

การคัดแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา ของโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง^{1*}

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก การเจริญมีลักษณะเป็นเส้นสาย ในจินมมีเบสกับกับ ไซโตซีนสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรีย จากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย พบว่า จากการแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร Starch Casein Agar สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต การศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องสเตอริโอ เมื่อเพาะ เชื้อบนอาหารแข็ง Hickey & Tresner's agar (HTA) พบว่า สีเส้นใยและสีสปอร์ของเชื้อมีทั้งสีขาว สีเทา สีดำ สีน้ำตาลและสีเหลือง ขนาดโคโลนีมีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก การหลั่งสารออกนอกเซลล์ที่ส่งผลกระทบต่อค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกลูโคสที่ใช้โบรโมไทมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อ 83 ไอโซเลต ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกผลิตสารที่ลดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 2 ผลิตสาร ที่เพิ่มค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนที่อินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 3 ผลิตสารที่ลดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง และกลุ่มที่ 4 ผลิตสารที่เพิ่มค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อและ เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน คิดเป็นร้อยละ 8.43, 3.61, 30.12 และ 57.83 ตามลำดับ รูปแบบ การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ที่ใช้ทดสอบได้แก่ เจนตามัยซิน สเตรปโตมัยซิน เตตราซัยคริน โพลีมัยซิน บี กานามัยซิน ไรฟามพิซิน เบซิทรากิน คลอแรมเฟนิคอล แอมพิซิลินและอีริโทรมัยซิน ของเชื้อทั้ง 83 ไอโซเลต พบว่า มีหลากหลายรูปแบบ เมื่อสุ่มตัวอย่างเชื้อ 13 ไอโซเลต มาจำแนกโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่า จำแนกได้เป็น *Streptomyces*, *Norcardiopsis* และ *Actinomyces* จำนวน 10, 2 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ

คำสำคัญ : การเสื่อมสภาพทางชีววิทยา โบราณสถาน แอคติโนแบคทีเรีย ความหลากหลายทางพันธุกรรม

¹ อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัด พระนครศรีอยุธยา

* ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: sujidkanlaya@gmail.com

Screening and studying some properties of actinobacteria that affect biodeterioration from archaeological site in Sukhothai historical park with

Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng^{1*}

Abstract

Actinobacteria are bacteria with high GC content in the genome. The aim of experiment was to isolate and study some character of actinobacteria isolated from archeological site in Sukhothai historical park. A total of 83 isolates were obtained when used Starch Casein Agar for isolation. Morphological study under stereo microscope when culture on HTA agar found divest of colony and spore color such as white, gray, black, brown and yellow. The ability in secrete substance effect medium pH when used glucose broth medium with bromothymol blue as indicator can be divide 83 isolates into 4 groups; group one secrete substance with decrease pH but no change indicator's color, group two secrete substance with increase pH but no change indicator's color, group three secrete substance with decrease pH and change indicator's to yellow color, and group four secrete substance with increase pH and change indicator's to blue color as 8.43, 3.61, 30.12 and 57.83 % respectively. The ability to resist 10 types of antibiotics, namely rifampicin, erythromycin, polymixin-B, ampicillin, bacitracin, gentamycin, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin and tetracycline found diverts character. The Random selected of 13 isolate for identified by sequencing 16S rDNA. The result found that 10, 2 and 1 isolate were closely related to genus *Streptomyces*, *Norcardiopsis* and *Actinomyces* respectively.

Keywords : biodeterioration, history rusin, actinobacteria, genetic diversity

¹ Department of Microbiology Faculty of Science and Technology Rajabhat Pranakhon Si Ayutthaya University Pranakhon Si Ayutthaya Province

*Corresponding author, e-mail: Sujidkanlaya@gmail.com

บทนำ

การเสื่อมสภาพของสิ่งก่อสร้างประเภทต่างๆ เกิดขึ้นได้ โดยเฉพาะโบราณสถาน ซึ่งถูกสร้างไว้แล้วเป็นเวลานาน ในประเทศไทยโบราณสถานนับว่าเป็นสิ่งก่อสร้างที่มีความสำคัญมากโดยเฉพาะด้านการเป็นมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ ในปัจจุบันมีโบราณสถานหลายแห่งเกิดการเสื่อมสภาพรวมทั้งอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย ซึ่งเป็นสถานที่หนึ่งที่มีความสำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก จนได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นมรดกโลกทางด้านวัฒนธรรมจากองค์การยูเนสโก เมื่อวันที่ 12 ธันวาคม 2534

