รายงานวิจัย

ความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนที่นำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส จากเมตาจีโนมของสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง

Metagenomics-based Diversity of Extremophiles and Cellulase-encoding Genes from Extreme Environments

สุดารัตน์ สวนจิตร
อภิรดี ปิลันธนภาคย์

ทุนอุดหนุนการวิจัย (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2557
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อวิจัย ความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนที่นำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส
จากเมตาจีโนมของสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง
ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร
ผศ.ดร. อภิรดี ปิลันธนภาคย์
หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปี พ.ศ. 2559

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของดินจากนาเกลือ ในจังหวัดฉะเชิงเทรา ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ทำโดยนำตัวอย่างดินป่าชายเลนมาสกัดเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป แอคติโนแบคทีเรียและอาร์เคีย รวมทั้งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribe spacer (ITS) ของยีสต์และราสาย นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปโคลนเพื่อสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA หรือห้องสมุด ITS และคัดเลือกโคลนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank บน NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria มากที่สุด (49.3 %) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (36.2 %) และไฟลัม Bacteroidetes (14.5 %) จีนัสตัวแทนที่พบโดดเด่นในกลุ่มแบคทีเรียทั่วไปคือ *Halomonas*, *Salimicrobium* และ *Salinibacter* ในขณะที่ห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรีย พบสมาชิกใน 2 จีนัส ซึ่งเป็นที่รู้จัก คือ *Streptomyces* และ *Saccharopolyspora* รวมทั้งพบแอคทิโนแบคทีเรียอีกอย่างน้อย 1 แทกซอนที่คาดว่าน่าจะเป็นจีนัสใหม่ ส่วนราสายและยีสต์ที่พบบ่อยคือจีนัส *Aspergillus* และ *Meyerozyma* ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในการค้นหายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ รวมทั้งการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ ไม่พบยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือที่นำมาศึกษาทุกตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบในลำดับต่อไป จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าถึงแม้นาเกลือเป็นระบบนิเวศที่มีสภาวะรุนแรงในด้านปัจจัยความเค็ม แต่ก็สามารถเป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย โดยจุลินทรีย์จำนวนมากมีความเฉพาะและไม่พบในสภาพแวดล้อมปกติ ทำให้มีความน่าสนใจในการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนี้ โดยเฉพาะในด้านการผลิตสารชีวภาพที่มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งหากมีการศึกษาในรายละเอียดให้มากขึ้น อาจนำไปสู่การค้นพบจุลินทรีย์แทกซอนใหม่และสารชีวภาพที่มีคุณค่า รวมถึงความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์และสารชีวภาพจากพื้นที่นาเกลือได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ นาเกลือ จุลินทรีย์ เมตาจีโนมิกส์ เอนไซม์เซลลูเลส

Research Title Metagenomics-based Diversity of Extremophiles and Cellulase-encoding Genes from Extreme Environments
Researchers Assistant Professor Sudarat Suanjit (Ph.D.)
Assistant Professor Apiradee Pilanthanapak (Ph.D.)
Organization Faculty of Science, Burapha University
Year 2016

Abstract

This research was conducted to explore microbial diversity in solar saltern located in Chachoengsao province. Samples of hypersaline soil were collected and used as a source of metagenomic DNA. A respective library of 16S rRNA gene was constructed for bacteria, actinobacteria and archaea, while the library of internal trancribed spacers (ITS) was prepared for fungi. Recombinant clones were screened and sequenced. Similarity searching of nucleotide sequences was performed on GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Bacterial distribution was found in three phyla by which Proteobacteria was the most dominant (49.3 %) followed by Firmicutes (36.2 %) and Bacteroidetes (14.5 %). The representative genera of bacteria were *Halomonas*, *Salimicrobium*, and *Salinibacter*. In the 16S rRNA library of actinobacterial phylum, two known genera were found, i.e. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora*. In addition, at least a novel genus of actinobacteria was also expected to be presented in this library. On the other hand, the ITS library demonstrated diverse fungal taxa. *Aspergillus* and *Meyerozyma* were the most abundant genera of mold and yeast, respectively. Cellulase-encoding gene was explored by metagenomics-functional screening as well as primer-specific PCR amplification. Unfortunately, the task was not successful and implementing a proper protocol is needed. Overall results taken from this investigation reflects the fact that although solar saltern is an extreme environment regarding its salinity, this ecosystem is a crucial reservoir of diverse microorganisms which many of them are unique. In depth investigation would fulfill knowledge that could benefit not only the discovery of novel taxa of microorganisms and valuable metabolites of industrial interest, but also their future applications.

Keywords: Biodiversity Solar saltern Microorganisms Metagenomics Cellulases

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ความหลากหลายของจุลินทรีย์และยีนที่นำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง (Metagenomics-based diversity of extremophiles and cellulase-encoding genes from extreme environment)” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย งบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นส่วนงานหลักที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัย ทั้งในด้านห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ รวมทั้งขอขอบคุณทุกส่วนงานในคณะวิทยาศาสตร์ และมหาวิทยาลัยบูรพา ที่มีส่วนสนับสนุนให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2559

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	
จุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง	5
เครื่องมือศึกษาความหลากหลายของแทกซอนและเอนไซม์เซลลูเลส ของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง	7
ศักยภาพทางด้านการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง	8
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินนาเกลือ	16
การค้นหายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากห้องสมุดเมตาจีโนม ของดินนาเกลือ	26
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลอง	32
อภิปรายผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
3-1	คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้ในเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือ	13
4-1	ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนจากห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในดินนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn	17
4-2	การระบุแทกซอนของแบคทีเรียทั่วไป (n=69)	18
4-3	ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรียจากดินนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn	21
4-4	การระบุแทกซอนของแอคทิโนมัยซีส (n=7)	21
4-5	ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของอาร์เคียจากดินนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn	23
4-6	การระบุแทกซอนของอาร์เคีย (n=58)	24
4-7	ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของราสายและยีสต์จากดินนาเกลือจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn	26
4-8	การระบุแทกซอนของราสายและยีสต์ (n=27)	27
4-9	จำนวนโคลน (n = 1,058) ที่ได้จากห้องสมุดเมตาจีโนมของตัวอย่างดินนาเกลือ จำนวน 5 ตัวอย่าง	31

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
2-1	การย่อยสลายเซลลูโลสโดยระบบเอนไซม์เซลลูเลส	11
4-1	จำนวนโคลนของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรีย และอาร์เคียที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม และจำนวนโคลนของจุลินทรีย์กลุ่มรา (ราสายและยีสต์) ที่ปรากฏ ในห้องสมุด ITS จากเมตาจีโนมของดินนาเกลือในจังหวัดฉะเชิงเทรา	16
4-2	ความถี่ของการพบแบคทีเรียไฟลัมต่างๆ จากโคลน ที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ซึ่งได้จากเมตาจีโนม ของดินนาเกลือในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา	17
4-3	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่พบใน เมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Kimura 2-parameter ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	20
4-4	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคทิโนแบคทีเรีย ที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัย ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	22
4-5	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอาร์เคียที่พบใน เมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณ ระยะห่างทางวิวัฒนาการ	25
4-6	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสายที่พบในเมตาจีโนม ของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
4-7	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่พบในเมตาจีโนม ของดินนาเกลือ ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณ ระยะห่างทางวิวัฒนาการ	29
4-8	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์โคลน FUNG-E04 ที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ	30

บทที่ 1
บทนำ

จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลขั้นพื้นฐานของระบบนิเวศ จุลินทรีย์ที่พบในแต่ละแหล่งอาศัยมีความหลากหลายทั้งในด้านจำนวน ชนิดและกิจกรรมเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมประเภทต่างๆ ซึ่งเป็นที่รู้จักนั้น มีหลากหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในสิ่งแวดล้อมนั้นยังมีจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมีจำนวนมากกว่า 99 เปอร์เซนต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (Streit and Schmitz, 2004; Zeyaullah *et al*., 2009) ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้ยังไม่เป็นที่รู้จักและถูกนำมาใช้ประโยชน์ นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าจุลินทรีย์เหล่านี้น่าจะเป็นแหล่งผลิตสำคัญของสารชีวภาพที่มีประโยชน์จำนวนมก เช่น เอนไซม์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวและพอลิเมอร์ชีวภาพ เป็นต้น (Davidson, 1995; Li & Qin, 2005; Egan *et al*., 2008; Satpute *et al*., 2010; Frock & Kelly, 2012)

ระบบนิเวศที่มีสภาวะรุนแรง (Extreme environment) เช่น น้ำพุร้อน (Hot spring) ปล่องไฮโดรเทอร์มอล (Hydrothermal vent) ทะเลสาบที่มีความเค็มสูง (Hypersaline lake) และนาเกลือ (Solar saltern) เป็นระบบนิเวศที่มีลักษณะจำกัดเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศเหล่านี้มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์ทั่วไปโดยเฉพาะลักษณะการปรับตัวทางด้านสรีรวิทยา การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมประเภทนี้ อาศัยหลักการของวิธีดั้งเดิมซึ่งเป็นการคัดแยกเชื้อที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้บนอาหารคัดเลือก (Cultured-dependence) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจทำให้เกิดการสูญหายของข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกดังกล่าว ดังนั้นการนำวิธีการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics) เข้ามาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเหล่านี้ เป็นการช่วยทำให้นักวิทยาศาสตร์มีโอกาสเข้าถึงจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ โดยวิธีการนี้เป็นการศึกษาเมตาจีโนมโดยตรง ไม่จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อ (Cultured independence) ข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถใช้ประกอบการตัดสินใจในอนาคต สำหรับการสร้างห้องสมุดเมตาจีโนมและคัดแยกยีนจำเพาะที่สนใจเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

การนำวิธีการทางเมตาจีโนมิกส์มาใช้ในการค้นหาเอนไซม์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ธรรมชาติของจุลินทรีย์สิ่งแวดล้อมกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายองค์ประกอบของพืชหรือเนื้อไม้ เช่น เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายลิกนิน (Lignolytic enzymes) เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (เช่น Xylanase) และเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulases) เป็นต้น (Xing *et al*., 2012) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ โดยเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืช โมเลกุลของเซลลูโลสประกอบขึ้นจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (β-1,4 Glycosidic linkage) เนื่องด้วยมีการนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ การผลิตสิ่งทอและกระดาษ เป็นต้น จึงทำให้ในอุตสาหกรรมมีความสนใจค้นหาเอนไซม์ที่สามารถ

ย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมจำนวนมาก เช่น การผลิตอาหารสัตว์ เครื่องดื่ม เบเกอรีและเยื่อกระดาษ การย่อยสลายเซลลูโลสเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ามีหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมี 3 กลุ่มด้วยกันคือ Endoglucanases (EC 3.2.1.4), Exoglucanase (EC 3.2.1.91) และ β-Glucosidase (EC3.2.1.21) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามกลุ่มนี้ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์โมโนแซคคาไรด์คือน้ำตาลกลูโคส (Lynd *et al*., 2002) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสพบได้ทั้งกลุ่มแบคทีเรีย รา รวมทั้งอาร์เคีย ซึ่งมีผู้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์และโคลนยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ในเชื้อที่แยกและเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในสิ่งแวดล้อมมีจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถถูกเพาะเลี้ยงให้เจริญในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งเชื่อว่าจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งสำคัญของสารชีวภาพชนิดต่างๆ ที่มีประโยชน์ รวมทั้งเอนไซม์เซลลูเลสที่มีคุณสมบัติใหม่ๆ หรือคุณสมบัติพิเศษ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยเฉพาะความสามารถในการดำเนินกิจกรรมและมีความเสถียรได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความรุนแรงของปัจจัยบางประการ เช่น อุณหภูมิ pH และความเค็ม เป็นต้น (Ferrer *et al*., 2007)

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ รวมถึงการคัดแยกยีนเป้าหมายที่สนใจจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ โดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (เมตาจีโนม) ของประชากรจุลินทรีย์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยตรง จากนั้นนำมาสร้างเป็นห้องสมุดเมตาจีโนม และคัดเลือกโคลนที่ต้องการจากห้องสมุดดังกล่าว (Cowan *et al*., 2005; Zeyaullah *et al*., 2009; Xing *et al*., 2012) ในอีกทางหนึ่งสามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายจำเพาะที่ต้องการได้โดยตรงจากเมตาจีโนม (Jacobsen *et al*., 2005)

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่นาเกลือซึ่งจัดเป็นสภาพแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรงในด้านความเค็ม โดยเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่นาเกลือในจังหวัดฉะเชิงเทราและเพชรบุรี จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาเตรียมเมตาจีโนม และนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย อาร์เคีย ราสาย และยีสต์ โดยยีนเครื่องหมายที่ใช้สำหรับจำแนกและศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรียและอาร์เคีย คือยีนนำรหัสการสร้าง 16S ribosomal RNA (16S rRNA gene; 16S rDNA) ส่วนการจำแนกและศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มราสายและยีสต์นั้นใช้ดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) เป็นเครื่องหมาย โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังมีความสนใจศึกษาการปรากฏอยู่และความหลากหลายของยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงศักยภาพของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่นำมาศึกษาในการใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่มีคุณสมบัติพิเศษที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

(1) เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมที่ได้จากดินนาเกลือ
(2) เพื่อค้นหายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือ

สมมติฐาน

(1) เมตาจีโนมซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างดินนาเกลือสามารถใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอแม่แบบที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้
(2) จุลินทรีย์ที่พบในนาเกลือมีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานหรือแทกซอน (Taxon) ที่แสดงความหลากหลายสูง เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัส rRNA หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS
(3) จุลินทรีย์บางแทกซอนที่อาศัยอยู่ในนาเกลือ มีความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสได้

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่นาเกลือในจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดหรือเมตาจีโนม (Metagenomic DNA; Metagenome) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยนำเมตาจีโนมมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรียและอาร์เคีย และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS สำหรับราสายและยีสต์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) จากนั้นสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA หรือห้องสมุด ITS สำหรับจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม จากนั้นนำโคลนที่ปรากฏในแต่ละห้องสมุดไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังได้ค้นหายีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือที่นำมาศึกษา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

(1) ทราบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศนาเกลือที่ศึกษา
(2) ทราบข้อมูลของยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสในระบบนิเวศนาเกลือที่ศึกษา

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

สภาพแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง (Extreme environment) หมายถึงพื้นที่หรือระบบนิเวศที่มีสภาวะของปัจจัยสิ่งแวดล้อมแตกต่างไปจากสภาวะปกติที่สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ (van de Vossenberg *et al*., 2000) ตัวอย่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน pH และความดัน เป็นต้น สิ่งมีชีวิตที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวจำเป็นต้องมีการปรับตัวในด้านโครงสร้างและ/หรือสรีรวิทยา โดยจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มสำคัญที่ทำหน้าที่ขับเคลื่อนกิจกรรมพื้นฐานต่างๆ ที่สำคัญของระบบนิเวศน์เหล่านี้ เช่น การย่อยสลายและการทำให้เกิดวัฏจักรของสารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยเรียกจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรงว่า Extremophiles ระบบนิเวศที่มีสภาวะแวดล้อมรุนแรงเป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์ที่นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากเชื่อว่ามีจุลินทรีย์ที่ยังไม่เป็นที่รู้จักอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งหมายความว่ายังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลชีวภาพอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่เป็นที่รู้จักอยู่บนจีโนมของจุลินทรีย์เหล่านี้ โอกาสของการค้นพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ รวมทั้งการค้นพบสารชนิดใหม่ที่สร้างจากจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมเหล่านี้จึงเป็นที่สนใจและท้าทายให้นักวิทยาศาสตร์เข้ามาศึกษา

1. จุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง

โดยทั่วไปสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติมักมีองค์ประกอบที่เป็นเกลือหรือความเค็มในปริมาณน้อย ระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงมักพบได้ในบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศที่ร้อนและแห้งแล้ง ซึ่งมีอัตราการระเหยของน้ำมากกว่าอัตราการรับน้ำเข้า จึงทำให้ความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น รวมทั้งทะเลและทะเลสาบซึ่งเป็นแหล่งรองรับและสะสมแร่ธาตุต่างๆ อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมบางแห่งอาจมีการสะสมของเกลือในความเข้มข้นที่สูงมากกว่าปกติ ทำให้มีความเค็มสูงมากกว่าระดับความเค็มของน้ำทะเล เช่น ในพื้นที่นาเกลือ ทำให้สภาพแวดล้อมนี้มีปัจจัยด้านความเค็มที่รุนแรง ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์โดยทั่วไป ในสภาพแวดล้อมนี้มักพบสิ่งมีชีวิตเป็นจำนวนน้อย มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเกลือสูงได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบเกลือ (Halophiles) และกลุ่มที่ทนเกลือ (Halotolerants)

1.1 จุลินทรีย์ชอบเกลือ

จุลินทรีย์ชอบเกลือ (Halophilic microorganisms) หมายถึง จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ NaCl แต่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl โดยสามารถจัดกลุ่มของจุลินทรีย์ตามความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมในการเจริญได้ดังนี้ (DasSarma, 2006)

(1) จุลินทรีย์ชอบเกลือเล็กน้อย (Slight halophiles) เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ระหว่าง 0.2-0.5 โมลาร์ (เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.2-3 %) โดยทั่วไปมีการเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือ 3 %

(2) จุลินทรีย์ชอบเกลือปานกลาง (Moderate halophiles) เจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5-2.5 โมลาร์ (เกลือโซเดียวคลอไรด์ 3-15 %)

(3) จุลินทรีย์ชอบเกลือสูง (Extreme halophiles) เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5-5.2 โมลาร์ (เกลือโซเดียมคลอไรด์ 15-30 %) โดยทั่วไปต้องการความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ระหว่าง 3-4 โมลาร์ มักมีการเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 25 % และยังเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5.5 โมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับจุดอิ่มตัวของเกลือโซเดียมคลอไรด์

1.2 ความหลากหลายของจุลินทรีย์

มีรายงานว่าประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ตามบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงมักมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสง รีดิวซ์ซัลเฟต และอื่น ๆ ดังนั้นจึงคาดว่าจุลินทรีย์ในระบบนิเวศดังกล่าวมีความหลากหลายและมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารต่างๆ จากการศึกษาของ Boutaiba, *et al*. (2011) ซึ่งใช้วิธีการทางเมตาจีโนมิกส์วิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียอาร์เคียและยูคาร์ยาในทะเลสาบ Sidi Ameur และ Himalatt Salt Lake ซึ่งมีปริมาณเกลือความเข้มข้นสูง พบว่าทั้งสองบริเวณมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียค่อนข้างสูง จากผลการศึกษาพบจุลินทรีย์กลุ่มฮาโลไฟล์ทุกไฟลัม ในขณะที่จุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาร์ยามีความหลากหลายต่ำ ในการศึกษานี้ยังพบจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียที่มีลักษณะทาง phylotype ใหม่ๆ อีกด้วย

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง ซึ่งโดยทั่วไปเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ชอบเกลือหรือชอบความเค็ม (Halophilic microorganisms) และจุลินทรีย์ทนเกลือหรือทนความเค็ม (Halotolerant microorganisms) จุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ในทั้งสามโดเมนของสิ่งมีชีวิต กล่าวคือ อาร์เคีย (Archaea) แบคทีเรีย (Bacteria) และยูคาร์ยา (Eucarya)

อาร์เคียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งถือว่ามีความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงได้เป็นอย่างดี เรียกอาร์เคียเหล่านี้ว่า ฮาโลอาร์เคีย (Haloarchaea) ที่สำคัญได้แก่ สมาชิกในออร์เดอร์ Halobacteriales แฟมิลิ Halobacteriaceae (Oren, 2002) นอกจากนี้ยังพบฮาโลอาร์เคียได้ในแฟมิลิอื่นๆ อีก 2 แฟมิลิ คือ Methanospirillaceae และ Methanosarcinaceae (Ratnakar, 2013) แฟมิลิ Halobacteriaceae ประกอบด้วยสมาชิกประมาณ 30 จีนัส ฮาโลอาร์เคียส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเค็มสูงมาก (Extreme halophile) กล่าวคือ 3.4-5 M NaCl และมีความต้องการเกลือในการเจริญอย่างน้อย 1-1.5 M NaCl อาร์เคียส่วนใหญ่ในแฟมิลีนี้มักมีการสร้างเม็ดสีแคโรทินอยด์ (Carotenoid pigments) สะสมไว้ที่เซลล์เมมเบรน ซึ่งเป็น α-bacterioruberin และอนุพันธ์ ตามทะเลสาบน้ำเค็มที่เซลล์ของอาร์เคียเหล่านี้มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย ก็สามารถทำให้สภาพแวดล้อมดังกล่าวมีสีแดงปรากฏขึ้น เซลล์ของพวกฮาโลอาร์เคียมักมีรูปร่างเป็นท่อนหลากหลายรูปทรง หรือมีรูปร่างกลม สามเหลี่ยมแบนราบ หรือสี่เหลี่ยม (Ratnakar, 2013)

สำหรับโดเมนแบคทีเรีย มีสมาชิกจำนวนมากที่จัดอยู่ในกลุ่มฮาโลไฟล์ ซึ่งพบได้ในไฟลัม Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes และ Bacterioidetes สำหรับแบคทีเรียแอนแอโรบในออร์เดอร์ Halanaerobiales (ไฟลัม Firmicutes) พบว่ามีสมาชิกทั้งหมดเป็นฮาโลไฟล์ ในพื้นที่ทะเลสาบน้ำเค็ม มักพบการก่อตัวเป็นแผ่นจุลินทรีย์ ซึ่งชีวมวลของจุลินทรีย์หลักสำคัญที่พบคือสมาชิกในไฟลัม Cyanobacteria โดยจีนัสที่มีการศึกษากันอย่างมากได้แก่ *Aphanothece*, *Spirulina* และ *Dactylococcopsis* ฮาโลไฟล์ที่อยู่ในโดเมนแบคทีเรียมักมีคุณลักษณะของความชอบเกลือในระดับปานกลาง (Moderate halophile) มากกว่าที่จะเป็นพวกที่ชอบเกลือในระดับสูง (Extreme halophile) เหมือนดังเช่นที่พบในพวกอาร์เคีย (Oren, 2002)

ในโดเมนยูคาร์ยา สามารถพบจุลินทรีย์ที่เป็นฮาโลไฟล์ได้ค่อนข้างน้อย จุลินทรีย์สำคัญที่พบได้บ่อยในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงได้แก่สาหร่ายสีเขียว *Dunaliella* สาหร่ายนี้เป็นผู้ผลิตเบื้องต้นหลักที่สำคัญทะเลสาบน้ำเค็มที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น Dead Sea เป็นต้น (Oren, 2002)

1.3 การปรับตัวของจุลินทรีย์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง

แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง เนื่องจากเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการยอมให้น้ำผ่านเข้าออกได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ทุกชนิดจึงต้องรักษาไซโตพลาสซึมของเซลล์ให้มีแรงดันออสโมติกอย่างน้อยให้เท่ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ ซึ่งโดยปกติไซโตพลาสซึมของเซลล์มีแรงดันออสโมติกมากกว่าสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์เล็กน้อย

1.3.1 การปรับตัวในระดับโครงสร้างของเซลล์

เซลล์เมมเบรนของอาร์เคียมีส่วนที่เป็น Phospholipid ซึ่งประกอบด้วย branched isoprene เชื่อมต่อกับ Glycerol ด้วย Ether group ในขณะเมมเบรนของแบคทีเรียและยูคาร์ยามีองค์ประกอบเป็น Fatty acid เชื่อมต่ออยู่กับ Glycerol ด้วยพันธะเอสเทอร์ (Ester bond) ลักษณะดังกล่าวทำให้เมมเบรนของอาร์เคียมีคุณสมบัติในการยอมให้อิออนผ่านเข้าออกเซลล์ได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียและยูคาร์ยา ดังนั้นอาร์เคียจึงมีความทนทานต่อเกลือในระดับความเข้มสูงได้มากกว่า (Oren, 2002; Ratnakar, 2013)

1.3.2 การปรับตัวในระดับเซลล์

จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าเซลล์มีการกำจัดโซเดียมอิออนออกจากไซโตพลาสซึมมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เนื่องจากโซเดียมอิออนมีอันตรายต่อเซลล์ โดยที่ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน เซลล์จุลินทรีย์มีกลไกต่างๆ ในการรักษาแรงดันออสโมติกภายในไซโตพลาสซึมให้สูงและพร้อมกันนั้นก็มีการทำให้ความเข้มข้นของโซเดียมอิออนอยู่ในระดับต่ำ กลไกที่สำคัญได้แก่

(1) การสะสม K^+ และ Cl^- เพื่อรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ เรียกกลไกนี้ว่า high salt-in พบได้ในจุลินทรีย์ไม่มากนัก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกฮาโลอาร์เคีย

ในออร์เดอร์ Halobacteriales โดยมีการสะสม KCl ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าความเข้มข้นของ NaCl ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบนอกเซลล์ สำหรับแบคทีเรีย พบกลไกนี้ได้เฉพาะในออร์เดอร์ Halanaerobiales การปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกโดยกลไกนี้ใช้พลังงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Oren, 2002; Ratnakar, 2013)

(2) การกำจัดเกลือออกจากไซโตพลาสซึมให้มากที่สุดเท่าที่ทำได้ และมีการสะสมสารประกอบอินทรีย์บางชนิดที่ทำหน้าที่ปรับสมดุลออสโมติก เรียกสารกลุ่มนี้ว่า compatible solutes สารเหล่านี้อาจมาจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบเซลล์และถูกดึงเข้าสู่เซลล์ด้วยกลไกเฉพาะ หรืออาจเป็นสารที่เซลล์สร้างขึ้น เรียกกลไกการปรับตัวในลักษณะนี้ว่า Low-salt, organic-solute-in ตัวอย่างของสารที่เป็น compatible solutes เช่น ectoine, glycine betaine, 2-sulfotrehalose และ glycerol เป็นต้น (Oren, 2002; Ratnakar, 2013)

1.3.3 การปรับตัวในระดับโมเลกุล

เมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์เกิดขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ การที่ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของเกลือสูง ทำให้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์จำเป็นต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำเนินกิจกรรมได้ การที่เซลล์มีการสะสม KCl อยู่ในไซโตพลาสซึมในความเข้มข้นระดับสูง (ระดับโมลาร์) ส่งผลทำให้ค่า Isoelectric point ของโปรตีนลดลงอย่างมาก ทำให้โปรตีนเหล่านี้ทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี

การปรับตัวของเอนไซม์ให้สามารถทำงานได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง นำไปสู่การมีคุณสมบัติใหม่ๆ ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่มฮาโลไฟล์ โดยมีการเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า Extremozymes ในปัจจุบันมีการค้นหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติใหม่ๆ จากจุลินทรีย์กลุ่มฮาโลไฟล์จากสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Oren, 2002; Ratnakar, 2013)

