

ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ

УДК 636.3:612.32:579.25:57.088.7

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.4. 5-26

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОМА РУБЦА У ОВЕЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ (обзор)

Колоскова Е.М., Остренко К.С., Езерский В.А., Овчарова А.Н., Белова Н.В.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФИЦ животноводства –
ВИЖ им. ак. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл., Российская Федерация*

Изучение микроорганизмов (МО) рубца до настоящего времени проводилось в основном классическим методом посева чистых культур на питательные среды; при этом детально описаны лишь несколько десятков видов симбионтных микроорганизмов. Разработка и развитие молекулярно-генетических методов исследований, позволяющих идентифицировать рубцовые МО, минуя стадию культивирования, способствовали получению более детального представления о процессах, происходящих в рубце. Установлено, что до 90% рубцовых МО являются некультивируемыми и неизвестными ранее. К настоящему времени с использованием современных молекулярно-генетических методов проведены многосторонние детальные исследования микробиоты рубца жвачных, в том числе и с участием российских ученых. Цель данной работы – систематизировать новые данные о микробных сообществах рубца жвачных животных, полученные с использованием молекулярно-генетических методов. Основные разделы: описание микробиоты рубца жвачных животных, основные принципы современных методов, использование этих методов, результаты исследования микробиома рубца овец. Особое внимание уделяется работам российских учёных, впервые разработавшим нормативы содержания микроорганизмов в рубце жвачных с учётом возраста и физиологического состояния животных. Проанализированы данные о влиянии стресса на микробиоту рубца и способы её защиты с использованием адаптогенных, антиоксидантных биологически активных веществ и пробиотиков. Сделано заключение о необходимости разработки нормативов содержания микроорганизмов в рубце овец с учётом условий содержания, кормовой базы и породных особенностей животных.

Ключевые слова: жвачные животные, овцы, рубец, микробиота, молекулярно-генетические методы, РТ-ПЦР, T-RFLP, NGS

Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 4: 5-26

Введение

Здоровье и продуктивность жвачных животных (ЖЖ) напрямую связаны с состоянием рубцового и кишечного пищеварения. Микробиота рубца и кишечника является существенным фактором формирования неспецифической резистентности организма, при этом самое мощное влияние на неё оказывают условия питания. Корм в рубце переваривается под действием микроорганизмов (МО) – бактерий, простейших и грибов. Под действием МО в преджелудках расщепляется 95% сахаров и крахмала, 70% клетчатки (30% в толстом кишечнике) и 40-80% протеина. В рубце жвачных создана почти идеальная среда для размножения МО. Постоянно поступающая слюна содержит необходимые для их роста и развития бикарбонаты, натрий, калий, фосфаты, мочевины. Поддерживается постоянная температура (39-40⁰ С) и газовый состав. Реакция содержимого рубца у здоровых животных при сбалансированном кормлении нейтральная, слабощелочная или слабощелочная, рН обычно 6,8-7,4. Значительные отклонения рН ведут к серьезным патологиям рубцового пищеварения, вплоть до полного отмирания простейших.

Изучение микробных сообществ рубца ЖЖ, в первую очередь – крупного рогатого скота (КРС), является весьма актуальным ввиду возможности быстрой диагностики и профилактики многих патологий пищеварительной системы, связанных с неправильным кормлением, что, как правило, сопровождается развитием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (Хамидуллин и др., 2016). Микробиоценоз рубца – сложная симбиотическая экосистема, членами которой являются сотни видов бактерий, грибов, метаногенных архей и в настоящее время изучена лишь малая их часть (Weimer et al., 2010; Ильина, 2013; Лаптев и др., 2016). Рубец, как важный пищеварительный орган жвачных животных, содержит огромное количество микроорганизмов (МО), а на состав микробных популяций рубца в основном влияет рацион (Henderson et al., 2015).

Рубец обеспечивает относительно стабильную среду обитания для МО – бактерий, простейших и грибов, среди которых доминируют бактерии (Pitta et al., 2016a). Микробы рубца влияют на ферментативные процессы, связанные с липидным обменом и накоплением азота, что непосредственно влияет на пищеварение и ряд производственных признаков, таких как эффективность использования корма, удой молока и его состав (Schären et al., 2018). На ферментативные процессы в рубце влияет видовой состав бактерий (Ley et al., 2008; Singh et al., 2012). О влиянии микробиоты рубца на жирность молока имеется сравнительно мало данных, но известно, что у свиней содержание жира, как важного фактора качества и вкуса мяса, положительно коррелирует с содержанием *Firmicutes* и отрицательно – с *Bacteroidetes* в кишечнике (Guo, 2009).

Чтобы ферментировать и преобразовывать корм в летучие жирные кислоты (ЛЖК), белки и витамины, жвачные животные критически зависят от микробных сообществ (бактерии, археи, грибы и простейшие), обитающих в рубце. Первичные производимые ЛЖК (ацетат, пропионат и бутират) вносят примерно 80% от общих энергетических потребностей хозяев (Zeineldin et al., 2018). Основные биологические механизмы, регулирующие уровень продуктивности, зависят от ряда внутренних и внешних факторов, включая возраст, пол, генотип и рацион питания, которые влияют на структуру и функцию микробов рубца (Henderson et al., 2015). Концентрация ЛЖК в рубце существенно зависит от условий кормления животного (Li and Guan, 2017). Выявлена связь между микробиомом рубца и вариабельностью эффективности использования питательных веществ корма (Shabat et al., 2016; McGovern et al., 2018).

Микроорганизмы рубца играют важную роль в переваривании белков, углеводов, крахмала, сахаров и жиров, обеспечивая организм хозяина энергией и протеином за счёт продукции ЛЖК и микробиального белка в процессе анаэробного брожения (Jiang et al., 2015). Поэтому оптимизация состава рубцовых популяций МО у жвачных животных становится в последнее время одним из приоритетных направлений исследований. В подавляющем большинстве – это исследования рубцовой микробиоты у КРС, но в менее многочисленных работах оценивалось общее количество бактерий в рубце овец.

1. Состав микробиоты рубца у жвачных животных

1.1. Общая характеристика микробиоты рубца жвачных животных

Бактериальная масса в рубце ЖЖ составляет около 10% сухого вещества содержимого рубца. В 1 мл рубцовой жидкости содержится около 10^{11} бактерий, 10^3 - 10^7 грибов, 10^9 архей и 10^6 простейших. Их взаимодействие и совместное обитание в этой многокомпонентной системе связано с многообразием источников растительной клетчатки и разнообразием спектра продуцируемых МО целлюлаз и других ферментов. Бактериальное сообщество рубца представлено *амилолитическими* (используют крахмал и мальтозу, расщепляя их до янтарной, уксусной и муравьиной кислот), *протеолитическими* (расщепляют белки до пептидов и аминокислот), *липолитическими* (расщепляют жиры до глицерина и жирных кислот), *целлюлозолитическими* (расщепляют сложные углеводы до ди- и моносахаров) и *молочнокислыми* бактериями (расщепляют крахмал и сахар до молочной кислоты). К бактериям относятся клостридии, селемонады, бактериоиды, уреолитические бактерии. Многие бактерии действуют избирательно, ввиду чего на один и тот же субстрат различные виды бактерий могут оказывать одновременное воздействие (Ковзов и др., 2003; Хамидуллин и др., 2016).

Расщепляя растительные корма, бактерии синтезируют вещества собственного тела – аминокислоты, гликоген, липиды, витамины группы В (тиамин, рибофлавин, никотиновую кислоту, фолиевую кислоту, биотин, цианокобаламин и др.), а также жирорастворимый витамин К (филохинон). Поэтому взрослые жвачные при сбалансированном кормлении не нуждаются в добавлении этих витаминов в рацион, но молодняк, у которого рубец еще не функционирует, должен получать их с кормом.

В рубце также обитают гнилостные, маслянокислые микробы, энтерококки, стафилококки, диплококки, псевдомонасы, бактериофаги. Видовой состав микробиома изменяется при смене рационов, что необходимо учитывать при включении в рацион нового корма (Грушкин, Шевелев, 2008).

Простейшие в рубце представлены реснитчатыми и равно-реснитчатыми *инфузориями* (около 50 видов). Заселение простейшими преджелудков при потреблении грубого корма происходит постепенно. У ягнят реснитчатые инфузории появляются на 8-12-й день жизни, у телят – позднее. Количество и видовой состав инфузорий в содержимом рубца зависит от условий питания животных. Инфузории измельчают и разрыхляют частицы корма, ферментируют сахара, накапливают полисахариды, участвуют в азотистом обмене. В них содержится около 20% азота, тогда как в бактериях – 12%. Они синтезируют незаменимые аминокислоты и белок, имеющий высокую биологическую ценность. Процесс расщепления крахмала инфузориями идёт с образованием уксусной, пропионовой и масляной кислот, которые адсорбируются стенкой рубца быстрее, чем молочная кислота, продуцируемая бактериями с большой скоростью (Чёрная, 2016).

Грибки рубца (дрожжи, плесени, актиномицеты (*Absidia corumbifera*, *Ab. Ramose*, *Mucor pusillus*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus fumigates*) обладают целлюлозолитической активностью, сбраживают сахара, синтезируют гликоген, аминокислоты, витамины группы В. Концентрация грибов в рубцовой жидкости достигает 10^3 - 10^7 в 1 мл (Лаптев и др., 2010).

1.2. Основные представители микробиоты рубца в норме.

Состав микрофлоры рубца связан с условиями питания (Yáñez-Ruiz et al., 2015). Экосистема рубца взрослого животного довольно устойчива к её модификации при использовании различных рационов с целью повышения продуктивности и здоровья животных. Колонизация рубца микроорганизмами, происходящая вскоре после рождения, способна привести к долгосрочным последствиям во взрослой жизни животного. На развитие рубцового эпителия и мышечного слоя по-разному влияет характер рациона, и особое внимание следует уделять переходу от жидкого (молочного) корма к грубому. Сразу после рождения рубец быстро колонизируется всеми типами МО, и на характер колонизации влияют такие факторы, как наличие/отсутствие взрослых животных, первый грубый корм, включение в рацион добавок, которые не допускают или, наоборот, способствуют заселению некоторых МО, или прямая инокуляция желательных штаммов. Структура микробного сообщества и активность рубца у ЖЖ после отъема тесно связаны с молочным периодом развития. Различия в адаптационных способностях из-за различного опыта ранней жизни логично приводят к идее микробного программирования для осуществления максимальной продуктивности животного. Для воплощения этой идеи в практику необходима обширная база данных о составе микробиома рубца животных, находящихся как в условиях максимально эффективной продуктивности, так и в неблагоприятных условиях.

В 2016 г. ООО «Биотроф» впервые в мире были разработаны первые варианты нормативов содержания микроорганизмов в рубце крупного рогатого скота с учётом возраста и физиологического состояния животных (рис. 1). Сегодня специалисты используют эти нормы для оценки микробиома рубца коров и коррекции дисбиотических нарушений (Лаптев и др., 2020).

