

การประยุกต์ใช้รงควัตถุสีน้ำตาลส้มที่มีฤทธิ์ต้าน methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* จากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) เพื่อใช้เป็นสีย้อมผ้า[†]

มณฑล เลิศคนวานิชกุล*, อาชีวะ มะปิจ และ ฮาลีหะมะ สะหม้อ

สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

*อีเมล: Lmonthon55@gmail.com

บทคัดย่อ

น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) สามารถแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา *Staphylococcus aureus* TISTR 517 และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ KB3 สามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลส้มในช่วงเวลา 3-5 วัน ของการบ่มเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์เอ็กเทร็กต์-มอลต์เอ็กเทร็กต์แบบครึ่งสูตร ที่มีปริมาณเปปโตน 0.6 กรัม ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยสามารถนำรงควัตถุสีน้ำตาลส้มมาย้อมผ้าดิบแต่ยังไม่พบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยา ดังนั้นจึงได้เพิ่มประสิทธิภาพการต้านการเจริญของเชื้อดื้อยาด้วยการนำไปผสมกับ 2,4-Di-tert-butylphenol พบว่าสามารถเห็นฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อดื้อยาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น การติดสีย้อมของผ้าดิบมีความคงตัวสูงแม้จะนำไปล้างออกด้วยน้ำ เมื่อใช้สีย้อมความเข้มข้น 2 ที่ pH 10 เป็นมอร์แดนต์ ดังนั้นในการทำการศึกษารังต่อไปจึงน่าจะพัฒนาให้รงควัตถุจากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) มีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาควบคู่ไปกับการติดแน่นบนผืนผ้า เพื่อเป็นประโยชน์ของการประยุกต์ใช้สารสีจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี ช่วยลดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305), สีย้อมผ้า

Abstract

The culture broth of *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) showed anti-*Staphylococcus aureus* TISTR517 and anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Strain KB3 was also found to be able to produce orange-brown pigments during 3-5 days of incubation in half formula Yeast Extract-Malt Extract broth medium, contained peptone content of 0.6 g, incubated at 30 °C, 150 rpm. The orange-brown pigments could be used to dye the calico, but the anti-bacterial activity was not found. Therefore, the anti-bacterial property was increased by mixing it with 2,4-Di-tert-butylphenol. It was found that the anti-bacterial activity was more clearly observed. The dyeing of calico is highly stable even after washing with water when using 2 % content of ash at pH 10 as mordants. Therefore, in the further study, it would be possible to develop a pigment from *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) to have more anti-bacterial activity along with adhesion on the fabric for the benefit of the application of natural pigments to instead use of chemicals. It might be helped to reduce the residues in the environment and is a sustainable use of biodiversity.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305), Textile dye

บทนำ

แบคทีเรียสเตรปโตมัยซิส (*Streptomyces*) เป็นสกุลของเชื้อที่พบได้มากที่สุดในกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซิส (*Actinomyces*) มีแหล่งอาศัยอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมบนโลกโดยเฉพาะในดินคิดเป็นร้อยละ 50 1) นอกจากนี้ยังพบได้ในอากาศ น้ำจืด น้ำทะเล และพืช เป็นต้น โดยเชื้อกลุ่มดังกล่าวได้ถูกรายงานว่ามีความสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือการผลิตสารในกลุ่มเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น 2) และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ในด้านเกษตรกรรมใช้ในการควบคุมโรคในพืช ด้านอุตสาหกรรมใช้ในการบำบัดน้ำเน่าเสีย 3) ด้านการแพทย์สามารถพัฒนาใช้เป็นยากดภูมิคุ้มกัน (Immuno suppressive drug) ยาฆ่าเชื้อปรสิต (antiparasitic drug) ยาฆ่าเชื้อรา (antifungal drug) เป็นต้น 4) นอกจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิออกฤทธิ์ปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้นแล้วยังพบว่าสารเมลาโนลินที่ผลิตจาก

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ขมรคมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

Streptomyces 5) ที่ถูกจัดเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งและเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds) ที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 6) และอาจจะแสดงฤทธิ์ปฏิชีวนะได้ด้วย 7) อีกทั้งยังพบว่าสารกลุ่มรงควัตถุ (Pigments) ให้สีอื่นๆยังสามารถตรวจพบได้จากสกุล *Streptomyces* ทั้งสีแดง ส้ม น้ำตาล อันเนื่องมาจากความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของเชื้อในแต่ละสปีชีส์ ซึ่งมีอยู่มากถึง 500 สปีชีส์ 8) จึงเป็นสาเหตุให้เชื้อมีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏให้เห็นด้วยสายตา (Macroscopic examination) ซึ่งจากความหลากหลายของรงควัตถุที่ถูกตรวจพบในจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา (Fungi) ไลเคน (Lichen) แบคทีเรีย (Bacteria) รวมทั้งแบคทีเรียที่คล้ายเชื้อรา (Fungi-like bacteria) ในกลุ่ม *Streptomyces* 5) จึงได้ถูกนำมาศึกษาใช้เป็นสีย้อมที่อาจนำไปใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ต่อไปได้อย่างมีคุณภาพ

