การใช้ประโยชน์จากสีของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินรังต่อ-หมาร่าในการย้อมสีเส้นใยไหม

APPLICATION OF THE PIGMENT OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM THE WASPS-NEST SOIL FOR DYEING SILK FIBERS

สิทธิชัย อุดก่ำ และนฤมล เถื่อนกูล*

Sittichai Urtgam and Naruemol Thurnkul*

บทคัดย่อ

สีย้อมแอคติโนแบคทีเรียเป็นทางเลือกใหม่ของสีย้อมจากธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินรังต่อ-หมาร่า ผลิตสีย้อม ย้อมเส้นใยไหม วิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอของเส้นใยไหมย้อมด้วยสีจากแอคติโนแบคทีเรีย และระบุชนิดแอคติโนแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจากดินรังต่อ-หมาร่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Caseinate Agar (SCA) ได้จำนวน 10 ไอโซเลท และพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 สร้างสารสีเหลืองและย้อมติดเส้นใยไหมได้ดีที่สุด จากการทดสอบความคงทนของเส้นใยไหมที่ย้อมด้วยสีจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ต่อการซัก และแสงตามวิธีมาตรฐาน ISO105-C06:2010(E) และ ISO105-B02:2014(E) ตามลำดับ พบว่ามีความคงทนต่อการซักที่ดีมาก โดยมีค่าการทดสอบอยู่ระหว่างระดับ 4-5 ส่วนการทดสอบความคงทนของสีต่อแสงนั้นพบว่า มีความคงทนของสีต่อแสงในระดับปานกลาง โดยมีค่าการทดสอบอยู่ระหว่างระดับ 3-4 จากการระบุชนิดด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rDNA* ในแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ที่แยกได้นี้มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces costaricanus* (99.57%) *S. prasinopilosus (*99.50%) *S. rochei* (99.50%) *S. padanus* (99.50%) และ *S. griseofuscus* (99.50%) ตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่มีรายงานการวิจัยว่า

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000

corresponding author e-mail: naruemol.t@psru.ac.th

Received: 6 May 2021; Revised: 20 July 2021; Accepted: 23 July 2021

เป็นชนิดที่มีการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีความสำคัญทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะพัฒนาสีจากแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ทางด้านสีย้อมสิ่งทอที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

คำสำคัญ: สี แอคติโนแบคทีเรีย การย้อมสีเส้นใยไหม ความคงทนต่อการซัก ความคงทนของสีต่อแสง

Abstract

Actinobacteria-derived pigments are the emerging class of natural dyes, which have attracted significant attention for the development of novel natural pigments for fiber dyeing. This research aims to isolate actinobacteria from wasps-nest soil for dye production, silk fibers dyeing, examine the qualities of fibers dyed by pigments and identify actinobacteria species. The results showed that 10 isolates of actinobacteria could be isolated from wasps-nest soil using Sodium Caseinate Agar (SCA). Moreover, the obtained actinobacteria J10 exhibited the yellow color and show the best dyeing on silk fibers. To investigate the qualities of pigment, the textile characteristics of dyed silk fibers were analyzed with the color fastness to washing and light by following the standard methods namely ISO105-C06:2010(E) and ISO 105-B02:2014(E), respectively. The result showed that the fastness to washing was ranged in the 4 to 5 level, which referred to a very good acceptance level. However, the light fastness was observed in the 3 to 4 level, which referred to an intermediate acceptance. The identification of actinobacteria isolate J10 based on comparative sequence analysis of *16S rDNA* gene revealed the similarity to *Streptomyces costaricanus* (99.57%), *S. prasinopilosus* (99.50%), *S. rochei* (99.50%), *S. padanus* (99.50%), and *S. griseofuscus* (99.50%). These actinobacteria were reported as *Streptomyces* spp. which could produce the secondary metabolites to apply for medical, agricultural and commercial purposes. Hence, the pigment could be potential candidates to further develop for textile dying applications.

