

ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของวัตราชบูรณะจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

corresponding author e-mail: sujidkanlaya@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถาน วัตราชบูรณะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยการเก็บตัวอย่างในฤดูร้อน ฤดูฝนและฤดูหนาว และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยการนับจำนวนตามวิธีมาตรฐาน แยกแอกติโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยใช้อาหาร starch casein agar ศึกษาความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ รวมทั้งความหลากหลายของเชื้อที่แยกได้ ผลการศึกษาพบจุลินทรีย์ที่หลากหลายชนิดและพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุด ผลการแยกเชื้อโดยใช้อาหาร starch casein agar สามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลต ศึกษาความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อพบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรดและเปลี่ยนสีของบรอมไทม์ลบลูจากสีเขียวเป็นสีเหลือง มี 32 ไอโซเลต กลุ่มที่ 2 ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่างและเปลี่ยนสีของบรอมไทม์ลบลูจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน มี 11 ไอโซเลต และกลุ่มที่ 3 ผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่เปลี่ยนสีของบรอมไทม์ลบลู มี 6 ไอโซเลต เมื่อสุ่มจำแนกชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่า มีชนิดที่หลากหลาย คือ *Streptomyces* sp., *S. mutabilis*, และ *Achromobacter* sp. จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ส่วน *S. indicus* และ *S. rubrogriseus* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ในขณะที่ *S. viridochromogenes* และ *S. vinaceusdrappus* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ การเสื่อมสภาพทางชีววิทยา แอกติโนแบคทีเรีย

DIVERSITY OF ACTINOBACTERIA WITH AFFECTING BIOLOGICAL
DETERIORATION OF WAT RATCHABURANA IN
PHRA NAKHON SI AYUTTHAYA

Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng

Faculty of Science and Technology, Phra Nakhon Si Ayutthaya Rajabhat University

corresponding author e-mail: Sujidkanlaya@gmail.com

Abstract

This research aimed to study diversity of actinobacteria affecting biological deterioration of Wat Ratchaburana in Phra Nakhon Si Ayutthaya. The samples were collected during summer, rainy and cold seasons and were studied by using scanning electron microscope (SEM). A standard method was employed to count all the amount of the total bacteria. Pure actinobacteria was differentiated using starch casein agar. Ability in producing secondary substances of the actinobacteria was also studied, together with the diversity differentiated. The finding revealed diversity of microorganisms. The amount of the samples was highest in rainy season. The results of using starch casein agar could differentiate the actinobacteria into 49 isolates. The ability in producing secondary metabolized could be formed into 3 groups. The first group comprised 32 isolates producing acidic substances and changed bromthymolblue from green to yellow color. The second group comprised 11 isolates producing alkaline substances and changed bromthymolblue from green to dark blue color. The third group comprised 6 isolates producing secondary metabolite substance but could not change color of bromthymolblue. Representatives of the samples from the 3 groups were taken and they were analyzed for the nucleotide sequences of 16S rDNA. The findings revealed species diversity of the actinobacteria i.e. *Streptomyces* sp., *S. mutabilis* and *Achromobacter* sp. are in group 1, *S. indicus* and *S. rubrogriseus* are in group 2 and *S. viridochromogenes* and *S. vinaceusdrappus* are in group 3.