สีย้อมมีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์กันมาตั้งแต่อดีตทั้งที่ใช้ในการย้อมเครื่องมือ เครื่องใช้เครื่องนุ่งห่ม หรืออาหาร โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะเป็นสีย้อมที่สังเคราะห์ทางเคมีที่มีองค์ประกอบของสารที่อาจก่อเกิดมะเร็งและสารพิษ เช่น โลหะหนักในกลุ่มของตะกั่วและโครเมียมที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน 9) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามศึกษาค้นหาสีย้อมจากธรรมชาติทั้งจากพืช ดิน แร่ธาตุต่างๆ รวมไปถึงจากรงควัตถุที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้เพื่อประโยชน์นำมาใช้ทดแทนสีย้อมสังเคราะห์ในการลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามการพัฒนาเลือกใช้สีย้อมทางชีววิทยายังคงต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น ปริมาณของวัตถุดิบที่นำมาใช้เตรียมเป็นสีย้อม พื้นที่ในการเตรียมวัตถุดิบหรือฤดูกาลที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยววัตถุดิบ เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณของสีย้อมที่เพียงพอและเกิดความสม่ำเสมอคงที่ต่อคุณภาพชิ้นงานในแต่ละครั้งของการย้อมสีให้เป็นที่ถูกใจแก่ผู้บริโภค ดังที่ได้มีรายงานการนำรงควัตถุสีแดงจาก *Streptomyces* K-4B ไปผสมในสบู่กลีเซอรีน เพื่อเพิ่มความน่าใช้งาน ดึงดูดใจผู้บริโภค โดยพบว่าสามารถใช้เป็นสีย้อมทดแทนจากพืชได้ด้วย 10) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับสีย้อมที่เตรียมได้จากพืชอาจมีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น พืชบางสายพันธุ์อาจต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต มีพื้นที่จำกัดในการเพาะปลูกค่อนข้างหายากหรือปัญหาภัยธรรมชาติที่อาจทำให้พรรณไม้สูญพันธุ์ได้ 11) โดยจะเห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์สามารถตอบโจทย์ปัญหาเหล่านั้นได้ค่อนข้างดีกว่าวัตถุดิบที่เป็นพืช หรือทรัพยากรทางธรรมชาติอื่นที่มีปริมาณอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณมากในพื้นที่จำกัด และเก็บเกี่ยวได้ทุกฤดูกาล ไม่เป็นการทำลายทรัพยากร อีกทั้งสีย้อมที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์ยังสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในบริเวณของการจัดการเกี่ยวกับสีย้อมนั้น 12) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological properties) อื่นของรงควัตถุที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* ที่สามารถแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ด้วย กล่าวคือนอกจากเป็นสีย้อมที่ติดแน่นทนนานแล้ว ยังสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อฝีหนอง ในกลุ่ม *Staphylococcus* ได้ด้วย ดังเช่น (รายงานวิจัยของมณฑล, 2015) ที่ได้รายงานว่า *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ถูกคัดแยกมาได้จากอากาศที่อ่าวนาง จังหวัดกระบี่ มีความสามารถผลิตสารเมแทบอลิไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ดีกว่ายาออกซาลิซิลิน (oxacillin) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract-Malt extract ครึ่งสูตร (YM/2) และระยะเวลาการเจริญของเชื้อจะอยู่ในช่วงวันที่ 3-4 ซึ่งเชื้อจะมีการปรากฏลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลที่มีลักษณะฝักรุ่นและมีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลส้ม (brownish-orange) (13) ที่สามารถละลายน้ำผ่านเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อได้ไม่ว่าจะเป็นอาหารวุ้นแข็ง (Agar medium) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Liquid medium) ทำให้พื้นที่บริเวณโดยรอบเป็นสีน้ำตาลอมส้ม และค่อนข้างติดแน่นทนนานแก่ที่ใช้ในการบ่มเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ KB3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM/2 ที่เพิ่มปริมาณเปปโตน (Peptone) ลงไปในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (14) จึงเป็นที่น่าสนใจทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำรงควัตถุของเชื้อสายพันธุ์ KB3 มาใช้ย้อมผ้าให้เป็นผ้าสีย้อมจากรงควัตถุที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์เป็นต้นแบบทำผ้ามย้อม ผ้าพันแผล ไปใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรม การแพทย์และทางเภสัชวิทยาได้ในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทำ Starter เชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM/2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวด duran ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ลงในขวด Baffled shake flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี Glass bead 200 เม็ด (1 เม็ด glass bead ต่อ 1 มิลลิลิตร) นำเข้าเครื่องนึ่งไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งจนเย็นตัว จากนั้นตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสด้านละ 1 เซนติเมตร ใส่ลงในขวดแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Orbital-shaking incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

ปัจจัยทางด้านกายภาพและปัจจัยทางด้านองค์ประกอบของสารเคมีต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

1) ปัจจัยทางกายภาพ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 TISTR 2305 เพื่อหาจำนวนวันที่ดีที่สุดในการเพิ่มปริมาณสารปฏิชีวนะทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดักซ์นิโดยวิธี Agar well diffusion โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะเดียวกันกับข้อที่ 1 แล้ว

นำน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละวันมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี โดยการนำสารแขวนลอยแบคทีเรียในแต่ละวันมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อแยกเอาตะกอนเชื้อออกไป ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อแยกนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาด้วยวิธี Agar well diffusion

ใช้ไม้ปั่นสำลีปาดจากเชื้อจุ่มสารแขวนลอยดื้อยาที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ป้ายที่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA รวมทั้งขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อวางให้ผิวหน้าแห้งเป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยทูปปาดจากเชื้อขนาด 100 ไมโครลิตร โดยคว่ำด้านบนเจาะกดลงไปเบาๆ บนจาน MHA ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมโดยประมาณ 0.6 เซนติเมตร แล้วใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บวนทั้ง แล้วเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 1) ลงในหลุมของอาหาร MHA หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำเลี้ยงเชื้อแพร่เข้าสู่เนื้อวันหมด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ปัจจัยทางด้านการประกอบของสารเคมี

1) การทดสอบผลของเปปโตเนตต่อการผลิตกรดไขมันและสารปฏิชีวนะ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM/2 จำนวน 1 ขวด ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและเติม Glass bead 100 เม็ดลงใน Baffled shake flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นขวดสูตรดั้งเดิมที่มีปริมาณเปปโตเนต 0.50 กรัม และลดปริมาณเป็น 0.10 กรัม, 0.20 กรัม และ 0.30 กรัม จากนั้นดูด starter จากข้อ 1. มาใส่ขวดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Orbital-shaking incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สังเกตลักษณะการสังเคราะห์กรดไขมันของเชื้อในขวดที่มีปริมาณ (กรัม) ของเปปโตเนตที่ความเข้มข้นต่างกันในแต่ละวัน จนถึงวันที่ 7 ดูดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM/2 ในวันที่ 3 จากนั้นทุก ๆ 24 ชั่วโมง ใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จำนวนขวดละ 2 หลอด นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบสูง ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเอาตะกอนเชื้อออกไป และเก็บ ส่วนใสมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาเบื้องต้นด้วยวิธี Agar well diffusion กับเชื้อ *S. aureus* (TISTR 517) และเชื้อ MRSA 3 ไอโซเลท และทำเช่นเดียวกันในวันที่ 4, 5, 6 และวันที่ 7

นำน้ำเลี้ยงเชื้อในแต่ละวันไปทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อดื้อยาและ MRSA 3 ไอโซเลท ที่ปรับ 0.5 Macfarland และซีบจานอาหาร MHA 5 เส้น (60 มิลลิเมตร) แล้วนำผ้าที่ย้อมด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อแต่ละวันไปวางทาบบนรอยขีด หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทั้งในวันที่ 3 และวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 เพื่อดูผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces sp.* KB3 (TISTR 2305)

การผลิตสีย้อมและการย้อมผ้าฝ้ายดิบ (12)

1) การสกัดสารสีจาก *Streptomyces sp.* KB3 (TISTR 2305)

ปั่นปลายข้าวใส่ลงในฟลาสก์และบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร อย่างละ 30 กรัม ใส่ น้ำประปาให้พอท่วมแช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วรินน้ำออกให้แห้งจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำ starter จากข้อ 1 ใส่ลงไปในปลายข้าวปริมาตร 12 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน แล้วอบแห้งด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำปลายข้าวมาพักให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปบดให้เป็นผงสี เก็บใส่ถุงไว้ในตู้ดูดความชื้น

2) การเตรียมสีย้อมและมอร์แดนต์

2.1) การเตรียมสีย้อม

ชั่งผงสี *Streptomyces sp.* KB3 (TISTR 2305) ต่อก่อนอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ในอัตราส่วน 1:5 ทำการผสมผงสีและสารสกัด เขย่าบนเครื่องกวนสารละลาย ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 (125 mm) ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไประเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกว่าเอทานอลจะแห้งสนิท จากนั้นละลายกลับด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 38 ปริมาตรครึ่งหนึ่งของเอทานอลเริ่มต้นแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2) การเตรียมมอร์แดนต์

นำผงสีใส่เข้าด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาทีละลายสีแล้วร้อยละ 2 (ซึ่งผงสี 2 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ลงในบีกเกอร์ คนจนเป็นเนื้อเดียวกัน กรองน้ำสีใส่ด้วยผ้าขาวบางลงในบีกเกอร์อีกใบแล้ววัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 10 12 และ 14 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นตัวลด pH และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวเพิ่ม pH ของสารละลาย