สาเหตุที่ทำให้โบราณสถานต่างๆ เกิดการเสื่อมสภาพมีหลายประการ เช่น เกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การเกิดจุดอ่อนในตัวเอง รวมทั้งที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์และจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การเสื่อมสภาพที่สาเหตุเกิดจากสิ่งมีชีวิต จะเรียกว่าการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา (biodegradation) ซึ่งจุลินทรีย์นับว่าเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาได้ (Filomena et al., 2012., Bartoli et al., 2014.) โดยจะส่งผลต่อการเสื่อมสภาพอย่างช้าๆ ผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น เกิดจากกระบวนการ assimilation คือ จุลินทรีย์ที่เจริญบนโบราณสถานจะใช้สารที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุในการก่อสร้างโบราณสถานนั้นๆ เป็นอาหารโดยตรง จึงส่งผลให้ความแข็งแรงของโบราณสถานลดลง การยึดเกาะกันของวัสดุก็ลดน้อยลงส่งผลให้เกิดการพังทลายลงได้ในที่สุด หรือเกิดจากกระบวนการ dissimilation คือ การที่จุลินทรีย์อยู่บนวัสดุก่อสร้าง แล้วมีผลต่อวัสดุก่อสร้างที่เนื่องมาจากการเจริญของจุลินทรีย์นั้น เช่น จุลินทรีย์บางชนิดเมื่อมีการเจริญจะสร้างสารเมแทบอลิต์ที่ส่งผลด้านการทำลายวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง โดยสารเมแทบอลิต์นั้น อาจถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ หรือเก็บไว้ในเซลล์ก็ได้ กรณีที่จุลินทรีย์ผลิตสารแล้วเก็บในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์ตายลงเซลล์จะแตก เกิดการปลดปล่อยสารออกมานอกเซลล์ โดยเฉพาะสารที่ฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ซึ่งส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของโบราณสถานได้

แอคติโนมัยซีต์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเฉพาะคือสร้างเส้นใย (hyphae) ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ได้ ในจีโนมของแอคติโนมัยซีต์จะมีปริมาณของเบสกวีนีนกับไซโตซีน (G+C) สูงประมาณ 55 – 78 โมลเปอร์เซ็นต์ อีกทั้งพบว่าเชื้อกลุ่มนี้ส่วนมากสามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ ได้ เช่น ขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ นอกจากนั้นแอคติโนมัยซีต์ส่วนใหญ่ สามารถรอดชีวิตในสภาพอุณหภูมิสูง จากสมบัติดังกล่าวของเชื้อนี้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยาของโบราณสถานได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการแยกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอคติโนมัยซีต์จากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และด้านพันธุกรรมของเชื้อที่พบจากโบราณสถานในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์ดังกล่าว ซึ่ง จะทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้มาประกอบในการหาแนวทางการป้องกัน หรือกำจัดเชื้อเหล่านั้นได้อย่างถูกต้อง เพื่อการอนุรักษ์และบำรุงรักษาโบราณสถานให้สามารถใช้งานได้อย่างยาวนานขึ้น ให้โบราณสถานเหล่านั้นทรงคุณค่าด้านการเป็นมรดกทางวัฒนธรรมของชาติสืบไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรียจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย
2. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ส่งผลกระทบต่อความสัมพันธ์ทางชีววิทยา