2. เครื่องมือศึกษาความหลากหลายของแทกซอนและเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง เช่น นาเกลือ จนถึงปัจจุบันมีค่อนข้างน้อย อีกทั้งยังไม่ได้สะท้อนให้เห็นถึงความหลากหลายที่แท้จริง เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่อาศัยเทคนิคที่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อและนำมาจัดจำแนก อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อศึกษาชนิด ปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การสร้างห้องสมุดของยีน rRNA การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเชิงปริมาณ รวมทั้งการทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH) ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อ ในกลุ่มของแบคทีเรีย เท่าที่มีรายงานไฟลัมที่เป็นที่รู้จักจนถึงปัจจุบันนั้นมี 52 ไฟลัม โดยประมาณครึ่งหนึ่งนั้นเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และมีเพียงไม่กี่พันแทกซอนเท่านั้นที่เพาะเลี้ยงและนำมาศึกษาได้ โดยในจำนวนนี้มีเพียง 4 % ที่จัดเป็นพวก Extremophiles (Ginolhac *et al*., 2004; Sogin *et al*., 2006) จากการ

วิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการของจุลินทรีย์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นได้ว่ามีจุลินทรีย์แทกซอนใหม่ๆ ที่ยังไม่เป็นที่รู้จักอีกมากอยู่ในสิ่งแวดล้อม

เมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics) เป็นการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่ผสมกันอยู่ในสิ่งแวดล้อม หรือที่เรียกว่าเมตาจีโนม (Metagenome) โดยอาศัยการตรวจสอบจากการแสดงออก (Expression) หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequences) ของยีนที่สนใจ (Riesenfeld *et al*., 2004; Iqbal *et al*., 2012) เมตาจีโนมิกส์สามารถวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด ซึ่งรวมถึงจุลินทรีย์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ด้วย วิธีการทางเมตาจีโนมิกส์ได้ถูกพัฒนาขึ้นและสามารถนำมาใช้ในการค้นหายีน สารชีวภาพ รวมทั้งบทบาทการทำงานของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Schloss & Handelsman, 2003; Streit & Schmitz, 2004)

ถึงแม้ว่าระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงจะจำกัดการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ แต่จากการศึกษาในหลายพื้นที่พบว่าระบบนิเวศที่มีความเค็มสูงก็มีความหลากหลายของจุลินทรีย์เช่นกัน เช่น Boutaiba *et al*. (2011) รายงานความหลากหลายของจุลินทรีย์ในทะเลสาบน้ำเค็ม Sidi Ameur และ Himalatt ที่ตั้งอยู่ในประเทศอัลจีเรีย โดยกลุ่มอาร์เคีย พบสมาชิกในจีนัส *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halorubrum* และ *Halosarcina* ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย พบสมาชิกแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria และ Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma- และ Delta-Proteobacteria) รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Ghai *et al*. (2011) ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมตาจีโนมจากนาเกลือ Bras del Port ประเทศสเปน โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing พบจุลินทรีย์ค่อนข้างหลากหลาย โดยแทกซอนที่โดดเด่นคือ ฮาโลอาร์เคีย *Haloquadratum walsbyi* และฮาโลแบคทีเรีย *Salinibacter ruber* จุลินทรีย์แทกซอนใหม่ที่พบได้บ่อยจัดอยู่ใน 3 กลุ่ม คือ (1) Euryarchaeon ที่มีปริมาณ G+C ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ Euryarchaeon โดยทั่วไป (2) Euryarchaeon ที่มีปริมาณ G+C สูง และ (3) Gamma-Proteobacteria ซึ่งมีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Alkalilimnicola* และ *Nitrococcus* นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานการพบแอคทิโนแบคทีเรียที่มีปริมาณ G+C ต่ำในตัวอย่างดินที่มีความเค็มปานกลาง ซึ่งมีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแอคทิโนแบคทีเรียที่พบในสภาพแวดล้อมน้ำจืด

ถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงจะมีลักษณะทางกายภาพและเคมีแตกต่างไปจากสภาพแวดล้อมปกติทั่วไป แต่ระบบนิเวศประเภทนี้ก็มีความน่าสนใจสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ชอบเกลือและจุลินทรีย์ทนเกลือ รวมทั้งเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่พึงประสงค์บางประการสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น คุณสมบัติในการทนทานต่อสภาวะที่มีน้ำน้อย การทนเกลือและ/หรือตัวทำละลาย เป็นต้น

3. ศักยภาพทางด้านการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง

จุลินทรีย์ที่เป็น Extremophiles มีความโดดเด่นในด้านความสามารถของการปรับตัวทางด้านสรีรวิทยา จึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งของการผลิตสารชีวภาพชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ แต่ข้อจำกัดจะเกิดขึ้นหากจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่สามารถถูกคัดแยกออกจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ได้ ดังนั้นการนำเมตาจีโนมิกส์เข้ามาใช้ในการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่สนใจจึงมีประโยชน์อย่างมาก นอกจากกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์จะเป็นจุดเริ่มต้นของการค้นพบ

จุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ แล้ว กระบวนการนี้ยังนำไปสู่การค้นพบยีนใหม่ๆ ที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์สำคัญชนิดต่างๆ รวมทั้งเอนไซม์เซลลูเลส

ถึงแม้ว่ารายงานเกี่ยวกับเมตาจีโนมิกส์ของยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรงยังมีไม่มากนัก แต่การปรากฏอยู่ของยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสชนิดใหม่ๆ ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ถูกค้นพบได้โดยกระบวนการทางเมตาจีโนมิกส์ ดังเช่น รายงานของ Voget *et al*. (2006) แยกยีนที่นำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสชนิดใหม่จากเมตาจีโนมของจุลินทรีย์ในดิน เอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสับเสตรทที่เป็นเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ ซึ่งพันธะ β-1,4 ภายในโมเลกุล เช่น lichenan และ β-glucan จากข้าวบาร์เลย์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ เอนไซม์นี้มีความเสถียรต่ออุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน และยังคงรักษากิจกรรมเอนไซม์ไว้ได้ถึง 86-87 % หลังจากอยู่ในสภาวะที่มีเกลือ 3 M NaCl, 3 M RbCl และ 4 M KCl เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Huang *et al*. (2010) ที่ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็น Endoglucanase จากแบคทีเรียฮาโลไฟล์ *Halomonas* sp. S66-4 (สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 2 % - 25 %) โดยพบว่ายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสชนิดนี้มีขนาด 1,053 bp แปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 350 เรสิดิวส์ ซึ่งแสดงความคล้ายคลึง 48 % กับเอนไซม์ Endoglucanase ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว ผู้วิจัยได้มีการโคลนยีนดังกล่าวและทำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ดำเนินกิจกรรมได้ดีที่ pH 5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่สำคัญ เอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถในการทนเกลือได้มากกว่า 5 M ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจาก Endoglucanase ชนิดอื่นๆ ที่เคยรายงานไว้ อีกทั้งยังมีความเสถียรมากต่อ pH ในช่วง 4-12 และอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง เช่น นาเกลือ ต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ การปรับคุณสมบัติของเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้นนับว่าเป็นปรับตัวที่สำคัญประการหนึ่ง เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในการดำเนินกิจกรรมเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ เอนไซม์ของจุลินทรีย์ในนาเกลือสามารถทำงานได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง ทั้งนี้อาจสืบเนื่องมาจากการที่เอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษต่างไปจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ โดยมีการเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า extremozymes ในปัจจุบันมีการค้นหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติใหม่ๆ จากจุลินทรีย์กลุ่มฮาโลไฟล์จากสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

3.1 ชนิดและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulases)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชและเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสจำนวนมากเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic โดยเอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ β-1,4-glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ส่วนได้แก่ ส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส (Catalytic domain) และส่วนที่ทำหน้าที่จับกับเซลลูโลส (Cellulose-binding domain) โดยทั้ง

2 ส่วนของเอนไซม์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ การเร่งปฏิกิริยาทำให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายและละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งทำให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสง่ายขึ้น (Sukumaran *et al*., 2005)

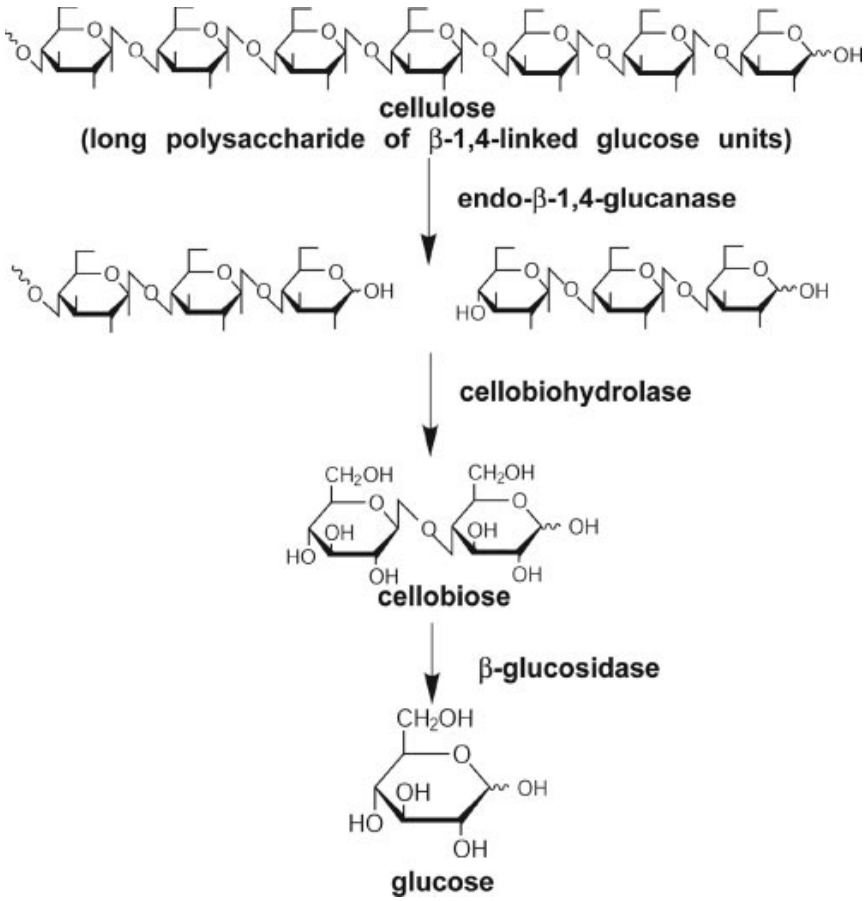
กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม หลักๆ ซึ่งทำหน้าที่ ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ได้แก่

(1) Endo-glucanase (Endo-β-1,4-glucanase, Endo-β-1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (Phosphoric swollen cellulose) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxyl methylcellulose) เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4-glycosidic แบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) (Wood, 1989) นอกจากนี้ยังทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส (Cellobiose) และกลูโคสอีกด้วย (Sharada *et al*. 2014)

(2) Exo-glucanase (Exo-β-1,4-D-glucan-4-cellobiohydrolase, E.C.3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยแยกหน่วยย่อยเซลโลไบโอส (Cellobiose) ออกจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing end) ของสายเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้เอนไซม์กลุ่มนี้ยังสามารถย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่จัดเรียงตัวเป็นระเบียบ (Microcrystalline cellulose) เช่น Avicel (Sharada *et al*., 2014; Sadhu & Maiti, 2013)

(3) β-1,4-Glucosidase หรือ Cellobiase (E.C.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส (Cellobiose) และเซลโลแดกซ์ทริน (Cellodextrin) ที่ละลายน้ำได้ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (Shewale, 1982; Ryu & Mandels, 1980)

การย่อยสลายเซลลูโลสที่สมบูรณ์จะเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสแสดงดังภาพที่ 2-1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งได้ด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกล่าวคือ ถ้ามีปริมาณของกลูโคสที่ผลิตได้มากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -Glucosidase ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของเซลโลไบโอส เมื่อเซลโลไบโอสมีปริมาณมากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นได้ช้าลง และปฏิกิริยาจะหยุดลงในที่สุด (Xie *et al*., 2007; Sharada *et al*., 2014)



ภาพที่ 2-1 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยระบบเอนไซม์เซลลูเลส
(ที่มา : Xie *et al*., 2007)

3.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชอบเกลือและจุลินทรีย์ทนเกลือ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมที่หลากหลาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอกและน้ำยาปรับผ้านุ่ม รวมทั้งในปัจจุบันมีความสนใจนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาล สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตเอทานอลต่อไป

Halocella cellulolytica เป็นแบคทีเรียฮาโลไฟล์ชนิดแรกที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Simankova *et al*., 1993) หลังจากนั้นเป็นต้นมา มีนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชอบเกลือและ/หรือทนเกลือกันมากขึ้น เช่น *Bacillus* (Aygan *et al*., 2008) *Bacillus aquimaris* VITP4 (Thaz *et al*., 2015) *Salinivibrio* sp. (Wang *et al*., 2009) และ *Halomonas* sp. (Huang *et al*., 2010) เป็นต้น และเมื่อมีการพัฒนาเทคนิคทางด้านเมตาจีโนมิกส์ ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการค้นหา ศึกษาและคัดเลือกข้อมูลของยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากห้องสมุดเมตาจีโนม (Metagenomic library) โดยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์โดยตรง (Voget *et al*., 2006) ทำให้การค้นหาและคัดเลือกเอนไซม์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมมีความสะดวก รวมทั้งการนำเอนไซม์ที่ได้มาดัดแปลงตามต้องการยังสามารถทำได้โดยไร้ขีดจำกัด