Keywords: Pigment, Actinobacteria, Silk fibers dyeing, Wash fastness, Light fastness

บทนำ

สีย้อมธรรมชาติที่ใช้ในการย้อมเส้นใยและสิ่งทอเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นและมรดกทางวัฒนธรรมที่สืบทอดต่อกันมา สีย้อมจากวัสดุธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่น ไม่ว่าจะเป็นสีย้อมที่ได้จากพืช สีย้อมที่ได้จากสัตว์ สีย้อมที่ได้จากแร่ธาตุหรือแม้กระทั่งสีย้อมที่ได้จากจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย สกุลสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces* sp.) (Kramar et al., 2014) ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการย้อมเส้นใยธรรมชาตินั้น ล้วนแล้วแต่มีความปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในแหล่งดินทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ยังคงพบแอคติโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียสได้ และพบว่าค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 9.0 (Goodfellow et al., 2012) แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตสารสี (pigments) แล้วขับออกสู่ภายนอกเซลล์ได้หลายเฉดสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาทิเช่น สีชมพู แดง ส้ม ฟ้า น้ำตาล เทา ม่วง เหลือง และ เขียว เป็นต้น ทำให้แอคติโนแบคทีเรียได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านสีย้อมเส้นใยธรรมชาติมากยิ่งขึ้น ด้วยคุณลักษณะเฉพาะที่โดดเด่นของสีย้อมแอคติโนแบคทีเรียคือ เป็นสีย้อมที่ผลิตจากแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ย้อมติดเส้นใยไหมได้หลายเฉดสีในกลุ่มสีเอิร์ธโทนและสีพาสเทล สามารถผลิตสีได้อย่างรวดเร็ว 7-10 วัน เร็วกว่าสีธรรมชาติจากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ผลิตสีได้บนวัตถุดิบราคาถูกและหาได้ง่ายตลอดปี ผลิตสีได้ไม่ต้องรอฤดูกาล ประหยัดพื้นที่ในการผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับสีย้อมเคมีสังเคราะห์จะพบว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการย้อมสีแอคติโนแบคทีเรียไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมทำให้ลดต้นทุนในกระบวนการย้อมสีเพราะไม่มีขั้นตอนในการบำบัดน้ำเสีย สีไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิต ผู้ย้อมและผู้ใช้ และลดการนำเข้าสีเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศ และเป็นการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งดินของประเทศไทยมาใช้ประโยชน์ในด้านการประยุกต์ใช้เป็นสีย้อมผ้า

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาที่สืบค้นจากวรรณกรรมปริทัศน์ พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินทั่วไปยังมีเฉดสีไม่มากนัก หากมีการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินแหล่งอื่น ๆ (Maiti & Mandal, 2020; Chakraborty et al., 2015; Priyadharsini & Dhanasekaran, 2015; Reddy et al., 2007) จะมีแนวโน้มที่จะได้สีย้อมจากแอคติโนแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ผลิตเฉดสีที่ย้อมสีเส้นใยได้แตกต่างจากเฉดสีเดิมได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินโดยมุ่งเน้นการคัดแยกจากดินรังต่อ-หมาร่า ทำการผลิตสีย้อมและย้อมเส้นใยไหม จากนั้นทำการวิเคราะห์ทดสอบคุณภาพของเส้นใยที่ย้อมแล้วต่อความคงทนต่อการซักและต่อแสง และทำการศึกษาเพื่อระบุชนิดแอคติโนแบคทีเรียที่แสดงผลการให้สี เพื่อนำสีจากแอคติโนแบคทีเรียที่ได้มาใช้ในกระบวนการย้อมสีเส้นใยธรรมชาติ และพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สิ่งทอรูปแบบต่าง ๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินรังต่อ-หมาร่าจากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยจะสุ่มเก็บตัวอย่าง จำนวน 3-5 จุด การเก็บดินรังต่อ-หมาร่าให้ใช้เสียมขนาดเล็กขุดรังแมลงทั้งรัง หากมีตัวอ่อนแมลงให้เขี่ยออกแล้วนำตัวอย่างดินใส่ในถุงพลาสติกรัดปากถุงให้สนิท เมื่อเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนำตัวอย่างมาเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

