

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА У
МОЛОЧНЫХ КОРОВ И ФИЛЛОСФЕРЫ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ**

Работа завершена:

"06" 06 2019 г.

Андрей

(А.М. Харченко)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., с.н.с.

"06" 06 2019 г.

Н

(Т.В. Григорьева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"06" 06 2019 г.

М

(В.М. Чернов)

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Обзор методов секвенирования	7
1.2 Молекулярные маркеры	9
1.3 Молочное скотоводство	12
1.3.1 Современное состояние молочного скотоводства	12
1.3.2 Особенности пищеварения жвачных животных	13
1.3.3 Микрофлора рубца	14
1.3.4 Стратегии коррекции микрофлоры рубца	17
1.4 Кормовые культуры	19
Заключение	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Сбор рубцовой жидкости	23
2.2 Молекулярно-генетические методы	23
2.2.1 Выделение ДНК	23
2.2.1.1 Выделение ДНК из рубцовой жидкости	23
2.2.1.2. Выделение ДНК из растений	24
2.2.2 Электрофорез	24
2.2.3 Подготовка библиотек для Illumina MiSeq	24
2.2.3.1 Первый раунд ПЦР	24
2.2.3.2 Очистка продуктов ПЦР	25
2.2.3.3 Маркировка индексами и второй раунд ПЦР	26
2.2.3.4 Качественная и количественная проверка библиотек	26

2.2.4 Секвенирование	27
2.2.5 Биоинформатика	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ	28
3.1 Оценка влияния сезонности и условий содержания на бактериальное сообщество рубца	28
3.2 Характеристика общих и доминирующих групп бактериального сообщества рубца	30
3.3 Характеристика разнообразия бактериальных сообществ филлосферы и ризосферы кормовых растений	33
3.4. Сравнительный анализ микрофлоры рубца молочных коров и кормовых растений	38
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

ВВЕДЕНИЕ

В естественных условиях обитания нет ни одного биохимического процесса, ни одной функции живых организмов, которые осуществлялись бы без прямого или косвенного участия в них симбиотических микроорганизмов. Изучение микрофлоры рубца молочных коров и кормовых растений может позволить не только объяснить, но и помочь в решении большинства проблем животноводства [Похilenко, Перелыгин, 2007; Шендеров, 2012; Elliott *et al.*, 2018].

Появившиеся в конце 20 века высокопроизводительные методы секвенирования, в основном, применялись в исследованиях, связанных с человеком, но в связи с развитием данных методов и их удешевлением, появляются проекты и для животных [Краснов с соавт., 2014, Бочкин с соавт., 2015]. Рост спроса на продукты питания с потенциально благотворным влиянием на здоровье потребителей вызвал повышенный интерес к разработке стратегий по улучшению качества продуктов, полученных из жвачных животных [Toral *et al.*, 2018; Paz *et al.*, 2018; Huws *et al.*, 2018]. Манипулирование средой рубца позволяет модифицировать липидный состав молока и мяса [Toral *et al.*, 2018]. Помимо улучшения продуктов питания, влияние на рубцовый микробиом может помочь в решении основных проблем животноводства: высокой частоты заболеваемости и короткого срока жизни животных. Микробная ферментация рубца оказывает влияние на качество питания и физиологию животного, а также обеспечивает защиту от патогенных микроорганизмов. В связи с этим, нормализация видового состава микрофлоры для стабилизации здоровья животных является актуальной задачей.

Состав рубцовой микрофлоры зависит от различных факторов: диеты, психологического состояния, вида и географического распределения жвачных животных [Hanning, Diaz-Sanchez, 2015; Franzolin, Wright, 2016; Ji *et al.*, 2017; Petri *et al.*, 2018; Toral *et al.*, 2018]. Различные стратегии влияния на микробиом рубца были протестированы с переменным успехом, необходимы

дополнительные междисциплинарные исследования, чтобы изучить механизм действия этих вмешательств и их истинный потенциал для манипулирования микрофлорой рубца в условиях фермы [Huws *et al.*, 2018; Moallem, 2018; Toral *et al.*, 2018; Stevanović *et al.*, 2018].

Кормовые культуры составляют основную часть рациона крупного рогатого скота [Driehuis, Elferink, 2000; Pini *et al.*, 2012; Capstaff, Miller, 2018]. Подобно интенсивно изучаемой животной микробиоте, растения содержат широкий спектр разнообразных бактерий, образующих сложное биологическое сообщество [Capstaff, Miller, 2018]. Понимание взаимодействия растительной и рубцовой микрофлоры имеет решающее значение для разработки новых методологий, позволяющих повысить эффективность использования жвачных животных [Elliott *et al.*, 2018].

Данная область исследований по-прежнему нуждается в более эффективных препаратах, а также в дополнительной идентификации микроорганизмов, их роли и взаимодействии друг с другом. Подобные исследования помогут обеспечить базу знаний, необходимую для решения текущих и будущих проблем животноводства [Paz *et al.*, 2018; Moallem, 2018].

В связи с этим **цель** данной работы – охарактеризовать состав бактериальных сообществ рубца молочных коров и кормовых растений с помощью методов секвенирования нового поколения.

Задачи:

- 1) Оценить влияние сезонности и условий содержания на бактериальное сообщество рубца;
- 2) Охарактеризовать общие и доминирующие группы бактериального сообщества рубца;
- 3) Охарактеризовать разнообразие бактериальных сообществ филлосферы и ризосферы кормовых растений;
- 4) Провести сравнительный анализ микрофлоры рубца молочных коров и кормовых растений.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Харченко Анастасия Михайловна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Магистерская диссертация
Название файла	Магистерская диссертация.docx
Процент заимствования	21,70%
Процент цитирования	0,10%
Процент оригинальности	78,21%
Дата проверки	20:07:47 10 июня 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
Дата подписи	 Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.