

การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำย้อมครามในหม้อย้อมและดินบริเวณย้อมครามเพื่อประยุกต์ใช้ในการย้อมและบำบัดน้ำเสีย

Isolation of Bacteria from the Indigo Dyeing Water in the Dyed Pot and Indigo Dyeing Area Soil for the Application of Dyeing Process and Wastewater Treatment

กนกนิต สุขชะ, เฉลิมวรุฒ สมปาก,

ธีระชัย ธานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นิชาดา เจียรนัยกุล

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

Kankanit Sukka, Chalermwoot Sompark,

Theerachai Thanananta and Niramol Sakayawong*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Nichada Jearanaikoon

Synchrotron Light Research Institute,

Mahawittayalai Road, Suranaree, Muang, Nakhon Ratchasima, 30000

Received: May 22, 2019; Accepted: June 13, 2019

บทคัดย่อ

การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียจากน้ำย้อมครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินบริเวณย้อม เพื่อนำแบคทีเรียที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการย้อมและลดสีในน้ำเสีย สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 23 ไอโซเลท เมื่อระบุชนิดแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะสัณฐานและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จัดอยู่ใน 5 สกุล ได้แก่ *Bacillus* 15 ไอโซเลท *Pseudomonas* 4 ไอโซเลท *Acinetobacter* 2 ไอโซเลท *Lysinibacillus* 1 ไอโซเลท และ *Aerococcus* 1 ไอโซเลท จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำย้อมสามารถเปลี่ยนรูปอินดิแคนเป็นอินดอกซิลและกลูโคส โดยแบคทีเรีย *Bacillus kochii* SKTU 5 สามารถให้ปริมาณกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 63.67 ± 6.59 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม สำหรับ *Acinetobacter baumannii* SKBT 2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่บริเวณย้อมครามลดสีครามได้ 79.13 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสี indigo ที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะหนึ่ง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับกระบวนการย้อมและลดสีในน้ำเสียจากการย้อมครามต่อไป

คำสำคัญ : กระบวนการย้อมผ้าครามจากสีธรรมชาติ; การย้อมสีคราม, การลดสี; สีคราม; ยีน *16S rRNA*

Abstract

Bacterial strains from natural indigo dyeing process at indigo-dyed pots and dyeing-soil were isolated and identified, for application of the dyeing process and decolorizing in wastewater treatment. By analyzing morphological and molecular characteristics with *16S rRNA* genes sequence, the 23 isolated bacteria were classified into 5 genera, i.e. *Bacillus* (15 isolates), *Pseudomonas* (4 isolates), *Acinetobacter* (2 isolates), *Lysinibacillus* (1 isolate), and *Aerococcus* (1 isolate). A preliminary study demonstrated that bacteria in the indigo-dyed pot could change indican to indoxyl and glucose. The results showed that *Bacillus kochii* SKTU5 was able to produce 63.67 ± 6.59 mM glucose at 30 °C for 96 hours. However, *Acinetobacter baumannii* SKBT2, the isolated soil bacteria from the dyeing area, could decolorize the indigo dye as 79.13 ± 0.43 % at the original concentration of 25 mg/L, under the static condition at 37 °C for 48 hours. These results can be further applied to create the starter seeds for indigo dyeing process and decolorizing indigo dye in wastewater treatment.

Keywords: natural indigo dyeing process; decolorization; indigo dye; *16S rRNA* gene

1. คำนำ

สีครามมีชื่อสามัญว่าอินดิโก (indigo) หรืออินดิโกติน (indigotin) มีสีน้ำเงินเข้มโทนฟ้าสามารถสกัดจากพืชธรรมชาติหลายชนิด ได้แก่ พืชวงศ์กะหล่ำ (Cruciferous) ในยุโรป พืชวงศ์ถั่ว (Leguminosae) ในอินเดีย พืชวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) ในประเทศญี่ปุ่น (Clark *et al.*, 1993; Schmidt, 1997) เป็นต้น สำหรับพืชสกุล *Indigofera* (วงศ์ Leguminosae) มีการกระจายพันธุ์ในแถบแอฟริกา อเมริกาฝั่งตะวันตก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบคราม (*Indigofera tinctoria* Linn.) (Chavan, 2015) เป็นพืชหลักในการให้สีคราม ส่วนห้อม [*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze] และครามเถา (*Marsdenia*

