижение окислительно-восстановительного потенциала дрожжей в среде рубца приводит к более благоприятным условиям для роста строго анаэробных целлюлолитических бактерий, которые могут стимулировать их прикрепление к частицам волокна (Jouany JP et al., 1998).

Разделение ниши может также объяснить, как снижение конкуренции, так и наблюдаемую функциональную избыточность *in vivo*. Этот механизм наблюдали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescence in situ hybridization, FISH), как внутривидовой среди групп *F. succinogenes*, так и межвидовой между *F. succinogenes* и *R. flavefaciens*. В обоих случаях бактерии были распределены в разных частях растения, используя сено садовых трав в качестве природного целлюлозного субстрата-мишени (Shinkai T and Kobayashi Y, 2007).

Другими учёными изучалась последовательность растительных волокон после их предварительного заселения отдельными видами. В этом эксперименте вид *F. succinogenes* впервые инокулирован в стебель сена (Shinkai T et al., 2010). Неожиданным результатом этого исследования были разные микробные консорциумы, полученные при использовании разных групп *F. Succinogenes* (1, 2 и 3). Группа 1 разработала стабильный консорциум с *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Clostridium sp.* Представителями группы 2 были *F. succinogenes*, *P. ruminicola* и неклассифицированные *Bacteroides*, причём *Treponema bryantii*, *B. fibrisolvens*, *Acinetobacter sp.* и *Wolinella succinogenes* были более многочисленными. В консорциуме группы 3 штаммы *F. succinogenes* исчезли и были заменены штаммами *R. albus* и *F. succinogenes* из группы 1, которые вышли из жидкости рубца. Эти результаты отражают необычайное разнообразие взаимодействий, которые происходят в рубце, в котором физиологические изменения в одной популяции микробов (например, *F. succinogenes*) вызывают чрезвычайно разнообразные взаимодействия всех микроорганизмов консорциума.

Манипуляции с микробиомом для повышенной деградации волокна.

За последние несколько десятилетий учёные пытались улучшить функционирование рубца за счёт более интенсивного разрушения клетчатки в рубце, но их попытки были безуспешными. Предпринимались различные манипуляции с использованием кормовых добавок, таких как химические вещества (Chalupa W, 1977) и ферменты (Colombatto D et al., 2003).

Предметом последних исследований стало использование живых бактерий в качестве пробиотиков (Weimer PJ, 2015). Первоначально пробиотические штаммы вводили в качестве однократной дозировки, и результат колонизации быстро отслеживался после инокуляции (Flint HJ et al., 1989). Поскольку было обнаружено, что количество чужеродных бактерий очень резко уменьшается в течение нескольких дней после инокуляции пробиотиков, то производили их повторное введение (Chiquette J et al., 2007), в результате которого концентрации фибролитических бактерий (*Ruminococcus sp.* и/или *F. succinogenes*) также быстро снижались.

Во всех этих исследованиях не выявлено действие пробиотиков на перевариваемость клетчатки либо отсутствовало, либо было временным; их введение оказало временное влияние на структуру микробиома рубца с быстрым возвращением его к исходному состоянию. В некоторых из этих экспериментальных исследований несколько фибролитических популяций (*Ruminococcus*, *Fibrobacter*, эукариоты, анаэробные грибы рубца и простейшие) увеличивались в ответ на введение дозы пробиотиков (Krause DO et al., 1999a). Также имеются данные об исследованиях по увеличению содержания клетчатки в соотношении корма к концентрату (Chiquette J et al., 2007), введение пробиотиков после голодания (Præsteng KE et al., 2013) и замены всего содержимого рубца микробиомом рубца животного с более высокой способностью разлагать пищевые волокна (Zhou M et al., 2018).

Метод дозирования пробиотика после периода голодания был использован, чтобы обогатить микробиом рубца оленя ключевыми фибролитическими бактериями, такими как *P. flavefaciens* в попытке увеличить гидролиз растительных волокон и улучшить здоровье животных (Præsteng KE et al., 2013). Что касается исследований Krause DO и его коллег (1999b), изменения в структуре микробиома наблюдались после введения дозы с пробиотическими штаммами и проявлялись уве-

личением *Prevotella* и сокращением популяций *Bacteroidetes*; однако сам пробиотик не сохранялся в среде рубца (Krause DO et al., 1999a). Во многих из этих исследований было отмечено увеличение популяции эукариот во время дозирования пробиотиками (Krause DO et al., 2001), что предполагает хищничество простейших бактерий, разлагающих волокна.

