

การใช้ functional gene ในการศึกษาประชากรของแบคทีเรียกลุ่มย่อย สลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

Use of functional gene in studying of rumen fibrolytic bacteria population in ruminants

จันทิรา วงศ์เนตร และ ฉลอง วชิราภกร^{1*}

Chantira Wongnen and Chalong Wachirapakorn

บทคัดย่อ: จากบทบาทสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยต่อกระบวนการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น จึงได้มีนักวิจัยพัฒนาวิธีการเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใย ทั้งจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิคชีวโมเลกุลโดยอาศัย 16S rRNA แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากมีความแม่นยำต่ำในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ในปัจจุบัน นักวิจัยได้มีความสนใจในการใช้ functional gene ในการตรวจหาแบคทีเรียโดยการตรวจหายีนที่ทำหน้าที่ที่ต้องการศึกษาโดยตรง ซึ่งการใช้ functional gene เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียให้ผลที่จำเพาะเจาะจงและครอบคลุมชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ มากกว่า 16S rRNA โดยการใช้ไพรเมอร์ cel5_392F-754R สามารถตรวจพบแบคทีเรียเฉพาะในกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยเท่านั้น โดยไม่ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ

คำสำคัญ: functional gene, 16S rRNA, แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน

ABSTRACT: Fibrolytic bacteria are the major rumen bacteria in the rumen of ruminants and have shown an important role in fiber degradation. Many researchers have developed methodologies to classify fibrolytic bacteria, including culture in a medium and rumen molecular technique using 16S rRNA gene as a basis. However, these are still limited due to low accuracy. Currently, researchers are interested in the use of functional genes to identify specific microorganisms. Functional genes are more comprehensive and specific than 16S rRNA. The cel5_392F-754R primer can identify rumen fibrolytic bacteria without detecting other groups of bacteria.

Keywords: functional gene, 16S rRNA, rumen fibrolytic bacteria

บทนำ

อาหารหยาบถือเป็นแหล่งอาหารสำคัญสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถย่อยสลายเยื่อใยเป็นแหล่งพลังงานได้ จากบทบาทสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใย (fibrolytic bacteria) ที่มีผลต่อกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น ได้มีนักวิจัยให้ความสนใจและทำการการศึกษาเพื่อ

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยโดยตรง ทั้งจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในกระเพาะรูเมนโดยอาศัยลักษณะของ 16S rRNA ในการจำแนก การใช้เทคนิคนี้สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยในรูเมนได้อย่างชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้ 16S rRNA ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากมีความแม่นยำต่ำ เนื่องจากมีรหัสพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน ในแบคทีเรียหลายกลุ่มส่งผลให้มี

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

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

* Corresponding author: chal_wch@kku.ac.th

ความคลาดเคลื่อนในการศึกษาความหลากหลายของประชากร (Mendum et al., 1999; Delorme et al., 2003; Heylen et al., 2006; Vianna et al., 2006) นอกจากนี้ การใช้ยีน 16S rRNA บ่งชี้ได้เพียงกลุ่มของแบคทีเรียโดยไม่สามารถบ่งชี้ความสามารถในการทำงานของแบคทีเรียได้ เนื่องจากเป็นยีนของ 16S rRNA ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนทั้งหมดของแบคทีเรีย จึงไม่สามารถระบุการทำงานเฉพาะของแบคทีเรียได้ ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการให้ความสนใจในการใช้ functional gene ในการหาความหลากหลายของแบคทีเรียมากขึ้น โดยการตรวจหาชิ้นที่ทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาโดยตรง จึงสามารถตรวจหาประชากรแบคทีเรียทั้งหมดที่มีความสามารถทำงานตรงกันได้

ดังนั้น บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางในการนำ functional gene เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาประชากรและความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องอันจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการวิจัยและการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้องให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน

สำหรับแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถประโยชน์เยื่อใยได้ ดังแสดงใน

Table 1 ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลส (cellulolytic bacteria) และกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยเอมิเซลลูโลส (xylanolytic bacteria) (ฉลอง, 2541) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสที่สำคัญได้แก่ *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* และ *Fibrobacter succinogenes* นอกจากนี้ยังมี *Clostridium lochheadii* และ *C. longisporum* แม้จะย่อยเซลลูโลสได้บ้าง แต่ไม่ค่อยพบในกระเพาะรูเมน โดยแบคทีเรียในกลุ่มย่อยสลายเอมิเซลลูโลสที่สำคัญที่สุดคือ *Butyrivibrio fibrisolvens* แต่ชนิดอื่นๆ เช่น *Prevotella ruminicola*, *F. succinogenes* และ *Lachnospira multiparus* ก็สามารถย่อยสลายเอมิเซลลูโลสได้ (Kamra, 2005) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้ชนิดเดียวจะสามารถย่อยสลายเยื่อใยได้น้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียทำงานร่วมกัน (ฉลอง, 2541) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของพืชประกอบด้วยการรวมตัวของคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน เอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะอาจมีผลเฉพาะจุดใดจุดหนึ่งเท่านั้น การมีเอนไซม์จากแบคทีเรียต่างชนิดกันแต่อยู่ในประเภทเดียวกัน อาจจะมีผลในการเข้าย่อยในจุดต่างๆ ร่วมกัน ทำให้การย่อยสลายเยื่อใยเกิดได้เร็วขึ้น

Table 1 Bacterial diversity of the rumen microbial ecosystem of domestic and wild animals