แนวคิด ทฤษฎี ที่เกี่ยวข้อง

การเสื่อมสภาพทางชีววิทยา หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสมบัติของสิ่งก่อสร้างที่เกิดจากปฏิกิริยาของสิ่งมีชีวิต (Hueck, 1968) สิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุทำให้สิ่งก่อสร้างเกิดการเสื่อมสภาพเรียกว่า ไบโอดีเทอริโอเจน (biodeteriogen) (Kumer, 1999) การเสื่อมสภาพของโบราณสถานจากการที่มีจุลินทรีย์เป็นสาเหตุนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ โดยลักษณะของการเกิดการเสื่อมสภาพจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กที่โดยปกติแล้วในสภาพแวดล้อมทั่วๆ ไปมักมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ทั้งที่อยู่ในรูปของสปอร์และที่ปะปนมากับฝุ่นละอองหรือไอน้ำ เมื่อสปอร์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นตกลงไปลงบนโบราณสถานรอบกับการมีสภาวะที่เหมาะสม รวมทั้งมีระยะเวลาที่นานเพียงพอต่อการเจริญจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้ เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนจะเกิดเหตุการณ์ต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อความสัมพันธ์ของโบราณสถานได้ เช่น การทำให้วัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านโครงสร้าง การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายนอก เช่น เกิดเป็นร่องรอยการกัดกร่อน การเปลี่ยนแปลงทางด้านสีของสิ่งก่อสร้าง เช่น การมีคราบสีต่างๆ บนพื้นผิวของโบราณสถาน โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นนั้นเกิดจากจุลินทรีย์มีกระบวนการทางสรีรวิทยาที่แตกต่างและหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น หากมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น กรดซิตริก กรดคาร์บอนิก จะส่งผลให้เกิดการกัดกร่อนทำให้วัสดุที่ใช้เป็นวัสดุก่อสร้างเกิดร่องรอยและเกิดการแตกหักได้ (Johnson, 1965) หรือถ้ามีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เจริญขึ้นเป็นอนุอยู่ซึ่งสารนี้ส่งผลกระทบต่อความสัมพันธ์ของโบราณสถานประเภทที่ก่อสร้างด้วยหิน โบราณสถานประเภทดังกล่าวก็เกิดการเสื่อมสภาพได้ การเกิดคราบสีต่างๆ มักเกิดจากสีของสปอร์ของเชื้อราหรือแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ (Aleksandra et al., 2015; Sravanthi et al., 2015; Bartoli et al., 2014; Abdulla et al., 2008; Filomena et al., 2012) ยกตัวอย่างเช่น พวกแอคติโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์จะผลิตสารที่มีสี (pigment) และขับออกนอกเซลล์ สารสีเหล่านี้ละลายน้ำได้ง่าย ดังนั้นเมื่อฝนตกจะทำให้เกิดการชะล้างสารสีเหล่านี้ให้ไหลไปตามพื้นผิวหน้าของโบราณสถานได้ ทำให้สีด้านนอกของโบราณสถานเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม การที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญเพิ่มจำนวนแล้วเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น จะส่งผลให้โบราณสถานเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ไม่ต้องการ รวมทั้งเกิดการชำรุดทรุดโทรม ทำให้ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่หรือบางชิ้นงานหากเกิดการเสื่อมโทรมมากๆ ทำจะทำให้ไม่สามารถใช้งานได้เลย (Johnson, 1965; Walter, 1968) มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพทางด้านชีววิทยา โดยเฉพาะรายงานที่เกี่ยวข้องกับเชื้อกลุ่มแอคติโนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพ ของโบราณสถาน โบราณวัตถุ และสถาปัตยกรรมที่สำคัญของโลก เช่น

ในปี 2008 Abdulla และคณะ ทำการเก็บตัวอย่างอากาศด้วยเครื่องเก็บอากาศอัตโนมัติ (automated air sampler) จากอากาศภายในโบสถ์ Saint Kantherine Monastery ประเทศอียิปต์ จำนวน 50 ตัวอย่าง เพื่อใช้จำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด พบว่าอาหาร Starch casein agar เจือจาง 10 เท่า มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการใช้แยกเชื้อ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ คือ แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท และรา มีจำนวน 487 65 และ 90 CFU/cm³ ตามลำดับ เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งสิ้น 56 ไอโซเลต จำแนกออกได้เป็น 5 จินัส มี 3 ไอโซเลตที่ไม่สามารถจำแนกได้ โดยแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่จัดอยู่ในจินัส

Streptomyces มีร้อยละ 59 ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ ผลการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 11 ชนิด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น การเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ความสามารถในการผลิตกรด และความสามารถในการผลิตสารสี พบว่า แอคติโนมัยซีทร้อยละ 77 ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบโดยมีรูปแบบของการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน ร้อยละ 12.5 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ ด้านความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญพบว่า เชื้อทดสอบมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายแบบ โดยร้อยละ 40 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ทดสอบในงานวิจัยนี้ได้ทุกชนิด ด้านความสามารถในการผลิตกรด พบว่าร้อยละ 80 ผลิตกรดได้ ด้านความสามารถในการผลิตสารสี พบว่ามีเพียงร้อยละ 34 ที่ผลิตสารสีดำ โดยร้อยละ 45 ผลิตสารสีอื่น โดยสีหลัก เป็น สีน้ำตาล มีบางไอโซเลตที่ผลิตสีเหลือง สีส้ม และสีเขียว

