

ความหลากหลายของจุลินทรีย์และนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของกระบือปาล์ก ที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด

Microbial Diversity and Rumen Ecology of Swamp Buffalo Fed Rice Straw or Fresh Para Grass

สุริยะ สะวานนท์^{1/*} สาธกา อินทะเวียง^{1/} ภูมพงศ์ บุญแสน^{1/} และ พริมา พิริยางกูร^{2/}
Suriya Sawanon^{1/*}, Sataka Intawiang^{1/}, Phoompong Boonsaen^{1/} and Pharima Phiriyangkul^{2/}

^{1/}ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{1/}Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{2/}คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{2/}Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: Email: agrsusa@ku.ac.th

(Received: 11 February 2016; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: The diversity and population of ruminal bacteria present in the rumen of swamp buffaloes fed rice straw or para grass (*Brachiaria mutica*). Total DNA were extracted from the rumen digesta of 4 swamp buffaloes fed rice straw or para grass. The diversity of bacteria was analyzed by PCR amplification and 16S rDNA clone library sequences. The bacteria population was determined by real-time PCR technique. The 16S rDNA sequences (1,500 bp) of clones were completely sequenced and subjected to a BLAST. In buffaloes fed rice straw, the 102 clones, 49.02% (50 clones) of the clone showed >97% sequence similarity with known isolates, for the remaining 50.98% (52 clones) had <97% similarity. The majority of clones fell into Low G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) and Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) (71.57 and 10.25%, respectively). In buffaloes fed fresh para grass, the 109 clones, 40.37% (44 clones) of the clone showed >97 % sequence similarity with known isolates, for the remaining 59.63% (65 clones) had similarity <97%. The majority of clones fell into LGCGPB and CFB (56.88 and 31.19%, respectively). The population of major groups of known bacteria in the rumina of buffalo fed rice straw or fresh para grass were similar.

Keywords: Swamp buffalo, 16S rDNA clone libraries, rice straw, para grass

บทคัดย่อ: การศึกษาความหลากหลาย และจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยใช้กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่เจาะกระเพาะรูเมน ทำการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนเพื่อนำมาสกัด DNA ของแบคทีเรียและนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR และการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA (1,500 bp) ทำการหาจำนวนประชากรของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค real-time PCR และนำลำดับเบสของยีน 16S rDNA ที่ได้จากการโคลนมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยวิธี on line BLAST จากการสุ่มโคลนของยีน 16S rDNA จากกระเพาะรูเมนของกระบือที่กินฟางข้าว จำนวน 102 โคลน พบโคลนที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 49.02 เปอร์เซ็นต์ (50 โคลน) และแบคทีเรียที่มีความเหมือนน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 50.98 เปอร์เซ็นต์ (52 โคลน) ของแบคทีเรียทั้งหมดในห้องสมุดยีน แบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบ คือ แบคทีเรียกลุ่ม Low G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) คิดเป็น 71.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การโคลนยีน 16S rDNA จากกระเพาะรูเมนของกระบือที่กินหญ้าขนสด จำนวน 109 โคลน พบโคลนที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูล มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 40.37 เปอร์เซ็นต์ (44 โคลน) และแบคทีเรียที่มีความเหมือนน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 59.63 เปอร์เซ็นต์ (65 โคลน) ของแบคทีเรียทั้งหมดในห้องสมุดยีน แบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบ คือ แบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB คิดเป็น 56.88 เปอร์เซ็นต์ จำนวนประชากรของแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบได้บ่อยในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: กระบือปลัก ห้องสมุดยีน 16S rDNA ฟางข้าว หญ้าขน

คำนำ

อาหารหยาบเป็นอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เคี้ยวเอื้อง อาหารหยาบที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไปจะเกิดการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน โดยการทำงานของจุลินทรีย์ และได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันระเหยง่าย แร่ธาตุ วิตามิน และโปรตีนจากเซลล์จุลินทรีย์สารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้ สัตว์เคี้ยวเอื้องจะนำไปใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิต และให้ผลผลิต เช่น เนื้อและน้ำนม ในกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน จุลินทรีย์มีส่วนสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการหมักย่อยสลายอาหาร และเป็นแหล่งโปรตีนให้กับตัวสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ที่มีจำนวนประชากรสูงที่สุดถึง 10^{10} - 10^{11} เซลล์/มล. (Makkar and McSweeney, 2010) โดยที่ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสัตว์ สภาพแวดล้อม และอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (สุริยะ, 2551) แบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอาหารในกระเพาะรูเมนจะมีความจำเพาะกับสารอาหารแต่ละชนิด เช่น แบคทีเรียกลุ่มย่อยเยื่อใย (fibrolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อย