นำดินที่เก็บมาบดให้ละเอียด ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน และชั่งดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายตั้งต้นลงทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) จนได้ความเข้มข้นที่ระดับ 10^{-4} จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Caseinate Agar (SCA) (skimmed milk 2.0 กรัม, glucose 2.0 กรัม, K_2HPO_4 0.2 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, sodium propionate 1.0 กรัม, agar 15.0 กรัม, distilled water 1.0 ลิตร) เกลี่ยให้กระจายบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เก็บแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกไอโซเลท และนำมา re-streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วเก็บลงในอาหาร SCA slant เพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (stock culture) (Thurnkul & Huanraluek, 2017)

3. การผลิตผงสีย้อมและการสกัดสารสี

ชั่งปลายข้าวปริมาณ 30 กรัม ลงในฟลาสก์ เทน้ำประปาใส่ให้ท่วมปลายข้าวเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทน้ำออกให้หมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำแอคติโนแบคทีเรียทุกไอโซเลท มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.08-0.1 (Kermeoglu et al., 2018) ดูดสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของแอคติโนแบคทีเรีย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในปลายข้าวที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นำปลายข้าวที่หมักด้วยแอคติโนแบคทีเรียไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จะได้ผงสีย้อมที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรีย และเก็บผงสีย้อมในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง การสกัดสีให้ชั่งผงสีย้อมปริมาณ 5 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร จำนวน 30 มิลลิลิตร นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาวางไว้เพื่อให้ปลายข้าวตกตะกอนแล้วจึงเทส่วนที่เป็นสารละลายใสที่มีสีเพื่อใช้ในการย้อมเส้นใยไหมต่อไป (Thurnkul & Huanraluek, 2017)

4. การย้อมเส้นใยไหม

เตรียมเส้นใยไหมปริมาณ 0.22 กรัม แช่ลงในสารสกัดสีย้อมพร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำเส้นใยไหมมาบิด ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำมาย้อมซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำเส้นใยไหมที่ย้อมสีแล้วมาล้างด้วยน้ำประปา ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตการติดสีเส้นใยไหมของแอคติโนแบคทีเรียโดยนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่อง Color Meter ที่แสดงผลในระบบ CIELAB คัดเลือกเส้นใยไหมที่ติดสีได้เข้มที่สุดในแต่ละเฉดสี และนำแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตสีที่คัดเลือกไว้นำมาผลิตสีย้อมในปริมาณมากโดยการชั่งปลายข้าวปริมาณ 100 กรัม ลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 8X12 นิ้ว เทน้ำประปาใส่ให้ท่วมปลายข้าวเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทน้ำออกให้หมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารแขวนลอยสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรีย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในปลายข้าวที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นำปลายข้าวที่หมักด้วยแอคติโนแบคทีเรียไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จะได้ผงสีย้อมปริมาณมากในการย้อมไหมเพื่อวิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอของเส้นใยไหมต่อไป

5. การวิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอของเส้นใยไหม

วิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอของเส้นใยไหม โดยทดสอบความคงทนของสีต่อการซัก และแสงตามมาตรฐาน ISO105-C06:2010(E) และ ISO 105-B02:2014(E) ตามลำดับ

6. การระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรีย

ระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่ย้อมติดเส้นใยไหมที่ติดสีได้เข้มที่สุดในแต่ละเฉดสี โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA และวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rDNA* (Williams, 1989) โดยสกัดดีเอ็นเอจากแอคติโนแบคทีเรียด้วยชุดสกัด BioFact™ Genomic DNA prep Kit (Biofactory, Korea) ตามวิธีมาตรฐานของบริษัท และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *16S rDNA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Mullis et al., 1986) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ universal bacterial primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GTTACCTT GTTACGACTT-3') (Lane, 1991) ด้วยสภาวะที่เหมาะสมร่วมกับเอนไซม์ของ BioFact™ *Taq* DNA Polymerase (Biofactory, Korea) นำผลผลิตที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย BioFact™ Gel & PCR Purification System (Biofactory, Korea) ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rDNA* ด้วยวิธี standard sequencing โดยบริษัท Bionics (Korea) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbor-joining method ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MegaX (Kumar et al., 2018)