Group	Species	References
Cellulolytic	<i>Fibrobacter succinogenes</i> (<i>Bacteroides succinogenes</i>)	Hungate (1950), Flint et al. (1990)
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus albus</i>	Dehority (1986) Dehority et al. (1967), Stewart et al. (1979), Bryant et al. (1986)
	<i>Clostridium cellobioparum</i>	Hungate (1944)
	<i>Clostridium longisporum</i> <i>Clostridium lochheadii</i>	Hungate (1957)
	<i>Eubacterium cellulosolvens</i> (<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>)	Bryant et al. (1958) Van Gylswyk et al. (1970)
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Bryant and Burkey (1953), Bryant and Small (1956)
	<i>Prevotella ruminicola</i> (<i>Bacteroides ruminicola</i>)	Cotta (1992)
Xylanolytic	<i>Eubacterium xylanophilum</i> , <i>Eubacterium uniformis</i>	Van Gylswyk and Van der Toorn (1985)

Source: Modified from Kamra (2005)

การศึกษาชนิดและจำนวนประชากรแบคทีเรียใน กระเพาะรูเมน

จากบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีผลต่อกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น จึงได้นักวิจัยให้ความสนใจศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลขึ้น เพื่อใช้ในการตรวจนับแบคทีเรียให้ได้ผลที่แม่นยำมากขึ้น ทำให้นักวิจัยสามารถนำไปปรับใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นการศึกษายีน 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) ที่จำเพาะเจาะจงเป็นมาตรฐานในการจำแนก (Forster et al., 1997; Shinkai and Kobayashi, 2007) ในการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มย่อย สลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนโดยใช้ 16S RNA

rRNA หมายถึง RNA ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม โดย rRNA ของแบคทีเรียมี 3 ขนาด ได้แก่

23S, 16S และ 5S โดยความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 2,971, 1,522, และ 120 bp ตามลำดับ (Bouchet et al., 2008) ซึ่ง 16S rRNA ได้มาจากไรโบโซมชิ้นเล็ก (30S) ในขณะที่ 5s และ 23s rRNA ได้มาจากไรโบโซมชิ้นใหญ่ (50s) ซึ่ง rRNA ทั้งสามชนิดมีความเชื่อมโยงกับชนิดของแบคทีเรียด้วยหน้าที่พื้นฐานในการสังเคราะห์โปรตีน (Woese, 1996) แต่เนื่องจากยีน 16S rRNA สามารถศึกษาชนิดของแบคทีเรียได้หลากหลายชนิดกว่า 5s และ 23s rRNA ดังนั้น ยีน 16S rRNA จึงจัดเป็นยีนหลักที่ใช้สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Kolbert and Persing, 1999) โดย Forster et al. (1997), Krause et al. (1999) และ Wanapat and Cherdthong (2009) รายงานว่า การใช้ยีน 16S rRNA สามารถจำแนกชนิดของ *B. fibrisolvens*, *F. succinogenes*, *R. albus* และ *R. flavefaciens* ได้ละเอียดเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าในสัตว์เคี้ยวเอื้องแต่ละชนิดจะพบจำนวนของแบคทีเรียเหล่านี้แตกต่างกันไป นอกจากนี้ จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยโดยใช้ 16S rRNA ในสัตว์เคี้ยวเอื้องแต่ละชนิดพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใย คือ *F. succinogenes*, *R. albus* และ *R. flavefaciens* มีความแปรปรวนของสูง (Table 2)

Table 2 Distribution of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* in the rumen quantified by molecular-based techniques

Animal	Proportion (% total bacteria)			Sources
	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>R. albus</i>	
Dairy cows	0.09-0.40	0.06-0.32	0.59-1.59	Weimer et al. (1999)
Dairy cows	0.61-1.00	0.34-0.80	0.001-0.008	Stevenson and Weimer (2007)
Dairy heifers	2.9-10.1	1.1-1.9	0.8-1.7	Uyeno et al. (2007)
Cattle	5.36	6.57	0.24	Kim and Yu (2012)
Sheep	2.0	1.6	0.9	Michalet-Doreau et al. (2002)
Sheep	2.60	0.14	0.03	Koike et al. (2007)
Sheep	0.01	2.15	18.12	Stiverson et al. (2011)

นอกจากนี้ Nercessian et al. (2005) รายงานถึงข้อจำกัดของ rRNA อีกอย่างหนึ่งคือขาดความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพและความสามารถในการเมแทบอลิซึม เช่นเดียวกับ Shinkai et al. (2010) ได้ทำการศึกษานิตของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยโดยใช้ยีนจาก 16S rRNA ของ *F. succinogenes* เป็นพื้นฐาน ร่วมกับการใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งสามารถตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยอื่นๆได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าความจำเพาะเจาะจงของการใช้ 16S rRNA ต่ำ เนื่องจากตรวจพบแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยด้วย

การศึกษานิตและจำนวนประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยใช้ functional gene

จากข้อจำกัดของการใช้ 16S rRNA ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียนั้น นักวิจัยจึงให้ความสนใจในการใช้ functional gene ซึ่งเป็นยีนของเอนไซม์สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม (key enzymes) สำหรับแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม (Hallam et al., 2003; Nercessian et al., 2005; Junier et al., 2010) เพื่อใช้ในการจำแนกประชากรแบคทีเรีย โดยนิยมใช้เอนไซม์ตัวสุดท้าย (terminal enzyme) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวจะพบได้เฉพาะในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น ยีน *pmoA* และ *mcrA* ในแบคทีเรียกลุ่มผลิตแก๊สเมเทน ยีน *amoA*, *narG*, *nirK*, *nirS* และ *nosZ* ของแบคทีเรียกลุ่มย่อยโปรตีนและผลิตแอมโมเนีย ยีน *celA*, *celB*, *celD*, *xynA*, *xynB* และ *endC* ของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่า functional gene บางชนิดประกอบด้วย operon หลายๆ กลุ่มรวมกัน ซึ่งแต่ละ operon ไม่สามารถใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด เนื่องจากบาง operon ไม่มีจุด conservative ที่สามารถใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้องได้ (Luton et al., 2002) ทำให้ functional gene ของเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Thauer, 1998)