โปรตีน (proteolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อยแป้ง (amylolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มย่อยไขมัน (lipolytic bacteria) เป็นต้น

กระบือปลักเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของระบบทางเดินอาหารของกระบือเองที่มีศักยภาพในการย่อยอาหารที่ดีเมื่อเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น (เมธา, 2552) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและมีศักยภาพในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดี อย่างไรก็ตามการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในกระเพาะรูเมนไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้เพียง 20-30 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่อาศัยในกระเพาะรูเมน (สุริยะ, 2551) เมื่อเปรียบเทียบกับ

การใช้เทคนิคการหาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA (Dengdi *et al.*, 2005) ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียแต่ละชนิด ทำให้สามารถนำข้อมูลของยีน 16S rDNA ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (Fukuma *et al.*, 2012) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบบนิเวศและปริมาณประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิคการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA และจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่สำคัญบางชนิดในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าว หรือหญ้าขนสด

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์และอาหารทดลอง

กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย ที่เจาะกระเพาะรูเมน (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 425.8 ± 22.5 กก.) จำนวน 4 ตัว เลี้ยงในคอกขังเดี่ยว (2.5×5 เมตร) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัว กระบือกลุ่มแรกได้รับฟางข้าว และกระบือกลุ่มที่สองได้รับหญ้าขนสด กระบือทั้งสองกลุ่มได้รับอาหารหยาบเพียงอย่างเดียว โดยให้อาหารอย่างเต็มที่วันละ 2 มื้อ (มื้อเช้าเวลา 8:00 น. และมื้อเย็นเวลา 17:00 น.) มีน้ำดื่ม และแร่ธาตุก้อนให้อินตลอดเวลา โดยให้อาหารทดลองเป็นเวลานาน 3 เดือน เพื่อให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีการปรับตัวเข้ากับอาหารทดลองได้ดีที่สุด และใช้เวลาในการเก็บข้อมูลต่าง ๆ เป็นเวลานาน 1 เดือน จากนั้นทำการเปลี่ยนสลับกลุ่มเพื่อให้กระบือได้รับอาหารหยาบอีกกลุ่มหนึ่ง ทำการปรับอาหารนาน 3 เดือน และทำการเก็บข้อมูลด้านต่าง ๆ นาน 1 เดือนเช่นเดียวกับครั้งแรก

การเก็บตัวอย่างในกระเพาะรูเมน และการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บตัวอย่างภายในกระเพาะรูเมน (rumen digesta) ผ่านทางช่องเปิดด้านข้างลำตัว

(cannula) ของกระบือทั้ง 4 ตัว (กลุ่มละ 2 ตัว) หลังจากให้อาหารมื้อเช้า 6 ชั่วโมง นำตัวอย่าง rumen digesta ของกระบือแต่ละตัวใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 50 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80°C องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่าง rumen digesta ของกระบือทุกตัวที่ได้รับอาหารชนิดเดียวกัน (ฟางข้าว จำนวน 4 ตัวอย่าง และหญ้าขนสด จำนวน 4 ตัวอย่าง) มาผสมรวมกันและทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction and purification by FavorPrep™ Stool DNA Isolation Mini Kit, FAVORGEN® BIOTECH CORP., Taiwan)

การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยกระทำภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์ DNA polymerase (Tag recombinant, Fermentas) ด้วยเทคนิค PCR (Lane, 1991) โดยใช้ Universal primer ดังนี้ 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' และ 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' เมื่อ M = A หรือ C และ Y = C หรือ T โดยทำปฏิกิริยาในเครื่อง MultiGene gradient thermal (Labnet, USA) ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ และทำการตรวจสอบผลผลิตของ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis และสกัดเอาชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp จากการทำ low melting agarose gel electrophoresis และสกัดเอา DNA เป้าหมาย (16S rDNA) โดยใช้ชุดสกัด OIAEK II Gel Extraction Kit (QIAGEN K.K., Japan)

