

Phylogenetic tree ของเมทาโนเจนในรูเมนโคพื้นเมืองไทยกับ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

Phylogenetic tree of rumen methanogen in Thai-native cattle and Holstein cattle

ฉัตรชัย แก้วพิลา¹, Takumi Shinkai², Makoto Otsuka³, Makoto Mitsumori²,

Akio Takenaka³ และ กฤตพล สมมาตย์^{1*}

Chatchai Kaewpila¹, Takumi Shinkai², Makoto Otsuka³, Makoto Mitsumori²,

Akio Takenaka³ and Kritapon Sommart^{1*}

บทคัดย่อ: มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรเมทาโนเจนในรูเมนโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแพะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติเปรียบเทียบกับโคนมโฮลสไตน์ฟรีเซียนที่ได้รับหญ้าแห้งร่วมกับอาหารข้น โดยการสร้าง Phylogenetic tree จากห้องสมุดยีน mcrA พบว่า ยีน mcrA ที่ได้รับมีความยาวในช่วง 464-491 เบสแพร์ ซึ่งทั้งหมด 456 clones กระจายตัวออกไปภายใต้ 5 คลัสเตอร์ โดยเรียงจากมากไปหาน้อย ได้แก่ *Methanobacteriales* (64.04%), *Uncultured-mcrA* (27.19%), *Methanomicrobiales* (7.02%), *Methanosarcinales* (1.10%) และ *Methanococcales* and *Methanosphaera* (0.66%) ซึ่ง clone ส่วนมากของโคทั้งสองชนิดเป็น *Methanobrevibacter* spp. ซึ่งให้เห็นว่า ในรูเมนของโคที่นำมาศึกษามีการใช้ hydrogen, formate, iso-propanol และ iso-butanol เป็นสารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์แก๊สมีเทน แต่อย่างไรก็ตาม โคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแพะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติมี clone ที่อยู่ภายใต้คลัสเตอร์ *Uncultured-mcrA* มากกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนได้รับหญ้าแห้งร่วมกับอาหารข้น ซึ่งอาจทำให้ในรูเมนมีการสังเคราะห์แก๊สมีเทนโดยใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: แก๊สมีเทน, เมทาโนเจน, Phylogenetic tree, โคพื้นเมืองไทย, โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

ABSTRACT: The objectives of this study was to construct the phylogenetic tree by using cloned mcrA gene library of rumen methanogen of Thai-native grazing natural forage and Holstein cattle fed hay with concentrate. The results found that, 456 cloned mcrA genes ranged from 464-491 bp and contributed into 5 clusters included: *Methanobacteriales* (64.04%), *Uncultured-mcrA* (27.19%), *Methanomicrobiales* (7.02%), *Methanosarcinales* (1.10%), and *Methanococcales* and *Methanosphaera* (0.66%). The most of cloned mcrA relate to *Methanobrevibacter* spp. that indicated rumen methanogen of these cattle were using hydrogen, formate, iso-propanol, and iso-butanol as major substrates to methanogenesis. However, when considered cluster of *Uncultured-mcrA* found that Thai-native cattle grazing natural forage have mcrA-clones relative more than Holstein cattle fed hay with concentrate supplementation. Thus, in the rumen of these cattle might be difference in major substrates to methanogenesis.

Keywords: Methane, Methanogen, Phylogenetic tree, Thai-native cattle, Holstein cattle

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, 40002, Thailand

² Rumen Microbiology Laboratory Molecular Nutrition Research Team, National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agricultural and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, 305-0901, Japan.

³ Animal Production and Glass Land Division, Japan International Research Center for Agriculture Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8686, Japan.

* Corresponding author: kritapon@kku.ac.th

บทนำ

โคพื้นเมืองไทยและโคบราห์มันมีการผลิตแก๊สมีเทนอยู่ในช่วง 44-229 L/h/d หรือ 3.6-12.2 %GEI (Chaokaur, 2011) กระบวนการสังเคราะห์แก๊สมีเทนในรูเมน (methanogenesis) เกิดจากการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO₂) กับไฮโดรเจน (Hydrogen; H) อาศัยเอนไซม์ methyl-coenzyme M reductase A (mcrA) ที่ผลิตจาก *Archaea* หรือที่เรียกว่า เมทาโนเจน (Methanogen) (Friedrich, 2005) การศึกษาความหลากหลายของประชากรเมทาโนเจนช่วยให้เข้าใจนิเวศวิทยาของเมทาโนเจนในรูเมนได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งพบว่าเมทาโนเจนในรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีสัดส่วนของ *Methanobrevibacter* spp. มากที่สุด (Wright et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตาม ความหลากหลายของประชากรเมทาโนเจนในรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์และสภาพแวดล้อมด้านอาหารเป็นหลัก (Friedrich, 2005) ซึ่งในโคพื้นเมืองไทยยังมีรายงานการศึกษาย่อยอย่างจำกัด อาจมีประชากรเมทาโนเจนที่มีความเฉพาะ จึงได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

