



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต

Screening of Potential Urease Producing Bacteria and Their Abilities
in Calcium Carbonate Formation

นามผู้วิจัย นางสาวปัญจพร อนุรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรางค์ สุธิราวุธ, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิเชียร กิจปรีชาวนิช, Dr.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์บาร์เมศ วรรณะภุติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสีทิจิ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส
และความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต

Screening of Potential Urease Producing Bacteria
and Their Abilities in Calcium Carbonate Formation

โดย

นางสาวปัญจพร อนุรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัญญพร อนุรัตน์ 2557: การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส
และความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรางค์ สุธิราชู, Dr.Agr. 115 หน้า

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างขุยมะพร้าวและปูนซีเมนต์ที่จำหน่ายเป็นการค้าใน
ประเทศไทยในอาหาร NB ที่มีการผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีจำนวนทั้งหมด 114 ไอโซเลท นำ
แบคทีเรียที่ได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสร่วมกับ *B. megaterium* และ *Bacillus* sp. จาก
แหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา 146 ไอโซเลท รวมทั้งหมดเป็น 260 ไอโซเลท โดยใช้อาหาร
Christensen urea agar พบว่า 127 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะ
ไอโซเลทที่สร้างยูรีเอสได้มากโดยใช้อาหาร urea broth ที่มีบัฟเฟอร์สูง พบว่ามี 7 ไอโซเลทให้ผลบวก
ผลการจำแนกชนิดของ 7 ไอโซเลทมีดังนี้ *Bacillus megaterium* A14, *B. thuringiensis* P1-18,
Lysinibacillus sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Lysinibacillus*
sphaericus และ *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus* sp. C31 และ C32 คล้าย *B. cereus*
group และไอโซเลท E34 ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปกลมติดสี่แกรมบวก ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จาก
การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสในอาหารที่มี yeast extract 0.01 และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า
Lysinibacillus sp. 501 และ *Lysinibacillus* sp. 201 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดเท่ากับ
14545.7 และ 14363.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างตะกอนแคลเซียม
คาร์บอเนตโดยใช้อาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 0.025 โมลาร์ และ
ตรวจสอบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยวิธี EDTA titration พบว่าปริมาณตะกอนแคลเซียม
คาร์บอเนตของ *Lysinibacillus* sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 3.7
และ 3.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารให้มากขึ้นพบว่า
Lysinibacillus sp. 201 สามารถให้ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตมากถึง 17.7 กรัมต่อลิตร ในอาหาร
ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์

Panjaborn Anurat 2014: Screening of Potential Urease Producing Bacteria and Their Abilities in Calcium Carbonate Formation. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Surang Suthirawut, Dr.Agr. 115 pages.

One hundred and fourteen bacterial strains were isolated from Thai commercial cement and coir dust samples by nutrient broth supplemented with 2% urea. Including of 146 strains of *B. megaterium* and *Bacillus* sp. from our culture collection, all of 260 strains were primary screened for urease activity by Christensen urea agar. One hundred and twenty-seven strains of urease positive strains were selected and secondary screened on urea broth for selection of high urease producing ones. Seven strains of high urease productivity based on urea broth were obtained and identified as *B. megaterium* A14, *B. thuringiensis* P1-18, unidentified C31 and C32 *Bacillus* sp. that related to *B. cereus* group, *Lysinibacillus* sp. 201 and *Lysinibacillus* sp. 501 that were closely related to both *L. sphaericus* and *L. fusiformis* and unidentified Gram positive coccus E34. The results from study of urease activity showed that *Lysinibacillus* sp. 501 and *Lysinibacillus* sp. 201 gave the highest yield of 14545.7 and 14363.8 Unit/ml, respectively. Calcium carbonate formation of each selected strain were compared by growing in NB supplemented with 2% urea and 0.025 M CaCl_2 and precipitated CaCO_3 were determined by EDTA titration method. *Lysinibacillus* sp. 201 and *Lysinibacillus* sp. 501 gave the highest yield at 3.7 and 3.6 g/l, respectively. Moreover, we found that *Lysinibacillus* sp. 201 could gave yield of precipitated CaCO_3 up to 17.7 g/l by supplemented of 0.2 M CaCl_2 in medium.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรางค์ สุธิราชู อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอนทั้งในด้านวิชาการและข้อคิดที่ดีต่างๆ ทั้งในการดำเนินงานวิจัยและในการดำเนินชีวิต รวมทั้งเป็นผู้ที่สนับสนุนและอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ในงานวิจัย รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บารเมศ วรรณะภูติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอนทั้งในด้านวิชาการและข้อคิดที่ดีต่างๆ ทั้งในการดำเนินงานวิจัยและในการดำเนินชีวิต รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ครู อาจารย์ทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า ทั้งทางด้านวิชาการและการดำเนินชีวิตตลอดจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัว ผู้ซึ่งให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจ ทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จและบรรลุเป้าหมายตลอดระยะเวลาการทำวิจัยจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ปัญญาพร อนุรัตน์
มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	77
สรุป	77
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเอนไซม์ยูรีเอสและ แคลเซียมคาร์บอเนต	92
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ กราฟมาตรฐานและการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส	96
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต และวิธีการคำนวณปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต	100
ภาคผนวก ง วิธีการทดสอบและผลการจำแนกชนิดโดยวิธี biolog	104
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียที่จำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rRNA	110
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ของแบคทีเรีย 3 กลุ่ม	10
2 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตที่เคยมี รายงาน	20
3 รายชื่อเชื้อจากแหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยาที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้	32
4 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างปูนซีเมนต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน และ 4 วัน	41
5 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างขุยมะพร้าว เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน และ 4 วัน	42
6 จำนวนไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ ในอาหาร Christensen urea agar และ อาหาร urea broth	46
7 รหัสและแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากอาหาร urea broth	47
8 ผลการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท	58
9 ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลท	61
10 คุณสมบัติทางสัณฐาน ชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ <i>B. megaterium</i> , <i>B. thuringiensis</i> และ <i>B. cereus</i> เปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลท A14 , P1-18, C31 และ C32	64
11 คุณสมบัติทางสัณฐาน ชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ <i>B. sphaericus</i> เปรียบเทียบ กับแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501	68
12 คุณสมบัติทางสัณฐาน ชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท E34	71
13 เปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียสร้างสปอร์ โดยวิธีดั้งเดิม วิธี Biolog และ 16S rRNA	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพการเกิดแร่แบบ BIB และ BCB	8
2	จำลองลักษณะการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดย ureolytic bacteria	11
3	โครงสร้างจำลองของเอนไซม์ยูรีเอส	15
4	ปฏิกิริยาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต โดยจุลินทรีย์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการย่อยสลายยูเรีย	18
5	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่มีการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตและเชื่อม ระหว่างเม็ดทรายโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	25
6	การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยการเหนี่ยวนำของจุลินทรีย์ที่ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	26
7	การเปลี่ยนแปลงสีในอาหาร Christensen urea agar slant หลังการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส เปรียบเทียบระหว่างผลบวกและชุดควบคุม	44
8	การเปลี่ยนแปลงสีในอาหาร urea broth หลังจากที่ใช้สร้างเอนไซม์ยูรีเอสใน ปริมาณมากจนสามารถเปลี่ยนสีฟีนอลเรดให้เป็นสีบานเย็น เปรียบเทียบ ระหว่างผลบวกและผลลบ	45
9	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (U/ml) ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย 7 ไอโซ เลทที่ให้ผลบวกในอาหาร urea broth เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที นาน 1 วัน	48
10	เปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ แบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์	50
11	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกใน อาหาร urea broth ในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร นาน 5 วัน ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (A) สีของสารละลายก่อนและหลังการไทเทรตด้วยวิธี EDTA titration (B)	51
12	เปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อ ลิตร นาน 5 วัน	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร ที่เวลาต่างๆ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที	54
14	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นเมื่อใส่แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์	57
15	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นเมื่อใส่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์	57
16	การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มใน microtiter plate โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ชุดควบคุม(A), ไอโซเลท C31(B), ไอโซเลท P1-18(C) และ ไอโซเลท C32(D)	59
17	สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรมของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท 201 (1), 501 (2), C31 (3), C32 (4) และรูปร่างสปอร์ (บริเวณหัวลูกศรชี้)	62
18	สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรม ของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท A14 (5), P1-18 (6), E34 (7, 8) และรูปร่างสปอร์(บริเวณหัวลูกศรชี้)	63
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์	98
ง1	วิธีการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog และวิเคราะห์ผลโดยฐานข้อมูล Biolog	105
ง2	การทดสอบต่างๆ ใน microplate ด้วยวิธี Biolog	106

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง3 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท 201(A) และไอโซเลท 501 (B)	107
ง4 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท C31 (C) และ ไอโซเลท C32 (D)	108
ง5 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท E34 (E)	109
จ1 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastN ไอโซเลท 201	111
จ2 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastN ไอโซเลท 501	112
จ3 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastN ไอโซเลท C31	113
จ4 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastN ไอโซเลท C32	114

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต

Screening of Potential Urease Producing Bacteria and Their Abilities in Calcium Carbonate Formation

คำนำ

ในทศวรรษที่ผ่านมาปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม และข้อจำกัดในเรื่องทรัพยากรธรรมชาติได้กลายเป็นปัญหาหลักที่หลายหน่วยงานกำลังกังวลอยู่สำหรับการผลิตวัสดุก่อสร้าง ตัวอย่างเช่น พอร์ตแลนด์ซีเมนต์ กระบวนการผลิตที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในหลายด้าน โดยการผลิตปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์หนึ่งตันจะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หนึ่งตันด้วยเช่นกัน และยังปล่อยฝุ่น เสียงรบกวนและความร้อนที่เกิดขึ้นในสภาพแวดล้อมอีกด้วย ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยเป็นจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับเรื่องนี้เพื่อหาวัสดุทางเลือกแทนซีเมนต์ที่มีการใช้พลังงานในระดับต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสำหรับอุตสาหกรรมการก่อสร้าง การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจทั่วโลก แคลเซียมคาร์บอเนตหรือแคลไซต์เป็นหนึ่งในแร่ที่พบได้ทั่วไป การเกิดผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นสามารถเกิดขึ้นเองในธรรมชาติแต่ต้องใช้ระยะเวลานาน เช่น หินปูนที่มีการตกตะกอน แต่การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์นั้นสามารถเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าการเกิดขึ้นตามธรรมชาติหรือวิธีทางเคมี (Stocks-Fischer *et al.*, 1999) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้ เช่น *Sporosarcina pasteurii*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas putida* (Shirakawa *et al.*, 2011) จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายยูเรียและเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต โดยการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตผ่านกระบวนการย่อยสลายยูเรียนั้น ยูเรียจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนียจะถูกปล่อยออกสู่สภาพแวดล้อม ส่งผลทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้นและทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้นั้นอาจใช้เป็นตัวประสาน ใช้เป็นสารยึดเกาะเม็ดทราย เสริมสร้างความแข็งแรงให้คอนกรีตหรือใช้ในการปรับปรุงดิน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากปูนซีเมนต์และวัสดุธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสามารถสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตและไบโอฟิล์ม และจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่แยกได้และนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสจากแหล่งต่างๆ และการตรวจสอบการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต ไบโอฟิล์ม และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย การผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดและความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต



การตรวจเอกสาร

แคลเซียมคาร์บอเนตและความสำคัญ

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เป็นหนึ่งในสารที่สามารถพบได้ทั่วไปและพบอย่างกว้างขวางในโลก การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate precipitation) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ทั่วไปในการก่อตัวของหินธรรมชาติและมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำจืด น้ำเค็ม และดิน (Castanier *et al.*, 1999; Ehrlich, 1998) ผลึกของหินที่เกิดขึ้นอาจเป็นเม็ดเล็กๆ รูปไข่ปลา (Oolitic) หินปูนที่มีซากดึกดำบรรพ์ (Fossiliferous) และหินปูน ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารละลายแคลเซียมหรือคาร์บอเนตในระบบเป็นสาเหตุให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในธรรมชาติ หรือการเปลี่ยนแปลงของสิ่งไม่มีชีวิต (Abiotic change) เช่น อุณหภูมิหรือความดันที่เปลี่ยนแปลงไป หรือกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต (Biotic change) เช่น กิจกรรมของจุลินทรีย์ ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตในธรรมชาติด้วยเช่นกัน (Castanier *et al.*, 2000) ซึ่งกระบวนการทางเคมีที่ทำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยดังต่อไปนี้ (Castanier *et al.*, 1999)

1. ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน
2. ความเข้มข้นของคาร์บอนอนินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ (dissolved organic carbon)
3. ค่าพีเอชในระบบ
4. ความสามารถของบริเวณที่จะเกิดนิวเคลียสผลึกที่มีอยู่ (Nucleation site)

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแคลเซียมคาร์บอเนต

แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbonate) มีสูตรเคมี CaCO_3 ส่วนประกอบทางเคมีประกอบด้วย CaO ร้อยละ 56 และ CO_2 ร้อยละ 44 มีความแข็ง 3 ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 2.71 สลายตัวเมื่อเผาที่อุณหภูมิ 825 องศาเซลเซียส ลักษณะทางกายภาพแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นผงสีขาวไม่ละลายน้ำแต่ละลายน้ำได้เมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารประกอบที่มีลักษณะต่างกันหลายอย่าง แต่ละลักษณะจะมีชื่อเรียกที่ต่างกัน โดยเฉพาะชื่อของแร่ที่ประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต เรียกว่า แร่แคลไซต์ (Calcite) หรือแคลสปาร์ (Calspar) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ธรรมดาที่สุดของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ผลึกของแคลเซียม

