*บทความวิจัย*

# การแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรียจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชรที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา

**สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง**


## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรีย จากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร โดยการเก็บตัวอย่างในฤดูหนาวและฤดูฝน เมื่อตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแอคติโนแบคทีเรีย เมื่อใช้อาหาร Starch Casein Agar ได้ 92 ไอโซเลต สัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องสเตอริโอ มีความหลากหลายทั้งด้านขนาด สีเส้นใยและสีสปอร์ ความสามารถในการผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรกลูโคสที่เติมโบรโมไทมัลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก หลั่งสารที่ลดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 2 หลั่งสารที่เพิ่มค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนที่อินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 3 หลั่งสารที่ลดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากเขียวเป็นเหลือง และกลุ่มที่ 4 หลั่งสารที่เพิ่มค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากเขียวเป็นน้ำเงิน ร้อยละ 9.78, 8.69, 19.56 และ 61.96 ตามลำดับ การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ของเชื้อทั้ง 92 ไอโซเลต พบว่า Polymixin-B สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ร้อยละ 100 ในขณะที่ Rifampicin, Erythromycin และ Ampicillin ยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงร้อยละ 33.7, 14.1 และ 39.1 ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อตัวแทนจำนวน 13 ไอโซเลต เพื่อจำแนกสายพันธุ์ พบว่าจำแนกได้เป็น *Streptomyces, Norcardiopsis* และ *Saccharopolyspora* จำนวน 11, 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ


**คำสำคัญ:** แอคติโนแบคทีเรีย การเสื่อมสภาพทางชีววิทยา ความหลากหลายทางชีวภาพ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: sujidkanlaya@gmail.com

# Isolation and Study in Some Characters of Actinobacteria from Archaeological Site in Kamphaeng Phet Historical Park Attributed to Biodeteriolation

**Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng**

## ABSTRACT

The aim of this experiment is to isolate and study some characters of actinobacteria isolated from archeological site in Kamphaeng Phet Historical Park. Samples were collected in winter and rainy season. The results of total bacteria count showed that total bacteria samples collected in rainy season were higher than those collected in winter. A total of 92 isolates was obtained when Starch Casein Agar was used for isolation. Morphological study under stereo microscope found a diversity of sizes, colony colors and spore colors. The ability in producing and secreting substances when culturing in glucose medium with bromothymol blue as indicator can divide 92 isolates into 4 groups: group one secreting substances with a decrease of pH but no change in indicator's colors; group two secreting substances with an increase in pH but no change in indicator's colors; group three secreting substances with a decrease in pH and change in an indicator's color to yellow; and group four secreting substances with an increase in pH and a change in indicator's color to blue as 9.78, 8.69, 19.56 and 61.96%, respectively. The ability to resist 10 types of antibiotics revealed that Polymixin-B showed 100% inhibition while Rifampicin, Erythromycin and Ampicillin showed 33.7%, 14.1% and 39.1% inhibition, respectively. The randomly selected 13 isolates for identification showed that 11, 1 and 1 isolates were closely related to genus *Streptomyces, Norcardiopsis* and *Saccharopolyspora,* respectively.

**Keywords:** Actinobacteria, Biodeterioration, Biodiversity

Department of Science, Faculty of Science and technology, Rajabhat Pranakhon Si Ayutthaya University
*Corresponding author, email: sujidkanlaya@gmail.com

## บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีชื่อเสียงเป็นลำดับต้นๆ ของโลกด้านการมีสถานที่ท่องเที่ยวเชิงวัฒนธรรมที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุทยานประวัติศาสตร์ที่ตั้งในประเทศหลายแห่งจนได้รับการประกาศจากองค์การยูเนสโกให้เป็นมรดกโลก ทั้งนี้รวมทั้งอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร ซึ่งในปัจจุบันพบว่าสิ่งก่อสร้างต่างๆ ที่ตั้งอยู่ในบริเวณอุทยานได้เกิดการเสื่อมสภาพลงไปมาก ซึ่งเป็นการเสื่อมสภาพที่สามารถมองเห็นได้ ทั้งการเสื่อมสภาพทางกายภาพ และการเสื่อมสภาพทางความงาม [1-2] สาเหตุที่ทำให้สิ่งก่อสร้างต่างๆ รวมทั้งโบราณสถานเกิดการเสื่อมสภาพมีหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น เกิดจากสิ่งแวดล้อม การเกิดจุดอ่อนในตัวเอง รวมทั้งที่เกิดจากการกระทำของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทั้งขนาดเล็ก เช่น จุลินทรีย์ สาหร่ายขนาดเล็ก มอส เฟิร์น ฯลฯ หรือสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ เช่น พืช สัตว์ และมนุษย์ ทั้งนี้การเสื่อมสภาพที่มีสาเหตุมาจากสิ่งที่มีชีวิต จะเรียกว่าการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา (biodeterioration) [3] และเรียกสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพว่า ไบโอดีเทอริโอเจน (biodeteriogent) [4]

จุลินทรีย์ที่เป็น ไบโอดีเทอริโอเจน พบว่ามีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่ายขนาดเล็ก รวมทั้งไลเคน [5-7] ซึ่งไบโอดีเทอริโอเจนเหล่านี้ทำให้โบราณสถานเกิดการเสื่อมสภาพโดยผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการ assimilation เกิดโดยจุลินทรีย์ที่เจริญบนโบราณสถานจะใช้สารที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุก่อสร้างเป็นแหล่งอาหารโดยตรง ซึ่งจะส่งผลให้ความแข็งแรงของโบราณสถานลดลง การยึดเกาะกันของวัสดุก่อสร้างลดลง ส่งผลให้เกิดการพังทลายลงได้ในท้ายที่สุด เช่น กรณีที่มีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) ได้ [5] หากมีจุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญอยู่บนโบราณสถานที่สร้างด้วยไม้หรือวัสดุที่สร้างด้วยไม้อยู่ ไม้จะถูกย่อยสลายทำให้เกิดการเสื่อมสภาพหรือพังทลายลงได้ อีกกระบวนการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของโบราณสถาน คือ กระบวนการ dissimilation คือ การที่จุลินทรีย์อยู่บนวัสดุก่อสร้างแล้วมีผลกระทบต่อวัสดุก่อสร้างในด้านต่างๆ ที่สืบเนื่องมาจากการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น เช่น การที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ ที่เป็นอันตรายและส่งผลในการทำลายวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง โดยสารเมแทบอไลต์เหล่านั้นจุลินทรีย์บางชนิดจะปล่อยออกมานอกเซลล์ หรือบางชนิดจะเก็บไว้ในเซลล์ ในกรณีที่จุลินทรีย์ผลิตสารแล้วเก็บในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์ตายลงเซลล์จะแตกแล้วเกิดการปลดปล่อยสารเหล่านั้นออกมานอกเซลล์ ซึ่งสารเหล่านั้นอาจส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของโบราณสถานได้ เช่น แบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ ชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นกรดซิตริก กรดทาทาริค กรดคาร์บอนิค หรือกรดอินทรีย์อื่นๆ กรดเหล่านี้จะกัดกร่อนและทำให้วัสดุก่อสร้างเกิดการเปื่อยยุ่ยได้ หรือจุลินทรีย์บางชนิดเมื่อมีการเจริญจะผลิตสารที่มีสีออกมา (pigment) และหลั่งสารสีออกนอกเซลล์ [6-8] สารสีเหล่านั้นหากละลายน้ำได้ง่ายเมื่อฝนตกจะทำให้เกิดการชะล้างสารสีเหล่านี้ไหลไปทั่วผิวหน้าของโบราณสถาน ทำให้สีด้านนอกของโบราณสถานเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หรือจุลินทรีย์บางชนิดเมื่อเจริญบนโบราณสถานแล้วจะสร้างสารที่สามารถทำปฏิกิริยาเคมีบางอย่างกับวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างทำให้เกิดอันตรายกับวัสดุก่อสร้าง เช่น ในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มไฮโดรเจนซัลไฟด์ [9] จะรีดิวส์สารประกอบกำมะถันให้เป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งแก๊สนี้สามารถจับกับโลหะหนัก เช่น เหล็ก ซึ่งผสมอยู่เป็นปริมาณมากในอิฐและศิลาแลง กลายเป็นตะกอนสีดำสะสมอยู่บนวัสดุก่อสร้าง ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพทางกายภาพของโบราณสถาน เป็นต้น