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ชอบเกลือมักมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic amino acids) อยู่ในสัดส่วนสูง ส่งผลให้บริเวณผิวหน้าของเอนไซม์มีประจุลบอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้เอนไซม์มีความยืดหยุ่นและไม่เกิดการเกาะกลุ่มในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงดังเช่นที่เกิดกับเอนไซม์ที่มาจากจุลินทรีย์ปกติ (Ventosa *et al*., 2011) ในปัจจุบันมีความสนใจศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชอบเกลือและจุลินทรีย์ทนเกลือ การที่เอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น เสถียรต่ออุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นด่าง ทำให้เป็นข้อดีในการเป็นตัวเลือกสำหรับการประยุกต์ใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. ตัวอย่างดินนาเกลือ

เก็บตัวอย่างดินจากนาเกลือในจังหวัดฉะเชิงเทรา (เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556) โดยสุ่มเก็บจากบริเวณต่างๆ จำนวน 5 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 ºC ระหว่างการขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างทั้งหมดมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ºC จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากตัวอย่างตะกอนดิน ทำโดยนำดิน 5 กรัม มาบดให้ละเอียดในสภาวะที่ใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Soil sample DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)

3. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินนาเกลือ

3.1 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

คู่ไพร์เมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA จากเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนมัยซีสและอาร์เคีย และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราสายและยีสต์ แสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 คู่ไพร์เมอร์ที่ใช้ในเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือ

ยีน/ดีเอ็นเอเป้าหมาย	ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'... 3')	ขนาดแอมพลิคอน (~bp)	อ้างอิง
16S rRNA gene (แบคทีเรีย)	MAS2F MAS1R	TCCTGGCTCAGATTGAACGCT CTTGTTACGACTTCACCCCAG	1,500	การศึกษานี้
16S rRNA gene (แอคทิโนมัยซีส)	ACT-F ACT-R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG AGAAAGGAGGTGTACCAGC	1,500	การศึกษานี้
16S rRNA gene (อาร์เคีย)	ARC-F ARC-R	TTCCGGTTGATCCCGCCGGA GGGTGTGTGCAAGGGGC	1,500	การศึกษานี้
ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 (ราสายและยีสต์)	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	600-650	White *et al.* (1990)

นำเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอที่เตรียมได้ (ข้อ 2) มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยผสมองค์ประกอบต่างๆ ตามลำดับ ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร องค์ประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้ 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM, Deoxynucleoside triphosphate ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) ชนิดละ 0.2 mM, ไพร์เมอร์ (แต่ละสาย) 0.5 µM, *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) 2.5 ยูนิต และดีเอ็นเอแม่แบบ (10 ng/µl) ปริมาตร 5 µl เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย (16S rRNA หรือ 18S rRNA) ในเครื่อง DNA thermal cycler (Biometra® *T*Gradient) โดยดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 ºC 3 นาที ตามด้วยขั้นตอน Denaturation ที่ 94 ºC 45 วินาที Annealing ที่ 55 ºC 30 วินาที และ Extension ที่ 72 ºC 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส (1.2 % agarose gel; 1X TAE buffer) เก็บสารละลายจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป โดยดำเนินการตามวิธีที่ระบุในชุด Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA)

3.2 การสร้างห้องสมุดยีน rRNA และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน rRNA ที่ได้จากการใช้เมตาจีโนมเป็นแม่แบบและผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy (Promega) นำดีเอ็นเอที่ได้เคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อแล้วเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM109 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี blue-white screening บนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar ที่ผสม IPTG และ X-gal เก็บโคลนสีขาวทุกโคลน (ซึ่งคาดว่าเป็นรีคอมบิแนนท์โคลน) พร้อมทั้งนำไปเก็บรักษาในอาหาร LB broth ที่ผสมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 %

นำรีคอมบิแนนท์โคลนมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิด (รีคอมบิแนนท์พลาสมิด; pGEM®-T Easy + insert) โดยใช้ชุดสกัด PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนพลาสมิดโดยวิธีการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (เรสทริกชันเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการตัดเพื่อปล่อยชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนพลาสมิดออกมาเป็นอิสระ ได้แก่ *Bst*ZI, *Eco*RI และ *Not*I ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ *Eco*RI)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ผ่านการตรวจยืนยันขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนโมเลกุลส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งอยู่ภูบน NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่ในห้องสมุดยีน rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์เปรียบเทียบในลักษณะเป็นคู่ (Pairwise analysis, PSA) โดยในการศึกษานี้ใช้ค่า similarity cutoff สำหรับแทกซอนระดับจีนัสและสปีชีส์ที่ 97 % และ 99 % ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของจุลินทรีย์

คัดเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rRNA ของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือรวมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงในระดับต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่กำลังศึกษาจากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) โดยจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้อยู่ในรูปแบบ Fasta (Fasta format) พร้อมกับบันทึกไฟล์ด้วยโปรแกรม Notepad จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คัดเลือกมาทำการจัดเรียงแบบ Multiple sequence alignment (MSA) โดยใช้โปรแกรม ClustalW ผ่านทางโปรแกรม BioEdit นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการทำ MSA แล้วมาคัดเลือกบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นข้อมูล (Informative site) ด้วยโปรแกรม Gblock และนำไฟล์ข้อมูลจาก Gblocks มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิไฟโลแกรม (Phylogram) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 เลือกทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrapping (1,000 ซ้ำ)

3.4 การยืนยันแทกซอน

ยืนยันแทกซอนของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมที่ศึกษา โดยใช้ระดับความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเครื่องหมาย 97 % ในการระบุแทกซอนระดับจีนัส และ 99 % สำหรับระบุแทกซอนระดับสปีชีส์ ร่วมกับข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

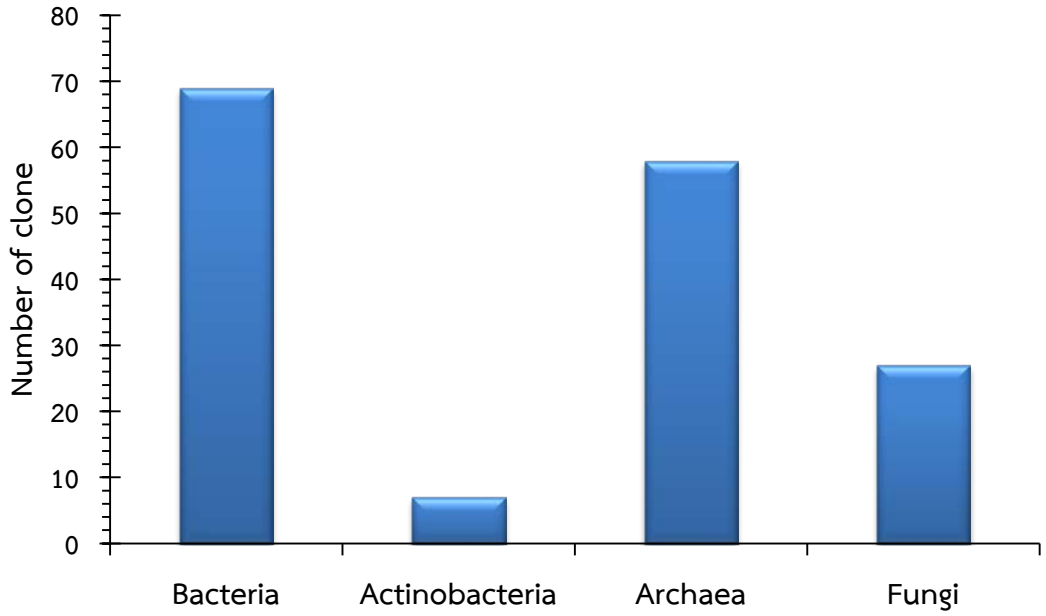
4. การค้นหายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสบางส่วนจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือ

นำตัวอย่างเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ จากนั้นเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pUC19 แล้วนำมาทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยวิธี Blue-white screening จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โคลนทั้งหมดมาตรวจคัดกรองกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบบจุด (Point inoculation) บนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar และย้อมด้วย 0.1 % Congo red ตรวจสอบการเจริญและการปรากฏของโซนใสรอบโคโลนี

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ตอนที่ 1 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินนาเกลือ

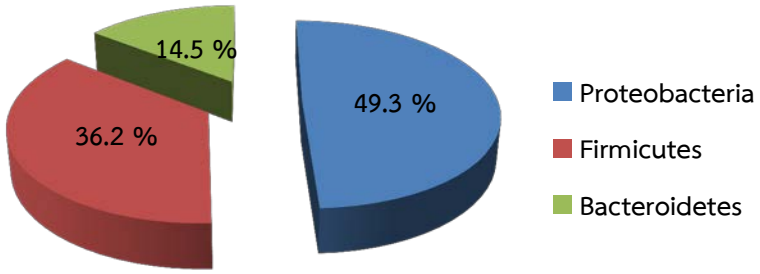
จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์จากเมตาจีโนมของตัวอย่างดินที่เก็บมาจากพื้นที่นาเกลือ ในจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนมัยซีสและอาร์เคีย ซึ่งมีจำนวนโคลนเท่ากับ 69, 7 และ 58 โคลน ตามลำดับ รวมทั้งสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอในส่วน ITS ของราสายและยีสต์ ซึ่งมีจำนวน 27 โคลน ดังแสดงในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 จำนวนโคลนของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรียและอาร์เคียที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม และจำนวนโคลนของจุลินทรีย์กลุ่มรา (ราสายและยีสต์) ที่ปรากฏในห้องสมุด ITS จากเมตาจีโนมของดินนาเกลือในจังหวัดฉะเชิงเทรา

1. แบคทีเรียทั่วไปและแอคทิโนแบคทีเรีย

เมื่อนำโคลนที่ปรากฏอยู่ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของกลุ่มแบคทีเรียทั่วไปและแอคทิโนแบคทีเรียไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแทกซอนของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในไฟลัม Proteobacteria (49.3 %) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (36.2 %) และไฟลัม Bacteroidetes (14.5 %) ดังแสดงในภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ความถี่ของการพบแบคทีเรียไฟลัมต่างๆ จากโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดยีน 16S rRNA ซึ่งได้จากเมตาจีโนมของดินนาเกลือในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา

1.1 ความหลากหลายของแทกซอนและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั่วไป

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป ประมาณ 98-100 % ของแต่ละข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST (blastn) พบว่าข้อมูลของแบคทีเรียจากดินนาเกลือที่ศึกษาแสดงความคล้ายคลึงกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ในระดับที่สูงถึง 98-100 % ตารางที่ 4-1 เป็นผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากโคลนที่เลือกเป็นตัวแทนในการนำเสนอ โดยกำหนดให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความคล้ายคลึงกันตั้งแต่ 97 % และ 99 % ขึ้นไป ถือว่าเป็นแทกซอนระดับจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน ตามลำดับ โดยในการศึกษานี้พบแบคทีเรียที่แตกต่างกันอย่างน้อย 18 สปีชีส์

ตารางที่ 4-1 ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนจากห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในดินนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn

No.	Representative clone	% Max identity	Closest reference (GenBank database)	Accession no.
1	BACT-A01	100	Uncultured Rhodobacteraceae EG17	AM691091
2	BACT-A11	99	*Halomonas aquamarina* DSM 30161	NR_042063
3	BACT-A12	99	*Cellulophaga* sp. AB261d	FR821159
4	BACT-A17	100	*Salimicrobium halophilum* C8-1	EU868887
5	BACT-B01	99	*Halomonas aquamarina* S6-07	EU624431
6	BACT-B10	98	*Nitrococcus mobilis* (ATCC 25380)	L35510
7	BACT-B13	98	*Thalassobacillus cyri* HS286	NR_116915
8	BACT-B14	100	*Salinibacter ruber* ST_13S67	LN650034
9	BACT-C04	99	*Halovibrio denitrificans* C4-2	EU868859
10	BACT-C07	99	*Salimicrobium halophilum* DSM 4771	NR_114725

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

No.	Representative clone	% Max identity	Closest reference (GenBank database)	Accession no.
11	BACT-D02	99	*Halobacillus trueperi* DSM 10404	NR_025459
12	BACT-D06	99	Uncultured bacterium clone L24	AB627557
13	BACT-D14	99	Uncultured *Beggiatoa* sp. clone LC10C_clone324	FR687027
14	BACT-D16	100	Uncultured *Flavobacterium* sp. clone M46	FM958433
15	BACT-E02	98	*Nitrococcus mobilis* (ATCC 25380)	L35510
16	BACT-E03	99	Uncultured *Desulfomicrobium* sp. clone TCB4y	DQ647149
17	BACT-E08	99	*Salinibacter ruber* ST_2B1	LN650025
18	BACT-E09	99	Uncultured bacterium clone P3-27	KC502883

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นผลการเปรียบเทียบที่แสดงค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดโดยมีคะแนนจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blastn สูงที่สุด (Total score และ Max score)

วิเคราะห์ข้อมูล ณ วันที่ 22 กรกฎาคม 2559

เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป สมาชิกของแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดนั้น ส่วนใหญ่อยู่ในคลาส Gamma-Proteobacteria โดยแทกซอนที่โดดเด่นคือ *Halomonas aquamarina* ซึ่งพบถึง 14 โคลน (20.3 %) แทกซอนที่พบโดดเด่นอีกแทกซอนหนึ่งเป็นแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes คือ *Salimicrobium halophilum* พบ 14 โคลน (20.3 %) ส่วนแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes พบ *Salinibacter ruber* มากที่สุด จำนวน 6 โคลน (8.7 %) ดังแสดงในตารางที่ 4-2