การหาลำดับเบสของ 16S rDNA

ทำการโคลนยีน 16S rDNA โดยใช้ชุด InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) และใช้ *E. coli* HIT-JM109 เป็นเซลล์ให้อาศัย ทำการตรวจการเชื่อมต่อของ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิคการเลือกโคโลนีสีขาว (blue-white selection)

จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่มี DNA เป้าหมาย คือ 16S rDNA ที่มีความยาวประมาณ 1,500 bp เชื่อมต่ออยู่ โดยใช้วิธีการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิคการทำ PCR ตามวิธีการที่แนะนำใน InsTAclone™ PCR Cloning Kit จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดที่มี 16S rDNA เป้าหมายขนาด 1,500 bp ตามวิธีที่แนะนำใน Plasmid DNA Extraction Mini Sample Kit (FAVORGEN® BIOTECH CORP., Taiwan) เมื่อได้พลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์และทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อนำไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA ต่อไป

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยส่งตรวจที่ First BASE Laboratories Sdn. Bhd, Malaysia (www.base-asia.com) เมื่อได้ลำดับเบสของ 16S rDNA ทั้ง Forward และ Reverse นำมาเปรียบเทียบความถูกต้อง โดยใช้โปรแกรม Ridom Trace Edit และโปรแกรม Clustal X 2.1 นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank (BLASTn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

การทำแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ

นำเอาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการโคลน และแบคทีเรียที่อยู่ใน GenBank มาทำการ Multiple alignment และทำการเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Clustal x 2.1 และให้ค่า Bootstrap trails = 1,000 นำไฟล์ที่ได้จากโปรแกรม Clustal x 2.1 ไปเขียนแผนภูมิต้นไม้ในโปรแกรม NJPLOT (Perriere and Gouy, 1996)

การวิเคราะห์ประชากรของแบคทีเรียโดยเทคนิค real-time PCR

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (16S rDNA) โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากตัวอย่างที่ทำการสกัดได้ข้างต้นมาทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียที่สนใจ (ตารางที่ 1) เมื่อทราบความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้จากพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ

Table 1. Primer sequences for real-time PCR amplification

Bacteria	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	References
Total bacteria	[F] CCTACGGGAGGCAGCAG [R] ATTACCGCGGCTGCTGG	194	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
<i>R. albus</i>	[F] CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG [R] CCTCCTTGCGGTTAGAACA	175	Tajima <i>et al.</i> (2001)
<i>F. succinogenes</i>	[F] GGTATGGGATGAGCTTGC [R] GCCTGCCCTGAACTATC	446	Tajima <i>et al.</i> (2001)
<i>R. flavefaciens</i>	[F] TCTGGAAACGGATGGTA [R] CCTTTAAGACAGGAGTTACAA	295	Koike and Kobayashi (2001)
<i>P. ruminicola</i>	[F] GGTTATCTTGAGTGAGAGTT [R] CTGATGGCAACTAAAGAA	485	Tajima <i>et al.</i> (2001)
<i>S. ruminantium</i>	[F] TGCTAATACCGAATGTTG [R] TCCTGCACTCAAGAAAGA	513	Tajima <i>et al.</i> (2001)
<i>S. bovis</i>	[F] CTAATACCGCATAACAGCAT [R] AGAAACTTCCTATCTCTAGG	869	Tajima <i>et al.</i> (2001)
Genus <i>Prevotella</i>	[F] CACRGTAACGATGGATGCC [R] GGTCGGGTTGCAGACC	534	Koike and Kobayashi (2001)
Total Methanogens	[F] GAGGAAGGATGGACGACG GTA [R] ACGGGCGGTGTGTGCAAG	600	Loy <i>et al.</i> (2002)

แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน และนำค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอไปหาหมายที่อยู่ในตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบจำนวน 16S rDNA เริ่มต้นของแบคทีเรียที่สนใจในตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป LightCycler® 480 real-time PCR software ในการวิเคราะห์ (Koike and Kobayashi, 2001)