คาร์บอเนต มีหลายชนิดทำให้มีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ด็อกทูลสปาร์ ไอซ์แลนด์-สปาร์ เนลเฮดสปาร์ และชาติน สปาร์ เป็นต้น

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นวัตถุบิขัณกลางที่ผลิตจากหินปูนในอุตสาหกรรมกลางน้ำ และนำไปใช้เป็นวัตถุบิขัณสำเร็จรูปในอุตสาหกรรมปลายน้ำ ด้วยคุณสมบัติเฉพาะของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่เป็นพิษ มีความขาวและความสว่างสูง จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นตัวเติมเต็ม (Filler) และตัวเพิ่มปริมาณ (Extender) ในอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมพลาสติก พีวีซี และอุตสาหกรรมยาง ใช้เป็นส่วนผสมในยาสีฟัน ผงซักฟอกและเวชภัณฑ์ต่างๆ นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตชิ้นส่วนและอุปกรณ์ต่างๆ เช่น คอมพิวเตอร์ โทรศัพท์ สายหุ้มโทรศัพท์ ฉนวนหุ้มสายไฟ ปากกา ยางลบ และแว่นตา เป็นต้น

การเกิดของแคลเซียมคาร์บอเนตในธรรมชาติ

ลักษณะการเกิดของแคลเซียมคาร์บอเนต แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะดังนี้

1. หินคาร์บอเนต (Carbonate Rocks)

หินคาร์บอเนต หมายถึง หินตามธรรมชาติที่ประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เป็นส่วนใหญ่ เป็นแคลเซียมคาร์บอเนตที่ขึ้นเกิดเองตามธรรมชาติในรูปของแร่ประกอบหิน ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะของการเกิดได้ 3 ชนิด

1.1 หินตะกอนคาร์บอเนต (Sedimentary Carbonate Rocks)

การจำแนกชนิดของหินทางธรณีวิทยาของหินตะกอนคาร์บอเนตขึ้นอยู่กับลักษณะการเกิดของแร่องค์ประกอบ ได้แก่

หินปูน (Limestone) เป็นหินตะกอนซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ซึ่งเกิดขึ้นในรูปของแคลไซต์ หรือบางครั้งจะอยู่ในรูปของอะราโกไนต์ (Aragonite) ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีสูตรทางเคมีเหมือนกัน แต่มีรูปผลึกต่างกัน โดโลไมต์ ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) เป็นแร่อีกชนิดหนึ่งที่พบมากในหินปูน โดโลไมต์ส่วนมากจะเกิดการแทนที่โดยปฏิกิริยาของแมกนีเซียมในรูปสารละลายที่เพิ่มขึ้นในหินปูน ในบรรดาหินตะกอนทั้งหมด ประมาณร้อยละ 20 เป็นหินปูนหรือโดโลไมต์หรือผสมกันระหว่างสองชนิดนี้ รวมทั้งสิ่งเจือปนต่างๆ

ชอล์ก (Chalk) เป็นหินปูนร่วนเนื้อละเอียดเกิดในน้ำตื้นประกอบด้วยซากสัตว์ในทะเล

มาร์ล (Marl) เป็นหินปูนเนื้อร่วนเกิดในทะเลสาบ ซึ่งได้แคลเซียมคาร์บอเนตจากลำธารหรือน้ำพุ

ทราเวอร์ทีน (Travertine) เป็นหินปูนที่มีเนื้อหลายแบบขึ้นอยู่กับแต่ละแหล่งที่เกิด อาจมีลักษณะเนื้อแน่น เป็นเส้นใยหรือเป็นชั้นๆ หรืออ่อนนุ่มและมีรูพรุนซึ่งเรียกกันว่า Calcareous Tufa ซึ่ง ทราเวอร์ทีนส่วนใหญ่จะเกิดจากการตกผลึกอย่างรวดเร็วของแคลเซียมคาร์บอเนตรอบๆ น้ำพุร้อน

1.2 หินอัคนีคาร์บอเนต (Ligneous Carbonate Rocks)

เป็นลักษณะพิเศษของหินอัคนีที่มีคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบหลักแม้จะมีปริมาณน้อย แต่ในบริเวณที่ขาดแคลนหินคาร์บอเนตก็สามารถนำมาใช้ทดแทนได้เป็นอย่างดี

1.3 หินแปรคาร์บอเนต (Metamorphic Carbonate Rocks)

เป็นหินปูนหรือโดโลไมต์ที่มีการจัดเรียงรูปผลึกใหม่ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีคือหินอ่อน (Marble) ซึ่งเกิดจากความร้อนและความกดดันจากใต้พิภพ

2. แร่แคลไซต์ (Calcite)

แร่แคลไซต์หรือแคลสปาร์ เป็นแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตมีหลายชนิดทำให้มีชื่อเรียกต่างกัน เช่น ด็อกทูลสปาร์ ไอซ์แลนด์สปาร์ เนล-เฮตสปาร์ และชาตินสปาร์ แร่แคลไซต์ปกติจะมีสีขาวหรือไม่มีสี แต่อาจมีสีอื่นๆ ได้ เช่น สีเทา แดง เขียว น้ำเงิน เหลือง ถ้ามีสิ่งอื่นๆ ปะปน เช่น ไพไรต์ ทองแดง เป็นต้น แร่แคลไซต์เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดเกลือจะเกิดฟองฟู

แคลเซียมคาร์บอเนตชนิดบดจากธรรมชาติ (Ground Calcium Carbonate: GCC)

GCC เป็นแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จากการบดแคลเซียมคาร์บอเนตธรรมชาติ เช่น หินปูน ที่มีความขาวและความบริสุทธิ์สูง หินอ่อนที่เกิดจากหินปูนแปรสภาพด้วยความร้อนและความดัน ทำให้เกิดการตกผลึกใหม่หรือ ซอล์ก ซึ่งเป็นหินปูนเนื้อร่วนละเอียด เกิดในน้ำตื้นที่ประกอบด้วยซากสัตว์ในทะเล และแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น กรรมวิธีในการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตมีหลายขั้นตอน การลดขนาดแร่และการคัดขนาดถือเป็นหัวใจสำคัญของการแต่งแร่ในการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดอนุภาคต่างๆ ตามที่ตลาดต้องการ การผลิต GCC ในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้แร่แคลไซต์ หินปูนหรือหินอ่อนเป็นวัตถุดิบ ซึ่งอาจจะได้จากการทำเหมืองเองหรือจากการรับซื้อวัตถุดิบ คุณสมบัติของแร่วัตถุดิบที่กำหนดไว้ในเบื้องต้น คือต้องมีองค์ประกอบของแคลเซียมคาร์บอเนต มากกว่า 95 และมีความขาวมากกว่าร้อยละ 94 (กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่)

การผลิตปูนซีเมนต์

ในอดีตมีผู้คนมากมายที่พยายามคิดค้นปูนซีเมนต์เพื่อการก่อสร้าง ในปี ค.ศ. 1824 นั้น นายโจเซฟ แอสปดิน ชาวอังกฤษเป็นผู้คิดค้นผลิตปูนซีเมนต์จนสำเร็จและทำการจดทะเบียนการผลิตปูนซีเมนต์อย่างถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามการผลิตในครั้งนั้นได้ปูนซีเมนต์ที่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากใช้ส่วนผสมที่ไม่ถูกต้อง ในปัจจุบันการผลิตปูนซีเมนต์พอร์แลนด์นั้นมีการพัฒนาให้เจริญก้าวหน้ามากขึ้น มีการผสมวัตถุดิบหลายอย่างเพิ่มเติมลงไปในส่วนผสม เช่น ประเภทที่ให้ธาตุแคลเซียม อาทิ หินปูน ดินสอพอง ดินปูนขาว ประเภทที่ให้ธาตุซิลิกอนและอะลูมิเนียม ได้แก่ หินเชล ดินเหนียว หินชนวน นอกจากนี้แล้วยังมีวัตถุดิบอย่างอื่นอีก เช่น แร่เหล็ก ใส่เพิ่มเติมลงไปในส่วนผสมดังกล่าว การผลิตปูนซีเมนต์ จะมีการผลิตอยู่ 2 แบบ ด้วยกันคือ ถ้าวัตถุดิบมีน้ำผสมอยู่มากก็จะใช้การผลิตแบบผสมเปียก กรรมวิธีการผลิตแบบเปียกนั้น วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ ดินสอพองและดินเหนียวถูกนำมาผสมกันให้ได้สัดส่วนเหมาะสมตามที่ต้องการ โดยเติมน้ำลงไปผสมแล้วนำไปบดให้ละเอียดก่อนที่จะป้อนเข้าไปในหม้อเผา (Klin) แต่ถ้าวัตถุดิบมีน้ำอยู่น้อยหรือไม่มีน้ำผสมอยู่เลย จะใช้การผลิตแบบผสมแห้ง ซึ่งกรรมวิธีการผลิตแบบแห้งวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่ หินปูนหินดินดาน จะถูกนำมาผสมกันในสภาพแห้งๆ ให้ได้สัดส่วนที่ต้องการแล้วบดให้ละเอียดก่อนที่จะป้อนเข้าไปในหม้อเผา เมื่อส่วนผสมของวัตถุดิบบดได้แล้วก็จะป้อนเข้าสู่หม้อเผาแบบหมุน (Rotaryklin) อุณหภูมิที่ใช้ในเตาเผา 1,400-1,500 องศาเซลเซียส ณ อุณหภูมินี้วัตถุดิบต่างๆจะถูกหลอมรวมกันเป็น Clinker ที่แข็งไว้ให้เย็นลง จากนั้นนำปูนเม็ดที่เย็นตัวลงนี้มาบดให้ละเอียดอีกครั้งหนึ่งในขณะทำการบดจะมีการเติมยิปซัมลงไปเล็กน้อย ประมาณ 3 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์เพื่อหน่วงเวลาการแข็งตัวของปูนซีเมนต์อันจะเป็นผลทำให้

สะดวกต่อการนำไปใช้งานต่อไปสำหรับกรรมวิธีการผลิตปูนซีเมนต์ในประเทศไทยปัจจุบันนิยมผลิตแบบแห้งซึ่งจัดเป็นกรรมวิธีที่ทันสมัยที่สุดเนื่องจากกรรมวิธีการผลิตไม่ยุ่งยาก และสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงน้อยหม้อเผาปูนซีเมนต์ที่ทันสมัยที่สุดในปัจจุบันสามารถผลิตปูนซีเมนต์ได้ถึง 10,000 ตันต่อวัน ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้ จะได้ คุณภาพของปูนซีเมนต์ ที่มีคุณภาพเท่าเทียมกัน (คณะกรรมการบริหารโครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ.)

ในการผลิตปูนซีเมนต์จะมีขบวนการที่เกี่ยวข้องหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การทำเหมืองผลิตหินปูนเป็นวัตถุดิบป้อนเข้าสู่โรงงานและผ่านเข้าขบวนการผลิตจนกระทั่งได้ผลผลิตเป็นปูนซีเมนต์ ซึ่งกิจกรรมในขบวนการต่างๆ เหล่านั้น ทั้งในส่วนของเหมืองและโรงงาน จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติในบริเวณใกล้เคียงอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ อันเป็นผลให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมา เช่น ปัญหาความเสื่อมโทรมของป่าไม้ ปัญหาจากการชะล้างพังทลายของดิน ปัญหามลพิษทางอากาศ เสียง และความสั่นสะเทือน ปัญหาผลกระทบด้านการคมนาคมขนส่ง ปัญหาผลกระทบด้านสุนทรียภาพและแหล่งธรรมชาติอันควรแก่การอนุรักษ์ ปัญหาผลกระทบต่อสังคมท้องถิ่น เป็นต้น

การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์

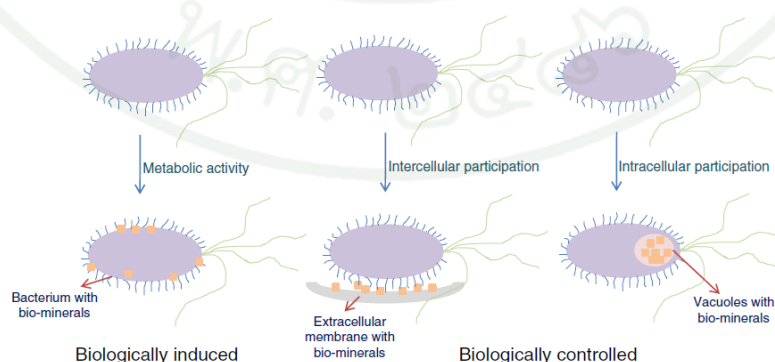
จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทในกระบวนการก่อตัวของแร่ธาตุและเกี่ยวข้องกับการสะสมแร่ธาตุของโลก มีรายงานว่าแบคทีเรียจากดิน น้ำจืด และน้ำเค็มสามารถตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งในธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการได้ การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในธรรมชาติเป็นปรากฏการณ์ทั่วไปที่เกิดโดยแบคทีเรียส่วนใหญ่โดยไม่มีเอนไซม์ยูรีเอสมาเกี่ยวข้อง ส่วนการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตที่แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการก่อตัวของตะกอนคาร์บอเนตและสามารถสะสมคาร์บอเนตในดินได้นั้น จะเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน โดยการย่อยสลายของยูเรียและยังเป็นผลิตภัณฑ์ในเมทาบอลิซึมไนโตรเจน และกระบวนการย่อยสลายยูเรีย (Urea hydrolysis) (Achal *et al.*, 2009a) การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์นั้นใช้เวลาน้อยกว่าการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยวิธีทางเคมีรวมไปถึงสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย (Stocks-Fischer *et al.*, 1999) และการเกิดคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถนำไปใช้ได้ในงานวิศวกรรมและอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การเสริมกำลังของหินปูน และการกำจัดน้ำเสียใต้ดิน ฯลฯ