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันได้มีนักวิจัยออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ functional gene เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการใช้ functional gene ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียสามารถแบ่งแยกชนิดของแบคทีเรียจากการทำงานและเห็นความแตกต่างของชนิดและจำนวนประชากรได้อย่างชัดเจน

ผลการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA และ functional gene

การศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้ลำดับยีนที่จำเพาะเจาะจงในช่วงก่อนทศวรรษที่ผ่านมา นิยมใช้ 16S rRNA อย่างไรก็ตาม Costello and Lidstrom (1999) พบว่าการใช้ยีน 16S rRNA เพื่อศึกษาประชากรและความหลากหลายของแบคทีเรียนั้นไม่สามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายอย่างแท้จริงของประชากรแบคทีเรียกลุ่มออกซิเดชั่นแก๊สเมเทน (methanotrophs) ทั้งหมดได้ แต่การใช้ยีนผลิตเอนไซม์ methane monooxygenase และ methanol dehydrogenase (*pmoA*) สามารถตรวจกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถออกซิเดชั่นแก๊สเมเทนได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่าการใช้ 16S rRNA มีความคลาดเคลื่อนสูง และให้ผลการคำนวณค่าประชากรของแบคทีเรียมีค่าค่อนข้างสูง ดังการรายงานของ Mendum et al. (1999) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบไพรเมอร์ระหว่าง 16S rRNA และยีนผลิตเอนไซม์ ammonia monooxygenase (*amoA*) เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มที่ออกซิเดชั่นแอมโมเนีย (ammonia oxidation) พบว่าการใช้ 16S rRNA รายงานจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ออกซิเดชั่นแอมโมเนียสูงเกินกว่าการใช้ยีน *amoA* (Figure 1) เนื่องจาก *amoA* เป็น operon ของเอนไซม์ ammonia monooxygenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน ammonia เป็น hydroxylamine ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบยีน *amoA* ได้เฉพาะในแบคทีเรียกลุ่มออกซิเดชั่นแอมโมเนีย (Hermansson and Lindgren, 2001; Norton et al., 2002) สอดคล้องกับการรายงานของ Henry et al. (2006) ที่รายงาน

ว่าการใช้ยีน nitrous oxide reduction (nosZ) จำนวน 2 ชุด เพื่อศึกษาปริมาณประชากรแบคทีเรียที่ผลิตที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่การใช้ยีน 16S rRNA ให้ผลจำนวนประชากรแบคทีเรียสูงกว่าการใช้ยีน nosZ เช่นเดียวกับการรายงานของ Heylen et al. (2006)

ที่รายงานว่าการศึกษาความหลากหลายโดยใช้ยีนผลิตภัณฑ์เอนไซม์ nitrite reductase (nirS) ให้ผลที่แตกต่างกับการใช้ 16S rRNA จึงเห็นได้ว่าการใช้ 16S rRNA อาจไม่เหมาะสมสำหรับการจัดกลุ่มแบคทีเรีย

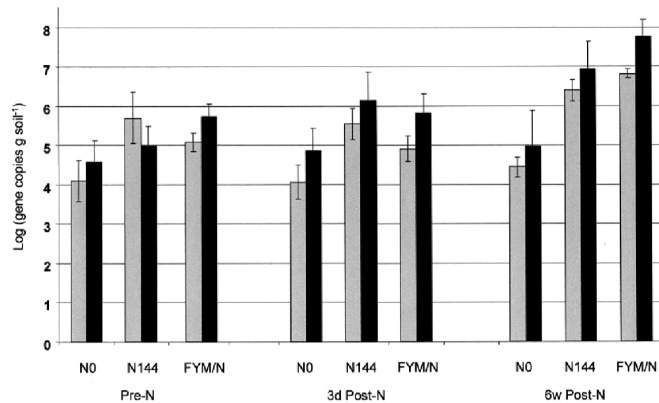


Figure 1 The number of amoA (■) and 16S rRNA (■) gene copies in DNA extracts from samples from plots NO, N144, and FYM/N

Source: Mendum et al. (1999)

จากการรายงานของ Kandeler et al. (2006) ได้ศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA เปรียบเทียบกับ narG, nirK, nirS, และ nosZ ซึ่งเป็น functional gene ของเอนไซม์ nitrate reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นแอมโมเนียไนโตรเจน พบว่าการใช้ 16S rRNA แสดงถึงปริมาณของดีเอ็นเอสูงกว่าการใช้ narG, nirK, nirS,

และ nosZ แต่อย่างไรก็ตาม functional gene แต่ละชนิดส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วย โดยพบว่า narG และ nirS แสดงปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่า nirK และ nosZ ดังแสดงใน Table 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า functional gene ที่แตกต่างกันให้ปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ functional gene ในอนาคต

Table 3 Copy numbers of the 16S rRNA and the narG, nirK, nirS, and nosZ genes from soils

Samples	No. of gene copies (ng ⁻¹ of DNA)				
	16S rRNA	narG	nirK	nirS	nosZ
1	5.1 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁴	1.1 × 10 ³	2.9 × 10 ³	1.8 × 10 ³
2	8.9 × 10 ⁵	2.1 × 10 ⁴	1.4 × 10 ³	2.9 × 10 ³	4.7 × 10 ³
3	7.5 × 10 ⁵	6.4 × 10 ³	9.1 × 10 ²	4.1 × 10 ³	2.0 × 10 ³
4	6.6 × 10 ⁵	3.3 × 10 ³	1.3 × 10 ³	2.5 × 10 ²	4.8 × 10 ³
5	6.3 × 10 ⁵	2.1 × 10 ³	9.5 × 10 ²	5.7 × 10 ²	4.7 × 10 ³

Source: Modified from Kandeler et al. (2006)