Keywords: biodiversity, biological deterioration, actinobacteria

บทนำ

วัดราชบูรณะ ตั้งอยู่ในอุทยานประวัติศาสตร์พระนครศรีอยุธยา บริเวณเชิงสะพานป่าถ่าน ซึ่งอยู่ติดกับวัดมหาธาตุทางด้านทิศตะวันออก ห่างจากพระราชวังโบราณ เล็กน้อย วัดนี้สร้างขึ้นในปี พ.ศ. 1967 โดยสมเด็จพระบรมราชาธิราชที่ 2 หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเจ้าสามพระยา วัดแห่งนี้มีชื่อเสียงและความโด่งดังมากในเรื่องที่เคยมีกลุ่มคนร้ายจำนวนหนึ่ง ลักลอบขุดกรุภายในพระปรางค์ประธาน ในปี พ.ศ. 2499 แล้วพบสมบัติเป็นจำนวนมากมายมหาศาลและได้ช่วงชิงทรัพย์สมบัติเหล่านั้นหลบหนีไปต่อมารกรมศิลปากรเข้าทำการบูรณะ พบทรัพย์สมบัติที่หลงเหลืออยู่ โดยเฉพาะสมบัติที่เป็นเครื่องทอง ปัจจุบันสมบัติที่อยู่ภายในกรุได้ถูกย้ายมาเก็บรักษาไว้ที่ พิพิธภัณฑ์สถานแห่งชาติ เจ้าสามพระยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ณ ห้องราชบูรณะ ปัจจุบันกรมศิลปากรอนุญาตให้ประชาชนสามารถเข้าเยี่ยมชมภายในกรุได้ สืบเนื่องจากการที่วัดแห่งนี้ถูกสร้างมานานมากแล้วดังนั้นโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในวัดจึงเกิดการเสื่อมสภาพไปตามกาลเวลา ซึ่งสาเหตุของการเสื่อมสภาพนั้นเกิดขึ้นได้จากปัจจัยหลายอย่าง เช่น การเสื่อมสภาพที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม การเสื่อมสภาพที่เกิดจากการเกิดจุดอ่อนในตัวเอง และการเสื่อมสภาพที่เกิดจากการกระทำของคนและสัตว์ และยังมีอีกปัจจัยหนึ่งคือเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้โบราณสถานเกิดการเสื่อมสภาพได้อีกเช่นกัน

การเสื่อมสภาพทางชีววิทยา (biodegradation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสิ่งก่อสร้างโดยที่การเปลี่ยนแปลงนั้นมีสาเหตุมาจากปฏิกิริยาของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (Hueck, 1968; Allsopp, 2011) และเรียกสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมสภาพนั้นว่า ไบโอดีทอริโอเจน (biodegrader) (Kumer & Kumer, 1999) การเสื่อมสภาพของโบราณสถานที่มีจุลินทรีย์เป็นสาเหตุ นั้น กลไกของการเกิดจะเกิดอย่างช้า ๆ กล่าวคือ จุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและที่มีอยู่โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อม ทั้งนี้อาจอยู่ในรูปของสปอร์ที่ปนมากับฝุ่นละอองหรือไอน้ำ เมื่อสปอร์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นตกไปลงบนโบราณสถานที่มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ จุลินทรีย์เหล่านั้นก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนได้ โดยจุลินทรีย์เหล่านั้นจะใช้โบราณสถานเป็นแหล่งอาหาร เช่น เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพได้ทั้งทางตรงคือ การเปลี่ยนแปลงสีซึ่งมาจากสีของสปอร์ของเชื้อหรือสีที่เกิดจากสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้น นอกจากนี้หากสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้นและขับออกนอกเซลล์นั้นมีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่างจะทำให้พื้นผิวของโบราณสถานถูกกัดกร่อนได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดจะเกิดอย่างช้า ๆ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญซึ่งส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของโบราณสถานมีทั้ง แบคทีเรีย รา และสาหร่ายขนาดเล็ก ในกลุ่มของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแอคติโนแบคทีเรียนั้นนับว่าที่มีผลอย่างมากต่อโบราณสถานที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย มักมีความสามารถในการผลิตสารที่มีสี และสร้างสปอร์ได้ รวมทั้งผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้หลายชนิด การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียบนโบราณสถานจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโบราณสถานในด้านต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายนอกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงสี หรือบางครั้งแอคติโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง แล้วส่งผลให้เกิดการกัดกร่อนทำให้วัสดุที่ใช้ก่อสร้างเกิดร่องรอยแตกหักได้ (Johnson, 1965) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาที่แยกจากโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในบริเวณวัดราชบูรณะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างโบราณสถานจากวัดราชบูรณะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งตั้งอยู่ที่พิกัด 14.36 องศาเหนือ 100.57 องศาตะวันออก มีสภาพภูมิอากาศโดยทั่วไปแบบร้อน ในปี พ.ศ. 2557 ระดับอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ที่ 32.4 องศาเซลเซียส เดือนเมษายนเป็นเดือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงสุดคืออยู่ที่ระดับ 35.9 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำที่สุดเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ที่ 21.9 องศาเซลเซียส โดยในเดือนมกราคมเป็นเดือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำที่สุดอยู่ที่ระดับ 17.0 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปี 1,423.8 มิลลิเมตร เดือนที่มีฝนตกที่จำนวนวันมากที่สุด คือ เดือนสิงหาคม ซึ่งในการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง บนผิวของโบราณสถานบริเวณกึ่งกลางจากด้านซ้าย ขวา ที่ระดับความสูงจากพื้นดิน 150 เซนติเมตร ทางด้านทิศตะวันออก และด้านทิศตะวันตก โดยใช้ไม้พินสาลีที่ฆ่าเชื้อแล้วป้ายบริเวณผิว พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร เก็บลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1 % peptone water ปลอดเชื้อ แล้วนำกลับมาตรวจวิเคราะห์ทันที ณ ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา อาคารเฉลิมพระเกียรติ ชั้น 4 ห้อง 401 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง คือ ฤดูหนาว เก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม ฤดูร้อน เก็บตัวอย่างเดือนเมษายน และฤดูฝนเก็บตัวอย่างเดือนสิงหาคม ในการเก็บตัวอย่างทั้งสามครั้งนั้นจะเก็บตัวอย่างที่ตำแหน่งเดิม

การศึกษาไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ภายใต้กล้อง ผ่านกระบวนการดูดความชื้น แล้วเคลือบทอง จากนั้น นำไปส่องภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV

การหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์มาเจือจางแบบลดลำดับส่วน (serial dilution) จนได้ระดับค่าความเจือจาง เป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงใน Petri film Aerobic Count Plate (บริษัท 3M) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด

การแยกแอกติโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

เจือจางตัวอย่างแบบลดลำดับส่วน จนได้ระดับค่าความเจือจาง ดังกล่าวข้างต้น แล้วจึงดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารแข็ง starch casein agar (Kuster & Williams, 1964) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนผิวน้ำอาหาร ที่คาดว่าจะแอกติโนแบคทีเรีย กล่าวคือ เลือกโคโลนีเชื้อที่มีผิวน้ำโคโลนีค่อนข้างแห้ง และโคโลนีจมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาขีดลาก (streak) บนจานอาหารแข็ง Hickey Tresner agar (HTA) หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหารวุ้นเอียง (slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

การศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิ

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวกลูโคส (glucose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย beef extract 3.0 กรัม peptone 5.0 กรัม glucose 10 กรัม ที่เติม bromthymol blue เข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ในอาหาร 1 ลิตร เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มในเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที วัดค่า pH ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ค่า pH ที่ได้

การจำแนกชนิดแอกติโนแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

ใช้วิธีพีซีอาร์โดยตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ที่บริษัทแมคโครเจน ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r ในการเพิ่มชิ้น DNA บริเวณ 16S rDNA โปรแกรมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 94 องศาเซลเซียส 45 นาที, 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

27f : AgA gTT TgA TCM TGG CTC Ag
1492r : TAC ggY TAC CTT gTT ACg ACT T
518f : CCA gCA gCC gCg gTA ATA Cg
800r : TAC CAg gg T ATC TAA TCC