В то время как в некоторых исследованиях сообщалось об адгезии пробиотических бактерий в рубце, можно утверждать, что отбор проб после введения дозы пробиотических штаммов жвачным животным был произведён слишком рано, и что последующий отбор проб показал бы возврат к исходному состоянию микробиома.

Анаэробные грибы рубца также способствовали лучшему использованию волокнистого корма жвачными животными с точки зрения увеличения его потребления, но в этом исследовании концентрация грибов после добавления пробиотиков не измерялась (Puniya AK et al., 2015).

Более радикальные стратегии изменения состава микробиома использовались в поздних попытках модулировать энергетическую эффективность хозяина путём переливания микробиоты рубца от «эффективных» животных к «неэффективным». Так, например, замена 95 % содержимого рубца у четырёх животных привела к временному влиянию на функционирование и структуру микробиома с возвращением его к исходному состоянию всего через 10 дней (Weimer PJ et al., 2017). Эти данные свидетельствуют о том, что состав микробиома рубца очень устойчив к изменениям и его первоначальное микробное сообщество имеет способность восстанавливаться даже при очень низкой концентрации. Во втором исследовании была применена интенсивная промывка рубца перед внесением в него иной микробиоты. Авторы сообщили о высокой индивидуальной изменчивости состава микробиома через 28 дней после переливания. В целом эти отчёты подчеркивают устойчивость микробного сообщества рубца к пертурбациям и специфичность его хозяина, причём каждый отдельный хозяин эволюционирует вместе с его микробиомом очень специфическим образом.

Тем не менее получены некоторые обнадеживающие результаты, когда пробиотические бактерии были нацелены на свободную экологическую нишу. Действительно, генетически модифицированный *Butyrivibrio fibrisolvens*, способный расщеплять фторацетат, может быть установлен в рубце овец, потребляющих фторацетатсодержащий растительный материал, что будет способствовать защите животного от отравления (Gregg K et al., 1998). Кроме того, устойчивость к токсичной аминокислоте мимозину может быть передана чувствительным козам путём инфузии содержимого рубца от устойчивых коз (Hammond AC, 1995). Помимо свободной экологической ниши ещё одним условием для более лёгкого приживания может быть микробная сложность экосистемы рубца, поскольку было показано, что множественное разнообразие микроорганизмов способствует более высокому укоренению пробиотиков (Fonty G et al., 1988).

Модуляция микробиома кишечника человека также оказалась очень сложной (Walter J et al., 2018). Был предложен механизм приживания, основанный на оценках микробного захватчика, микробиома и организма-хозяина. Применение этих принципов к среде рубца жвачных животных может способствовать получению лучшего результата.

Микробное сообщество рубца формируется с очень раннего возраста животных (Jami E et al., 2013; Guzman CE et al., 2015), но только после рождения. Хотя в рубце молодого животного можно избежать расселения простейших (Yáñez-Ruiz DR et al., 2015) и анаэробных грибов (Puniya AK et al., 2015), бактериальные популяции являются менее контролируемые. Тем не менее некоторые усилия, направленные на снижение метаногенеза путём внесения изменений в раннем периоде жизни, привели к положительным результатам (Abecia L et al., 2014), и эти данные свидетельствуют о возможности разработки стратегий для повышения эффективности разложения клетчатки (Jami E et al., 2013).

Биореактор на основе рубца.

В настоящее время биореакторы на основе рубца жвачных животных открывают перспективу для производства биогаза и кормовых биодобавок. Механизм их действия основан на анаэробном сбраживании органических отходов сельскохозяйственного производства. Детальное изу-

чение динамики функционирования рубца, анаэробной экосистемы и процессов его ферментации является предпосылкой для понимания основ физиологии пищеварения, а также возникновения и протекания желудочно-кишечных заболеваний, таких как ацидоз рубца. Изучение факторов, которые способствуют модуляции *in vivo*, лежат в основе своевременных изменений окружающей среды и физиологии, зависимой от хозяина (Ziemer CJ et al., 2000).