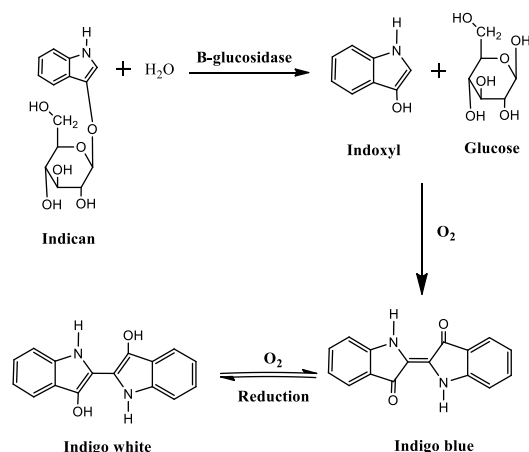
tinctoria R.Br.) เป็นพืชเสริม เนื่องจากเป็นพืชที่ชอบอากาศชื้นและแดดรำไร จึงให้ผลผลิตไม่ค่อยเพียงพอ มีไว้เพื่อเสริมในฤดูแล้งที่ขาดแคลนเท่านั้น (อนุรัตน์, 2555)

การย้อมผ้าด้วยสีครามจากพืช ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ (1) การสกัดครามจากพืช โดยนำใบพืชแช่น้ำและเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ที่อยู่ในคอลโรพลาสต์ของเซลล์มีโซฟิลล์ในใบพืช และจุลินทรีย์จะย่อยอินดิแคน (indican) ที่อยู่ในใบพืช ซึ่งเป็นสารไม่มีสีและไม่ละลายน้ำ (Minami *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2010) เปลี่ยนเป็นอินดอกซิล (indoxyl) และกลูโคส (glucose) ซึ่งไม่มีสี แต่ละลายน้ำได้ อินดอกซิลมักออกซิไดซ์ได้ง่ายด้วยออกซิเจนในอากาศ เปลี่ยน

เป็นคราม (indigo blue) ที่มีความเสถียร มีสีน้ำเงิน และมีขนาดเล็กมาก จากนั้นทำให้อนุภาคคราม ตกตะกอนด้วยการเติมปูนแดง (CaO) และกวนให้ สัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ซึ่งจะได้ละอองสีน้ำ เงินจับกับปูนและจมตัวลง แล้วพักไว้ 1 คืน จากนั้น เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนครามไว้เตรียม น้ำย้อมต่อไป (2) การเตรียมน้ำสีย้อมด้วยกระบวนการหมัก นำตะกอนครามหมักร่วมกับน้ำขี้เถ้า โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม *Alkalibacterium* จากธรรมชาติเป็นตัวช่วยรีดิวซ์ให้ indigo blue เป็น indigo white โดย น้ำย้อมจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองเข้ม ใช้ ระยะเวลาประมาณ 15 วัน และ (3) การย้อมผ้า โดย จุ่มผ้าลงในน้ำสีย้อมที่อยู่ในรูปที่พร้อมย้อม (indigo white) แล้วนำมาบิดให้หมาดและให้สัมผัสอากาศ สาร indigo white ที่เคยละลายอยู่ในน้ำสีย้อมและ เกาะติดเนื้อผ้าขึ้นมาจะเกิดการออกซิเดชันและ เปลี่ยนกลับเป็น indigo blue แทรกเข้าไปในเส้นใย ผ้า ทำให้ได้ผ้าย้อมสีครามจากธรรมชาติ โดย ปฏิกริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 1 (อนรัตน์, 2555) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aino และคณะ (2010) ซึ่งแยกและศึกษาความสามารถของ จุลินทรีย์ที่สามารถรีดิวซ์สีครามจากหมอย้อมคราม ในประเทศญี่ปุ่น เช่นเดียวกับการศึกษาของ สมพงษ์ และเบญจวรรณ (2556) ซึ่งแยกจุลินทรีย์ จากหมอย้อมครามที่ได้จากพืช *Indigofera indica* โดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electro- phoresis (DGGE) พบจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Atopostipes* sp., *Clostridiales bacterium*, *Sporomusa acidovorans*, *Amphi- bacillus* sp., *Alkalibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Actinomycetales* sp. อย่างไรก็ตาม แม้ว่า กระบวนการย้อมผ้าครามจากสีธรรมชาติมีองค์ ประกอบที่มาจากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อ ปล่อน้ำทิ้งสีลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอาจก่อให้เกิด มลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน

Campos และคณะ (2001) ศึกษาการย่อย สลายสีย้อมผ้าอินดิโกโดยใช้เอนไซม์ laccase ที่ทำ ให้บริสุทธิ์ ซึ่งสกัดจากรา *Trametes hirsuta* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่าสามารถออกซิไดซ์อินดิโก ให้เป็น isatin (indole-2,3-dione) แล้วเปลี่ยนเป็น anthranilic acid (2-aminobenzoic acid)

Nicholson และ John (2005) ศึกษาการ ลดสีครามโดยใช้แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) ได้แก่ *Clostridium isatidis*, *C. auran- tibutyricum*, *C. celatum* และ *C. papyrosolvans* เมื่อนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium isatidis* ไปทดสอบความสามารถการลดสี พบว่าให้ ประสิทธิภาพการลดสีที่ดี นอกจากนี้ยังรายงานว่า การเติม madder powder, anthraquinone-2, 6- disulfonic acid และ humic acid ช่วยกระตุ้นการลด สีครามได้



รูปที่ 1 ปฏิกริยาการสกัด เตรียมน้ำย้อม และย้อมสี คราม (อนรัตน์, 2555)

Ramya และคณะ (2008) ศึกษาการลดสี indigo carmine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอินดิโกโดยใช้ แบคทีเรีย *Paenibacillus larvae* ซึ่งแยกได้จากกาก ตะกอนในบ่อน้ำทิ้งโรงงานย้อมผ้า พบว่าการลดสี indigo carmine เกิดได้สูงสุดเมื่อเติมเพปโตเนและ

ยีสต์สกัดความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการได้ isatin sulfonic acid และ anthranilic acid เป็นสารผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังพบว่าการลดสีจะถูกยับยั้งเมื่อไม่มีการเขย่าหรือให้แสงในโตรเจนอนินทรีย์เป็น sodium nitrite และ ammonium chloride

Li และคณะ (2015) ศึกษาการลดสี indigo carmine ด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MZS10 โดยใช้ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราความผสม 200 รอบต่อนาที เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการลดสีด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) พบว่ามี การย่อยสลายหมู่ฟังก์ชัน C=C และ C=O ของ indigo carmine และเกิดพันธะใหม่ของ -CH ในสารเมแทบอลิต์ ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าน่าจะเป็นสาร indoline sulfonic acid ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียจากน้ำสีครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินบริเวณย้อม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับการย้อมและสามารถนำจุลินทรีย์ที่ได้ไปใช้ในการลดสีในน้ำเสียจากการย้อมครามต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การคัดกรองแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างน้ำสีครามครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินบริเวณย้อม ร้านครามสกล อำเภอมือง จังหวัดสกลนคร (รูปที่ 2) ซึ่งน้ำสีครามที่ใช่จะเป็นน้ำที่ได้ในการเตรียมน้ำสีครามด้วยกระบวนการหมัก เป็นการหมักตะกอนครามร่วมกับน้ำซี้ได้ โดยการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม *Alkalibacterium* เป็นตัวช่วยรีดิวซ์ให้ indigo

blue เป็น indigo white โดยน้ำย้อมจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองเข้ม เมื่อนำผ้าจุ่มลงในน้ำสีย้อม (indigo white) แล้วนำมาบิดสัมผัสอากาศ สาร indigo white ที่เคยละลายอยู่ในน้ำสีย้อมและเกาะติดเนื้อผ้าขึ้นมาจะเกิดการออกซิเดชันและเปลี่ยนกลับเป็น indigo blue แทรกเข้าไปในเส้นใยผ้า ทำให้ได้ผ้าย้อมสีคราม เมื่อเก็บตัวอย่างดังกล่าวได้แล้วนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 100 เท่า และดูตัวอย่างที่เจือจางแล้วกระจาย (spread) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง nutrient agar (NA: peptone 5 g, NaCl 5 g, beef extract 5 g, yeast extract 1.5 g, agar 15 g, distilled water 1 L, pH 7.0) (Aino *et al.*, 2010) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บแบคทีเรียที่มีลักษณะสีฐานของโคโลนีแตกต่างกันไว้ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในการระบุชนิด และศึกษาประสิทธิภาพในการลดสีครามต่อไป



รูปที่ 2 แหล่งเก็บตัวอย่างน้ำสีครามครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินบริเวณย้อม ร้านครามสกล จังหวัดสกลนคร

