

Животноводство и кормопроизводство. 2022. Т. 105, № 2. С. 70-83.
Animal Husbandry and Fodder Production. 2022. Vol. 105, no 2. P. 70-83.

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА КОРМЛЕНИЯ

Обзорная статья

УДК 636.085

doi:10.33284/2658-3135-105-2-70

Анализ совершенствования технологии сохранения рубцовой жидкости. Искусственные рубцы жвачных животных

Мария Сергеевна Аринжанова¹

¹Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, Оренбург, Россия
¹marymiroshnikova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1898-9307>

Аннотация. Исследования, направленные на изучение переваривания корма, влияния кормовых добавок или ферментации в рубце, часто требуют определения конечных продуктов ферментации и потока питательных веществ с использованием канюль, установленных в сычуге или двенадцатиперстной кишке. В настоящее время оправданными являются альтернативные методы, способные точно имитировать работу рубца. Создание «идеального» искусственного рубца, поддерживающего и воспроизводящего первоначальное микробное сообщество рубца жвачного животного, может стать передовой природоподобной технологией, позволяющей учёным в области животноводства упрощать и ускорять исследовательский процесс. Был проведён анализ совершенствования технологии сохранения рубцовой жидкости благодаря сравнительной характеристике производительности, конфигурации и результативности ранних и более современных моделей искусственных рубцовых ферментёров.

Ключевые слова: рубец, искусственный рубец, искусственные биосистемы, биореактор, рубцовый ферментёр, *in vitro*, природоподобные технологии

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 20-16-00088.

Для цитирования: Аринжанова М.С. Анализ совершенствования технологии сохранения рубцовой жидкости. Искусственные рубцы жвачных животных (обзор) // Животноводство и кормопроизводство. 2022. Т. 105, № 2. С. 70-83. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-105-2-70>

THEORY AND PRACTICE OF FEEDING

Review article

Analysis of the technology improvement for the preservation of rumen liquids. Artificial rumens of ruminant

Maria S Arinzhanova¹

¹Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia
¹marymiroshnikova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1898-9307>

Abstract. Studies looking at feed digestion, effects of feed additives, or rumen fermentation often require the determination of terminal products fermentation and nutrient flow using cannulae placed in the abomasum or duodenum. Currently, alternative methods are justified that can accurately simulate the rumen work. Creating a “perfect” artificial rumen that maintains and reproduces the original microbial community in rumen of ruminant animal could be an advanced nature-like technology that allows animal scientists to simplify and speed up the research process. An analysis was made of the improvement of the technology for preserving rumen fluid due to the comparative characteristics of the performance, configuration and effectiveness of earlier and more modern models of artificial rumen fermenters.

Keywords: rumen, artificial rumen, artificial bio-systems, bioreactor, rumen fermenter, *in vitro*, nature-like technologies

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 20-16-00088.

For citation: Arinzhanova MS. Analysis of the technology improvement for the preservation of rumen liquids. Artificial rumens of ruminant (review). *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2022;105(2):70-83. (In Russ.). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-105-2-70>

Введение.

Системы непрерывного культивирования, моделирующие пищеварение рубца жвачных – это подкатегория методов воссоздания/имитации рубца, соответствующих определению Hungate RE (1966): «Чан, в котором свежий корм и слюна смешиваются с ферментирующей массой, а жидкость и остатки корма выходят в определённых количествах эквивалентно входящим». Системы непрерывного культивирования различных конструкций широко используются для оценки влияния рациона, состава корма и кормовых добавок на пищеварение в рубце, синтез микробного белка и процессов ферментации в рубце. Основными преимуществами этих рубцовых ферментёров непрерывного действия (Rumen continuous fermenter, RCF) являются: 1 – возможность протестировать большое количество обработок с достаточным количеством повторений и за короткий период времени; 2 – способность тестировать более высокие, в некоторых случаях потенциально токсичные для животных уровни данной кормовой добавки; 3 – низкая стоимость эксперимента (по сравнению с испытаниями на животных); 4 – проведение экспериментов в стабильных и контролируемых условиях в отличие от *in vivo*. Главным преимуществом системы непрерывного культивирования *in vitro* по сравнению с системой периодического культивирования *in vitro* является способность удалять конечные продукты ферментации и поддерживать относительно стабильную ферментацию в течение длительного периода времени (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977; Cardozo PW et al., 2004; López S, 2005; Soto EC et al., 2013; Jin D et al., 2016).

Были предприняты многочисленные попытки разработать системы непрерывной ферментации, имитирующие процессы, осуществляемые в рубце, и оценить количество продуктов ферментации, которые покидают рубец в качестве питательных веществ для животного-хозяина. Системы варьируются от очень простых устройств с периодической подачей (Weller RA and Pilgrim AF, 1974; Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977) до более сложных систем непрерывного действия (Slyter LL et al., 1964; Teather RM and Sauer F, 1988; Fuchigami M et al., 1989), а также до таких систем, где скорости оборота жидкости и твёрдого вещества могут быть установлены независимо, а конечные продукты удаляются путём фильтрации или диализа содержимого ферментёра (Slyter LL et al., 1964; Hoover WH et al., 1976; Merry RJ et al., 1987; Hino T et al., 1993).