ปี 2012 Filomena และคณะ ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่ม chemoorganotrophic จากถ้ำและสุสานสำคัญ 3 แห่ง คือ สุสาน St. Callistus ซึ่งตั้งอยู่ในกรุงโรมประเทศอิตาลี สุสาน St. Agatha's ตั้งอยู่ในสาธารณรัฐ Malta และถ้ำค้างคาว ใน Zuheros ซึ่งตั้งอยู่ตอนใต้ของประเทศสเปน โดยแยกเชื้อด้วยอาหาร BR11 และ Starch Casein KNO₃ ที่เติม cycloheximide 0.05% เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาแยกแบบแกรม ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน แล้วจัดกลุ่มเชื้อตามรูปแบบที่ได้จาก ITS-PCR แล้วสุ่มเชื้อจากแต่ละกลุ่มมาจำแนกด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNAs พบว่า ตัวอย่างจากสุสาน St. Callistus พบเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่เรีย ส่วนมากอยู่ในสกุล *Streptomyces* คิดเป็นร้อยละ 30.5 เชื้อกลุ่ม Firmicutes สายพันธุ์ที่พบอยู่ในสกุล *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Humibacillus* และ *Staphylococcus* ประมาณร้อยละ 1.7 ถึง 3.4 ตัวอย่างจากถ้ำค้างคาว พบว่า เชื้อร้อยละ 90.6 อยู่ในกลุ่ม Firmicutes โดยจำแนกเป็นสกุลต่างๆ คือ *Bacillus* และ *Paenibacillus* ร้อยละ 42.5 และ 4.6 ส่วนเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่เรีย พบร้อยละ 41.2 จำแนกเป็น 4 สกุล คือ *Streptomyces*, *Blastococcus*, *Micrococcus* และ *Rhodococcus* คิดเป็นร้อยละ 18.4, 5.7, 5.7 และ 3.3 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างจากสุสาน St. Agatha's ไม่พบเชื้อกลุ่ม Proteobacteria จุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* (ร้อยละ 37.3) รองลงมาได้แก่ *Streptomyces* spp. (ร้อยละ 38.2) และ *Pseudonocardia* (ร้อยละ 5.8) ตามลำดับ

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่และวิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ครั้งแรก เดือนมกราคม พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนฤดูหนาว และครั้งที่สอง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559 เป็นตัวแทนฤดูฝน โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโบราณสถานด้วยการกวาดเชื้อ (swab) ตัวอย่างดิน เก็บดินที่ขุดลึกจากผิวน้ำดินลงไป 10 เซนติเมตร (Jeffrey, 2008) จาก 4 ทิศรอบโบราณสถาน คือ ทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก จากโบราณสถาน 5 แห่งในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย คือ วัดชนะสงคราม วัดศรีสวาย วัดตระพังเงิน วัดช้างล้อมและวัดมหาธาตุ

การแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

นำตัวอย่างมาเจือจางลำดับส่วน จาก 10^{-1} จนถึง 10^{-6} จากนั้นจุดตัวอย่างแต่ละความเจือจางตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง Starch Casein Agar (SCA) (Jeffrey, 2008) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนกระทั่งตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อทุกๆ วัน เชื้อเชื้อที่ โคโลนีจม ผงลงในเนื้ออาหาร ผิวหน้าไม่มันวาว คล้ายกำมะหยี่ ซึ่งเป็นสมบัติเบื้องต้นของเชื้อในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย ไปขีดลากใหม่ (re-streak) หลายๆ ครั้ง บนอาหาร Hickey Tresner's agar (HTA) (Abdulla et al., 2008) จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็งเอียง HTA เพื่อการศึกษาในลำดับต่อไป

การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาขีดลาก (cross streak) บนจานอาหารแข็ง HTA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีโดยการส่องภายใต้กล้องสตอร์โอ แล้วบันทึกภาพภายใต้กล้อง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเหลวสูตรกลูโคส (Abdulla et al., 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมโบรโมไทมอลบลู ร้อยละ 1.6 เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ นำแอคติโนแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบทั้ง 83 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารข้างต้น แล้วบ่มในเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องวัดพีเอชเมื่อเวลาครบ 5 วัน เปรียบเทียบกับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ

ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ และเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร HTA จากนั้น นำแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ผลิตโดยบริษัท BBL 10 ชนิด ได้แก่ เจนตามัยซิน (10 µg) สเตรปโตมัยซิน (10 µg) เตตราไซคริน (30 µg) โพลีมัยซิน บี (300 units) กานามัยซิน (30 µg) ไรฟามพิซิน (5 µg) เบซิทรานจีน (10 µg) คลอแรมเฟนิคอล (30 µg) แอมพิซิลิน (10 µg) และอิริโทรมัยซิน (15 µg) มาวางลงในจานอาหารที่เกลี่ยเชื้อไว้จานละ 5 ชนิดสาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง วัดบริเวณสีที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

การจำแนกชนิดของเชื้อ

ใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA โดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี เปรียบเทียบกับข้อมูลของ GenBank โดยวิธีการ BLAST ด้วยฐานข้อมูลของ NCBI

ผลการวิจัย

สภาพแวดล้อมของพื้นที่ศึกษา

จังหวัดสุโขทัย ตั้งอยู่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ที่พิกัด $17^{\circ}01'12.4''\text{N}$ $99^{\circ}42'16.8''\text{E}$ สภาพภูมิอากาศโดยทั่วไปมี 3 ฤดู คือ ฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝน อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปี ประมาณ 27.6 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 33.0 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปี ประมาณ 1,208.8 มิลลิลิตร เดือนมกราคม เป็นเดือนที่อุณหภูมิเฉลี่ยต่ำที่สุด เดือนมิถุนายนเป็นเดือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงที่สุด เดือนที่มีฝนตกเป็นปริมาณมาก อยู่ระหว่างเดือนมิถุนายน ไปจนกระทั่งสิ้นสุดเดือนตุลาคม ปริมาณฝนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 150-230 มิลลิลิตร อุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย ตั้งห่างจากตัวจังหวัดไปทางทิศตะวันตกประมาณ 12 กิโลเมตร สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปภายในบริเวณอุทยานมีการรักษาความสะอาดและการปรับแต่งภูมิทัศน์อย่าง

สม่ำเสมอ ยกเว้นวัดช้างล้อมที่ตั้งอยู่ห่างจากวัดอื่นๆ วัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างมีทั้งส่วนที่เป็นอิฐและศิลาแลง ดินรอบโบราณสถานเป็นสีน้ำตาลอ่อน ถูกอัดจนแน่น มีนักท่องเที่ยวทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติเข้าเยี่ยมชม ทั้งที่เป็นหมู่คณะไม่เป็นหมู่คณะ

ไบโอฟิล์มบนโบราณสถาน

จากการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างจากผิวของโบราณสถานจากวัดที่ตั้งในบริเวณอุทยานฯ 5 แห่ง ได้แก่ วัดช้างล้อม วัดศรีสวาย วัดมหาธาตุ วัดชนะสงคราม และวัดตระพังเงิน พบว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งราที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าซึ่งเห็นเป็นคราบสีต่างๆ โดยเฉพาะสีดำพบเป็นสีหลัก มีเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญรวมตัวกันและเจริญบนผิวของโบราณสถาน เป็นไบโอฟิล์มที่มองเห็นได้อย่างชัดเจนมองเห็นมีลักษณะเป็นคราบสีต่างๆ เช่น สีดำ สีน้ำตาล สีเทา ปะปนกันไป ซึ่งไบโอฟิล์มที่พบจากวัดช้างล้อมสามารถสังเกตได้ชัดเจนที่สุด ส่วนใหญ่มีสีเขียวและสีเทา ซึ่งเป็นไลเคนประเภทต่างๆ ที่พบได้บนพื้นผิวภายนอกรอบเจดีย์ และคราบสีดำจากวัดนี้ปรากฏชัดเจนมากกว่าวัดอื่น ดังรายละเอียดในภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างในบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย

ตารางที่ 1 ลักษณะไบโอฟิล์มและจำนวนไอโซเลตของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากโบราณสถาน

สถานที่เก็บตัวอย่าง	สีไบโอฟิล์มที่ปรากฏ		จำนวนไอโซเลตที่แยกได้		
	ฤดูหนาว	ฤดูฝน	ฤดูหนาว	ฤดูฝน	ผลรวม
วัดช้างล้อม	สีเทาปนเขียว	สีเทาปนเขียว	12	4	16
วัดศรีสวาย	สีดำ สีน้ำตาล	สีเทาเขียว	10	2	12
วัดมหาธาตุ	สีดำ สีเทา	สีน้ำตาล สีดำ	9	4	13
วัดชนะสงคราม	สีดำ สีเทา	สีดำ สีน้ำตาล	12	5	17
วัดตระพังเงิน	สีดำ สีเทา สีเขียว	สีดำ สีน้ำตาล	8	17	25
รวม			51	32	83

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากโบราณสถานอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย

จากการนำตัวอย่างดินและตัวอย่างจากผิวของโบราณสถานมาแยกเชื้อโดยการเกลี่ยเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SCA พบว่า ตัวอย่างที่เก็บจากวัดชนะสงคราม วัดศรีสวาย วัดตระพังเงิน วัดช้างล้อม และวัดมหาธาตุ แยกเชื้อได้จำนวน 17, 12, 25, 16 และ 13 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาวจากวัดชนะสงครามและวัดช้างล้อม สามารถแยกเชื้อได้จำนวนไอโซเลตสูงที่สุด คือ 12 ไอโซเลต ส่วนตัวอย่างที่เก็บใน

ฤดูฝน พบว่าตัวอย่างจากวัดตระพังเงินสามารถแยกเชื้อได้สูงที่สุดคือ 17 ไอโซเลต พบว่าตัวอย่างจากวัดตระพังเงินสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยรวมได้มากที่สุดคือ จำนวน 25 ไอโซเลต และจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ทั้งหมดรวม 83 ไอโซเลต ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องสเตอริโอ พบว่า ขนาดโคโลนีของเชื้อมีทั้งขนาดใหญ่(เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.5 เซนติเมตร) เช่น SW001, SW044 และขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-0.4 เซนติเมตร) เช่น SW003, SR055 สีของเส้นใยและสปอร์มีหลายสีแต่สีที่พบมากที่สุดคือสีเทา สีน้ำตาล และสีขาว มีบางไอโซเลตที่มีสีเหลือง เช่น SW013 เป็นต้น และพบว่าบางไอโซเลต สร้างสารที่มีสีและหลั่งออกนอกเซลล์จนทำให้สีของอาหาร HTA เปลี่ยน เช่น SW024, SW032, SW033, SW035, และ SW037 เป็นต้น ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียภายใต้กล้องสเตอริโอ

การผลิตสารออกนอกเซลล์เมื่อเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ผลจากการนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 83 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรกลูโคสที่ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.8 และเติมบรอมไทม์บลูเป็นอินดิเคเตอร์ เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบวงกลมและควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน เมื่อเพาะเชื้อครบระยะเวลาแล้ววัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสังเกตสีของอินดิเคเตอร์ สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อทดสอบทั้ง 83 ไอโซเลต ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก ผลิตรสารที่ลดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 2 ผลิตรสารที่เพิ่มค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนที่อินดิเคเตอร์ กลุ่มที่ 3 ผลิตรสารที่ลดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากเขียวเป็นเหลือง และกลุ่มที่ 4 ผลิตรสารที่เพิ่มค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากเขียวเป็นน้ำเงิน จำนวน 7, 3, 25 และ 48 ไอโซเลต ตามลำดับ

การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ

เมื่อใช้สารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 83 ไอโซเลต พบว่าเชื้อ 46 ไอโซเลตที่ยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญได้ พบว่า โพลีมัยซิน บี เบซิทรากิน เจนตามัยซิน สเตรปโตมัยซินและกานามัยซิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 83 ไอโซเลต ส่วนแอมพิซิลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่มีจำนวนเชื้อทดสอบจำนวนมากที่ต้านทานยานี้ได้คือ 24 ไอโซเลต ในขณะที่ ไรฟามพิซิน อิริโทรมัยซิน คลอแรมเฟนิคอล และ เตตราซัยคริน มีจำนวนเชื้อที่ต้านทานได้จำนวน 17, 7, 2 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ

การจำแนกชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

ในงานวิจัยนี้ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน 16S rDNA ทำโดยการส่งตัวอย่างแบคทีเรียไปวิเคราะห์ที่บริษัท แมคโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี จำนวน 13 ไอโซเลต ผลการจำแนกสายพันธุ์ พบว่า เชื้อทั้ง 13 ไอโซเลต จำแนกได้เป็น *Streptomyces*, *Nocardiosis* และ *Actinomycetes* จำนวน 10, 2 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนแบคทีเรีย

ลำดับที่	รหัสชื่อ	length	% Identities	Blast report
1	SW023	1485	100	<i>Nocardiopsis</i> sp.
2	SW028	1475	99	<i>Nocardiopsis</i>
3	SW035	1488	99	<i>Streptomyces</i> sp.
4	SW039	1478	100	<i>Streptomyces reticuli</i>
5	SW044	1433	99	<i>Streptomyces</i> sp.
6	SW057	1463	99	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
7	SW060	1003	99	<i>Streptomyces</i> sp.
8	SW069	996	99	<i>Streptomyces flavofuscus</i>
9	SW071	1488	99	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i>
10	SR076	1439	99	<i>Actinomycetes</i> sp.
11	SR078	1009	99	<i>Streptomyces</i> sp.
12	SR079	1425	99	<i>Streptomyces</i> sp.
13	SR080	1485	99	<i>Streptomyces</i> sp.

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นสาย ในจีโนมมีปริมาณเบสกว่าพันกับไซโตซีนสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอคติโนแบคทีเรีย ที่แยกจากโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย จากการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง พบว่าโบราณสถานทั้ง 5 วัด พบการเจริญของเชื้อจนก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มสีต่างๆ ทั้งนี้พบว่าที่วัดช้างล้อมมีไบโอฟิล์มทั้งสีดำและสีเทาออกเขียวเจริญบนพื้นผิวเป็นบริเวณกว้างและเห็นได้ชัดเจนที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโบราณสถานอีก 4 แห่ง ทั้งนี้เนื่องจากวัดช้างล้อม ตั้งอยู่ห่างจากสถานที่เก็บตัวอย่างอีก 4 แห่งที่เหลือ รวมทั้งพบว่ามีนักท่องเที่ยวจำนวนน้อยมาท่องเที่ยวที่วัดนี้ จึงทำให้สถานที่ดังกล่าวไม่ถูกรบกวน ทำให้จุลินทรีย์มีระยะเวลาเพียงพอสำหรับการเจริญ

ก่อให้เกิดไบโอฟิล์มจำนวนมากซึ่งส่งผลให้สีของโบรมีสถานแห่งนี้เปลี่ยนแปลงไป จากผลการศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 83 ไอโซเลต พบว่าสีของเส้นใยและสีของสปอร์ของเชื้อที่แยกได้มีหลายสี ซึ่งสีดังกล่าวย่อมส่งผลโดยตรงต่อสีของพื้นผิวโบรมีสถานที่เชื้อเหล่านี้เจริญอยู่ที่ทำให้สีเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสารที่มีสีและหลังออกมานอกเซลล์ได้ ซึ่งสังเกตเห็นได้เมื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหาร HTA เป็นเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdulla และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารสีได้ ทั้งสีแดงและสีอื่นๆ ด้วย เช่น สีน้ำตาล สีส้ม ซึ่งสารสีที่เชื้อผลิตนี้ย่อมส่งผลต่อสีพื้นผิวของโบรมีสถานด้วยเช่นกัน (Suihko, et al., 2007) ด้านความสามารถในการผลิตสารที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ (ร้อยละ 61.96) ผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างจนสามารถเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม Abdulla และคณะ (2008) ได้ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ด้านนี้เช่นเดียวกัน แต่พบว่าเชื้อผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด อย่างไรก็ตาม การที่เชื้อมีความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่าง ล้วนส่งผลต่อการกักตร่อนวัสดุได้ ในงานวิจัยนี้ ศึกษาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกได้ต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด พบว่า รูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อมีความหลากหลายซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdulla และคณะ (2008) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้พบว่า โพลีมัยซิน บี เบซิทรานซิน เจนตามัยซิน สเตربتมัยซินและกานามัยซิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 83 ไอโซเลต ส่วนแอมพิซิลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่มีจำนวนเชื้อทดสอบจำนวนมากที่ต้านทานได้ คือ 24 ไอโซเลต ในขณะที่ ไรฟามพิซิน อิริโทรมัยซิน คลอแรมเฟนิคอล และ เตตราซัยคริน มีจำนวนเชื้อที่ต้านทานได้จำนวน 17, 7, 2 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลจากการจำแนกชนิดของเชื้อในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อส่วนมากเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน (Filomena, et al., 2012; Sravanthi, et al., 2015; Wang, et al., 2011) ที่ศึกษาการเสื่อมสภาพของโบรมีสถานในประเทศต่างๆ ที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ โดยพบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพมักจะเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Streptomyces*