วิธีการศึกษา

สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในรูเมนจากโคโตเต็มวัยจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ โคโฮลส์ไตร์ฟรี่เชียน จำนวน 2 ตัว (อายุเฉลี่ย 6 ปี 7 เดือน) ที่ได้รับฟางข้าวแห้งร่วมกับอาหารข้นในสัดส่วน 7:3 (Group 1) และ จำนวน 3 ตัว (อายุเฉลี่ย 7 ปี 2 เดือน) ที่ได้รับหญ้า Timothy ร่วมกับอาหารข้นในสัดส่วน 4:6 (Group 2) และโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแพะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติ (Group 3) จำนวน 3 ตัว (อายุเฉลี่ย 1 ปี 10 เดือน) โคแต่ละตัวจะถูกเก็บตัวอย่างของเหลวจากรูเมนก่อนให้อาหารเข้าตัวละ 500 ml หลังจากนั้นนำ 1 ml มาสกัดเอา DNA ด้วย FastDNA kit (Q-BIO gene, Quebec, Canada) ตัวอย่างประกอบด้วย DNA ที่ได้จากโคแต่ละตัวของ Group 3 (Lib#3, Lib#4 และ Lib#5), DNA ที่ได้จากโคแต่ละตัวของ Group 1 นำมา

รวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (Lib#1) และ DNA ที่ได้จากโคแต่ละตัวของ Group 2 นำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (Lib#2) ถูกนำไปทำห้องสมุดของยีน mcrA (mcrA gene clone library) โดยใช้ไพรเมอร์ตาม Luton et al. (2002) หลังจากหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nucleotide sequencer ด้วยกระบวนการมาตรฐานแล้วในขั้นตอนต่อมา นำยีน mcrA ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Lib#1 จำนวน 94 clones จาก Lib#2 จำนวน 96 clones และจาก Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 รวมกันจำนวน 266 clones มาเรียบเรียงเพื่อให้ทราบพันธุ์และสัดส่วนในแต่ละพันธุ์ของเมทาโนเจนจากแต่ละห้องสมุดยีนโดยเปรียบเทียบกับยีน mcrA ของเมทาโนเจนที่ทราบชนิดแล้วจาก GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธีการ neighbor-joining algorithm ด้วย Kimura model โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) ซึ่งกำหนดค่า bootstrap analysis ไว้ที่ 1,000 ครั้ง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทำห้องสมุดยีน mcrA มี clone บางส่วนที่สูญเสียไประหว่างกระบวนการศึกษา พบว่า ยีน mcrA ที่ได้รับมีความยาวในช่วง 464-491 bp ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Luton et al. (2002) แสดงให้เห็นว่ายีน mcrA ที่ได้สร้างขึ้นมีความสมบูรณ์โดยความหลากหลายของเมทาโนเจนในรูเมนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงใน Figure 1 (ดู Table 1 ประกอบ) พบว่า clone ทั้งหมดกระจายอยู่ภายใต้ 5 คลัสเตอร์หลัก โดยคลัสเตอร์ *Methanobacteriales* มีจำนวน clone มากที่สุด ซึ่งมีสัดส่วนเท่ากับ 64.04% of total clone (292 clones จาก 456 clones) ในลำดับต่อมาคือ Uncultured-mcrA มีสัดส่วนเท่ากับ 27.19 % of total clone (124 clones จาก 456 clones) นอกจากนี้ clone ยังกระจายตัวอยู่ภายใต้คลัสเตอร์อื่นๆ ได้แก่ *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* และ *Methanococcales* and *Methanosphaera*

หากพิจารณาที่คลัสเตอร์ *Methanobacteriales* พบว่า clone ทั้งหมดเป็น *Methanobrevibacter* spp. ซึ่ง Lib#1 และ Lib#2 เป็น clone จากโคนมไฮลด์ ไตน์ฟรีเซียน (ที่ได้รับหญ้าแห้งร่วมกับอาหารข้น) มีสัดส่วนเท่ากับ 64.89 และ 91.67 % ตามลำดับ โดยที่ Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 มีผลในทิศทางเดียวกันคือ มีสัดส่วนเท่ากับ 53.76% (173 clones จาก 266 clones) ซึ่งให้เห็นว่า เมทาโนเจนในรูเมนของโคที่นำมาศึกษามีการใช้ hydrogen, formate, iso-propanol และ iso-butanol เป็นสารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์แก๊สมีเทน (Zinder, 1993; Miller, 1995)

Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 มี clone ที่อยู่ภายใต้คลัสเตอร์ Uncultured-mcrA เท่ากับ 39.47 % (105 clones จาก 266 clones) ซึ่งมากกว่า Lib#1 ที่มี

สัดส่วนเท่ากับ 19.15 % (18 clones จาก 96 clones) และ Lib#2 มีสัดส่วนเท่ากับ 1.04 % (1 clone จาก 94 clones) แสดงให้เห็นว่า เมทาโนเจนที่ยังไม่สามารถแยกเชื้อได้ในรูเมนของโคพื้นเมืองไทยที่ทะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติมีมากกว่า ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบสารตั้งต้นที่แท้จริงเพื่อผลิตแก๊สมีเทนของเมทาโนเจนในกลุ่มนี้ และหากพิจารณาที่คลัสเตอร์ *Methanosarcinales* พบว่า มีเฉพาะ clone ที่มาจาก Group 2 (Lib#2) เท่านั้น โดยมีสัดส่วน 5.21% (5 clones จาก 96 clones) แสดงให้เห็นว่า ประชากรเมทาโนเจนในรูเมนของโคกลุ่มนี้น้อย 5.21% มีการใช้ acetate เป็น สารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์แก๊สมีเทน (Zinder, 1993; Miller, 1995)

Table 1 The cloned methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene libraries of methanogen in the rumen samples of Thai-native cattle and Holstein cattle^{1/}.

Items	Cloned mcrA libraries		
	Group 1 (Lib#1)	Group 2 (Lib#2)	Group 3 (Lib#3, 4, 5)
Total amount of cloned mcrA sequences	94	96	266
Clone relative to cluster of			
<i>Methanococcales</i> and <i>Methanosphaera</i> (0.66% of total clone)			
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	-	2	-
Un-relative	-	-	1
<i>Methanobacteriales</i> (64.04% of total clone)			
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	37	36	114
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1	9	47	3
<i>Methanobrevibacter woesei</i>	-	2	-
Un-relative	15	3	26
Uncultured-mcrA (27.19% of total clone)			
Bovine Rumen Clone CLI12	16	-	57
Bovine Rumen Clone CLI34	2	-	35
Bovine Rumen Clone CLI52	-	-	9
Wallaby Foregut Clone TWM-NOV.04	-	1	-
Un-relative	-	-	4
<i>Methanosarcinales</i> (1.10% of total clone)			
<i>Methanosaeta concillii</i>	-	2	-
Un-relative	-	3	-
<i>Methanomicrobiales</i> (7.02% of total clone)			
<i>Methanomicrobium mobile</i>	15	-	17

^{1/}Group 1, Group 2, and Group 3 were Holstein cattle which fed rice straw plus with concentrate (7:3), Holstein cattle fed timothy grass hay with concentrate (4:6), and Thai-native cattle grazing natural forage, respectively.