Целлюлозолитические бактерии (ЦЛБ) – доминирующие бактерии рубца жвачных животных, расщепляющие клетчатку растительных кормов (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, лигнин) до летучих жирных кислот. ЦЛБ в присутствии достаточного уровня аммиака быстро размножаются. Кормовая мочевины может обеспечивать достаточный уровень аммиака и способствовать эффективному использованию волокнистого грубого корма. Если, однако, рН рубца

снизится приблизительно до 6,0, то размножение ЦЛБ и их работа замедляются. При pH ниже 5,6 эти процессы прекращаются совсем, т.е. присутствие компонентов корма, повышающих кислотность, ингибирует переваривание грубых кормов (Ерсков, Рил, 2003). ЦЛБ, простейшие и грибы играют важную роль в ферментативном разложении целлюлозы и гемицеллюлозы на мелкие молекулы, которые могут быть поглощены рубцом (Zebeli et al., 2012) (табл. 1).

Амилолитические бактерии (*Bacteriodes ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylophilica*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, в основном стрептококки), представлены в рубце следующей по численности группой. Они находятся в рубце при даче различных рационов, их количество особенно возрастает при использовании зерновых, крахмалистых и сахаристых кормов, они ферментируют крахмал концентрированных кормов до формиата, ацетата, пропионата, лактата, сукцината, содержание которых в рубце достигает 2-17%. *Streptococcus bovis*, например, производит ацетат и этиловый спирт, если размножается медленно, но при быстром размножении производит лактат. Этот вид более кислотоустойчив, чем большинство МО рубца. В нормальных условиях это не очень проявляется, но при накоплении лактата, превышающем возможности буферной системы, *Str. bovis* может стать доминирующим видом (Ерсков, Рил, 2003).

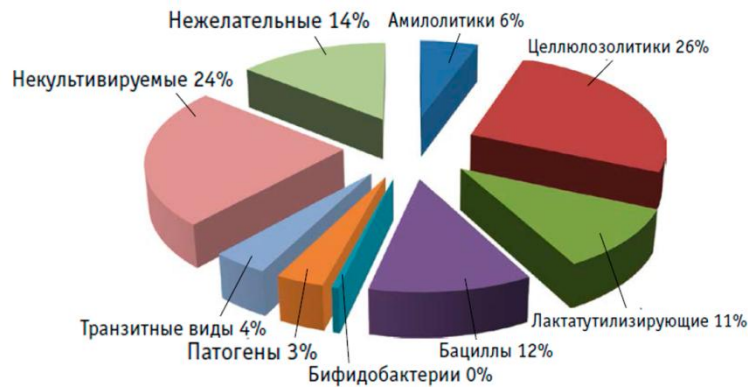


Рис. 1. Среднее содержание микроорганизмов в рубце клинически здоровой коровы (Лантев и др., 2018).

Таблица 1. Основные целлюлозолитические микроорганизмы, присутствующие в рубце жвачных (адатировано по: Йылдырым, 2019)

Микроорганизмы	Конечные продукты метаболизма	Норма
Бактерии:		
<i>Lachnospira multiparus</i>	Ацетат, формиат, лактат, H ₂ , CO ₂	Мин. 20% для дойных коров (Иванов, 2017);
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Сукцинат, ацетат, формиат	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Ацетат, формиат, ацетат, бутират, H ₂ , CO ₂	
<i>Ruminococci albus</i>	Ацетат, формиат, H ₂ , CO ₂	
<i>Clostridium lochheadii</i>	Ацетат, формиат, бутират, H ₂ , CO ₂	
Микромицеты (грибы)		
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Лактат, формиат, ацетат, сукцинат, этанол	До 25% в период сухостоя (Романов и др., 2019)
<i>Piromyces communis</i>	Целлюлоза, олигосахариды	
<i>Orpinomyces joyonii</i>	Глюкоза	
Простейшие:		
<i>Enoploplastron triloricastrum</i> , <i>Eudiplodinium maggii</i> , <i>Diploplastron affine</i> , <i>Epidinium ecaudatum</i> , <i>Diplodinium monacanthum</i> , <i>D. pentacanthum</i> .	Сахара	

Липолитические бактерии (*Anaerovibrio lipolytica*, продукты – ацетат, пропионат), протеолитические простейшие (*Entodinium caudatum*, *Eudiplodinium medium* – метаболиты – аммиак, ЛЖК), метаногенные археи (*Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile* – биосинтез метана из водорода и углекислого газа, формиата) – группы МО, также выполняющие особые функции в рубце (Йылдырым, 2019).

Лактат-утилизирующие бактерии (ЛЖК - синтезирующие МО – *Selenomonas lactilytica*, *Megasphaera elsdenii*) ферментируют молочную кислоту, образуемую бактероидами и молочнокислыми бактериями (а также другие органические кислоты) до летучих жирных кислот (ацетат, сукцинат, пропионат, бутират, валерат, а также H_2 , CO_2), используемых организмом в метаболических процессах. Норма содержания в рубце дойных коров – менее 3% (Иванов, 2017).

К бактериям – антагонистам патогенов и иммуномодуляторов относятся бифидобактерии и бациллы. *Бифидобактерии* (*Bifidobacteriales*) в пищеварительном тракте проявляют антимикробную, иммуномодулирующую активность, осуществляют синтез витаминов, некоторых незаменимых аминокислот. Норма содержания в рубце дойных и сухостойных коров - не менее 0,5%. *Бациллы* (*Bacillaceae*) в рубце ЖК проявляют антимикробную, иммуномодулирующую, протеолитическую активность, ферментативную активность в отношении углеводов кормов. Семейство *Bacillaceae* может быть представлено несколькими родами: *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Geobacillus sp.*, *Alcalibacillus sp.*, и др. Норма содержания в рубце дойных и сухостойных коров – не менее 7% и 10% соответственно (Романов и др., 2019).

“*Нежелательная*” микрофлора, условно-патогенные микроорганизмы. *Лактобактерии* в рубце ЖК ферментируют моносахара до молочной кислоты и могут приводить к снижению pH в рубце, поэтому являются нежелательными. Суммарная доля лактобацилл в рубце дойных коров не должна превышать 2% (Иванов, 2017).

Энтеробактерии представляют собой широкую группу МО, многие из которых могут являться возбудителями гастроэнтеритов, эндометритов, маститов. В основном представлены группой бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Суммарная доля в рубце дойных коров не должна превышать 10% (Иванов, 2017).

Актиномицеты - нежелательные МО рубца ЖК, поскольку могут являться возбудителями актиномикозов, а резкое возрастание их доли может свидетельствовать о дисбиотических нарушениях. Суммарная доля в рубце коров не должна превышать 10% (Романов и др., 2019).

Патогенные виды МО, доминирующие в содержимом рубца – это микоплазмы, трепонемы, стрептококки. *Микоплазмы* – патогены, общие для человека и животных. Данные организмы способны вызывать хронические инфекционные болезни, поражения верхних дыхательных путей, серозно-катаральные воспаления легких, серозных покровов, кератоконъюнктивиты, а также артриты у молодняка. *Трепонемы* – патогенные МО, возбудители ряда опасных инфекций человека и животных. Способны вызывать опасные трепонемозы человека и животных – инфекции, передающиеся половым путем. *Стрептококки* – патогенные МО, участники гнойно-воспалительных процессов в организме животных. Паразитируют на поверхностях кожи и слизистых оболочек животного, вызывая различные повреждения и травмы слизистых покровов.

1.3. Влияние стресса и защита микробиоты от негативных факторов

Резкие изменения в желудочно-кишечном тракте в процессе переваривания и всасывания питательных веществ корма могут нанести ущерб здоровью и продуктивности животных. Поэтому нормальное физиологическое состояние кишечника имеет большое значение для организма животного. ЖКТ очень чувствителен к воздействию внешних стресс-факторов, таких как тепловые нагрузки, отъём и транспортировка. Стресс может влиять на динамику развития кишечного барьера, повышая проницаемость стенки кишечника. Микробиота кишечника может быть вовлечена в различные состояния, связанные со стрессом, включая тревогу, депрессию, синдром раздражённой толстой кишки.

У взрослых крыс, подвергшихся депрессивному воздействию в период раннего развития, выявляли менее разнообразную микробиоту в сравнении с животными, выращенными без стресса (O'Mahony et al., 2008). Обеднённый состав микробиоты ассоциировался с повышенной реакцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и повышением провоспалительных цитокинов. В другом эксперименте у мышей, подвергавшиеся хроническому стрессу в течение 5 недель, развивалось депрессивное состояние, которое сопровождалось снижением количества лактобактерий (Marin et al., 2017).

В настоящее время активно создаются специализированные и функциональные пищевые продукты, обогащённые биологически активными веществами (БАВ) адаптогенного характера. Многие из них позиционируются в качестве средств, способных повышать устойчивость организма животного к вредным физическим и токсическим факторам среды, а также проявлять иммуномодулирующую и противомикробную активность. К последним главным образом относятся препараты пробиотического ряда и адаптогены. При этом влияние большинства таких соединений на кишечную микробиоту неизвестно.

Менее разнообразная микробиота ЖКТ ассоциируется с повышенной реакцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, повышением провоспалительных цитокинов, снижением стрессоустойчивости и депрессией. Обогащение диеты пребиотическими компонентами увеличивает разнообразие кишечной микробиоты. Диетические вмешательства, направленные на микробиом кишечника, включают также применение пробиотиков, которые способствуют повышенной сопротивляемости организма и обуславливают меньшую подверженность депрессии (Комарова, 2020).

Взаимодействие бактерий кишечной микробиоты и нервной системы организма-хозяина осуществляется посредством синтезируемых бактериями низкомолекулярных веществ - нейромедиаторов и гормоноподобных веществ: в первую очередь, это ацетилхолин, серотонин, норадреналин, гистамин, жирные кислоты с короткими цепями, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Секретируемые бактериями нейромедиаторы могут непосредственно действовать на нервные окончания в ЖКТ, стимулировать клетки эпителия кишечника, которые в ответ высвобождают молекулы, модулирующие нейротрансдукцию в энтеральной нервной системе, оказывая влияние на мозг и поведение животных.

Любой стресс для организма – это активизация огромного количества катаболических, окислительных реакций с образованием первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Потенцированное действие нейрорепараторов (например, солей лития) и антиоксидантов (аскорбиновой кислоты) можно рассматривать как один из путей регуляции активности процессов перекисного окисления (Остренко и др., 2016). Результаты сравнительного хемомикробиомного анализа органических солей лития показали, что аскорбат лития эффективно способствует поддержке бактерий-комменсалов положительной микробиоты, и характеризуется определёнными антибактериальными свойствами против патогенных бактерий (Остренко и др., 2019). Наиболее расположены к стрессам молодые, племенные и высокопродуктивные животные. Чувствительность к стрессам повышается при нарушениях содержания и кормления, при длительном отрицательном действии естественных климатических факторов, а также при одновременном воздействии двух или нескольких стресс-факторов. Стресс приводит к потерям живой массы и мясной продукции, изменению бактериального баланса кишечника, что в свою очередь влияет на иммунитет. Одно из последствий стресса – изменения в составе, разнообразии и количестве бактерий в кишечнике. При этом в кишечнике возрастает количество потенциально опасных бактерий, таких как клостридии.

