

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

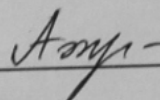
Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Бакалаврская работа

МЕТАГЕНОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ РУБЦА
ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ

Работа завершена:

«1» июня 2017 г.



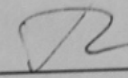
(А.М. Харченко)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

«1» июня 2017 г.

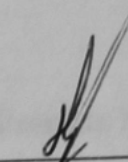


(Т.В. Григорьева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«1» июня 2017 г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Молочное скотоводство	7
1.1.1 Современное состояние молочного скотоводства	7
1.1.2 Особенности кормления высокопродуктивных коров	9
1.1.3 Лактатный ацидоз	10
1.2 Особенности пищеварения жвачных	11
1.2.1 Рубец как экологическая ниша	11
1.2.2 Микрофлора рубца	12
1.3 Пробиотики	14
1.3.1 Роль пробиотиков и пребиотиков	14
1.4 Секвенирование	17
1.4.1 Понятие о секвенировании	17
1.4.2 Преимущества секвенирования по гену 16S рРНК	18
Заключение	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Сбор рубцовой жидкости	21
2.2 Молекулярно-генетические методы	21
2.2.1 Выделение ДНК	21
2.2.2 Электрофорез	22
2.2.3 Подготовка библиотек для Illumina MiSeq	22
2.2.3.1 Первый раунд ПЦР	22
2.2.3.2 Очистка продуктов ПЦР	23

2.2.3.3 Маркировка индексами и второй раунд ПЦР	24
2.2.3.4 Качественная и количественная проверка библиотек	24
2.2.4 Секвенирование	25
2.2.5 Биоинформатика	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ	26
3.1 Общая характеристика микробного сообщества содержимого рубца	26
3.2 Особенности микробных сообществ содержимого рубца в связи с заболеваниями крупного рогатого скота	29
3.3 Влияние пробиотических препаратов на изменение микробного сообщества	33
ВЫВОДЫ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие появились новые методы исследования микробиоты, которая пока мало изучена, но имеет влияние на состояние своего хозяина. 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 ЖКТ может позволить не только объяснить, но и предотвратить большинство заболеваний [Похиленко, Перелыгин, 2007; Шендеров, 2012].

Появившиеся в конце 20 века высокопроизводительные методы секвенирования, в основном, применяются в исследованиях связанных с человеком, но в связи с развитием данных методов и их удешевлением, появляются проекты и для животных [Краснов с соавт., 2014, Бочков с соавт., 2015]. Выясняется взаимосвязь различных заболеваний и рубцовой микрофлоры жвачных животных [Wang *et al.*, 2012; Plaizier *et al.*, 2017], а также взаимосвязь последней с диетой и другими факторами среды [Goto *et al.*, 2016]. Известно, что значительная часть микроорганизмов рубца представлена некультивируемыми видами. Секвенирование нового поколения позволяет изучить микробиоту рубца, пропустив стадию культивирования на питательных средах [Лаптев с соавт., 2012].

Коровы являются одним из основных производителей молока, а в некоторых регионах ещё и главным источником белка. Проблемой молочного скотоводства является высокая частота заболеваний, связанных с поражением конечностей (21.2-24.3%), нарушением обмена веществ (22-22.9%) и пищеварения (14-14.5%), заболеваниями органов воспроизводства (8.8-13.9%), маститами (6.5%), а также коротким сроком жизни. Исследователи связывают эти нарушения с наличием в рационе питания высокопродуктивных коров большого количества крахмалистых кормов, которые помогают повысить молочную продуктивность животных, но

понижают рН среды рубца, что в дальнейшем приводит к ацидозу [Лаптев, 2007]. В связи с этим, нормализация видового состава микрофлоры для стабилизации здоровья животных является актуальной задачей. К сожалению, на данный момент недостаточно исследований по изучению микробиоты крупного рогатого скота, а также по оценке действия различных препаратов на микрофлору рубца.

Многие исследователи видят решение проблем молочного скотоводства в пробиотиках, которые улучшают качество жизни животных, оказывая регулирующее воздействие на состав микробиоты. Они не только изменяют ферментативные процессы, но и вытесняют условно-патогенную микрофлору [Ушкалова, 2007; Лаптев *с соавт.*, 2012; Imperial, Iwana, 2016]. Однако данная область исследований по-прежнему нуждается в более эффективных препаратах, а также в дополнительной идентификации микроорганизмов, их роли и взаимодействии друг с другом.

В связи с этим **цель** данной работы – охарактеризовать состав микробного сообщества с помощью методов секвенирования нового поколения.

Задачи:

- 1) Охарактеризовать разнообразие микробных сообществ содержимого рубца;
- 2) Выявить особенности микробных сообществ содержимого рубца в связи с заболеваниями крупного рогатого скота;
- 3) Охарактеризовать изменение микробного сообщества под действием пробиотиков.