2.2 การระบุชนิดของแบคทีเรีย

2.2.1 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะพื้นฐาน

กระตุ้นแบคทีเรียที่ได้จากการคัดกรองด้วยวิธีขีดเชื้อ (streak) บนอาหารแข็ง NA บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อพบโคโลนีเดี่ยว (single colony) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน คือ สีและรูปร่างลักษณะของโคโลนี และการติดสีแกรม ตามวิธีมาตรฐานใน *Bergey's Manual* (Breed *et al.*, 1957)

2.2.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

(1) การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากแบคทีเรีย โดยวิธีดัดแปลงจาก นฤมล และคณะ (2559) ดังนี้ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย peptone water (1 % peptone, 0.5 % NaCl, pH 7.2) 2 ครั้ง และกระจายตะกอนเซลล์ใน TE buffer ปริมาตร 567 ไมโครลิตร แล้วเติม 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม 5 M sodium chloride ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นกำจัดโปรตีนโดยเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (24:24:1) 1 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่ กำจัดโปรตีนที่เหลือและฟีนอลด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบา ๆ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายใส

ส่วนบนทิ้ง และล้างเกล็ดที่ติดมากับตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส โดยใช้เทคนิคดัดแปลงจาก ปิยะวรรณ และคณะ (2557) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแลงก์โซพอลิเมอเรสและการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ใช้วิธีดัดแปลงจาก นฤมล และธีระชัย (2554) โดยเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์สากล [F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')] (Heuer *et al.*, 1997) โดยเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาแลงก์โซพอลิเมอเรส (1x buffer, 200 μ M dNTP, 250 nM primer, 0.5 U Taq DNA polymerase) แล้วทำปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วส่งไปตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาแลงก์โซพอลิเมอเรส ณ บริษัท

SolGent Co., Ltd. (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA* นำมาระบุชนิดของแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นวิเคราะห์การจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining (นฤมล และคณะ, 2559)

2.3 ประสิทธิภาพการผลิตกลูโคสจากสารตั้งต้นอินดิแคน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำสีย้อมครามในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ เจือจางด้วยอาหารเหลว NB ให้ได้ค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับค่าความขุ่นของ McFarlane standard No.3 ($OD_{600} \approx 0.582$) นำสารละลายแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้หมუნเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องหมუნเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) จำนวน 3 ครั้ง ทดสอบประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปอินดิแคนให้อยู่ในรูปของอินดิโกโดยบ่มตะกอนเซลล์กับสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (พิชญพร และคณะ, 2561) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.4 ประสิทธิภาพการลดสีครามของแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำย้อมครามในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ แล้วเจือจางด้วยอาหารเหลว NB ให้ได้ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับค่าความขุ่นของ McFarlane standard No.3 ($OD_{600} \approx 0.582$) และถ่ายกล้าเชื้อที่เจือจาง 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว NB (pH 7) ที่มีสีครามความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์หลังการลดสีทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำผลิตภัณฑ์แต่ละตัวอย่างไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) นำไปคำนวณค่าการลดสีตามสมการที่ 1 ต่อไป

2.5 การวิเคราะห์

2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้ reagent kit จากบริษัท ERBA Mannheim ประเทศเยอรมนี โดยเปิดตำราละลายพร้อมใช้งาน ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer 250 mmol/L, glucose oxidase > 25 U/mL, peroxidase > 2 U/mL phenol 5 mmol/L และ 4-aminoantipyrine 0.5 mmol/L ลงในตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 0-20 มิลลิโมลาร์ และใช้น้ำกลั่นเป็น blank วัดค่าซ้ำ 3 ซ้ำ

2.5.2 การวิเคราะห์การลดสี

วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการลดสีครามของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่นแสง 602 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นแสงที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสีครามสูงสุด (Hart *et al.*, 1992) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสีครามมาตรฐานความเข้มข้น 0-25 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้อาหารเหลว NB ที่ไม่มีการเติมสีเป็น blank โดยวัด 3 ซ้ำ แล้วคำนวณการลดสีครามจากสมการที่ 1 คือ การลดสี (เปอร์เซ็นต์) = [(ความเข้มข้นสีครามเริ่มต้น - ความเข้มข้นสีครามสุดท้าย) ÷ ความเข้มข้นสีครามเริ่มต้น] x 100

2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้

โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดแยกแบคทีเรีย

เมื่อคัดกรองแบคทีเรียจากน้ำสีย้อมครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินบริเวณย้อม ร้านครามสกล อำเภอมือง จังหวัดสกลนคร พบว่าคัดแยกได้แบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง NA จำนวน 23 ไอโซเลท โดยแยกได้จากน้ำสีย้อมคราม 19 ไอโซเลท และดินที่บริเวณย้อม 4 ไอโซเลท