Исследователи долгое время рассматривали возможность применения принципов рубцовой ферментации в промышленных анаэробных системах, имитирующих пищеварение, как привлекательную стратегию для сокращения и стабилизации лигноцеллюлозных отходов с одновременной регенерацией биогаза в качестве возобновляемого источника энергии. Физиология пищеварения жвачных животных изучалась в течение многих лет, чтобы выделить ключевые механизмы, которые могут способствовать анаэробной деградации лигноцеллюлозных отходов (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977; Muetzel S et al., 2009).

Анаэробное пищеварение (Anaerobic digestion, AD) – это эффективный многоступенчатый процесс, в котором энергия производится из органических отходов и обладает высоким биометановым потенциалом, но имеет ограниченную доступность из-за других высококонкурентных (биотехнологических) областей применения.

Было проведено несколько исследований по изучению жизнедеятельности рубцовых микроорганизмов в анаэробных варочных котлах, целью которых являлось увеличение выработки метана и скорости разложения целлюлозы (Gijzen HJ et al., 1987; Blasig JD et al., 1992; Barnes SP and Keller J, 2003). Учёные предположили, что инокуляция реакторов содержимым рубца увеличивает скорость расщепления целлюлозы в процессах переваривания лигноцеллюлозных отходов, однако макроскопические наблюдения показали, что микробиота рубца не может легко осесть в промышленных анаэробных варочных котлах и превзойти способности естественных микроорганизмов твёрдых отходов (O'Sullivan CA and Burrell PC, 2007). Более того, скорость биоразложения в анаэробных биореакторах, инокулированных содержимым рубца, остаётся ниже, чем в кишечнике животных. Следовательно, необходимо изучить расселение целлюлолитической микробиоты рубца и проявление её ферментативных свойств в анаэробном варочном котле (Yue ZB et al., 2013).

Изучению ферментации в рубце могут помочь системы непрерывного культивирования *in vitro*, имитирующие среду рубца. Рубцовый ферментер непрерывного действия (Rumen continuous fermenter, RCF) – это лабораторное оборудование, разработанное для моделирования условий и работы рубцового пищеварения, которое предназначено для изучения метаболизма рубца жвачных. Данные системы производят ферментирующую жидкость, их работа осуществляется с инокуляции посевного материала в искусственном рубце и непрерывного притока искусственной слюны, выхода продуктов ферментации и постоянного поступления питательных веществ (субстратов). Они также могут быть модифицированы и адаптированы для использования в качестве искусственных генераторов ферментационной жидкости рубца, с последующей стандартизацией по нескольким условиям, в том числе по типу и количеству ферментируемого субстрата, pH, разбавлению и т. д. Существуют исследования, в которых сравнивали ферментационные жидкости из разных RCF с жидкостями, собранными из рубцов жвачных (Hristov AN et al., 2012). Жидкость из ферментеров менее концентрирована с точки зрения короткоцепочных жирных кислот (Short chain fatty acid, SCFA) и простейших, а количество целлюлолитических бактериальных штаммов, по видимому, снижено в некоторых типах RCF, например, Rusitec (Martínez ME et al., 2010 a,b), в то время как в других ферментерах микробиом был сопоставим к измеренному непосредственно на инокуляте рубца, собранном *in vivo* (Soto EC et al., 2012; Soto EC et al., 2013). Однако ни в одном из экспериментов не проводилось сопоставления характеристик жидкости рубца жвачных и содержимого RCF для их применения в качестве посевного материала с точки зрения результатов различных тестов *in vitro*.

По сравнению с *in vivo* методы *in vitro* дешевле, на их работу затрачивается меньше времени и процесс их эксплуатации строже контролируется (Hristov AN et al., 2012). Одной из наиболее часто используемых моделей *in vitro* является двухпоточная система ферментера RCF, разработан-

ная Hoover WH с коллегами (1976), которая поддерживает ферментацию инокулята рубца в сосуде для ферментации объемом 1 литр путём постоянного добавления кормового субстрата, бикарбонатного буфера и N_2 или CO_2 для поддержания анаэробных условий, а также для дифференциального удаления твёрдых и жидких стоков. Было показано, что работа этой системы близка к *in vivo* эффектом переваривания клетчатки и профиля SCFA (Hoover WH et al., 1976). Однако способность этой системы поддерживать определённые популяции микроорганизмов всё ещё неясна.