2.3) วิธีการย้อมสีผ้า

ตัดผ้าฝ้ายดิบให้มีขนาดประมาณ 1x3 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น แล้วนำผ้าฝ้ายดิบที่ตัดมาแช่ในสารละลายมอร์แดนท์ซึ่งให้ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (ใช้ผ้า 3 ชิ้นต่อหนึ่ง pH และอีกหนึ่งชิ้นใช้สำหรับเป็นตัวควบคุม) นำมาผึ่งให้แห้งแล้วย้อมต่อในน้ำสีย้อม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง ล้างออกด้วยน้ำประปาโดยการแช่ไว้ในบีกเกอร์เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้ง ทำซ้ำอีกสองครั้ง

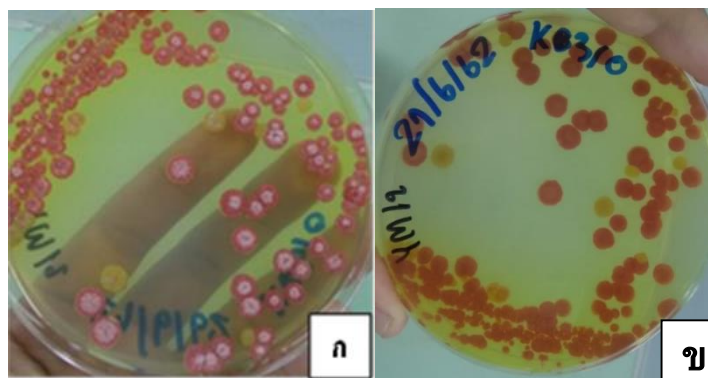
4. การยืนยันฤทธิ์ต้าน MRSA จากผ้าฝ้ายดิบ

ตัดผ้าขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 24 ชิ้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดัดขึ้นเบื้องต้นโดยการนำผ้าไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมในสภาวะต่างๆดังนี้ น้ำสีย้อม น้ำสีย้อมผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อวันที่ 3 อัตราส่วน 1:1 น้ำสีย้อมผสมกับ 2,4-Di-tert-butylphenol อัตราส่วน 1:1 (ผ้าย้อมด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 38 และ 2,4-Di-tert-butylphenol เพื่อเป็นตัวควบคุม) นำผ้าย้อมมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดัดขึ้นเบื้องต้นโดยการวางผ้าบนจานอาหาร MHA ชีดด้วยเชื้อดัดขึ้นและ MRSA รอบผ้าความยาวขนาด 10 มิลลิเมตร โดยในขั้นตอนนี้ได้ลดจำนวนเชื้อดัดขึ้นที่นำมาทดสอบเหลือเพียง *S. aureus* (TISTR 517) และเชื้อ MRSA 2 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นดูลักษณะการต้านการเจริญของเชื้อรอบผ้าฝ้ายดิบที่ย้อมเชิงคุณภาพ

ผลและอภิปรายผล

สัณฐานวิทยา การยืนยันและการระบุชนิดของเชื้อสเตรปโตมัยซิส

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ที่รักษาสภาพไว้ในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract-malt extract (YM) ความเข้มข้นครึ่งสูตร (YM/2) ด้วยวิธีขีดบนจานเพาะเชื้อ (streak plate) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนปรากฏลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะฝังงู (embedded) มีการสร้างรงควัตถุสีส้ม โดยโคโลนีจะปรากฏให้เห็นตั้งแต่ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 มีการสร้างสปอร์สีส้ม สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ซึมแพร่เข้าสู่เนื้อวุ้นเป็นสีน้ำตาล และเมื่อบ่มเลี้ยงไว้นานขึ้นจะเห็นโคโลนีที่มีผิวหน้าหยาบมีร่อง (grain) เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 6 มิลลิเมตร มีลักษณะสีเข้มที่ขึ้นโดยสังเกตสีด้านหลังโคโลนีเป็นสีแดงส้ม (reddish-orange) เมื่อเทียบกับโคโลนีที่อยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่สร้างรงควัตถุสีส้มและไม่สร้างรงควัตถุ และบนผิวโคโลนีจะมีลักษณะเป็นแป้งสีขาว (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีมี 2 แบบคือ ไม่สร้างสปอร์ (สีขาว) สร้างสปอร์ (สีส้ม) (ก) และภาพหลังโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) (ข)

การยืนยันเชื้อสเตรปโตมัยซิส

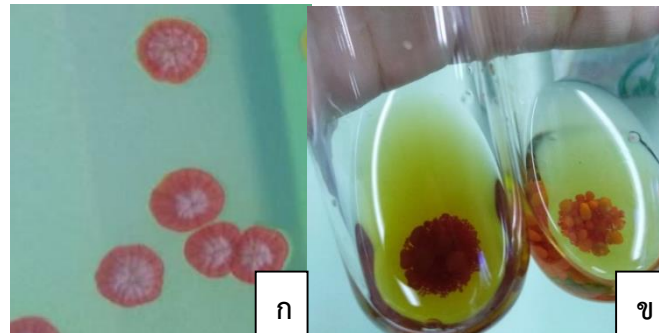
ลักษณะที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อทำการเลี้ยงแบบ slide culture มาเป็นระยะเวลา 7 วัน ในสภาวะบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ย้อมด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue แบบ wet mount ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 40 เท่า พบว่าเชื้อมีลักษณะแตกกิ่งก้านคล้ายสาหร่าย

การระบุชนิดของเชื้อสเตรปโตมัยซิส

1) การสร้างรงควัตถุของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305)

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ขีดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM/2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โคโลนีจะปรากฏให้เห็นตั้งแต่ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 พบว่าปรากฏลักษณะเป็นโคโลนีที่มีการสร้างรงควัตถุสีส้มและมีการสร้างเมลา

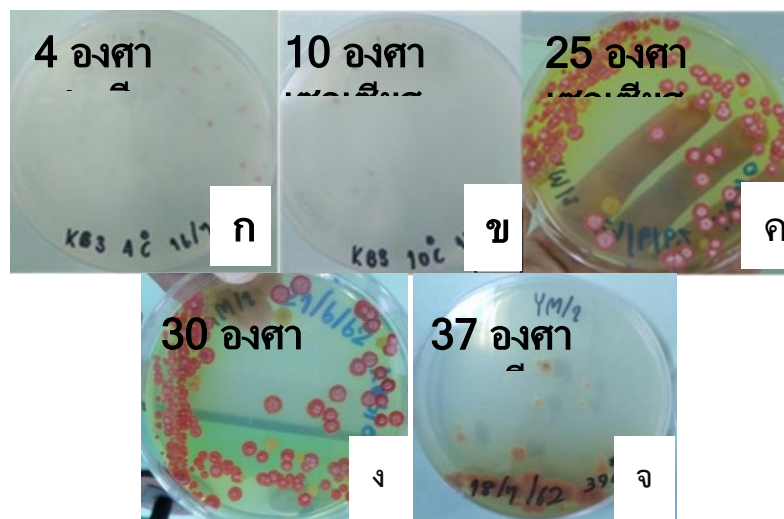
นิน (ภาพที่ 2 (ก)) เพื่อยืนยันว่ารงควัตถุสี สีส้มและสีน้ำตาลดังกล่าวที่สังเกตเห็นบนจานเพาะเชื้อวันแข็ง YM/2 สามารถละลายออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ด้วยการนำโคโลนีไปเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM/2 ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าลักษณะการเจริญของตะกอนเชื้อมีการสร้างรงควัตถุสีส้ม (orange pigment) เมื่อบ่มเลี้ยงนานขึ้น ตะกอนเชื้อและสารแขวนลอยเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีน้ำตาล (melanin pigment) (ภาพที่ 2 (ข)) เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อ