3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรีย

การตรวจชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะพื้นฐานโดยอ้างอิงจากตารางมาตรฐานใน Bergey's manual แสดงถึงแบคทีเรียที่คัดกรองได้แต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA* ได้ผลดังตารางที่ 1 โดยพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสีย้อม 19 ไอโซเลท (SKTU1-20)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างลักษณะพื้นฐานของโคลนีแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากน้ำสีย้อมและดินที่ปนเปื้อนน้ำสีย้อม

ลักษณะ	ไอโซเลท SKBT 1	ไอโซเลท SKBT 2	ไอโซเลท SKBT 3	ไอโซเลท SKBT 4
การติดสีแกรม	บวก	ลบ	ลบ	บวก
รูปร่างเซลล์	แท่ง	กลม	กลม	แท่ง
รูปร่างโคโลนี	กลม	กลม	กลม	กลม
ขอบโคโลนี	หยัก	เรียบ	เรียบ	หยัก
สีโคโลนี	ขาว	ครีม	เหลือง	ขาว
รูปถ่ายจานเพาะเลี้ยง				

ตารางที่ 2 สกูลและชนิดของแบคทีเรียเมื่อระบุด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลท	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)	Accession number ใน GenBank	สกูลและชนิดของแบคทีเรีย
น้ำสีย้อมครามในหม้อย้อม	SKTU1	100.00	MH031763	<i>Bacillus circulans</i>
	SKTU2	95.18	MH031764	<i>Bacillus eiseniae</i>
	SKTU3	100.00	MH031765	<i>Bacillus kochii</i>
	SKTU4	100.00	MH031766	<i>Bacillus kochii</i>
	SKTU5	95.89	MH031767	<i>Bacillus kochii</i>
	SKTU6	98.89	MH031768	<i>Bacillus kochii</i>
	SKTU7	100.00	MK629724	<i>Bacillus cereus</i>
	SKTU8	95.25	MK652860	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
	SKTU9	100.00	MK652862	<i>Bacillus safensis</i>
	SKTU10	95.90	MK652872	<i>Bacillus cereus</i>
	SKTU11	97.47	MK652874	<i>Pseudomonas gessardii</i>
	SKTU12	98.69	MK656098	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
	SKTU13	97.94	MK656089	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	SKTU14	98.23	MK658867	<i>Bacillus kochii</i>
	SKTU16	99.02	MK658868	<i>Bacillus horneckiae</i>
	SKTU17	97.18	MK659948	<i>Aerococcus urinaeequi</i>
	SKTU18	98.74	MK659952	<i>Bacillus arbutinivorans</i>
	SKTU19	97.00	MK659954	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	SKTU20	99.27	MK659957	<i>Bacillus horneckiae</i>
ดินบริเวณย้อม	SKBT1	99.00	MG928502	<i>Bacillus wiedmannii</i>
	SKBT2	98.00	MG928503	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	SKBT3	98.00	MG928504	<i>Acinetobacter junii</i>
	SKBT4	100.00	MG928505	<i>Bacillus cereus</i>

อยู่ในสกูล *Bacillus* 13 ไอโซเลท (68.42 เปอร์เซ็นต์) รองมา คือ สกูล *Pseudomonas* 4 ไอโซเลท (21.05 เปอร์เซ็นต์) สกูล *Lysinibacillus* และ *Aerococcus* พบสกูลละ 1 ไอโซเลท (5.26 เปอร์เซ็นต์) ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำสีย้อม 4 ไอโซเลท (SKBT1-4) จัดอยู่ในสกูล *Bacillus* และ *Acinetobacter* สกูลละ 2 ไอโซเลท (50 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 2)