มีการศึกษาด้านความหลากหลายและบทบาทของจุลินทรีย์ที่ส่งผลกระทบต่อการเสื่อมสภาพของโบราณสถานและสิ่งก่อสร้างที่เป็นมรดกทางวัฒนธรรม ตามสถานที่สำคัญต่างๆ ของโลก เช่น ในปี 2012 Filomena และคณะ [10] ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่ม chemoorganotrophic ด้วยการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วจำแนกชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA การแยกเชื้อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด คือ BRII และ Starch Casein $KNO_3$ ตัวอย่างที่ศึกษาเก็บรวบรวมจากสถานที่สำคัญ 3 แห่ง คือ ถ้ำค้างคาว ใน Zuheros ซึ่งตั้งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศสเปน สุสาน St. Callistus ตั้งอยู่ในกรุงโรม ประเทศอิตาลี และสุสาน St. Agatha's ตั้งอยู่ในสาธารณรัฐ Malta พบว่า ตัวอย่างจากสุสาน St. Callistus พบเชื้อในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล Streptomycetes ตัวอย่างจากถ้ำค้างคาวพบเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Firmicutes จำแนกระดับสกุลได้เป็น *Bacillus* และ *Paenibacillus* ในขณะที่ตัวอย่างจากสุสาน St. Agatha's ไม่พบเชื้อในกลุ่ม Proteobacteria แต่พบว่าเชื้อที่แยกได้อยู่ในสกุล *Bacillus, Streptomyces* spp. และ *Pseudonocardia* [11]

ปี 2008 Abdulla และคณะ [12] ได้แยกและจำแนกเชื้อ actinomycetes จากตัวอย่างหินปูนโบราณจากสุสานเทลล์บาสตาร์ ซึ่งตั้งอยู่ในเมืองซาร์การ์ซี ประเทศอียิปต์ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อทั้งหมดของตัวอย่างที่เก็บฤดูหนาวกับฤดูร้อน พบว่าจำนวนเชื้อทั้งหมดในฤดูหนาว (อุณหภูมิระหว่าง 18-20 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีจำนวนระหว่าง $10^3$ ถึง $10^4$ CFU/g สูงกว่าจำนวนเชื้อทั้งหมดในฤดูร้อน (อุณหภูมิระหว่าง 28-38 องศาเซลเซียส) เมื่อจำแนกเชื้อ Actinomycetes พบว่า สามารถจัดได้ 4 กลุ่ม คือ *Streptomycetes, Nocardia, Micromonospora* และ sporangiate คิดเป็นร้อยละ 54, 26, 14 และ 6 ตามลำดับ การศึกษาผลของเชื้อต่อการเสื่อมสภาพ ด้านความสามารถในการผลิตสารสีและหลั่งสารสีออกนอกเซลล์ พบว่าเชื้อร้อยละ 88 ผลิตสารสีได้ โดยสีที่ผลิตส่วนมากมีสีน้ำตาล ด้านการทำอันตรายต่อวัสดุก่อสร้าง ในงานวิจัยนี้ได้จำลองโดยการนำชิ้นส่วนหินปูนมาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อทดสอบ 127 ไอโซเลต และวัดน้ำหนักของหินปูนที่หายไปรวมทั้งวัดค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามี Actinomycetes เพียงร้อยละ 16 ที่ทำให้น้ำหนักของหินปูนที่ใช้ทดสอบลดลง โดย Actinomycetes สายพันธุ์ที่ทำให้น้ำหนักของหินปูนลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่สายพันธุ์ *Nocardia brasiliensis, Micromonospora carbonacea* และ *Pseudonocardia compacta* อย่างไรก็ตามสายพันธุ์อื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบถึงแม้ว่าจะไม่ส่งผลต่อน้ำหนักของหินปูนแต่พบว่าค่าความเป็นกรด ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

ในปี 2010 Kim และคณะ [13] ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอากาศในพระราชวังโบราณที่สร้างด้วยไม้ในประเทศเกาหลี 3 แห่ง คือวังจูฮัมนู (JHN) และวังยองวาดัง (YHD) ซึ่งตั้งอยู่ในพระราชวังชางด๊อกคง ในกรุงโซล และ วังอันยอง-ฮังยาโย (UH) ตั้งอยู่ในเมืองนามวอน ทั้งนี้วังยองวาดัง (YWD) จะเปิดประตูทุกบานไว้ตลอดทั้งปี ในขณะที่วังจูฮัมนู (JHN) และวังอันยอง-ฮังยาโย (UH) จะปิดประตูไว้ตลอดปี ผลจากการเก็บตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ของสถานที่ด้านการใช้งานแบบเปิดและปิด ในฤดูกาลที่แตกต่างกัน 2 ครั้ง คือฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน พบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิจาก YHD แยกเชื้อราได้ 671 ไอโซเลต (จำแนกได้เป็น 20 สกุล 25 สปีชีส์) ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บจาก JHN แยกเชื้อราได้ 125 ไอโซเลต (จำแนกได้เป็น 19 สกุล 25 สปีชีส์) ส่วนตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน พบว่า YHD แยกเชื้อราได้ 175 ไอโซเลต (จำแนกได้เป็น 11 สกุล 12 สปีชีส์) ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บจาก JHN แยกเชื้อราได้ 66 ไอโซเลต (จำแนกได้เป็น 12 สกุล 13 สปีชีส์) ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่เก็บ