При *гипотонии рубца* (уменьшение числа сокращений и полное прекращение моторной функции, вызванные нарушением в кормлении: резкий переход с сочного на грубый корм и наоборот) у овец отмечали значительные нарушения рубцового пищеварения, выражавшиеся в снижении активности и количества инфузорий, обеднении их видового состава на фоне общего уменьшения функциональной активности микрофлоры. Преобладание в структуре рациона зелёных кормов оказывало положительное воздействие на количественный состав инфузорий и активность

микрофлоры (Сенчук 2019). Изменения нормального биоценоза в содержимом рубца приводят к тяжёлым негативным последствиям для организма жвачных животных. Нарушение пищеварения в рубце ведёт к серьёзным патологиям обмена веществ из-за отклонений в количественном и качественном соотношении ЛЖК (Stein 2006).

С превентивной целью для сохранения здоровья и стимуляции роста, развития животных и для получения экологически безопасной и качественной продукции целесообразно применять пробиотические препараты. Бактериальные клетки, содержащиеся в пробиотике, являются биокатализаторами многих жизненно важных процессов в пищеварительном тракте (Ноздрин, 2011). Это послужило теоретической основой разработки способов повышения продуктивности полигастричных животных и профилактики незаразных патологий при помощи коррекции видового состава рубцовой микрофлоры с использованием пробиотиков (Миронова, 2015).

В последние годы созданы многочисленные средства широкого спектра действия для восстановления численности и улучшения качественного состава микрофлоры рубца. Препараты делятся на две основные группы — пробиотики и пребиотики. Пробиотики содержат непатогенные бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенной и условно патогенной микрофлоры. Пребиотики – это препараты или биологически активные добавки немикробного происхождения, стимулирующие рост и метаболическую деятельность нормальной микрофлоры рубца. Существуют также фитобиотики (антибактериальные средства растительного происхождения) и метабиотики (препараты, содержащие продукты метаболизма пробиотических МО или их структурные компоненты) (Лаптев и др., 2020). В ООО «БИОТРОФ» на основе высокоэффективных штаммов бактерий, способных хорошо приживаться в экосистеме рубца и поддерживать его баланс, была разработана группа биопрепаратов (пробиотик Целлобактерин+ - комплекс живых молочнокислых и целлюлозолитических бактерий (*Bacillus pantothenicus* №1-85), фитопробиотик Провитол, сорбент Заслон и др.). Микроорганизмы, входящие в их состав, обладают высокой ферментативной активностью и антагонистическим потенциалом против патогенов. Ввод в рационы этих кормовых добавок способствовал оптимизации микрофлоры рубца коров разного возраста – улучшалось рубцовое пищеварение, повышалась молочная продуктивность и качество молока (Лаптев и др., 2018; Романов и др., 2019).

Использование пробиотических препаратов Бацелл и Лактомикробиокол повышало концентрацию в рубцовом содержимом ЛЖК от 2,8 до 13,4 %, что может являться убедительным свидетельством повышения целлюлозлитической активности микрофлоры (Бабичева 2016). Стимулирование рубцовой микрофлоры овец пробиотиками приводило к увеличению перевариваемости безазотистых экстрактивных веществ и жира (Шайдуллин, 2014).

2. Молекулярно-биологические методы анализа микрофлоры рубца овец

2.1. *Общие положения.* Существует ряд методов изучения микробиоты рубца, среди которых: метод с использованием микроскопии, посевы на питательных средах для выведения и культивирования чистых колоний культур микроорганизмов, физико-биохимические, молекулярно-биологические и генетические методы анализа.

Изучение ранее недоступных некультивируемых бактерий и систематизация уже известных прокариот в настоящее время стало возможным в связи с развитием биоинформатики и открытием полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей из одного участка ДНК получить миллиарды точных копий, клонирования выделенных генов в бактериальных плаزمиды и методик секвенирования нуклеотидных последовательностей, полученных в достаточном для анализа количестве.

Использование методик, основанных на молекулярно-генетическом принципе, достаточно эффективно отражает численность жизнеспособных представителей микробных экосистем. Молекулярно-биологические методы позволяют изучать МО, минуя стадию культивирования. В настоящее время для изучения сложно организованных сообществ наиболее популярны метагеномные методы T-RFLP-анализ и NGS-секвенирование, которые позволяют изучить 100% МО и получить полный профиль биологического разнообразия. При этом NGS-секвенирование

предоставляет возможность выявить состав МО до видов и родов. Применение метода ПЦР позволяет дополнить и уточнить результаты, включая в себя одновременно детекцию и определение количества бактерий.

Один из используемых методов – T-RFLP метод, в частности, реализуемый лабораторией компании ООО «Биотроф» (г. Санкт-Петербург), позволяет определить нормы содержания представителей нормофлоры и патогенных микроорганизмов в рубце жвачных животных (Кряжевских, 2010; Ильина и др., 2011; Лаптев и др., 2014).

Объект анализа – ген 16S рPHK. Идеальным маркером для идентификации МО оказался ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК (*16S рPHK*). Этот ген есть в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и эукариот. Размер гена *16S рPHK* - около 1600 нуклеотидов. Он имеет как консервативные участки, одинаковые у всех прокариот, так и видоспецифичные (рис. 2; по: Lopez et al., 2003). Консервативные участки служат для первого этапа амплификации ПЦР, а видоспецифичные – для определения видов. Степень схожести видоспецифичных участков отражает эволюционное родство разных видов.

Нуклеотидные последовательности гена *6S рPHK* всех известных к настоящему времени бактерий и архей общедоступны. Выявленные последовательности сравнивают с имеющимися в базах данных и идентифицируют вид бактерии или объявляют её принадлежащей к некультивируемому виду. Появление современных технологий метагеномных исследований позволило анализировать состав микробных сообществ по гену *16S рPHK* без традиционного этапа клонирования.

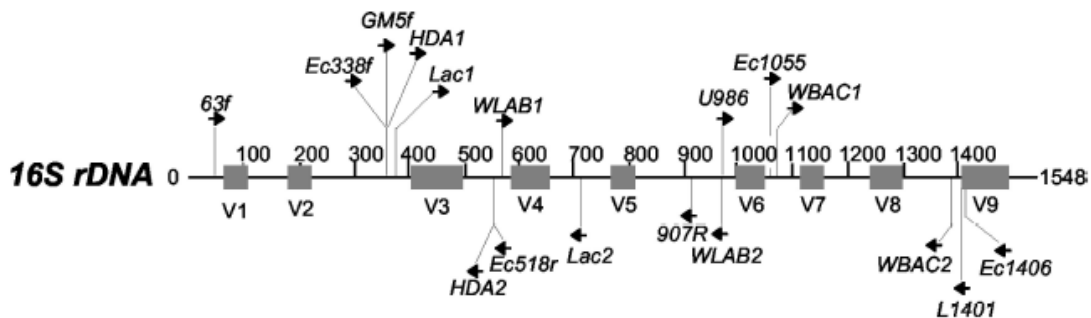


Рис. 2. Структура гена 16S рДНК *Lactobacillus plantarum* (GeneBank AJ271852) (относительное положение некоторых праймеров). Серыми блоками обозначены переменные области гена.

В настоящее время молекулярно-генетические исследования микробных сообществ основываются на использовании трёх основных методов: количественной ПЦР (ПЦР в реальном времени), T-RFLP-анализе, секвенировании нового поколения, последний из которых с применением соответствующего программного обеспечения даёт максимально возможную информацию об объекте исследования.

2.2. Метод количественной ПЦР

ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) включает в себя одновременно детекцию и количественное определение специфической последовательности в образце (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов) (Van Guilder et al., 2008). Основное отличие от классической ПЦР состоит в том, что после каждого цикла амплификации измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени. Все существующие в настоящее время системы регистрации накопления продуктов ПЦР основаны на измерении флуоресценции реакционной смеси (Ребриков, 2009). Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству нарабатываемой в ходе реакции ДНК (рис. 3; по: Jung et al., 2018; праймеры: прямой HDA1 – АСТССТАСGGGAGGCAGCAG; обратный: HDA2 – АТТАССГСГГСТГСТГГ).

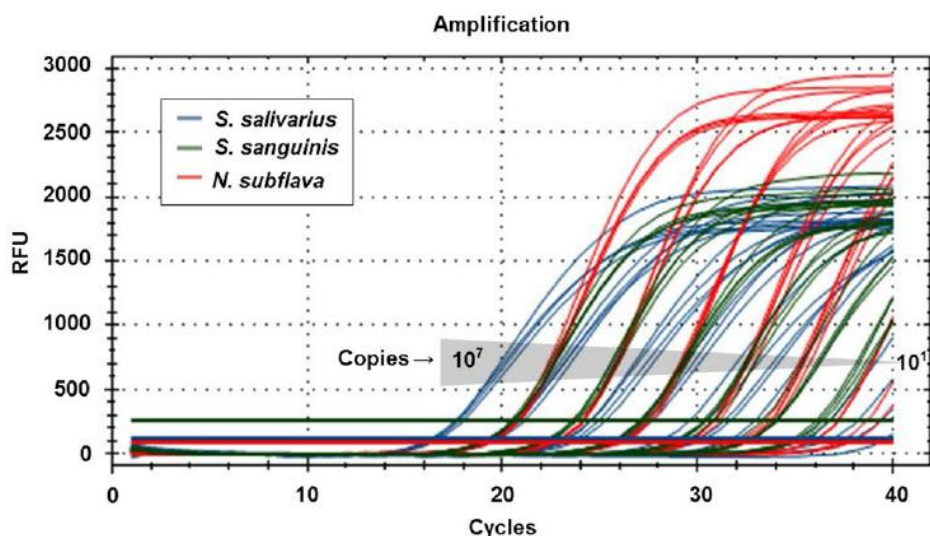


Рис. 3. Диапазон измерений с использованием синтетических генов для подтверждения аналитической чувствительности РВ-ПЦР. Все три вида бактерий были обнаружены при 10^2 – 10^7 копиях на реакцию.

РВ-ПЦР проводят с использованием детектирующего амплификатора (например, ДТ Lite-4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с помощью «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green» (ЗАО «Синтол», Россия) и универсальных праймеров на общее количество бактерий (Wang et al., 2013).

2.3. T-RFLP-анализ

Метод T-RFLP-анализа (terminal restriction fragment length polymorphism), основан на анализе варибельности консервативных участков гена *16S rPHK*. Суть метода заключается в выделении из содержимого ЖКТ тотальной бактериальной ДНК. Это один из метагеномных методов первого поколения, который позволит оценить изменения в естественных и искусственных микробных сообществах (Logue et al., 2008). Он даёт возможность изучать сложно организованные микробные сообщества, отслеживать генотипические изменения в микробиоценозе во времени и пространстве, осуществлять поиск взаимосвязи между различными МО, выявлять функционально активную часть сообщества, откликающуюся на изменение тех или иных факторов окружающей среды (Schütte et al., 2008). Амплификацию фрагментов ДНК проводят с использованием универсальных бактериальных праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты гена *16S rPHK*, присутствующего у всех МО. Использование праймеров, комплементарных консервативным участкам этого гена, позволяет амплифицировать ДНК большинства видов бактерий для дальнейшего исследования полученных образцов ДНК (Равин и др., 2015).