นอกจากนี้ พบว่าการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ด้วยการใช้ 16S rRNA ไม่สามารถสร้างแผนภาพได้อย่างถูกต้อง (Felske et al., 2003) โดยงานวิจัยส่วนใหญ่แสดงแผนภาพ phylogenetic tree มีความคลาดเคลื่อนสูงกว่าการใช้ functional gene ซึ่ง Vianna et al. (2006) พบว่าผลการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ระหว่างตัวอย่างที่ใช้ 16S rRNA และยีนผลิตเอนไซม์ methyl coenzyme M reductase (mcrA) ซึ่งเป็นที่ทราบว่าพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้เฉพาะในแบคทีเรียกลุ่มผลิตแก๊สเมทาเนน (methanogenic archaea) เท่านั้น โดยบ่งบอกว่าการใช้ 16S rRNA มีการนับแบคทีเรียที่ไม่ใช่ methanogenic archaea จึงส่งผลให้สามารถตรวจจับจำนวนของแบคทีเรียเป้าหมายได้มากกว่าการใช้ยีน mcrA นอกจากนี้การใช้ 16S rRNA ยังให้ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียผิดพลาดด้วย โดยไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของ methanogenic archaea 2 ชนิด (*Methanobrevibacter oralis* และ *M. smithii*) ออกจากกันได้ ในขณะที่การใช้ยีน mcrA สามารถจำแนก methanogenic archaea แต่ละชนิดออกจากกันได้ อย่างชัดเจน **Figure 2** ดังนั้นเพื่อการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม methanogenic archaea ที่เหมาะสมจึงควรใช้ยีน mcrA นอกจากนี้ Gregory et al. (2003) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง 16S rRNA และยีน

ผลิตเอนไซม์ nitrate reductase gene (NarG) ในการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree พบว่ามีเพียงบางส่วนของที่เหมือนกันเท่านั้น นอกจากนี้แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มี NarG sequences แบบเดียวกันแต่ถูกจัดแยกเป็นต่างสายพันธุ์ในกรณีที่ใช้ 16S rRNA เช่นเดียวกับการรายงานจาก Goregues et al. (2005) ที่พบว่า 16S rRNA จัดแบคทีเรียบางชนิดอยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน แต่ยีน nirS จัดแบคทีเรียเหล่านั้นต่างกลุ่มกันอย่างชัดเจน **Figure 3** สอดคล้องกับการรายงานของ Delorme et al. (2003) ที่กล่าวว่าไม่พบความสัมพันธ์ของแผนภาพ phylogenetic tree จากยีน narG, nosZ และ 16S rRNA นอกจากนี้ Regan et al. (2003) พบว่าการใช้ 16S rRNA เพื่อสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่าง nitrobacter และแบคทีเรียกลุ่ม non-nitriteoxidizing bacteria ได้ ทำให้ขาดความน่าเชื่อถือในการใช้ยีน 16S rRNA สอดคล้องกับการรายงานของ Bothe et al. (2000) รายงานว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ ammonia-oxidizing bacteria มีความคล้ายคลึงกับ *Rhodocyclus purpureus* และแบคทีเรียที่ออกซิไดส์ธาตุเหล็ก โดยเฉพาะ *Gallionella ferruginea* ดังนั้นการใช้ 16S rRNA ที่ขาดความจำเพาะเจาะจงมีความเสี่ยงสูงที่จะทำให้แผนภาพ phylogenetic tree มีความคลาดเคลื่อน