Эксперименты, характеризующие сообщества микроорганизмов в ферментерах RCF, были ограничены в рамках какого-то конкретного микробного сообщества, но недавняя разработка NGS ампликонов 16S рРНК предоставила возможность изучать микробную среду в масштабе всего сообщества.

До сих пор в ограниченном числе исследований использовалось секвенирование 16S рРНК сообществ микроорганизмов ферментеров рубца RCF. Группа исследователей профилировали микробиом двухпоточных ферментеров RCF, чтобы изучить влияние добавок мочевины на сообщество рубца (Jin D et al., 2016).

Техника долговременного моделирования рубца «RUMen SIMulation TEChnique» (RUSITEC) – это ещё одна хорошо зарекомендовавшая себя полунепрерывная модель *in vitro* для исследования процессов ферментации рубца. В данной системе корм помещается в нейлоновые мешки, которые перемешиваются внутри сосудов для ферментации, содержащих инокулят рубца. Инкубацию *in vitro* следует проводить с кормом, измельчённым до такого состояния, чтобы лучше всего можно было бы имитировать жевание жвачных животных. Хотя система RUSITEC использовалась в исследованиях почти 40 лет (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977), в данных моделях ведётся поиск улучшений, которые максимально отражают и имитируют естественные процессы у жвачных животных. Этот метод широко используется для изучения влияния различных рационов или кормовых добавок на микробные паттерны ферментации, синтез белка и рост микроорганизмов рубца (Giraldo LA et al., 2007; Ertl P et al., 2015). Несмотря на то, что это высоко стандартизованный метод (например, по температуре, pH и потоку буфера), известно, что система отличается от условий *in vivo* в отношении процессов абсорбции, различий в соотношении между жидкими и твёрдыми материалами, более низких концентраций SCFA и протозойных сдвигов по сравнению с животным-донором (Martinez ME et al., 2010a). Было высказано предположение, что бактериальное разнообразие в RUSITEC снижается, а исчезновение инфузорий может быть связано с потерей баланса в бактериальных популяциях (Prevot S et al., 1994).

Информация о стабильности бактериальной микробиоты и метаболома рубца в системе RUSITEC пока недоступна. Реализация методов высокого разрешения, таких как высокопроизводительное секвенирование и метаболомика, расширяет наши знания об экосистеме микроорганизмов рубца и процессах его ферментации. Используя ПЦП в реальном времени, Lengowski MB с коллегами (2016) установили, что большинство изменений в процессе адаптации микробного сообщества рубца к системе RUSITEC происходит в течение первых 48 часов после инокуляции, однако для некоторых видов этот процесс может продолжаться дольше (Lengowski MB et al., 2016). Доступность высокопроизводительных методов секвенирования даёт возможность детально исследовать изменения в сообществе микроорганизмов и микробных биохимических процессах. Belanche A совместно с коллегами (2016 a) были первыми, кто применил методы секвенирования 16S нового поколения для оценки влияния пищевых добавок хитозана и сапонинов плодов плюща в системе RUSITEC (Belanche A et al., 2016b) и 2-х видов бурых водорослей на микробиом рубца (Belanche A et al., 2016c). Недавно Duarte AC и его коллеги (2017) сообщили о влиянии дня отбора проб на связанную с жидкостью микробиоту в RUSITEC с использованием секвенирования Illumina (Duarte AC et al., 2017).

Для оценки усвояемости кормов были также разработаны другие методы *in vitro*. Menke KH и Steingass H (1988) предложили измерять газ, производимый во время ферментации, и данные о составе корма для оценки содержания энергии в кормах. Theodorou MK с коллегами (1991), учитывая предыдущие исследования (Menke KH et al., 1979), разработали метод *in vitro* для измерения

накопления газа в свободном пространстве. Затем этот метод был переработан другими авторами, которые использовали компьютеризированные датчики давления для мониторинга газообразных продуктов микробного метаболизма и обнаружили чёткую линейную зависимость между исчезновением нейтрального детергентного волокна (Neutral detergent fiber, NDF) и образованием газа (Schofield P and Pell AN, 1995).