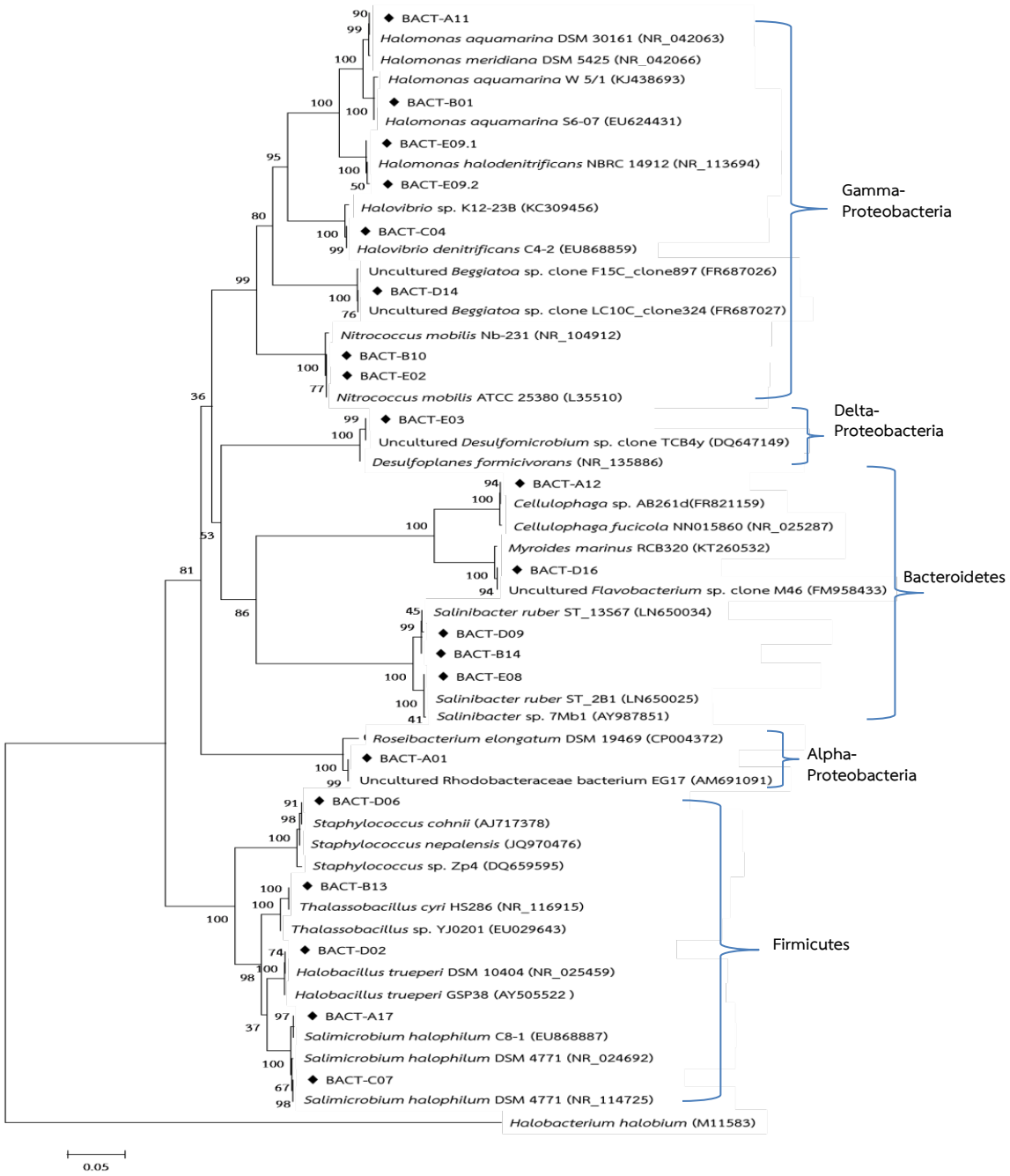
ตารางที่ 4-2 การระบุแทกซอนของแบคทีเรียทั่วไป (n=69)

ไฟลัม/แทกซอน	จำนวน (โคลน)	ความถี่การพบ (%)
Proteobacteria		
Alpha-Proteobacteria		
Roseibacterium sp.	3	4.35
Gamma-Proteobacteria		
Halomonas aquamarina	14	20.3
Halomonas halodenitrificans	12	17.4
Halovibrio denitrificans	1	1.45
Nitrococcus mobilis	1	1.45
Beggiatoa sp.	2	2.9

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ไฟลัม/แทกซอน	จำนวน (โคลน)	ความถี่การพบ (%)
Delta-Proteobacteria		
Desulfomicrobium sp.	1	1.45
Firmicutes		
Halobacillus trueperi	8	11.6
Salimicrobium halophilum	14	20.3
Thalassobacillus cyri	1	1.45
Staphylococcus cohnii	1	1.45
Staphylococcus sp.	1	1.45
Bacteroidetes		
Salinibacter ruber	6	8.7
Flavobacterium sp.	2	2.9
Cellulophaga sp.	2	2.9

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของโคลนแบคทีเรียที่เลือกเป็นตัวแทน (ตารางที่ 4-1) ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแบคทีเรียแทกซอนต่างๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าตำแหน่งบนแผนภูมิของแต่ละโคลนปรากฏอยู่ในตำแหน่งที่สอดคล้องกับข้อมูลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้โมเดล Kimura 2-parameter ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแบคทีเรียแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,286 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 53 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Halobacterium halobium* (M11583) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

1.2 ความหลากหลายของแทกซอนและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคทิโนแบคทีเรีย

ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรีย ตรวจพบสมาชิกที่สามารถระบุแทกซอนระดับจีนัสได้ 2 จีนัส คือ *Streptomyces* จำนวน 2 โคลน และ *Saccharopolyspora* จำนวน 3 โคลน (ตารางที่ 4-2) โดยในจำนวนนี้พบว่า 2 โคลน (ACT-B01 และ ACT-C01) แสดงความคล้ายคลึง 99 % กับ *Saccharopolyspora spinosa* strain JCM 9375 (LC149867) ทำให้สามารถระบุแทกซอนของทั้งสองโคลนนี้เป็น *S. spinosa* ส่วนอีก 1 โคลน (ACT-D01) แสดงความคล้ายคลึง 97 % กับ *Saccharopolyspora thermophile* strain JCM 10664 (LC076550) จึงระบุแทกซอนของโคลนนี้เป็น *Saccharopolyspora* sp. (ตารางที่ 4-4) นอกจากนี้พบโคลนที่ยังไม่สามารถระบุแทกซอนระดับจีนัสได้อีก 2 โคลน (โคลนตัวแทนคือ ACT-E02) โดยมีความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สูงสุดเพียง 92 % กับ Uncultured bacterium clone MN23 ซึ่งทำให้คาดได้ว่าดินจากนาเกลือที่นำมาศึกษามีแอคทิโนแบคทีเรียซึ่งยังไม่เป็นที่รู้จักมาก่อน

ตารางที่ 4-3 ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรียจากดินนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn

No.	Representative clone	% Max identity	Reference (GenBank database)	Accession no.
1	ACT-A01	97	*Streptomyces* sp. JAJ83	KC012641
2	ACT-B01	99	*Saccharopolyspora spinosa* JCM 9375	LC149867
3	ACT-C01	99	*Saccharopolyspora spinosa* JCM 9375	LC149867
4	ACT-D01	97	*Saccharopolyspora thermophila* JCM 10664	LC076550
5	ACT-E02	92	Uncultured bacterium clone MN23	JN869023

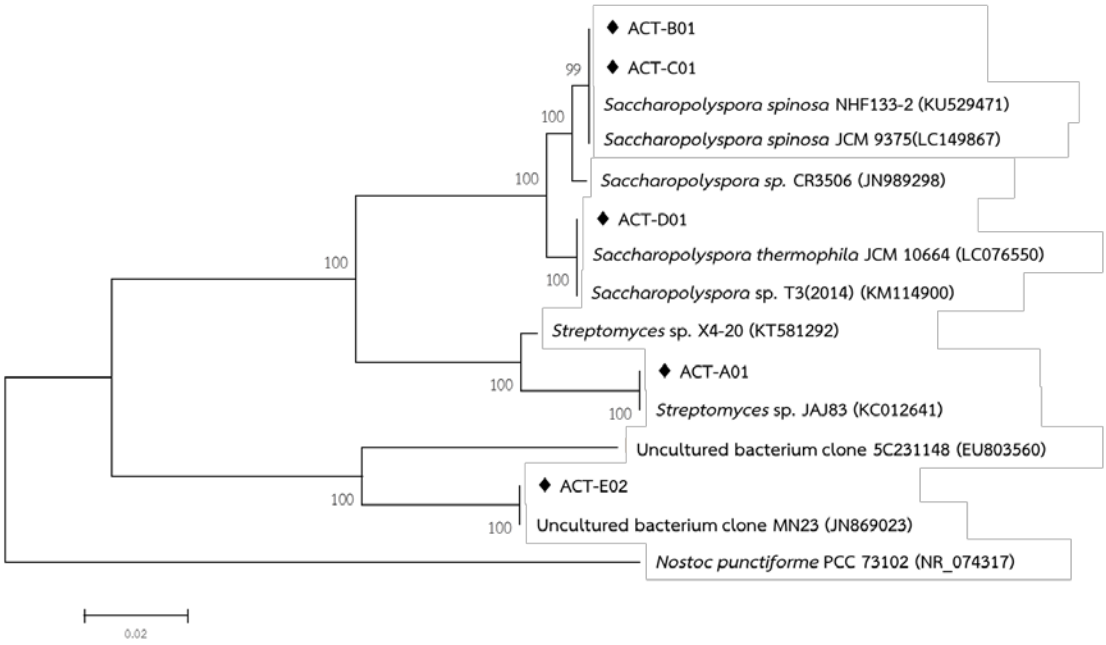
หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นผลการเปรียบเทียบที่แสดงค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดโดยมีคะแนนจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blastn สูงที่สุด (Total score และ Max score)

วิเคราะห์ข้อมูล ณ วันที่ 22 กรกฎาคม 2559

ตารางที่ 4-4 การระบุแทกซอนของแอคทิโนมัยซีส (n=7)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	% ที่พบ
Streptomyces sp.	2	28.6
Saccharopolyspora spinosa	2	28.6
Saccharopolyspora sp.	1	14.3
Unidentified actinobacteria	2	28.6

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของโคลนแอคทิโนแบคทีเรียที่เลือกเป็นตัวแทน (ตารางที่ 4-3) ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแอคทิโนแบคทีเรียแทกซอนต่างๆ ที่แสดงความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับแต่ละโคลน พบว่าตำแหน่งบนแผนภูมิของแต่ละโคลนปรากฏอยู่ในตำแหน่งที่สอดคล้องกับข้อมูลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4-4) โดย ACT-B01 และ ACT-C01 มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมากและมีบรรพบุรุษร่วมกับ *Saccharopolyspora spinosa* ซึ่งมีสายวิวัฒนาการแยกออกจากโคลน ACT-D01 อย่างชัดเจน ส่วนโคลน ACT-A01 มีตำแหน่งอยู่ในเคลดที่ประกอบด้วยสมาชิกในจีนัส Streptomyces โดยเป็นเคลดพี่น้องกับสมาชิกในจีนัส *Saccharopolyspora* ในขณะที่โคลน ACT-E02 แยกตัวออกมาอยู่ในอีกคลัสเตอร์หนึ่ง



ภาพที่ 4-4 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอคทิโนแบคทีเรียที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแอคทิโนแบคทเรียแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,341 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 15 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Nostoc punctiforme* (NR_074317) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

2. ความหลากหลายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอาร์เคียในดินนาเกลือ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่มอาร์เคีย ประมาณ 98-100 % ของแต่ละข้อมูลซึ่งมีความยาวประมาณ 1,500 bp ถูกนำไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST (blastn) พบว่าข้อมูลของอาร์เคียจากดินนาเกลือที่ศึกษาแสดงความคล้ายคลึงกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ในระดับที่สูงถึง 98-100 % ตารางที่ 4-5 เป็นผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากโคลนที่เลือกเป็นตัวแทนในการนำเสนอ โดยกำหนดให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความคล้ายคลึงกันตั้งแต่ 97 % และ 99 % ขึ้นไป ถือว่าเป็นแทกซอนระดับจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน ตามลำดับ โดยในการศึกษานี้พบแบคทีเรียที่แตกต่างกันในระดับสปีชีส์ อย่างน้อย 11 แทกซอน (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4-5 ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของอาร์เคียจากดินนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn

No.	Representative clone	% Max identity	Closest reference (GenBank database)	Accession no.
1	ARCH-A09	99	*Halococcus thailandensis* JCM 13552	NR_113139
2	ARCH-A13	98	*Halomarina oriensis* KeC-11	NR_112987
3	ARCH-A14	99	*Halococcus hamelinensis* 100A6	NR_113432
4	ARCH-B02	99	*Halobacterium halobium*	M11583
5	ARCH-B03	99	Uncultured *Haloquadratum* sp. clone SFG1A011	AM947444
6	ARCH-B04	98	*Halomarina oriensis* KeC-11	NR_112987
7	ARCH-C01	99	*Haloarcula amylolytica* BD-3	NR_115870
8	ARCH-C09	100	*Halobacterium salinarum* R1	AM774415
9	ARCH-D10	99	*Haloferax denitrificans* JCM 8864	NR_113439
10	ARCH-D12	99	*Halococcus agarilyticus* 62E	AB748562
11	ARCH-E05	99	*Halococcus saccharolyticus* JCM 8878	NR_113435
12	ARCH-E11	99	*Halobacterium salinarum*	AB074299
13	ARCH-E14	99	*Halobacterium* sp. Y12	D14127