การศึกษาสภาวะภายในกระเพาะรูเมน

ทำการศึกษาสภาวะภายในกระเพาะรูเมนของกระบือหลังจากได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างของเหลวที่อยู่ในกระเพาะรูเมน หลังจากให้อาหารมื้อเช้า 6 ชั่วโมง จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เพื่อนำตัวอย่างของเหลวไปตรวจวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (EUTECH INSTRUMENTS pH 510, Japan) ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid, VFA) ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) รุ่น CP 3800 และปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH₃-N) ตามวิธีของอังคณา และดวงสมร (2532)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาค้นคว้านี้ใช้แผนการทดลองแบบ 2 x 2 Crossover design และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R (Windows 2.9.2)

ผลการทดลองและวิจารณ์

สภาวะภายในกระเพาะรูเมน

ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดเพียงอย่างเดียว มีค่า 7.33 หรือ 7.40 ตามลำดับ ใกล้เคียงกับ Thu and Preston (1999) รายงานว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียวและให้กินอย่างเต็มที่ที่มีค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะรูเมน เท่ากับ 7.32 ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด กรดอะซิติก กรดไพรูวิก กรดบิวทิริก รวมทั้งสัดส่วนของกรดอะซิติกต่อไพรูวิกในกระบือที่ได้รับฟางข้าวมีค่าสูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด (ตารางที่ 2) เนื่องจากฟางข้าวมีปริมาณวัตถุแห้งและผนังเซลล์สูงกว่าหญ้าขน (ปรีชา และทวีพร, 2551; Thu and Preston, 1999) ทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือหมักย่อยเยื่อใยจากฟางข้าวได้ดีกว่าหญ้าขนสด (สาธกา และคณะ, 2555) และผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ได้สูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด

กระบือที่ได้รับหญ้าขนสดมีความเข้มข้นแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนสูงกว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าว (ตารางที่ 2) ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหาร (ฟางข้าว

Table 2. Ruminal condition of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

Parameter	Rice straw	Para grass	P-value
pH	7.33 ± 0.97	7.40 ± 1.60	0.15
Ammonia nitrogen (mg %)	4.29 ± 0.65	6.56 ± 0.68	0.02
Total VFAs (mM/l)	72.74 ± 0.70	60.21 ± 1.67	0.01
- Acetate (mM/l)	33.25 ± 2.66	25.92 ± 2.18	0.01
- Propionate (mM/l)	20.08 ± 0.49	17.29 ± 0.40	0.03
- Butyrate (mM/l)	19.41 ± 1.43	17.00 ± 0.44	0.02
- Acetate : Propionate ratio	1.66 ± 0.16	1.50 ± 0.11	0.01

หรือหญ้าขนสดมีปริมาณโปรตีนรวม 2.56 และ 5.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อสัตว์กินอาหารเข้าไปโปรตีนจะถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนให้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นกรดอะมิโนจะถูกย่อยต่อไปเป็นแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมน และไนโตรเจนอีกส่วนหนึ่งได้มาจากการนำกลับเข้ามาในกระเพาะรูเมนผ่านทางน้ำลายในรูปของยูเรีย ในขณะที่กรดอะมิโนและแอมโมเนีย-ไนโตรเจนส่วนหนึ่งจะถูกจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เอง (สุริยะ, 2551) โดยปกติปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนที่ตรวจพบในกระเพาะรูเมนของกระบืออยู่ที่ 5-8 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (วันเลิศ, 2549)

ความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด

ทำการศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าว โดยทำการโคลนยีน 16S rDNA จำนวน 102 โคลน และทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยวิธี on line BLAST พบลำดับเบส 16S rDNA ของโคลนที่ได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 โคลน คิดเป็น

49.02 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบส 16S rDNA ของโคลนที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน GenBank น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 52 โคลน คิดเป็น 50.98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ในขณะที่กระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จากการทำโคลนยีน 16S rDNA จำนวน 102 โคลน พบลำดับเบสของ 16S rDNA ที่เหมือนกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 40.37 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบส 16S rDNA ที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูล น้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 59.63 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนโคลนของยีน 16S rDNA จากทั้งสองห้องสมุดยีนที่เหมือนกับแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้ว ส่วนใหญ่ คือ *Clostridium* spp. และ *Bacteroides cellulosolvens*

แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนจากกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าว หรือหญ้าขนสด (ภาพที่ 1) แผนภูมิต้นไม้นี้เป็นการนำลำดับเบสของทั้งสองห้องสมุดยีนมาทำการ align ร่วมกัน จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่มีทั้งตัวอย่างของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่กระบือได้รับฟางข้าว และหญ้าขนสดเป็นอาหารหลัก เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับอาหารหญ้าที่แตกต่างกันทั้งสองกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่ง