กระบวนการสะสมแร่ชีวภาพ (Biom mineralization process) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดแร่โดยการตกตะกอนของแร่อนินทรีย์โดยกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตและโปรคาริโอต

(Barabesi *et al.*, 2007) เช่น การสร้าง cystolith (พืชที่มีสภาพขาดแคลนน้ำจะมีโครงสร้างเซลล์ชั้นในสุดที่มีขนาดใหญ่และผนังบางสะสมน้ำเรียกว่า water storage cell หรือเป็นที่สะสมผลึกรูปทุเรียน) ในส่วนใบของพืช รวมทั้งการสร้างกระดูก ฟัน และเปลือกหอยหุ้มร่างกายในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต และมีการสร้างตะกอนแร่ชนิดต่างๆ เช่น แคลไซต์ คาร์บอเนตและซิลิเกต ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต (Stocks-Fischer *et al.*, 1999) และมีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในธรรมชาติสามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ซึ่งการตกตะกอนของแร่อนินทรีย์ในธรรมชาติที่เกิดขึ้นโดยกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต จะเกิดขึ้นโดย 2 กลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. Biologically Induced Biomineralization (BIB) กล่าวคือ สิ่งมีชีวิตจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแร่ ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันไป โดยสิ่งมีชีวิตจะเปลี่ยนสิ่งแวดล้อมที่มันอาศัยอยู่ให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างแร่ ดังนั้นแร่ที่เกิดขึ้นจะไม่มีโครงสร้างพิเศษและกลไกทางชีวโมเลกุลที่จำเพาะเข้ามาเกี่ยวข้อง (Barabesi *et al.*, 2007) ซึ่งโดยส่วนใหญ่การตกตะกอนของแร่จะเกิดโดยกลไกนี้ (Rivadeneya *et al.*, 1994) รวมทั้งการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียด้วย

2. Biologically Controlled Biomineralization (BCB) กล่าวคือ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะควบคุมการเกิดนิวเคลียสผลึก (Nucleation) และการเพิ่มขนาดของผลึก โดยที่สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็จะมีโครงสร้างผลึกในรูปแบบที่แตกต่างกัน และเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสายพันธุ์ ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันไป เช่น การตกตะกอนของแร่แมกเนไทต์ (Magnetite) โดย Magnetotactic bacteria (Bazylinski *et al.*, 1997) และการทับถมกันของซิลิกาในสาหร่ายเซลล์เดียวกลุ่ม Coccolithophores และไดอะตอม (Barabesi *et al.*, 2007)



ภาพที่ 1 แผนภาพการเกิดแร่แบบ BIB และ BCB

ที่มา: Sarayu *et al.* (2014)

Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) เป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นต่าง ประกอบไปด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีรวมไปถึงบทบาทของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและค่าพีเอชที่สูงขึ้นด้วย (Achal *et al.*, 2010) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสจะย่อยสลายยูเรียไปเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนียจะถูกปล่อยไปในสิ่งแวดล้อม ทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้นและเกิดการชักนำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนต และสามารถอธิบายได้ว่าเป็นปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของแคลเซียมไอออนและประจุลบของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Achal and Pan, 2011)

กลไกการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์

กลไกการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์นั้นเป็นกลไกที่มีความซับซ้อนมากกว่าการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยสิ่งไม่มีชีวิต (Tourney and Ngwenya, 2009) โดยจุลินทรีย์นั้นจะมีกลไกการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตที่แตกต่างกันตามแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ คือ

1. จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Photosynthetic organisms) เช่น ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายที่สามารถปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์
2. จุลินทรีย์ที่สามารถรีดิวซ์สารประกอบซัลเฟตไปเป็นซัลไฟด์ (sulfate reducing bacteria) ภายใต้สภาวะ anoxic
3. จุลินทรีย์ที่อยู่ในวัฏจักรไนโตรเจน (Nitrogen cycle) ที่สามารถเกิดกระบวนการ ดังนี้
 - 3.1 กระบวนการ deamination ของกรดอะมิโนในสภาวะที่มีอากาศ (aerobiosis)
 - 3.2 กระบวนการ nitrate reduction ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobiosis) หรือที่มีอากาศน้อย (microaerophily)
 - 3.3 กระบวนการย่อยสลายยูเรียไปเป็นกรดยูริกในสภาวะที่มีอากาศ (aerobiosis) โดยผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส

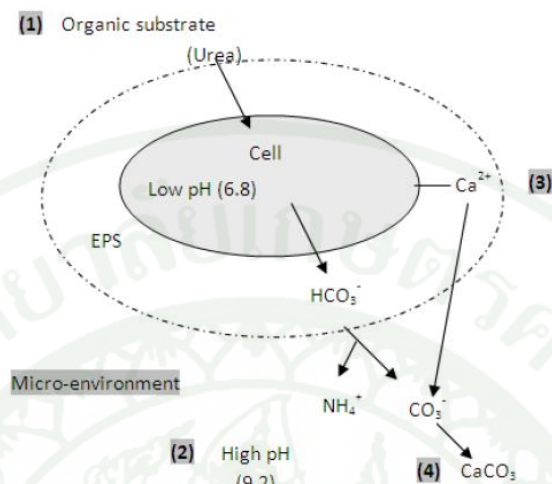
ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้

ชนิดของจุลินทรีย์	ระบบ	ชนิดของผลึกแคลเซียมคาร์บอเนต	อ้างอิง
Photosynthetic organism			
<i>Synechococcus</i>	Meromictic lake	Calcite(CaCO_3)	Douglas and
GL24	Lucene lake	Calcite(CaCO_3)	Beveridge, 1998
<i>Chlorella</i>			Dittrich, 2004
Sulfate reducing bacteria			
<i>Isolate SRB</i>	Anoxic	Dolomite	-
<i>LVform6</i>	hypersaline lagoon	(Ca(Mg)CO_3)	
Nitrogen cycle			
<i>Bacillus pasteurii</i>	Urea degradation in synthetic medium	Calcite(CaCO_3)	Mc.Connaughey, 2000
<i>Bacillus cereus</i>	Ammonification and nitrate reduction	Calcite(CaCO_3)	Castanier <i>et al.</i> , 1999

ที่มา: Ariyanti and Handayani (2012)

จากกลไกของจุลินทรีย์ทั้งหมดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตโดยผ่านการย่อยสลายยูเรียนั้นเป็นกลไกที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและได้ปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตมากที่สุด ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ยูรีเอสที่มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีมากมายหลายสายพันธุ์ เช่น *Acinetobacter* sp. (Sanchez-Moral *et al.*, 2003), *Deleyahlophila* (Rivadeneira *et al.*, 1996), *E. coli* (Bachmeier *et al.*, 2002), *Myxococcus xanthus* (Gonzalez-Munoz *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 1993) และสายพันธุ์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางคือ *Sporosarcina pasteurii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ รูปร่างท่อนและต้องการอากาศ และมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่ง

พลังงาน สร้างแอมโมเนียซึ่งทำให้ค่าพีเอชในสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอเนต เมื่อในระบบมีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก็จะเกิดเป็นตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Stocks-Fischer *et al.*, 1999)



ภาพที่ 2 จำลองลักษณะการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดย ureolytic bacteria

ที่มา: Al-Thawadi (2011)

ขั้นตอนของกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตประกอบด้วย

1. เกิดภาวะ supersaturation ในระบบ เมื่อความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (แคลเซียมไฮดรอกไซด์และคาร์บอเนตไฮดรอกไซด์) มากกว่าความสามารถในการละลายได้ของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีค่าต่ำมาก ดังนั้นจึงเกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในระบบ

2. เกิดการสร้างผลึกนิวเคลียส (Nucleation) โดยขึ้นกับอุณหภูมิและระดับ supersaturation ในระบบ โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นบริเวณที่จะเกิดการสร้างผลึกนิวเคลียส (Nucleation site)

3. การขยายขนาดของผลึกที่เกิดจากผลึกนิวเคลียสจำนวนมากในระบบ โดยจะขึ้นกับระดับของ supersaturation ในระบบ ซึ่งระดับของ supersaturation จะเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับอัตราการไฮโดรไลซิส และสอดคล้องกับลักษณะผลึกของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นด้วย โดยจะเกิดผลึกที่มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (amorphous) และผลึกรูปร่างกลม (vaterite) เมื่อระบบอยู่ในระดับ

high supersaturation และเกิดการละลาย และตะกอนใหม่ในรูปที่มีความเสถียรมากขึ้น คือ เป็นผลึกรูปร่างสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (rhombohedral) เมื่อระบบอยู่ในระดับ low supersaturation

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตที่ถูกชักนำโดยจุลินทรีย์เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดิน สามารถสรุปได้ดังนี้ (Microbial -induced calcium carbonate precipitation; MICP) (Wei *et al.*, 2012)

1. สารอาหาร

สารอาหารเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องมีความเพียงพอและเหมาะสมต่อการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตของจุลินทรีย์ ทั้งในขั้นตอนของการทำกล้าเชื้อและการนำไปประยุกต์ใช้在地 สารอาหารต่างๆ ของแบคทีเรีย คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂), ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca), เหล็ก (Fe) และอื่นๆ การขาดสารอินทรีย์เหล่านี้ในดินจะทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ถูกจำกัด มีงานวิจัยหลายอย่างที่รายงานว่า การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป NB 3 กรัมต่อลิตร นั้นเชื้อแบคทีเรียจะสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ เพราะฉะนั้นการที่เชื้อได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอก็จะสามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้

2. ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นควรเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเร่งการย่อยสลายยูเรียและสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ เช่น แบคทีเรียยีส *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* และ *Desulfotomaculum* เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ควรเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์มาจากกระบวนการหายใจคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาและการสร้างแอมโมเนียจะทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้นอีกด้วย

มีงานวิจัยที่รายงานว่ามีการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *B. sphaericus*, *B. megaterium* และ *B. pasteurii* มาใช้ในกระบวนการชักนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อ งานวิจัยต่างๆ (De Muynck *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2006; Barabesi *et al.*, 2007; Tiano *et al.*, 1999; Castanier *et al.*, 2000; Lee, 2003) เช่น การปรับปรุงดิน การเสริมสร้างความ

แข็งแรงของคอนกรีต แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ถูกชักนำโดยแบคทีเรียนั้น ก็ขึ้นอยู่กับชนิดที่แตกต่างกันของสายพันธุ์ *Bacillus* ด้วย

3. รูปทรงของแบคทีเรียที่มีความเหมาะสม

แบคทีเรียที่อยู่ในดินจะมีขนาดประมาณ 0.5-3.0 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในดินจะเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคของดินด้วยเช่นกัน ถ้าแบคทีเรียมีขนาดเล็กกว่าอนุภาคของดินแบคทีเรียก็จะสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ดังนั้นการเลือกขนาดของดินที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อปรับปรุงดินควรเลือกให้เหมาะสมกับขนาดของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยด้วย เพื่อไม่ให้เป็นการยับยั้งการกระจายของแบคทีเรียในดิน

4. ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย

การใช้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เชื้อแบคทีเรียชักนำให้เกิดการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากด้วยเช่นกัน เนื่องจากอัตราการย่อยสลายยูเรียมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Stocks-Fischer *et al.* (1999) ที่ชี้ให้เห็นว่าการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ *B. pasteurii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสด้วยเช่นกัน

5. อุณหภูมิ

เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส กิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์จะค่อนข้างต่ำ อัตราการย่อยสลายยูเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสก็ไม่ส่งเสริมให้การย่อยสลายยูเรียเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด เพราะฉะนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตควรมีความเหมาะสมกับงานวิจัยนั้นๆ เช่น การนำแบคทีเรียไปใช้ในดิน ก็ควรเลือกแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในอุณหภูมิของดินนั้นได้ จากงานวิจัยของ Sahrawat (1984) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสนั้นจะอยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 10 องศาเซลเซียส และสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiao *et al.*, 2005 และ Chen *et al.*, 1996 ด้วยเช่นกัน แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสดังกล่าว ก็ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้จริงในการปรับปรุงดินและในห้องปฏิบัติการ

6. ความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายยูเรีย 1 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะทำปฏิกิริยากันและทำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตขึ้น ซึ่งหากในสารละลายมีความสมดุลของสองสารนี้ก็จะชักนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดี จากปริมาณสารสัมพันธ์พบว่า สัดส่วนของยูเรียต่อแคลเซียมคลอไรด์ควรจะเป็น 1: 2.5 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต โดยพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลของยูเรีย คือ 60 กรัมต่อโมลาร์ และน้ำหนักของแคลเซียมคลอไรด์ คือ 147 กรัมต่อโมลาร์ และศึกษาผลของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์สูงจะเพิ่มปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยเช่นกัน (Nemati *et al.*, 2005)