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

คัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินรังต่อ-หมาร่า จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 10 ไอโซเลท

2. การผลิตสีย้อม การย้อมเส้นใยไหม และการวิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอของเส้นใยไหม

นำแอคติโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงลงบนปลายข้าว แอคติโนแบคทีเรียสร้างสีบนปลายข้าวได้ นำปลายข้าวที่มีสีมาอบแห้งด้วยความร้อน และบดให้ละเอียด เมื่อนำผงสีมาสกัดสีด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J1-J9 สร้างสีโทนสีขาว น้ำตาลม่วง และเหลืองบนปลายข้าว แต่แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 มีลักษณะเด่นคือ มีการสร้างสารสีเหลืองซึมสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนบนปลายข้าวมีการสร้างสีเหลืองซึมสู่ปลายข้าวอย่างทั่วถึง และสามารถผลิตผงสีเหลืองดังภาพที่ 1A (Figure 1A) และย้อมติดเส้นใยไหมได้เข้มที่สุดในโทนสีเหลือง ดังแสดงผลในตารางที่ 1 (Table 1) จึงนำเส้นใยไหมที่ย้อมแล้วดังภาพที่ 1B (Figure 1B) มาทำการวิเคราะห์ทดสอบคุณภาพสิ่งทอจากเส้นใยไหม โดยทดสอบความคงทนของการย้อมสีจากแอคติโนแบคทีเรียต่อการซักและความทนทานต่อแสง ตามมาตรฐาน ISO105-C06:2010(E) และ ISO 105-B02:2014(E) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอแสดงความคงทนต่อการซักอย่างดีเยี่ยม โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของสีไปจากเดิมนั้น จัดอยู่ในระดับสีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนถึงระดับสีเปลี่ยนแปลงพอสังเกตได้ (อยู่ระหว่างระดับ 3-4) ความคงทนต่อการซักโดยสีตกติดผ้าขาว พบว่าอยู่ในระดับสีตกติดเล็กน้อยถึงไม่มีการตกติดของสี (อยู่ระหว่างระดับ 4-5) และมีความคงทนของสีต่อแสงในระดับปานกลาง มีค่าการทดสอบอยู่ระหว่างระดับ 3-4 ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Figure 1 Actinobacteria isolate J10's dye and dyed silk
A) Actinobacteria isolate J10's dye
B) Un-dyed silk and dyed silk

Table 1 Character of actinobacteria isolate J10's dye.

Dye color	Color dying on silk's fiber	CIELAB value of color				
		L	a*	b*	C	h
Yellow	Yellow	76.06	-	+30.86	29.76	81.03

Remark L determine the lightness between 0 – 100: 0 interpreted as dark/black, 100 interpreted as light/white.
a* determine the red/green color: + interpreted as red, – interpreted as green.
b* determine the yellow/blue color: + interpreted as yellow, – interpreted as blue.
C Chroma determine the color intensity between 0 – 100
H Hue angle determine the true appearance of color between 0-360 degree: 0-45 degree present as violet-red to orange-red, 45-90 degree present as orange-red to yellow.

Table 2 Textile characteristics analysis of the fastness to washing and to lighting of actinobacteria isolate J10's dye.