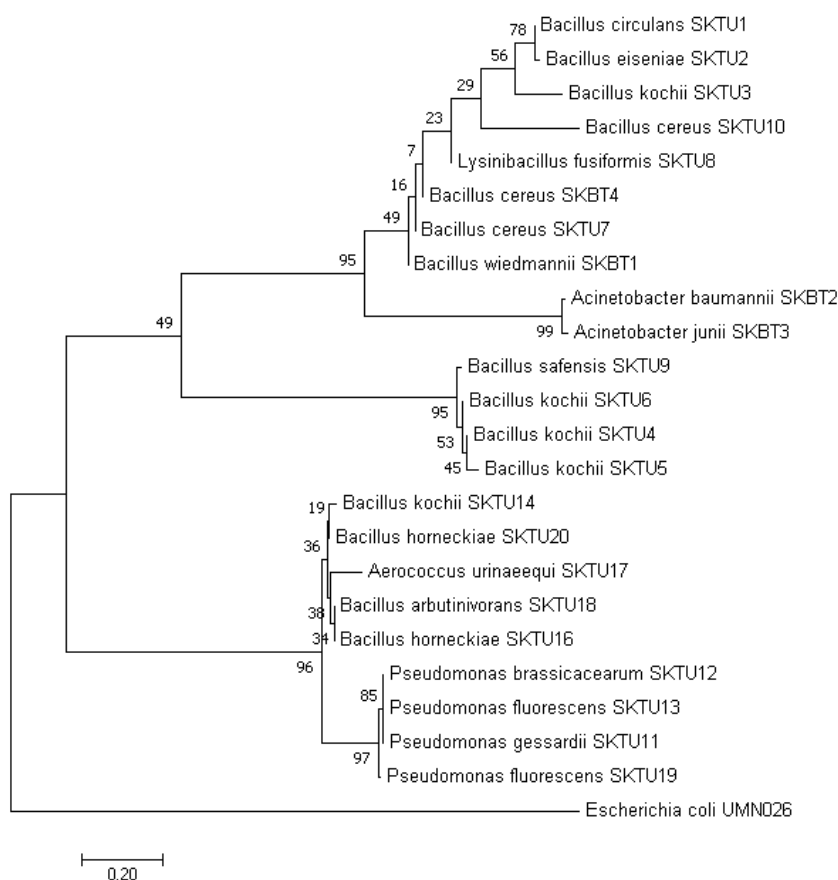
เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA* ของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดในสกูล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* สามารถแยกอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถแยกกลุ่มตามสกูลของแบคทีเรีย (รูปที่ 3) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rRNA* ใกล้เคียงกันมากและอาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั่นเกินไป ทำให้

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีลักษณะซ้อนทับกันแม้ว่าแบคทีเรียจัดอยู่ต่างสกุลก็ตาม

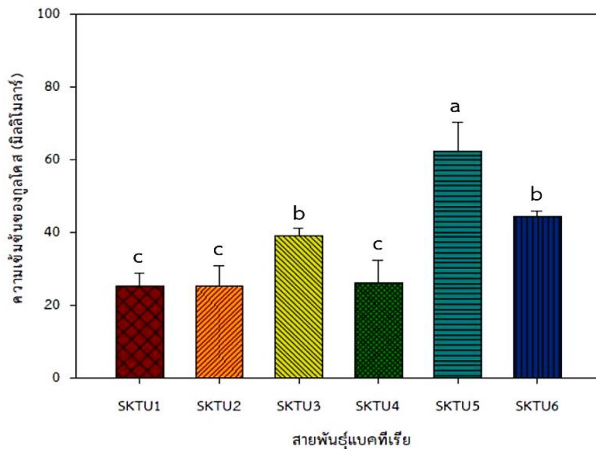
3.3 ประสิทธิภาพการผลิตกลูโคสจากอินดิแคน

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียออมจำนวน 19 สายพันธุ์ เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปอินดิแคนให้อยู่ในรูปของอินดิโกโดยบ่มตะกอนเซลล์กับสารละลายอินดิแคนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4) พบว่าแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถให้ปริมาณกลูโคสที่สูงแตกต่าง