Table 3. Numbers of 16S rDNA clones retrieved from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass nearest know bacteria in GenBank

Nearest know bacteria	Rice straw		Para grass	
	Number of clone	%	Number of clone	%
>97% Nearest know bacteria	50	49.02	44	40.37
<i>Clostridium</i> spp.	16	15.68	11	10.09
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	10	9.80	12	11.01
<i>Pelotomaculum propionicum</i>	4	3.92	2	1.83
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	3	2.94	4	3.67
<i>Butyrivibrio hungatei</i>	3	2.94	1	0.92
<i>Ruminococcus gnavus</i>	3	2.94	2	1.83
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2	1.96	4	3.67
<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	1	0.98	2	1.83
<i>Prevotella ruminicola</i>	-	-	2	1.83
Other species	8	7.84	4	3.68
<97% Nearest know bacteria	52	50.98	65	59.63

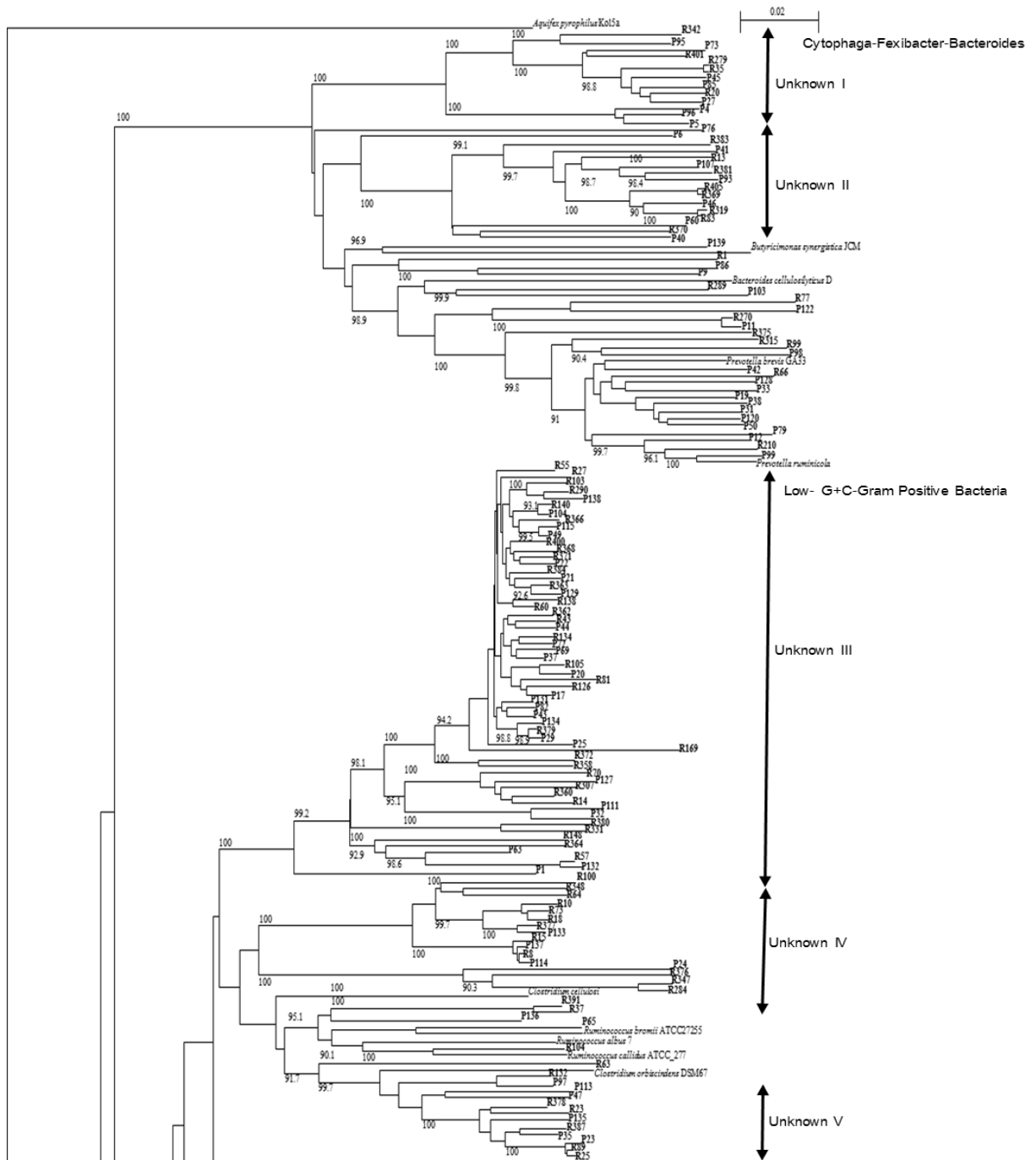


Figure 1. The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences from rumen of swamp buffalo fed rice straw (R clone number) or fresh para grass (P clone number). The tree was constructed using neighbor-joining analysis of a distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. *Aquifex pyrophilus* was used as an out-group sequence

แบคทีเรียออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือ 1) Low-G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB) 2) Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) 3) High-G+C Gram-Positive Bacteria (HGCGPB) และ 4) Spirochaetes (Tajima *et al.*, 1999)

เพียงอย่างเดียว หรือมีการเสริมอาหารขึ้นร่วมด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม LGCGPB เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด และพบกลุ่ม Unknown III มากที่สุด รองลงมาคือ Unknown IV (ตารางที่ 4) โดยพบในกระป๋องที่ได้รับฟางข้าวมากกว่ากระป๋องที่ได้รับหญ้าขนสด คิดเป็น 31.37 และ 22.94 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่ม Unknown III ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Unknown IV เท่ากับ 11.76 และ 3.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามจะพบกลุ่ม Unknown VII ในกระเพาะรูเมนของกระป๋องที่ได้รับหญ้าขนสด (9.17 เปอร์เซ็นต์) มากกว่ากระป๋องที่ได้รับฟางข้าว (3.92 เปอร์เซ็นต์) นั้นแสดงให้เห็นว่าชนิดแบคทีเรีย