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในอาหารเลี้ยงเชื้อวันแข็ง YM/2 (ก) และลักษณะของการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM/2 (ข)

2) การเจริญที่อุณหภูมิของเชื้อทดสอบ

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 มาขีดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อวันแข็ง YM/2 ด้วยวิธี streak plate technique บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4 10 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส โคโลนีจะปรากฏให้เห็นตั้งแต่ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีการเจริญของเชื้อ แต่มีการเจริญและสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* KB3 ในจานเพาะเชื้อวันแข็ง YM/2 ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ก) 10 องศาเซลเซียส (ข) ไม่มีการเจริญของเชื้อ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ค) 30 องศาเซลเซียส (ง) 37 องศาเซลเซียส (จ) มีการเจริญของเชื้อ

3) ทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

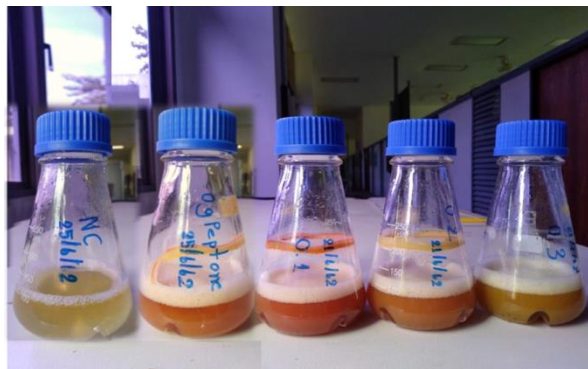
นำตะกอนเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 ทดสอบการใช้น้ำตาลด้วยชุดการทดสอบ API 50 CH บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงปรากฏว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลชนิดต่าง และเมื่อนำผลมาเทียบกับตารางการระบุชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 พบว่าเชื้อมีลักษณะ Aerial spore เป็นสีแดง มีลักษณะ Pigment 2 แบบคือ Red/orange และ Yellow/brown เชื้อมีความสามารถในการสร้างเม

ลานินในเปปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆ มีการเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาและ 37 องศาและเชื้อมีการใช้น้ำตาลน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อทดสอบกับชุดทดสอบ API 50 CH จากผลการทดสอบตรงกับสปีชีส์ *Streptomyces chromogenus*

การเจริญของเชื้อและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

1) ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เมื่อนำสารแขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM/2 ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ปริมาณความเข้มข้นของเปปโตน 0.5 กรัม 0.6 กรัม 0.7 กรัม และ 0.8 กรัม เป็นเวลา 7 วัน พบว่าวันที่ 3 ลักษณะการเจริญของตะกอนเชื้อมีการสร้างรงควัตถุน้ำตาลส้ม (brownish-orange) (ภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อ



ภาพที่ 4 ลักษณะการเจริญของตะกอนเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงเชื้อสีเหลืองใส เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีก้อนตะกอนเชื้อสร้างรงควัตถุน้ำตาลแดงความเข้มข้นของเปปโตน

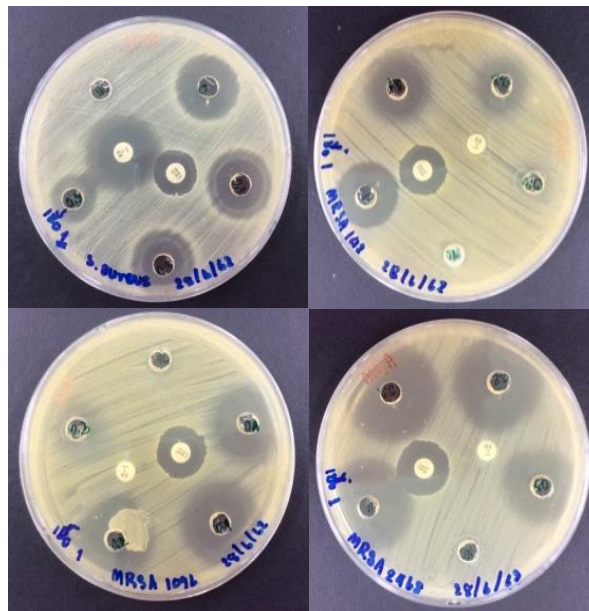
2) ฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3

การเจริญในสูตรอาหารปกติ

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเลี้ยงในอาหารเหลว YM/2 สูตรปกติ เพื่อมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยาในเบื้องต้น โดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาได้ทั้ง *S. aureus* TISTR 517 และ MRSA ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้ด้วยการยับยั้งเชื้อสูงสุด ในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน ในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5)

การเจริญในสูตรอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของเปปโตน

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเลี้ยงในอาหารเหลว YM/2 ที่มีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเปปโตน 0.5 กรัม 0.6 กรัม 0.7 กรัม และ 0.8 กรัม ตามลำดับ เพื่อมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยา พบว่าในช่วงการเลี้ยงเชื้อ 1 ถึง 5 วัน เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อ KB3 ที่ระยะการบ่มเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ไปทดสอบการต้านเชื้อดื้อยาดังวิธี Agar well diffusion พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ *S. aureus* TISTR 517 และ MRSA 3 ไอโซเลท) โดยในวันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเปปโตน 0.6 กรัม ให้ขนาดวงใสยับยั้งแต่ละเชื้อมีขนาดเฉลี่ยในช่วง 20.00 ± 0.50 ถึง 31.50 ± 0.50 มิลลิเมตร หลังจากนั้นในวันที่ 4 ในสภาวะน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเปปโตนเพิ่มขึ้นฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาเริ่มลดลงเหลือขนาดวงใสยับยั้งแต่ละเชื้อมีขนาดอยู่ในช่วง 29.50 ± 50.00 มิลลิเมตร จนถึงไม่มีวงใสของการยับยั้ง (0.60 ± 0.00 มิลลิเมตร) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเชื้อดื้อยาที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อขนาดวงใสของการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จำนวนวันที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดวงใสของการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อขนาดวงใสของการยับยั้งที่ปริมาณความเข้มข้นของเปปโตน 0.8 กรัม



ภาพที่ 5 ฤทธิ์ต้านเชื้อดักซันของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3

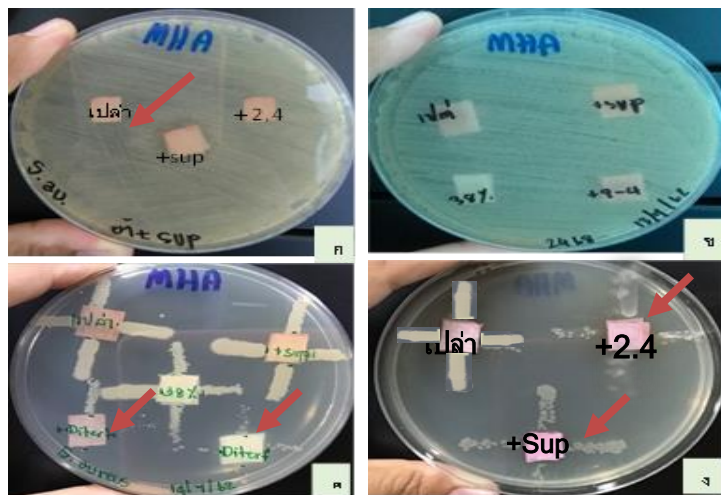
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะจากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305)