Двумя основными ограничениями являются поддержание популяции простейших и предотвращение прогрессирующего накопления непереваренных материалов в ферментационных колбах (Teather RM and Sauer F, 1988; Muetzel S et al., 2009) Последнюю проблему можно решить, оборудовав ферментёр с эффективной системой перемешивания содержимого колб и соответствующим сливным отверстием. Однако этот раствор обычно угнетает популяцию простейших, которые не могут адекватно питаться при искусственном перемешивании (Coleman GS, 1980) и требуют места в сосуде для ферментации, «...где они могут быть изолированы со скоростью удаления, значительно меньшей, чем скорость оборота жидкости» (Weller RA and Pilgrim AF, 1974).

Оценены различные подходы к поддержанию популяций простейших в нескольких типах ферментёров, например, для улучшения физических условий секвестрации простейших с использованием губчатых кубиков в модифицированной полунепрерывной системе RUSITEC (Abe M and Kurihara Y, 1984) или фильтров (Karnati SKR et al., 2009) и уменьшая количество подаваемого кор-

ма и/или скорость перемешивания (Broudiscou LP et al., 1997) или используя разные скорости оборота твёрдых и жидких веществ в двухпоточный ферментёр непрерывного действия (Double-flow continuous culture system, DFCCS) (Hoover WH et al., 1976; Teather RM and Sauer F, 1988; Ziemer CJ et al., 2000).

В идеале состав микробных популяций в ферментёрах должен быть репрезентативным с точки зрения разнообразия и количества популяции, обнаруженной в рубце животного-хозяина (Mateos I et al., 2015). Однако постоянно сообщалось о резком сокращении простейших в течение инкубационного периода или даже в некоторых случаях о полном их исчезновении в различных типах ферментёров (Mansfield HR et al., 1995; Moumen A et al., 2009; Hristov AN et al., 2012). Этот эффект в основном объясняется вымыванием простейших из ферментёров и воздействием атмосферного кислорода на содержимое ферментёров (Hillman K et al., 1991; Mansfield HR et al., 1995). Простейшие холотрихи, по-видимому, особенно уязвимы для вымывания, и их можно культивировать в течение более коротких периодов времени *in vitro* по сравнению с энтодимиоморфными простейшими (Williams AG, 1986). Кроме того, информации об эволюции других микробных популяций в ферментёрах в течение инкубационного периода всё ещё недостаточно.

Все новые модернизированные системы должны в первую очередь воспроизводить условия рубца (например, pH, оборот, температуру и т. д.), но также быть как можно более простыми, спроектированными с использованием недорогих компонентов и требующими минимального ухода. Однако необходимость имитировать очень сложную физиологическую функцию *in vivo* выявила различные ограничения доступных систем рубцовой ферментации непрерывного действия (Muetzel S et al., 2009).

Между рубцовым ферментёром и *in vivo* существует множество важных различий (например, недостаточное всасывание, различия в скорости разведения (прохождения) жидкости и частиц и потребление корма на объём рубца), которые могут влиять на пищеварительные процессы. Например, количество субстрата на единицу объёма ферментационной среды в RCF очень мало по сравнению с методами моделирования рубца *in vivo* (RUSITEC 20 г субстрата/сутки на 0,7 л=29 г/л; в среднем у коровы – 20000 г на 80 л=250 г/л). Чтобы применить данные RCF к условиям *in vivo*, важно знать, насколько хорошо результаты RCF соответствуют данным *in vivo*. Во многих случаях использование кормовых добавок рекомендуется на основе данных RCF, хотя результаты могут не соответствовать данным *in vivo*. В нескольких исследованиях были опубликованы данные одновременно RCF и *in vivo* (хотя цель, возможно, не состояла в прямом сравнении двух систем). Devant M с коллегами (2001) исследовали источники белка (соевый шрот по сравнению с рыбной и кукурузной глютеневой мукой) в RCF по сравнению с *in vivo* у мясного скота и сообщили о значительно различных концентрациях ацетата, пропионата и соотношения ацетат:пропионат в RCF, но об отсутствии влияния источника белка на рубец летучих жирных кислот *in vivo*. Точно так же влияние источника белка и добавок мочевины на предполагаемый синтез микробного белка в рубце было очень значительным в эксперименте RCF, но не наблюдалось различий *in vivo* (Devant M et al., 2001). В другом исследовании сообщалось о повышенной усвояемости клетчатки из-за добавок яблочной кислоты при RCF, но не наблюдалось никакого эффекта *in vivo* (Sniffen CJ et al., 2006). Другие примеры расхождений между данными RCF и данными *in vivo* в том же исследовании доступны в литературе (микробный синтез белка: Dann HM et al., 2006; Molina-Alcaide E et al., 2009; ферментация и усвояемость рубца: Carro MD et al., 2009; Cantalapiedra-Hijar G et al., 2011).

Несмотря на существующие проблемы в области технологии сохранения рубцовой жидкости в искусственных рубцах исследователи не прекращали поисков методов и разработок для совершенствования поддержания консорциума простейших и других микроорганизмов, скорости прохождения (растворения) жидкости, её всасывания и т. д.

Рубцовые ферментёры.

Пионерами, заложившими основы проектирования и разработки аппаратов ферментации непрерывного культивирования подобных рубцам жвачных, были Warner ACI (1956), Stewart DG et al. (1961), Slyter LL et al. (1964), Weller RA et al. (1974) и другие исследователи. Последующие модели искусственных рубцов, начиная с 1976 года, создавались учёными с учётом исправления ошибок и недоработок своих коллег. Ниже охарактеризованы модели рубцовых ферментёров непрерывного действия.

Двухпоточный ферментёр непрерывного культивирования.