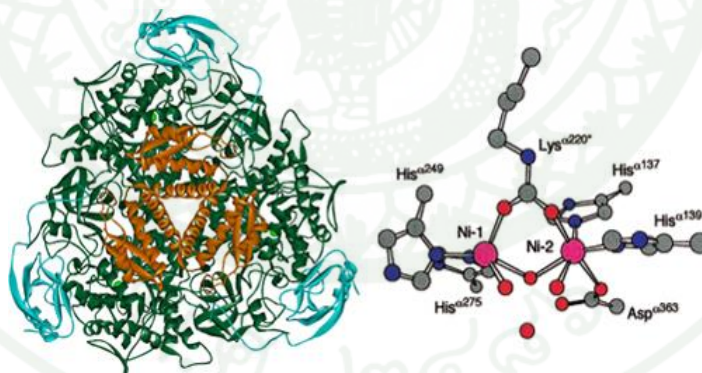
7. ค่าความเป็นกรดต่าง

การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตเริ่มต้นจากการที่ยูเรียถูกย่อยโดยเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งเอนไซม์ยูรีเอสได้มาจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นรอบเซลล์ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อพีเอชที่เหมาะสมเช่นเดียวกับเอนไซม์ยูรีเอส ระดับพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ยูรีเอส อยู่ในช่วง 7.5-8.0 และกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากพีเอช 6.0 จนถึง 8.0 ซึ่งเป็นจุดที่กิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด และกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงเมื่อพีเอชสูงมากขึ้น (Stocks-Fisher *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามที่พีเอช 9.0 เอนไซม์ยูรีเอสก็ยังคงทำงานและมีกิจกรรมได้ การที่ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายยูเรียนั้น จะเกิดแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์เมื่อพีเอชสูงขึ้น ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียจะต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับพีเอชที่เกิดขึ้น เพื่อสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเพื่อย่อยสลายยูเรีย

เอนไซม์ยูรีเอส

เอนไซม์ยูรีเอส (Urease, Urea amidohydrolase; 3.5.1.5) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของนิกเกิล(Ni) อยู่ตรงกลาง 2 อะตอม การย่อยสลายยูเรียจะทำให้เกิดเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย James Sumner จากแปลงปลูกถั่วพุ่ม เมล็ดยาว (*Canavalia ensiformis*) หรือที่เรียกว่า jack bean ในปี 1926 (Sumner *et al.*, 1926) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่ายและพืชนอกจากนั้นยังเป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางในวงการการแพทย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อ

โรคในระบบทางเดินปัสสาวะของคน เช่น *Proteus mirabilis* ส่วน *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณลำไส้เล็กและมะเร็งกระเพาะอาหาร (Zhu-Ping *et al.*, 2007) ตัวอย่างวิธีการตรวจการติดเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหาร โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส วิธีแรกคือ Rapid urease test (RUT) ถือว่าเป็นการตรวจสำหรับการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ง่าย รวดเร็ว สะดวก และมีประโยชน์สูงสุดในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษาโรคนี้นมาก่อน โดยการตรวจด้วยวิธีนี้อาศัยคุณสมบัติของ *H. pylori* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้เป็นจำนวนมาก เอนไซม์นี้จะเปลี่ยนยูเรียให้เป็นแอมโมเนีย และไบคาร์บอเนต ซึ่งทำให้พีเอชของชุดทดสอบเปลี่ยนจากสีเหลืองกลายเป็นสีแดง วิธีการทำคือ เอาชิ้นเนื้อที่ตัดออกจากกระเพาะอาหารใส่หลอดเล็กๆ ของชุดตรวจสำเร็จรูปที่เรียกว่า CLO test ซึ่งภายในหลอดจะมียูเรียและ sensitive color indicator ถ้าในหลอดนี้เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง อ่านผลว่า positive แสดงว่ามีการติดเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหาร หรือการตรวจด้วยวิธีการเป่าลมหายใจและวัดหาระดับยูเรีย (Urea Breath Test) วิธีการตรวจวินิจฉัยนี้เรียกว่า Urea breath test C-14 ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความแม่นยำสูงปลอดภัย โดยคนไข้ไม่ต้องเจ็บตัว โดยให้กินยูเรียแคปซูล (Urea Capsule) ที่มีลักษณะคล้ายยาเม็ดและรอประมาณ 20 นาที หากในกระเพาะอาหารมีเชื้อนี้ จะมีการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งจะเปลี่ยนยูเรียให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย โดยก๊าซจะถูกขับออกมาทางลมหายใจ (Wilson *et al.*, 2008)

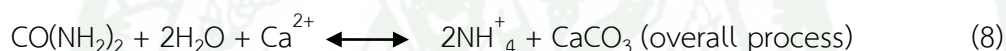
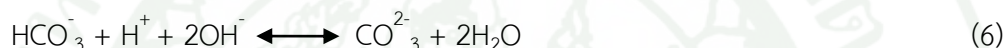
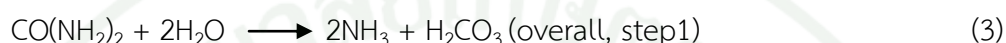
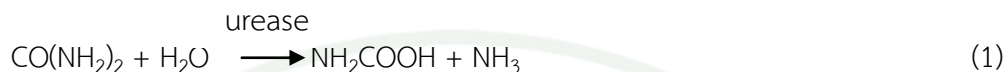


ภาพที่ 3 โครงสร้างจำลองของเอนไซม์ยูรีเอส

ที่มา: Laboratory of Bioinorganic Chemistry

เอนไซม์ยูรีเอสมีบทบาทสำคัญในการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตของจุลินทรีย์ เช่น *Sporosarcina pasteurii* หรือชื่อเดิมคือ *Bacillus pasteurii* เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มียีนที่เจาะจงในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease cluster gene) ซึ่งจะชักนำให้เกิดการสร้างแคลเซียม

คาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าจุลินทรีย์ที่ไม่มียีนนี้ เช่น *E. coli* การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตจะเกิดผ่านกระบวนการย่อยสลายยูเรีย เมื่อแอมโมเนียถูกปลดปล่อยออกจากกระบวนการย่อยสลายยูเรียแล้วจะทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้นและส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต (Wei *et al.*, 2012) ดังสมการ



สมการเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตโดยกระบวนการย่อยสลายยูเรีย

จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าแบคทีเรียจะมีการใช้ยูเรีย ($\text{CO(NH}_2)_2$) เป็นแหล่งพลังงาน โดยที่ 1 โมลาร์ของยูเรีย จะเกิดผลิตภัณฑ์คือ คาร์บาเมต (NH_2COOH) 1 โมลาร์ และแอมโมเนีย 1 โมลาร์ (NH_3) ซึ่งแอมโมเนียจะทำให้ค่าพีเอชในระบบสูงขึ้น และความเข้มข้นของคาร์บอนอนินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งในที่นี้ คือ คาร์บอเนตไอออน (CO_3^{2-}) จะถูกควบคุมโดยปริมาณคาร์บาเมต ซึ่งค่าพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนอนินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ในระบบเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต ดังสมการ(1-6) กล่าวคือ จากสมการ (2) คาร์บาเมตจะถูกย่อยได้เป็นแอมโมเนีย 1 โมลาร์ และกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) 1 โมลาร์ ซึ่งกรดคาร์บอนิกจะแตกตัวให้ไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) และแอมโมเนีย 2 โมลาร์ จะแตกตัวให้แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) อย่างละ 2 โมลาร์ ดังสมการ (4-5) ซึ่งเมื่อมีไฮดรอกไซด์ไอออนในระบบจะทำให้ค่าพีเอชในระบบสูงขึ้น และจะไปรบกวนสมดุลของไบคาร์บอเนตไอออน ส่งผลให้เกิดคาร์บอเนตไอออนดังสมการที่ (6) ซึ่งค่าพีเอชในระบบที่เป็นกลางจะเกิดไบคาร์บอเนตไอออนเป็นหลักมากกว่าคาร์บอเนตไอออน เมื่อพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้นแอมโมเนียจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออนและเกิดสมดุลที่ค่าพีเอชประมาณ 9.3 นอกจากนั้นค่าพีเอชยังส่งผลต่อความสามารถในการละลายของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วย แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ที่ได้จากการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ลงในระบบ จะเข้าจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากประจุลบบนผนังเซลล์ และเข้าจับกับคาร์บอเนตไอออน เกิดเป็นตะกอน

แคลเซียมคาร์บอเนต (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Whiffin, 2004; Dejong *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2009)

เมื่อระยะเวลาผ่านไป กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสจะลดลง เนื่องจากการสะสมสารที่เอนไซม์สร้างขึ้น การสลายตัวของเซลล์แบคทีเรีย การชะล้างออกจากระบบ (wash out) รวมทั้งการที่ผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตถูกห่อหุ้มและมีความพรุน ซึ่งความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น หรือการเกิดสารพิษในระบบ รวมทั้งอุณหภูมิที่สูงขึ้น มีส่วนเร่งให้เกิดการสลายตัวของเซลล์และสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายยูเรียในที่สุด

โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์และการเกิดผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ ก. Hydrolysis (การย่อยสลาย) ข. Acid – base Equilibrium (การสมดุลกรดต่าง) ค. Precipitation (การตกผลึก) ดังนี้

ก. Urea hydrolysis

กระบวนการนี้เป็นปฏิกิริยาไม่ย้อนกลับ ซึ่งยูเรียทำปฏิกิริยากับน้ำ และเกิดสารแอมโมเนียมและคาร์บอเนต ในสถานะที่เป็นกลาง คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) จะแปรสภาพเป็นไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ซึ่งจะทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพีเอช แอมโมเนียม (NH_4^+) จะแยกตัวเป็นแอมโมเนีย (NH_3) จนเกิดสภาวะสมดุลกรดต่าง ระหว่าง $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ และ $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ที่ค่าพีเอชประมาณ 9.3

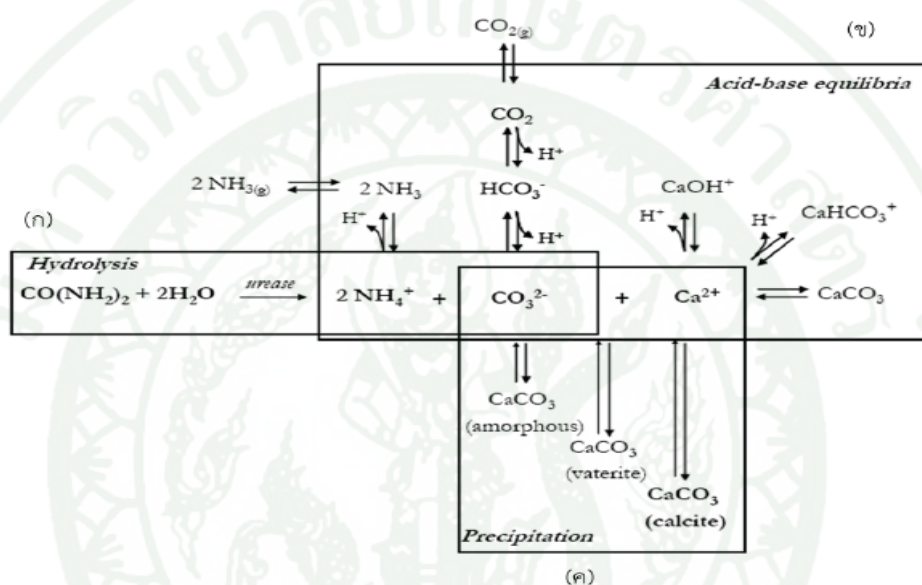
กระบวนการย่อยสลายยูเรียด้วยปฏิกิริยาทางเคมีนั้น จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น (ถึงประมาณ 14 เท่า) โดยเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย ยีสต์บางชนิดและพืช

ข. Acid – base Equilibrium

เมื่อเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสและก่อให้เกิดแอมโมเนียมและคาร์บอเนต ในสารละลายเหล่านี้จะแปรสภาพออกเป็นหลายรูปแบบ เช่น แอมโมเนีย แอมโมเนียม คาร์บอเนต กรดคาร์บอนิก ไฮดรอกไซด์และโปรตอน เมื่อมีแคลเซียมไอออนในสารละลาย จะทำให้เกิดสารประกอบขึ้นหลายชนิด เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไบคาร์บอเนตและแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณสารประกอบเหล่านี้ ขึ้นอยู่กับสมดุลกรดต่าง อุณหภูมิและความเค็มในสารละลาย

ค. Precipitation of calcium carbonate

ขั้นตอนการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต ประกอบด้วย Nucleation, Crystal growth และ secondary change in crystal lattice แต่ละขบวนการนี้มีอัตราที่แตกต่างกัน และต่อเนื่องกันในสภาวะอุณหภูมิและแรงดันปกติ ผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตจะมีเสถียรภาพและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงง่าย



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการย่อยสลายยูเรีย (ก, ข และ ค ดังที่อธิบายไว้ข้างต้น)

ที่มา: Paassen (2009)

จุลินทรีย์ที่จะสามารถนำมาใช้เพื่อการประยุกต์ใช้ในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้นั้นจะต้องมีความสามารถทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมได้สูง และต้องมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสที่มีกิจกรรมสูง ซึ่งสามารถแบ่งจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูง ออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการตอบสนองต่อแอมโมเนีย คือ

1. จุลินทรีย์ที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียในระบบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes autrophus*, *B. megaterium* (Kaltwasser et al., 1972) และ *Klebsiella aerogenes* (Friedrich and Magasanik, 1977) เนื่องจากการมีแอมโมเนียในเซลล์จะชักนำให้มีการสร้างกลูตาามีนในเซลล์ซึ่งจะป้องกันการย่อยสลายยูเรียนั่นเอง

2. จุลินทรีย์ที่แอมโมเนียในระบบไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส เช่น *Sporosarcina pasteurii* (*Bacillus pasteurii*), *Proteus vulgaris* และ *Helicobacter pylori*

