

การศึกษารูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน
16S rRNA ของแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa*
โดยใช้ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง
Analysis of 16S rRNA Gene Sequences in *Paenibacillus*
polymyxa Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

กนกนาฏ ปราบมาก, สุดาทิพย์ จันทร และภัทรพร คุ่มภักย์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Kanoknart Prabmark, Sudathip Chantorn and Phataraporn Khumphai*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: July 28, 2018; Accepted: September 3, 2018

บทคัดย่อ

Paenibacillus polymyxa เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลันเนส ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและอาหารสัตว์ โดยการศึกษาเพื่อจำแนกและระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียเป็นประโยชน์ต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์และเลือกใช้แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA และศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง (SNP) พบว่า *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ มียีน 16S rRNA จำนวน 11-14 ชุดซ้ำ ภายในจีโนม และพบบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 29 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 465-488 เป็นบริเวณที่สามารถเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอร์สากล ซึ่งสามารถจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ได้เป็น 2 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 สามารถระบุ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 เป็น *P. polymyxa* ไอโซเลต BTK01 และมีค่าดัชนีความแตกต่างกับแบคทีเรีย *P. polymyxa* 0.000-0.0017 ดังนั้นความแตกต่างของรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 รูปแบบ แสดงถึงความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในสปีชีส์ ส่งผลให้แบคทีเรีย *P. polymyxa* มีแนวโน้มในการจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ย่อย และสามารถนำรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์มาเพิ่มแนวทางพัฒนาฐานข้อมูลยีน 16S rRNA เพื่อระบุสปีชีส์และสปีชีส์ย่อยของแบคทีเรีย *P. polymyxa*

คำสำคัญ : *Paenibacillus*; SNP; ยีน 16S rRNA; การจำแนก; สปีชีส์ย่อย

Abstract

Paenibacillus polymyxa plays a major role in the production of xylanase enzyme, which can be potentially applied in paper and animal feed industries. It is necessary to study the identification of the

bacteria for preserving bacterial cultures and effectively bacterial utilization. In this study, we analyzed nucleotide sequences and determined the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 16S *rRNA* gene of *P. polymyxa*. The results showed that 10 strains of *P. polymyxa* contained 11 to 14 *rRNA* gene copies of 16S *rRNA* gene, which are located within each genome. The polymorphic sites were found among the multiple 16S *rRNA* genes and the alignment results showed that 29 variable sites were detected. The region ranging from 465 to 488, which can be amplified using universal 16S *rRNA* gene primers. This region could be divided into 2 nucleotide sequence patterns (pattern 1 and pattern 2). The pattern 1 could be used to identify *Paenibacillus* sp. BTK01 as *P. polymyxa* BTK01 that corresponded with the distance correlation coefficient (0.000 to 0.0017) of 10 reference strains. Thus, the patterns represented the variation within species, which could be used for discrimination of *P. polymyxa* at subspecies level. In conclusion, the results suggest that these 2 sequence patterns of 16S *rRNA* gene may improve the 16S *rRNA* database for species and subspecies identification of *P. polymyxa*.

Keywords: *Paenibacillus*; SNP; 16S *rRNA* gene; identification; subspecies

1. คำนำ

Paenibacillus sp. จัดเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (variable gram) เนื่องจากมีผนังเซลล์ชั้นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่บางมาก แบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ประกอบด้วย *P. polymyxa*, *P. jamaicae*, *P. peoriae*, *P. brasilensis*, *P. pabuli*, *P. taichungensis* และ *P. Dongdonensis* เป็นต้น Wang และคณะ (2013) รายงานว่า *Paenibacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (fixing nitrogen) ซึ่งใช้จำนวนยีนน้อยที่สุดในการตรึงไนโตรเจน (9 ยีน) ประกอบด้วย *nifB*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *hesA* และ *nifV* โดยแต่ละยีนอยู่เรียงติดกัน แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ส่วนมากบริเวณดินปลูกพืชทางการเกษตร ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี (Niu *et al.*, 2011) พริกไทย (Ma *et al.*, 2011) แตงโม (Li *et al.*, 2014) เป็นต้น