Одной из наиболее часто используемых моделей *in vitro* является двухпоточный ферментёр непрерывного культивирования (DFCCS), разработанный Hoover WH с коллегами (1976), который поддерживает ферментацию инокулята рубца в сосуде для ферментации объёмом 1 литр путём постоянного добавления кормового субстрата, бикарбонатного буфера и N₂ или CO₂ для поддержания анаэробных условий, а также для дифференциального удаления твёрдых и жидких стоков. У двухпоточной системы ферментации с непрерывным культивированием ферментёры работают непрерывно в течение длительных периодов времени, кроме того, непрерывное культивирование обеспечивает контролируемую температуру и буферизацию слюны (Alende M et al., 2018). Было показано, что работа этой системы близка к *in vivo* эффектом переваривания клетчатки и профиля короткоцепочечных жирных кислот (Short-chain fatty acids, SCFA) и обеспечивает более точный ответ на ферментацию, чем инкубация в закрытых сосудах (Hoover WH et al., 1976).

Система включает длительную ферментацию с периодами от 8 (Calsamiglia S et al., 2002) до 11 дней (Dai X et al., 2019). Данный аппарат использовался в основном для оценки влияния кормов и добавок на ферментацию, пищеварение, поток питательных веществ и метаболизм азота в молочных продуктах (Brandao VLN et al., 2018) и говядине (Amaral PM et al., 2016). Одним из наиболее важных преимуществ DFCCS по сравнению с другими системами *in vitro* является непрерывное удаление конечных продуктов ферментации, таких как летучие жирные кислоты и аммиак (NH₃), которые потенциально могут препятствовать ферментации. Кроме того, система позволяет проводить интенсивный отбор проб, определение скорости разложения и тестирование кормовых добавок, которые находятся на ранних стадиях разработки и ещё не производятся в больших масштабах. Однако способность этой системы поддерживать определённые популяции микроорганизмов всё ещё неясна.

Rumen Simulation Technique (RUSITEC).

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 (рис. 1, 2).

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 короткоцепочечных жирных кислот и протозойных сдвигов по сравнению с животным-донором (Martínez ME et al., 2010). 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).

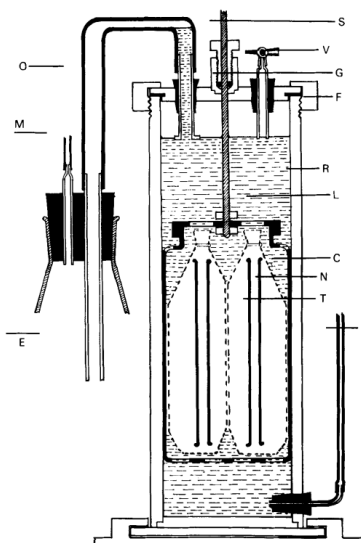


Рис. 1 – Принципиальная схема одной единицы долговременного искусственного рубца с четырьмя сосудами, сделанного из органического стекла, из резины или полиэтилена. Ведущий вал (S) изготовлен из нержавеющей стали; V – пробоотборный клапан; G – сальник (газонепроницаемый); F – фланец; R – главный реакционный сосуд; L – рубцовая жидкость; C – перфорированный контейнер для пищевых продуктов; N – нейлоновый марлевый мешок; T – жёсткая трубка; I – вход искусственной слюны; O – розетка через перелив; M – магистраль к газосборному мешку; E – ёмкость для сбора сточных вод (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977).

Figure 1 – Schematic diagram of one unit of the four-vessel long-term artificial rumen, made of perspex, rubber or polyethylene. The driving shaft (S) was made of stainless steel; V – sampling valve; G – gland (gas-tight); F – flange; R – main reaction vessel; L – rumen fluid; C – perforated food container; N – nylon gauze bag; T – rigid tube; I – inlet of artificial saliva; O – outlet through overflow; M – line to gas-collection bag; E – vessel for collection of effluent (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977).

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 (Belanche A et al., 2016a) 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 обнаружили сдвиг в микробиоме между 5 и 10 днями исследования в RUSITEC с помощью секвенирования нового поколения (Duarte AC et al., 2017).

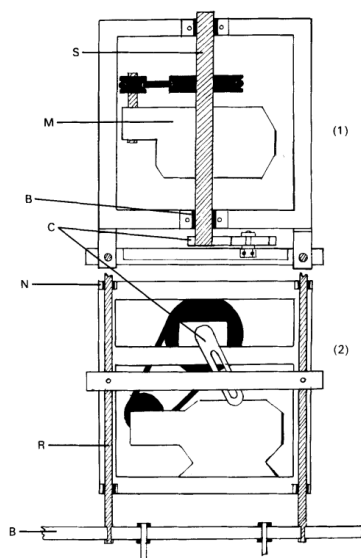


Рис. 2 – Принципиальная схема приводного механизма аппарата для долговременной имитации рубца. S – коленчатый вал; M – электрический мотор; B – подшипники; C – заводная рукоятка (вращение – возвратно-поступательное движение); N – нейлоновые направляющие; R – поршневые штанги; B – штанга с креплениями к валам из нержавеющей стали в реакционных сосудах (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977).

Figure 2 – Schematic diagram of the driving mechanism for the long-term rumen simulation apparatus. S – crank shaft; M – electric motor; B – bearings; C – crank (rotation-reciprocating movement); N – nylon guides; R – reciprocating rods; B – bar with attachments to stainless-steel shafts in reaction vessels (Czerkawski JW and Breckenridge G, 1977).