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกและศึกษาสมบัติพื้นฐานบางประการของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย จากโบรมีสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย พบว่าเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะด้านสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสาเหตุให้สิ่งก่อสร้างเกิดการเสื่อมสภาพ หลายด้าน เช่น เชื้อมีสีต่างๆ รวมทั้งความสามารถด้านการผลิตสารออกนอกเซลล์ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารทั้งที่มีฤทธิ์เป็นกรดและด่างได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ และพบว่าเมื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ในเชื้อสามารถผลิตสารที่มีสีต่างๆ ออกนอกเซลล์ แต่ในงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ทดสอบความสามารถด้านดังกล่าวของเชื้อ จึงควรทำการพิสูจน์ว่าเชื้อสามารถผลิตสารสีและหลังออกนอกเซลล์ได้ จากการทดสอบการตอบสนองของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ พบว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หลายไอโซเลตในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งแนวโน้มนี้แสดงให้เห็นว่าหากต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในโบรมีสถานก็สามารถทำได้ ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ทดสอบการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งหากจะนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง อาจยังไม่มีเหมาะสม ดังนั้นควรมีการศึกษาหาสารอื่นทดแทน โดยควรคำนึงถึงสารที่ไม่ส่งกระทบต่อโบรมีสถานและสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยครั้งนี้ นับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญซึ่งทำให้ทราบสมบัติต่างๆ ในเชิงวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากโบรมีสถานอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัยซึ่งได้เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นคลังเชื้อไว้ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา เพื่อใช้ในการวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2559 ในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abdulla, H., Morshedy, H. and Dewedar, A. (2008). Characterization of actinomycetes isolated from the indoor air of the church of Saint Katherine Monastery, Egypt. *Aerobiologia*. 24, 35-41.
- Bartoli, F., Municchia, A. C., Futagami, Y., Kashiwadani, H. and Moon, K. H. (2014). Biological colonization patterns on the ruins of Angkor temples (Cambodia) in the biodeterioration vs bioprotection debate. *International Biodeterioration & Degradation*. 96, 157-165.
- Filomena, D. L., Agnese, L., Gabrielle, Z. and Clara, E. U. (2012). Chemoorganotrophic bacteria isolated from biodeteriorated surfaces in cave and catacombs. *International Journal of Speleology*. 41(2), 125-136.
- Hueck, H. J., (Eds.). (1968). *The Biodeterioration of Materials. An Appraisal, Biodeterioration of Materials*. New York: Elsevier Publishing Co, Ltd.
- Jeffrey, L. S. H. (2008). Isolation, Characterization and identification of actinomycetes from agriculture soil at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*. 35 (7), 3697-3702.
- Johnson, H. M., (Eds.). (1965). *Concrete Structure: Causes of Deterioration and Preventive Measure*. New York: MacGraw-Hill Book Company.
- Kumer R. and Kumer A. V., (Eds.). (1999). *Biodeterioration of stone in tropical Environment: An overview*. New York: The Getty Conservation institute.
- Sravanthi, V., Babu, Z. F., Gregory, G. W., Elias, S., Seifollah, N., Ley, M. T. and Joshua, R. (2015). Isolation of a sulfur-oxidizing *Streptomyces* sp. From deterioration bridge structure and its role in concrete deterioration. *International Biodeterioration & Degradation*. 97, 128-134.
- Walter, A. H. and Elphicks, J. J. (1968). *Biodeterioration of Materials: Microbiological and Allied Aspect*. Proceedings of the 1st International Symposium Southampton. (pp. 245-252). London: Elsevier Publishing Co, Ltd.