จากการบ่มเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่า มีลักษณะการเจริญเป็นตะกอนเชื้อ มีการสร้างรงควัตถุน้ำตาล รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีน้ำตาลแดง นอกจากนี้ปริมาณของเปปโตเนที่ความเข้มข้นต่างๆมีผลต่อการสร้างรงควัตถุ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 5 ฟลasks (Flasks) ประกอบด้วย ขวดที่1 Negative Control (NC) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า ขวดที่ 2 0.5 กรัมเปปโตเน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดที่3 0.6 กรัมเปปโตเน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า + 0.1 กรัมเปปโตเน ขวดที่ 4 0.7 กรัมเปปโตเน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ + 0.2 กรัมเปปโตเน และขวดที่5 0.8 กรัมเปปโตเน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ + 0.3 กรัมเปปโตเน ซึ่งหากมีการเพิ่มปริมาณเปปโตเนจะยิ่งสร้างรงควัตถุมากยิ่งขึ้น โดยความเข้มข้นที่ให้สีน้ำตาลส้ม คือ 0.6 กรัมเปปโตเน

การประยุกต์ใช้รงควัตถุสีแดงจาก *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในการย้อมผ้า

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดักซัน

เมื่อนำผ้าขาวบางขนาด 1x1 เซนติเมตร เข้าเครื่องไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นนำสารแขวนลอยของเชื้อดักซันทั้ง 2 สายพันธุ์ (*S. aureus* TISTR 517 และ MRSA 2 ไอโซเลท) มาป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในหลอดน้ำสีย้อมเปล่า (ผงสีย้อมละลายกลับด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์) น้ำสีย้อม+น้ำเลี้ยงเชื้อ และน้ำสีย้อม 2,4-Di-tert-butylphenol ตามลำดับ ทำการย้อมโดยการเขย่าในบนเครื่องเขย่า 100 รอบ ต่อนาทีเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มีสารแขวนลอยของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อดักซันด้วยวิธี diffusion method พบว่าน้ำสีย้อมเปล่าและน้ำสีย้อมที่ผสมกับ 2,4-Di-tert-butylphenol ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดักซัน และพบว่าน้ำสีย้อมผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ต้านเชื้อดักซัน เมื่อมาทดสอบด้วยวิธีนำสารแขวนลอยของเชื้อดักซันมาซีดรอบผ้าสีย้อมพบว่า น้ำสีย้อมที่ผสมกับ 2,4-Di-tert-butylphenol มีฤทธิ์ต้านเชื้อดักซัน ดังภาพที่ 6 และตารางที่ 1



ภาพ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียดขึ้นจากการทดลอง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* (TISTR 517) ด้วยวิธี diffusion method (ก) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน MRSA 2468 ด้วยวิธี diffusion method (ข) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* (TISTR 517) ด้วยวิธีซีทรอบผ้า (ค) และผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน MRSA 2468 ด้วยวิธีซีทรอบผ้า (ง)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียดขึ้นของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ทดสอบด้วยวิธี diffusion method และวิธีซีทรอบผ้า

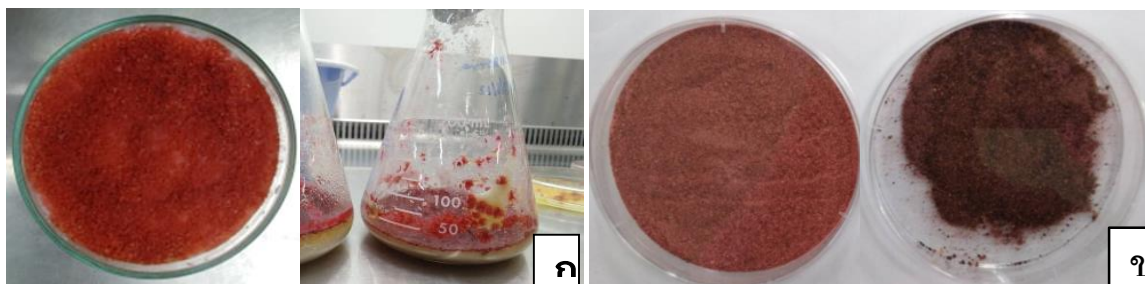
สารแขวนลอย	ฤทธิ์ต้านเชื้อ					
	วิธี diffusion method			วิธีซีทรอบผ้า		
	<i>S. aureus</i> TISTR 517	MRSA 142	MRSA 2468	<i>S. aureus</i> TISTR 517	MRSA 142	MRSA 2468
น้ำสีย้อม	-	-	-	-	-	-
น้ำสีย้อม + น้ำเลี้ยงเชื้อ	+	-	-	+	+	+
น้ำสีย้อม+2,4-Di-tert-butylphenol	-	-	-	+	+	+
2,4-Di-tert-butylphenol	+	-	-	+	+	+
38 % ethanol	-	-	-	-	-	-

— ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดัดขึ้น, + มีฤทธิ์ต้านเชื้อดัดขึ้น

การย้อมผ้าด้วยรงควัตถุสีส้มจากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305)