Методика проведения T-RFLP-анализа. Амплификацию ДНК осуществляют с помощью эубактериальных праймеров, позволяющих амплифицировать консервативный фрагмент гена *16S rPHK* (позиции 63-1492, нумерация указана для гена *16S rPHK E. Coli*), например, 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) и 1492R (TACGGHTACCTTGTTACGACTT). Праймер 63F на 5'-конце имеет метку, например, флуорофор D4 (WellRed). Флуоресцентно меченные ампликоны гена *16S rPHK* очищают, с помощью флуориметра определяют концентрацию ампликонов в растворе. Рестриктию ампликонов проводят с использованием рестриктаз, имеющих сайты в варибельных областях гена *16S rPHK*, например, *HaeIII*, *HhaI* и *MspI*. Проводят анализ фрагментов рестрикции. Погрешность наиболее часто используемого прибора SEQ 8000 (Beckman Coulter, США), составляет не более 5%. Вычисление размеров пиков и их площади проводят в соответствующих программах, таких как Fragment Analysis (Beckman Coulter, США). Это позволяет выделить подтипы (филотипы) и определить их процентное содержание в микробном сообществе

(рис. 4). Принадлежность бактерий к определённой филогенетической группе определяют с использованием программы Fragment Sorter (ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php).

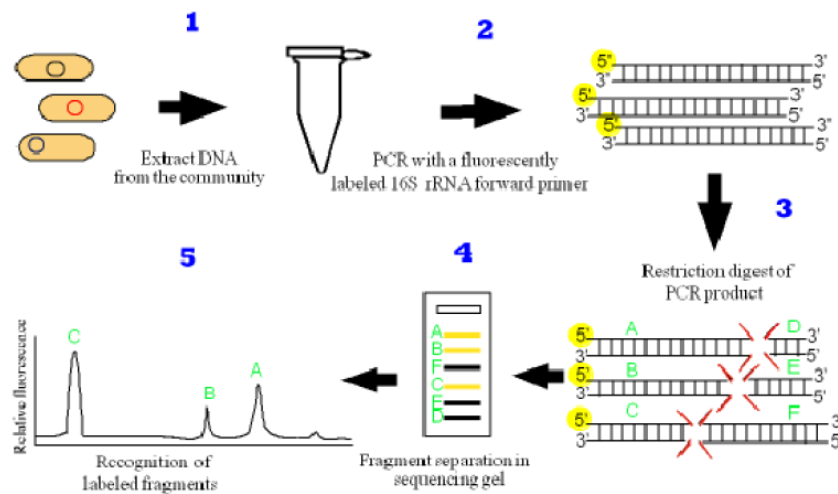


Рис. 4. Принципиальная схема T-RFLP метода: определение сообществ, кодирующих ген 16S рРНК (модифицировано по: Stres, 2006).

NGS-секвенирование

Понимание состава и функционирования микробиома в последние годы мощно продвинулось вперед благодаря применению передовых технологий NGS (*next generation sequencing* - секвенирования следующего поколения) для метагеномного анализа (Quince et al., 2017). Популярные платформы NGS, такие как MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore) в сочетании с метагеномными подходами, которые либо нацелены на конкретные гены (16S рРНК), либо на весь бактериальный геном, дают представление о сложных микробных популяциях в рубце, которые трудно идентифицировать с помощью культурально-зависимых подходов (Gu et al., 2019). Разработка удобного программного обеспечения позволяет исследователям получать большие объёмы биологических данных. Например, CowPI – инструмент функционального прогнозирования, может определить функциональный потенциал различных профилей микробиома рубца, используя данные 16S рРНК (Wilkinson et al., 2018).

В основе применения NGS для изучения разнообразия микробиоценозов также лежат методы ПЦР-амплификации и секвенирования последовательностей генов 16S рРНК. Используют праймеры для секвенирования, комплементарные консервативным участкам гена 16S рРНК для получения более коротких внутренних последовательностей гипервариабельных участков; по результатам их секвенирования МО может быть отнесен к тому или иному виду (Fadrosh et al., 2014). Одним из основных этапов метагеномного секвенирования является подготовка образца для исследования - превращение ДНК в стандартную библиотеку фрагментов ДНК, подходящую для загрузки в секвенатор. Основным шагом при подготовке образца является получение специфических фрагментов, в дальнейшем позволяющих определить видовую и/или родовую принадлежность микроорганизма (Красненко и др., 2017).

Как и в T-RFLP-методе, амплификацию для последующего проведения NGS осуществляют с использованием известных зубактериальных праймеров для консервативных зон гена 16S рРНК, например, 343F (CTCCTACGRRSGCAGCAG) – 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT), фланкирующих вариабельный участок V3V4. Выполнение метагеномного секвенирования образцов на каждой платформе имеет свои особенности. Все процессы секвенирования на платформе Illumina проходят в проточной ячейке, покрытой одноцепочечными нуклеотидами, комплементарными последовательности линкера, прикрепляемого во время приготовления библиотек. Прикрепленные к проточной ячейке фрагменты удлиняются при помощи ПЦР, при этом полимеразы начинают работать только в том случае, когда свободный конец связанного фрагмента

гибридуется с комплементарным олигонуклеотидом (HP10, HP11, рис. 5; по: Fadrosh et al., 2014) на поверхности ячейки. Вследствие этого происходит рост числа копий единичной молекулы в определённой части ячейки. Образуются миллионы кластеров, каждый из которых представляет собой скопление определённого фрагмента. После этого происходит распознавание последовательности – построение комплементарной цепи с использованием меченых нуклеотидов и снятие сигнала после каждого шага удлинения.

Метагеномное секвенирование на геномном секвенаторе типа MiSeq (Illumina, Inc., США) позволяет получать разнонаправленные последовательности размером около 300 нт. Химерные последовательности исключают из анализа с помощью соответствующей программы USEARCH 7. <<http://drive5.com/usearch/>>. Обработку полученных ридов 2×300 нт проводят с помощью биоинформационной платформы CLC Bio GW 7. (Qiagen, Нидерланды), со стадиями перекрытия, фильтрации по качеству, триммирования (исключения) последовательностей праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводят с применением программы RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Погрешность прибора MiSeq составляет 5%. Последовательности сравнивают с компьютерной базой данных также с использованием алгоритма BLAST (Йылдырым, 2018).

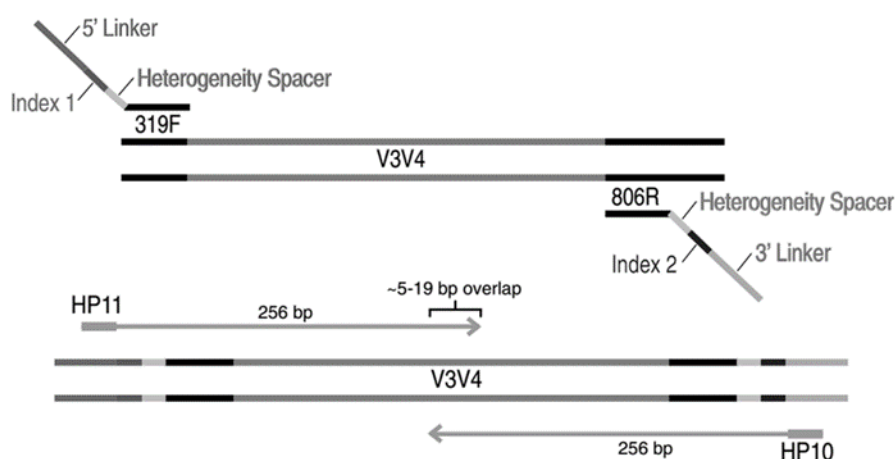


Рис. 5. Двойная индикаторная стратегия ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с гетерогенными спейсерными праймерами для секвенирования на платформе Illumina MiSeq. А) ПЦР праймеры, нацеленные на гипервариабельные области V3V4 гена 16S рРНК, содержат гетерогенную спейсерную область и линкерную последовательность, оптимизированную для секвенирования на платформе Illumina MiSeq. Это позволяет проводить секвенирование с использованием стандартных праймеров для секвенирования - HP10 и HP11.

3. Исследование микробиоты овец и коз с использованием молекулярно-генетических методов

Микробиота рубца подвержена влиянию многих факторов, таких как рацион, вид животного, географический регион. В мире насчитывается около 1,2 миллиарда овец, выращиваемых для производства мяса, молока и шерсти. Овцеводство – важное с/х направление на международном уровне, что подтверждается постоянным ежегодным ростом этого сектора (Pulina et al., 2018). В настоящее время большинство исследований по изучению взаимосвязей между эффективностью конверсии корма и микробиомом рубца, было проведено на КРС; овцы менее дорогие, требуют меньше корма, быстрее достигают зрелости и более управляемы, чем КРС, что делает этот вид практичной и экономичной моделью для исследований физиологии пищеварения у жвачных.

Питание – основной фактор, влияющий на микробное разнообразие рубца, состояние здоровья и продуктивность жвачных животных. Влияние кормового рациона на структуру микробных сообществ рубца исследовалось у яков (Xue et al., 2016), голштинских молочных коров (Pitta et al., 2016), мехшанских буйволов (Pitta et al., 2014), тибетских овец (Liu et al., 2019), северных оленей (Ильина и др., 2017; 2020), танских овец (Fu et al., 2020) и коз (Liu et al., 2015). Микробиота рубца может быть сформирована под влиянием кормовых, адаптивных анатомических и физиологических факторов и развиваться в зависимости от особенностей применяемых технологий кормления у разных видов животных.

Микробиота разных разделов ЖКТ овец. Китайско-монгольские овцы выращиваются для производства шерсти и мяса. При исследовании микробиоты их ЖКТ с использованием платформы Illumina MiSeq было обнаружено высокое разнообразие микробиома рубца у этих овец: у них доминировали основные типы (филы) бактерий *Firmicutes* (44,62%), *Bacteroidetes* (38,49%) и *Proteobacteria* (4,11%) (Zeng et al. 2017). Основные выявленные роды – *Prevotella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Treponema* и *Desulfovibrio*. Филогенетическое исследование сообществ показало, что в ЖКТ овец наиболее активен метаболический путь, связанный с углеводным обменом. Целлюлозолитические метаболические пути были более развиты в желудке и толстом кишечнике. Все три отдела ЖКТ характеризовались высоким разнообразием микробиома, из которого лишь 76 ОТЕ (операционных таксономических единиц) (ОТЕ – единица генетического разнообразия, генетическое сходство выше 97%) были общими для всех отделов кишечника, подавляющее же большинство ОТЕ было уникально для каждого фрагмента ЖКТ (рис. 6).

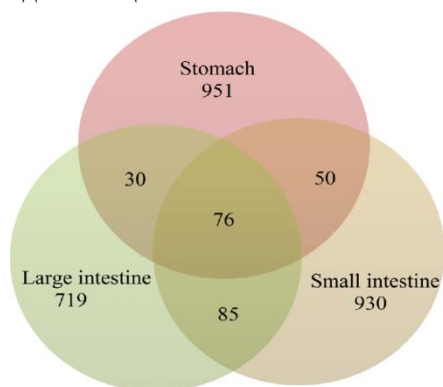


Рис. 6. Количество операционных таксономических единиц (ОТЕ) между микробиомом желудка, тонкого и толстого кишечника – диаграмма Венна (по: Zeng et al., 2017).