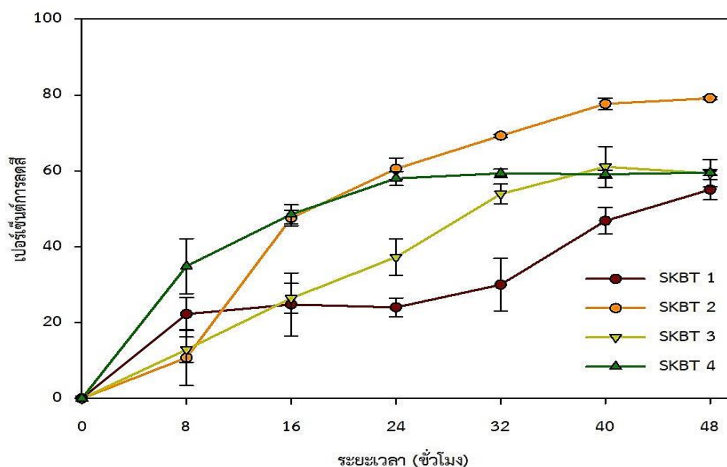
กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถให้ปริมาณกลูโคสที่สูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ *Bacillus kochii* SKTU5 ให้ปริมาณกลูโคสจากการเปลี่ยนรูปจากสารอินดิแคนได้สูงที่สุดเท่ากับ 63.67 ± 6.59 มิลลิโมลาร์ รองมา คือ *Bacillus kochii* SKTU6, *Bacillus kochii* SKTU3, *Bacillus kochii* SKTU4, *Bacillus circulans* SKTU1 และ *Bacillus eiseniae* SKTU2 ให้ปริมาณกลูโคสเท่ากับ 45.70 ± 3.29 , 40.48 ± 2.39 , 27.44 ± 6.94 , 26.71 ± 3.26 และ 26.57 ± 3.89 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวนี้เป็นสายพันธุ์ที่



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียที่คัดกรองได้ 23 ไอโซเลท



รูปที่ 4 ปริมาณกลูโคสที่แบคทีเรียผลิตจากอินดิแคน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 5 การลดสีครามด้วยแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำเสีย

อาจมีความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนสารอินดิแคนที่อยู่ในไบโคราม เพื่อเปลี่ยนเป็นอินโดกซิล (indoxyl) และกลูโคส (glucose) ได้ดียิ่งขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและอาจส่งผลให้ได้สีครามหรืออินดิโกที่มากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับ Aino และคณะ (2010) ที่แยกจุลินทรีย์ซึ่งสามารถรีดิวซ์สีครามจากหม้อย้อมครามในประเทศญี่ปุ่นได้หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus firmus*, *Halomonas venusta*, *Amphibacillus xylanus*, *Tissierella creatinophila* DSM 6911^T, *Bacillus cellulosilyticus* N-4T, *Corynebacterium efficiens* YS-314T เป็นต้น และสมพงษ์ และเบญจวรรณ (2556) แยกจุลินทรีย์จากหม้อย้อมครามที่ได้จากพืช *Indigofera indica* ใน

ประเทศไทยโดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) โดยพบจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Atopostipes* sp., *Clostridium* sp., *Sporomusa acidovorans*, *Amphibacillus* sp., *Alkalibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Actinomycetales* sp.

3.4 ประสิทธิภาพการลดสีครามของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่คัดกรองได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำเสียในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลดสีคราม (รูปที่ 5 และ 6) โดยแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* SKBT 2 ลดสีได้สูงที่สุดถึง 79.13 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์

รองมา คือ *Bacillus cereus* SKBT4, *Acinetobacter junii* SKBT3 และ *Bacillus wiedmannii* SKBT1 ลดสีครามได้ 59.56 ± 0.78 , 59.35 ± 3.63 และ 55.06 ± 2.69 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณารูปแบบของการลดสีในสภาวะนิ่งจากงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Ramya และคณะ (2008) ที่ศึกษาการลดสี indigo carmine ด้วยแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae* โดยการเขย่าเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2015) ที่ศึกษาการลดสี indigo carmine ด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MZS10 ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพและมีการกวนผสม โดยการลดสีครามด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสภาวะนิ่งมีประสิทธิภาพในการลดสีเช่นเดียวกับรูปแบบเขย่า ซึ่งสามารถลดสีครามในระยะเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาสารเมแทบอไลต์ของผลิตภัณฑ์และรวมถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดสี เพื่อให้เข้าใจกระบวนการลดสีและการบำบัดทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 6 ประสิทธิภาพการลดสีครามด้วยแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากดินบริเวณย้อม ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4. สรุปผลการวิจัย

เมื่อคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียย้อมครามในกระบวนการย้อมผ้าครามธรรมชาติและดินที่บริเวณ