Несмотря на всё более широкое использование NGS для мониторинга изменений сообществ микроорганизмов рубца в системах *in vitro*, насколько нам известно, не было исследований, сравнивающих микробиомы, присутствующие в этих системах, с истинным сообществом *in vivo*.

Понимание того, как сообщество микроорганизмов в ферментерах RCF связано с микробиомом настоящего рубца, имеет решающее значение для получения выводов о методах лечения, применяемых в этих системах. Помимо отсутствия сравнений между рубцами жвачных и ферментерами RCF мало известно об изменениях в микробиоме ферментеров RCF с течением времени. Для работы на двухпоточных ферментерах RCF традиционно используют 6- или 7-дневный период их адаптации перед отбором проб (Cardozo PW et al., 2004; Jenkins TC et al., 2014). Эта продолжительность была первоначально выбрана на основе результатов, которые продемонстрировали отсутствие различий в ферментации *in vitro* между 6-9 и 11-14 днями эксперимента (Hoover WH et al., 1976). Однако более свежие доказательства, подтверждающие продолжительность периода адаптации, немногочисленны. Изучение изменений бактериального и архейного сообщества ферментеров RCF с течением времени может дать представление о продолжительности инкубационного периода, необходимого для достижения стабильного микробиома.

Выводы.

Успешная эксплуатация биореактора, использующего микробное сообщество рубца жвачных животных для промышленных и биотехнологических применений, должна основываться на оптимизации состава микробного сообщества, эксплуатационных параметров и факторов окружающей среды, которые основываются на эмпирических исследованиях и смоделированы для обеспечения производительности и стабильности процесса. Введение инокулята микробиома в биореактор представляет собой важный шаг в запуске микробиологических процессов. Установленное микробное сообщество, управляющее биологическими процессами в биореакторе представляет собой консорциум, приобретённый из внешней среды. Во многих известных случаях сложившееся микробное сообщество рубцового ферментера лишь частично напоминает первоначальный консорциум, оставшиеся конечные популяции адаптируются к контролируемым условиям в биореакторе и данный процесс в настоящий момент представляет собой одну из основных проблем. Поэтому важной задачей является понимание процессов сборки сообщества микроорганизмов рубца жвачных в течение их жизни и разработка анаэробного ферментера, с помощью которого появится возможность воспроизведения и поддержания «идеальной» искусственной микробиоты, работающей в кооперации для достижения определенного результата.

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

Литература

1. Abecia L, Waddams KE, Martínez-Fernandez G, Martín-García AI, Ramos-Morales E, Newbold CJ, Yáñez-Ruiz DR. An antimethanogenic nutritional intervention in early life of ruminants modifies ruminal colonization by Archaea. *Archaea*. 2014;2014:841463. doi: 10.1155/2014/841463
2. Allesina S, Levine JM. A competitive network theory of species diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 A;108(14):5638-5642. doi: 10.1073/pnas.1014428108
3. Bainbridge ML, Cersosimo LM, Wright AD, Kraft J. Rumen bacterial communities shift across a lactation in Holstein, Jersey and Holstein × Jersey dairy cows and correlate to rumen function,

bacterial fatty acid composition and production parameters. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016;92(5):fiw059. doi: 10.1093/femsec/fiw059

4. Barnes SP, Keller J. Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced anaerobic digestion. *Water Sci Technol.* 2003;48(4):155-162.

5. Belanche A, Jones E, Parveen I, Newbold CJ. A metagenomics approach to evaluate the impact of dietary supplementation with *Ascophyllum nodosum* or *Laminaria digitata* on rumen function in rusitec fermenters. *Front Microbiol.* 2016a; 7:299. doi: 10.3389/fmicb.2016.00299

6. Belanche A, Kingston-Smith AH, Newbold CJ. An integrated multi-omics approach reveals the effects of supplementing grass or grass hay with vitamin E on the rumen microbiome and its function. *Front Microbiol.* 2016b; 7:905. doi: 10.3389/fmicb.2016.00905