Влияние рациона на состав микробиома рубца у овец

Внутри микробиома рубца доминируют бактерии, которые вносят наибольший вклад в переваривание и превращение кормов в ЛЖК и микробный белок. Бактериальное сообщество рубца зависит от состава рациона, типов кормов, возраста животных и стратегии кормления. Вариации этих факторов оказывают сильное влияние на метаболизм рубца, что может повлиять как на продуктивность, так и на здоровье ЖЖ. В современном интенсивном овцеводстве обычно применяют общий смешанный рацион, содержащий высокую долю зерна, для улучшения потребления энергии и увеличения суточного прироста массы тела. Для того чтобы уменьшить отходы кормов и затраты на рабочую силу, а также облегчить управление кормлением на откормочных площадях, на некоторых фермах используется гранулированный общий смешанный рацион. Гранулирование положительно сказывается на потреблении корма, однако, мало что известно о влиянии гранулированного корма на состав и функцию микробиома рубца овец.

Было проведено сравнение откормочных ягнят на разных рационах по составу бактериального сообщества рубца, ферментации рубца и показателей роста (для NGS амплифицировали V3V4 регион бактериального гена *16S rRNA*). Первая группа получала низкозерновой негранулированный корм (30% концентратов, CON), 2-я группа – высокозерновой не гранулированный (70% концентратов, HG), а 3-я группа – высокозерновой корм в гранулированной форме (HP). Животные группы HG показали значительно более высокий

среднесуточный прирост массы тела при сравнении с первой группой, разницы между HG и HP группами не было, но pH рубцовой жидкости у овец группы HP был ниже, чем у HG, а концентрация лактата – выше. Во всех группах преобладали типы (фикумы) *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Представителей филума целлюлозолитических *Fibrobacteres* было меньше у HP по сравнению с HG. Среди преобладающих таксономических единиц доля некоторых, принадлежащих к роду *Prevotella* (из филума *Bacteroidetes*), увеличилась в группе HG и резко снизилась у HP (рис. 7). Функциональный профиль микробиома рубца выявил обогащение пентозофосфатного пути только в группе HP – гранулирование высокозернового общего рациона изменяло ферментацию рубца и усиливало утилизацию сахара микробиотой рубца (Trabi et al., 2019)

Аналогичный эксперимент по исследованию микробиоты рубца был проведен на шестимесячных овцах (Chinese Tan), находившихся в течение 3-х мес. при разных условиях кормления - пастбищный выпас и содержание на откормочном рационе с высоким содержанием концентратов). Анализ NGS (16S рПНК, 3V4V) выявил относительно высокую вариабельность между отдельными животными и значительные межгрупповые различия по некоторым показателям. Микробиом рубца овец на выпасе был разнообразнее, что было показано в аналогичной работе на козах (Grilli et al., 2016). Доминирующими из 17 филумов бактерий, выявленных в рубце обеих групп (Fu et al., 2020), были *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Их процентное соотношение у пастбищной и откормочной групп составляло по *Bacteroidetes* – 51 и 39; *Firmicutes* - 28 и 14; *Proteobacteria* – 16 и 46% соответственно. Основные различия наблюдали в последних двух филумах, что указывает на сильное влияние рациона на характер бактериального доминирования. Кроме этих трёх были достаточно представлены филумы *Spirochaetae*, *Fibrobacteria* и *Actinobacteria*, хотя численность отдельных видов в них различалась (Pitta et al., 2016a). *Proteobacteria*, как важный филум в метаболизме рубца, доминировал у животных, получающих крахмал-содержащие диеты (Pitta et al., 2016b), они же были наиболее распространённым филумом у овец, получавших рацион с высоким содержанием концентратов. В группе выпаса содержание *Fibrobacteres* было выше, чем в группе с концентратным рационом, как и в работе (Trabi et al., 2019). Представители *Fibrobacteres* тесно связаны с деградацией целлюлозы и лигнина. У коз, получавших рацион с высоким содержанием зерна (Liu et al., 2015), увеличивалась в рубце доля рода *Succinivibrionaceae* и уменьшалось содержание неклассифицированных *Rikenellaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Ruminococcaceae*, *Fibrobacter* и *Lachnospiraceae*, связанных с деградацией целлюлозы и гемицеллюлозы (Biddle et al., 2013; Li et al., 2014). У овец наблюдали то же самое (Fu et al., 2020): *Succinivibrionaceae*, участвующих в деградации крахмала, было больше в рубце овец концентратного рациона.

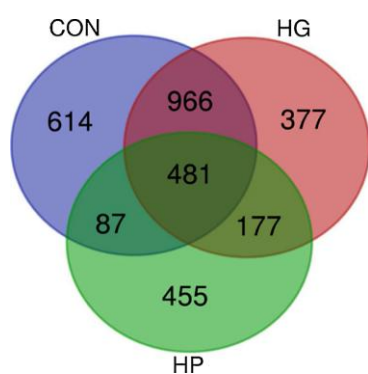


Рис. 7. Разнообразие в операционных таксономических единицах (ОТЕ, диаграмма Венна) микробиома рубца ягнят, получавших низкозерновой рацион (CON), негранулированный (HG) или гранулированный (HP) высокозерновой рацион. (по: Trabi et al., 2019). Для трех групп общие 481 ОТЕ, и по 614, 377 и 455 – исключительные ОТЕ.

Исследование влияния различных соотношений концентрированного и фуражного корма (от 0:100 до 60:40) на ростовые показатели, ферментацию и микробиом рубца тибетских овец, содержащихся в загоне, показало, что повышение доли концентрата от 0 до 60% оказывало положительное влияние на потребление сухого вещества, массу тела, приросты живой массы и коэффициент конверсии корма. При снижении молярного соотношения ацетата к пропионату

повышалась концентрация азота, пропионата и валерата. Повышение содержания концентратов в рационе способствовало росту в рубцовой микробиоте доли филума *Bacteroidetes* и рода *Prevotella*: но при этом уменьшилось разнообразие бактерий рубца и изменилось количество некоторых основных бактерий рубцового содержимого (NGS, 16S рPHK, V4) (Liu et al., 2019).

География обитания также оказывает влияние на состав микрофлоры рубца. Микробиота рубца высокогорных жвачных настроена на пути продуцирования ЛЖК, а на низких высотах – на путь метаногенеза по сравнению с равнинными; у высокогорных ЖЖ выбросы метана были ниже, а коэффициент конверсии корма - выше (Zhang et al., 2016).

Экологическая адаптация жвачных тесно связана с рубцовой микробиотой, эта адаптация способствует увеличению разнообразия потребляемых растений; при введении раствора танина в рубец у овец, в отличие от коз, значительно снижался уровень потребления корма (Narjisse, Hansali, 1985). Способность коз переносить дубильные вещества была связана с присутствием в рубце бактерий, разрушающих дубильные вещества (*Selenomonas ruminantium*) (Odenyo et al., 1998). Тибетские козы и овцы, пасущиеся на одном и том же высокогорном пастбище, отличались по показателям роста, иммунным реакциям и пищевым предпочтениям: в рубце коз было увеличено количество бактерий, расщепляющих сырой протеин и продуцирующих ЛЖК (*Sacharofermentans* и *Lachnospiraceae*). В рубце овец было больше количество грибов и простейших, разрушающих клетчатку (*Neocallimastigaceae* и *Metadinium*). Уровень ЛЖК соответствовал различиям в составе микробиоты рубца коз и овец (NGS, амплифицировали V3V4 регион бактериальной 16S rRNA гена, ITS rRNA гена грибов, вариабельный фрагмент гена 18S rRNA простейших). Разницу в микробиоме рубца коз и овец можно объяснить пищевыми предпочтениями – в смешанных пастбищных условиях козы выбирают траву с высоким содержанием сырого протеина, что хорошо для роста, тогда как овцы предпочитают растения с высоким уровнем труднопереваримого лигнина (Langda et al., 2020). *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Neocallimastigomycota*, и *Ciliophora* были самыми распространенными бактериями, грибами и простейшими в рубце ЖЖ. Целлюлозолитических грибов рода *Cyllumyces* было больше в рубце овец, тогда как ЛЖК-продуцирующих бактерий (*Sacharofermentans* и *Lachnospiraceae*) - в рубце коз: микробиота рубца коз лучше адаптирована к условиям высокогорного выпаса.

Микробиота рубца коз обычно становится стабильной примерно в шестимесячном возрасте (Guo, 2015), однако очень мало исследований по динамике возрастного развития микробных сообществ рубца у овец. NGS-анализ образцов рубцовой жидкости тибетских ягнят на протяжении первого года жизни показал, что доля филума *Bacteroidetes* выросла с 18,9 до 53,9%, а доля *Proteobacteria* снизилась с 40,8 до 5,9%. Основные изменения в бактериальной колонизации происходили в результате изменения рациона питания до 28-дневного возраста, после чего популяция МО рубца стабилизировалась. Для колонизации рубца микробным сообществом с увеличением возраста важна пищевая среда; была показана роль молозива в формировании и преемственности микробного сообщества рубца в течение первого года жизни - способности лактобацилл значительно регулировать микробную структуру рубца. Это исследование даёт новое понимание колонизации бактериальных сообществ у ягнят, которое может быть полезно при разработке стратегий развития микробиоты рубца для улучшения функционального развития животных (Wang L. et al., 2019).

Для понимания процессов питания и метаболизма важное значение имеет изучение микробиома и метаболома рубца на разных стадиях развития животного. В связи с этим возникают следующие вопросы: различаются ли микробиомы ягнят и взрослых овец; как с возрастом меняются метаболиты рубца (включая ЛЖК); есть ли корреляция между микробиомом и метаболомом или ЛЖК.

Тесная взаимосвязь между микробным составом и метаболитами, различная потребность в питании для овец разных возрастов была показана на примере тибетских овец (Li et al., 2020). NGS-анализ микробиоты рубца (V3V4), метаболитов и ЛЖК у ягнят в возрасте 1 мес. и тибетских овец в возрасте 6 мес. показал, что *Bacteroidetes* и *Spirochaetae* было больше у молодых овец, в то время как *Firmicutes* и *Tenericutes* – у ягнят. Микробное сообщество в рубце ягнят было менее

разнообразным. Различалось содержание незаменимых аминокислот и связанных с ними функциональных путей – L-лейцина (биосинтез валина, лейцина и изолейцина) было больше у ягнят, а фенилэтиламина (метаболит фенилаланина) – у молодняка. Структура микробного сообщества рубца, профиль метаболитов зависели от возраста, но концентрация ЛЖК в рубце была относительно стабильной. Некоторые МО (*Clostridium* и *Ruminococcaceae*) положительно коррелировали с L-лейцином, но отрицательно – с фенилэтиламином. Микрофлора рубца статистически значимо коррелировала с метаболомом и профилями ЛЖК. Эти знания имеют важное значение для регулирования питания и метаболизма животных, опосредованного участием микробиома рубца.