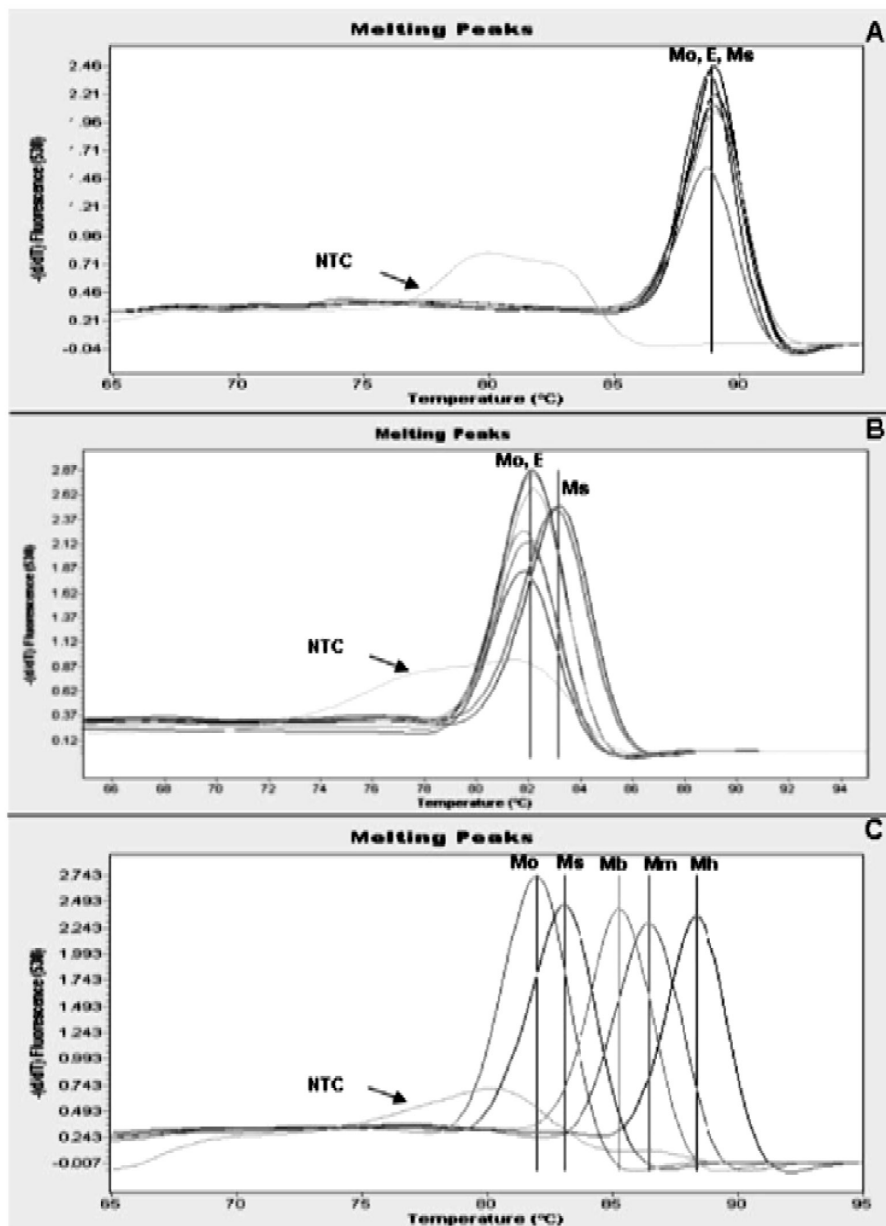


Figure 2 Dissociation curves of archaeal 16S rRNA gene PCR products (A) and methanogenic mcrA gene PCR products (B and C). E, endodontic samples; Mo = *M. oralis*; Ms = *M. smithii*; Mb = *M. bryantii*; Mm = *M. maripaludis*; Mh = *M. hungatei*; NTC = nontarget control.

Source: Vianna et al. (2006)

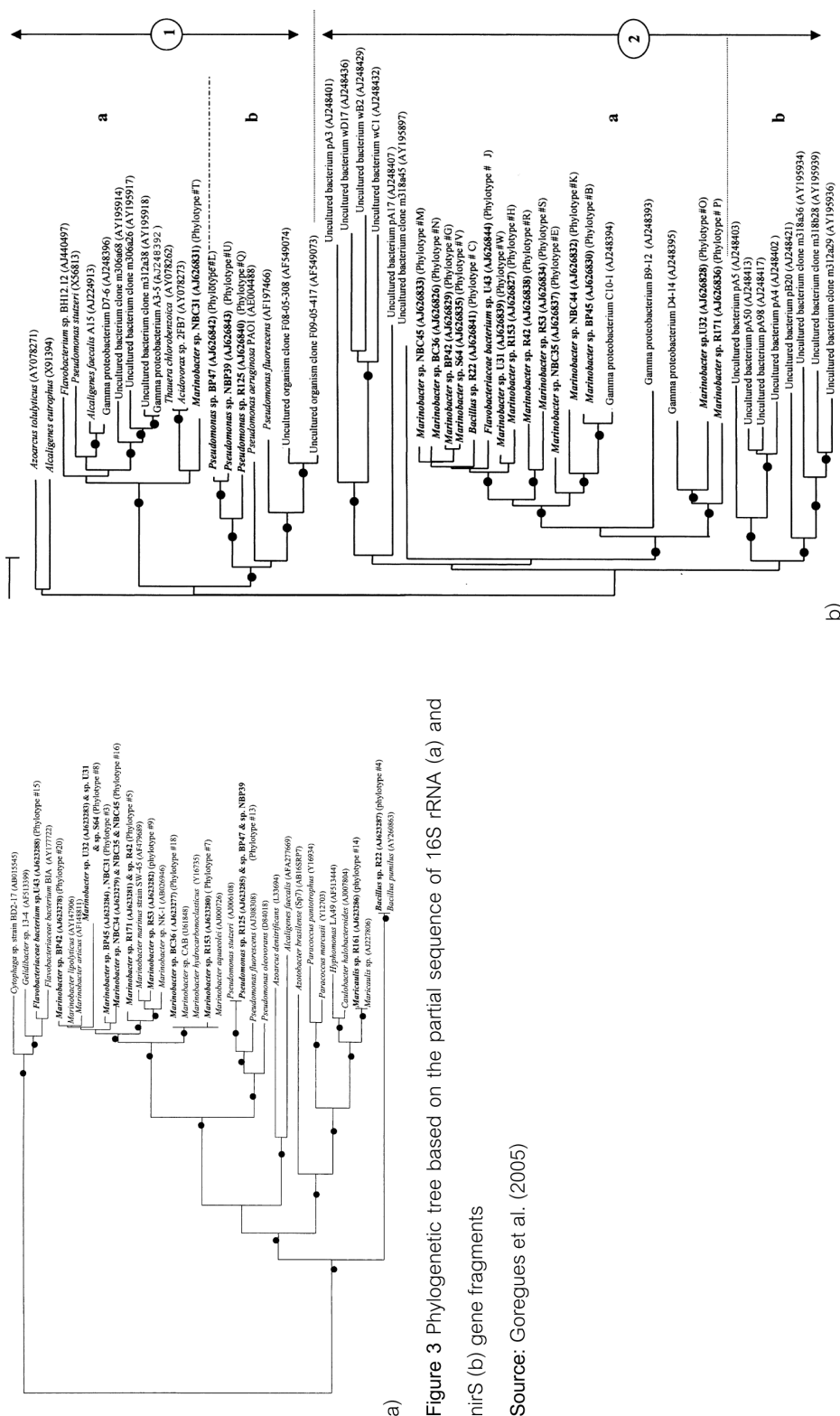


Figure 3 Phylogenetic tree based on the partial sequence of 16S rRNA (a) and nirS (b) gene fragments

Source: Goregues et al. (2005)

ผลของการใช้ไพรเมอร์จาก functional gene ในการศึกษาประชากรของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