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นผลการเปรียบเทียบที่แสดงค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดโดยมีคะแนนจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blastn สูงที่สุด (Total score และ Max score)

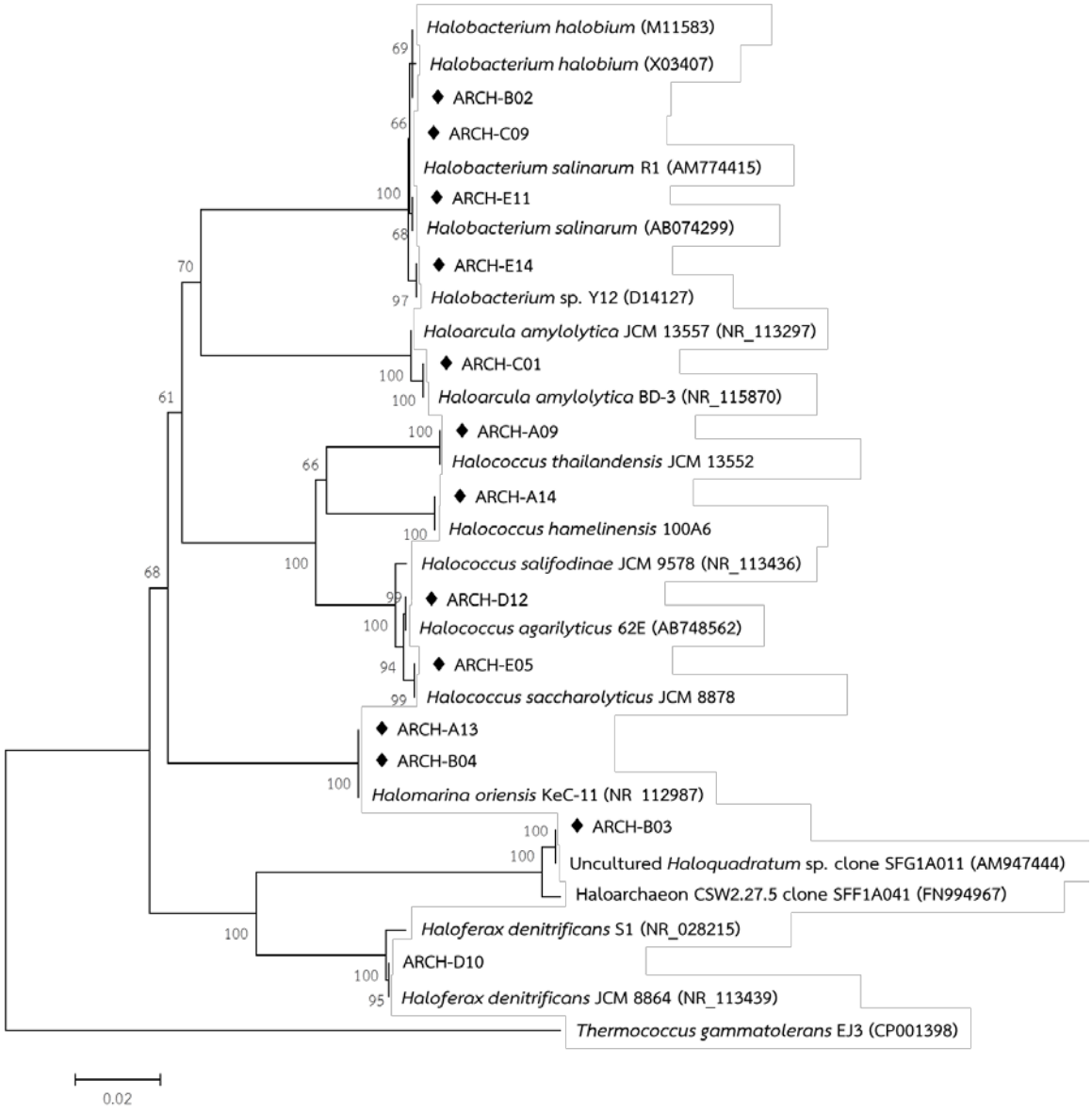
วิเคราะห์ข้อมูล ณ วันที่ 22 กรกฎาคม 2559

แทกซอนของอาร์เคียที่พบมากที่สุดคือ *Halobacterium salinarum* (36.12 %) รองลงมาคือ *Halobacterium* sp. (13.76 %) *Halomarina* sp. (12.04 %) และ *Halobacterium halobium* (10.32 %) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอาร์เคียในจีนัส *Haloferax*, *Haloquadratum*, *Halococcus* และ *Haloarcula* (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4-6 การระบุแทกซอนของอาร์เคีย (n=58)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	ความถี่ของการพบ (%)
Halobacterium salinarum	21	36.12
Halobacterium halobium	6	10.32
Haloquadratum sp.	2	3.44
Haloferax denitrifican	3	5.16
Halococcus saccharolyticus	5	8.60
Halococcus agarilyticus	1	1.72
Halococcus thailandensis	2	3.44
Halococcus hamelinensis	1	1.72
Haloarcula amylolytica	2	3.44
Halomarina sp.	7	12.04
Halobacterium sp.	8	13.76

อาร์เคียทั้งหมดที่พบอยู่ในไฟลัม Euryarchaeota แผนภูมิต้นไม้ที่แสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แบ่งโคลนของอาร์เคียที่นำมาวิเคราะห์ออกเป็น 2 คลัสเตอร์แยกจากกันอย่างชัดเจน โดยคลัสเตอร์แรกประกอบด้วยสมาชิกส่วนใหญ่ซึ่งอยู่ในจีนัส *Halobacterium*, *Halomarina*, *Halobacterium*, *Halococcus* และ *Haloarcula* ส่วนอีกคลัสเตอร์หนึ่งประกอบด้วยสมาชิก 2 จีนัส คือ *Haloferax*, *Haloquadratum* (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอาร์เคียที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของอาร์เคียแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จำนวน 1,343 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 31 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Nostoc punctiforme* (NR_074317) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

3. ความหลากหลายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสายและยีสต์ในดินนาเกลือ

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการจำแนกราคือ ITS ซึ่งครอบคลุมบริเวณ ITS1, ยีน 5.8S rRNA และ ITS2 ในห้องสมุดดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น มีจำนวนโคลนทั้งสิ้น 27 โคลน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นราสายจำนวน 22 โคลน และอีก 5 โคลน เป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ (ตารางที่ 4-7 และ 4-8)

ตารางที่ 4-7 ความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของราสายและยีสต์จากดินนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn

No.	Representative clone	% Max identity	Closest reference (GenBank database)	Accession no.
1	FUNG-A01.1	100	*Penicillium* sp. MG-2016	LT558883
2	FUNG-A04	100	*Aspergillus brasiliensis* CMU-SC301-1	KT378129
3	FUNG-C03	99	*Aspergillus* sp. CCHA	GU988901
4	FUNG-C06	99	*Aspergillus carbonarius* 229	AJ876878
5	FUNG-C07	100	*Chaetomium globosum* KCJ1(1)	KM268713
6	FUNG-C08	99	*Cladosporium oxysporum* CBS 126351	HM148119
7	FUNG-C10	100	*Glomerobolus gelineus* AFTOL-ID 1349	DQ247782
8	FUNG-C11	100	*Aspergillus* sp. TW4-2	KU533844
9	FUNG-D02	99	*Penicillium chrysogenum* WM 06.341	DQ249212
10	FUNG-D03	100	*Penicillium* sp. 28 BRO-2013	KF367540
11	FUNG-D06	99	*Scopulariopsis* sp. BMU03909	LN850772
12	FUNG-D07	100	*Gymnoascus* sp. NZ-2015a strain YZ400	KP278215
13	FUNG-E01	99	*Sporothrix* sp. 1-CMW9488	AY546720
14	FUNG-E02	100	*Aspergillus niger* KT 5	LC105682
15	FUNG-E03	96	*Emericella nidulans*	AJ000933
16	FUNG-E05	100	*Aspergillus parasiticus* NRRL 502	AY373859
17	FUNG-A01.2	100	*Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* DMic 113902	JN008142.2
18	FUNG-C02	99	*Rhodotorula* sp. CBS 10104	AJ876487.1
19	FUNG-C09	100	*Meyerozyma guilliermondii* ZAG8	KU883323.1
20	FUNG-E04	100	*Yarrowia lipolytica* ZG2-Y149	HF545658

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นผลการเปรียบเทียบที่แสดงค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดโดยมีคะแนนจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blastn สูงที่สุด (Total score และ Max score)

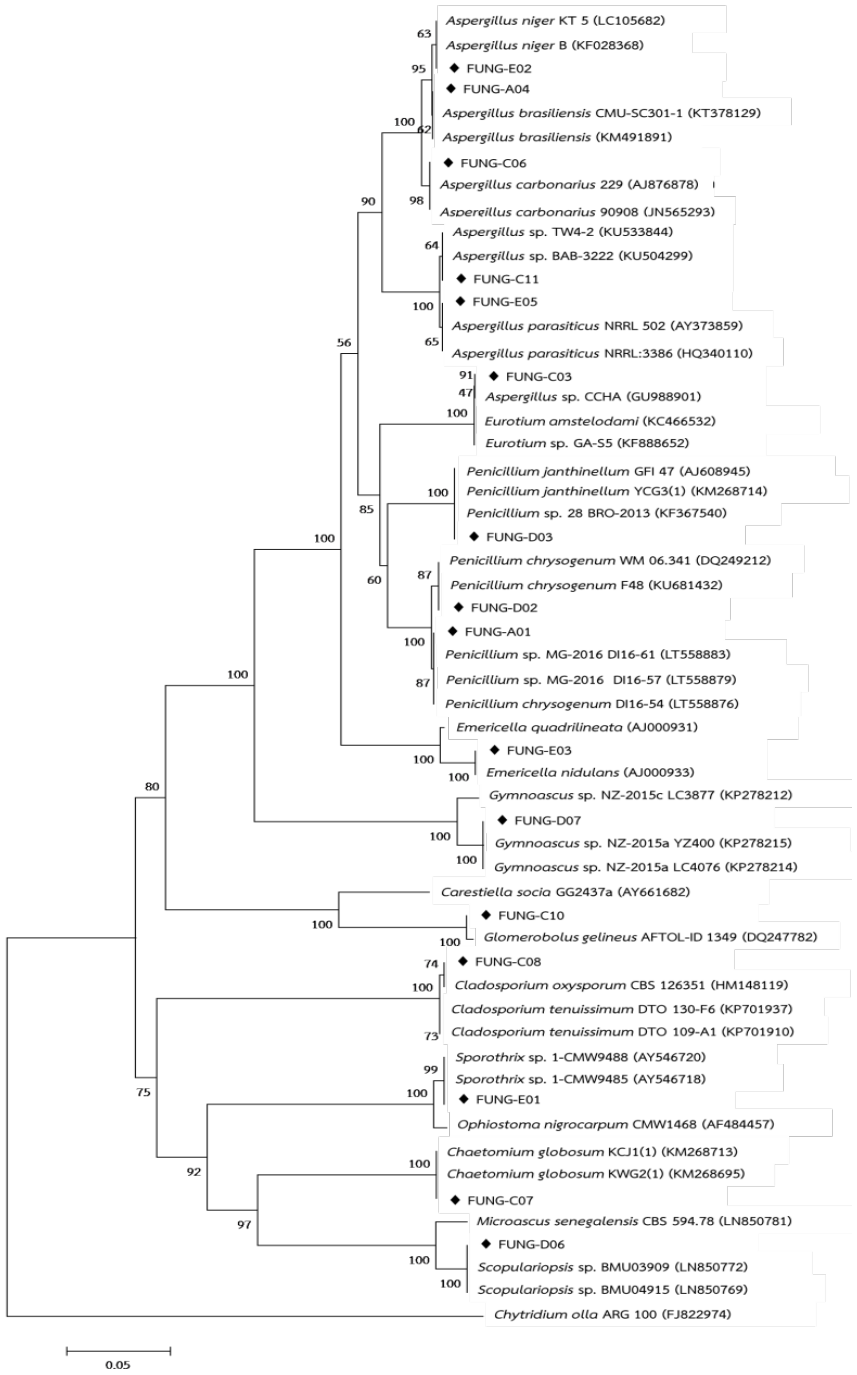
วิเคราะห์ข้อมูล ณ วันที่ 4 สิงหาคม 2559

ตารางที่ 4-8 การระบุแทกซอนของราสายและยีสต์ (n=27)

แทกซอน	จำนวน (โคลน)	ความถี่ของการพบ (%)
Molds		
Aspergillus niger	4	14.80
Aspergillus flavus	1	3.70
Aspergillus nidulans	1	3.70
Aspergillus sojae	1	3.70
Aspergillus brasiliensis	1	3.70
Aspergillus carbonarius	1	3.70
Chaetomium globosum	3	11.10
Cladosporium oxysporum	1	3.70
Penicillium sp.1	2	7.40
Penicillium janthinellum	1	3.70
Penicillium chrysogenum	1	3.70
Sporothrix sp.	1	3.70
Scopulariopsis sp.	1	3.70
Gymnoascus sp.	2	7.40
Glomerobolus sp.	1	3.70
Yeasts		
Debaryomyces hansenii	1	3.70
Yarrowia lipolytica	1	3.70
Meyerozyma guilliermondii	2	7.40
Rhodotorula sp.	1	3.70