Общее обсуждение и заключение

На протяжении последних десятилетий изучение МО рубца, их роли в пищеварении и обмене веществ в многокамерном желудке жвачных животных вызывает повышенный интерес учёных и практиков-животноводов. Результаты этих исследований способствуют организации более рационального и полноценного кормления животных и эффективного использования кормов для повышения продуктивности. Ранее проводимые исследования микрофлоры рубца (до 90-х гг 20-го века) на основе классических методов посева на специальные питательные среды, оказались недостаточно информативными; были детально описаны лишь несколько десятков видов симбионтных МО (Тараканов, 2006). Значительная часть МО рубца представлена некультивируемыми видами, а представления, основанные на классических микробиологических методах, не отражают всей полноты процессов, происходящих в рубце. Разработка и развитие молекулярно-генетических методов исследования, позволяющих идентифицировать рубцовые МО, минуя стадию культивирования, способствовали получению более детального представления о процессах, происходящих в рубце. Установлено, что до 90% рубцовых МО являются некультивируемыми и неизвестными ранее. При этом ряд некультивируемых видов выявлен и в числе известных таксонов – руминококков, зубактерий, клостридий, лактобактерий и др.

На основании результатов, полученных с использованием методов T-RFLP и NGS в молекулярно-генетической лаборатории компании «БИОТРОФ», впервые в мире сформированы первые варианты нормативов содержания микроорганизмов в рубце КРС (Романов, 2019). Перед современными исследователями стоит задача не просто изучить структуру микробного сообщества, но и проследить за изменением этой структуры в результате тех или иных воздействий, найти способ коррекции нарушенного состояния микробиома. Методы T-RFLP и NGS с соответствующим программным обеспечением позволяют получить информацию о детальном профиле микробного сообщества (бактерий, архей, грибов). В результате появилась возможность выявления микроорганизмов, оказывающих непосредственное влияние на продуктивность жвачных животных.

Исследования микробиома рубца КРС с использованием молекулярно-генетических методов интенсивно идут во всем мире, включая Российскую Федерацию, однако аналогичных работ по мелким жвачным животным (козы и овцы) гораздо меньше. В РФ, кроме изучения микробиома КРС, ООО «Биотроф» выполняет исследования микробного сообщества рубца северного оленя с использованием методов T-RFLP (Лайшев и др., 2019) и NGS (Дуняшев и др., 2019; Ильина и др., 2020).

NGS-анализ микробиома рубца овец интенсивно используется в работах зарубежных учёных, в первую очередь, китайских. Объекты исследования – китайско-монгольские (Zeng et al., 2017), тибетские (Zhang et al., 2016; Liu et al., 2019; Wang et al., 2019; Langda et al., 2020; Li et al., 2020), овцы Тан (Fu et al., 2020), монгольские Ху (Hu) (Trabi et al., 2019). В России к настоящему времени насчитывается около 23 миллионов овец и коз. Овцеводство в России не является популярным видом бизнеса в силу традиционного уклона в разведение КРС, и оно представлено в основном небольшими фермерскими и личными подсобными хозяйствами. Тем не менее, специалисты считают овцеводство в РФ одним из очень перспективных направлений животноводческого бизнеса. Современные исследования направлены на создание мясного

овцеводства России, а также на сохранение романовских овец, численность которых за последние годы резко сократилась. Грубошерстные романовские овцы – старейшей отечественной породы, продуктивны в условиях умеренного климата Нечерноземья, с целью разведения для получения баранины и качественной овчины. Физиология, биохимия и генетика, технология производства овец этой породы достаточно изучены (Арсеньев и Лобков, 2011). Ранее были опубликованы работы по оценке микрофлоры рубца овец романовской породы с использованием классических методов микробиологии (Фомичев и др., 2019). Были оценены роль инфузорий в переваривании содержимого рубца (Тощев, 2006), целлюлозолитическая активность микробиоценоза рубца (Артемяева и др., 2018) в зависимости от структуры рациона, влияние антиоксидантной добавки и органического йода на микрофлору рубца (Фомичев и др., 2019).

Очевидно, что назрела острая необходимость использования современных молекулярно-биологических методов в исследовании особенностей функционирования микробиома овец, выращиваемых в условиях российского овцеводства. Как и для КРС, это позволит со временем детально описать нормофлору рубца овец, способствуя развитию овцеводства на современной научной основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арсенев Д.Д., Лобков, В.Ю. Технология романовского овцеводства: монография. – Ярославль: Ярославская ГСХА. 2011. – 268 с.
2. Артемяева О.А., Колодина Е.Н., Логвинова Т.И. Изучение микробиоценоза у гибридных и чистопородных животных // *Новости науки в АПК*. – 2018. – Т. 11. – № 2-1. – С.247-250.
3. Бабичева И.А., Мустафин Р.З. Бактериальная ферментация питательных веществ в рубце при использовании пробиотических препаратов // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2016. – № 6. – С. 116-118.
4. Грушкин А.Г., Шевелев Н.С. О морфофункциональных особенностях микробиоты рубца жвачных животных и роли целлюлозолитических бактерий в рубцовом пищеварении // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – № 2. – С. 12-19.
5. Дуняшев Т.П., Соболев Д.В., Лаптев Г.Ю. Сравнительный анализ бактериального сообщества рубца у молодых и взрослых особей *Rangifer tarandus* из арктических регионов России в осенне-зимний период // *Известия СПбГАУ*. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 80-83.
6. Ёрсков Э. Р., Рил М. Энергетическое питание жвачных животных (пер. с англ.). – Боровск: ВНИИФБИП, 2003. – 165 с.
7. Иванов А. Изучение микробиоты рубца коров методом T-RFLP. Современные нормативы // *Дайджест Сельское хозяйство. Наука и Практика*. – 2017. – № 4. – С. 1-6.
8. Ильина Л., Балакирева А., Ёылдырым Е., Лаптев Г. Изучение бактериального сообщества рубца коров с помощью T-RFLP-анализа // *Молочное и мясное скотоводство*. – 2011. – №2. – С. 24-27.
9. Ильина Л.А., Петрушенко Ю.Н. Взаимодействие между микроорганизмами в рубце // *Сборник научных трудов Кубанского университета*. – Кубань: Издательский Дом Юг, 2013. – С. 85-95.
10. Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю., Лайшев К.А., Ёылдырым Е.А., Филиппова В.А., Никонов И.Н., Новикова Н.И. Изучение микробиоты рубца северных оленей молекулярно-генетическим методом T-RFLP // *Медицинский академический журнал*. – 2017. – Т. 17. – № 4. – С. 62-64.
11. Ильина Л.А., Филиппова В.А., Лайшев К.А., Ёылдырым Е.А., Дуняшев Т.П., Бражник Е.А., Дубровин А.В., Соболев Д.В., Тюрина Д.Г., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю., Южаков А.А., Романенко Т.М., Вылко Ю.П. Сезонные изменения микробиома рубца у северного оленя (*Rangifer tarandus*) в условиях российской арктики. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2020. – Т. 55. – № 4. – С. 697-713.
12. Комарова О.Н., Хавкин А.И. Взаимосвязь стресса, иммунитета и кишечной микробиоты // *Педиатрическая фармакология*. – 2020. – Т. 17. – № 1. – С. 18-24. DOI: 10.15690/pf.v17i1.2078
13. Красненко А.Ю., Елисеев А.Ю., Борисевич Д.И., Цуканов К.Ю., Давыдова А.И., Ильинский В.В. Особенности подготовки библиотек для метагеномного секвенирования образцов на платформе Illumina // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. – 2017. – № 2. – С. 30-36. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-04
14. Кряжевских Л.А. Биотехнологии в основе повышения продуктивного долголетия КРС // *Сельскохозяйственные Вести*. – 2010. – № 3. – С. 22-23.
15. Лайшев К.А., Ильина Л.А., Ёылдырым Е.А., Филиппова В.А., Дуняшев Т.П., Дубровин А.В., Соболев Д.В., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю., Южаков А.А., Романенко Т.М., Вылко Ю.П. Микробиота рубца у северных

- олений (*Rangifer tarandus*) с клиническими проявлениями некробактериозов // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 4. – С. 744-753.
16. Лаптев Г., Кряжевских Л. Исследование бактериального сообщества рубца с помощью метода T-RFLP // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – № 3. – С. 16-18.
 17. Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Ильина Л.А., Ёылдырым Е.А., Думова В.А., Корочкина Е.А. Исследование вагинальной слизи высокопродуктивных коров в послелетельный период посредством ПЦР в реальном времени // Российский ветеринарный журнал. – 2014. – № 3. – С.10-12.
 18. Лаптев Г., Ильина Л., Ёылдырым Е. Оценить обстановку // Новое сельское хозяйство. – 2016. - Т.1. –№ 1. – С.60-63.
 19. Лаптев Г., Ильина Л., Солдатова В. Микробиом рубца жвачных: современные представления // Животноводство России. – 2018. – № 10. – С. 38-42.
 20. Лаптев Г., Ёылдырым Е., Ильина Л. Микробиом рубца — основа здоровья коров // Животноводство России. – 2020. – № 4. – С. 42-45.
 21. Миронова И.В., Косилов В.И. Переваримость коровами основных питательных веществ рационов коров черно-пестрой породы при использовании в кормлении пробиотической добавки Ветоспорин-актив// Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – Т. 52. – № 2. – С. 143-146.
 22. Неверова Н.Н., Кикалова Т.П., Карпунина Л.В., Сметанина М.Д. Изменение молочнокислой микрофлоры кишечника животных под действием лектина бацилл в условиях стресса // Вестник Саратовского ГАУ. – 2007. – № 5. – С. 20-22.
 23. Ноздрин Г.А., Иванова А.Б., Ноздрин А.Г. Теоретические и практические основы применения пробиотиков на основе бацилл в ветеринарии // Вестник НГАУ. – 2011. – Т. 21. – № 5. – С. 87-95.
 24. Остренко К.С., Громова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Пронин А.В., Стельмашук Е.В., Хаспеков Л.Г. Аскорбат лития улучшает адаптацию к стрессу на моделях *in vitro* и *in vivo* // Фармакодинамика и фармакокинетика. – 2016. – № 3. – С. 13-20.
 25. Остренко К.С., Громова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С. Клеточный протеом, литий, системные эффекты: биоинформационный анализ взаимосвязей // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2019. – № 3. – С. 5-19.
 26. Правдивцева М.И., Карпунина Л.В., Сметанина М.Д. Влияние экзополисахаридов лактобацилл на микрофлору толстого отдела кишечника самок крыс при различных видах стресса // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2011. – Т. 11. – Вып. 2. – С. 89-94.
 27. Равин Н.В., Марданов А.В., Скрябин К.Г. Метагеномика как инструмент изучения “некультивируемых” микроорганизмов // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 5. – С. 519-528.
 28. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени. – М.: БИНОМ. – 2009. – 223 с.
 29. Романов В.Н., Боголюбова Н.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А. Современные способы улучшения здоровья и роста продуктивности жвачных животных. – Подольск-Дубровицы: ВИЖ, 2019. – 128 с.
 30. Сенчук И.В. Диагностика нарушений рубцового пищеварения у овец // Известия сельскохозяйственной науки Тавриды. – 2019. – Т. 180. –№ 17. – С. 156-163.
 31. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. – М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
 32. Тощев В.К. Микрофлора рубца овец при различных рационах // Зоотехния. – 2006. – № 2. – С. 18-19.
 33. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Мелешко Н.А., Лаптев Г.Ю. и др. Влияние *Bacillus subtilis* на микробное сообщество рубца и его членов, имеющих высокие коэффициенты корреляции с показателями пищеварения, роста и развития хозяина // Микробиология. – 2013. –Т. 82. – № 4. – С. 456-563.
 34. Фомичев Ю.П., Боголюбова Н.В., Мишуоров А.В., Рыков Р.А. Биокоррекция ферментативных и микробиологических процессов в рубце, межклеточный обмен у овец путем применения в питании антиоксиданта и органического йода // Российская сельскохозяйственная наука. –2019. – № 4. – С. 43-47. DOI: 10.31857/S2500-26272019443-47
 35. Хамидуллин И.Р., Галиуллин А.К., Тамимдаров Б.Ф., Шакиров Ш.К. Идентификация микроорганизмов рубца крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – 2016. – Т. 227. – № 3. – С. 112-114.
 36. Чёрная, Л.В. Особенности жизнедеятельности эндобионтных инфузорий в желудке овец // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3. – С.402-404.
 37. Шайдуллин С.Ф. Влияние ферментных препаратов на рубцовое пищеварение, переваримость и усвояемость питательных веществ у овец // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – 2014. – №. 2. – С. 294–301.