จากวังอันยอง-ฮังยาโย (UH) 2 ครั้ง คือในฤดูใบไม้ผลิและในฤดูร้อนแยกเชื้อได้ 180 ไอโซเลต (จำแนกเบื้องต้นได้ 13 สกุล 15 สปีชีส์) และตัวอย่างฤดูร้อนแยกได้ 58 ไอโซเลต (จำแนกเบื้องต้นได้ 14 สกุล 17 สปีชีส์) ตามลำดับ จากผลข้างต้นพบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของเชื้อรา ขึ้นกับปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเป็นหลัก ทั้งลักษณะทางภูมิศาสตร์ของสถานที่ตั้ง สภาพทางภูมิอากาศและการใช้งานของสถานที่ซึ่งแต่ละแห่งมีลักษณะที่เฉพาะ

ในปี 2011 Wang และคณะ [14] ศึกษากลุ่มของประชากรแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวอิฐเก่าที่ใช้สร้างกำแพงเมืองหนานจิงหมิง (Nanjing Ming) งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค DGGE ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนและความหลากหลายของประชากรของแบคทีเรียจากตัวอย่างอิฐที่เสื่อมสภาพมากเปรียบเทียบกับอิฐที่เสื่อมสภาพน้อย พบว่า ตัวอย่างจากอิฐที่เสื่อมสภาพมากมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่าตัวอย่างจากอิฐที่เสื่อมสภาพน้อย และเมื่อจำแนกชนิดพบว่าเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Actinobacteria, TM7, Proteobacteria และ Bacteroidetes เป็นหลัก

ในประเทศไทยมีการศึกษาด้านความหลากหลายและผลกระทบของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากโบราณสถานที่สำคัญ เช่น การศึกษาความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถาน ในอุทยานประวัติศาสตร์อยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา [15] และโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย จังหวัดสุโขทัย [11] พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล Streptomyces จากการตรวจสอบสมบัติด้านการผลิตสารออกนอกเซลล์ของเชื้อในอาหารเหลวสูตรกลูโคส พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารที่สามารถเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเหลวได้ โดยพบทั้งเชื้อที่ทำให้ค่า pH ของอาหารเพิ่มขึ้นและลดลง

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานหรือสถานที่ที่มีความสำคัญทางวัฒนธรรมของประเทศต่างๆ ที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นสภาพแวดล้อมนับว่าเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อทั้งชนิดและปริมาณของเชื้อสาเหตุที่ทำให้โบราณสถานเหล่านั้นเกิดการเสื่อมสภาพ [13] สืบเนื่องจากในปัจจุบันเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันด้านสภาพแวดล้อมต่างๆ จากภัยพิบัติทางธรรมชาติ รวมทั้งในประเทศไทย เช่น เมื่อปี พ.ศ. 2554 ได้เกิดเหตุการณ์อุทกภัยครั้งใหญ่ขึ้น ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวย่อมส่งผลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา ซึ่งมีลักษณะที่เฉพาะ และถึงแม้ว่าในประเทศไทยจะเคยมีรายงานวิจัยบ้างที่เกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์จากโบราณสถาน แต่ได้ศึกษาไว้แล้วเป็นเวลานานรวมทั้งยังไม่ครอบคลุมโบราณสถานหรือสถานที่ที่เป็นมรดกทางวัฒนธรรมที่สำคัญของประเทศทุกแห่ง

แอคติโนแบคทีเรียนับว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียสำคัญชนิดหนึ่งที่ส่งผลด้านการทำให้เกิดการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาได้ [16] ทั้งนี้จากสมบัติทั่วไปของแอคติโนแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างเส้นใยได้ (hyphae) โดยมีลักษณะเป็นสายยาวคล้ายเส้นใยของเชื้อรา แต่เส้นใยของแอคติโนแบคทีเรียจะสั้นและสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) มีบางตัวที่สร้างเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ได้ ในจีโนมจะมีปริมาณของกัวนีนกับไซโตซีน (G+C) สูงถึง 55–78 mol% โคโลนีของของแอคติโนแบคทีเรียมีลักษณะที่เฉพาะ คือมีลักษณะทึบแสง เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งและมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่าและสามารถสังเกตได้ชัดเจน ผิวโคโลนีมีหลากหลาย ทั้งที่เรียบคล้ายหนังสัตว์หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ คล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น

สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น แอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ สามารถรอดชีวิตในสภาพอุณหภูมิสูง รวมทั้ง มีความสามารถด้านการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ จากสมบัติดังกล่าวข้างต้นของเชื้อนับว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการเสื่อมสภาพทางกายภาพและการเสื่อมสภาพทางความงาม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร รวมทั้งศึกษาสมบัติบางประการที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของเชื้อที่แยกได้ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและด้านพันธุกรรมรวมทั้งสมบัติบางประการที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประกอบในการหาแนวทางในการป้องกัน หรือกำจัดเชื้อเหล่านั้นได้อย่างตรงจุด เพื่อการอนุรักษ์และบำรุงรักษาโบราณสถานให้สามารถใช้งานได้ยาวนานขึ้น เพื่อให้โบราณสถานที่ทรงคุณค่าเหล่านั้น คงความเป็นมรดกทางวัฒนธรรมของชาติให้ชนรุ่นหลังไว้เป็นแหล่งเรียนรู้ได้ยาวนานสืบต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีทดลอง

### พื้นที่ทำการศึกษาและวิธีการเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างจากโบราณสถานที่ตั้งในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร โดยเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ครั้งแรก เดือนมกราคม พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนฤดูหนาว และครั้งที่สอง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนฤดูฝน เก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโบราณสถานโดยการ swab ด้วยชุดเก็บตัวอย่างพร้อมใช้ (ready to use swab) ที่ผลิตโดยบริษัท 3M ที่ระดับความสูงจากฐาน 100 เซนติเมตร [17] จาก 4 ด้านของโบราณสถานแต่ละแห่ง คือ ทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออกและทิศตะวันตก จากโบราณสถาน 5 แห่ง คือ ศาลพระอิศวร วัดพระธาตุ วัดพระแก้ว วัดพระนอน และวัดช้างรอบ

### การศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ตัวอย่างวัสดุก่อสร้างที่เก็บจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร 5 แห่ง จะถูกเตรียมโดยผู้เชี่ยวชาญ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV ที่บริษัท ธาราบิสสิเนส จำกัด จังหวัดปทุมธานี

### การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่าง

เจือจางตัวอย่างแบบลดลำดับส่วน ครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จากนั้นดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงใน Petri film Aerobic Count Plate (ผลิตโดยบริษัท 3M) โดยแต่ละระดับความเจือจางของตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนับโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะแผ่นฟิมล์ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ ระหว่าง 30-300 โคโลนี

**การแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย**

นำตัวอย่าง มาเจือจางแบบลดลำดับส่วน ครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) แล้วดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจาง ตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจากอาหารแข็ง Starch-Casein Agar (SCA) [18] จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนกระทั่งตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อทุกๆ วัน และเลือกเฉพาะเชื้อที่เจริญที่มีลักษณะเบื้องต้นเป็นแอคติโนแบคทีเรีย คือ โคโลนีจะจม ฝังลงในเนื้ออาหาร ไม่มันวาว ผิวหน้าโคโลนีแห้ง นำไปขีด (streak) บนอาหาร Hickey Tresner Agar (HTA) [12] บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาขีดซ้ำอีกหลายๆ ครั้ง (re-streak) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็งเอียง HTA สำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

**การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ**

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด มาขีดลาก (cross streak) บนจานอาหารแข็ง HTA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะโคโลนีด้วยการส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ พร้อมทั้งบันทึกภาพ

**การศึกษาการผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**

เตรียมอาหารเหลวสูตรกลูโคส (glucose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่ bromothymol blue ร้อยละ1.6 เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ [12] นำเชื้อที่คัดเลือกไว้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารข้างต้น นำไปบ่มในเครื่องเขย่า ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องวัด pH เมื่อเวลาครบ 5 วัน เปรียบเทียบกับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

**การศึกษารูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ**

ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ แตะเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร HTA จากนั้น นำแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 10 ชนิด ได้แก่ เจนตามัยซิน (Gentamycin, 10 μg) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin, 10 μg) เตตราซัยคริน (Tetracycline, 30 μg) โพลีมัยซิน บี (Polymyxin-B, 300 U) คานามัยซิน (Kanamycin, 30 μg) ไรแฟมพิซิน (Rifampicin, 5 μg) เบซิทราซิน (Bacitracin, 10 μg) คลอแรมฟินิคัล (Chloramphenicol, 30 μg) แอมพิซิลิน (Ampicillin, 10 μg) และอิริโทรมัยซิน (Erythromycin, 15 μg) มาวางในจานอาหาร HTA ที่เกลี่ยเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไว้แล้ว จานละ 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณใส บันทึกผลการทดลอง

**การจำแนกชนิดของเชื้อ**

ใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA โดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัทแม็คโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์สายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nit.gov/Blast.egi) เปรียบเทียบกับคลังข้อมูลของ GenBank

## ผลการทดลอง

**สภาพแวดล้อมของพื้นที่ศึกษา**

จังหวัดกำแพงเพชร ตั้งอยู่ภาคเหนือตอนล่าง ที่พิกัด 16°29′0″N 99°31′12″E มีสภาพภูมิอากาศโดยทั่วไป เป็นแบบอบอุ่นตลอดทั้งปี อุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ 27-33 องศาเซลเซียส โดยสภาพอากาศจะเปลี่ยนแปลงไปตามอิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ที่มาจากอ่าวเบงกอลและอ่าวไทย อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปี ประมาณ 27.3 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงที่สุดเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ที่ 33.4°C อุณหภูมิต่ำที่สุดเฉลี่ยนประมาณ 22.5 องศาเซลเซียส เดือนเมษายนเป็นเดือนที่มีอากาศร้อนที่สุด เดือนธันวาคมเป็นเดือนที่หนาวที่สุด ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปี 1,301.5 มิลลิเมตร ตลอดทั้งปีมีจำนวนวันที่ฝนตกประมาณ 123 วัน ช่วงเดือนที่มีฝนตกจะอยู่ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม อุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชรตั้งอยู่ในพื้นที่ของอำเภอเมือง ทางด้านทิศตะวันออกของแม่น้ำปิง พื้นที่ของบริเวณอุทยานจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือเขตภายในกำแพงเมือง กับเขตนอกกำแพง กรมศิลปากรได้กำหนดเขตที่ดินของอุทยานประวัติศาสตร์แห่งนี้ไว้ว่ามีพื้นที่ประมาณ 2,114 ไร่ ในการลงพื้นพี่เพื่อเก็บตัวอย่าง พบว่าสภาพโดยทั่วไปของบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์แห่งนี้ค่อนข้างเงียบ มีนักท่องเที่ยวเข้าชมอุทยานประปราย โบราณสถานที่ทำการเก็บตัวอย่างในการวิจัยนี้ได้จากการสุ่ม 5 แห่ง ได้แก่ ศาลพระอิศวร วัดพระธาตุ วัดพระแก้ว วัดพระนอน และวัดช้างรอบ ซึ่งวัสดุหลักที่ใช้สำหรับการก่อสร้างโบราณสถานเหล่านี้คือศิลาแลง ดังรูปที่ 1

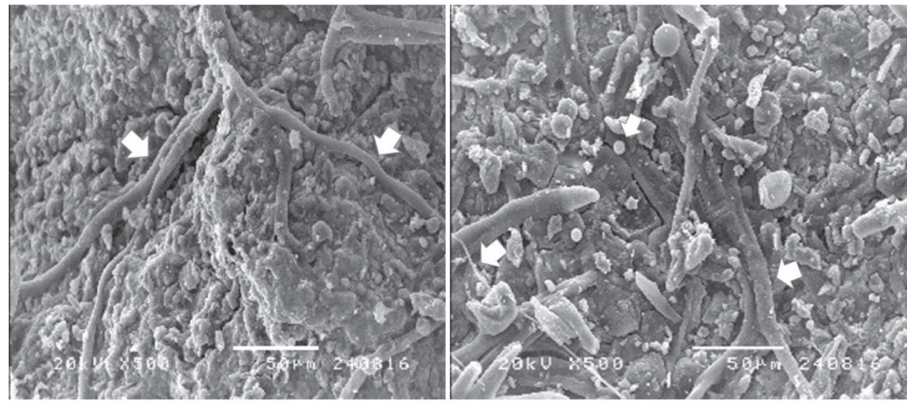
**รูปที่ 1** สถานที่เก็บตัวอย่างจากโบราณสถานตัวแทนในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร

**ลักษณะไบโอฟิมล์บนโบราณสถาน**

การเก็บตัวอย่างในงานวิจัยนี้ ทำ 2 ครั้ง คือ เดือนมกราคม 2559 เป็นตัวแทนฤดูหนาวและเดือนกรกฎาคม 2559 เป็นตัวแทนฤดูฝน จากโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ของอุทยานฯ 5 แห่ง คือ ศาลพระอิศวร วัดพระธาตุ วัดพระแก้ว วัดพระนอนและวัดช้างรอบ พบว่าพื้นผิวของโบราณสถานมีคราบสีต่างๆ ปรากฏให้เห็นได้อย่างชัดเจน มีสีต่างๆ หลากหลายสี เช่น สีดำ สีเทา สีเขียว โดยสีหลักที่พบ คือสีดำ อย่างไรก็ตามลักษณะพื้นผิวของโบราณสถาน 4 แห่ง คือ ศาลพระอิศวร วัดพระธาตุ วัดพระแก้วและวัดพระนอน ลักษณะคราบสีที่พบส่วนใหญ่จะเป็นสีดำ ในขณะที่ลักษณะคราบสีบนพื้นผิวของวัดช้างรอบจะแตกต่างจากโบราณสถานอีก 4 แห่งดังกล่าวข้างต้น คือคราบสีที่พบที่วัดช้างรอบนั้นสีหลักจะเป็นสีเทาเขียว ซึ่งเป็นลักษณะของไลเคนส์ ทั้งนี้ลักษณะปรากฏที่พบจากการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างทั้งสองครั้ง พบว่าพื้นผิวโดยทั่วไปของโบราณสถานที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่เดียวกันไม่ค่อยแตกต่างกัน

**การศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด**

ผลจากการนำชิ้นส่วนวัสดุจากโบราณสถานมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายแบบ พบเซลล์จุลินทรีย์ที่มีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็กกระจายทั่วไปบนผิวตัวอย่าง รวมทั้งพบเซลล์ที่เป็นเส้นใยขนาดใหญ่ปกคลุมทั่วไปบนผิวตัวอย่างและมีบางส่วนที่เส้นใยแทรกตัวเข้าในวัสดุได้ซึ่งเป็นลักษณะเส้นใยของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบเส้นใยขนาดเล็กซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ปรากฏบนพื้นผิวตัวอย่างด้วย ดังรูปที่ 2

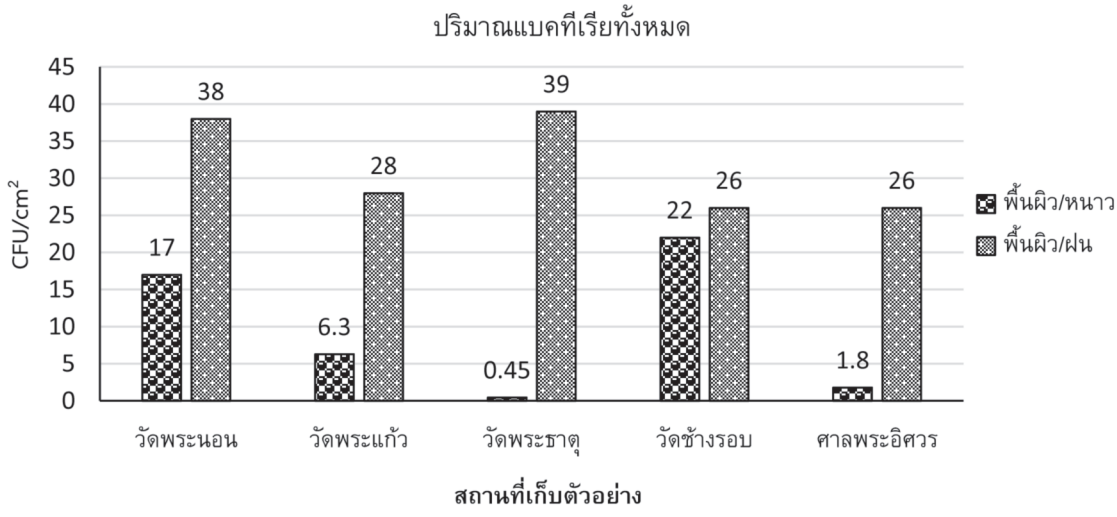



ก ข

**รูปที่ 2** ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ของตัวอย่างวัสดุที่เก็บจากโบราณสถานในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร (ก) เส้นใยราที่เจริญบนพื้นผิว (ข) เซลล์รูปร่างทรงกลมของแบคทีเรียเส้นใยขนาดเล็กของแอคติโนแบคทีเรียและเส้นใยขนาดใหญ่ของรา

**ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด**

เมื่อตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธีมาตรฐานโดยการเพาะเชื้อด้วย Petri film Aerobic Count Plate ของตัวอย่างพื้นผิวโบราณสถานที่เก็บในฤดูหนาวและฤดูฝน พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างพื้นผิวที่เก็บในฤดูหนาว มีค่า ระหว่าง $4.5\times10^{6}$ ถึง $2.2\times10^{8}$ CFU/cm$^2$ โดยพบว่าตัวอย่างพื้นผิวจากวัดมหาธาตุมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดต่ำที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างจากวัดช้างรอบมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด ส่วนปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝน มีค่าระหว่าง $2.6\times10^{8}$ ถึง $3.9\times10^{8}$ CFU/cm$^2$ โดยตัวอย่างพื้นผิวจากวัดช้างรอบและศาลพระอิศวรมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดต่ำที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างจากวัดพระธาตุมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้านฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนจะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว ดังรูปที่ 3




**รูปที่ 3** แผนภูมิจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างจากพื้นผิวโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร

## การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากโบราณสถานอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร

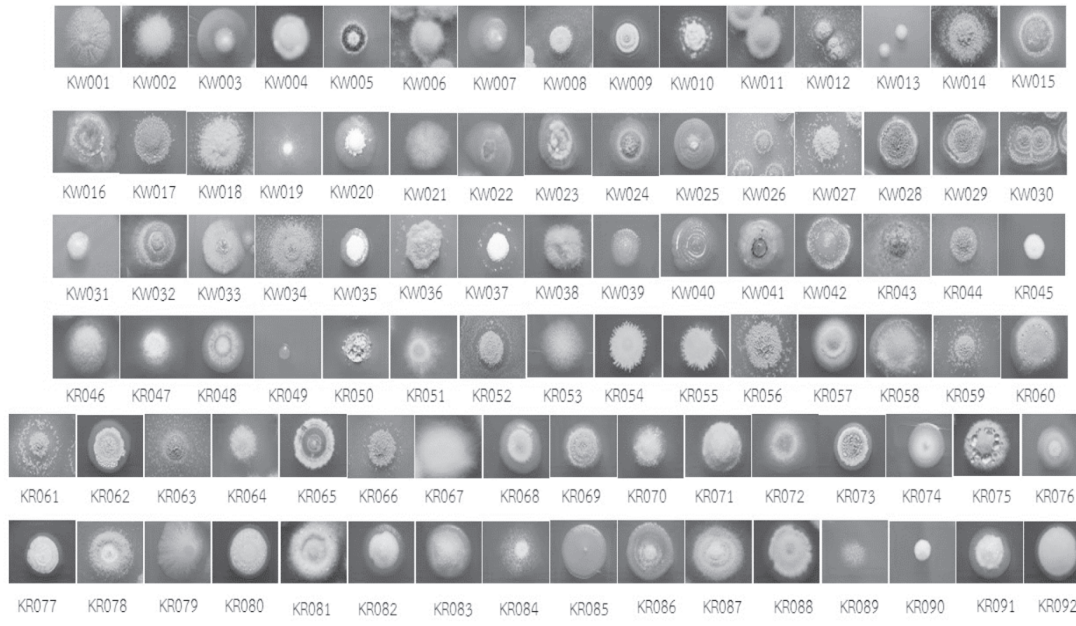
ผลจากการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร ด้วยการใช้อาหารแข็งสูตร SCA สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 92 ไอโซเลต พบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝน สามารถแยกเชื้อได้จำนวนมากกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว ทั้งนี้พบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาวจากศาล พระอิศวรแยกเชื้อได้จำนวนสูงที่สุดคือ 12 ไอโซเลต ในขณะที่ตัวอย่างจากวัดช้างรอบและวัดพระนอนแยก เชื้อได้จำนวนน้อยที่สุดจำนวนเท่ากันคือ 6 ไอโซเลต ส่วนตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนพบว่าตัวอย่างจากวัดพระแก้ว แยกเชื้อได้จำนวนสูงที่สุดคือ 14 ไอโซเลต ในขณะที่ตัวอย่างจากวัดพระธาตุแยกเชื้อได้จำนวนน้อยที่สุดคือ 3 ไอโซเลต โดยพบว่าตัวอย่างจากวัดพระแก้วสามารถแยกเชื้อได้จำนวนสูงที่สุด คือ 24 ไอโซเลต ในขณะ ที่ตัวอย่างจากวัดพระธาตุแยกเชื้อได้จำนวนน้อยที่สุดคือ 11 ไอโซเลต ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากโบราณสถาน ในเขตอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร

| สถานที่เก็บตัวอย่าง | รหัส/จำนวนเชื้อที่แยกได้ในฤดูหนาว (ไอโซเลต) | รหัส/จำนวนเชื้อที่แยกได้ในฤดูฝน (ไอโซเลต) | รวม (ไอโซเลต) |
|---|---|---|---|
| วัดพระนอน | KW001-KW006 (6) | KR043-KR051 (9) | 15 |
| วัดพระแก้ว | KW007-KW016 (10) | KR052-KR065 (14) | 24 |
| วัดพระธาตุ | KW017-KW024 (8) | KR066-KR068 (3) | 11 |
| วัดช้างรอบ | KW025-KW030 (6) | KR069-KR081 (13) | 19 |
| ศาลพระอิศวร | KW031-KW042 (12) | KR082-KR092 (11) | 23 |
| **รวม** | **42** | **50** | **92** |

**ลักษณะโคโลนีแอคติโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร**

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 92 ไอโซเลต โดย การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร HTA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมา ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ พบว่า ขนาดของโคโลนีเชื้อจะแตกต่างกันมีทั้งขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน ศูนย์กลางมากกว่า 0.5 เซนติเมตร) และเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.2 เซนติเมตร) ดังรูปที่ 4 สี ของเส้นใยและสปอร์ที่เชื้อสร้างมีหลากหลายสี เช่น สีขาว สีครีม สีเหลือง สีน้ำตาล และสีดำ โดยสีโคโลนี ที่พบมากที่สุดคือสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางไอโซเลตที่ผลิตสารสีแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์จน สามารถเปลี่ยนสีของอาหาร HTA ได้ เช่น KW026 KW027 KW018 KW020 KW033 KW034 KW035 KW036 และ KW037 หลั่งสารสีน้ำตาล เป็นต้น




**รูปที่ 4** โคโลนีเดี่ยวของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากโบราณสถานอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชรภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียเมื่อเพาะด้วยอาหารแข็ง HTA

**การผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์เมื่อเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**

ผลจากการนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 92 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกลูโคส ที่ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเป็น 6.8 และเติมบรอมไทมัลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เมื่อเพาะเชื้อครบระยะเวลาแล้ววัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อที่ทดสอบทั้ง 92 ไอโซเลต ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ผลิตสารที่ทำให้ค่า pH อาหารลดลงแต่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ มีจำนวน 9 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 9.78 กลุ่มที่ 2 ผลิตสารที่ทำให้ค่า pH อาหารสูงขึ้นแต่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ มีจำนวน 8 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 8.69 กลุ่มที่ 3 ผลิตสารที่ทำให้ค่า pH อาหารลดลงและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลือง มีจำนวน 18 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 19.56 และ กลุ่มที่ 4 ผลิตสารที่ทำให้ค่า pH อาหารสูงขึ้นและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีน้ำเงิน มีจำนวน 57 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 61.96 ซึ่งมีจำนวนไอโซเลตสูงที่สุด ดังตารางที่ 2

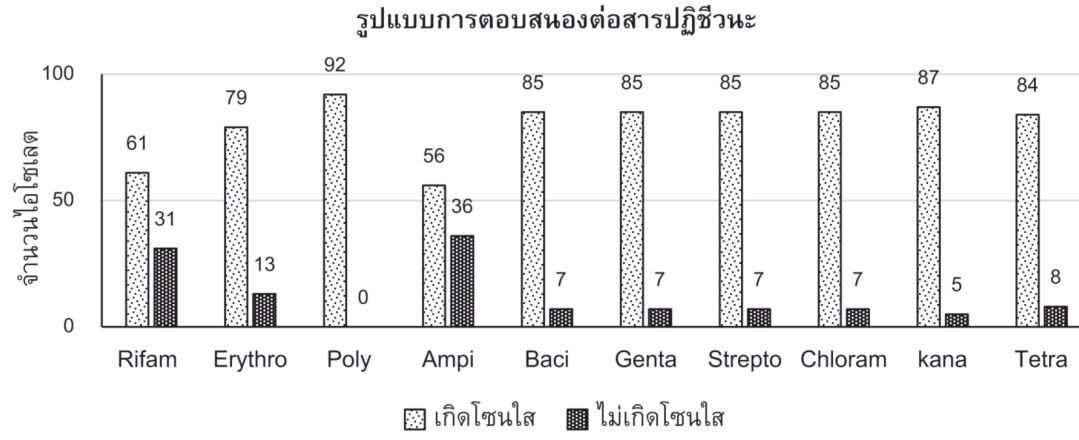
**รูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ**

ผลการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 92 ไอโซเลต พบว่า มีเชื้อทดสอบจำนวน 38 ไอโซเลต ที่สารปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญได้ คิดเป็นร้อยละ 41.3 เมื่อพิจารณาชนิดของสารปฏิชีวนะว่าชนิดใดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนเชื้อได้จำนวนมากหรือน้อย พบว่า Polymyxin-B เป็นสารปฏิชีวนะชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 92 ไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมามีสารปฏิชีวนะถึง 6 ชนิด ได้แก่ Bacitracin, Gentamycin,

Streptomycin, Chloramphenicol, Kanamycin และ Tetracycline ที่ยับยั้งเชื้อได้จำนวนมากกว่า 80 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 87 และพบว่า Ampicillin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อได้จำนวนไอโซเลตน้อยที่สุด คือสามารถยับยั้งได้เพียง 56 ไอโซเลต และจากผลการทดสอบนี้พบว่า มีสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Rifampicin, Erythromycin และ Ampicillin ที่มีเชื้อทดสอบจำนวนค่อนข้างสูงที่สามารถต้านทานฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะเหล่านี้ได้ ซึ่งมีจำนวน 31, 13 และ 36 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 33.7, 14.1 และ 39.1 ตามลำดับ ดังรูปที่ 5

**ตารางที่ 2** การผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์ของเชื้อทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรกลูโคส

| กลุ่ม | จำนวน (ร้อยละ) | ไอโซเลต |
|---|---|---|
| 1. pH อาหารลดลง/ ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ | 9 (9.78) | KW005 KW014 KW016 KW038 KW046 KR083 KR084 KR085 KR090 |
| 2. pH อาหารเพิ่มขึ้น/ | 8 | KW007 KW017 KW019 KW033 KW041 KW042 KW045 KW050 |
| 3. pH อาหารลดลง/ | 18 | KW003 KW006 KW014 KW022 KW024 KW025 KW028 KW029 KW030 KW034 KW035 KW048 KR053 KR078 KR082 KR086 KR091 KR092 |
| 4. pH อาหารเพิ่มขึ้น/ เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ | 57 (61.96) | KW001 KW002 KW004 KW008 KW009 KW010 KW011 KW012 KW013 KW018 KW020 KW021 KW023 KW026 KW027 KW031 KW032 KW036 KW037 KW039 KW040 KW043 KW044 KW047 KW049 KW051 KR052 KR054 KR055 KR056 KR057 KR058 KR059 KR060 KR061 KR062 KR063 KR064 KR065 KR066 KR067 KR068 KR069 KR070 KR071 KR072 KR073 KR074 KR075 KR076 KR077 KR079 KR080 KR081 KR087 KR088 KR089 |