จากการรายงานของ Stevenson and Weimer (2007) รายงานว่า จากการนับจำนวนแบคทีเรียย่อยเยื่อใย 3 ชนิด คือ *R. flavefaciens*, *R. albus* และ *F. succinogenes* โดย 16S rRNA พบว่าจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งสามชนิดมีประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งคิดเป็นปริมาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียอื่นๆ ในกระเพาะรูเมนมีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยได้เช่นกัน ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA เพื่อศึกษาจำนวนประชากรของ *R. flavefaciens*, *R. albus* และ *F. succinogenes* ไม่เพียงพอต่อการศึกษานับจำนวนประชากรแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยทั้งหมด นอกจากนี้การใช้ 16S rRNA ยังมีการตรวจจับรวมแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ด้วย ซึ่งการใช้ยีน 16S rRNA บ่งชี้ได้เพียงกลุ่มของแบคทีเรียที่มียีน 16S rRNA ตรงกับยีนที่ต้องการศึกษาโดยไม่สามารถบ่งชี้ถึงความสามารถในการทำงานได้ ซึ่งการใช้ functional gene สามารถตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสามารถทำงานตรงกันได้ในโดยการตรวจหา ยีนที่ทำหน้าที่ที่ต้องการศึกษาโดยตรง

Selinger et al. (1996) รายงานถึงชนิดของยีนและเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนกลุ่มย่อยสลายเยื่อใย ดัง Table 4 โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสถูกควบคุมโดยยีน celA, celB, celC, celD, celE, egIV, Egl, end-1, endA, endAFS, endB, endC, endl และ pRA201

และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสถูกควบคุมโดยยีน xylB, xynA, xynB, xynC และ xynD ซึ่งเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolases families (GHF) ซึ่ง Henrissat (1991) และ Davison and Blaxter (2005) รายงานว่ามีเอนไซม์ GHF 14 กลุ่มจากทั้งหมด 131 กลุ่ม ที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลส โดยเอนไซม์ในกลุ่ม GHF 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51 และ 74 เป็นเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส สอดคล้องกับการรายงานของ Berg et al. (2009) ที่พบว่า ใน *R. flavefaciens* มีการแสดงออกของยีน GHF หลายกลุ่ม แต่ที่สำคัญคือ GHF 5, 9, 11 และ 43 (Figure 4) โดย Dai et al. (2012) แสดงถึงส่วนประกอบของกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสร้างเคราะหเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยมีกลไกการทำงานที่ซับซ้อนและมีขนาดใหญ่ นอกจากนี้จะเห็นว่ายีนสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยเยื่อใยทั้งของเยื่อใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีการกระจายตัว และทำงานร่วมกันเป็นคอมเพล็กซ์ สอดคล้องกับการรายงานของ McSweeney and Mackie (2012) ที่กล่าวว่ายีนของเอนไซม์ GHF มีขนาดใหญ่ (มากกว่า 100 ยีน) ซึ่งมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่ใกล้ๆ กันเช่นเดียวกับ Izquierdo et al. (2010) ที่กล่าวว่าเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยเซลลูโลสประกอบด้วยเอนไซม์ GHF หลายชนิดทำงานร่วมกัน โดยมี GHF 5 และ 9 เป็นส่วนหลัก

Table 4 Cloning and characterization of genes from rumenbacteria

Source	Gene	Enzyme	Reference
<i>B. fibrisolvens</i>	celA	Endoglucanase	Hazlewood et al. (1990)
	endl	Endoglucanase	Berger et al. (1989)
	xynA	Xylanase	Mannarelli et al. (1990)
	xynB	Xylanase	Lin and Thomson (1991)
	xylB	Xylosidase	Sewell et al. (1989), Utt et al. (1991)
<i>Clostridium sp.</i>	celA	Endoglucanase	Mittendorf and Thomson (1993, 1995)
<i>F. succinogenes</i>	endAFS	Endoglucanase	Cavicchioli et al. (1991)
	endB	Endoglucanase	Broussolle et al. (1994)
	end-1	Endoglucanase	Ozcan et al. (1996)
	endC	Endoglucanase	Bera et al. (1996)
	xynC	Xylanase	Paradis et al. (1993), Zhu et al. (1994)
<i>P. ruminicola</i>	celA	Endoglucanase	Vercoc and Gregg (1992)
	xyl	Xylanase	Whitehead (1993)
	xynA, xynB	Xylanase	Gasparic et al. (1995)
<i>R. albus</i>	celA	Endoglucanase	Attwood et al. (1996), Vercoc and Gregg (1993)
	celA, celB	Endoglucanase	Poole et al. (1990)
	Egl	Endoglucanase	Ohmiya et al. (1989), Duguchi et al. (1991)
	eglV	Endoglucanase	Karita et al. (1993)
	pRA201	β -Glucosidase	Takano et al. (1992), Ohmiya et al. (1985)
<i>R. flavefaciens</i>	celA	Cellodextrinase	Wang and Thomson (1990, 1992)
	celB	Endoglucanase	Vercoc et al. (1995)
	celD	Glucanase	Howard and White (1990), Vercoc et al. (1994)
	celE	Endoglucanase	Wang et al. (1993)
	xynA	Xylanase	Zhang and Flint et al. (1992)
	xynB	Xylanase	Zhang et al. (1994)
	xynD	Xylanase/glucanase, Xylanase, β -1,3-1,4-glucanase	Flint et al. (1993)

Source: Modified from Selinger et al. (1996)

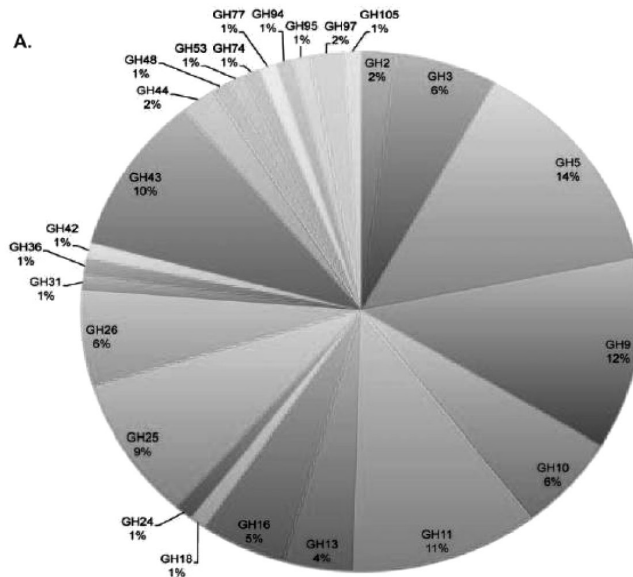


Figure 4 Abundance of glycoside hydrolase modules and carbohydrate-binding modules detected in *R. flavefaciens* FD-1. The 101 GH family modules predicted in *R. flavefaciens*