Система имитации рубца с естественными компонентами для непрерывного культивирования бактерий и простейших в рубце.

Разработанная Teather RM and Sauer F (1988) система имитации рубца представляет собой ферментёр с частичным перемешиванием и переливом, помещённый в нижнюю треть камеры брожения. В данной модели обеспечивается разная скорость оборота твёрдой и жидкой фаз, позволяя содержимому рубца расслаиваться по типу рубца животного, а материал перелива собирается из середины содержимого ферментёра (рис. 3, 4). Ферментёр поддерживает микробные популяции рубца и параметры ферментации не менее 2 недель при жидкости скорость оборачиваемости до 2/сут. Подача может быть ручной или автоматической. Механическая простота системы и низкая скорость перемешивания обеспечивают высокую надёжность и простоту эксплуатации при невысокой стоимости. Помимо простоты, преимуществом системы является то, что материал, покидающий систему, «отбирается» под действием силы тяжести. Тщательно переваренные частицы имеют тенденцию тонуть и удаляются, как и в рубце животного (Teather RM and Sauer F, 1988).

Поддержание простейших и метаногенов, а также переваривание клетчатки в непрерывной культуре, имитирующей рубец.

Hino T с коллегами разработали аналогичный Teather RM and Sauer FD (1988) аппарат и смогли поддерживать активную популяцию простейших, но он оказался довольно сложным. Помимо подсчёта простейших, было выполнено относительно немного работы по сравнению микробных популяций, поддерживаемых в этой непрерывной системе (Hino T et al., 1993).

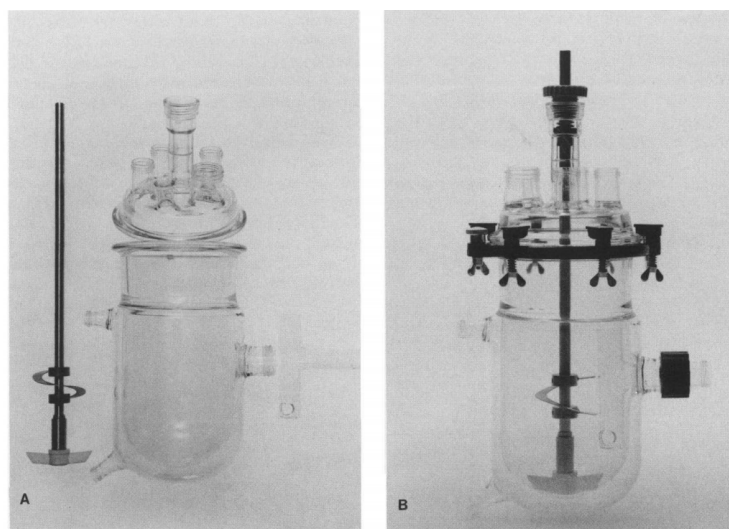


Рис. 3. – Ёмкость ферментёра в разобранном виде (А) и собранном (В); на А изображены (слева направо) мешалка с винтовой лопастью, установленная на высоте перелива, ёмкость ферментёра и верхняя часть, изготовленный по индивидуальному заказу Т-образный штуцер, выполняющий функцию перелива (Teather RM and Sauer F, 1988).

Figure 3 – Fermenter vessel disassembled (A) and assembled (B); A shows (left to right) the stirrer with a helical blade mounted at the height of the overflow, the fermenter vessel and top, and the custom fabricated 'T' fitting that serves as the overflow (Teather RM and Sauer F, 1988).

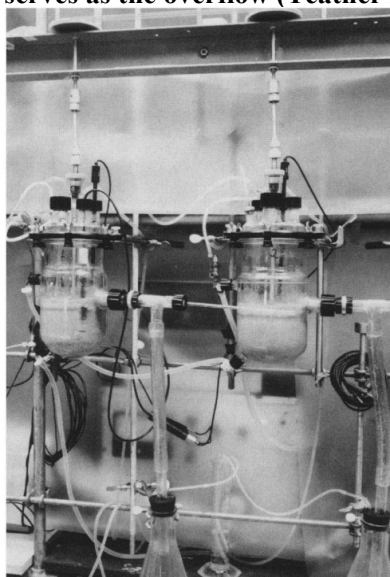


Рис. 4 – Ферментёры в сборе и работают. Переливы (рис. 3) подключены к герметичным 2-литровым колбам Эрленмейера (внизу в центре и справа). Можно увидеть линии выхода газа, идущие от верхней части колб Эрленмейера в мерный цилиндр (внизу в центре) с водой, который служит для поддержания небольшого обратного давления на систему (Teather RM and Sauer F, 1988).

Figure 4 – Fermenters assembled and operating. The overflows (Figure 3) are connected to sealed 2-L Erlenmeyer flasks (bottom center and right). The gas exit lines can be seen coming from the top of the Erlenmeyer flasks to a graduated cylinder (bottom center) containing water, which serves to maintain a slight back pressure on the system. Note the stratification of the fermenter solids content into floating, suspended, and sedimented components (Teather RM and Sauer F, 1988).

Оценка стратифицированной системы непрерывной инкубации рубца.

Muetzel S с соавторами (2009) представили систему непрерывного культивирования, основанную на системе, разработанной Teather RM and Sauer FD (1988), в которой программируемые скорости перемешивания позволяют формировать мат, аналогичный тому, который находится в рубце, для создания *de facto* системы двойного потока с разными скоростями оборота жидкости и твёрдого вещества, что помогает поддерживать популяцию простейших (рис. 5).