**รูปที่ 5** แผนภูมิรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อ

**หมายเหตุ:** Rifam=Rifampcin; Erythro=Erytroycin; Poly=Polymyxin-B; Baci=Bacitracin; Genta=Gentamycin; Strepto=Streptomycin; Chloram=Chloramphenicol; Kana=Kanamycin; Tetra=Tetracycline

**จำแนกชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA**

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน 16S rDNA ทำโดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท แมคโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี ผลการจำแนกสายพันธุ์แอคติโนแบคทีเรียตัวแทน 13 ไอโซเลต พบว่าเป็น *Streptomyces, Norcardiopsis* และ *Saccharopolyspora* จำนวน 11, 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ผลการจำแนกชนิดแอคทิโนแบคทีเรียด้วยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

| ลำดับที่ | รหัสเชื้อ | Length (bps) | % Identities | Blast Report |
|---|---|---|---|---|
| 1 | KW003 | 1463 | 99 | *Streptomyces hygroscopicus* |
| 2 | KW009 | 1518 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 3 | KW011 | 1459 | 99 | *Streptomyces bobili* |
| 4 | KW026 | 1483 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 5 | KW029 | 1494 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 6 | KW031 | 1485 | 99 | *Nocardiopsis* sp. |
| 7 | KW039 | 1479 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 8 | KW045 | 1443 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 9 | KW059 | 1478 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 10 | KR065 | 1473 | 99 | *Saccharopolyspora* sp. |
| 11 | KR069 | 1484 | 99 | *Streptomyces* sp. |
| 12 | KR071 | 1490 | 99 | *Streptomyces purpurascens* |
| 13 | KR082 | 1479 | 99 | *Streptomyces* sp. |

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นสาย ในจีโนมมีปริมาณ GC สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรีย จากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร โดยการเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโบราณสถาน 2 ครั้ง คือฤดูหนาว และฤดูฝน ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนมีปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว ซึ่งมีความสอดคล้องกับจำนวนเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ กล่าวคือ จำนวนไอโซเลตบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนมีมากกว่าไอโซเลตบริสุทธิ์ที่เก็บในฤดูหนาว จากผลการศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 92 ไอโซเลต ที่พบความหลากหลายด้านสีของเส้นใยและสีของสปอร์ของเชื้อที่แยกได้ ในงานวิจัยนี้พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kiruthuka และ Angayarkanni [19] รวมทั้งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhaskara และคณะ [20] ที่พบว่าเชื้อกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย สามารถผลิตสารสีได้หลากหลาย ทั้งสีดำ และสารสีอื่นๆ ด้วย เช่น สีน้ำตาล สีส้ม สีฟ้า [21] ซึ่งสารสีที่เชื้อผลิตนี้ย่อมส่งผลต่อพื้นผิวของโบราณสถานอย่างเห็นได้ชัดเจนที่สุด ว่าทำให้สีของโบราณสถานที่มีเชื้อเหล่านี้เจริญอยู่เปลี่ยนแปลงไปจากสีดั้งเดิม ซึ่งในงานวิจัยของ Suihko และคณะ [22] ก็พบเช่นกันว่ามีแบคทีเรียที่แยกจากโบราณสถานที่สามารถผลิตสารที่มีได้เช่นกัน ด้านความสามารถในการผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ของเชื้อนั้น ในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ คิดเป็น ร้อยละ 61.96 ผลิตและหลั่งสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างจนสามารถเปลี่ยนสี

ของอินดิเคเตอร์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างได้ของเชื้อย่อมส่งผลด้านการกัดกร่อนต่อวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างได้ ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Abdulla และคณะ [12] ได้ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ด้านนี้เช่นเดียวกัน แต่เชื้อที่พบมีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าในงานวิจัยนี้สารที่เชื้อผลิตขึ้นนั้นส่วนมากมีฤทธิ์เป็นด่าง ก็สามารถส่งผลต่อการกัดกร่อนต่อวัสดุต่างๆ ได้เช่นกัน ย่อมส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของโบราณสถานได้ ในงานวิจัยนี้ผลจากการศึกษาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด พบว่า รูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อมีความหลากหลาย ในงานวิจัยนี้ พบว่า Polymyxin-B เป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 92 ไอโซเลตได้ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ อีกถึง 6 ชนิด ได้แก่ Bacitracin, Gentamycin, Streptomycin, Kanamycin, Chloramphenicol และ tetracycline ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 87 (ยับยั้งได้มากกว่า 80 ไอโซเลต) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีสารปฏิชีวนะ 3 ชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อย คือ Rifampicin, Erythromycin และ Ampicillin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้จำนวน 32, 13 และ 36 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 33.7, 14.1 และ 39.1 ตามลำดับ แนวโน้มนี้แสดงให้เห็นว่าหากต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากโบราณสถานก็สามารถทำได้ โดยต้องศึกษาและใช้สารที่เหมาะสมและจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ทดสอบการใช้สารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งหากจะนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมอาจไม่มีความเหมาะสมดังนั้นควรมีการศึกษาว่าสารเคมีอื่นๆ ที่มีราคาถูกและไม่ส่งกระทบต่อทั้งโบราณสถานและสิ่งแวดล้อมเป็นสารชนิดใดต่อไป จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อส่วนมากเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน [10, 14, 17, 23] ที่ศึกษาการเสื่อมสภาพของโบราณสถานในประเทศต่างๆ ที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์และพบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่พบว่าเป็นชนิดที่โดดเด่นมักจะเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Streptomyces*

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย โดยการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจากโบราณสถานในเขตอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชร พบว่าเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ได้มีความหลากหลายทั้งด้านสัณฐานวิทยารวมทั้งเมื่อตรวจสอบสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสาเหตุให้สิ่งก่อสร้างเกิดการเสื่อมสภาพ เช่น การผลิตและหลั่งสารออกนอกเซลล์ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อสามารถผลิตและหลั่งสารทั้งที่มีฤทธิ์เป็นกรดและด่างได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ รวมทั้งจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก็สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายสามารถเจริญในตัวอย่างได้ และจากการที่ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบการตอบสนองของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ พบว่า สารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลการวิจัยนี้นับว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญมากที่ชี้ให้เห็นว่าสามารถหาวิธีการในการป้องกันหรือกำจัดเชื้อที่อยู่ในโบราณสถานต่างๆ ได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเป็นการทดสอบโดยการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งหากจะนำไปประยุกต์ใช้จริงในสภาพแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากเป็นสารที่มีราคาแพงและสารปฏิชีวนะบางชนิดอาจส่งผลกระทบด้านลบต่อโบราณสถานได้ ดังนั้น ในงานต่อไปอาจวิจัยด้านการหาวิธีการต่างๆ ที่เหมาะสมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อในโบราณสถานโดยที่ไม่ส่งกระทบต่อโบราณสถาน รวมทั้งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย อย่างไรก็ตามผลการวิจัยครั้งนี้นับได้ว่าเป็นจุดเริ่มที่สำคัญซึ่งทำให้ทราบสมบัติต่างๆ ในเชิง