Source: Berg et al. (2009)

Dodd et al. (2010) ทำการศึกษาแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใย กลุ่ม *Prevotella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ GHF 5 พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั้งที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมน ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ดินและน้ำ มีกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเยื่อใยเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยยีนหลายๆยีนเป็นกลุ่ม โดยโครงสร้างหลักประกอบด้วยยีน SusC, SusD, hypp และ GH10 ซึ่ง Dai et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย (fibrolytic microorganism) โดยใช้ยีนสร้าง SusC และ SusC รายงานว่าการใช้ยีนสร้าง SusC และ SusC ในการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย สามารถตรวจพบเชื้อใน

กลุ่ม GH5, GH9 และ GH10 ได้ แต่ไม่พบเชื้อกลุ่ม GH48 อย่างไรก็ตาม Pereyra et al. (2010) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่มย่อยเซลลูโลส โดยอาศัยยีนของเอนไซม์ GHF 5 (cel5) และ 48 (cel48) โดยพบว่าการใช้ไพรเมอร์ cel5_392F-754R สามารถใช้เป็น functional gene ของการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยคือ *Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans*, *R. flavefaciens* และ *F. succinogenes* โดยไม่ตรวจนับรวมแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่ไพรเมอร์ cel48_490F-920R และ cel48_880F-980R ตรวจพบเพียง *C. thermocellum* ส่วนไพรเมอร์ cel5_392F-525R ไม่สามารถตรวจพบเชื้อใดๆเลย (Table 5)

Table 5 Results of PCR specificity tests with positive and negative controls

Primer combination	<i>C. thermocellum</i>	<i>C. cellulovorans</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>F. succinogenes</i>	<i>D. autotrophicum</i>	<i>M. maripaludis</i>
cel48_490F-920R	+	-	-	-	-	-
cel48_880F-980R	+	-	-	-	-	-
cel5_392F-525R	-	-	-	-	-	-
cel5_392F-754R	+	+	+	+	-	-
mcrA_1035F-1530R	-	-	-	-	-	+
mcrA_1035F-1450R	-	-	-	-	-	+
mcrA_1430F-1530R	-	-	-	-	-	+

Source: Pereyra et al. (2010)

Wang et al. (2012) รายงานว่า functional gene ของเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียชนิดต่างๆมีความหลากหลาย โดย functional gene ของเอนไซม์ endoglucanase ของ *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus* และ *B. fibrisolvens* สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงส่งผลให้การใช้ไพรเมอร์ของ functional gene ของเอนไซม์ endoglucanase เพียงคู่เดียวในการศึกษาจำนวนประชากรของแบคทีเรียไม่เพียงพอต่อการศึกษาซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Koike and Kobayashi (2009) ที่กล่าวว่าเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อ *F. succinogenes* แตกต่างจากแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์ย่อยเยื่อใยจาก *F. succinogenes* แตกต่างจากเชื้ออื่นๆอย่างไรก็ตาม functional gene ของเอนไซม์ xylanase มีความหลากหลายที่น้อยมาก จึงมีความเป็นไปได้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้ functional gene ได้ง่ายกว่า

นอกจากนี้ การใช้ไพรเมอร์ของ functional gene ที่จำเพาะเจาะจงมากเกินไป ส่งผลให้ไม่สามารถตรวจนับจำนวนประชากรแบคทีเรียได้ครอบคลุมทั้งหมดทุกชนิด ซึ่ง Pereyra et al. (2010) รายงานว่าการใช้ cel48 ตรวจพบเพียง *C. thermocellum* เท่านั้น ไม่ครอบคลุมถึง *R. flavefaciens* และ *F. Succinogenes* เช่นเดียวกับการรายงานของ Gaby and Buckley

(2012) ซึ่งทำการรวบรวมไพรเมอร์จากยีน nitrogen-fixing (nifH) ในแบคทีเรียและ archaea รายงานว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน nifH ให้ผลการทดลองที่ไม่ครอบคลุมยีน nifH ทั้งหมดในแบคทีเรียและ Archaea โดยพบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมด 51 ไพรเมอร์มีไพรเมอร์เพียง 15 แบบ ที่สามารถตรวจจับแบคทีเรียกลุ่มจับไนโตรเจนได้สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่า การใช้ functional gene เพื่อศึกษาชนิดและจำนวนประชากรแบคทีเรียให้ผลการศึกษาที่ครอบคลุมและจำเพาะเจาะจงกว่า 16S rRNA เนื่องจาก 16S rRNA รายงานจำนวนประชากรแบคทีเรียสูงกว่า นอกจากนี้ยังจำแนกชนิดของแบคทีเรียคลาดเคลื่อน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ไพรเมอร์ของ functional gene ที่จำเพาะเจาะจงมากเกินไป ส่งผลให้ไม่สามารถตรวจนับจำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุ่มที่ศึกษาได้ครอบคลุมทุกชนิด ดังนั้น จึงยังต้องมีการศึกษาเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและครอบคลุมแก่การย่อยสลายในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียต่อไป ซึ่งในเบื้องต้นมีการรายงานการใช้ functional gene ของ cel5 สามารถตรวจพบแบคทีเรียหลักที่ย่อยสลายเยื่อใย คือ *R. flavefaciens* และ *F. succinogenes* ได้