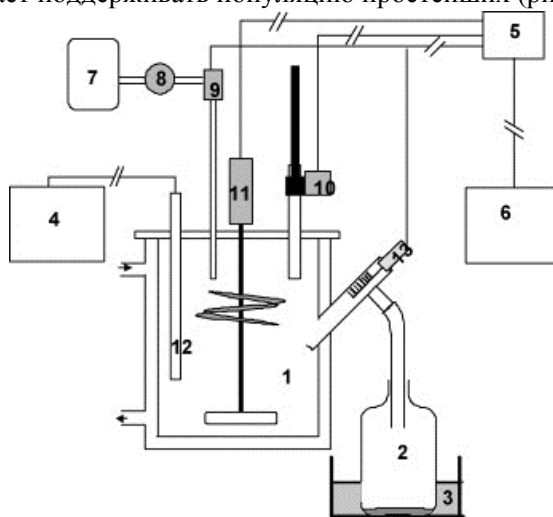


Рис 5. – Общий вид ферментёра. 1 – стеклянный сосуд с водяной рубашкой; 2 – переливная бутылка; 3 – водяная баня с охлаждением (+4 °С); 4 – ПК для регистрации pH и температуры; 5 – блок управления; 6 – ПК для управления перемешиванием, подачей и дозированием буфера; 7 – буферная ёмкость; 8 – насос для буфера; 9 – селеноидный клапан для дозирования буфера; 10 – питатель; 11 – мешалка; 12 – датчик pH/температуры; 13 – мотор-редуктор, чтобы избежать блокировки переполнения (Muetzel S et al., 2009).

Figure 5 – General layout of a fermenter. 1 – water jacketed glass vessel; 2 – overflow bottle; 3 – cooled (+4 °C) waterbath; 4 – PC for recording pH and temperatures; 5 – control unit; 6 – PC for control of stirring, feed and buffer dispensing; 7 – buffer reservoir; 8 – pump for buffer; 9 – selenoid valve for dispensing buffer; 10 – feeder; 11 – stirrer; 12 – pH/temperature probe; 13 – geared motor to avoid overflow blockage (Muetzel S et al., 2009).

Новые функции включают в себя не засоряющийся отводящий поток и компактную систему подачи с компьютерным управлением, способную доставлять измельчённые субстраты или гранулы. Система состоит из 12 ферментёрных ёмкостей с термостатическим управлением рабочим объёмом 1 л каждый. Ферментёры заполняли жидкостью рубца от двух коров и в них постоянно вводили тот же рацион, который был у животных-доноров (15 г/день в течение 3 дней, затем 10 г/день) и искусственной слюной (1 л/день). Концентрация SCFA, микробной рибосомной РНК (рРНК) и общая ферментативная активность были ниже в ферментёре, чем у животных-доноров, но пропорции SCFA остались прежними. Не было разницы в специфической активности целлюлазы, но специфическая активность ксиланазы и общее количество простейших были значительно выше в ферментёрах. Пропорции *bacterium* и *eukaryotes* (т. е. простейших и грибов) были схожими в ферментёрах по сравнению с животным-донором, но пропорция *archaea* (метаногенов) была увеличена. Общая рРНК из целлюлолитических организмов (*Chytridiomycetes*, *Fibrobacter sp.*, *Ruminococcus albus* и *R. flavefaciens*) была аналогична таковой у животных-доноров. Однако состав целлюлолитического сообщества изменился с увеличением доли *R. albus* и *Chytridiomycetes*, тогда как доля *R. flavefaciens* уменьшилась, а род *Fibrobacter* не изменился.

Несмотря на эти различия, *in vitro*-система имеет потенциал для изучения влияния компонентов корма на параметры ферментации. Основная особенность заключается в том, что данный ферментёр непрерывного культивирования позволяет формировать мат в бродильном сосуде, в котором выживают простейшие. Данная система, по-видимому, довольно хорошо отражает ферментацию в рубце с точки зрения состава конечного продукта и некоторых ферментативных активностей, но есть изменения в составе микробного сообщества, которые требуют дальнейшего изучения (Muetzel S et al., 2009).

Автоматически управляемая и непрерывная культуральная система имитации рубца.

Чтобы преодолеть недостатки устройства для имитации рубца Shen W с коллегами (2012) была разработана автоматически управляемая и непрерывная культуральная система имитации рубца, в которой твёрдый утор, жидкость и газ были сконструированы в герметичных условиях. Эта система содержит шесть блоков ферментации, каждый из которых состоит из ферментационного аппарата, устройства оттока, компонента подачи жидкости, модуля регистрации данных и управляющего компьютера. Ферментёр с рабочим объёмом 1000 ± 20 мл является центром каждой ферментационной установки, и на ферментёры устанавливаются различные датчики для контроля давления, значения pH и температуры в режиме реального времени. Переливное устройство подключается к переливной трубе ферментёра. На дне ферментёра установлен твёрдый разрядник, а на выпускном тракте – расходомер газа и детекторы CO_2 и CH_4 для измерения объёма выхлопа и содержания CO_2 и CH_4 концентрации в ферментёрах, используемых в этом исследовании.