ผลการวิจัย

ลักษณะไบโอฟิล์ม

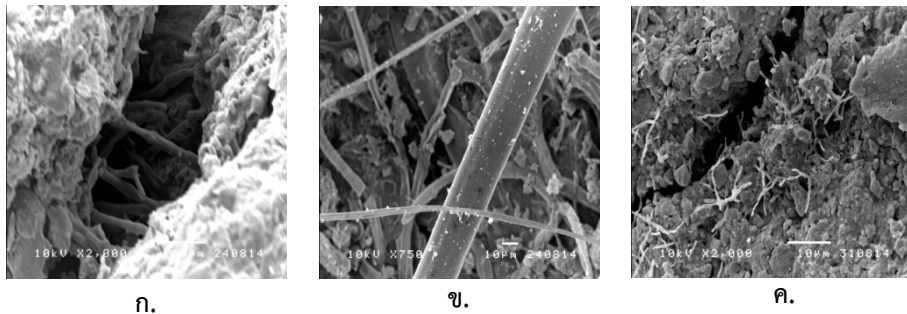
สีของไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ปรากฏบนพื้นผิวของโบราณสถานที่เกิดขึ้นอย่างพบว่ามีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ ส่วนมากสีหลักของไบโอฟิล์มที่พบเป็นสีเทาดำ สีดำและสีเทา ส่วนไบโอฟิล์มสีอื่น ๆ มีปะปนบ้างเล็กน้อย เช่น สีเหลือง สีน้ำตาลเข้ม สีขาว สีเขียว ซึ่งไบโอฟิล์มสีดำและสีอื่นๆ ที่ปรากฏนั้นเนื่องมาจากสาเหตุหลัก คือ สีของสปอร์และสีของเส้นใย ของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนแบคทีเรีย และราชนิดต่างๆ ที่มีสีที่หลากหลายและแตกต่างกัน ที่เจริญทับถมกันเป็นเวลานาน และมีปริมาณจนก่อให้เกิดเป็นไบโอฟิล์ม ผลจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง คือ ฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝน พบว่า ลักษณะของไบโอฟิล์มที่พบทั้ง 3 ฤดู ไม่ว่าจะเป็นพื้นผิวของโบราณสถานทางด้านทิศตะวันออกหรือพื้นผิวของโบราณสถานทางด้านทิศตะวันตก ไม่มีความแตกต่างกันดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของไบโอฟิล์มของตัวอย่าง

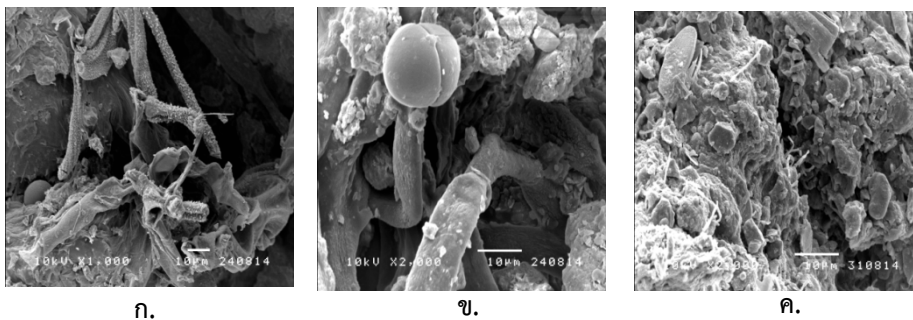
ชื่อตัวอย่าง	ฤดูที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง	สีไบโอฟิล์ม
RB1	หนาว	ตะวันออก	สีดำ สีเทา
RB2	ร้อน	ตะวันออก	สีเทา
RB3	ฝน	ตะวันออก	สีเทา
RB4	หนาว	ตะวันตก	สีดำ สีน้ำตาล
RB5	ร้อน	ตะวันตก	สีดำ สีเทา สีเขียว
RB6	ฝน	ตะวันตก	สีเทา

ผลการศึกษาไบโอฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากการนำตัวอย่างที่เก็บในฤดูกาลต่างๆ จากด้านทิศตะวันออกและด้านทิศตะวันตกของโบราณสถาน ไปทำการตรวจวิเคราะห์ภายใต้กล้อง SEM ได้ผลดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 ภาพตัวอย่างไบโอฟิล์มจากโบราณสถาน ด้านทิศตะวันออก ที่ระดับความสูงจากพื้น 150 เซนติเมตร จุดกึ่งกลางจากด้านซ้ายและด้านขวาภายใต้กล้อง SEM
ก.) ตัวอย่างในฤดูหนาว ข.) ตัวอย่างในฤดูร้อน ค.) ตัวอย่างในฤดูฝน