เอกสารอ้างอิง

- ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Berg, M.M.E., D.A. Antonopoulos, M.T. Rincon, M. Band, A. Bari, T. Akraiko, A. Hernandez, J. Thimmapuram, B. Henrissat, P.M. Coutinho, I. Borovok, S. Jindou, R. Lamed, H.J. Flint, E.A. Bayer, and B.A. White. 2009. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS ONE*. 4: e6650.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schlöter, B.B. Ward, and K.P. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Reviews*. 24: 673-690.
- Costello, A.M., and M.E. Lidstrom. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5066-5074.
- Dai, X., Y. Zhu, Y. Luo, L. Song, D. Liu, L. Liu, F. Chen, M. Wang, J. Li, X. Zeng, Z. Dong, S. Hu, L. Li, J. Xu, L. Huang, and X. Dong. 2012. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. *PLoS ONE*. 7: e40430.
- Davison, A., and M.L. Blaxter. 2005. An expressed sequence tag survey of gene expression in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, an intermediate vector of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 130: 539-552.
- Delorme, S., L. Philippot, V. Edel-Hermann, C. Deulvot, C. Mougé, and P. Lemanceau. 2003. Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1004-1012.
- Dodd, D., Y.H. Moon, K. Swaminathan, R.I. Mackie, and I.K.O. Cann. 2010. Transcriptomic analyses of xylan degradation by *Prevotella bryantii* and insights into energy acquisition by xylanolytic bacteroidetes. *J. Biol. Chem.* 285: 30261-30273.
- Felske, A.D.M., W. Fehr, B.V. Pauling, H. von Canstein, and I. Wagner-Döbler. 2003. Functional profiling of mercuric reductase (*merA*) genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer. *BMC Microbiol.* 3: 22.
- Forster, R.J., J. Gong, and R.M. Teather. 1997. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1256-1560.
- Gaby, J.C., and D.H. Buckley. 2012. A comprehensive evaluation of pcr primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS ONE*. 7: e42149.
- Goregues, C.M., V.D. Michotey, and P.C. Bonin. 2005. Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microbiol. Ecol.* 49: 198-208.
- Gregory, L.G., P.L. Bond, D.J. Richardson, and S. Spiro. 2003. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker. *Microbiol.* 149: 229-237.
- Hallam, S.J., P.R. Girguis, C.M. Preston, P.M. Richardson, and E.F. DeLong. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5483-5491.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henry, S., D. Bru, B. Stres, S. Hallet, and L. Philippot. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5181-5189.
- Hermansson, A., and P.E. Lindgren. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 972-976.
- Heylen, K., D. Gevers, B. Vanparys, L. Wittebolle, J. Geets, N. Boon, and P. De Vos. 2006. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* 8: 2012-2021.
- Izquierdo, J.A., M.V. Sizova, and L.R. Lynd. 2010. Diversity of bacteria and glycosyl hydrolase family 48 genes in cellulolytic consortia enriched from thermophilic biocompost. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3545-3553.
- Junier, P., V. Molina, C. Dorador, O. Hadas, O.S. Kim, T. Junier, K.P. Witzel, and J.F. Imhoff. 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 425-440.

- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89: 124-135.
- Kandeler, E., K. Deiglmayr, D. Tschierko, D. Bru, and L. Philippot. 2006. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5957-5962.
- Kolbert, C.P., and D.H. Persing. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 299-305.
- Krause, D.O., B.P. Dalrymple, W.J.M. Smith, R.I. Mackie, and C.S. McSweeney. 1999. 16S rRNA sequencing *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiol.* 145: 1797-1807.
- Luton, P.E., J.M. Wayne, R.J. Sharp, and P.W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiol.* 148: 3521-3530.
- McSweeney, C., and R. Mackie. 2012. Micro-organisms and Ruminant Digestion: State of Knowledge, Trends and Future Prospects. In: Intergovernmental Technical Working Group on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy.
- Mendum, T.A., R.E. Sockett, and P.R. Hirsch. 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the β subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4155-4162.
- Nercessian, O., N. Bienvenu, D. Moreira, D. Prieur, and C. Jeanthon. 2005. Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ. Microbiol.* 7: 118-132.
- Norton, J.M., J.J. Alzerreca, Y. Suwa, and M.G. Klotz. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177: 139-149.
- Pereyra, L.P., S.R. Hiibel, M.V. Prieto Riquelme, K.F. Reardon, and A. Pruden. 2010. Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2192-2202.
- Regan, J.M., G.W. Harrington, H. Baribeau, R.D. Leon, and D.R. Noguera. 2003. Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Water Res.* 37: 197-205.
- Selinger, L.B., C.W. Forsberg, and K.J. Cheng. 1996. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe.* 2: 263-284.
- Shinkai, T., and Y. Kobayashi. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1646-1652.
- Shinkai, T., T. Ueki, and Y. Kobayashi. 2010. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Anim. Sci. J.* 81: 72-79.
- Stevenson, D.M., and P.J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biot.* 75: 165-174.
- Thauer, R. K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiol.* 144: 2377-2406.
- Vianna, M.E., G. Conrads, B.P.F.A. Gomes, and H.P. Horz. 2006. Identification and quantification of Archaea involved in primary endodontic infections. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1274-1282.
- Wanapat, M., and A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58: 294-299.
- Wang, G., K. Meng, H. Luo, Y. Wang, H. Huang, P. Shi, P. Yang, Z. Zhang, and B. Yao. 2012. Phylogenetic diversity and environment-specific distributions of glycosyl hydrolase family 10 xylanases in geographically distant soils. *PLoS ONE.* 7: e43480.
- Williams, A.G., and N.H. Strachan. 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 58-59.
- Woese, C. R. 1996. The World of Ribosomal RNA. In: R. A. Zimmermann, and A. E. Dahlberg (ed.), *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis*. CRC Press, Boca Raton, USA.