3.1 ความหลากหลายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสาย

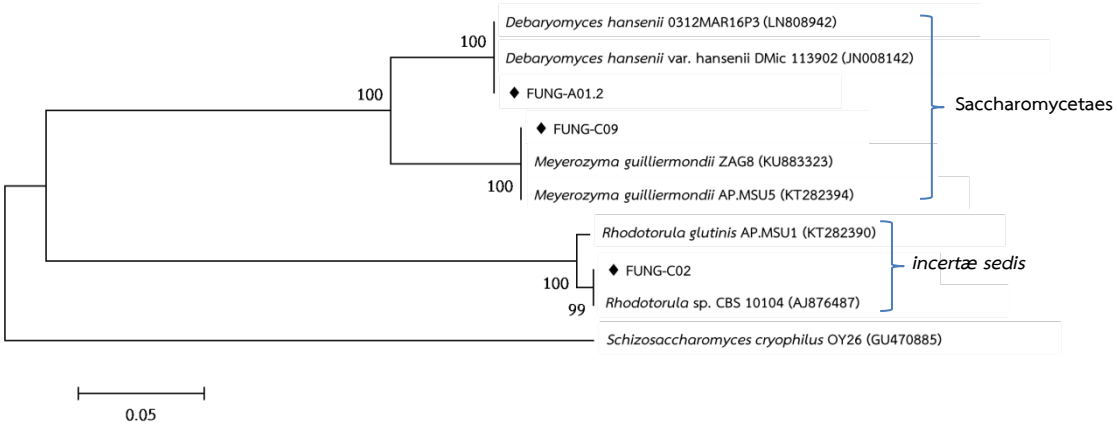
แทกซอนของราสายที่พบมากที่สุดคือ จีนัส *Aspergillus* (9 โคลน; 33.3 %) โดยพบ 6 สปีชีส์ คือ *A. niger* (14.8 %), *A. flavus* (3.7 %), *A. nidulans* (3.7 %), *A. sojae* (3.7 %), *A. brasiliensis* (3.7 %) และ *A. carbonarius* (3.7 %) สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสายแสดงดังภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-6 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสายที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของราสายแต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จำนวน 434 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 56 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Chytridium olla* ARG 100 (FJ822974) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

3.2 ความหลากหลายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์

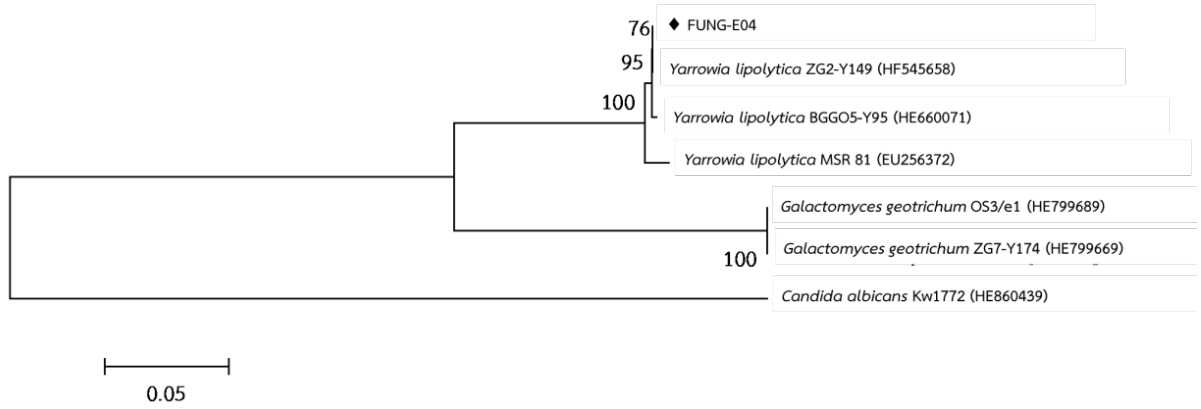
ยีสต์ที่ตรวจพบจัดอยู่ใน 4 จีนัส คือ *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Meyerozyma และ Yarrowia* ข้อมูลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเครื่องหมายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลนจากนาเกลือที่วิเคราะห์ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในจีนัสเหล่านี้ ทำให้สามารถระบุแทกซอนของยีสต์ที่พบเป็น *Debaryomyces hansenii* (FUNG-A01.2), *Meyerozyma guilliermondii* (FUNG-C09), *Rhodotorula* sp. (FUNG-C02) (ตารางที่ 4-7 และ 4-8 ภาพที่ 4-8) และ *Yarrowia lypolytica* (FUNG-E04) (ตารางที่ 4-7 และ 4-8 ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-7 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของยีสต์แต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จำนวน 506 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 10 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Schizosaccharomyces cryophilus* OY26 (GU470885) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

ในส่วนของโคลน FUNG-E04 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทำให้สามารถระบุแทกซอนเบื้องต้นของโคลนนี้ว่าเป็น *Yarrowia lypolytica* ซึ่งเป็นยีสต์ในแฟมิลิ Dipodascaceae เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FUNG-E04 ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับยีสต์อีก 3 โคลนดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีสายวิวัฒนาการที่แยกออกมา (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FUNG-E04 มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับแทกซอนที่เกี่ยวข้อง แผนภูมิต้นไม้ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยมีแทกซอนร่วมเป็นสมาชิกในแฟมิลีเดียวกัน คือ *Galactomyces*

geotrichum แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า FUNG-E04 มีบรรพบุรุษร่วมล่าสุดกับ *Yarrowia lypolytica* สายพันธุ์ต่างๆ ทำให้สามารถยืนยันแทกซอนของโคลน FUNG-E04 ว่าเป็น *Yarrowia lypolytica* (ตารางที่ 4-7, 4-8 และภาพที่ 4-8)



ภาพที่ 4-8 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์โคลน FUNG-E04 ที่พบในเมตาจีโนมของดินนาเกลือ สร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 6 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และใช้ p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของยีสต์แต่ละแทกซอน ทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrapping จำนวน 1,000 ซ้ำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS จำนวน 467 ตำแหน่ง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 7 ข้อมูล ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยมี *Candida albicans* Kw1772 (HE860439) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

ตอนที่ 2 การค้นหายีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากห้องสมุดเมตาจีโนมของดินนาเกลือ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเมตาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดินทั้ง 5 ตัวอย่าง มาตัดด้วยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI จากนั้นโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC19 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน ได้ทั้งหมด 1,058 โคลน (ตารางที่ 4-9) เมื่อนำโคลนทั้งหมดไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Functional screening) โดยเพาะเลี้ยงโคลนที่ได้ทั้งหมดบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar และย้อมด้วย 0.1 % Congo red อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ไม่พบโคลนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว

ตารางที่ 4-9 จำนวนโคลน (n = 1,058) ที่ได้จากห้องสมุดเมตาจีโนมของตัวอย่างดินนาเกลือ จำนวน 5 ตัวอย่าง

ห้องสมุดเมตาจีโนม ของตัวอย่างดินนาเกลือ	ขนาดห้องสมุด (โคลน)	จำนวนโคลนที่แสดงกิจกรรม เอนไซม์เซลลูเลส
A	233	-
B	175	-
C	196	-
D	206	-
E	248	-

ในลำดับต่อมา ได้มีการนำไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับเพิ่มปริมาณยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลส (β-glucosidase) ซึ่งผู้วิจัยได้ออกแบบไว้สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวของแอคทิโนแบคทีเรียจีนัส *Streptomyces* แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวได้ ทำให้ผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาในหัวข้อนี้ต่อไป

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินนาเกลือที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยใช้วิธีสร้างห้องสมุดยีน 16S rRNA หรือหรือห้องสมุดดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากเมตาจีโนม พบจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรีย อาร์เคีย ราสายและยีสต์ ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย พบไฟลัม Proteobacteria มากที่สุด (49.3 %) รองลงมาคือไฟลัม Firmicutes (36.2 %) และไฟลัม Bacteroidetes (14.5 %) จีนัสตัวแทนที่พบโดดเด่นของแบคทีเรียทั่วไป คือ *Halomonas, Salimicrobium* และ *Salinibacter* ในขณะที่ในห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรีย พบจีนัส *Streptomyces* และ *Saccharopolyspora* รวมทั้งพบว่ามีแอคทิโนมัยซีสอีกอย่างน้อย 1 จีนัสที่คาดว่าน่าจะเป็นจีนัสใหม่ สำหรับห้องสมุด ITS พบว่ามีความหลากหลายของแทกซอน โดยพบทั้งราสายและยีสต์ซึ่งจีนัสตัวแทนที่พบมากคือ *Aspergillus* และ *Meyerozyma* ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบยีนนำรหัสเอนไซม์เซลลูเลสจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือที่นำมาศึกษาทุกตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบในลำดับต่อไป

อภิปรายผลการทดลอง

นาเกลือเป็นระบบนิเวศที่มีสภาพแวดล้อมที่มีความรุนแรงของปัจจัยด้านความเค็ม จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศแห่งนี้จำเป็นต้องมีการปรับตัวในด้านต่างๆ เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ซึ่งไม่เพียงแต่การปรับตัวในด้านการรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์เท่านั้น แต่จุลินทรีย์ยังจำเป็นต้องมีการปรับตัวในด้านอื่นๆ เช่น โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติพิเศษสำหรับใช้ในการดำเนินวิถีเมแทบอลิซึม ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้ระบบนิเวศที่มีความเค็มสูง เช่น นาเกลือ มีความน่าสนใจที่จะเป็นแหล่งสำหรับค้นหาจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ที่อาจมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างไปจากที่เคยพบในจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ

จุลินทรีย์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีบทบาทสำคัญในทุกระบบนิเวศ โดยถือเป็นสิ่งมีชีวิตพื้นฐานที่ช่วยให้เกิดการขับเคลื่อนและรักษาสมดุลของระบบนิเวศ บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศเกี่ยวข้องโดยตรงกับการหมุนเวียนของสารอาหาร เพื่อส่งผ่านไปยังสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากนาเกลือเป็นระบบนิเวศที่มีสภาวะรุนแรง ซึ่งอาจส่งผลทำให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นี้มีความหลากหลายไม่มากนักก็เป็นได้ แต่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ได้ก็คาดว่าน่าจะมีคุณสมบัติพิเศษ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากนาเกลือในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ พบจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรีย อาร์เคีย ยีสต์และราสาย ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทั่วไป แอคทิโนแบคทีเรียและอาร์เคีย ได้มีการใช้คู่ไพร์เมอร์ยูนิเวอร์ซัล (Universal primers) เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มขึ้นมา ซึ่งออกแบบโดยคณะผู้วิจัย ในขณะที่โมเลกุล

ซึ่งเลือกมาใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์และราสายคือดีเอ็นเอบริเวณ ITS (White *et al*., 1990) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพร์เมอร์แต่ละชุดนั้นเป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ผสมของจุลินทรีย์แทกซอนต่างๆ จึงจำเป็นต้องนำมาโคลนเพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละชิ้นออกจากกัน โดยโคลน 1 โคลน มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แทรกอยู่ 1 ชิ้น เมื่อนำพลาสมิดที่สกัดจากรีคอมบิแนนท์โคลนไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ก็จะทำให้ทราบถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่บนพลาสมิด ซึ่งนำไปสู่การวิเคราะห์และระบุแทกซอน

แบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุด (49.3 %) ในตัวอย่างดินนาเกลือที่ศึกษา โดยสมาชิกส่วนใหญ่อยู่ในคลาส Gamma-Proteobacteria เช่น *Halomonas aquamarina*, *Halomonas halodenitrificans* และ *Beggiatoa* sp. นอกจากนี้ยังพบสมาชิกในคลาส Alpha- และ Delta-Proteobacteria ได้แก่ *Roseibacterium* sp. และ *Desulfomicrobium* sp. ตามลำดับ นอกจากนี้ในตัวอย่างดินนาเกลือที่นำมาศึกษานี้พบแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes 36.2 % เช่น *Salimicrobium halophilum* และ *Halobacillus trueperi* เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes พบ 14.5 % โดยสมาชิกที่เด่นที่สุดคือ *Salinibacter ruber* ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Sardar and Pathak (2014) ที่รายงานว่าแบคทีเรียในแฟมิลี Halomonadaceae เช่น *Halomonas* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในพื้นที่นาเกลือ Mulund ในรัฐ Mumbai ประเทศอินเดีย แบคทีเรียในจีนัส *Halomonas* จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบเกลือหรือฮาโลไฟล์ ซึ่งมีรายงานการคัดแยกได้จากน้ำทะเล ทะเลสาบน้ำเค็มและนาเกลือ โดยสามารถพบได้หลากหลายสปีชีส์ เช่น *H. aquamarina*, *H. maura* (Bouchotroch, *et al*., 2001) *H. songnenensis* (Jiang, *et al*., 2014) และ *H. smyrnensis* (Poli, *et al*., 2013) เป็นต้น