После 10 дней тестовых экспериментов результаты показали, что значения pH во всех 4 ферментёрах были стабильными и соответствовали условиям *in vivo* с 5-го дня до конца эксперимента; количество простейших поддерживали на уровне $(0,99 \pm 0,32) \times 10^4$ ($p=0,6877$), а концентрацию $\text{NH}_3\text{-N}$ в переливаемой жидкости поддерживали стабильно на уровне $(3,91 \pm 1,10)$ мг/100 мл; скорость исчезновения общего сухого вещества, общее время выхода газа и общая концентрация летучих жирных кислот составляли $62 \% \pm 2 \%$, $(2\ 370 \pm 33)$ и $(41,77 \pm 3,78)$ ммоль/л ($p=0,488$) соответственно (Shen W et al., 2012).

Тестирование многослойной системы ферментёра непрерывного действия в рубце.

Mason F с коллегами (2015) разработали ферментёр рубца с непрерывным культивированием, который основан на предыдущих опытах Teather RM and Sauer FD (1988) и Muetzel S et al. (2009) и позволяет формировать слоистый резиновый мат в колбах за счёт щадящей системы перемешивания и слива на дне колб (рис. 6). Устройство предназначено для оптимизации условий выживания значительной популяции простейших и минимизации накопления непереваренного материала в ферментационных колбах. Кроме того, данную систему легко воспроизвести, поскольку она имеет простую конструкцию, использует недорогие материалы и не требует больших затрат на управление.

Ферментёр непрерывного действия, имитирующий работу рубца, состоит из стеклянных бутылок 8×2 л, нагретых до $+39$ °C и помещённых на водонепроницаемую магнитную мешалку. Бутылки закрываются резиновой пробкой, вставкой для притока искусственной слюны и имеют отток у дна. Отлив у дна бутылок позволяет расслаивать подаваемый материал: менее плотные частицы образуют материальный колпачок в верхней части ферментационной жидкости, полезный для поддержания анаэробного состояния жидкости и обеспечения защитной ниши для простейших, в то время как более плотный материал осаждается на дне и вытекает через выходное отверстие. Испытанный ферментёр рубца с непрерывным культивированием достигает стабильных условий ферментации после нескольких дней адаптации. Количество вводимого корма должно быть правильно подобрано, чтобы ограничить накопление непереваренных материалов в стеклянных бутылках и поддерживать характер ферментации в допустимых пределах (Mason F et al., 2015).

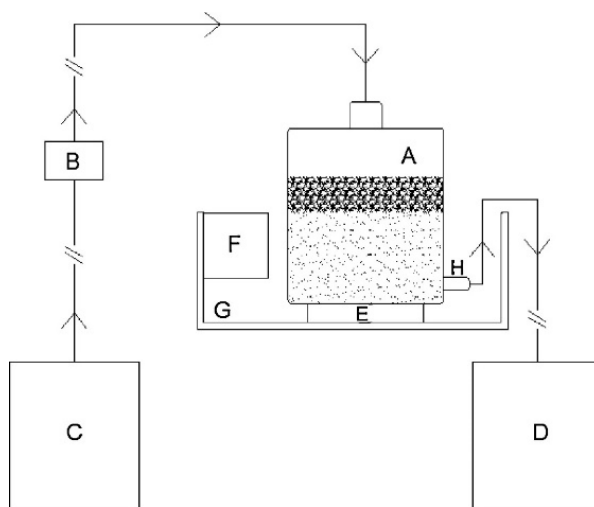


Рис. 6 – Схема ферментёра. А – стеклянная бутылка; В – перистальтический насос; С – буферный резервуар; D – сливной бак; E – магнитная мешалка; F – обогреватель; G – водяная баня; H – отток. Терминология жидкостей: ферментационная жидкость (жидкость, содержащаяся в стеклянной бутылке А), рубцовая жидкость (исходный посевной материал рубца, помещённый в стеклянную бутылку А в начале ферментации), буферный раствор (минеральная жидкость, помещённая в стеклянную бутылку А в начале ферментации и непрерывно перекачиваемая в стеклянную бутылку А из резервуара С), сточная жидкость (ферментационная жидкость вытекает из стеклянной бутылки А в резервуар D) (Mason F et al., 2015)

Figure 6 – Layout of the fermenter. A – glass bottle; B – peristaltic pump; C – buffer reservoir; D – effluent tank; E – magnetic stirrer; F – heater; G – waterbath; H – outflow. Fluids terminology: fermentation fluid (liquid contained in glass bottle A), ruminal liquid (original rumen inoculum inserted in the glass bottle A at the beginning of fermentation), buffer solution (mineral liquid inserted in the glass bottle A at the beginning of fermentation and continuously pumped in the glass bottle A from the reservoir C), effluent liquid (fermentation fluid outflowed from the glass bottle A in the tank D) (Mason F et al., 2015)

Оценка однопоточной ферментёрной системы непрерывного культивирования для определения ферментации в рубце и продукции энтерального метана.

Dillard SL совместно с соавторами (2019) была разработана 4-секционная однопоточная культуральная ферментёрная система непрерывного действия для оценки усвояемости питательных веществ *in vitro*, концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК) и ежедневного образования кишечного метана (СН₄) в рационах жвачных животных. Цель состояла в том, чтобы разработать систему с закрытыми сосудами, которая поддерживала бы популяции простейших и обеспечивала точные прогнозы общего производства СН₄. Рацион из 50 % травы садовой (*Dactylis glomerata* L.) и 50 % люцерны (*Medicago sativa* L.) скармливали в течение 4, 10-дневных периодов (7-дневная адаптация и 3-дневный сбор). Ферментёры получали 82 г сухого вещества (СВ)/день в четыре равных кормления. рН и температуру измеряли каждые 2 мин, а СН₄ концентрацию – каждые 10 мин. Ежедневно отбирали пробы для подсчёта СВ и простейших, а также ежедневно отбирали пробы сточных вод для определения концентраций СВ, ЛЖК и NH₃-N. Отсутствовало влияние ($P \geq 0,17$) адаптации по сравнению с количеством дней сбора на СВ сосуда и сточных вод, температуру или рН. Начальное количество простейших уменьшилось ($P \leq 0,01$), но восстановилось до исходного количества к периоду сбора. Общие концентрации ЛЖК, ацетата, пропионата и изобутирата не различались ($P \geq 0,13$) между периодами или днями периода сбора. Данные, собранные в течение