Paenibacillus sp. สามารถสร้างเอนไซม์แมนนาเนส (mannanase) และไซลานเนส (xylanase) ซึ่งมีสมบัติย่อยสลายประกอบแมนแนน

(Kim *et al.*, 2017) และสารประกอบไซแลน (Walia *et al.*, 2013) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชตามลำดับ โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อย่อยกากอาหาร และอุตสาหกรรมกระดาษในขั้นตอนการฟอกขาวแทนการใช้สารเคมี พบว่า *P. polymyxa* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ปริมาณสูง และ *P. pabuli* สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งแมนนาเนสและไซลานเนส ซึ่งเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมกระดาษและอาหารสัตว์ และมีประโยชน์ใช้ในทางการเกษตร การบำบัดทางสิ่งแวดล้อม และงานทางการแพทย์ เป็นต้น ดังนั้นการทราบชนิดของแบคทีเรียจะทำให้สามารถเลือกใช้แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีประโยชน์ในการเก็บรักษาสายพันธุ์

P. polymyxa และ *P. pabuli* สามารถผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาและจำแนกชนิดแบคทีเรีย การจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* เป็นที่นิยมมากในปัจจุบันศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S

rRNA ด้วยไพรเมอร์สากล (universal primer) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) รายงานผลโดยแสดงนิวคลีโอไทด์ที่มีความถี่สูงสุดที่พบในตำแหน่งนั้นของทั้งจีโนม ซึ่งแต่ละชุดซ้ำของยีนจะมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่ง ทำให้ข้อมูลชนิดนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้แสดงผลขาดหายไป ส่งผลให้การวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานะข้อมูลได้ผลไม่ชัดเจน (Hakovirta *et al.*, 2016) จึงไม่สามารถใช้จำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียบางชนิดในระดับสปีชีส์

การศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ยังสามารถใช้เพื่อกำหนดรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้หลายรูปแบบ ซึ่งเป็นผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละชุดซ้ำของยีน เพื่อนำรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หลากหลายมาปรับปรุงฐานข้อมูลของ *16S rRNA* เพิ่มโอกาสให้สามารถใช้ข้อมูลในการอ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* (sequence alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการทราบชนิดของแบคทีเรีย (query sequence) (Fernández-No *et al.*, 2015 และ Hakovirta *et al.*, 2016) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง (SNP) บริเวณยีน *16S rRNA* ภายในสปีชีส์เพื่อกำหนดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ในแบคทีเรียภายในสปีชีส์เดียวกัน เพื่อประโยชน์ในงานด้านการจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ดังกล่าว

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S*

rRNA

2.1.1 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของตัวอย่างแบคทีเรีย *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ใช้สำหรับการศึกษา SNP ศึกษาการจัดรูปแบบนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* และใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงเพื่อระบุสปีชีส์

2.1.2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่ทราบสปีชีส์จำนวน 3 สายพันธุ์ (*P. polymyxa* H-5 ขนาด 1,455 คู่เบส, *P. pabuli* SW12 ขนาด 1,431 คู่เบส และ *P. pabuli* JCM9074 ขนาด 1,507 คู่เบส) ซึ่งใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบการจัดรูปแบบและใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงเพื่อระบุสปีชีส์

2.1.3 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ที่เก็บเกี่ยวจากนาข้าว จังหวัดกาญจนบุรีซึ่งไม่ทราบสปีชีส์จำนวน 3 ไอโซเลต (BTK01 ขนาด 1,332 คู่เบส, BTK04 ขนาด 1,336 คู่เบส และ BTK05 ขนาด 1,331 คู่เบส) ใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างที่ต้องการทราบสปีชีส์

2.2 การตรวจสอบจำนวนชุดซ้ำของยีน *16S rRNA* ในจีโนม

จำนวนชุดซ้ำของยีน *16S rRNA* ในจีโนม *P. polymyxa* แต่ละสายพันธุ์ตรวจสอบโดยค้นหาจากข้อมูลทั้งจีโนมในฐานะข้อมูล NCBI เปรียบเทียบจำนวนชุดซ้ำของยีน *16S rRNA* ในฐานะข้อมูล และค้นหาแบคทีเรีย *P. polymyxa* โดยใช้ชื่อของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในฐานะข้อมูล rrnDB database (<https://rrnodb.umms.med.umich.edu>)