Table 4. Unknown groups of 16S rDNA clones retrieved from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

Bacterial group	Clone name	
	Rice straw	Para grass
Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB)		
Unknown I	R20, R35, R279, R342, R401 (n=5)	P4, P5, P27, P45, P73, P85, P95, P96 (n=8)
Unknown II	R13, R83, R319, R369, R370, R381, R383, R405 (n=8)	P6, P40, P41, P46, P60, P76, P93, P107 (n=8)
High-G+C Gram-Positive Bacteria (HGCGPB)	R382, R22, R399, R17 (n=4)	P28, P14, P116, P48, P13, P64 (n=6)
Low-G+C Gram-Positive Bacteria (LGCGPB)		
Unknown III	R55, R27, R103, R140, R366, R400, R368, R371, R384, R290, R363, R138, R60, R360, R43, R134, R105, R81, R126, R379, R169, R372, R358, R70, R307, R360, R14, R380, R331, R148, R364, R54 (n=32)	P138, P104, P115, P49, P22, P21, P129, P44, P72, P69, P37, P20, P17, P131, P82, P43, P134, P129, P25 (n=19)
Unknown IV	R100, R348, R64, R10, P73, R18, R377, R15, R8, R376, R347, R284 (n=12)	P133, P137, P114, P24 (n=4)
Unknown V	R132, R378, R23, R387, R89, R25 (n=6)	P97, P113, P47, P135, P35, P23, (n=6)
Unknown VI	R305, R72, R40, R42, R373, R395 (n=6)	P88, P87, P26, P123, P30 (n=5)
Unknown VII	R386, R9, R312, R365 (n=4)	P18, P81, P68, P66, P130, P16, P102, P15, P10, P77 (n=10)
Spirochaetes	R68 (n=1)	P1 (n=1)

ในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะในกลุ่ม Unknown III, IV และ VII จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของอาหารหยาบที่กระบือได้รับ ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหารหยาบต่างชนิดกัน (ฟาง และหญ้าขน) จะมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ต่างกันไป ทำให้ชนิดของแบคทีเรียที่เข้ามาหมักย่อยมีความแตกต่างกันไปด้วย

ประชากรของแบคทีเรียบางชนิดในกระเพาะรูเมนของกระบือปาล์กที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด

การตรวจวัดจำนวนประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยทำการวิเคราะห์ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในกระเพาะ

รูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำนวน 8 กลุ่ม คือ แบคทีเรียทั้งหมด (total bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทน (total methanogen), *R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*, *S. ruminantium*, *P. ruminicola*, *S. bovis* และ genus *Prevotella* พบว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน โดยพบแบคทีเรียในกลุ่ม genus *Prevotella* มากที่สุด รองลงมา คือ จุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทน ในขณะที่แบคทีเรียชนิดหลักที่ย่อยเยื่อใยในกระเพาะรูเมนพบแบคทีเรีย *R. flavefaciens* ในปริมาณมากที่สุด และตามด้วย *R. albus* และ *F. succinogenes* ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับการรายงานของภูมิพงศ์ และคณะ

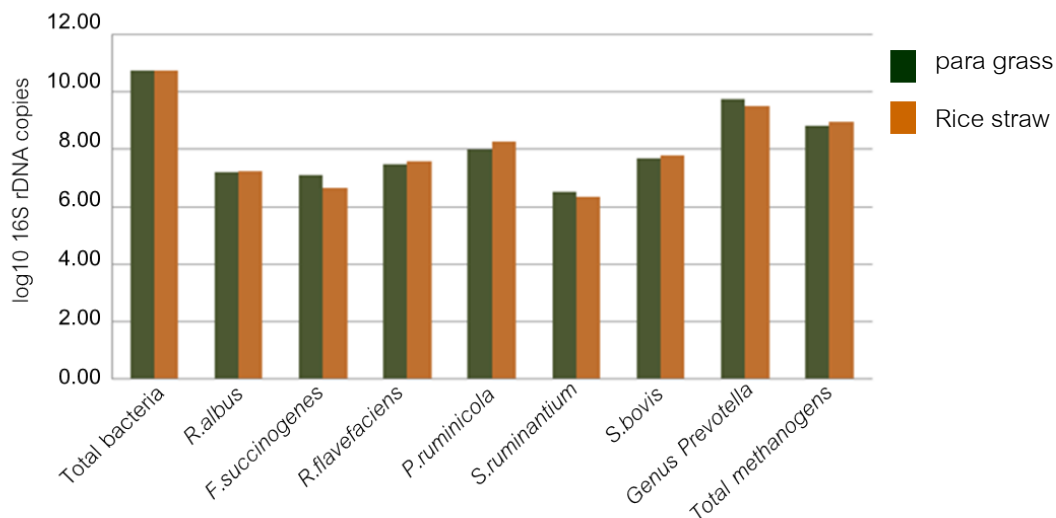


Figure 2. The population size (log10 16S rDNA copies) of total bacteria, total methanogens, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*, *S. ruminantium*, *P. ruminicola*, *S. bovis* and genus *Prevotella* from rumen of swamp buffalo fed rice straw or fresh para grass

(2553) และสมพร (2557) ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียย่อยเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวอย่างเดียว หรือได้รับฟางข้าวร่วมกับการเสริมอาหารชั้นพบแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่ทำการคัดเลือกได้ส่วนใหญ่เป็น *R. albus* และ *R. flavefaciens* แต่ไม่สามารถคัดเลือก *F. succinogenes* จากกระเพาะรูเมนของกระบือได้เลย นั้นแสดงให้เห็นว่า *F. succinogenes* เป็นแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่มีประชากรน้อยในกระเพาะรูเมนของกระบือปกติที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียว

สรุป

กระบือที่ได้รับฟางข้าวในกระเพาะรูเมนมีความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายสูง แต่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสดเนื่องจากอาหารหยาบทั้งสองชนิดมีโครงสร้างของผนังเซลล์และปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกันทำให้ผลผลิตจากการหมักย่อยของจุลินทรีย์มีปริมาณที่แตกต่างกันจากการทำห้องสมุดยีนของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่พบมากที่สุดในการเพาะรูเมนของกระบือ คือ LGCGPB โดยกระบือที่ได้รับฟางข้าวมีอัตราส่วนของ