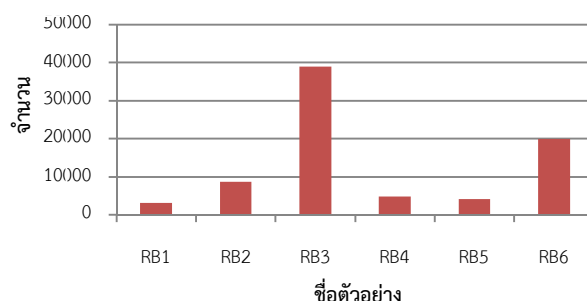


ภาพที่ 2 ภาพตัวอย่างไบโอฟิล์มจากโบราณสถาน ด้านทิศตะวันตก ที่ระดับความสูงจากพื้น 150 เซนติเมตร จุดกึ่งกลางจากด้านซ้ายและด้านขวาภายใต้กล้อง SEM
ก.) ตัวอย่างในฤดูหนาว ข.) ตัวอย่างในฤดูร้อน ค.) ตัวอย่างในฤดูฝน

จากภาพที่ 1 เป็นภาพภายใต้กล้องที่ได้จากตัวอย่างที่เก็บจากด้านทิศตะวันออก พบว่า ในฤดูหนาวและฤดูร้อน ลักษณะของพื้นผิวตัวอย่างจะถูกกัดกร่อน จุลินทรีย์ที่พบทั้งสองตัวอย่างนั้นเป็นเส้นใยราที่เจริญอยู่และมีโครงสร้างของสาหร่ายขนาดเล็กเจริญบนผิว ส่วนในฤดูฝน พบไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ที่อยู่รวมกลุ่มกันเป็นเส้นใยสั้น (filamentous) เจริญแทรกตัวอยู่ในโครงสร้างของวัสดุ ภาพที่ 2 เป็นภาพตัวอย่างภายใต้กล้องที่ได้จากด้านทิศตะวันตก พบว่า ตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาวและฤดูร้อนมีโครงสร้างของสาหร่ายขนาดเล็กที่ขาดความชื้นแทรกอยู่ที่ผิวของวัสดุก่อสร้างและพบจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างกลมและจุลินทรีย์รูปร่างท่อนสั้นปะปนอยู่กับไบโอฟิล์ม ส่วนตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝน พบสาหร่ายขนาดเล็ก รูปร่างคล้ายกระสวยและจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่รวมกลุ่มกันกับจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างกลมและท่อนสั้น

ผลการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

ผลการเก็บตัวอย่างจากโบราณสถานที่อยู่ในวัดราชบูรณะ จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเป็นตัวแทน 3 ฤดู คือ ฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝน มาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ได้ผลดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างที่เก็บจากโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในวัดราชบูรณะ

ผลจากการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างที่เก็บมาจากฤดูกาลและทิศทาง ที่แตกต่างกัน พบว่าทิศทาง (ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก) ที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดไม่มาก แต่การเก็บตัวอย่างในฤดูกาลที่แตกต่างกันจะพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแตกต่างกันมาก ซึ่งตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝน (RB3 และ RB6) พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน (RB2 และ RB5) ส่วนตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว (RB1 และ RB4) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดต่ำที่สุด

ผลการศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิ

เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเติม 1.6 % ของบรอมไทมัลบูล์เป็นอินดิเคเตอร์ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การผลิตสารทุติยภูมิของแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากวัดราชบูรณะ

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	การเปลี่ยนสีบรอมไทมัลบูล์	ผลต่างระดับpH		
			เริ่มต้น	7 วัน	ผลต่าง
RB1	ARB01	GB	6.56	8.75	-2.19
	ARB02	GY	6.20	5.45	0.75
	ARB03	GB	6.57	8.55	-1.98
	ARB04	GY	6.23	4.99	1.24
	ARB05	GY	6.25	4.65	1.60
	ARB06	GY	6.56	4.66	1.90
	ARB07	GY	6.25	4.88	1.37
	ARB08	GB	6.57	8.67	-2.10
	ARB09	GY	6.57	5.09	1.48
	ARB10	GB	6.55	8.56	-2.01
RB4	ARB11	N	6.25	6.14	0.11
	ARB12	GY	6.56	4.74	1.82