4 экспериментальных периодов, продемонстрировали, что система была способна достичь стабильного состояния ферментации в течение 7-дневного периода адаптации, и даже обычно переменные данные (т. е. производство CH_4) были стабильными в течение и между периодами. Хотя необходимы дальнейшие исследования для определения взаимосвязи между этой системой и данными *in vivo*. Данная система ферментёра непрерывного культивирования обеспечивает достоверное сравнение ферментации в рубце *in vitro* и энтерального образования CH_4 в рационах жвачных животных, которое затем может быть подтверждено исследованиями *in vivo* (Dillard SL et al., 2019).

Заключение.

Начиная с 60-х годов прошлого столетия исследователи изменяли конфигурацию RCF для совершенствования сохранения первичного консорциума микроорганизмов рубца животных, чтобы в дальнейшем была возможность воспроизведения и поддержания «идеальной» искусственной микробиоты. Проведя анализ эволюции технологии конструирования различных приборов, имитирующих работу рубца жвачных животных, можно сделать вывод о том, что с годами учёными был сделан большой шаг для преодоления недостатков их работы, что наглядно отражено в устройстве самых современных моделей рубцовых ферментёров непрерывного действия. Но тем не менее не все проблемы были решены, поскольку у новых аппаратов всё ещё имеются свои недоработки и недочёты и существует необходимость их дальнейшего совершенствования.

Список источников

1. Abe M, Kurihara Y. Long-term cultivation of certain rumen protozoa in a continuous fermentation system supplemented with sponge materials. *Journal of Applied Bacteriology*. 1984;56(2):201-213. doi: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb01340.x
2. Alende M, Lascano GJ, Jenkins TC, Koch LE, Volpi-Lagrecia G, Andrae JG. Technical note: comparison of 4 methods for determining *in vitro* ruminal digestibility of annual ryegrass. *Prof Anim Sci*. 2018;34(3):306-309. doi: 10.15232/pas.2017-01688
3. Amaral PM, Mariz LDS, Benedeti PDB, Silva LG, Paula EM, Monteiro HF, Shenkoru T, Santos SA, Poulson SR, Faciola AP. Effects of static or oscillating dietary crude protein levels on fermentation dynamics of beef cattle diets using a dual-flow continuous culture system. *PLoS One*. 2016;11(12):e0169170. doi: 10.1371/journal.pone.0169170
4. Belanche A, Jones E, Parveen I, Newbold CJ. A metagenomics approach to evaluate the impact of dietary supplementation with *Ascomyces nodosum* or *Laminaria digitata* on rumen function in rusitec fermenters. *Front Microbiol*. 2016a;7:299. doi: 10.3389/fmicb.2016.00299
5. 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
6. 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
7. Brandao VLN, Silva LG, Paula EM, Monteiro HF, Dai X, Lelis ALJ, Faccenda A, Poulson SR, Faciola AP. Effects of replacing canola meal with solvent-extracted camelina meal on microbial fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J Dairy Sci*. 2018;101:9028-9040. doi: 10.3168/jds.2018-14826
8. Broudiscou LP, Papon Y, Fabre M, Broudiscou AF. Maintenance of rumen protozoa populations in a dual outflow continuous fermenter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;75(3):273-280. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<273::AID-JSFA876>3.0.CO;2-8
9. Calsamiglia S, Ferret A, Devant M. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J Dairy Sci*. 2002;85(3):574-579. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74111-8

10. Cantalapiedra-Hijar G, Yáñez-Ruiz DR, Newbold CJ, Molina-Alcaide E. The effect of the feed-to-buffer ratio on bacterial diversity and ruminal fermentation in single-flow continuous-culture fermenters. *J Dairy Sci.* 2011;94(3):1374-1384. doi: 10.3168/jds.2010-3260
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. Carro MD, Ranilla MJ, Martín-García AI, Molina-Alcaide E. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal.* 2009;3(4):527-534. doi: 10.1017/S1751731108003844
13. Coleman GS. Rumen ciliate protozoa. In: Lumsden WHR, Muller R, Baker JR, editors. *Advances in Parasitology.* London New, York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press. 1980;18:121-173.
14. 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
15. Dai X, Paula EM, Lelis ALJ, Silva LG, Brandao VLN, Monteiro HF, Fan P, Poulson SR, Jeong KC, Faciola AP. Effects of lipopolysaccharide dosing on bacterial community composition and fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J Dairy Sci.* 2019;102(1):334-350. doi: 10.3168/jds.2018-14807
16. Dann HM, Ballard CS, Grant RJ, Cotanch KW, Carter MP, Suekawa M. Effects of glutamate on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of ruminal contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 2006;130(3-4):204-224. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.01.009
17. Devant M, Ferret A, Calsamiglia S, Casals R, Gasa J. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J Anim Sci.* 2001;79(7):1944-1953. doi: 10.2527/2001.7971944x
18. Dillard SL, Roca-Fernández AI, Rubano MD, Soder KJ. Evaluation of a single-flow continuous culture fermenter system for determination of ruminal fermentation and enteric methane production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2019;103(5):1313-1324. doi: 10.1111/jpn.13155
19. 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
20. 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
21. Fuchigami M, Senshu T, Horiguchi M. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *Journal of Dairy Science.* 1989;72(11):3070-3078. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79460-1
22. 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
23. Hillman K, Williams AG, Lloyd D. Evaluation of matrices in the rumen simulation technique (RUSITEC) for the maintenance of ciliate protozoa. *Lett Appl Microbiol.* 1991;12(4):129-132. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00522.x
24. Hino T, Sugiyama M, Okumura K. Maintenance of protozoa and methanogens, and fiber digestion in rumen-simulating continuous culture. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 1993;39(1):35-45. doi: 10.2323/jgam.39.35
25. Hoover WH, Crooker BA, Sniffen CJ. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous culture of rumen contents. *J Anim Sci.* 1976;43(2):528-534.