ย้อม พบว่าคัดกรองได้แบคทีเรีย 23 ไอโซเลท เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียจากน้ำเสียย้อม 19 ไอโซเลท (SKTU1-20) อยู่ในสกุล *Bacillus* 13 ไอโซเลท สกุล *Pseudomonas* 4 ไอโซเลท สกุล *Lysinibacillus* 1 ไอโซเลท และสกุล *Aerococcus* 1 ไอโซเลท ส่วนแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำเสียย้อม 4 ไอโซเลท (SKBT1-4) อยู่ในสกุล *Bacillus* และสกุล *Acinetobacter* สกุลละ 2 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากน้ำเสียย้อมนั้น มีเพียง 6 ไอโซเลทที่ช่วยในการเปลี่ยนรูปอินดิแคนให้เป็นอินดอกซิลและกลูโคส โดยที่แบคทีเรีย *Bacillus kochii* SKTU5 สามารถให้ปริมาณกลูโคสจากการเปลี่ยนรูปจากสารอินดิแคนได้สูงเท่ากับ 63.67 ± 6.59 มิลลิโมลาร์ ส่วนแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากดินบริเวณย้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำเสียย้อมครามมีเพียง 4 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถลดสีคราม โดย *Acinetobacter baumannii* SKBT2 ลดสีได้สูงสุด 79.13 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียย้อมครามในหม้อย้อมมีส่วนช่วยให้มีสีครามที่สูงขึ้น ส่วนแบคทีเรียจากดินบริเวณย้อมสามารถช่วยลดสีครามได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับการย้อมและสามารถนำจุลินทรีย์ที่ได้ไปใช้ในการลดสีในน้ำเสียจากการย้อมครามต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560 เลขที่สัญญา 23/2560 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ขอขอบคุณ คุณสุกัญญา สารนันท์ เจ้าของร้านครามสกล อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณ คุณพิชามณู พิชิตทอง ที่มีส่วนทำให้

การวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

- นฤมล ธนानันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2554, การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในกุ้งแช่แข็งด้วยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19(2): 12-17.
- นฤมล ธนานันต์, นวัพน เกตุสวัสดิวงศ์, ศรีสุดา ปัทมณาสรรณ และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA, Thai J. Sci. Technol. 5(2): 160-168.
- ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์, นิรมล ศากยวงศ์ และสายันท์ สมฤทธิ์, 2557, ผลการจำแนกราดด้วยวิธีโอทีเอสพีซีอาร์และความสามารถในการบำบัดสีรีแอกทีฟ RR141, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(5): 683-694.
- พิชญพร ภิญญ์ญาพัช, ธวัชชัย ชัยธวัชวิที และเอกอาทิพย์ ฤทธิเดชยัง, 2561, การคัดแยกและการระบุสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสีย้อมหม้อมแบบธรรมชาติ, ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 35(1): 45-54.
- สมพงศ์ โอทอง และเบญจวรรณ บัวขวัญ, 2556, การพัฒนาเกลือเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักสีครามจากต้นครามและการเก็บรักษาสีครามในสภาพเหมาะสมต่อการย้อม, รายงานวิจัยโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา, 65 น.
- อนรรตน์ สายทอง, 2555, หม้อมย้อมครามธรรมชาติ, ว.วิทยาศาสตร์ มข. 40(2): 423-435.
- Aino, K., Narihiro, T., Minamida, K., Kamagata, Y., Yoshimune, K. and Yumoto, I., 2010, Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation, FEMS

Microbiol. Ecol. 74: 174-183.

- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. and Gubitz, G.M., 2001, Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*, J. Biotechnol. 89: 131-139.
- Clark, R. J. H., Cooksey, C. J., Daniels, M. A. M. and Withnall, R., 1993, Indigo, woad, and Tyrian Purple: Important vat dyes from antiquity to the present, Endeavour 17: 191-199.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E. M., 1997, Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradient, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3233-3241.
- Li, H.X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J.H. and Mao, Z. G., 2015, Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10, Int. Biodeterior. Biodegrad. 103: 30-37.
- Minami, Y., Takao, H., Kanafuji, T., Miura, K., Kondo, M., Hara Nishimura, I. and Matsubara, H., 1997, beta-glucosidase in the indigo plant: Intracellular localization and tissue specific expression in leaves, Plant. Cell. Physiol. 38: 1069-1074.
- Nicholson, S. K. and John, P., 2005, The mechanism of bacterial indigo reduction, Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 117-123.
- Ramya, M., Anusha, B. and Kalavathy, S., 2008, Decolorization and biodegradation of indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus*

- larvae*, Biodegradation 19: 283-291.
- Schmidt, H., 1997, Indigo-100 Jahre industrielle Synthese, Chemie in unserer Zeit 31: 121-128.
- Song, J., Imanaka, H., Imamura, K., Kajitani, K. and Nakanishi, K., 2010, Development of a highly efficient indigo dyeing method using indican with an immobilized beta-glucosidase from *Aspergillus niger*, J. Biosci. Bioeng. 110: 281-287.