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	การเปลี่ยนสีบรอมไทมัลบลู	ผลต่างระดับpH		
			เริ่มต้น	7 วัน	ผลต่าง
RB4	ARB13	GY	6.57	4.74	1.83
	ARB14	GB	6.58	7.44	-0.86
	ARB15	GY	6.21	4.65	1.56
	ARB16	N	6.55	6.56	-0.01
	ARB17	GY	6.57	4.93	1.64
	ARB18	GB	6.55	8.66	-2.11
	ARB19	GY	6.57	4.83	1.74
	ARB20	GY	6.26	4.78	1.48
	ARB21	GB	6.55	8.50	-1.95
	ARB22	GY	6.57	4.60	1.97
	ARB23	N	6.51	6.53	-0.02
	ARB24	N	6.20	6.25	-0.05
	ARB25	GY	6.56	4.46	2.10
RB2	ARB26	N	6.51	6.52	-0.01
	ARB27	GY	6.54	4.88	1.66
	ARB28	GY	6.55	4.75	1.80
	ARB29	GY	6.57	4.37	2.20
	ARB30	GB	6.54	8.00	-1.46
	ARB31	GY	6.57	5.80	0.77
	ARB32	GY	6.55	4.50	2.05
	ARB33	GY	6.34	4.76	1.58
	ARB34	GB	6.58	7.90	1.32
RB5	ARB35	GY	6.55	5.32	1.23
RB3	ARB36	GY	6.54	4.40	2.14
	ARB37	N	6.56	6.58	-0.02
	ARB38	GB	6.57	8.35	-1.78
	ARB39	GB	6.67	8.81	-2.14
	ARB40	GY	6.54	4.97	1.57
	ARB41	GY	6.54	4.98	1.56
	ARB42	GY	6.67	4.98	1.69
	ARB43	GY	6.65	4.67	1.98
	ARB44	GY	6.56	4.53	2.03
	ARB45	GY	6.55	4.67	1.88
	ARB46	GY	6.57	4.64	1.93
RB6	ARB47	GY	6.55	4.95	1.60
	ARB48	GY	6.54	4.97	1.57
	ARB49	GY	6.58	4.60	1.98

หมายเหตุ N หมายถึง สีอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงหลังการบ่มเชื้อ 7 วัน

GY หมายถึง สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด

GB หมายถึง สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง

จากตารางที่ 2 พบว่าเชื้อทดสอบสามารถจัดกลุ่มตามชนิดของสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตได้เป็น 3 กลุ่ม คือ เชื้อที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด (เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีเหลือง, GY) เชื้อที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกลาง (ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ, N) และเชื้อที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน, GB) ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจัดกลุ่มเชื้อทดสอบตามความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ

กลุ่ม	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไอโซเลต
1	อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง	ARB02, ARB04, ARB05, ARB06, ARB07, ARB09, ARB12, ARB13, ARB17, ARB19, ARB20, ARB22, ARB25, ARB27, ARB28, ARB29, ARB31, ARB32, ARB33, ARB35, ARB36, ARB40, ARB41, ARB42, ARB43, ARB44, ARB45, ARB46, ARB47, ARB48, ARB49
2	อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นน้ำเงิน	ARB01, ARB03, ARB08, ARB10, ARB14, ARB18, ARB21, ARB30, ARB34, ARB38, ARB39
3	อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี	ARB11, ARB16, ARB23, ARB24, ARB26, ARB37

จากตารางที่ 3 พบว่าเชื้อทดสอบส่วนใหญ่จะผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด (32 ไอโซเลต) และรองลงมาได้แก่เชื้อที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (11 ไอโซเลต) และพบว่ามีเชื้อ 6 ไอโซเลตที่ผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณที่ต่ำจนไม่สามารถเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมินี้จะเห็นว่าเชื้อสามารถสร้างสารที่ส่งผลต่อการกักตัวของโบราณสถานได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการจำแนกเชื้อโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

สุ่มเลือกแอกติโนแบคทีเรียเพื่อจำแนกด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยเลือกตัวแทนไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร HTA ที่แตกต่างกัน และตัวแทนจากไอโซเลตแต่ละกลุ่มด้านความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิโดยเลือกไอโซเลตที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด 4 ไอโซเลต (ARB25, ARB28, ARB29, ARB36) ไอโซเลตที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (ARB30, ARB39) ไอโซเลตที่ไม่สามารถเปลี่ยนสีบรอมไทม์บลู 2 ไอโซเลต (ARB26, ARB37) ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกชนิดแอกติโนแบคทีเรียด้วยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