การเตรียมผงสีย้อม

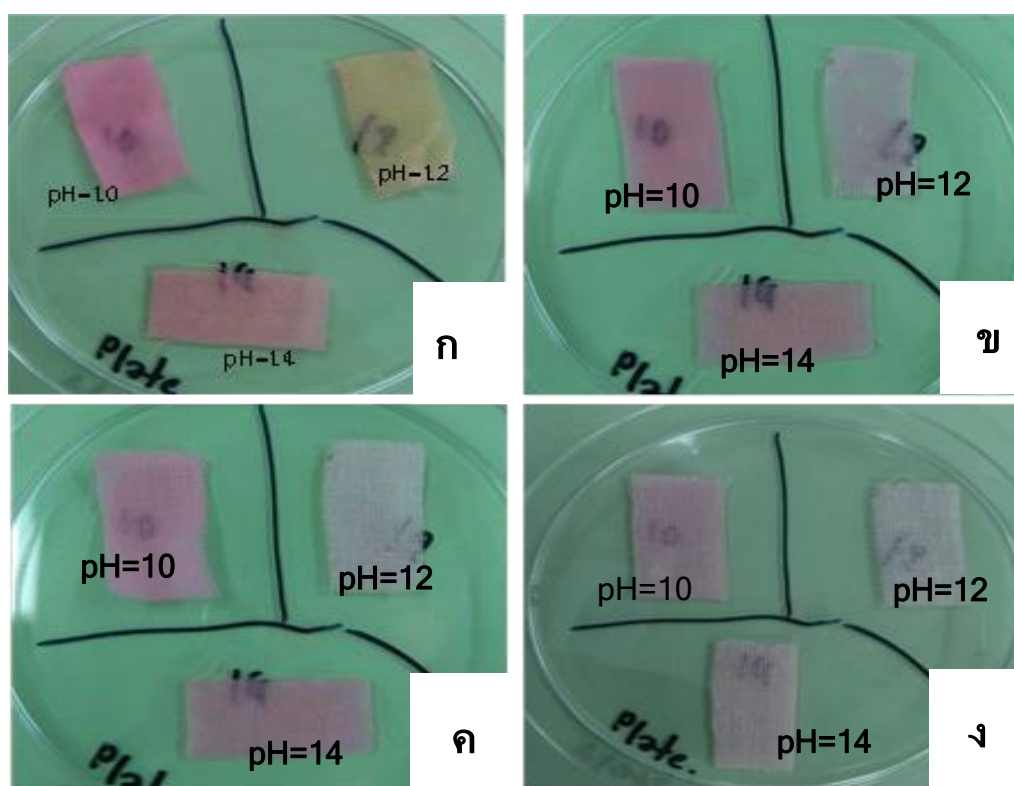
เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) จากการเพิ่มปริมาณเชื้อในเปปโตนความเข้มข้น 0.6 กรัม ในวันที่ 3 มาเพาะเลี้ยงในปลายข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน มีการเจริญของเชื้อบริเวณผิวหน้าของอาหาร (obligate) และสร้างรงควัตถุสีส้มแดง (reddish-orange) เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีน้ำตาลส้ม (brownish-orange) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาชนะปากกว้างพบว่าสร้างรงควัตถุสีส้มและสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลส้มในภาชนะปากแคบ (ภาพที่ 7 (ก)) จากนั้นนำไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน และ ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปบดเพื่อเตรียมเป็นผงสีย้อม พบว่าในกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ผงสีย้อมเป็นสีน้ำตาลส้ม และที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ให้ผงสีย้อมเป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม (ภาพที่ 7 (ข))



ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในสภาวะการบ่มเลี้ยงในภาชนะปากกว้าง (ซ้ายมือ ก) และภาชนะปากแคบ (ขวามือ ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ก) นำไปอบแห้งและเตรียมเป็นผงสีย้อมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ซ้ายมือ ข) และที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส (ขวามือ ข) (ข)

การย้อมผ้าด้วยรงควัตถุสีส้มจาก *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305)

เมื่อนำผ้าขาวบางขนาด 1x3 เซนติเมตร เข้าเครื่องนึ่งไอน้ำที่สภาวะมาตรฐาน เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาแช่ในน้ำที่เฝ้าความเข้มข้นร้อยละ 2 (มอร์แดน) ที่ pH 10 12 และ 14 เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมโดยการเขย่าบนเครื่อง rotater ที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วยน้ำประปา พบว่า ผ้าที่ใช้ pH เท่ากับ 10 เป็นมอร์แดนส์เมื่อนำไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมผ้าเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพูเข้ม เมื่อนำไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมผ้าเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง และผ้าที่ใช้ pH เท่ากับ 12 เป็นมอร์แดนส์เมื่อนำไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมผ้าเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพูอ่อน และหลังนำไปซัก 3 ครั้ง พบว่า ผ้าที่ใช้ pH เท่ากับ 10 เป็นมอร์แดนส์สีฟ้ามีการซีดลงจากสีชมพูเข้มเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน ผ้าที่ใช้ pH เท่ากับ 12 เป็นมอร์แดนส์จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูอ่อนและมีการซีดลงเมื่อซักรอบที่ 2 และที่ 3 และผ้าที่ใช้ pH เท่ากับ 14 เป็นมอร์แดนส์จะเปลี่ยนจากสีชมพูอ่อนเป็นสีที่ซีดลง ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ลักษณะผ้าสีย้อมที่ใช้ pre-mordant ที่ pH ต่างๆ ล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ผ้าสีย้อมที่ใช้ pre-mordant ที่ pH = 10, pH = 12, pH = 14 (ก) ผ้าสีย้อมที่ใช้ pre-mordant ที่ pH = 10, pH = 12, pH = 14 ล้างด้วยน้ำประปารั้งที่ 1 (ข) ผ้าสีย้อมที่ใช้ pre-mordant ที่ pH = 10, pH = 12, pH = 14 ล้างด้วยน้ำประปารั้งที่ 2 (ค) และผ้าสีย้อมที่ใช้ pre-mordant ที่ pH = 10, pH = 12, pH = 14 ล้างด้วยน้ำประปารั้งที่ 3 (ง)

อภิปราย

Streptomyces เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptomycetaceae สกุล *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีจำนวนมากที่สุดและมีความสำคัญมากที่สุดในการแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycete เชื้อกลุ่มนี้มีรายงานอย่างมากมาย เพราะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่สำคัญมากมาย เช่น streptomycin, tetracycline เป็นต้น สามารถแยกได้จากหลายถิ่นฐาน และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมาได้ที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และแหล่งที่แยกออกมาได้

สัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบและการยืนยันเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญคล้ายเชื้อรา ใช้ระยะเวลา 5-7 วันในการบ่มเลี้ยงเชื้อ โดยให้ลักษณะโคโลนีแห้งรวมตัวกันแน่น ต่อมาจะพัฒนาเป็นเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์ที่ปลายของเส้นใย จนปรากฏบนอาหารแข็งลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายสายแป้ง (Powdery) หรือกำมะหยี่ (Velvet) และมีลักษณะฝัງวัน เกาแน่น โคโลนีมีหลายลักษณะ ได้แก่ แผ่กระจาย (Discrete) คล้ายไลเคน (Lichenoid) คล้ายแผ่นหนัง (Leathery) และคล้ายเนย (Butyrous) สปอร์มีสีฟ้า เทา เขียว แดง ม่วง ขาว และเหลือง เส้นใยอาหารมีสีฟ้า เขียว เข้ม แดง และม่วง ทำให้เห็นสีของเส้นใยแตกต่างกัน *Streptomyces* sp. จึงสามารถผลิตรงควัตถุหลายชนิด โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้เชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 โคโลนีลักษณะ ฝัງวัน มีสีน้ำตาลส้ม และมีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเส้นใยแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน คล้ายเชื้อรา (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Streptomyces* 13)

ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยเลือกใช้ขวด baffled flask (ขวดที่มีลักษณะก้นเว้า) แทนขวด duran เนื่องจากขวด baffled flask มีรอยหยักบริเวณก้นขวด ร่วมกับเม็ดลูกปัดแก้ว (glass bead) จำนวน 1 เม็ด ต่อ 1 มิลลิลิตร เพื่อช่วยลดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อและเพื่อลดระยะเวลาในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ เนื่องจากการกระทบกันของเม็ดลูกปัดแก้วทำให้เพิ่มปริมาณออกซิเจนและมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้ดียิ่งขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งเชื้อชนิดนี้ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Obligate aerobes) 14) แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้สามารถลดระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อลงได้จาก 12 วัน เหลือเพียง 5-7 วัน ในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ *Streptomyces* และการสร้างสปอร์นั้นต้องเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนค่อนข้างสูงอาหารที่นิยมใช้จึงได้แก่ Glucose-yeast extract-malt extract, Oat meal, Inorganic salt-starch และ Glycerol-asparagine agar เป็นต้น 15) งานวิจัยครั้งนี้ใช้อาหาร Yeast extract-malt extract medium ความเข้มข้นครึ่งสูตร (YM/2) ซึ่งอ้างอิงอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) เนื่องจากเป็นอาหารที่สามารถกระตุ้นให้เชื้อผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ดี เนื่องจากมีสารอาหารที่สมบูรณ์ 16)

ปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยองค์ประกอบของสารเคมี

เชื้อสเตรปโตไมซีสามารถผลิตสารปฏิชีวนะในช่วง idiophase หรือ stationary phase ของการเจริญโดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญ เกิดเมื่อมีปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้มีการสะสมของ biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ที่เก็บได้จากวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ซึ่งในวันที่ 3 จะเป็นการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อครั้งที่ 1 จนครบ 5 วันไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อได้ทั้ง *S. aureus* และ MRSA ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยจำนวนวันที่ให้ผลดีที่สุด และให้ฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุดคือวันที่ 3 17)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ทดสอบผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA เบื้องต้นด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ เปปโตนที่มีปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเปปโตนที่มีปริมาณความเข้มข้น 0.6 กรัมผลิตสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะด้านการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด เนื่องจากปริมาณเปปโตนที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญและสร้างเส้นใยของเชื้อ จึงสามารถสร้างรงควัตถุและสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะได้ 18)

การประยุกต์ใช้รงควัตถุน้ำตาลส้มจากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในการย้อมผ้า

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. KB3 (TISTR 2305) ในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ในปริมาณความเข้มข้นของเปปโตน 0.6 กรัม มาเลี้ยงในปลายข้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เชื้อมีการเจริญและสร้างรงควัตถุน้ำตาลส้มบนผิวหน้าปลายข้าว เนื่องจากเชื้อมีการใช้ออกซิเจนในการเจริญ (obligate aerobe) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Yong-Gu et al., 2006) แล้วนำปลายข้าวดังกล่าวมาเตรียมเป็นผงสี 12) จากนั้นนำไปย้อมผ้าขาวบางเพื่อทดสอบเฉดสีและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อได้ขึ้น ให้ผลการวิจัยดังนี้

การทดสอบเฉดสี

นำผ้าที่ใช้ซี๊เจ้าเป็นมอดแนสความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ pH แตกต่างกัน 3 ค่า โดยใช้ pH เท่ากับ 10 เนื่องจากค่าความเป็นกรดต่างของสีย้อมมีผลต่อพื้นผ้าและการย้อมเกาะ โดยส่วนใหญ่สีย้อมจะมีความเป็นด่างเพราะจะไม่ทำลายเส้นใยและพื้นผ้าในขณะย้อม 14) ซึ่งจากงานวิจัยของ (ภัทรานิษฐ์ พิมพ์ประพร, 2558) เส้นใยและสีเกือบทุกชนิดมีกลุ่ม OH อยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเซลลูโลสและเส้นใยโปรตีนทำให้ดูดซึมสีได้มาก การลดค่า pH เป็นการเพิ่มกลุ่ม OH ของสีย้อม ทำให้สามารถดูดซึมสีได้ดียิ่งขึ้น 19) สามารถเปลี่ยนเฉดสีชมพูเป็นเฉดสีชมพูที่เข้มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (ทิวา เขียนวงษ์ และ นฤมล เกื้อนกุล, 2551) ใช้สีย้อม *Streptomyces* sp. S6.2 ในการย้อมเส้นใยไหม เส้นใยขนแกะและเส้นใยฝ้ายโดยใช้ซี๊เจ้าเป็นมอดแนสก่อนการย้อมสีทำให้สามารถเปลี่ยนจากเฉดสีชมพูเป็นเฉดสีม่วงและเส้นใยเข้มขึ้นได้ 12) และจากงานวิจัยของ (Ozan et al., 2013) ใช้ซี๊เจ้าเป็นสารช่วยติดสีสามารถทำให้ผ้าฝ้าย ผ้าลินิน ขนแกะ ไยสังเคราะห์และเส้นใยอะคริลิกติดสีได้ดีขึ้น 20) แสดงให้เห็นว่ามอดแนสสามารถนำสีมาใช้ประโยชน์ทางด้านสีย้อมได้

ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยา

ผ้าที่ผ่านกระบวนการย้อมที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาด้วยวิธีการทดสอบ diffusion method เนื่องจากในกระบวนการผลิตสีย้อมในขั้นตอนการอบแห้งต้องใช้อุณหภูมิสูงซึ่งมากกว่า 100 องศาเซลเซียส 12) แต่ฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยาจะลดลงที่อุณหภูมิมากกว่า 73 องศาเซลเซียส 17) จึงลดอุณหภูมิการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่เพิ่มระยะเวลาเป็น 3 วัน ปรากฏว่าผ้าที่ผ่านกระบวนการย้อมในสภาวะดังกล่าวไม่ปรากฏวงใสการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อทดสอบ 21) นอกจากนี้ชนิดและขนาดของผ้ามีผลต่อการดูดซับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Chequer et al., 2013) ผ้าฝ้ายมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่ทำจากพืชธรรมชาติ และโปรตีนกลุ่มไฮดรอกซิล โดยคุณสมบัติในเซลลูโลสมีความสามารถดูดซับน้ำได้สูงมีประโยชน์ในการตรึงสารประกอบที่ละลายในน้ำ 22) ทดสอบโดยนำสารแขวนลอยของเชื้อที่ยังมีฤทธิ์ต้านอยู่มาย้อมผ้าขนาด 3x5 เซนติเมตร วางทาบบนรอยขีดเชื้อดื้อยาบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA พบว่าผ้าไม่เกิดวงใสการยับยั้งเชื้อดื้อยา แต่ทั้งนี้ได้พยายามทำให้ผ้าดังกล่าวมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อดื้อยาโดยการเติม 2,4-Di-tert-butylphenol ลงไปในน้ำสีย้อม ซึ่งจากงานวิจัยของ Kittisak (Chawawisi et al., 2015) พบว่าสารชนิดนี้ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. KB1 มีฤทธิ์ในการทำลายผนังเซลล์เชื้อดื้อยาในกลุ่ม MRSA และ MSSA ได้ (23) ผลปรากฏว่าให้ฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยา โดยสังเกตลักษณะการเจริญของรอยขีดเชื้อดื้อยารอบผ้าสีย้อมมีการเจริญลดลง นอกจากนี้ได้เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาลงไปสัดส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อให้เกิดฤทธิ์ต้านดังกล่าว พบว่าผ้ามีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาเช่นกัน (ภาพที่ 8)