2.3 การวิเคราะห์รูปแบบและความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ภายในสปีชีส์

เตรียมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์บริเวณยีน 16S *rRNA* ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ ในรูปแบบไฟล์ .fasta โดยสกัดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทุกจำนวนชุดซ้ำของยีน 16S *rRNA* ในแบคทีเรีย *P. polymyxa* แต่ละสายพันธุ์จากจำนวนชุดซ้ำของยีน 16S *rRNA* จากข้อ 2.2 แล้ววิเคราะห์ด้วยการทำ multiple sequence alignment จากนั้นเลือกเลือกนิวคลีโอไทด์ที่มีความถี่สูงสุดในแต่ละตำแหน่งของยีน 16S *rRNA* ทั้งหมดในจีโนมที่เป็นลำดับพ้องกัน (consensus sequence) ของแต่ละสายพันธุ์

จากนั้นนำ consensus sequence มาทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2015) ตรวจสอบบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้แถบเครื่องมือ mark variable sites กำหนดใช้รูปแบบไฟล์ .mas เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* ภายในสปีชีส์ และวิเคราะห์การจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์บริเวณยีน 16S *rRNA* ด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิทางพันธุกรรม

2.4 ศึกษาการใช้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสปีชีส์/สปีชีส์ย่อยของแบคทีเรีย

ทดสอบรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S *rRNA* ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบที่ทราบสปีชีส์จำนวน 3 สายพันธุ์ (*P. polymyxa* H-5, *P. pabuli* SW12 และ *P. pabuli* JCM9074) และลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบที่ไม่ทราบสปีชีส์จำนวน 3 ไอโซเลต (*Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01, BTK04 และ BTK05) โดยการทำให้ multiple sequence alignment สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA, neighbor-joining (NJ) และ maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications และวิเคราะห์ความ

สัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด แล้วคำนวณหาค่าดัชนีความแตกต่าง (distance correlation coefficient) รวมถึงศึกษาการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2015)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ความหลากหลายและรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* ภายในสปีชีส์

การตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน 16S *rRNA* ภายในจีโนมแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรีย *P. polymyxa* มีจำนวนซ้ำทั้งหมด 11-14 ซ้ำ (copy) และมีขนาดยีน (length) 1,542-1,565 คู่เบส (ตารางที่ 1) โดยแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีจำนวนซ้ำและขนาดของยีนใกล้เคียงกัน แสดงว่าจำนวนซ้ำและขนาดของยีนไม่เกี่ยวข้องกับการจัดรูปแบบนิวคลีโอไทด์ แต่เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งภายในสปีชีส์ การมีจำนวนซ้ำของยีนจำนวนมากในจีโนมพบได้ในยีนที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pettersson และคณะ (1996) และ Reischl และคณะ (1998) ซึ่งได้ศึกษาจำนวนซ้ำของยีน 16S *rRNA* ในแบคทีเรีย *Mycoplasma mycoides* และ *Mycobacterium celatum* ตามลำดับ พบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งภายในสปีชีส์ของ *Mycoplasma mycoides* และ *Mycobacterium celatum*

ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์ พบบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 29 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์มี

สาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบสพิวรีน (purine transition) การเปลี่ยนแปลงระหว่างเบสไพริมิดีน (pyrimidine transition) การเปลี่ยนแปลงระหว่างเบสพิวรีนและไพริมิดีน (transversion) การเพิ่มของเบส (insertion) และการขาดหายไปของเบส (deletion) บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ (SNP) ตำแหน่งที่ 465-488 สามารถจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียออกเป็น 2 รูปแบบ โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ (conserve sequence) บริเวณ

ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. Polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์ (รูปที่ 1) รูปแบบที่ 1 คือ 5'-TCTTG TAGA GTA ACTGCTACAAGA-3' ได้แก่ *P. polymyxa* SC2, *P. polymyxa* M1, *P. polymyxa* CF05, *P. polymyxa* YC0573, *P. polymyxa* YC0136, *P. polymyxa* J, *P. polymyxa* sb3-1 และ *P. polymyxa* ATCC 15970 และรูปแบบที่ 2 คือ 5'-TTGAGAGA GTA ACTGCTCTTGAG-3' ได้แก่ *P. polymyxa* SQR-21 และ *P. polymyxa* HY96-2 (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนชุดซ้ำและขนาดของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้งหมด 10 สายพันธุ์

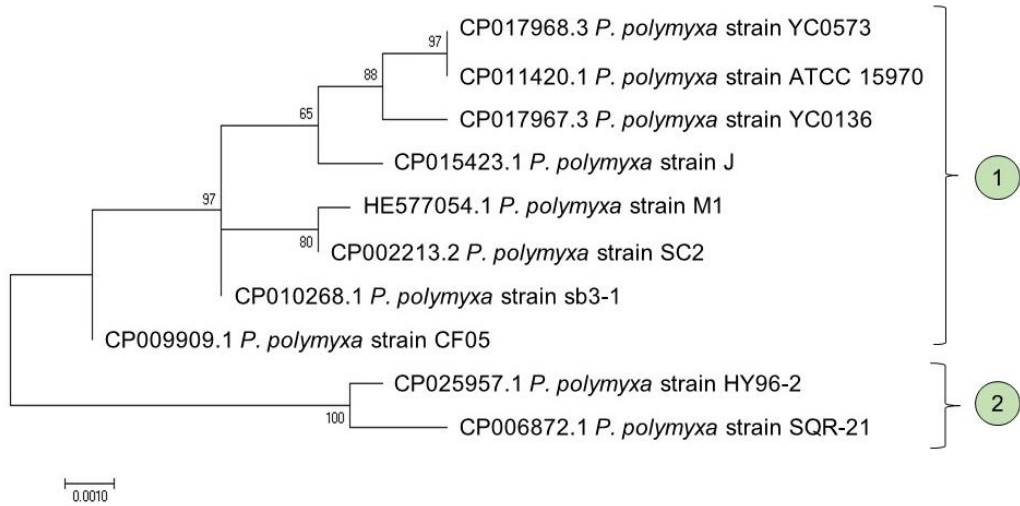
ลำดับ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession No.	จำนวนยีน (ชุดซ้ำ)	ขนาดของยีน (คู่เบส)
1	<i>P. polymyxa</i> SC2	CP002213.2	13	1,559
2	<i>P. polymyxa</i> M1	HE577054.1	14	1,542
3	<i>P. polymyxa</i> CF05	CP009909.1	14	1,563
4	<i>P. polymyxa</i> SQR-21	CP006872.1	13	1,542
5	<i>P. polymyxa</i> YC0573	CP017968.3	12	1,565
6	<i>P. polymyxa</i> YC0136	CP017967.3	11	1,565
7	<i>P. polymyxa</i> J	CP015423.1	14	1,565
8	<i>P. polymyxa</i> sb3-1	CP010268.1	14	1,559
9	<i>P. polymyxa</i> ATCC 15970	CP011420.1	13	1,565
10	<i>P. polymyxa</i> HY96-2	CP025957.1	14	1,552