Textile characteristics analysis	Standard method	Color fastness	Level of color fastness
Fastness to washing	ISO105-C06:2010(E)	Color changed	3-4
		Washed-out on	
		- cotton	4-5
		- silk	4-5
Fastness to lighting	ISO 105-B02:2014(E)	Color changed	3-4

Remark Fastness to washing: Color changed and Washed-out was determined as high to low between levels 1-5
Fastness to lighting was determined as low to high between levels 1-8

3. การระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรีย

นำแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าย้อมติดสีแกรมบวก สร้างมัยซีเลียม 2 ชนิด คือ มัยซีเลียมที่ยึดเกาะกับซับสเตรต (substrate mycelium) และมัยซีเลียมชนิดที่ยื่นไปในอากาศ (aerial mycelium) (Goodfellow et al., 2012) ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA พบว่าโคโลนีมีลักษณะแบน ขอบเรียบ มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน สีของโคโลนีทั้งผิวหน้าและที่ยึดเกาะกับอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาวขอบเทาและมีการสร้างสารสีเหลืองซึมสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 2 (Figure 2) เมื่อทำการแยกดีเอนเอของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 พร้อมทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณปลาย 5' ของยีน *16S rDNA* เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าว และนำมาวิเคราะห์ผลเพื่อจำแนกชนิดของตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลด้วย Blast analysis พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* sp. ตามสายวิวัฒนาการ

(Saitou & Nei, 1987; Felsenstein, 1985; Tajima & Nei, 1984; Kumar et al., 2018) ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 มีความใกล้เคียงกันกับ *Streptomyces costaricanus* (99.57%), *S. prasinopilosus* (99.50%), *S. rochei* (99.50%), *S. padanus* (99.50%) และ *S. griseofuscus* (99.50%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 (Figure 3)

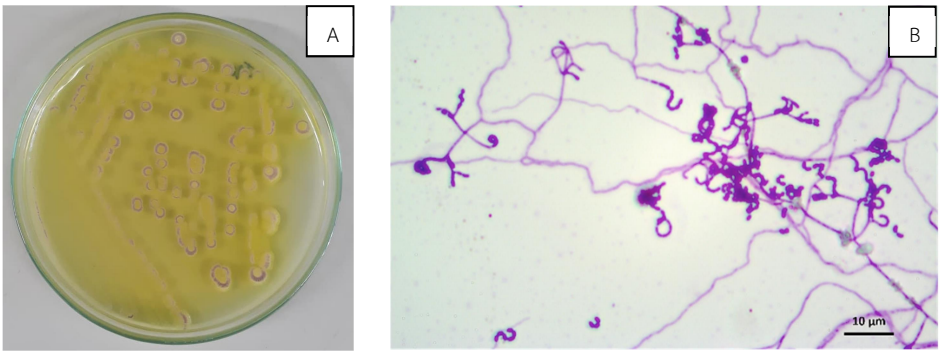

Figure 2 Characters of colony and conidia of actinobacteria isolate J10
A) Characters of colony on SCA agar
B) Characters of conidia under light microscope (1000X)

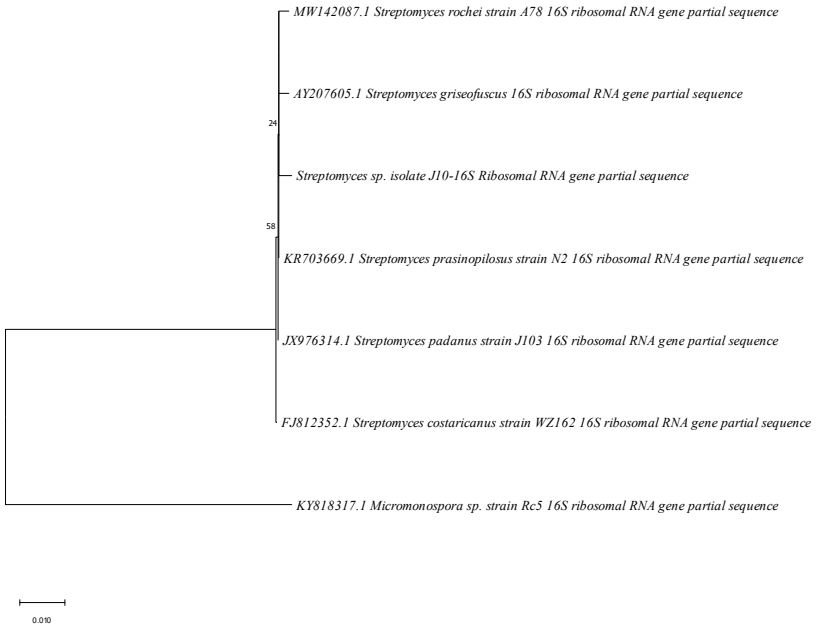

Figure 3 Phylogenetic tree of actinobacteria isolate J10 compared with *Streptomyces* spp. based on partial sequence of *16S rDNA* gene.