สรุปผล

Streptomyces sp. KB3 (TISTR 2305) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีผิวหน้าหยาบด้าน มีร่อง (grain) ฝ่งวุ้น มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลส้ม (brownish-orange) เมื่อเจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง Yeast-extract Malt-extract agar ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โคโลนีจะปรากฏให้เห็นตั้งแต่ระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 โดยลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แตกกิ่งก้านคล้ายสาหร่าย สามารถระบุชนิดเชื้อได้เป็น *Streptomyces chromogenus* แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 2 เชื้อ (*S. aureus* TISTR 517 และ MRSA 3 ไอโซเลท) ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM/2 แต่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของการสร้างรงควัตถุและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของเปปโตเนที่แตกต่างกัน โดยในสูตรอาหารที่มี 0.5 กรัมเปปโตเน สร้างรงควัตถุสีส้มและมีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาได้น้อย สำหรับปริมาณเปปโตเนที่ให้ฤทธิ์การต้านและให้รงควัตถุที่ดีที่สุดคือ 0.6 กรัมเปปโตเน แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเปปโตเนที่ 0.7 และ 0.8 กรัม พบว่ามีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นเปปโตเนมากขึ้นจะให้สีและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) จึงได้ประยุกต์ใช้รงควัตถุสีน้ำตาลส้มจากเชื้อ *S. chromogenus* มาใช้เป็นการเตรียมเป็นผงสีย้อมในการย้อมผ้าดิบ และมีการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อดื้อยา ผ้าดิบที่ได้ถูกนำไปย้อมด้วยน้ำสีย้อมจากเชื้อ *S. chromogenus* แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นได้เพิ่มประสิทธิภาพการต้านด้วยการนำไปผสมกับ 2,4-Di-tert-butylphenol และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังมีฤทธิ์ต้านปฏิชีวนะ จึงสามารถเห็นฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปในความคงตัวของฤทธิ์ต้านดังกล่าว อย่างไรก็ตามความคงตัวของสีย้อมยังเห็นชัดเจนแม้จะนำไปล้างออกด้วยน้ำ เมื่อใช้ซี๊เจ้าความเข้มข้น 2 ที่ pH เท่ากับ 10 เป็นมอดแนส ให้ชิ้นผ้าเป็นสีชมพูแดงเทียบกับผ้าที่ไม่ใช้น้ำซี๊เจ้าในกระบวนการย้อม ดังนั้นในการทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปจึงน่าจะพัฒนาให้รงควัตถุจากเชื้อ *S. chromogenus* มีฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยาควบคู่ไปกับการติดแน่นบนพื้นผ้า เพื่อเป็นประโยชน์ของการประยุกต์ใช้สารสีจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี ช่วยลดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เลิศคณาวณิชกุล และคณะ

บรรณานุกรม

- กัญญรัตน์ กัญญาคำ. (2557). มหัศจรรย์สารสีจากจุลินทรีย์. *วารสารวิชาการฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์สถาบันคั่นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร*, 44(1), 26-29.
- กัจจันท์ มะลิซ้อน. (2538). การคัดแยกและระบุหาแอคติโนมัยซีทอาศัยในดิน อุทยานแห่งชาติภูแล้งนา นครพนม. *วารสารนเรศวรพะเยา*, 8(1), 21-24.
- จันทร์จรัส วัฒนโชติ, นิชา สิรินนท์ธนา, รวีวรรณ วัฒนติลกา และ ภูมิภัทร รักดี. (2560). สภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน. *แก่นเกษตร*, 45(1), 866-871.
- จารุวรรณ ฉัตรทอง. (2554). *การสกัดสีจาก Neurospora sp. Colorant Extraction from Neurospora sp.* (รายงานวิจัยสมบูรณ์). หุ่นอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- เจนวิทย์ ศรีคงแก้ว, และ ชุตินา หงส์คำภา. (2558). ฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยซีท ในการต้านเชื้อสแตปไฟโลคอคคัสเชื้อเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลิน (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์). นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.
- ทิวา เขียนวงษ์, และ นฤมล เกื้อนกุล. (27, ตุลาคม, 2557). การใช้สีย้อม *Streptomyces* sp. P2 ในการย้อมเส้นใยไหม เส้นใยขนแกะและเส้นใยฝ้าย. *การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร*, มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- บุรฮานะห์ ใบยี่, ชนินันท์ พรสุริยา, และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. (2562). ฤทธิ์ต้านเชื้อราของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 ต่อเชื้อราสาเหตุ โรคใบจุดของผักสลัด. *แก่นเกษตร*, 47(1), 1608-1611.
- ปวีณา สังข์แก้ว. (2556). *สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ Streptomyces griseus subsp. Fomicus สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา). สงขลา: บัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, และ นิธิยา รัตนานพนธ์. (ม.ป.ป.). *Generation time*. กรุงเทพฯ. <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time>
- ภัทรานิฏฐน พิมพ์ประพร. (2558). *การศึกษาอิทธิพลของสารช่วยติดสีต่อคุณสมบัติของสีย้อมธรรมชาติสกัดจากใบหมื่นบนเส้นใยไหมย้อมด้วยกระบวนการการย้อมแบบดูดซึม* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสิ่งทอ). นครราชสีมา: บัณฑิตมหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.
- มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, กาญจนา พลเดช, และ จุฑาพรณ์ ขวัญเทพ. (17-18, ธันวาคม, 2558). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อสเตรปโตมัยซีท. *การประชุมวิชาการระดับชาติ*, มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.
- รัตนารักษ์ ศรีวิบูลย์. (2013). *แอคติโนมัยซีท*. สำนักคอมพิวเตอร์: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. (ม.ป.ป.). *Streptomyces spp. แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติ*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัยไอซาก้า. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ศรินทร์ ทองธรรมชาติ, ชื่นจิตร ศรีชูวงศ์, วัชร วารินทร์, และ พัทธภรณ์ พิมพ์จันทร์. (2554). การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในสีย้อมกกสังเคราะห์และการผลิตสีย้อมจากธรรมชาติ. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*, 5(2), 193-203.
- ศรีสกุล ชนะพันธ์. (2553). *การแยกและคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- อรลดา เจือจันทร์. (ม.ป.ป.). *การสำรวจหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารสีจากดินในเขตอำเภอเมือง*. จังหวัดสุรินทร์.
- อิสระวัฒน์ ฤทธนพศธร, และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2562). การแยกสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสับดำดิบ. *วารสารวิชาการ Veridian E-Journal*, 6(3), 888-902.
- Chequer, F. M. D., Rodrigues, O. G. A., Anastácio, F. E. R., Cardoso, J. C., Boldrin, Z. M. V., Oliveira, D. P., Ferraz, E. R. A., Cardoso, J. C., Zanoni, M. V.B., & De Oliveira, D. P. (2013). *Textile dyes: Dyeing process and environmental impact*. In Günay, M. (Ed.). *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. London, England: IntechOpen.

- Das, A., Bhattacharya, S., Mohammed, H. Y., & Rajan, S. S. (2014). In vitro antimicrobial activity and characterization of mangrove isolates of streptomycetes effective against bacteria and fungi of nosocomial origin. *Brazilian Archive Biology and Technology*, 3(57), 349-356.
- Herlina., Asnani, A., & Diastuti, H. (2017). The application of red pigments from streptomyces K-4B and dayak onions (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) in colouring glycerine soap. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 172, 012023.
- Ozan, A., Ceilk, A., Gedik, G., Yavas, A. (2013). Natural dye extraction from waste barks of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) timber and eco-friendly natural dyeing of various textile fibers. *Fiber and Polymer*, 14(5), 866-873.
- Pook-In, G., Seansupa, K., & Upakut, S. (2019). Inhibition of staphylococcus aureus by cotton fabrics treated with the crude finish produced *Streptomyces* sp. Stain AC4. *Journal of Food Health Bioenergy*, 12(1), 44-53
- Ryu, Y. G., Butler, M. J., Chater, K. F., & Lee, K. J. (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7132-7139.