26. 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;95(9):5299-5307. doi: 10.3168/jds.2012-5533
27. Hungate RE. *The Rumen and its Microbes.* New York, London: Academic Press; 1966:533 p.
28. 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
29. Karnati SKR, Sylvester JT, Ribeiro CVDM, Gilligan LE, Firkins JL. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis *J Dairy Sci.* 2009;92(8):3849-3860. doi: 10.3168/jds.2008-1436
30. 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: 10.1371/journal.pone.0150115
31. López S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: Dijkstra J, Forbes JM, France J, editors. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* UK, Wallingford: CABI Publishing. 2005;4:87. doi: 10.1079/9780851998145.0087
32. Mansfield HR, Endres MI, Stern MD. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim Feed Sci Technol.* 1995;55(1-2):47-66. doi: 10.1016/0377-8401(95)98202-8
33. 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.* 2010;93(8):3684-3698. doi: 10.3168/jds.2009-2933
34. Mason F, Zanfi C, Spanghero M. Testing a stratified continuous rumen fermenter system. *Animal Feed Science and Technology.* 2015;201:104-109. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.01.008
35. Mateos I, Ranilla MJ, Saro C, Carro MD. Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and in batch cultures of rumen microorganisms. *J Agric Sci.* 2015;153(6):1097-1106. doi: 10.1017/S0021859615000167
36. Merry RJ, Smith RH, McAllan AB. Studies of rumen function in an in vitro continuous culture system. *Archives of Animal Nutrition.* 1987;37(6):475-488. doi: 10.1080/17450398709421063
37. Molina-Alcaide E, Pascual MR, Cantalapiedra-Hijar G, Morales-García EY, Martín-García AI. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. *J Anim Sci.* 2009;87(4):1321-1333. doi: 10.2527/jas.2008-1263
38. Moumen A, Yáñez-Ruiz DR, Carro MD, Molina-Alcaide E. Protozoa evolution in single-flow continuous culture and Rusitec fermenters fed high-forage diets. In: Papachristou TG, Parissi ZM, Ben Salem H, Morand-Fehr P, editors. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats.* Zaragoza: CIHEAM/FAO/NAGREF. 2009;85:303-308.
39. Muetzel S, Lawrence P, Hoffmann EM, Becker K. Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim Feed Sci Technol.* 2009;151(1-2):32-43. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.11.001
40. 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.
41. Shen W, Jiang Y, Wang J, Bu D, Shi H. Design and testing of rumen simulation system with discharging solid chime, liquid, and gas respectively. *T Chinese Soc Agri Eng.* 2012;28(3):20-26.
42. Slyter LL, Nelson WO, Wolin MJ. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Applied Microbiology.* 1964;12(4):374-377. doi: 10.1128/am.12.4.374-377.1964

43. Sniffen CJ, Ballard CS, Carter MP, Cotanch KW, Danna HM, Grant RJ, Mandebvu P, Suekawa M, Martin SA. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 2006;127(1-2):13-31. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.07.006
44. 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: 10.1016/j.anifeedsci.2013.06.003
45. Stewart DG, Warner RG, Seeley HW. Continuous culture as a method for studying rumen fermentation. *Applied Microbiology.* 1961;9(2):150-156. doi: 10.1128/am.9.2.150-156.1961
46. Teather RM, Sauer FD. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J Dairy Sci.* 1988;71(3):666-673. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79605-8
47. Warner ACI. Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J Gen Microbiol.* 1956;14:733-748.
48. Weller RA, Pilgrim AF. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br J Nutr.* 1974;32(2):341-351.
49. Williams AG. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol Rev.* 1986;50(1):25-49. doi: 10.1128/mr.50.1.25-49.1986
50. 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

Информация об авторах:

Мария Сергеевна Аринжанова, аспирант 1 года обучения, младший научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. проф. С.Г. Леушина, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 января д. 29, тел.: 8-922-867-57-10.

Information about the authors:

Maria S Arinzhanova, 1st year postgraduate student, Junior Researcher of Farm Animal Feeding and Feed Technology Department named after Leushin SG, Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, 29 9 Yanvarya St., Orenburg, 460000, tel.: 89228675710.

Статья поступила в редакцию 13.04.2022; одобрена после рецензирования 17.05.2022; принята к публикации 14.06.2022.

The article was submitted 13.04.2022; approved after reviewing 17.05.2022; accepted for publication 14.06.2022.