อภิปรายผล

คัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินรังต่อ-หมาร่า ได้จำนวน 10 ไอโซเลท แอคติโนแบคทีเรียสร้างสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA และสามารถผลิตสีบนปลายข้าวได้ดี และพบว่ามีสีจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ผลิตผงสีย้อมได้สีเหลือง ย้อมติดเส้นใยไหมได้เข้มที่สุดในเฉดสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Kulkarni et al. (2014) ที่พบว่าสารสกัดหยาบสีของแอคติโนแบคทีเรีย (*Kocuria flava* HO-9041) สามารถย้อมเส้นใยไหมและเส้นใยขนสัตว์ติดสีเหลือง เมื่อนำเส้นใยไหมที่ย้อมด้วยสีจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 มาทดสอบความคงทนต่อการซักและความคงทนของสีต่อแสงพบว่าเส้นใยไหมมีความคงทนต่อการซักดี มีค่าการทดสอบอยู่ระหว่างระดับ 4-5 และมีความคงทนของสีต่อแสงในระดับปานกลาง มีค่าการทดสอบอยู่ระหว่างระดับ 3-4 จากคุณสมบัติการย้อมติดสีเส้นใยไหมและผลทดสอบความคงทน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสีที่ควรนำมาพัฒนาและนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการย้อมสีเส้นใยธรรมชาติได้อย่างดี เช่นเดียวกันกับการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ประโยชน์ทางด้านการย้อมเส้นใย ดังตัวอย่างในวรรณกรรมปริทัศน์ เช่น *Janthinobacterium lividum* ใช้ในกระบวนการย้อมสีย้อมเส้นใยจากธรรมชาติได้หลายชนิด เช่น ไหม ฝ้าย ขนสัตว์ (Shirata et al., 2000) *Serratia sakuensis* subsp. *nov strain* KRED ผลิตสารสีแดง (novel red biochrome) ใช้ในการย้อมสีผ้าไหม ผ้าขนสัตว์และผ้าฝ้าย (Vaidyanathan et al., 2011) *Monascus purpureus, Isaria farinosa, Emericella nidulans, Fusarium verticillioides* และ *Penicillium purpurogenum* ผลิตสารสีที่ละลายน้ำเพื่อใช้ในการย้อมเส้นใยฝ้าย (Velmurugan et al., 2010) การใช้สีจากไลเคน (stictacoronata lichen) ย้อมผ้าไหมติดสีม่วง (brilliant lilac color) (Mansour & Heffernan, 2010) *Cortinarius phoeniceus* var. *occidentalis* ย้อมเส้นใยขนสัตว์ติดสีชมพู (Sundström, 2004) การนำเห็ดหลายสายพันธุ์มาใช้เป็นสีย้อมเส้นใยขนสัตว์ เช่น *Pisolithus arhizus* ให้สีน้ำตาลและสีทอง *Boletopsis grisea* ให้สีเขียว *Cortinarius semisanguineus* ให้สีแดง-ส้ม *Hapalopilus rutilans* ให้สีม่วง *Phaeolus schweinitzii* ให้สีเหลืองทอง (Suomi, 2001) และ *Streptomyces* strain NP2, NP4 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศเซอร์เบีย สามารถผลิตสารสีน้ำเงินเข้มและแดงเข้ม ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ casein starch agar เมื่อนำมาสกัดสีโดยใช้เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) แล้วนำมาย้อมเส้นใยสังเคราะห์ พบว่าย้อมติดสีเส้นใยสังเคราะห์ในเฉดสีน้ำเงินและแดงเข้ม (Kramar et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดสีชมพูจาก *Streptomyces fradiae* VITIPMSB ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนจากประเทศอินเดียสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของสีในเครื่องสำอางคและเป็นสีย้อมเส้นใยฝ้ายและขนสัตว์ (Chakraborty et al., 2015)

ระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA และวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rDNA* พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ที่แยกได้นั้น มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces costaricanus* (99.57%), *S. prasinopilosus*

*(*99.50%), *S. rochei* (99.50%), *S. padanus* (99.50%) และ *S. griseofuscus* (99.50%) ตามลำดับ ซึ่ง *Streptomyces* spp. ที่มีความใกล้เคียงทั้ง 5 ชนิด เป็นชนิดที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เอนไซม์ สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) และเป็นชนิดที่ไม่มีรายงานการก่อโรคในสิ่งมีชีวิต แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยในระดับที่ยอมรับได้หากนำสีจาก *Streptomyces* spp. กลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ด้านสิ่งทอ โดยมีรายงานว่า *Streptomyces costaricanus* สร้างสารแอคติโนมัยซินชนิดดี (actinomycin- D) ซึ่งเป็นสารที่ใช้รักษาโรคเนื้องอกและมะเร็ง (Wilm's tumor of the kidney, trophoblastic tumors and rhabdomyosarcoma) สารต้านเชื้อรา (antifungal) และสร้างเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) ได้ (Liu et al., 2019; Kim & Song, 2016; Sipriyadi et al., 2020) และยังมีรายงานวิจัยของ Li et al. (2020) และ Lim et al. (2006) ที่พบว่า *S. griseofuscus* สร้างสารแอสตาแซนธิน (astaxanthin) ที่มีสีเหลืองซึ่งเป็นสารอาหารที่อยู่ในกลุ่มแคโรทินอยด์ (carotenoid) มีคุณสมบัติในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ปกป้องสารพันธุกรรมในเซลล์ (DNA) จากการถูกทำลาย ซึ่งป้องกันการกลายพันธุ์ของเซลล์ ช่วยป้องกันสาเหตุของการก่อมะเร็งได้ ป้องกันเซลล์ผิวจากการถูกทำลายโดยแสงแดด และสร้างสารต้านเชื้อรา แต่ยังไม่มีรายงานว่ามีการใช้สีจาก *Streptomyces* spp. ที่มีความใกล้เคียงทั้ง 5 ชนิด ดังกล่าวมาใช้ในการย้อมสีเส้นใยไหม จากผลการวิจัยที่พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ย้อมติดเส้นใยไหมเฉดสีเหลือง หากนำมาประยุกต์ใช้กับการย้อมสีเส้นใยธรรมชาติอื่น ๆ เช่น ฝ้าย หรือขนสัตว์ ดังรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Chakraborty et al., 2015; Kramar et al., 2014; Kulkarni et al., 2014) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการพัฒนาสีจากแอคติโนแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ทางด้านสีย้อมสิ่งทอต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินรังต่อ-หมาร่าได้จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 ย้อมติดเส้นใยไหมสีเหลือง ทดสอบความคงทนของเส้นใยไหมพบว่ามีความคงทนต่อการซักได้ดี ส่วนความคงทนของสีต่อแสงปานกลาง ระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA และวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rDNA* พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท J10 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces costaricanus* (99.57%) *S. prasinopilosus (*99.50%) *S. rochei* (99.50%) *S. padanus* (99.50%) และ *S. griseofuscus* (99.50%) ตามลำดับ จากคุณสมบัติการเป็นสีย้อมและชนิดของแอคติโนแบคทีเรียแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสีย้อมที่ควรนำไปพัฒนาเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2563 และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยาและจุลชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chakraborty I, Redkar P, Munjal, M. et al. Isolation and characterization of pigment producing marine actinobacteria from mangrove soil and applications of bio-pigments. Der Pharmacia Lettre 2015;7,93-100.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 1985;39: 783-791.

Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ. et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd edition. volume five. The Actinobacteria, Part A and B. New York: Springer-Verlag; 2012.