วิทยาศาสตร์บริสุทธิ์เกี่ยวกับเชื้อแอคติโนแบคทีเรียในโบราณสถานจากอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชรซึ่งได้เก็บเป็นคลังเชื้อไว้ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา เพื่อใช้ในการวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไป

## กิติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย และบุคลากรอุทยานประวัติศาสตร์กำแพงเพชรที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

## เอกสารอ้างอิง

1. Johnson, H. M. 1965. Concerted Structure: Causes of Deterioration and Preventive Measure. Deterioration, Maintenance and Repair of Structure. McGraw-Hill Book Company. p. 154.
2. Jain, K. K., Mishra, A. K., and Singh, T. 1991. Studies in the Effect of Biogenic on Stone Materials. In Biodegradation of Cultural Property: Held at National Research Laboratory for Conservation of Cultural Property, in Collaboration with ICCROM and INTACH, Agrawal, O.P. and Shashi D., Editors. Proceedings of the International Conference on Biodeterioration of Cultural Property; 20-25 February 1989. New Delhi, Macmillan India. p. 240-49.
3. Kumar, R., and Kumar, A. V. 1999. Biodeterioration of Stone in Tropical Environment: An Overview Research in Conservatin Series, Los Angeles., The Getty Conservation institute. p. 1-9.
4. Gargani, G. 1968. Deterioration of Works of Art Following the Florence Flood Disaster. In: Haderlie, E.C. Editor. Biodeterioration of Materials: Microbiological and Allied Aspect. Proceedings of the 1st International Biodeterioration Symposium; 9-14 September 1968. Southampton. London.
5. Arenz, B. E., and Blanchette, R. A. 2009. Investigations of Fungal Diversity in Wooden Structures and Soils at Historic Sites on the Antarctic Peninsula. *Canadian Journal of Microbiology.* 55: 46-56.
6 Bartoli, F., Municchia, A. C., Futagami, Y., Kashiwadani, H., Moon, K. H., and Caneva, G. 2014. Biological Colonization Patterns on the Ruins of Angkor Temples (Cambodia) in the Biodeterioration vs Bioprotection Dabate. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 96: 157-165.
7. Pandey, A. K., Shrivastav, A., Bhatnagar, P., Sarsaiya, S., and Awasthi, M. K. 2011. Diversity of Monument Deterioration-Causing Fungi at Gwalior fort (M.P.) India. *Annals of Environmental Science.* 5: 35-40.

8. Sakr, A. A., Ghaly, M. F., Ali, M. F., and Abdel-Haliem, M. E. F. 2013. Biodeterioration of Binding Media in Tempera Paintings by Streptomyces Isolated from Some Ancient Egyptian Paintings. *African Journal of Biotechnology.* 12(14): 1644-1656.
9. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. 2015. Brock Biology of Microorganisms. 14th Edition. New York. Pearson Global Edition, Inc. p. 535.
10. De Leo, F., Iero, A., Zammit, G., and Urzi, C. 2012. Chemoorganotrophic Bacteria Isolated from Biodeteriorated Surfaces in Cave and Catacombs. *International Journal of Speleology.* 41(2): 125-136.
11. Sujidkanlaya, M., 2017. Screening and Studying some Properties of Actinobacteria that Affect Biodeterioration from Archaeological Site in Sukhothai Histrorical Park. *VRU Research and Development Journal Science and Technology.* 12(1): 107-117. (in Thai)
12. Abdulla, H., May, E., Bahgat, M., and Dewedar, A. 2008. Characterization of Actinomycetes Isolation from Ancient Stone and Their Potential for Deterioration. *Polish Journal of Microbiology.* 57(3): 213-220.
13 Kim, M. J., Shin, H. K., Choi, Y. S., Kim, G. C., and Kim, G. H. 2016. An Aeromycological Study of Various Wooden Cultural Heritages in Korea. *Journal of Cultural Heritage.* 17: 123-130.
14. Wang, Q., Ma, G. Y., He, L. Y., and Sheng, X. F. 2011. Characterization of Bacterial Community Inhabiting the Surfaces of Weathered Bricks of Nanjing Ming City Wall. *Science of the Total Environment.* 409: 756-762.
15. Sujidkanlaya, M. 2015. Diversity of Actinobacteria with Effecting Biological Deterioration of Wat Ratchaburana in Phra Nakhon Si Ayutthaya. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities and Social Science.* 16 (2): 300-311. (in Thai)
16. Sravanthi, V., Fathepure, B. F., Wilber, G. G., Sudoi, E., Nasrazadani, S., Ley, M. T., and Ramsey, J. D. 2015. Isolation of a Sulfur-Oxidizing *Streptomyces* sp. from Deterioration Bridge Structure and Its Role in Concrete Deterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 97: 128-134.
17. Takizawa, M., Colwell, R. R., and Hill, R. T. 1993. Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environment Microbiology.* 59(4): 997-1002.
18. Jeffrey, L. S. H. 2008. Isolation, Characterization and Identification of Actinomycetes from Agriculture Soil at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology.* 7(20): 3697-3702.

19. Kiruthika, P., and Angayarkanni, J. 2015. Production and Optimization of Melanin Pigment from *Streptomyces* sp. BI 244. *International journal of Advances in Interdisciplinary Research.* 2(1): 1-5.
20. Bhaskara Rao, K. V., Chakraborty, I., Redkar, P., Munjal, M., and Sathish, S. R. 2015. Isolation and Characterization of Pigment Producing Marine Actinobacterial from Mangrove Soil and Applications of Bio-Pigments. *Der Pharmacia Lettre.* 7(4): 93-100.
21. Lin, Y. B., Wang, X. Y., Fang, H., Ma, Y. N., Tang, J., Tang, M., and Wei, G. H. 2012. *Streptomyces shaanxiensis* sp. Nov., a Blue Pigment-Producing Streptomycete from Sewage Irrigation Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 62: 1725-1730.
22. Suihko, M. L., Alakomi, H. L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., and Saarela, M. 2007. Characterization of Aerobic Bacterial and Fungal Microbiota on Surfaces of Historic Scottish Monuments. *Systematic and Applied Microbiology.* 30: 494-508.
23. Gorbushina, A. A., Heyman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W. E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., and Swings, J. 2004. Bacteria and Fungal Diversity and Biodeterioration Problems in Mural Painting Environment of St. Martin Church (Greene-Kreiensen, Germany). *International Biodeterioration & Biodegradation.* 53: 13-24.

*ได้รับบทความวันที่ 5 มีนาคม 2560*
*ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 25 สิงหาคม 2560*