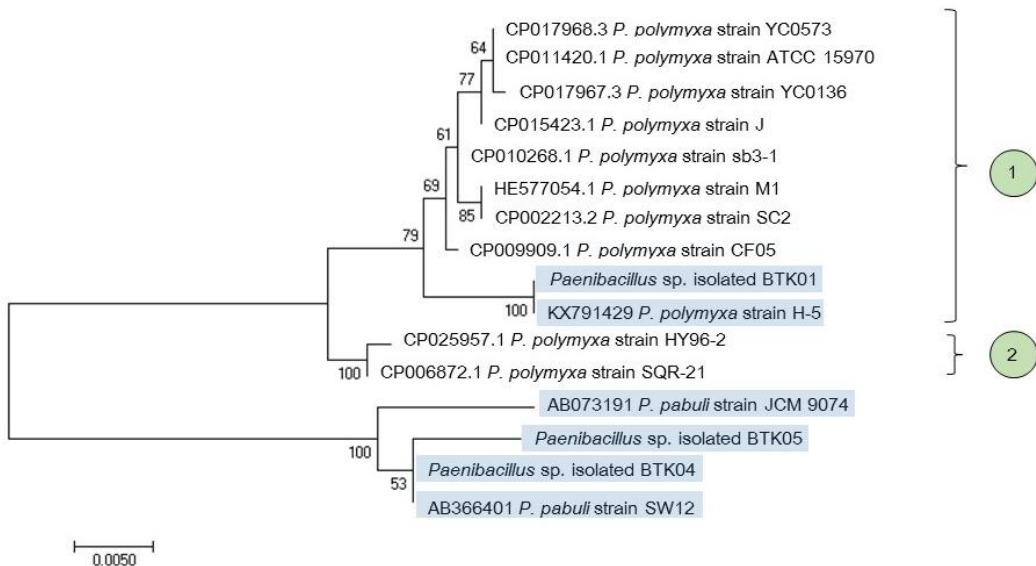
รูปที่ 1 รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ที่พบจากแบคทีเรียภายในสปีชีส์ *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ 465-488 สามารถจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ได้ 2 รูปแบบ

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์

SNP	ตำแหน่ง alignment	ชนิดนิวคลีโอไทด์ (ความถี่)	ลักษณะการกลาย
1	74	A(0.8), G(0.2)	purine transition
2	75	A(0.5), T(0.4) และ G(0.1)	transversion, purine transition
3	76	T(0.8), G(0.2)	transversion
4	93	A(0.7), C(0.3)	transversion
5	94	A(0.6), C(0.2) และ T(0.2)	transversion
6	95	T(0.8), C(0.2)	pyrimidine transition
7	215	A(0.7), G(0.3)	purine transition
8	465	T(0.8), C(0.2)	pyrimidine transition
9	466	C(0.8), T(0.2)	pyrimidine transition
10	468	T(0.8), G(0.2)	transversion
11	469	G(0.8), A(0.2)	purine transition
12	470	T(0.8), G(0.2)	transversion
13	483	A(0.8), C(0.2)	transversion
14	484	C(0.8), T(0.2)	pyrimidine transition
15	485	A(0.8), T(0.2)	transversion
16	486	A(0.8), G(0.2)	purine transition
17	487	G(0.8), A(0.2)	purine transition
18	488	A(0.8), G(0.2)	purine transition
19	656	G(0.8), A(0.2)	purine transition
20	714	G(0.7), T(0.3)	transversion
21	1,012	C(0.8), T(0.2)	pyrimidine transition
22	1,031	A(0.7), G(0.3)	purine transition
23	1,275	C(0.5), T(0.4) และ G(0.1)	pyrimidine transition, transversion
24	1,281	G(0.8), T(0.2)	transversion
25	1,282	Indels base T	insertion, deletion
26	1,283	G(0.8), C(0.2)	transversion
27	1,455	A(0.6), G(0.4)	purine transition
28	1,463	Indels base C	insertion, deletion
29	1,470	Indels base G	insertion, deletion



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์ สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications สามารถจำแนกแบคทีเรีย *P. polymyxa* ได้เป็น 2 กลุ่ม ตามรูปแบบของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* ทั้ง 10 สายพันธุ์ และ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01, BTK04 และ BTK05 สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) โดยกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications

ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์บริเวณยีน 16S rRNA อยู่ในช่วงที่ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยใช้ไพรเมอร์สากล เช่น ไพรเมอร์ 20F (5'-AGTTTGAT

CCTGGCTCAG-3') ในตำแหน่งที่ 9-27 ของยีน 16S rRNA และไพรเมอร์ 1500R (5'-GTTACCTTG TTACGACTT-3') ในตำแหน่งที่ 1,492-1,509 ของ

ยีน 16S *rRNA* (Brosius *et al.*, 1981) ดังนั้นจึงสามารถใช้ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์บริเวณดังกล่าวเป็นรูปแบบในการจำแนกและระบุสปีชีส์ย่อย (subspecies) ของแบคทีเรีย *P. Polymyxa* ได้

การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นภายในสปีชีส์มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของเบสกลุ่มเดียวกัน (transition) มากกว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสต่างกลุ่มกัน (transversion) (ตารางที่ 2) เกิดจากกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ ในการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์มีโปรตีนเพียงพอในการทำหน้าที่เพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์ การจำลองตัวเองของดีเอ็นเออาจเกิดการต่อนิวคลีโอไทด์ผิดพลาดและเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมแก้ไขได้ (DNA repair) ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายใหม่มีนิวคลีโอไทด์ที่ผิดไปจากดีเอ็นเอต้นแบบ และเมื่อดีเอ็นเอสายใหม่มีการจำลองตัวเองจะก่อให้เกิดความผิดพลาดต่อเนื่องไป ความผิดพลาดในตำแหน่งนั้น เกิดเป็น point mutation (กิตติพัฒน์, 2557) การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งนั้น ๆ อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเกิด point mutation เป็นสาเหตุหลักของการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง (SNP) เมื่อมีการถ่ายทอดพันธุกรรมของ point mutation ส่งผลให้เกิดสปีชีส์ย่อยของแบคทีเรีย *P. polymyxa* เช่น งานวิจัยของ Kozak-Muiznieks และคณะ (2018) ใช้ SNP ในการศึกษาสปีชีส์ย่อยของแบคทีเรีย *Legionella pneumophila* (*Lp*) ร่วมกับการศึกษาแผนภูมิทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S *rRNA*, *mip* และ *gyrB* เป็นต้น โดยการศึกษาสปีชีส์ย่อยของแบคทีเรียมีประโยชน์ต่อการเลือกใช้แบคทีเรียที่เหมาะสมกับงานที่ต้องการศึกษา เนื่องจากภายในแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันบางสายพันธุ์ แต่ละสปีชีส์ย่อยมีสมบัติในการสร้างผลผลิตจากเชื้อที่ต่างกัน

3.2 การระบุสปีชีส์/สปีชีส์ย่อยของแบคทีเรียโดยใช้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA*

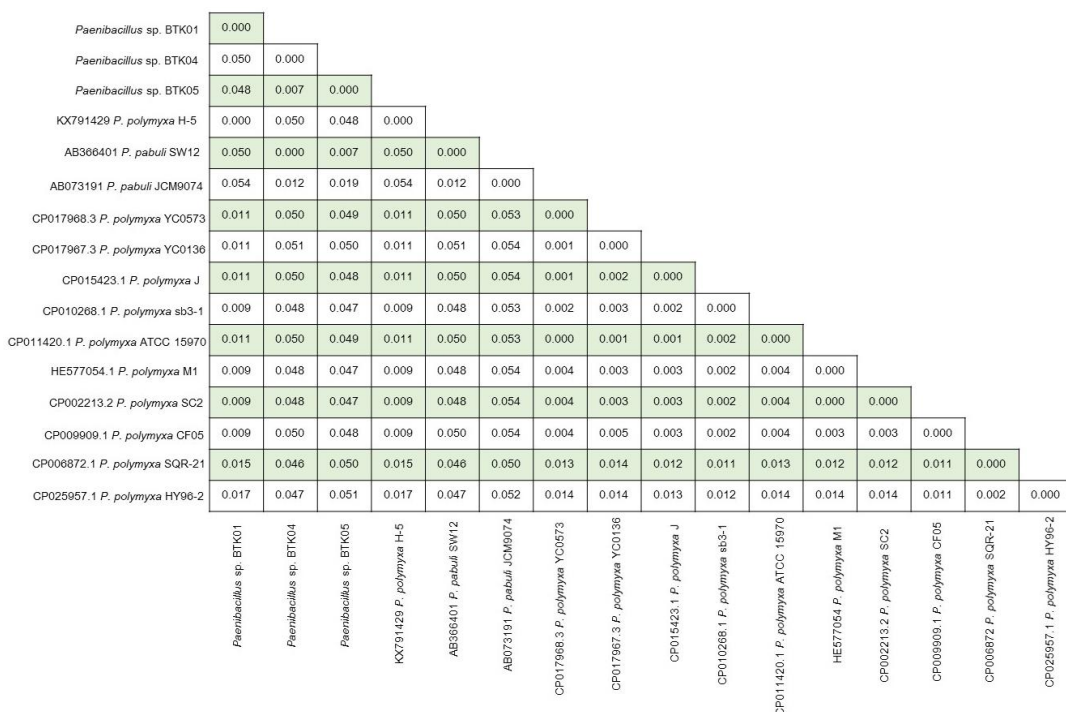
แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยวิธี UPGMA, neighbor-joining (NJ) และ maximum likelihood (ML) ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications เพื่อดูการจัดทำรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* พบว่าสามารถจำแนกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 2 รูปแบบ ซึ่งแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากทั้ง 3 วิธี แสดงการจัดรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สอดคล้องกัน

รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* สอดคล้องกับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 2) และการกำหนดรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1) เมื่อดูความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S *rRNA* ของแบคทีเรีย *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบที่ทราบสปีชีส์ จำนวน 3 สายพันธุ์ (*P. polymyxa* H-5, *P. pabuli* SW12 และ *P. pabuli* JCM9074) และลำดับนิวคลีโอไทด์ทดสอบที่ไม่ทราบสปีชีส์ จำนวน 3 ไอโซเลต (*Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01, BTK04 และ BTK05) พบว่าสามารถจำแนกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสายพันธุ์ของแบคทีเรียเป็น 2 รูปแบบ (รูปที่ 2) โดยแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับรูปแบบที่ 1 ของ *P. polymyxa* และมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับแบคทีเรีย *P. polymyxa* H-5 (รูปที่ 3) จึงสามารถระบุ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 เป็น *P. polymyxa* ไอโซเลต BTK01

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่าง (distance correlation coefficient) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S *rRNA* ของแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 มีค่าดัชนีความ

แตกต่างกันตั้งแต่ 0.000 (แตกต่าง 0 ตำแหน่งจาก นิวคลีโอไทด์ 1,332 คู่เบส) ถึง 0.017 (แตกต่าง 22 ตำแหน่งจากนิวคลีโอไทด์ 1,332 คู่เบส) กับ แบคทีเรีย *P. polymyxa* (รูปที่ 4) สามารถระบุ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 เป็น *P. polymyxa* ไอโซเลต BTK01 จากแผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและค่าดัชนีความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ภายใน *P.*

polymyxa แสดงถึงความหลากหลายที่เกิดขึ้น ภายในสปีชีส์ ส่งผลให้แบคทีเรีย *P. polymyxa* มี แนวโน้มในการจำแนกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ย่อย (subspecies) ในทิศทางเดียวกับแบคทีเรียกลุ่ม *B. subtilis* (Yi *et al.*, 2014) ที่มีความใกล้เคียงทาง พันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA แต่ยังคง มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ภายในสปีชีส์ที่ ทำให้สามารถแยกได้ถึงระดับสปีชีส์ย่อยได้



รูปที่ 4 ค่าดัชนีความแตกต่างของแบคทีเรีย *P. polymyxa* และ *P. pabuli* ที่วิเคราะห์จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA

ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK04 และ BTK05 แยกออกมาจากกลุ่มของ *P. polymyxa* และมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. pabuli* (รูปที่ 3) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ซึ่ง *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK04 และ BTK05 มีค่าใกล้เคียงกับ *P. pabuli* (รูปที่ 4) ทำให้สามารถ

ระบุ *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK04 และ BTK05 เป็น *P. pabuli* ไอโซเลต BTK04 และ BTK05 ตามลำดับ

4. สรุป

แบคทีเรีย *P. polymyxa* จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีจำนวนยีน 16S rRNA ทั้งหมด 11-14 ซ้ำ (copy) และมีขนาดของ

ยีน (length) ประมาณ 1,542-1,565 คู่เบส พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งของเบสที่เรีย *P. polymyxa* โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 29 ตำแหน่ง และตำแหน่งที่ 465-488 สามารถจัดรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ได้ 2 รูปแบบ ซึ่งแสดงแนวโน้มการเกิดสปีชีส์ย่อยในเบสที่เรีย *P. polymyxa* และพบว่ารูปแบบที่ 1 สามารถระบุชนิดของเบสที่เรีย *Paenibacillus* sp. ไอโซเลต BTK01 เป็น *P. polymyxa* ไอโซเลต BTK01 สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยมีค่าดัชนีความแตกต่างตั้งแต่ 0.000-0.017 กับเบสที่เรีย *P. polymyxa*

การศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์สามารถนำมาปรับปรุงฐานข้อมูลยีน *16S rRNA* ด้วยการกำหนดชุดรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มแนวทางในการวิเคราะห์จำแนกและระบุสปีชีส์/สปีชีส์ย่อยของเบสที่เรีย *P. polymyxa* ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมสูง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูบบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ ทบ 06/2560)

6. รายการอ้างอิง

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2557, พันธุวิศวกรรม : เทคโนโลยีของยีน, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., and Noller, H.F., 1981, Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 148: 107-127.

Fernández- No, I.C., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Barros-Velázquez, J. and Calo-Mata, P., 2015, Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *16S rRNA* gene of foodborne *Bacillus* spp., *Food Microbiol.* 46: 239-245.

Hakovirta, J.R., Prezioso, S., Hodge, D., Pillai, S.P. and Weigel, L.M., 2016, Identification and analysis of informative single nucleotide polymorphisms in *16S rRNA* gene sequences of the *Bacillus cereus* group, *J. Clin. Microbiol.* 54: 2749-2756.

Kim, D.Y., Chung, C.W., Cho, H.Y., Rhee, Y.H., Shin, D.H., Son, K.H. and Park, H.Y., 2017, Biocatalytic characterization of an endo-β-1,4-mannanase produced by *Paenibacillus* sp. strain HY-8, *Biotechnol. Lett.* 39: 149-155.

Kozak-Muiznieks, N.A., Morrison, S.S., Mercante, J.W., Ishaq, M.K., Johnson, T., Caravas, J., Lucas, C.E., Brown, E., Raphael, B.H. and Winchell, J.M., 2018, Comparative genome analysis reveals a complex population structure of *Legionella pneumophila* subspecies, *Infect. Genet. Evol.* 59: 172-185.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

Lee, Z.M.P., Bussema, C. and Schmidt, T.M., 2009, rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea, *Nucl. Acids Res.* 37: D489-D493.

- Li, S., Yang, D., Qiu, M., Shao, J., Guo, R., Shen, B., Yin, X., Zhang, R., Zhang, N. and Shen, Q., 2014, Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SQR- 21, a plant growth- promoting rhizobacterium with antifungal activity and rhizosphere colonization ability, Genome Announce. 2(2): e00281-14.
- Ma, M., Wang, C., Ding, Y., Li, L., Shen, D., Jiang, X., Guan, D., Cao, F., Chen, H., Feng, R., Wang, X., Ge, Y., Yao, L., Bing, X., Yang, X., Li, J. and Du, B., 2011, Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth- promoting rhizobacterium with broad- spectrum antimicrobial activity, J. Bacteriol. 193: 311-312.
- Niu, B., Rueckert, C., Blom, J., Wang, Q. and Borriss, R., 2011, The genome of the plant growth- promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 contains nine sites dedicated to nonribosomal synthesis of lipopeptides and polyketides, J. Bacteriol. 193: 5862-5863.
- Petterson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. and Johansson, K.E., 1996, Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons, J. Bacteriol. 178: 4131-4142.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B.J., Ninet, B., Hirschel, B. and Emler, S., 1998, 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene, J. Clin. Microbiol. 36: 1761-1764.
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A. and Shirkot, C.K., 2013, Production of alkalophilic xylanases by *Paenibacillus polymyxa* CKWX1 isolated from decomposing wood, Proc. Nat. Acad. Sci. Ind. B Biol. Sci. 83: 215-223.
- Wang, L., Zhang, L., Liu, Z., Zhao, D., Liu, X. and Zhang, B., 2013, A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli*, PLOS Genet. 9(10): e1003865.
- Yi, H., Chun, J. and Cha, C.J., 2014, Genomic insights into the taxonomic status of the three subspecies of *Bacillus subtilis*, Syst. Appl. Microbiol. 37: 95-99.