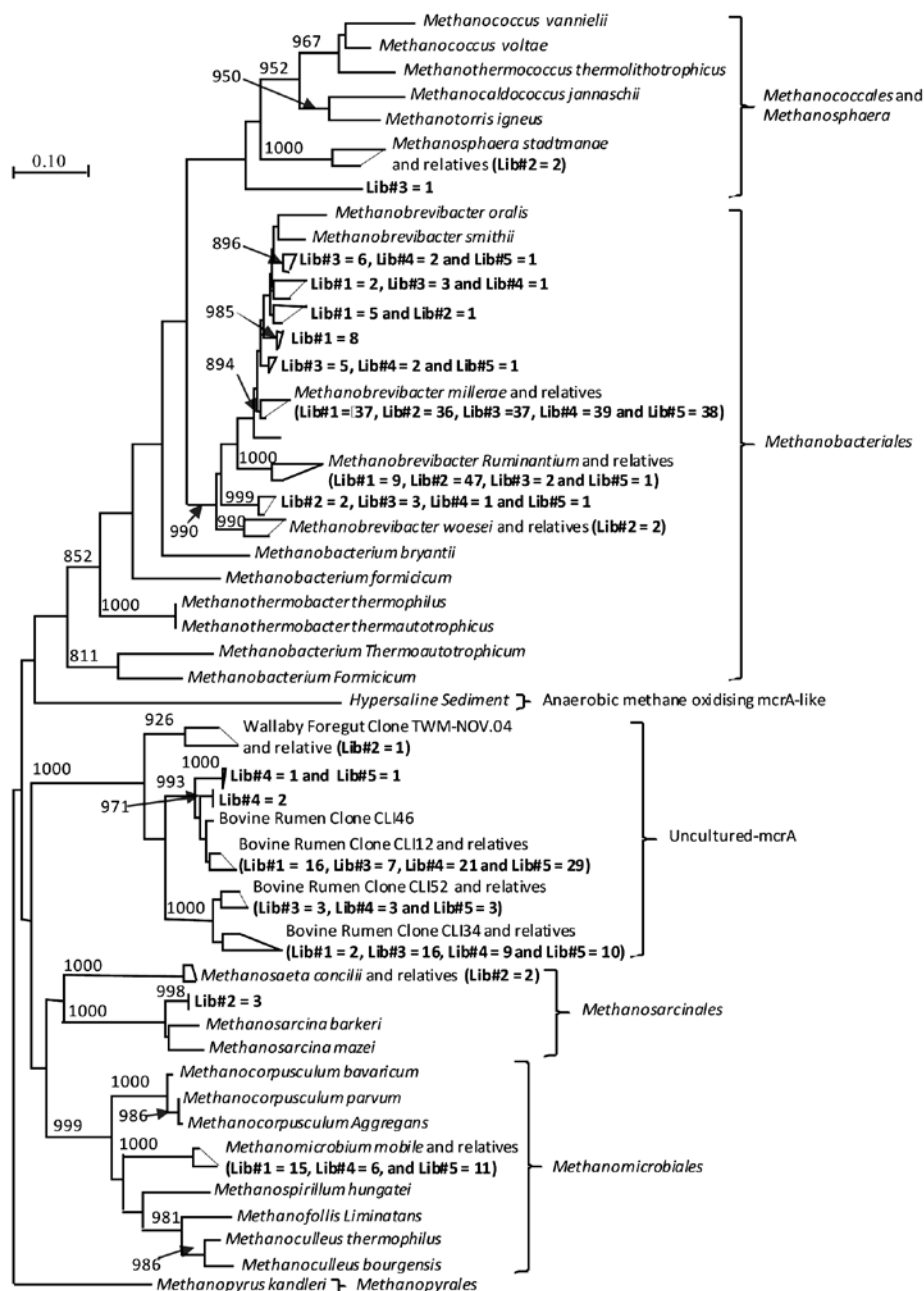


Figure 1 Phylogenetic tree indicating the relationship among 456 methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene sequences of cloned rumen samples libraries which are indicated in boldface text (Lib#1 = Holstein cattle fed rice straw with concentrate (7:3) included 94 cloned mcrA sequences, Lib#2 = Holstein cattle fed timothy grass hay with concentrate (4:6) included 96 cloned mcrA sequences, and Lib#3 + Lib#4 + Lib#5 = Thai-native cattle grazing natural forage included 266 (from 83 + 87 + 96, respectively) cloned mcrA sequences), with known methanogen sequences in GenBank. *Methanopyrus kandleri* was selected as outgroup (bootstrap values <800 not shown). The scale bar indicates 0.10 inferred nucleotide substitutions per position.

สรุป

เมทาโนเจนในรูเมนของโคที่ถูกนำมาศึกษา มีสัดส่วนประชากรของ *Methanobrevibacter* spp. มากที่สุด ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ hydrogen, formate, iso-propanol และ iso-butanol เป็นสารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์แก๊สมีเทน และเมทาโนเจนในรูเมนของโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแพะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติมีสัดส่วนของเมทาโนเจนที่ยังไม่สามารถแยกเชื้อได้สูงกว่าโฮลส์เตนฟรีเซียนที่ได้รับหญ้าแห้งร่วมกับอาหารข้น ซึ่งอาจทำให้มีกระบวนการสังเคราะห์แก๊สมีเทนโดยใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, National Institute of Livestock and Grassland Science และ Japan International Research Center for Agriculture Sciences สำหรับการสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Chaokaur, A. 2011. Current status of methane emission from cattle in Thailand. Page 197 in: Proc. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), Suranaree University of Technology, Nakorn Ratchasima, Thailand.
- Friedrich, M.W. 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing *Archaea*. *Methods Enzymol.* 397:428-442.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microb.* 148:3521-3530.
- Miller, T. L. 1995. Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. Page 317 in: W. von Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves, and D. Giesecke (eds), *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
- Wright, G. A-D., X. Ma, and N. E. Obispo. 2008. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep in Venezuela. *Microb. Ecol.* 56:390-394.
- Zinder, S. H. 1993. Physiological ecology of methanogens. Page 128 in: J. G. Ferry (ed), *Methanogenesis*, Chapman and Hall, NY., USA.