แบคทีเรียในกลุ่ม LGCGPB สูงกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม LGCGPB เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิด ในขณะที่กระบือที่ได้รับฟางข้าวจะพบแบคทีเรียในกลุ่ม Unknown III และ Unknown IV มากกว่ากระบือที่ได้รับหญ้าขนสด นอกจากนี้ยังพบว่ากระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสดมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียในกลุ่มหลักบางชนิดใกล้เคียงกัน ในขณะที่พบจำนวนของแบคทีเรียย่อยเยื่อใย *R. flavefaciens* และ *R. albus* มากกว่า *F. succinogenes*

เอกสารอ้างอิง

- ปรีชา อินนุรักษ์ และ ทวีพร เรืองพริ้ม. 2551. การเพิ่มศักยภาพการใช้ฟางข้าวเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ภูมิพงศ์ บุญแสน สุริยะ สะวานนท์ ปรีชา อินนุรักษ์ และ พริมา พริยวงกูร. 2553. การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปกติ.

- ใน: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 48 สาขา
สัตว, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
เมธา วรณพัฒน์. 2552. การผลิตโคเนื้อและกระบือใน
เขตร้อน. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- วันเลิศ พงษ์ปุกูล. 2549. การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาของ
ฟางข้าวโดยการหมักย่อยของจุลินทรีย์ในการ
ผลิตโคเนื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- สมพร ปุ่นโก. 2557. การศึกษาความหลากหลายและการ
คัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยเยื่อ
ใยและไม่ย่อยเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของ
กระบือปลัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- สาธิตา สุริยะ สะวานนท์ พริมา พริยางกูร และสมจิตร
ถนอมวงศ์วัฒน์. 2555. การเปรียบเทียบ
ความสามารถในการย่อยเยื่อใย กิจกรรมของ
เอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณจุลินทรีย์ และสภาวะ
ของกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟาง
ข้าวกับหญ้าขนสด. ใน: การประชุมทางวิชาการ
ครั้งที่ 50 สาขา สัตว,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- สุริยะ สะวานนท์. 2551. จุลินทรีย์และเทคโนโลยีชีวภาพ
ด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน. ภาควิชาสัตว
บาล คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน, นครปฐม.
- อังคณา หาญบรรจง และดวงสมร สีนเจิมศิริ. 2532. การ
วิเคราะห์และประเมินคุณภาพอาหารสัตว์.
ภาควิชาสัตวบาล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- Dengdi, A., D. Xiuzhu and D. Zhiyang. 2005.
Prokaryote diversity in the rumen of yak
(*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos
taurun*) estimated by 16S rDNA homology
analyses. *Anarobe* 11: 207-215.
- Fukuma, N., S. Koike and Y. Kobayashi. 2012.
Involvement of recently cultured group U2
bacterium in ruminal fiber digestion
revealed by coculture with *Fibrobacter
succinogenes* S85. *FEMS Microbiology
Letters* 336: 17-25.
- Koike, S. and Y. Kobayashi. 2001. Development and
use of competitive PCR assays for the
rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter
succinogenes*, *Ruminococcus albus* and
Ruminococcus flavefaciens. *FEMS
Microbial Ecology* 204: 361-366.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. E.
Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). In:
pp. 115-175. E. Stackebrandt and M.
Goodfellow (eds.). *Nucleic Acid Techniques
in Bacterial Systematics*. John Wiley and
Sons, New York.
- Loy A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J.
Ernst, K.H. Schleifer and M. Wagner. 2002.
Oligonucleotide microarray for 16S rRNA
gene-based detection of all recognized
lineages of sulfate-reducing prokaryotes in
the environment. *Applied and
Environmental Microbiology* 68(10): 5064-
5081.
- Makkar, H.P.S. and C.S. McSweeney. 2010. *Methods
in Gut Microbial Ecology for Ruminants*.
Springer, Dordrecht.
- Muyzer, G., E.C. Waal and A.G. Uitterlinden. 1993.
Profiling of complex microbial populations
by denaturing gradient gel electrophoresis
analysis of polymerase chain reaction-
amplified genes coding for 16S rRNA.
Applied and Environmental Microbiology
59(3): 695-700.

- Perriere, G. and M. Gouy. 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.
- Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M. Nakamura, H. Matsui and Y. Benno. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbial Ecology* 29: 159-169.
- Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2766-2774.
- Thu, N.V. and T. R. Preston. 1999. Rumen environment and feed degradability in swamp buffaloes fed different supplements. *Livest. Res. Rural Dev.* 11(3): 1-7.
-