เนื่องจากในระบบจะมีความเข้มข้นของยูเรียที่จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ยูรีเอสสูง ดังนั้น จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้จะต้องอยู่ในกลุ่มที่ 2 คือ แอมโมเนียในระบบไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งในปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Sporosarcina pasteurii* เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง และไม่เป็นเชื้อก่อโรคอีกด้วย (Fujita *et al.*, 2000; Mobley *et al.*, 1995)

ในปัจจุบันมีการศึกษามากมายเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต นอกจากการใช้ *Sporosarcina pasteurii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินแล้ว ยังมีการใช้ จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น เช่น การใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus leopoliensis*, *Prochlorococcus* sp., *Trichodesmium erythraeum* (Aloisi, 2008; Planavsky *et al.*, 2009) การใช้ microalgae (Ariyanti and Handayani, 2012) รวมทั้งการใช้แบคทีเรียอื่น เช่น *B. sphaericus* (De Muyndck *et al.*, 2008a,b; Dick *et al.*, 2006) *B. lentus* (Dick *et al.*, 2006) *B. subtilis* (Barabesi *et al.*, 2007; Tiano *et al.*, 1999) *B. cereus* (Castanier *et al.*, 2000; Metayer-Levrel *et al.*, 1999) และ *B. amyloliquefaciens* (Lee, 2003) ซึ่ง *Bacillus* แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในปริมาณมาก และมีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงด้วยเช่นกัน (Dick *et al.*, 2006) จากการที่หลายงานวิจัยนำ *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ มาเพื่อใช้ในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น เนื่องจากแบคทีเรียนี้ส่วนมากจะพบได้ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในดิน และมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Rivadenryra *et al.*, 1993; Boquet *et al.*, 1973)

จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่ใช้ในงานวิจัยเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต ได้แก่ *Myxococcus xanthus* (Jimenez-Lopez *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตบนหินปูนได้มากกว่า *B. cereus* (Castanier *et al.*, 2000) เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ลงไปรูพรุนของหินปูนได้ ส่งผลให้เกิดการเชื่อมอนุภาคดินทั้งบนพื้นผิวและภายในหิน (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003) และ *Pseudomonas fluorescens* ที่สามารถตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดี เพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะที่เป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นของแคลเซียมในระบบสูง (Anderson *et al.*, 1992) เป็นต้น

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตที่เคยมีรายงาน

จุลินทรีย์	อ้างอิง
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	Tiano <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus cereus</i>	Le Metayer-Levrel <i>et al.</i> , 1999; Castanier <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus sphaericus</i>	Dick <i>et al.</i> , 2006; De Belie <i>et al.</i> , 2008; De Muynck <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Baskar <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilis</i>	Ferrer <i>et al.</i> , 1988
<i>Bacillus fusiformis</i>	Ben Chekroun <i>et al.</i> , 2004; Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> , 2003; Gonzalez-Munoz <i>et al.</i> , 2008; Jroundi <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Jonkers <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus cohnii</i>	Jonkers <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus megaterium</i>	Lian <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus licheniformis</i>	Tourney and Ngwenya, 2009
<i>Bacillus lentus</i>	Dick <i>et al.</i> , 2006
<i>Proteus vulgaris</i>	Whiffin, 2004
<i>Proteus mirabilis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas putida</i>	May, 2005
<i>Myxococcus xanthus</i>	Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> , 2003; Jroundi <i>et al.</i> , 2010; Ettenauer <i>et al.</i> , 2011; Baskar <i>et al.</i> , 2006
<i>Acinetobacter</i> sp.	Heyrman <i>et al.</i> , 1999; Cacchio <i>et al.</i> , 2003; Barrientos-Diaz and Gidekel, 2008;
<i>Arthrobacter</i> sp.	Fredrickson <i>et al.</i> , 2004; Van Waasbergen <i>et al.</i> , 2000
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Achal <i>et al.</i> , 2011; Bang <i>et al.</i> , 2008; Ramachandran <i>et al.</i> , 2001; Ramakrishnan, 2007; Day <i>et al.</i> , 2003
<i>Shewanella</i> sp.	Ghosh <i>et al.</i> , 2005
<i>Mytilus californianus</i>	Heyrman <i>et al.</i> , 1999
<i>Micrococcus</i> sp.	Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> , 2003
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>Nocardia calcaria</i>	Ercole <i>et al.</i> , 2012

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	อ้างอิง
Cyanobacteria	
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	Zippel <i>et al.</i> , 2009
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Zippel <i>et al.</i> , 2009
<i>Prochlorococcus</i> sp.	Planavsky <i>et al.</i> , 2009
<i>Phormidium</i> sp.	Aloisi, 2008
<i>Phormidium crobyanum</i>	Kremer <i>et al.</i> , 2008
<i>Schizothrix</i> sp.	Foster <i>et al.</i> , 2009
<i>Dichothrix</i> sp.	Planavsky <i>et al.</i> , 2009
<i>Nostoc</i> sp.	Susana <i>et al.</i> , 2002
<i>Oscillatoria</i> sp.	Susana <i>et al.</i> , 2002
<i>Planktothrix</i> sp.	Susana <i>et al.</i> , 2002
<i>Spirulina</i> sp.	Susana <i>et al.</i> , 2002

ที่มา: Sarayu *et al.* (2014)

การแตกตัวของแผ่นคอนกรีตสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วไป ซึ่งไม่ได้เกิดขึ้นภายในทันทีและไม่ได้มีการบำรุงรักษาอย่างเหมาะสม นักวิทยาศาสตร์จึงมีความสนใจในการใช้แบคทีเรียเพื่อแก้ปัญหาโดยวิธีทางชีวภาพเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตและเชื่อมประสานระหว่างเม็ดดิน และเนื่องจากคอนกรีตมีค่าพีเอชที่เป็นด่างมาก หรือค่าพีเอชประมาณ 12.5 แต่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดหรือพีเอชต่ำกว่า 6.5 คอนกรีตจะเริ่มเกิดความเสียหายขึ้น เช่น โครงสร้างสูญเสียกำลังและความแข็งแรง ความพรุน และความสามารถซึมผ่านของน้ำในคอนกรีตเพิ่มขึ้น ทำให้ความทนทานลดลง ค่าพีเอชของคอนกรีตลดลงอย่างมากและการสูญเสียมวลหรือน้ำหนักคอนกรีต ตัวอย่างของกรดที่สามารถกัดกร่อนคอนกรีตอย่างรุนแรงคือ กรด Carbonic, Hydrochloric, Hydrofluoric, Nitric, Phosphoric, Sulfuric, Acetic, Citric, Humic, Lactic และ Tannic ด้วยเหตุนี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เป็นเหตุผลในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและมีความสามารถในการสร้างสปอร์ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อปรับปรุงดินที่มีการรวมตัวเป็นหินปูนและช่วยฟื้นฟูการแตกของคอนกรีต (Achal *et al.*, 2009b)

การประยุกต์ใช้ Microbially Induced Calcium carbonate Precipitation ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายยูเรีย ตัวอย่างของการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ดังนี้

1. การบำบัดน้ำเสียที่มีแคลเซียมปนอยู่

การใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรียในน้ำเสียของโรงงานนั้น คือการนำสารละลายแคลเซียมออกจากน้ำเสียของโรงงานที่รีไซเคิลกระดาษ (Van *et al.*, 1997) ความเข้มข้นที่สูงของแคลเซียมในน้ำเสียนั้นจะทำให้เกิดปัญหาการอุดตันในท่อและถังหมักของโรงงานทำงานผิดปกติ และเพื่อให้เป็นไปตามกฎหมายเกี่ยวกับการจัดการน้ำ (Clean Water Act) คือน้ำเสียที่ปล่อยออกมานั้นต้องมีไนโตรเจนในปริมาณน้อยและมีค่าพีเอชที่มีความเป็นกลาง ซึ่งการนำแคลเซียมออกจากน้ำเสียนั้นสามารถทำได้โดยเติมสารเคมีที่เป็นด่างลงไปเพื่อให้แคลเซียมเกิดการรวมตัวขึ้น แต่วิธีทางเคมีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงและทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมมีความเป็นด่าง (Hammes *et al.*, 2003b) วิธีที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งคือการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย ซึ่งในน้ำทิ้งมีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่รวมตัวกันอยู่มาก ซึ่งทำโดยการเติมยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำๆ ลงไปในระบบเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมในขณะเดียวกันค่าพีเอชและไนโตรเจนก็ยังอยู่ในระดับที่เหมาะสมอีกด้วย

2. การปรับปรุงคุณภาพดิน (Biogrout)

การปรับปรุงคุณภาพดินนั้นสามารถทำได้โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย ซึ่งจะสามารถลดการซึมผ่านของน้ำได้ (Stocks-Fischer *et al.*, 1999) สามารถทำได้โดยใช้สารละลายของเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีฉีดหรือพ่นลงไปในดินด้วยอัตราและความดันสูงทำให้ดินมีความแข็งแรงมากขึ้นเนื่องจากการซึมผ่านของน้ำลดลง

3. การป้องกัน พื้นฟูรูปปั้น อนุสาวรีย์และการสร้างปูนสำเร็จรูปชีวภาพ

ปัจจัยทางชีวภาพและทางเคมีเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อนุสาวรีย์หรือรูปปั้นต่างๆ ที่มีความสำคัญเกิดการผุกร่อน เช่น การสัมผัสกับสารเคมี ความชื้นที่แทรกซึมเข้าไปถึงวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง (Chunxiang *et al.*, 2009) ทำให้วัสดุเหล่านั้นสูญเสียการเกาะติดหรือประสานกัน ดังนั้นจึงมีผู้สนใจที่จะทำให้อนุสาวรีย์หรือรูปปั้นเหล่านั้นชะลอการทรุดโทรม การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม ureolytic โดยการศึกษาในคอนกรีตที่มีรอยแตกร้าว พบว่าการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการ

สร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นสามารถเชื่อมประสานรอยที่แตกร้าวของคอนกรีตได้ นอกจากนั้นยังเพิ่มความแข็งแรงและลดการซึมน้ำของคอนกรีตอีกด้วย

ตัวอย่างของการประยุกต์ใช้ได้แก่งานวิจัยของ Metayer-Levrel *et al.* (1999) ประสบความสำเร็จในการทำปูนสำเร็จรูปชีวภาพ ที่เป็นส่วนผสมของซีเมนต์ น้ำและทรายละเอียดเพื่อใช้เติมช่องว่างในการก่อสร้างเพื่อให้เกิดการเชื่อมประสานโดยมีการฉีดพ่นสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่มีแคลเซียมและยูเรียผสมไปที่ผิวของหินปูน ทำให้มีการสร้างและสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดขึ้นที่ผิวของวัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง

4. การเพิ่มความสามารถในการเก็บเกี่ยวน้ำมัน

เนื่องจากในกระบวนการผลิตน้ำมัน น้ำมันดิบที่อยู่ในแหล่งเก็บจะมีความหนืดค่อนข้างมาก ดังนั้นเมื่อจะเก็บเกี่ยวน้ำมันขึ้นมาจากแหล่งเก็บกักเพื่อให้เข้าสู่บ่อน้ำมันทำให้ได้ผลผลิตน้อย จึงต้องมีการฉีดก๊าซลงไป เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจน เพื่อลดความหนืดของน้ำมันในแหล่งเก็บ ซึ่งก๊าซจะแพร่เข้าไปในน้ำมันทำให้ง่ายต่อการปั๊มขึ้นมา อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดแรงดึงผิวโดยแบคทีเรียที่มีการฉีดเข้าไปนั้นจะมีการสร้าง biosurfactant ผ่านกิจกรรมของกระบวนการหมัก อย่างเช่นการใช้กากน้ำตาล (molasses) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันมาก คือ *Coryneform bacteria* เช่น สายพันธุ์ *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* รวมไปถึงจุลินทรีย์กลุ่มอื่น คือ *Clostridium pasteurianum* และ *Bacillus sp.* (Bryant, 1987)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hammes *et al.* (2003a) ได้คัดแยกเชื้อจากดินที่อยู่บริเวณผิวก้อนซีเมนต์ที่เพิ่งตัดใหม่ๆ ได้ 12 ไอโซเลทและนำมาเลี้ยงในอาหาร precipitation agar ที่มีส่วนผสมของ NA ยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ 5 และ 10 วัน พบว่าทั้ง 12 ไอโซเลทนี้สามารถสร้างผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตได้ใน 10 วัน หลังจากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งที่มีรูปร่างและขนาดต่างกัน หลังจากนั้นนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเบื้องต้นในอาหาร urease test agar และพบว่าทั้ง 12 ไอโซเลทที่คัดแยกได้นั้นให้ผลเอนไซม์ยูรีเอสเป็นบวก ส่วนการหากิจกรรมเอนไซม์นั้นใช้วิธี Nessler assay แต่มีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงและเมื่อนำไปจัด

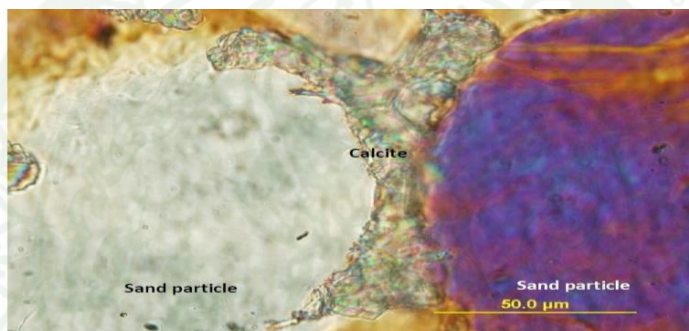
จำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าเชื้อที่แยกได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม *Bacillus sphaericus*