38. Dobrogosz W.J. Enhancement of human health with *Lactobacillus reuteri* - A probiotic, immunobiotic and immunoprotective // *Nutrafoods*. – 2005. – No. 4. – P. 15-28.
39. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. – 2014. – Vol. 2. – No. 1. – P. 6. DOI: 10.1186/2049-2618-2-6
40. Fu Z., Xu X., Zhang J., Zhang L. Effect of different feeding methods on rumen microbes in growing Chinese Tan sheep // *Revista Brasileira de Zootecnia*. – 2020. – 49. – e20190258.<<https://doi.org/10.37496/rbz4920190258>>
41. Ganzle M.G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – No. 64. – P. 326-332.
42. Grilli D.J., Fliegerová K., Kopečný J., Lama S.P., Egea V., Sohaefer N., Pereyra C., Ruiz M.S., Sosa M. A., Arenas G.N., Mrázek J. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet // *Anaerobe*. – 2016. – No. 42. – P. 17-26. DOI: [org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.002](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.002)
43. Gu W., Miller S., Chiu C.Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2019. – No. 14. – P. 319-338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751
44. Guo X.L. Detection of Firmicutes and Bacteroidetes in the pig gut and the correlation between their abundance and fat deposit. // Thesis (Dr. Sci.). Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan, China, 2009.
45. Guo W. The research on the composition structure of archaea and bacteria in the rumen of goat at different age stage // Thesis (D.Sc.). Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan, China, 2015.
46. Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Janssen P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range // *Scientific Reports*. – 2015. – No. 5. – 14567-1478. DOI: [org/10.1038/srep14567](https://doi.org/10.1038/srep14567)
47. Jiang S., Yang Z., Yang W., Li Z., Zhang C., Liu X., Wan F. Diets of differentially processed wheat alter ruminal fermentation parameters and microbial populations in beef cattle // *J. Anim. Sci.* – 2015. – No. 93. – P. 5378-5385. DOI: 10.2527/jas.2015-9547
48. Jung J.Y., Yoon H.K., An S., Lee J.W., Ahn E.R., Kim Y.J., Park H.C., Lee K., Hwang J.H., Lim S.K. Rapid oral bacteria detection based on real-time PCR for the forensic identification of saliva // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – No. 1. – e10852. DOI: 10.1038/s41598-018-29264-2.
49. Langda S., Zhang C., Zhang K., Gui B., Ji D., Deji C., Cuoji A., Wang X., Wu Y. Diversity and composition of rumen bacteria, fungi, and protozoa in goats and sheep living in the same high-altitude pasture // *Animals*. – 2020. – Vol. 10. – No. 2. – P. 186. DOI:10.3390/ani10020186
50. Ley R.E., Lozupone C.A., Hamady M., Knight R., Gordon J.I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – No. 6. – P. 776-788. DOI: [org/10.1038/nrmicro1978](https://doi.org/10.1038/nrmicro1978)
51. Li F., Guan L.L. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – No. 83. – e00061-17. DOI: 10.1128/AEM.00061-17
52. Li H, Yu Q, Li T, Shao L, Su M, Zhou H, Qu J. Rumen microbiome and metabolome of tibetan sheep (*ovis aries*) reflect animal age and nutritional requirement // *Front Vet. Sci.* – 2020. – No. 7. – P. 609. DOI: 10.3389/fvets.2020.00609
53. Liu H., Xu T., Xu S., Ma L., Han X., Wang X., Zhang X., Hu L., Zhao N., Chen Y., Pi L., Zhao X.. Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau // *Peer J.* – 2019. – No. 7. – e7462. DOI: [org/10.7717/peerj.7462](https://doi.org/10.7717/peerj.7462)
54. Logue J.B., Burgmann H., Robinson C.T. Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria // *BioScience*. – 2008. – Vol. 58. – No. 2. – P. 103-113.
55. Lopez I., Ruiz-Larrea F., Cocolin L., Orr E., Phister T., Marshall M., Vander G.J., Mills D.A. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69. – No. 11. – P. 6801-6807. DOI: 10.1128/aem.69.11.6801-6807
56. Marin I.A., Goertz J.E., Ren T., Rich S.S., Onengut-Gumuscu S., Farber E., Wu M., Overall C.C., Kipnis J., Gaultier A. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior // *Sci. Rep.* – 2017. – No. 7. – e43859. DOI: 10.1038/srep43859
57. McGovern E., Kenny D.A., McCabe M.S., Fitzsimons C., Mcgee M., Kelly A.K., Waters S.M. 16S rRNA sequencing reveals relationship between potent cellulolytic genera and feed efficiency in the rumen of bulls // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1842. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01842
58. Narjisse H., Hansali M.E. Effect of tannins on nitrogen balance and microbial activity of rumen fluid in sheep and goats // *Ann. Zootech.* – 1985. – Vol. 34. – P. 482-492
59. Odenyo A.A., Osuji P.O. Tannin-tolerant ruminal bacteria from East African ruminants // *Can. J. Microbiol.* – 1998. – Vol. 44. – P. 905-909.

60. O'Mahony S.M., Marchesi J.R., Scully P., Codling C., Ceolho A.M., Quigley E.M., Cryan J.F., Dinan T.G. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses // *Biol Psychiatry*. – 2009. – Vol. 65. – No. 3. – P. 263-267. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.06.026
61. Pitta D.W., Indugu N., Kumar S., Vecchiarelli B., Sinha R., Baker L.D., Bhukya B., Ferguson J.D. Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows // *Anaerobe*. – 2016a. – No. 38. – P. 50-60. DOI:org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.003
62. Pitta D.W., Pinchak W.E., Indugu N., Vecchiarelli B., Sinha R., Fulford J.D. Metagenomic analysis of the rumen microbiome of steers with wheat-induced frothy bloat // *Front. Microbiol.* – 2016b. – No. 7. – P. 689-695. DOI: org/10.3389/fmicb.2016.00689
63. Pulina G., Milán M.J., Lavín M.P., Theodoridis A., Morin E., Capote J., Thomas D.L., Francesconi A.H.D., Caja G. Invited review: current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors // *J. Dairy Sci.* – 2018. – No. 101. – P. 6715-6729. DOI: 10.3168/jds.2017-14015
64. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – No. 35. – P. 833-844. DOI: 10.1038/nbt.3935
65. Shabat S.K.B., Sasson G., Doron-Faigenboim A., Durman T., Yaacoby S., Berg Miller M.E., White B.A., Shterzer N., Mizrahi I. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants // *ISME J.* – 2016. – No. 10. – P. 2958-2972. DOI: 10.1038/ismej.2016.62
66. Schären M., Frahm J., Kersten S., Meyer U., Hummel J., Breves G., Dänicke S. Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows // *J. Dairy Sci.* – 2018. – No. 101. – P. 4615-4637. DOI: org/10.3168/jds.2017-13736
67. Schütte U.M.E., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C. et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 80. – P. 365-380.
68. Singh K.M.; Ahir V.B., Tripathi A.K., Ramani U.V., Sajjani M., Koringa P.G., Jakhesara S., Pandya P.R., Rank D.N., Murty D.S., Kothari R.K., Joshi C.G. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: A preliminary study // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39. – No. 4. – P. 4841-4848. <<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1278-0>>
69. Stein D.R., Allen D.T., Perry E.B., Bruner J.C., Gates K.W., Rehberger T.G., Mertz K., Jones D., Spicer L.J. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield components, and reproduction // *J. Dairy Sci.* – 2006. – Vol. 89. – P. 111-125.
70. Stres B. The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology // *Acta Agricult. Sloven.* – 2006. – Vol. 88. – No. 2. – P. 65-73.
71. Trabi E.B., Seddik H., Xie F., Lin L., Mao S. Comparison of the rumen bacterial community, rumen fermentation and growth performance of fattening lambs fed low grain, pelleted or non-pelleted high grain total mixed ration // *Anim. Feed Sci. Technol.* – 2019. – No. 253. – P. 1-12. DOI: org/10.1016/j.anifeeds.2019.05.001
72. Van Guilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis // *Biotechniques*. – 2008. – Vol. 44. – No. 5. – P. 619-626.
73. Wang L., Zhang K., Zhang C., Feng Y., Zhang X., Wang X., Wu G. Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – No. 1. – P. 19620. DOI: 10.1038/s41598-019-56206-3
74. Wang Y., Ametaj B.N., Ambrose D.J., Gänzle M.G. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici* // *BMC Microbiol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 19-30.
75. Weimer P.J., Stevenson D.M., Mertens D.R. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions // *J. Dairy Sci.* – 2010. – Vol. 93. – No. 1. – P. 265-278.
76. Wilkinson T.J., Huws S.A., Edwards J.E., Kingston-Smith A.H., Siu-Ting K., Hughes M., Rubino F., Friedersdorff M., Creevey C.J. CowPI: a rumen microbiome focussed version of the PICRUSt functional inference software // *Front. Microbiol.* – 2018. – No. 9. – P. 1095. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01095
77. Yáñez-Ruiz D.R., Abecia L., Newbold C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – Art. 1133. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01133
78. Zeineldin M., Barakat R., Elolimy A., Salem A.Z.M., Elghandour M.M.Y., Monroy J.C. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health // *Microb. Pathog.* – 2018. – No. 124. – P. 106-115. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.08.038

79. Zeng Y., Zeng D., Ni X., Zhu H., Jian P., Zhou Y., Xu S., Lin Y., Li Y., Yin Z., Pan K., Jing B. Microbial community compositions in the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep using Illumina MiSeq sequencing revealed high microbial diversity // *AMB Express*. – 2017. – Vol. 7. – No. 1. – P. 75-86. DOI: 10.1186/s13568-017-0378-1
80. Zhang Z., Xu D., Li W., Hao J., Wang J., Xin Z., Wang W., Qiang Q., Huang X., Zhou J. Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals // *Curr. Biol*. – 2016. – No. 26. – P. 1873-1879.