Kermeoglu F, Aksoy U, Kalender A. et al. Determination of the minimum inhibitory concentrations of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An *In Vitro* study. The Cureus Journal of Medical Science 2018;10(2):1-8.

Kim HR, & Song HG. Antifungal activity of *Streptomyces costaricanus* HR391 against some plant-pathogenic fungi. Korean Journal of Microbiology 2016;52(4):437-443.

Kramar A, Ilic-Tomic T, Petkovic M. et al. Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing. World Journal Microbiology Biotechnology 2014;30: 2231-2240.

Kulkarni VM, Gangawane PD, Patwardhan AV, Adivarekar RV. Dyeing of silk/wool using crude pigment extract from an isolate *Kocuria flava* sp. HO-9041. Octa Journal of Environmental Research 2014;2(4).

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 2018;35:1547-1549.

Li S, Ji J, Hu S. et al. Enhancement of **ε**-poly-L-lysine production in *Streptomyces griseofuscus* by addition of exogenous astaxanthin. Bioprocess and Biosystems Engineering 2020;43:1813-1821.

Lim TH, Kwon SY, Kim JH. Effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 on growth of pepper plants and phytophthora blight by *phytophthora capsici*. Research in Plant Disease 2006;12(1):46-50.

Liu M, Jia Y, Xie Y. et al. Identification of the actinomycin D biosynthetic pathway from marine-derived *Streptomyces costaricanus* SCSIO S0073. Marine drugs 2019;17(4):240.

Maiti PK, Mandal S. Lentzea indica sp. nov., a novel actinobacteria isolated from Indian Himalayan-soil. Antonie van Leeuwenhoek 2020;113(10):1411-1423.

Mansour HF, Heffernan S. Environmental aspects on dyeing silk fabric with stictacoronata lichen using ultrasonic energy and mild mordants. Clean Technologies and Environmental Policy 2010; 13:207-213.

Mullis K, Faloona F, Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986;51(1):263-73.

Priyadharsini P, Dhanasekaran D. Diversity of soil allelopathic actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 2015;14(1),54-60.

Reddy GS, Potrafka RM, Garcia-Pichel F. Modestobacter versicolor sp. nov., an actinobacterium from biological soil crusts that produces melanins under oligotrophy, with emended descriptions of the genus Modestobacter and Modestobacter multiseptatus Mevs et al. 2000. International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology 2007;57(9),2014-2020.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 1987;4:406-425.

Shirata A, Takanori T, Hiroe Y. et Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. Japan Agricultural Research Quarterly. 2000;34:131-140.

Sipriyadi S, Wahyudi AT, Suhartono MT. et al. Optimization of xylanase production by *Streptomyces costaricanus* 45I-3 Using Various Substrates through Submerged Fermentation. Microbiology Indonesia 2020;14(1):5-5.

Sundström E. What is a "Mordant" and why use them? international mushroom dye institute. 2004. Available at: http://sonic.net/dbeebee/IMDI_new/mordants.html#Contact%20us. Accessed March 27, 2021.

Suomi P. All Fiber Arts. Fungi dye recipe. *Pisolithusarhizus* - Herne Kuukunen (FI). 2001. Available at: https://www.allfiberarts.com/2017/fungi-dye-pisolithus-arhizus.htm. Accessed March 20, 2021.

Tajima F and Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution 1984;1:269-285.

Thurnkul N, Huanraluek N. Isolation of actinomycetes from termite mound in Srisatchanalai district Sukhothai province for silk fiber dyeing. PSRU Journal of Science and Technology 2017;2(3):1-8.

Vaidyanathan J, Bhathena-Langdana Z, Adivarekar RV. Production, partial characterization, and use of a red biochrome produced by *serratia sakuensis* subsp. nov strain KRED for dyeing natural fibers. Biotechnology and Applied Biochemistry 2012;166(2):321-335.

Velmurugan P, Kim MJ, Park JS. et al. Dyeing of cotton yarn with five water soluble fungal pigments obtained from five fungi. Fibers and Polymers 2010;11(4):598-605.