7. Belanche A, Pinloche E, Preskett D, Newbold CJ. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016c; 92(1):fiv160. doi: 10.1093/femsec/fiv160

8. Bernalier A, Fonty G, Bonnemoy F, Gouet P. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *J Gen Microbiol.* 1993;139(4):873-880. doi: 10.1099/00221287-139-4-873

9. Bickhart DM, Weimer PJ. Symposium review: Host-rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2018;101(8):7680-7689. doi: 10.3168/jds.2017-13328

10. Blasig JD, Holtzapple MT, Dale BE, Engler CR, Byers FM. Volatile fatty acid fermentation of AFEX-treated bagasse and newspaper by rumen microorganisms. *Resour. Conserv. Recy.* 1992;7(1-3):95-114. doi: [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(92\)90009-Q](https://doi.org/10.1016/0921-3449(92)90009-Q)

11. Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J Anim Sci.* 2004;82(11):3230-3236. doi: 10.2527/2004.82113230x

12. Chalupa W. Manipulating rumen fermentation. *J Anim Sci.* 1977;45(3):585-599. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1977.453585x>

13. Chan WW, Dehority BA. Production of *Ruminococcus flavefaciens* growth inhibitor(s) by *Ruminococcus albus*. *Anim Feed Sci Technol.* 1999;77(1-2):61-71. doi: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00234-X)

14. Chen J, Weimer PJ. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology.* 2001; 147(1):21-30. doi: 10.1099/00221287-147-1-21

15. Chiquette J, Talbot G, Markwell F, Nili N, Forster RJ. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus flavefaciens* NJ along with a probiotic mixture in forage or concentrate-fed dairy cows: effect on ruminal fermentation, cellulolytic populations and in sacco digestibility. *Can J Anim Sci.* 2007;87(2):237-249. doi: <https://doi.org/10.4141/A06-066>

16. Colombatto D, Morgavi DP, Furtado AF, Beauchemin KA. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *J Anim Sci.* 2003;81(10):2628-2638. doi: 10.2527/2003.81102628x

17. Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br J Nutr.* 1977;38(3):371-384. doi: 10.1079/bjn19770102

18. Duarte AC, Holman DB, Alexander TW, Durmic Z, Vercoe PE, Chaves AV. The type of forage substrate preparation included as substrate in a RUSITEC system affects the ruminal microbiota and fermentation characteristics. *Front Microbiol.* 2017;8:704. doi: 10.3389/fmicb.2017.00704

19. Ertl P, Knaus W, Metzler-Zebeli BU, Klevenhusen F, Khiaosa-Ard R, Zebeli Q. Substitution of common concentrates with by-products modulated ruminal fermentation, nutrient degradation, and microbial community composition in vitro. *J Dairy Sci.* 2015; 98(7):4762-4771. doi: 10.3168/jds.2014-9063

20. Flachowsky G. *Rumen Microbiology*: Burk A Dehority (Ed.), Nottingham University Press, Nottingham, NG11 OAX, UK, 2003, Hardcover, ISBN 1-897676-99-9, £ 40, 372 pp. *Animal Feed Science and Technology.* 2004;113(1-4):253-254. doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2003.09.002

21. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(2):121-131. doi: 10.1038/nrmicro1817
22. Flint HJ, Bisset J, Webb J. Use of antibiotic resistance mutations to track strains of obligately anaerobic bacteria introduced into the rumen of sheep. *J Appl Bacteriol*. 1989;67(2):177-183. doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb03393.x
23. Fonty G, Gouet P, Ratefiarivelo H, Jouany JP. Establishment of *Bacteroides succinogenes* and measurement of the main digestive parameters in the rumen of gnotoxenic lambs. *Can J Microbiol*. 1988;34(8):938-946. doi: 10.1139/m88-166
24. Gijzen HJ, Lubberding HJ, Verhagen FJ, Zwart KB, Vogels GD. Application of rumen microorganisms for an enhanced anaerobic degradation of solid organic waste materials. *Biol. Waste*. 1987;22(2):81-95. doi: [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90041-3)
25. Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido ML, Carro MD. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br J Nutr*. 2007;98(4):753-761. doi: 10.1017/S0007114507744446
26. Gregg K, Hamdorf B, Henderson K, Kopečný J, Wong C. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(9):3496-3498. doi: 10.1128/AEM.64.9.3496-3498.1998
27. Guzman CE, Bereza-Malcolm LT, De Groef B, Franks AE. 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: 10.1371/journal.pone.0133048
28. Hammond AC. *Leucaena toxicosis and its control in ruminants*. *J Anim Sci*. 1995;73(5):1487-1492. doi: 10.2527/1995.7351487x
29. Hobson PN, Stewart CS, eds. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Netherlands: Springer Science & Business Media; 1997: 719 p. doi: 10.1007/978-94-009-1453-7
30. Hoover WH, Crooker BA, Sniffen CJ. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. *J Anim. Sci*. 1976;43(2):528-534. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1976.432528x>
31. Hristov AN, Lee C, Hristova R, Huhtanen P, Firkins JL. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *J Dairy Sci*. 2012 Sep;95(9):5299-5307. doi: 10.3168/jds.2012-5533. PMID: 22916935.
32. Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J*. 2013;7(6):1069-1079. doi: 10.1038/ismej.2013.2
33. Jenkins TC, Bridges WC, Harrison JH, Young KM. Addition of potassium carbonate to continuous cultures of mixed ruminal bacteria shifts volatile fatty acids and daily production of biohydrogenation intermediates. *J Dairy Sci*. 2014; 97(2):975-984. doi: 10.3168/jds.2013-7164
34. Jin D, Zhao S, Wang P, Zheng N, Bu D, Beckers Y, Wang J. Insights into abundant rumen ureolytic bacterial community using rumen simulation system. *Front Microbiol*. 2016;7:1006. doi: 10.3389/fmicb.2016.01006
35. Jouany JP, Mathieu F, Senaud J, Bohatier J, Bertin G, Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Reprod Nutr Dev*. 1998;38(4):401-416. doi: 10.1051/rnd:19980405
36. Kalmokoff ML, Teather RM. Isolation and characterization of a bacteriocin (*Butyrivibriocin* AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(2):394-402. doi: 10.1128/aem.63.2.394-402.1997
37. 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: 10.1111/j.1574-6941.2010.00977.x

38. Krause DO, Bunch RJ, Conlan LL, Kennedy PM, Smith WJ, Mackie RI, McSweeney CS. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. *Microbiology*. 2001;147(7):1719-1729. doi: 10.1099/00221287-147-7-1719
39. Krause DO, Bunch RJ, Smith WJM, McSweeney CS. Diversity of *Ruminococcus* strains: a survey of genetic polymorphisms and plant digestibility. *J Appl Microbiol*. 1999a;86(3):487-495.
40. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 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)
41. Krause DO, Smith WJM, Ryan FME, Mackie RI, McSweeney CS. Use of 16S-rRNA based techniques to investigate the ecological succession of microbial populations in the immature lamb rumen: tracking of a specific strain of inoculated *Ruminococcus* and Interactions with other microbial populations in vivo. *Microb Ecol*. 1999b;38(4):365-376. doi: 10.1007/s002489901006
42. Lengowski MB, Zuber KH, Witzig M, Mohring J, Boguhn J, Rodehutsord M. Changes in rumen microbial community composition during adaption to an in-vitro system and the impact of different forages. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150115. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150115>
43. Martínez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos S, Carro MD. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J Dairy Sci*. 2010a; 93(8):3684-3698. doi: 10.3168/jds.2009-2933
44. Martínez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Saro C, Carro MD. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. *J Dairy Sci*. 2010b;93(8):3699-3712. doi: 10.3168/jds.2009-2934
45. Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*. 2019;10(2):115-132. doi: 10.1080/19490976.2018.1505176
46. Menke K, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*. 1979;93(1):217-222. doi: 10.1017/S0021859600086305
47. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev*. 1988;28:7-55.
48. Mosoni P, Fonty G, Gouet P. Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Curr Microbiol*. 1997;35(1):44-47. doi: 10.1007/s002849900209
49. Muetzel S, Lawrence P, Hoffmann EM, Becker K. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim Feed Sci Tech*. 2009;151(1-2): 32-43. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001
50. O'Sullivan CA, Burrell PC. The effect of media changes on the rate of cellulose solubilisation by rumen and digester derived microbial communities. *Waste Manag*. 2007;27(12):1808-1814. doi: 10.1016/j.wasman.2006.10.010
51. Poulsen M, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Urich T. Methylophilic methanogenic *Thermoplasmata* implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun*. 2013;4:1428. doi: 10.1038/ncomms2432
52. Præsteng KE, Pope PB, Cann IK, Mackie RI, Mathiesen SD, Folkow LP, Eijsink VG, Sundset MA. Probiotic dosing of *Ruminococcus flavefaciens* affects rumen microbiome structure and function in reindeer. *Microb Ecol*. 2013;66(4):840-849. doi: 10.1007/s00248-013-0279-z
53. Prevot S, Senaud J, Bohatier J, Prensier G. Variation in the composition of the ruminal bacterial microflora during the adaptation phase in an artificial fermenter (RUSITEC). *Zool Sci*. 1994;11(6):871-882.