Group	Code	Length	% Identities	Blast report
1	ARB25	1433	99	<i>Streptomyces mutabilis</i>
	ARB28	1003	99	<i>Streptomyces</i> sp.
	ARB29	996	99	<i>Achromobacter</i> sp.
	ARB36	1439	99	<i>Streptomyces</i> sp. CPE338
2	ARB30	1488	99	<i>Streptomyces indicus</i>
	ARB39	1425	99	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>
3	ARB26	1463	99	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
	ARB37	1009	99	<i>Streptomyces vinaceusdrappus</i>

จากตารางที่ 4 พบว่า ชนิดของแอกติโนแบคทีเรียที่พบส่วนมากอยู่ในสกุล *Streptomyces* แต่เป็นชนิดที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียจากโบราณสถาน นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต ARB29 จำแนกได้เป็น *Achromobacter* sp. ที่แตกต่างจากไอโซเลตอื่น ๆ

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในวัดราชบูรณะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษามีไบโอฟิล์มสีต่าง ๆ ทั้งสีเทาดำ สีดำและสีเทาซึ่งเป็นสีหลักที่พบ และมีสีอื่น ๆ อีก เช่น สีเขียว สีน้ำตาล สีขาว ซึ่งสีต่าง ๆ ที่ปรากฏบนพื้นผิวของโบราณสถาน เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ทั้งรา แบคทีเรีย และสาหร่ายขนาดเล็ก จากงานวิจัยของ Bartoli et al. (2014) พบว่าตัวอย่างไบโอฟิล์มซึ่งมีสีเขียวที่เก็บจากปราสาท นครวัด ประเทศกัมพูชา เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด มีสาหร่ายชนิดต่าง ๆ และสาหร่ายขนาดเล็กเจริญบนพื้นผิว รวมทั้งพบว่าสาหร่ายเหล่านี้สามารถเจริญแทรกลงในวัสดุได้ ส่วนสีอื่น ๆ ของไบโอฟิล์มเกิดได้เนื่องจากสีของสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์พวกรา และแอกติโนแบคทีเรียที่ส่วนมากมีสีดำ สีเทาดำ และสีน้ำตาล นอกจากนี้สีที่ปรากฏบนพื้นผิวของโบราณสถานยังสามารถเกิดได้จากการที่จุลินทรีย์ต่าง ๆ ผลิตสารทุติยภูมิที่มีสีแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (Rosling et al., 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราและแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแอกติโนแบคทีเรียนับว่าเป็นสาเหตุหลักทั้งนี้เนื่องจากสภาพภูมิอากาศของจังหวัดพระนครศรีอยุธยาเป็นแบบร้อน อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ที่ประมาณ 32.4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราและแอกติโนแบคทีเรียเป็นอย่างดี (Sterflinger & Pinar, 2013) และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า มีจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และสาหร่ายขนาดเล็กเจริญบนพื้นผิวของตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suihko et al. (2007) จากการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน พบว่า ฤดูฝนพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด ส่วนฤดูหนาวและฤดูร้อนจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบมีปริมาณไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างที่เก็บในฤดูเดียวกันแต่ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างแตกต่างกันคือด้านทิศตะวันออกและด้านทิศตะวันตก พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบไม่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้สามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้ 49 ไอโซเลต เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อทั้งหมดพบว่าเชื้อทดสอบสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ทั้งสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดและสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ไอโซเลตของเชื้อที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดจนเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลืองได้มากถึง 32 ไอโซเลต ไอโซเลตของเชื้อที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างจนเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินได้มี 11 ไอโซเลต และมี 6 ไอโซเลตที่ผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นกัน แต่ผลิตได้ในปริมาณต่ำ (สังเกตจากอินดิเคเตอร์ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าหากมีแอกติโนแบคทีเรียเจริญบนโบราณสถาน การเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานย่อมเกิดขึ้นได้เนื่องมาจากสารทุติยภูมิที่เชื้อผลิตขึ้นส่งผลไปทำให้วัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างถูกกัดกร่อนได้ (Tikam & Swaranjit, 2012) ทั้งนี้ Vupputuri et al. (2015) พบว่า *Streptomyces* sp. กลุ่ม sulfur-oxidizing มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายทางชีววิทยากับวัสดุก่อสร้างที่ใช้คอนกรีต ผลการจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรียในงานวิจัยนี้พบว่าส่วนมากจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suihko et al. (2007) และงานวิจัยของ Abdulla et al. (2008) ที่พบว่าแบคทีเรียที่พบบริเวณพื้นผิวของอนุสาวรีย์ในประเทศ