REFERENCES (for publications in Russian)

1. Arsen'ev D.D., Lobkov V.Yu. *Tekhnologiya romanovskogo ovtsevodstva* (Romanov sheep breeding technology). Yaroslavl': GSKhA Publ., 2011, 268 p.
2. Artem'eva O.A., Kolodina E.N., Logvinova T.I. [Study of microbiocenosis in hybrid and purebred animals]. *Novosti nauki v APK. - Science news in the agro-industrial complex*. 2018, 11(2-1): 247-250.
3. Babicheva I.A., Mustafin R.Z. [Bacterial fermentation of nutrients in the rumen using probiotic formulations]. *Izvestiya Orenburgskogo GAU - Proceedings of Orenburg State University*. 2016, 6: 116-118.
4. Chernaya L.V. [Features of the vital activity of endobiont ciliates in the stomach of sheep]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy - International Journal of Applied and Basic Research*. 2016, 3: 402-404.
5. Dunyashev T.P., Sobolev D.V., Laptev G.Yu. [Comparative analysis of the bacterial community of the rumen in young and adult individuals of Rangifer tarandus from the Arctic regions of Russia in the autumn-winter period] *Izvestiya SPbGAU - Bulletin of St. Petersburg State University*. 2019, 55(2): 80-83.
6. Erskov E.R., Ril M. *Energeticheskoe pitanie zhvachnykh zhivotnykh* (Energetic nutrition of ruminants, translated from English). Borovsk: VNIIFBIP Publ., 2003, 165 p.
7. Fomichev Yu.P., Bogolyubova N.V., Mishurov A.V., Rykov R.A. [Biocorrection of enzymatic and microbiological processes in the rumen, interstitial metabolism in sheep by using an antioxidant and organic iodine in the diet]. *Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka - Russian agricultural science*. 2019, 4: 43-47. DOI: 10.31857/S2500-26272019443-47
8. Grushkin A.G., Shevelev N.S. [On the morphofunctional features of the rumen microbiota of ruminants and the role of cellulolytic bacteria in cicatricial digestion]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2008, 2: 12-19.
9. Il'ina L., Balakireva A., Iyldyrym E., Laptev G. [Study of the bacterial community of the rumen of cows using T-RFLP analysis]. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo - Dairy and Meat Cattle Husbandry*. 2011, 2: 24-27.
10. Il'ina L.A., Petrushenko Yu.N. [Interaction between microorganisms in the rumen]. *Sbornik nauchnykh trudov Kubanskogo universiteta - Collection of scientific papers of the Kuban University*. Kuban': Izdatel'skii Dom Yug, 2013: 85-95.
11. Il'ina L.A., Laptev G.Yu., Laishev K.A., Iyldyrym E.A., Filippova V.A., Nikonov I.N., Noviko-va N.I. [Study of the microbiota of the rumen of reindeer by the molecular genetic method T-RFLP]. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal - Medical academic journal*. 2017, 17(4): 62-64.
12. Il'ina L.A., Filippova V.A., Laishev K.A., Iyldyrym E.A., Dunyashev T.P., Brazhnik E.A., Dubrovin A.V., Sobolev D.V., Tyurina D.G., Novikova N.I., Laptev G.Yu., Yuzhakov A.A., Romanenko T.M., Vylko Yu.P. [Seasonal changes in the rumen microbiome in reindeer (Rangifer tarandus) in the Russian Arctic]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2020, 55(4): 697-713.
13. Ivanov A. [Study of cow rumen microbiota by T-RFLP method. Modern standards]. *Daidzhest Sel'skoe khozyaistvo. Nauka i Praktika - Digest Agriculture. Science and Practice*. 2017. – № 4. – C. 1-6.
14. Khamidullin I.R., Galiullin A.K., Tamimdarov B.F., Shakirov Sh.K. [Identification of microorganisms of the rumen of cattle]. *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny - Scientific Notes of n Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. 2016, 227(3): 112-114.
15. Komarova O.N., Khavkin A.I. [Relationship between stress, immunity and gut microbiota]. *Pediatricheskaya farmakologiya - Pediatric Pharmacology*. 2020, 17(1): 18-24. DOI: 10.15690/pf.v17i1.2078
16. Krasnenko A.Yu., Eliseev A.Yu., Borisevich D.I., Tsukanov K.Yu., Davydova A.I., Il'inskii V.V. [Specifics of preparing libraries for metagenomic sequencing of samples on the Illumina platform]. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta - Bulletin of the Russian State Medical University*. 2017, 2: 30-36. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-04
17. Kryazhevskikh L.A. [Biotechnology at the heart of increasing the productive longevity of cattle]. *Sel'skokhozyaistvennye vesti - Agricultural News*. 2010, 3: 22-23.
18. Laishev K.A., Il'ina L.A., Iyldyrym E.A., Filippova V.A., Dunyashev T.P., Dubrovin A.V., Sobolev D.V., Novikova N.I., Laptev G.Yu., Yuzhakov A.A., Romanenko T.M., Vylko Yu.P. [Rumen microbiota in reindeer

- (Rangifer tarandus) with clinical manifestations of necrobacteriosis]. *Sel'skokhosyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2019, 54(4): 744-753.
19. Laptev G., Kryazhevskikh L. [Study of the bacterial community of the rumen using the T-RFLP method]. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo - Dairy and Meat Cattle Husbandry*. 2010, 3: 16-18.
 20. Laptev G.Yu., Novikova N.I., Il'ina L.A., Ilydyrym E.A., Dumova V.A., Korochkina E.A. [Study of vaginal mucus of high-yielding cows in the postpartum period by means of real-time PCR]. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal - Russian Veterinary Journal*. 2014, 3: 10-12.
 21. Laptev G., Il'ina L., Ilydyrym E. [Assess the situation]. *Novoe sel'skoe khozyaistvo - New agriculture*. 2016, 1(1): 60-63.
 22. Laptev G., Il'ina L., Soldatova V. [Ruminant rumen microbiome: current understanding]. *Zhivotnovodstvo Rossii - Animal Husbandry in Russia*. 2018, 10: 38-42.
 23. Laptev G., Ilydyrym E., Il'ina L. [The rumen microbiome is the foundation of cow health]. *Zhivotnovodstvo Rossii - Animal Husbandry in Russia*. 2020, 4: 42-45.
 24. Mironova I.V., Kosilov V.I. [Digestibility of the main nutrients in the diets of Black-and-White cows by cows when using the probiotic additive Vetosporin-active in feeding]. *Izvestiya OGAU - Reports of Orenburg State Agrarian University*. 2015, 52(2): 143-146.
 25. Neverova N.N., Kikalova T.P., Karpunina L.V., Smetanina M.D. [Changes in the lactic acid microflora of the intestines of animals under the influence of bacilli lectin under stress]. *Vestnik Saratovskogo GAU - Saratov State Agrarian University Bulletin*. 2007, 5: 20-22.
 26. Nozdrin G.A., Ivanova A.B., Nozdrin A.G. [Theoretical and practical foundations of the application of bacillus-based probiotics in veterinary medicine]. *Vestnik NGAU - Bulletin of Novosibirsk State University*. 2011, 21(5): 87-95.
 27. Ostrenko K.S., Gromova O.A., Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Pronin A.V., Stel'mashchuk E.V., Khaspekov L.G. [Lithium ascorbate improves stress adaptation in vitro and in vivo models]. *Farmakodinamika i farmakokinetika - Pharmacodynamics and Pharmacokinetics*. 2016, 3: 13-20.
 28. Ostrenko K.S., Gromova O.A., Torshin I.Yu., Sardaryan I.S. [Cellular proteome, lithium, systemic effects: bioinformatics analysis of relationships]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2019, 3: 5-19.
 29. Pravdivtseva M.I., Karpunina L.V., Smetanina M.D. [Effect of lactobacilli exopolysaccharides on the microflora of the large intestine of female rats under various types of stress]. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Ser. Khimiya. Biologiya. Ekologiya - Bulletin of the Saratov University. Ser. Chemistry. Biology. Ecology*. 2011, 11(2): 89-94.
 30. Ravin N.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. [Metagenomics as a tool for the study of "unculturable" microorganisms]. *Genetika - Genetics*. 2015, 51(5): 519-528.
 31. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. *PTsR v real'nom vremeni (Real time PCR)*. Moscow: BINOM Publ., 2009, 223 p.
 32. Romanov V.N., Bogolyubova N.V., Laptev G.Yu., Il'ina L.A. [Modern ways to improve the health and productivity of ruminants]. *Dubrovitsy: VIZh Publ.*, 2019, 128 p.
 33. Senchuk I.V. [Diagnosis of ruminal digestion disorders in sheep]. *Izvestiya sel'skokhozyaistvennoi nauki Tavriy - Bulletin of agricultural science of Taurida*. 2019, 180(17): 156-163.
 34. Shaidullin S.F. [Effect of enzyme preparations on cicatricial digestion, digestibility and nutrient absorption in sheep]. *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny - Scientific Notes of Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. 2014. 2: 294-301.
 35. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy (Methods for studying the microflora of the digestive tract of farm animals and poultry)*. Moscow: Nauchnyi Mir Publ., 2006, 188 p.
 36. Toshchev V.K. [Sheep rumen microflora in different diets]. *Zootekhnika - Zootechnics*. 2006, 2: 18-19.
 37. Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Meleshko N.A., Laptev G.Yu et al. [Influence of *Bacillus subtilis* on the microbial community of the rumen and its members, which have high correlation coefficients with indices of digestion, growth and development of the host]. *Mikrobiologiya - Microbiology*. 2013, 82(4): 456-563.

Studies of the sheep rumen microbiome using molecular genetic methods: a review

Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Ostrenko K.S., Ovcharova A.N., Belova N.V.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Branch of Ernst Federal
Science Center for Animal Husbandry; Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The study of microorganisms (MO) of the rumen until now was carried out mainly by the classical method of sowing pure cultures on nutrient media, while only a few dozen species of symbiotic microorganisms are described in detail. The development of molecular genetic research methods that make it possible to identify rumen MOs, bypassing the stage of cultivation, contributed to obtaining a more detailed understanding of the processes occurring in the rumen. It has been established that up to 90% of rumen MOs are unculturable and previously unknown. To date, using modern molecular genetic methods, many-sided detailed studies of the rumen microbiota of ruminants have been carried out, including with the participation of Russian scientists. The purpose of this work is to systematize new data on the microbial communities of the rumen obtained using molecular genetic methods. Main sections: description of the rumen microbiota, the basic principles of modern methods, the use of these methods, the results of the study of the sheep rumen microbiome. Special attention is paid to the work of Russian scientists, who were the first to develop standards for the content of microorganisms in the rumen of ruminants, taking into account the age and physiological state of animals. The data on the effect of stress on the rumen microbiota and methods of its protection using adaptogenic, antioxidant biologically active substances and probiotics are analyzed. It was concluded that it is necessary to develop standards for the content of microorganisms in the rumen of sheep, taking into account the conditions of detention, the food base and the breed characteristics of animals.

Keywords: rumen, sheep, ruminants, microbiome, molecular genetic methods, RT-PCR, T-RFLP, NGS.

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2020, 4: 5-26

Поступило в редакцию: 27.11.2020

Получено после доработки: 03.12.2020

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. +7(910)590-92-83, heleko3@yandex.ru;
Езерский Вадим Александрович, м.н.с., тел. +7(906)642-59-92, ez.vadim@yandex.ru;
Остренко Константин Сергеевич, д.б.н., зав. лаб., тел. +7(910)916-66-58, Ostrenkoks@gmail.com;
Овчарова Анастасия Никитовна, к.б.н., с.н.с., тел. +7(964)146-68-62;
Белова Надежда Викторовна, ст.лаборант, тел. +7(903)635-83-57