ในดินนาเกลือที่ศึกษาตรวจพบแอคทิโนแบคทีเรียอย่างน้อย 2 จีนัส คือ *Streptomyces* และ *Saccharopolyspora* โดยปกติแล้วในสภาพแวดล้อมปกติสามารถพบแอคทิโนแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมากและหลากหลาย อย่างไรก็ตามดินนาเกลืออาจมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ จึงทำให้พบแอคทิโนแบคทีเรียได้ไม่หลากหลาย อย่างไรก็ตาม มีข้อมูลที่น่าสนใจคือพบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอคทิโนแบคทีเรียในตัวอย่างดินนาเกลือที่นำมาศึกษาที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวแสดงความคล้ายคลึงสูงสุดเพียง 92 % กับข้อมูลของ Uncultured bacterium ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank Jose *et al*. (2013) รายงานการคัดแยกแอคทิโนแบคทีเรียจากพื้นที่นาเกลือในบริเวณทะเลสาบน้ำเค็ม Sambhar ประเทศอินเดีย เมื่อจำแนกโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นสมาชิกในจีนัส *Streptomyces, Pseudonocardia* และ *Actinoalloteichus* สำหรับการศึกษาในประเทศไทย พบรายงานการคัดแยกแอคทิโนแบคทีเรียจากนาเกลือในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงครามและเพชรบุรี เมื่อจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces variabilis* โดยแอคทิโนแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* ได้ (ปวีณา สุขสอาด และคณะ, 2555)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของแอคทิโนแบคทีเรียในพื้นที่นาเกลือของประเทศไทยโดยใช้กระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์

อาร์เคียเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่พบในดินนาเกลือที่เก็บมาจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งพบได้ค่อนข้างหลากหลาย แทกซอที่พบมากที่สุดคือ *Halobacterium salinarum* (36.12 %) รองลงมาคือ *Halobacterium* sp. (13.76 %) *Halomarina* sp. (12.04 %) และ *Halobacterium halobium* (10.32 %) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอาร์เคียในจีนัส *Haloferax*, *Haloquadratum*, *Halococcus* และ *Haloarcula* ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Zafrilla *et al*. (2010) ซึ่งศึกษาความหลากหลายของอาร์เคียในนาเกลือบริเวณ Alto Vinalopó Valley ประเทศสเปน โดยคณะผู้วิจัยดังกล่าวนี้พบอาร์เคียที่โดดเด่นคือจีนัส *Haloarcula, Halorubrum, Haloquadratum* และ *Halobacterium*

ราเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่พบได้หลากหลายในดินนาเกลือ ราสายที่พบมากที่สุดคือจีนัส *Aspergillus* โดยพบ 6 สปีชีส์ คือ *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. sojae*, *A. brasiliensis* และ *A. carbonarius* นอกจากนี้ยังพบราในจีนัสอื่นๆ เช่น *Penicillium*, *Chaetomium* และ *Cladosporium* เป็นต้น สอดคล้องกับรายงานของอภิรดีและคณะ (2559) ที่ศึกษาความหลากหลายของราในนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งได้รายงานการพบราในจีนัสดังกล่าวข้างต้นไว้เช่นกัน ราเหล่านี้สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมปกติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าราเหล่านี้มีความสามารถในการทนเกลือ (Halotolerant) นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังได้ตรวจพบยีสต์ 4 จีนัส คือ *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Meyerozyma และ Yarrowia* ข้อมูลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเครื่องหมายและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโคลนจากนาเกลือที่วิเคราะห์ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในจีนัสเหล่านี้ ทำให้สามารถระบุแทกซอนของยีสต์ที่พบเป็น *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodotorula* sp. และ *Yarrowia lypolytica*

ในงานวิจัยนี้ เบื้องต้นได้สำรวจยีนนำรหัสการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้กระบวนการตัดเมตาจีโนมด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (*Eco*RI) และนำมาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC (pUC 19) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาตรวจคัดกรองกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar ไม่พบโคลนที่แสดงผลบวก (ไม่ได้แสดงผล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น ประสิทธิภาพของการโคลนที่ต่ำ ทำให้ไม่สามารถได้โคลนทั้งหมดที่ควรมีได้ อีกทั้งขั้นตอนการโคลนเกี่ยวข้องกับการตัดเมตาจีโนมด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ยีนเป้าหมายอาจถูกตัดจนเสียสภาพการทำงานไป อย่างไรก็ตาม เมื่อผู้วิจัยได้นำไพร์เมอร์ซึ่งมีความจำเพาะของการออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสจากแอคทิโนแบคทีเรียจีนัส *Streptococcus* มาทดลองใช้เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายดังกล่าวจากเมตาจีโนมของดินนาเกลือ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนดังกล่าวมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ยากต่อการใช้คู่ไพร์เมอร์เฉพาะในการเพิ่มปริมาณยีนนี้ขึ้นมา

การคัดแยกยีนที่สนใจโดยอาศัยกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ อาจมีอุปสรรคค่อนข้างมาก เนื่องจากโอกาสของการได้ยีนเป้าหมายมีค่อนข้างต่ำ โคลนที่ปรากฏในห้องสมุดอาจไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการเนื่องจากขาดความสมบูรณ์หรือความครบถ้วนของข้อมูลยีน รวมทั้งโคลนที่ปรากฏในห้องสมุดอาจไม่ใช่โคลนทั้งหมดที่มีอยู่ เนื่องจากประสิทธิภาพของการโคลน

ยีนไม่ดีพอ การตรวจคัดกรองโคลนโดยอาศัยการของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ก็เป็นปัจจัยจำกัดอีกประการหนึ่ง ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีใหม่มาใช้ในการศึกษาทางด้านเมตาจีโนมิกส์ เช่น เทคโนโลยี NGS (Next generation sequencing technology) ซึ่งช่วยให้การตรวจคัดกรองโคลนจากห้องสมุดเมตาจีโนมเป็นไปด้วยความสะดวกและรวดเร็ว (Ghai et al., 2011; de Mandal *et al*., 2015)

ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถสะท้อนให้เห็นได้ว่าถึงแม้ว่านาเกลือจะถูกจัดว่าเป็นระบบนิเวศที่มีปัจจัยสิ่งแวดล้อมรุนแรง แต่นาเกลือก็เป็นระบบนิเวศหนึ่งซึ่งเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์จำนวนมากที่ไม่สามารถพบได้ในระบบนิเวศอื่นๆ อีกทั้งจากความเฉพาะของระบบนิเวศนาเกลือ จึงมีส่วนกำหนดให้จุลินทรีย์ในพื้นที่นี้มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เช่น การผลิตสารชีวภาพที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งมนุษย์สามารถเข้ามาค้นหาและคัดแยกจุลินทรีย์เหล่านั้นเพื่อนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์ได้ตามความต้องการ ถึงแม้ว่าจะมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก ที่ไม่สามารถคัดแยกได้โดยวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่ก็มีกระบวนการทางด้านเมตาจีโนมิกส์ที่สามารถทำให้นักวิจัยเข้าถึงข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งทำให้สามารถนำข้อมูลเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ได้เช่นกัน เช่น การโคลนยีนและคัดเลือกยีนนำรหัสการสร้างสารชีวภาพที่สำคัญชนิดต่างๆ จากนาเกลือ การได้มาซึ่งข้อมูลระดับโมเลกุลในด้านยีนเครื่องหมายที่บ่งชี้แทกซอนและสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อออกแบบการทดลองสำหรับตรวจคัดกรองค้นหายีนที่กำหนดลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพในการผลิตสารชีวภาพที่สำคัญชนิดต่างๆ ที่สนใจจากระบบนิเวศแห่งนี้ รวมทั้งข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมและสร้างความเข้าใจให้ทุกคนตระหนักถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในทุกสภาพแวดล้อม อันจะนำไปสู่การร่วมกันฟื้นฟูและอนุรักษ์ไว้เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

ปวีณา สุขสอาด, กรรณิการ์ ดวงมาลย์, ชัยวัฒน์ กิตติกูล, กันทิมาณี ประเดิมวงศ์ และ วสุ ปฐมอารีย์. (2555). แอคติโนมัยสีทจากดินนาเกลือและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50, สาขาวิทยาศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. วันที่ 31 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิรดี ปิลันธนภาคย์, สุดารัตน์ สวนจิตร, สมถวิล จริตควร และศรัญญา รักเสรี. (2559). ความหลากหลายของราในนาเกลือ จังหวัดฉะเชิงเทรา. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 21(2), 280-290 (http://science.buu.ac.th/ojs246/index.php/sci/article/view/1113).

Aygan, A. & Arikan, B. (2008). A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 369-374.

Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I. & Beljar V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 51, 1625–1632.

Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K. A., & Maupin-Furlow, J. A. (2011). Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 75, 909-916.

Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., & Wittwer, P. (2005). *TRENDS in Biotechnology*, 23, 321-329.

DasSarma, S. (2006). Extreme halophiles are models for astro-biology. *Microbe*, 1, 120-127.

Davidson, B.S. (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microoganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 284-291.

de Mandal, S., Panda, A.K., Bisht, S.S., & Kumar, N.S. (2015). Microbial ecology in the era of next generation sequencing. *Next Generation Sequencing & Application*, S1: 001. doi:10.4172/jngsa.S1-001.

Ergan, S., Thomas, T., & Kjelleberg, S. (2008). Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 219-225.

Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, & Golyshin, P. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 207-214.

Frock, A.D. & Kelly, R.M. (2012). Extreme thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1, 1-10.

Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A. B., Martin-Cuadrado, A-B., Mizuno, C. M., McMahon, K. D., Papke, R. T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, B., Rohwer,F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A., & Rodríguez-Valera, F. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep00135.

Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T.M., Pierrère, G., Simonet, P., and Nalin, R. (2004). Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5522-5527.

Huang, Q., Dong, C. Z., Dong, R. M., Jiang, H., Wang, S., Wang, G., Fang, B., Ding, X., Niu, L., Li, X., Zhang, C., & Dong, H. (2011). Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles*, DOI: 10.1007/s00792-011-0386-z

Huang, X., Shao, Z., Hong, Y., Lin, L., Li, C., Huang, F., Wang, H., & Liu, Z. (2010). Cel8H, a novel endoglucanase from the halophilic bacterium *Halomonas* sp. S66-4: Molecular cloning, heterogonous expression, and biochemical characterization. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 318-324.

Iqbal, H. A., Feng, Z., & Brady, S. (2012). Biocatalysts and small molecule products from metagenomic study. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16: 109-116.

Jacobsen, J., Lydolph, & Lange, L. (2005). Culture independent PCR: An alternative enzyme discovery strategy. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 63-71.

Jiang, J., Pan, Y., Hu, S., Zhang, X., Hu, B., Huang, H., Hong, S., Meng, J., Li, C., & Wang, K. (2014). *Halomonas songnenensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1662–1669.

Jose, P. A. & Jebakumar, S. R. D. (2013). Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Frontiers in Microbiology*, DOI: 10.3389/fmicb.2013.00190.

Li, X. & Qin, L. (2005). Metagenomics-based drucg discovery and marine microbial diversity. *TRENDS in Biotechnology*, 23, 539-543.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W.H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577.

Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and application. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 56-63.

Poli, A., Nicolaus, B., Denizci, A. A., Yavuzturk, B., & Kazan, D. (2013). *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 10–18.

Ratnakar, D. (2013). Use of halophile physiology and adaptations in various industrial applications. *Research Journal of Biotechnology*, 8(2), 1-3.

Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Reviews of Genetics*, 38, 525-552.

Ryu, D. D. Y., & Mandels, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2), 91-102.

Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: A review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235-258.

Sardar, A. G. & Pathak, A. P. (2014). Exploring the microbiota of solar saltern of Mulund, Mumbai, India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 43(4), 634-641.

Satpute, S. K., Banat, I. M., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28, 436-450.

Schloss, P.D. & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-310.

Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., & AnandRao, M. (2014). Applications of cellulases-review. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*, 4(2), 424-437.

Shewale, J. G. (1982). Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry*, 14(6), 435-443.

Simankova, M. V., Chernych, N. A., Osipov, G. A., & Zavarzin, G. A. (1993). *Halocella cellulolytica* gen. nov., sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(3), 385-389.

Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., & Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 103, 12115-12120.

Streit, W. R. & Schmiyz, R. A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492-489.

Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832-844.

Thaz, C. J., Lavanya, B., Kumar, J. G. S. P., & Jayaraman, G. (2015). Production and characterization of a halotolerant cellulase from *Bacillus aquimaris* VITP4 strain. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 412-414.

van de Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (2000). Adaptations of the cell membrane for life in extreme environments. *In* Environmental stressors and gene responses (Storey, K. B. & Storey, J., Eds), Elsevier Science, pp. 71-88.

Ventosa, A., Oren, A., & Ma, Y. (2011). *Halophiles and Hypersaline Environment*. Berlin: Springer-Verlag.

Voget, S., Steele, H.L., and Streit, W.R. (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulose. *Journal of Biotechnology*, 126: 26-36.

Wang, C. Y., Hsieh, Y. R., Ng, C. C., Chan, H., Lin, H. T., Tzeng, W. S., Shyu, Y. T. (2009). Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technolology*, 44, 373-379.

Wang, F., Li, F., Chen, G., & Liu, W. (2009). Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiological Research*, 164, 650-657.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR protocols: A guide to method and applications (Innis, M.A., Gelfan, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., Eds.), Academic Press Inc., pp. 315-322.

Xie, G., Bruce, D. J., Challacombe, J. F., Chertkov, O., Detter, J. C., Gilna, P., Han, C. S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G. L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L. S., Brettin, T., S., Henrissat, B., Wilson, D. B., & McBride, M. J. (2007). Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3536-3546.

Xing, M-N., Zhang, X-Z., & Huang, H. (2012). Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. *Biotechnology Advances*, 30, 920-929.

Zafrilla, B., Martinez-Espinosa, R. M., Alonso, M. A., & Bonete, M. J. (2010). Biodiversity of archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline Systems*, 6, Open Access at http://www.salinesystems.org/content/6/1/10.

Zeyaullah, M. D., Kamli, M. R., Islam, B., Atif, M., Benkhayal, F. A., Nehal, M., Rizvi, M. A., & Ali, A. (2009). Metagenomics - An advanced approach for non-cultivable microorganisms. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4: 49-54.