สกอตแลนด์ ส่วนมากเป็น *Streptomyces* ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยและพบว่าชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด ได้แก่ *Streptomyces* sp., *S. mutabilis* และ *Achromobacter* sp. ชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ได้แก่ *S. indicus* และ *S. rubrogriseus* ส่วนชนิดที่ผลิตสารทุติยภูมิแต่ไม่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *S. viridochromogenes*, *S. vinaceusdrappus* ซึ่งจะเห็นว่ามีหลากหลายของชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่พบในงานวิจัย

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาความหลากหลายของชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในวัดราชบูรณะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีความแตกต่างกันหากเก็บตัวอย่างในฤดูกาลที่แตกต่างกัน โดยฤดูฝน จะมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูแล้งและฤดูร้อน และพบว่าการเก็บตัวอย่างจากด้านทิศตะวันออกเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากด้านทิศตะวันตกไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรีย จากการศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูฝนนั้นไบโอฟิล์มมีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูแล้งและฤดูร้อน ด้านความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ พบว่าส่วนใหญ่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด รองลงมาผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง และมีไอโซเลตที่ผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (กลุ่มที่3) เมื่อผสมเชื้อมาจำแนกชนิดด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่า ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Streptomyces* โดยชนิดเชื้อที่พบแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่ต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abdulla, H., May, E., Bahgat, M., & Dewedar, A. (2008). Characterization of actinomycetes isolated from ancient stone and their potential for deterioration. *Polish Journal of Microbiology*, 57(3), 213-220.
- Allsopp, D. (2011). Worlde wastage: the economics of biodeterioration. *Microbiology Today*, (38), 150-153.
- Bartoli, F., Casanova, M.A., Futagami, Y., Kashiwadani, H., Moon, K.H. & Caneva, G. (2014). Biological colonization patterns on the ruins of angkor temples (Cambodia) in the biodeterioration vs bioprotection debate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (96), 157-165.
- Hueck, H.J. (1968). *The Biodeterioration of Materials: An Appraisal*, Biodeterioration of Materials. Elsevier Publishing Co, Ltd.
- Johnson, H. M. (1965). *Concrete structure: causes of deterioration and preventive measure, deterioration, maintenance and repair of structure*. MacGraw-Hill Book Company.
- Kumer R. & Kumer A.V. (1999). *Biodeterioration of stone in tropical environment: an overview*. The Getty Conservation institute.
- Kuster, E. & Williams, S.T. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, (202), 928-929.
- Rosling, A., Finlay, R.D. & Gadd, G.M. (2009). Geomycology. *Fungal Biology Reviews*, (23), 91-93.

- Sterflinger, K. & Pinar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of Art-Tilting at Windmills. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (97), 9637-9646.
- Suihko, M.L., Hanna, L.A., Ann, Irene, G., Jurgen, F. & Maria, S. (2007). Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of Historic Scottish Monuments. **Systematic and Applied Microbiology**, (30), 494-508.
- Tikam, C.D. & Swaranijit, S.C. (2012). Microbial induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. **Environment Sciences Europe**, 24(36), 1-13.
- Vupputuri, S., Fathepure, B.Z., Wilber, G.G., Sudoi, E., Nasrazadani, S., Tyler Ley, M. & Ramsey, J.D. (2015). Isolation of a sulfur-oxidizing *Streptomyces* sp. from deteriorating bridge structures and its role in concrete deterioration. **Inter Biodeterioration & Biodegradation**, (97), 128-134.