54. Puniya AK, Salem AZM, Kumar S, et al. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: a review. *J Integr Agric.* 2015;14(3):550-560. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60837-6
55. Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie C-A, Rooke JA, McKain N, Ross DW, et al. Bovine Host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet.* 2016;12(2):e1005846. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005846>
56. Roger V, Fonty G, Komisarczuk-Bony S, Gouet P. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(10):3081-3087. doi: 10.1128/aem.56.10.3081-3087.1990
57. Santschi DE, Berthiaume R, Matte JJ, Mustafa AF, Girard CL. Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005;88(6):2043-2054. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72881-2
58. Schofield P, Pell AN. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J Anim Sci.* 1995;73(11):3455-3463. doi: 10.2527/1995.73113455x
59. Shi Y, Odt CL, Weimer PJ. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(2):734-742. doi:10.1128/aem.63.2.734-742.1997
60. Shinkai T, Kobayashi Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(5):1646-1652. doi: 10.1128/AEM.01896-06
61. Shinkai T, Ueki T, Kobayashi Y. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Anim Sci J.* 2010;81(1):72-79. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00698.x
62. Soto EC, Molina-Alcaide E, Khelil H, Yáñez-Ruiz DR. Ruminal microbiota developing in different in vitro simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013;185(1-2):9-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.003>
63. Soto EC, Yáñez-Ruiz DR, Cantalapiedra-Hijar G, Vivas A, Molina-Alcaide E. Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous culture fermenters. *Anim. Prod. Sci.* 2012;52(9):813-822. doi: 10.1071/AN11312
64. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB. A new laboratory procedure for estimating kinetic parameters associated with the digestibility of forages. In: *Proceedings of the International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, USD-ARS; Madison, WI, USA. 7-10 October 1991.
65. Walter J, Maldonado-Gómez MX, Martínez I. To engraft or not to engraft: an ecological framework for gut microbiome modulation with live microbes. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49:129-139. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.008
66. Weimer PJ, Cox MS, Vieira de Paula T, Lin M, Hall MB, Suen G. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2017;100(9):7165-7182. doi: 10.3168/jds.2017-12746
67. Weimer PJ. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* 2015;6:296. doi: 10.3389/fmicb.2015.00296
68. Yáñez-Ruiz DR, Abecia L, Newbold CJ. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Front Microbiol.* 2015;6:1133. doi: 10.3389/fmicb.2015.01133

69. Yue ZB, Li WW, Yu HQ. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 2013;128:738-744. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.073

70. Zhou M, Peng YJ, Chen Y, Klinger CM, Oba M, Liu JX, Guan LL. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome.* 2018;6(1):62. doi: 10.1186/s40168-018-0447-y

71. Ziemer CJ, Sharp R, Stern MD, Cotta MA, Whitehead TR, Stahl DA. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ Microbiol.* 2000;2(6):632-643. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00146.x

Мирошникова Мария Сергеевна, 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

Аринжанов Азамат Ерсайнович, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры, Оренбургский государственный университет, 460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, e-mail: arin.azamat@mail.ru

Поступила в редакцию 16 августа 2021 г.; принята после решения редколлегии 13 сентября 2021 г.; опубликована 30 сентября 2021 г. / Received: 16 August 2021; Accepted: 13 September 2021; Published: 30 September 2021