รายงานการศึกษาของ Lee (2003) รายงานว่าเนื่องจากในทศวรรษนี้รูปปั้นหินปูนและอนุสาวรีย์ประวัติศาสตร์กำลังเผชิญกับความเสื่อมสภาพเนื่องจากการผุกร่อนและมลพิษจากชั้นบรรยากาศทำให้ต้องหาวิธีการอนุรักษ์รูปปั้นและหินปูนเหล่านี้ จากข้อมูลต่างๆทำให้ผู้วิจัยทราบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวเลือกที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อการฟื้นฟูรูปปั้นและอนุสาวรีย์ต่างๆ แต่พบว่ากระบวนการนี้ต้องมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการศึกษาการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตจากจุลินทรีย์จึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนสภาวะที่มีความเป็นด่าง คือ ค่าพีเอช 7-9 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้และเมื่อนำไปสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ Scanning electron microscope (SEM) พบว่ารูปร่างของแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นแบบ rhombohedral

รายงานการศึกษาของ Achal *et al.* (2009, 2010, 2011) ซึ่งได้ทำการวิจัยโดยการคัดแยกเชื้อจากดินที่มีความเป็นด่างและปูนซีเมนต์ แล้วศึกษาคุณสมบัติต่างๆคือ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส การผลิต Extracellular polymeric substance ไบโอฟิล์มและการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น เมื่อนำมาจำแนกคุณสมบัติทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุลพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *B. megaterium*, *B. simplex* และ *Bacillus* sp. ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารต่างๆเพื่อตรวจสอบกิจกรรม คือ ในการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส ไบโอฟิล์ม และการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ผสมกับยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ และ CaCl_2 0.025 โมลาร์ และเมื่อเวลาผ่านไป 5 วันก็จะให้ค่ากิจกรรมสูงในทุกๆกิจกรรมและมีค่ากิจกรรมที่มีความสัมพันธ์กัน โดยคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียในกลุ่ม MICP คือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การผลิต Extracellular polymeric substance ไบโอฟิล์มและการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต และผู้วิจัยยังได้ศึกษา microbial concrete โดยศึกษาแรงอัดและการดูดซึมน้ำของปูนซีเมนต์โดยใช้เชื้อ *Sporosarcina pasteurii* MTCC1761 และ NCIM2477 หรือชื่อเก่าคือ *Bacillus pasteurii* ในขั้นตอนการทดสอบการเกิดแรงอัดพบว่าปูนซีเมนต์ที่ใส่แบคทีเรียลงไปนั้นมีแรงอัดเพิ่มมากขึ้นเพราะแบคทีเรียมีการสร้างและสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตไว้ที่เซลล์จุลินทรีย์ภายในรูของปูนซีเมนต์และทรายที่ผสมกันอยู่และเมื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ SEM จะเห็นว่าเกาะกันเป็นกลุ่มและผลการทดสอบการดูดซึมน้ำพบว่าปูนซีเมนต์ที่ผ่านการผสมด้วยเชื้อแบคทีเรียจะมีการดูดซึมน้ำน้อยมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมถึงแม้จะนำก้อนปูนซีเมนต์ไปสัมผัสกับน้ำหลายครั้ง ซึ่งงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ microbial concrete

เพื่อเพิ่มความมั่นคงให้กับโครงสร้างในการก่อสร้างได้นั่นเองและยังเป็นแนวทางเพื่อนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ในการฟื้นฟูรอยแตกของโครงสร้างต่างๆ รวมทั้งเป็นวิธีที่มีตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

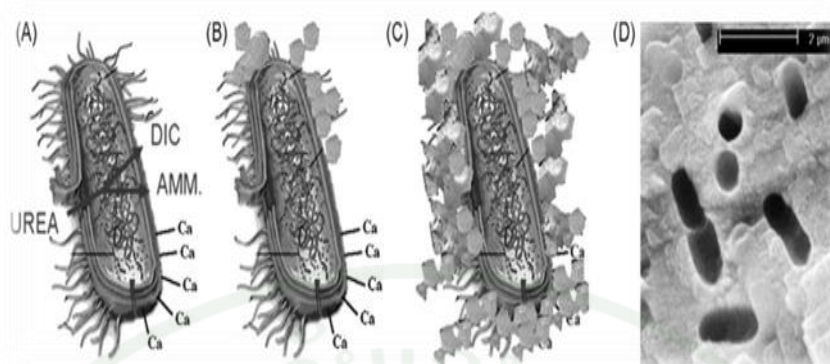
Qian *et al.* (2010) ได้ศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* (*Sporosarcina pasteurii*) และการฟื้นฟูของซีเมนต์โดยใช้ก้อนพอร์ตแลนด์ซีเมนต์รูปทรงสี่เหลี่ยมและเปรียบเทียบวิธีต่างกัน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้ เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน แคลเซียมคาร์บอเนต มีความหนา 100 μm และเมื่อฉีดเชื้อแบคทีเรียลงไปบนรอยแตกของก้อนซีเมนต์รูปทรงสี่เหลี่ยมทำให้เกิดการเชื่อมประสานระหว่างอนุภาคของเม็ดทรายและซีเมนต์และทำให้เกิดแรงอัดและสามารถฟื้นฟูซีเมนต์ได้ถึง 84 เปอร์เซ็นต์ และการดูดซึมน้ำก็ลดน้อยลงด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่มีการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตและเชื่อมระหว่างเม็ดทรายโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

ที่มา: Al-Thawadi (2008)

Chahal *et al.* (2011) รายงานว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการเกิดผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตได้โดยเป็นผลผลิตจากเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน ในน้ำ ในทะเลสาบที่มีความเค็มโดยเอนไซม์นี้มีความสามารถในการย่อยสลายยูเรีย และจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นต่างได้ โดยจุลินทรีย์ที่มีค่ากิจกรรมยูรีเอสมากที่สุดคือ *Bacillus pasteurii*, *B. lentus* และ *Bervibacterium ammonigens* ตามลำดับ รวมทั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ยังให้ค่าการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตมากตามลำดับอีกด้วย



ภาพที่ 6 การเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยการเหนี่ยวนำของจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถในการสร้าง เอนไซม์ยูรีเอส

ที่มา: Ariyanti and Handayani (2012)

จากภาพที่ 6 แคลเซียมไอออนในสารละลายจะจับกับเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อมีการเติมยูเรียเข้าไปในระบบ หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะเปลี่ยนยูเรียไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (DIC) และแอมโมเนีย (AMM) และปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (A) การที่มีแคลเซียมไอออนจะทำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (B) หลังจากนั้นเซลล์จุลินทรีย์ก็จะถูกปกคลุมด้วยตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต (C) และเมื่อเซลล์ทั้งหมดถูกปกคลุมด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต การส่งต่อสารอาหารเข้าสู่เซลล์จึงมีความจำกัด ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ตาย และ (D) เป็นภาพของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตเกาะอยู่

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตจากงานวิจัยต่างๆ

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติหรือแหล่งอื่นๆ ที่มีความเหมาะสมนั้นน่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต เช่นการคัดเลือกเชื้อจากถ้ำหินปูน ภูเขาหินปูน หินงอกหินย้อย ปูนซีเมนต์ ตลอดจนดินที่มีความเป็นด่างเพื่อนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปแทนการใช้เชื้อจากแหล่งเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Achal *et al.* (2010, 2011) ที่ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากปูนซีเมนต์และดินที่มีความเป็นด่างและพบว่าเชื้อเหล่านี้มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้ และเมื่อนำมาจำแนกปรากฏว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. และในปีเดียวกันนั้นเอง Puspita *et al.* (2011) ได้ทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่าง ดิน ทราย น้ำทะเลและหินจาก 7 แหล่งในประเทศอินโดนีเซีย และพบว่าเชื้อที่แยกได้นั้นส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ที่ทนต่อสภาวะความเป็นด่างที่พีเอช 7-9 และเป็น

เชื้อ *Staphylococcus* และ *Oceanobacillus* เล็กน้อย ส่วนงานวิจัยของ Cacchio *et al.* (2012) ที่ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตจากหินที่อยู่ในถ้ำ พบว่าเชื้อเหล่านี้คือ *Bacillus burkholderia* และ *Pasteurella* spp. และมีรายงานการวิจัยว่า Kumar *et al.* (2013) แยกเชื้อจากคอนกรีตที่ประเทศอินเดีย พบว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* sp. ด้วยเช่นกัน

การนำแบคทีเรียในกลุ่ม MICP ไปประยุกต์ใช้ที่เคยมีรายงาน

ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตจากแหล่งต่างๆแล้ว ยังได้มีการศึกษาการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ และเนื่องจากปัญหาทางด้านพลังงานก็เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ การใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยของมนุษย์ทำให้เกิดปัญหาต่างๆตามมา การฟื้นฟูการแตกร้าวต่างๆ หรือขั้นตอนการผลิตปูนซีเมนต์ก็เป็นอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดการสิ้นเปลืองพลังงาน

ปัญหาการแตกร้าวของคอนกรีตเป็นปรากฏการณ์อย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นได้ทั่วไป เนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น อุณหภูมิที่ต่างกัน แรงยืดหยุ่นที่น้อยหรือมากเกินไปของวัตถุ (DeMuynck *et al.*, 2008) ดังนั้นการซ่อมแซมรอยแตกร้าวของคอนกรีตด้วยต้นทุนที่ต่ำและการใช้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์จึงเป็นสิ่งที่ต้องการอย่างมาก ดังนั้นการซ่อมแซมโดยใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

รายงานการศึกษาของ Belie *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการซ่อมแซมรอยแตกของซีเมนต์โดยใช้จุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* ที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้ก้อนคอนกรีตและทำให้เกิดรอยแตกร้าวเทียมขึ้นมา หลังจากนั้นจุ่มคอนกรีตที่แตกลงไปในสารละลายต่างๆกัน พบว่าสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียกับแหล่งแคลเซียมและการตรึงเซลล์แบคทีเรียใน silica sol-gel สามารถทำให้คอนกรีตเกิดการเชื่อมประสานได้และลดการซึมผ่านของน้ำได้

รายงานการศึกษาของ Arunacahlam *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาแรงอัดหรือแรงกดของคอนกรีตโดยใช้ Bioconcrete ที่ทำมาจากจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* มาผสมเข้ากับก้อนคอนกรีตธรรมดาที่มีรอยแตกร้าว หลังจากนั้นนำไปทดสอบหาแรงอัด พบว่าก้อนคอนกรีตนี้มีแรงอัดเพิ่มมากขึ้นกว่าตอนที่คอนกรีตมีรอยแตกร้าว

รายงานการศึกษาของ Park *et al.* (2010) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากพอร์ตแลนด์ซีเมนต์ เพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าเชื้อที่ทำการคัดแยกได้คือ *Sporosarcina soli* KNUC401, *Bacillus massiliensis* KNUC402, *Arthrobacter crystallopoietes* KNUC403 และ *Lysinibacillus fusiformis* KNUC404 หลังจากนั้นนำก้อนซีเมนต์ทรงลูกบาศก์ไปจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่มียูเรียและแคลเซียมคลอไรด์ และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน เชื้อ *Arthrobacter crystallopoietes* KNUC403 สามารถเพิ่มแรงอัดได้ถึง 8.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม (Biofilm) คือโครงสร้างที่ยึดเกาะกับพื้นผิว สร้างโดยกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่รวมกัน ประกอบด้วยสารต่างๆหลายชนิด ทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบไบโอฟิล์มและเป็นที่รู้จัก ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Porphyromonas gingivalis* เป็นต้น การยึดเกาะของแบคทีเรียจะสามารถยึดเกาะได้ในอุปกรณ์เกือบทุกพื้นผิว โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นผิววัตถุที่มีผิวหน้าไม่เรียบเป็นรอยหรือเกิดการขีดข่วน จากนั้นกระบวนการยึดเกาะก็จะเริ่มแข็งแรงขึ้น โดยอาศัยโครงสร้างของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายขนหรือเส้นผม เช่น พิล (pili) ฟิมเบรีย (fimbriae) หรือ ซิเลีย (cilia) โดยจุลินทรีย์จะยึดเกาะกับวัตถุและมีการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกันอยู่บนผิวหน้าของวัตถุ เป็นสารพอลิเมอร์ที่เซลล์สร้างขึ้นแล้วขับออกภายนอกเซลล์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารพวก Extracellular Polymeric Substances (EPS) ซึ่งมีองค์ประกอบได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ดีเอ็นเอและไขมัน ซึ่งสัดส่วนจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อม (Rosche *et al.*, 2009) โดยไบโอฟิล์ม ดังกล่าวนี้อาจมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์สามารถยึดเกาะกับผิวหน้าของวัตถุได้ดียิ่งขึ้น (พนิดา, 2555) อีกทั้งเป็นโครงสร้างสำคัญที่ช่วยในการยึดเกาะเมื่อเกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตกับวัสดุอื่นอีกด้วย (Riding, 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างปูนซีเมนต์ มีทั้งหมด 5 ตัวอย่างคือ

- ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1 ตราอินทรีเพชร ถุงสีน้ำเงิน
- ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1 ตราบัวแดง
- ปูนซีเมนต์ตราเสือ ถุงสีเขียว
- ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1 ตรา TPI ถุงสีแดง
- ปูนซีเมนต์ตราช้าง

โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างปูนซีเมนต์ ดังนี้ เลือกผงปูนบริเวณที่อยู่ด้านในที่ยังไม่สัมผัสกับแสงแดด อากาศ และความชื้น ใช้ช้อนตักบริเวณกลางถุง โดยตักด้วยความระมัดระวังและรวดเร็วให้ผงปูนสัมผัสกับอากาศภายนอกน้อยที่สุด ตักใส่ถุงพลาสติกแล้วปิดปากถุงให้สนิททันที จดบันทึกชื่อทางการค้าของตัวอย่างปูนซีเมนต์ พร้อมสถานที่เก็บตัวอย่างดังกล่าว

1.2 การเก็บตัวอย่างขุยมะพร้าว

- ขุยมะพร้าวชนิดอัดก้อน
- ขุยมะพร้าวชนิดผง
- ขุยมะพร้าวชนิดผงที่มีการผสมธาตุสังกะสี

โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างขุยมะพร้าว ดังนี้ ในกรณีที่ เป็นขุยมะพร้าวชนิดผงและชนิดผงที่มีการผสมธาตุสังกะสี ใช้ช้อนตักด้วยความระมัดระวังและรวดเร็วให้ตัวอย่างสัมผัสกับอากาศภายนอกน้อยที่สุด ตักใส่ถุงพลาสติกแล้วปิดปากถุงให้สนิททันที ส่วนก้อนขุยมะพร้าวชนิดอัดก้อน แฉลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อขุยมะพร้าวเกิดการเปื่อยยุ่ยนำขุยมะพร้าวที่ได้มาผึ่งแดดให้เปื่อยพอสมควรก่อน จึงนำมาใช้งานในขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสจากตัวอย่างปูนซีเมนต์

2.1.1 ชั่งตัวอย่างปูนซีเมนต์จำนวน 1 กรัมโดยใช้วิธี aseptic technique ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่ทำให้ปราศเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรน) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

2.1.2 หลังจากที่ยีสต์เชื้อนาน 2 วันจะเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เริ่มขุ่นขึ้น ให้แบ่ง สารละลายของเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1.1 ไปทำให้ได้ความเจือจาง 10 เท่าและ 100 เท่าตามลำดับ แล้วจึงนำไป spread ลงในจานอาหาร NA บ่มให้เชื้อเจริญนาน 1-2 วัน แล้วเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak plate เพื่อเก็บโคโลนีเดี่ยว แล้วเก็บเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยง NA

2.1.3 ส่วนของสารละลายของเชื้อในฟลาสก์ที่เหลือจากข้อ 2.1.2 นำไปทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell ของแบคทีเรียให้หมดโดยคาดว่าจะเหลือเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของสปอร์อิสระที่งอกช้ากว่า หลังจากนั้นนำไปเขย่าต่อที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำมา spread บนจานอาหาร NA โดยไม่ต้องเจือจาง และที่ความเจือจาง 10 เท่า บ่มเชื้อนาน 2-3 วัน แล้วเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak plate เพื่อเก็บโคโลนีเดี่ยว แล้วเก็บเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยง NA

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสจากตัวอย่างขุยมะพร้าว

2.2.1 กรณีของขุยมะพร้าวชนิดอัดก้อน นำก้อนขุยมะพร้าวแช่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อขุยมะพร้าวเกิดการเปื่อยยุ่ยนำขุยมะพร้าวที่ได้มาผึ่งแดดให้เปียกพอหมาดก่อน จึงนำมาใช้งานในขั้นต่อไป เมื่อได้ตัวอย่างขุยมะพร้าวทั้ง 3 ชนิดในสภาพที่พร้อมใช้งานแล้วชั่งตัวอย่างขุยมะพร้าวจำนวน 1 กรัมแบบ aseptic technique ใส่ลงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมยูเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ และในอาหาร NB ที่ไม่ได้ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร

50 มิลลิลิตร โดยทำใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

2.2.2 หลังจากที่ได้เลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน จะเห็นอาหารในฟลาสก์เริ่มขุ่นขึ้น ให้แบ่งสารละลายของเชื้อที่ได้จากข้อ 2.2.1 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ไป spread ลงบนจานอาหาร NA ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องเจือจาง ส่วนของสารละลายเชื้อจากอาหาร NB ที่ไม่ได้ผสมยูเรีย ให้ทำความสะอาดที่ 10 เท่าและ 100 เท่า แล้วจึง spread บนจานอาหารแข็ง NA บ่มให้เชื้อเจริญนาน 1-2 วัน แล้วเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน ลงในอาหารเอียง NA เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

2.2.3 สารละลายของเชื้อในฟลาสก์ที่เหลือจากข้อ 2.2.2 นำไปทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell ของแบคทีเรียให้หมด โดยคาดว่าจะเหลือเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของสปอร์อิสระที่งอกช้า หลังจากนั้นนำไปเขย่าต่อที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำมา spread บนอาหาร NA ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร NA ตามลำดับ โดยไม่เจือจาง และเจือจาง 10 เท่า บ่มเชื้อนาน 1-2 วัน แล้วจึงเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะการเจริญบนอาหารที่มีความแตกต่างกัน ย้ายลงอาหารใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ก่อนเก็บเป็น stock ในอาหารเอียง NA

2.3 ใช้เชื้อจาก stock culture ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการซึ่งส่วนมากเป็นเชื้อ *B. megaterium* เนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รายชื่อเชื้อจากแหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยาที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>B. megaterium</i>		
- ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran	P001, P002, P007, P008, P009, P011, P021, P028, K002, K003, K004, K005, K009, K014, K018, K024	ดิน
- ที่สามารถละลายฟอสเฟต	A228, C1, C10, C12, C13, C14, C216, C3, C4-1, C411, C46,	ดิน
- ที่สามารถละลายฟอสเฟต	BKRP5, BKRP10, KORP16, KORP17, KORP23, KORP24, T1RP13, T2RP13	หินฟอสเฟต
	Ba-10, Ba-8, Ba4-1-1, Ba12-1-1	ดินทาง
	Ba15-1-1, Ba15-2-1, Ba6-1-2, Ba12-1-2, Ba2-1, Ba14-1, Ba5-2, Ba6-2, Ba8-2, Ba9-2, Ba14-2, Ba15-2, OriBa-4, OriBa5-1-2, OriBa7-1, OriBa7-1-2, OriBa7-2, OriBa-9, Ba-3, Ba6-1, Ba16-1-2, Ba15-2-2, OriBa-12, OriBa-13, OriBa-14, OriBa-17, OriBa-18, OriBa-2, OriBa-3-2, OriBa5-1-1, OriBa5-2, OriBa-6	ภาคเหนือของประเทศไทย

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
	1028(2)/3, 1028(3)/1, 78100(1)/1, 78100(1)/4, 78100(2)/3, 78100(3)/1, 1028(2)/3, 1028(3)/1, 1028(3)/2, 1028(3)/3, 1028(3)/7, 1234(1)/2, 4656(3)/1, 6428(1)/1, 6428(2)/1, 6482(2)/4	ดินห้วยขาแข้ง
	125,206, 303, 403, 408, 411, 502, 504, 516	ขุยมะพร้าว
<i>B. thuringiensis</i> - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran	P006, P010, P012, P023, P024, P026, P027, P030, P031, P033, K006, K011, K015, P1-18	ดิน ขุยมะพร้าว
<i>B. amyloliquefaciens</i> - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran	P013, P014, P015, P016, P017, P018, P019, P020, K008, K013, K019, K021, K025, K027	ดิน
<i>Bacillus</i> sp. - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran	K001, K010, K017, K029	ดิน
<i>B. brevis</i> - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran	P003, P004, P005, K007, K012, K023	ดิน

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>B. circulans</i> - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran K020		ดิน
<i>B. sphaericus</i> - ที่สามารถย่อยสลาย carbofuran K022		ดิน
	201, 202, 501, 513	ขุยมะพร้าว
<i>B. mycoides</i>	314	ขุยมะพร้าว
รวม	146	ไอโซเลท

2.4 การคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

จากไอโซเลทต่างๆของแบคทีเรียที่ได้จากผลการทดลองข้อ 2.1.2, 2.1.3, 2.2.2, 2.2.3 และ 2.3 นำมาทำให้บริสุทธิ์และทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี point inoculation บนอาหาร Christensen urea agar slant โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NA slant ให้มีอายุประมาณ 16-18 ชั่วโมง ก่อน หลังจากนั้นจึงถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร Christensen urea agar slant เพื่อทดสอบว่า เชื้อใดที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้บ้าง โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารอาหาร Christensen urea agar slant จะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูบานเย็นถ้าเชื้อมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งสารอาหาร เนื่องจากเมื่อเชื้อแบคทีเรียมีการย่อยสลายยูเรียแล้ว จะทำให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างขึ้น ส่งผลให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนแปลงไป

3. ขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงจากอาหาร urea broth (อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูง)

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสจากอาหาร Christensen urea agar slant แล้วนำเชื้อที่ให้ผลบวกไปตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในอาหาร urea broth ต่อ ซึ่งเป็นอาหารที่ผสมบัฟเฟอร์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้มาก เนื่องจากอาหารสูตรนี้มีบัฟเฟอร์ในปริมาณสูงกว่าอาหารปกติ ดังนั้นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้มากในระดับที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดได้ จึงต้องสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้สูง ปกติอาหารนี้ใช้แยก *Proteus* sp. ออกจากแบคทีเรียในสกุล Enterobacteriaceae โดย

Rustigian and Stuart (1941) และ Stuart *et al*, 1945 ได้อธิบายหลักการของการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างยูรีเอสได้สูงโดยการใช้ urea broth ที่มี Monopotassium phosphate monobasic 9.1 กรัม และ Dipotassium phosphate monobasic 9.5 กรัม ต่อสูตรอาหารหนึ่งลิตรว่าระดับบัฟเฟอร์ที่สูงจนทำให้ พีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงไปเป็น 8.1 จึงจะสามารถให้ผลบวกได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่งานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารนี้เพื่อการ screen หาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างยูรีเอสได้สูงโดยวิธีรวดเร็วก่อนจะนำไปจำแนกชนิดและตรวจหาปริมาณยูรีเอสที่ได้ในขั้นตอนต่อไป โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NA slant ให้มีอายุประมาณ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อแบบ heavy inoculums ลงอาหาร urea broth ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตรเลี้ยง 1-2 วัน โดยเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และบันทึกผลการทดลองว่าเชื้อใดที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้มากบ้าง โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารคืออาหารเหลว urea broth จะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูบานเย็นถ้าเชื้อมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งสารอาหาร และทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างขึ้น และอาจมีเชื้อบางที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในอาหาร Christensen urea agar แต่ไม่ให้เกิดผลการทดสอบเป็นบวกในอาหาร urea broth เนื่องจากพีเอชที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอให้ที่จะทำให้อาหารเปลี่ยนสีได้ และวัดค่าพีเอชของอาหารเหลวด้วย เพื่อที่จะรู้ว่าค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นเป็นไปตามทฤษฎีหรือไม่ หลังจากนั้นนำเชื้อที่เปลี่ยนสีอาหารไปทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ

4. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส

เมื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้จากข้อ 3 ทำการทดสอบต่อ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียงให้มีอายุ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 หลอดลงในอาหาร NB นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น แล้วใส่เชื้อตั้งต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสโดยวิธี phenol-hypochlorite โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีระดับความเข้มข้น 200-1000 ไมโครโมลาร์ เป็นสารละลายมาตรฐาน ขั้นตอนในการตรวจสอบเริ่มจากนำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บส่วนใสไว้เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ หลังจากนั้นใช้ส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตร และใส่ส่วนผสมของ potassium phosphate buffer พีเอช 8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และยูเรีย ซึ่งเป็น substrate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (Achal *et al.*, 2009) หลังจากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสจากปริมาณแอมโมเนียที่ปล่อยจากยูเรีย โดยวิธีของ Weatherburn (1967) โดยเติม phenol nitroprusside 1

มิลลิลิตร และ alkaline hypochlorite 1 มิลลิลิตร (ดังวิธีการเตรียมที่แสดงไว้ในภาคผนวก ข) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 626 นาโนเมตร แล้วทำการคำนวณหน่วยของเอนไซม์ รายงานผลเป็นยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (U/ml) โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ยูรีเอสคือปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายยูเรีย 1 ไมโครโมลาร์ ต่อ 1 นาที

5. การศึกษาผลของเวลาเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

คัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถให้ผลบวกในอาหาร urea broth และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดมาศึกษาการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสโดยเก็บตัวอย่างในแต่ละวัน เพื่อหาว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงสุดที่วันใด โดยขั้นตอนการทำเหมือนการตรวจสอบการหากิจกรรมเอนไซม์

6. การตรวจสอบความสามารถในการเกิดตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3 มาทดสอบการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต โดยคาดว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้มาก จะสามารถสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากด้วย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร (0.025 โมลาร์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนใส่ในจานเปตริ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง และนำไปไทเทรตเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต โดยนำตะกอนละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 นอร์มอล ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร เติมน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เพื่อปรับค่าพีเอชให้เป็นต่าง (ค่าพีเอชประมาณ 11) แล้วจึงเติมสินดิเคเตอร์ murexide 1-2 กรัม (สี murexide 0.1 กรัมผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 50 กรัม) แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลาย EDTA 0.01 โมลาร์ เพื่อดูจุดยุติที่เกิดขึ้นโดยเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีม่วงแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (APHA, 1980)

7. การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและความสัมพันธ์ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต และ การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตของเชื้อแบคทีเรีย

7.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกและความสัมพันธ์ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต

การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียกับปริมาณการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนต มีวิธีการดังต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อในอาหารวุ้นเอียงเลี้ยงให้มีอายุ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบใส่ในอาหาร NB ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที นาน 8 ชั่วโมงแล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร (0.025 โมลาร์) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ศึกษาอัตราการเจริญนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาหาปริมาณแบคทีเรียเป็น CFU/ml โดยวิธี spread plate และนับจำนวนโคโลนีในอาหาร NA ส่วนอีกส่วนที่ศึกษาการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปไทเทรตเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

7.2 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต

แบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกกว่า ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและสามารถสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากนำมาศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียง NA ให้มีอายุ 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที นาน 8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และผสมแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณต่างๆ กันคือ 7.351 กรัมต่อลิตร (0.05 โมลาร์), 14.702 กรัมต่อลิตร (0.1 โมลาร์), 29.404 กรัมต่อลิตร (0.2 โมลาร์), 58.808 กรัมต่อลิตร (0.4 โมลาร์) และ 117.616 กรัมต่อลิตร (0.8 โมลาร์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง และอีกวิธีหนึ่งคือ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 วัน แล้วจึงเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ คือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 โมลาร์ ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย

ปริมาตรอาหารรวมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์แล้วเท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตทันที เก็บตะกอนที่ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนใส่ในจานเปตริ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง แล้วจึงหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตตามวิธีที่ได้กล่าวแล้วในข้อ 6

8. การตรวจสอบการผลิตไบโอฟิล์ม

การทดสอบการผลิตไบโอฟิล์ม โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วมาทดสอบ การตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์มทำใน microtiter-plate 96 หลุมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เริ่มจากการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 230 ไมโครลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร TSB นาน 8 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยหลุมที่เป็น negative control จะไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยทำเชื้อละ 8 ข้ำหรือ 8 หลุม หลังจากนั้นนำไปล้างด้วย peptone water ปริมาตร 300 ไมโครลิตร 3 ครั้ง แล้วทำการตรึงแบคทีเรียโดยเติมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วรอให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปย้อมสีคริสตัลไวโอเล็ต 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นาน 5 นาที ล้างสีส่วนเกินทิ้งด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วเติมกรดอะซิติก 33 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (Hesham, 2008)

9. จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีดั้งเดิม วิธี Biolog และเทคนิคทางโมเลกุล

9.1 จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีดั้งเดิม

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาจำแนกชนิดนั้น เลือกเฉพาะเชื้อที่ให้ผลทดสอบเป็นบวกในการทดสอบการสร้างเอนไซม์จากอาหาร urea broth เท่านั้น

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวกที่อยู่ในยีนัส *Bacillus* โดยใช้วิธีที่อธิบายโดย Claus and Berkeley (1986), Gordon (1989) และเปรียบเทียบข้อมูลผลเพิ่มเติมจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition

volume 3 (2009) ตัวอย่างการทดสอบ ได้แก่ การทดสอบทางสัณฐานวิทยา เช่น การศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ รูปแบบของสปอร์ การเคลื่อนที่ การทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เช่น การสร้างเอนไซม์ Catalase Oxidase ความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญ โดยใช้อาหาร anaerobic agar การทดสอบ VP การรีดิวซ์ Nitrate การสร้างกรดจากน้ำตาล D-Glucose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Manitol และ Lactose การทดสอบการย่อยแป้ง Gelatin, Casein, Esculin, Tween 80, Phenylalanine การทดสอบความสามารถในการใช้ citrate หรือ propionate ในการเจริญ การเจริญในอาหาร NB ที่มีพีเอชเท่ากับ 5.7 และการเจริญในอาหาร NB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 7 เปอร์เซ็นต์และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาแบคทีเรียรูปทรงกลมแกรมบวกนั้นก็คล้ายกับการศึกษาในยีส *Bacillus* ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยา ตัวอย่างการทดสอบ ได้แก่ การทดสอบทางสัณฐานวิทยา เช่น การศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ รูปแบบของสปอร์ การเคลื่อนที่ การทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เช่น การสร้างเอนไซม์ Catalase Oxidase ความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญ โดยใช้อาหาร anaerobic agar การทดสอบ VP การรีดิวซ์ Nitrate การสร้างกรดจากน้ำตาล D-Glucose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Manitol และ Lactose การทดสอบการย่อยแป้ง Gelatin, Casein, Esculin, Tween 80, Phenylalanine การทดสอบความสามารถในการใช้ citrate หรือ propionate ในการเจริญ การเจริญในอาหาร NB ที่มีพีเอชเท่ากับ 5.7 และการเจริญในอาหาร NB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 7 เปอร์เซ็นต์และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

9.2 การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้วิธี Biolog

การจำแนกโดยใช้วิธี Biolog จะใช้ฐานข้อมูล GEN III ซึ่งเป็นเทคโนโลยีล่าสุดของ Biolog ซึ่งประกอบด้วย การทดสอบ 2 ส่วนคือ การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน และความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะหรือ การเจริญในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่างๆ กัน หรือการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างในระดับต่างๆ รายละเอียดของการทดสอบอยู่ในภาคผนวก ก ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

ทำการ cross streak เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่ม 24 ชั่วโมง แล้วใช้ลูปเขี่ยโคลนนี้เดียวขึ้นมาใส่ใน inoculation medium A และ B เพื่อเปรียบเทียบผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นวัดความขุ่นของสารละลายเชื้อให้ได้ตามที่กำหนดคือ 97-98 เปอร์เซ็นต์การผ่านของแสง (%T) แล้วปิเปตสารละลายเชื้อใส่ microplate หลุมละ 100

ไมโครลิตรจนครบทุกหลุม ซึ่งเป็นชุดอาหารสำหรับทดสอบเฉพาะ โดยใช้ multichannel pipette ทำการบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องอ่านผล Biolog โดยจะอ่านผลจากสีที่เกิดในแต่ละหลุมทดสอบ เนื่องจากมีการเจริญในอาหารต่างชนิดกันทั้งหมด 96 หลุม ซึ่งอ่านผลโดย microplate reader และเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลในระบบ

9.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยเทคนิคทางโมเลกุลนั้นจะทำได้โดยการหาลำดับเบสของ ยีน 16S rRNA gene sequence สกัด DNA template โดยการสกัด total chromosome ด้วยชุด สกัด E.Z.N.A Bacterial DNA kit (Omega Biotek, USA) Primer 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') และ DDW นำเข้า เครื่อง PCR เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณของ DNA template วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และส่งชิ้น PCR product ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia และนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับ genome database ด้วย โปรแกรม blastn เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

โดยการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีทางโมเลกุลนั้น จะส่งเชื้อบริสุทธิ์ให้กรมวิชาการ เกษตรและคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพื่อทำการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี 16S rRNA

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างปูนซีเมนต์และขุยมะพร้าว

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเพื่อย่อยสลายยูเรีย (Ureolytic bacteria) จากตัวอย่างปูนซีเมนต์ 5 ชนิด และตัวอย่างขุยมะพร้าว 3 ชนิด โดยวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อที่ 2.1 และ 2.2 หลังจากเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เป็นเวลา 2 วันแล้วนำมา spread plate เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน พบว่ามีปริมาณโคโลนีที่ได้มากกว่าจากฟลาสก์ที่ผ่านการ heat shock ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 4 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างปูนซีเมนต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน และ 4 วัน

ชนิดของตัวอย่างปูนซีเมนต์ที่นำมาทำการทดลอง	จำนวนไอโซเลทที่ได้โดยจำแนกตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง	
	เลี้ยง 2 วัน	
	เลี้ยง 2 วัน	เลี้ยง 4 วัน
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตราอินทรีเพชร ถุงสีน้ำเงิน	10	4
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตราบัวแดง	4	1
ปูนซีเมนต์ตราเสือ ถุงสีเขียว	7	3
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตรา TPI ถุงสีแดง	6	3
ปูนซีเมนต์ตราช้าง	7	3

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างขุยมะพร้าว เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน และ 4 วัน

ชนิดของตัวอย่างขุยมะพร้าว ที่นำมาทำการทดลอง	จำนวนไอโซเลทที่ได้โดยจำแนกตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง			
	อาหาร NA		อาหาร NA + ยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์	
	เลี้ยง 2 วัน	เลี้ยง 4 วัน	เลี้ยง 2 วัน	เลี้ยง 4 วัน
ขุยมะพร้าวชนิดอัดก้อน	10	3	8	3
ขุยมะพร้าวชนิดผง	13	5	3	2
ขุยมะพร้าวชนิดผงที่มี การผสมธาตุสังกะสี	9	4	4	2
รวมไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้ จากทั้ง 8 ตัวอย่าง			114	

จากตารางที่ 4 และ 5 จำนวนไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้จากทั้ง 8 ตัวอย่าง คือ 114 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาจากจำนวนโคโลนี พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างปูนซีเมนต์และขุยมะพร้าวใน 2 วันแรกก่อนการ heat shock ที่เลี้ยงนาน 4 วัน มีความหลากหลายของโคโลนีมากกว่า เนื่องจากเชื้อหลายชนิดที่อยู่ในตัวอย่างทั้งที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์มีโอกาสเจริญเมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ที่ผสมยูเรีย หลังจากนั้นเมื่อนำไป heat shock เชื้อแบคทีเรียที่โตเร็วและไม่สร้างสปอร์จะถูกความร้อนทำลายไป เชื้อที่เหลือจึงเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เติบโตมาจากสปอร์อิสระในตัวอย่างและไม่ออกหรือเพิ่มจำนวนใน 2 วันแรกที่บ่มเชื้อ จึงพบความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่า

ในตัวอย่างขุยมะพร้าวพบจำนวนแบคทีเรียมากกว่าในปูนซีเมนต์ เนื่องจากขุยมะพร้าวเป็นวัสดุที่มาจากธรรมชาติที่มีรูพรุนและอากาศสามารถผ่านเข้าได้มาก จึงเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ โอกาสที่จะพบจุลินทรีย์ย่อมมีหลากหลายชนิดมากกว่าในตัวอย่างปูนซีเมนต์ อีกประการหนึ่งขั้นตอนของการผลิตปูนซีเมนต์ต้องใช้อุณหภูมิสูงมาก คือ อุณหภูมิประมาณ 1200-1400 องศาเซลเซียสและตัวเนื้อปูนมีความเป็นด่างสูง อีกทั้งวัตถุดิบหลักที่ใช้มีเพียงแค่ดินเหนียว หินขาวและหินปูน (คณะกรรมการบริหารโครงการสาหร่ายกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ.) จึงไม่น่ามีจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถเจริญได้ในขั้นตอนนี้ แต่การที่พบว่ามีจุลินทรีย์ในตัวอย่างปูนซีเมนต์ อาจเป็นเพราะในขั้นตอนของการผลิตปูนซีเมนต์มีการผสมวัตถุดิบชนิดอื่นๆ เช่น ยิปซัม จึงทำให้มีปะปนของจุลินทรีย์

จากวัตถุดิบอื่นที่นำมาผสม พบว่าในตัวอย่างได้โคโลนีของแบคทีเรียหลากหลายลักษณะ เมื่อนำมาย้อมสีแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รูปร่างแบบท่อนและกลม แต่เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำ heat shock แล้วเลี้ยงจนครบ 4 วัน มา spread plate พบว่าโคโลนีที่ได้มีปริมาณลดลง ความหลากหลายของลักษณะโคโลนีน้อยกว่า และพบแต่แบคทีเรียแกรมบวกที่มีสปอร์ เนื่องจากในขั้นตอนของการ heat shock จะสามารถทำลายพวกแบคทีเรียแกรมลบหรือแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ ทำให้แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ หรือสปอร์งอกข้ามโอกาสในการเจริญเพิ่มมากขึ้น จุดประสงค์ที่แยกเชื้อจากปูนซีเมนต์เพราะต้องการได้แบคทีเรียที่สามารถทนต่าง เนื่องจากในการนำไปประยุกต์ใช้นั้น เชื้ออาจจำเป็นต้องอยู่ร่วมกับปูนทรายที่มีสภาพเป็นด่างสูง เช่น การนำไปปรับปรุงคุณภาพดินนั้น สภาวะแวดล้อมของดินจะมีความเป็นด่างที่มาก ความสามารถในการทนต่างของเชื้อแบคทีเรียจึงเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่มีความสำคัญ ซึ่งงานวิจัยของ Achal *et al.* (2010, 2011) ก็ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในปูนซีเมนต์และพบว่าเชื้อที่มีศักยภาพในการย่อยสลายยูเรียและสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต คือ *B. simplex*, *B. megaterium*, *B. subtilis* และ *Bacillus* sp.

การแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างขุยมะพร้าว พบจำนวนโคโลนีที่แตกต่างมากกว่าในตัวอย่างปูนซีเมนต์ ผลจากการ spread plate ในอาหาร NA ให้ลักษณะโคโลนีที่หลากหลายมากกว่าในอาหาร NA ที่มีการผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียทั่วไปจะเจริญได้ดีในอาหาร NA ปกติ แต่แบคทีเรียที่ทนสภาวะที่เป็นด่างได้เท่านั้นที่จะเจริญในอาหารที่มียูเรียได้ เนื่องจากในกระบวนการย่อยสลายยูเรีย จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย 2 ชนิดคือคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย แอมโมเนียที่ได้จะส่งผลให้ค่าพีเอชในอาหารเพิ่มสูงขึ้น จากตัวอย่างขุยมะพร้าวและปูนซีเมนต์ที่จำหน่ายเป็นการค้าในประเทศไทยพบแบคทีเรียทั้งหมด 114 ไอโซเลท และรวบรวมเชื้อ *Bacillus* sp. จากแหล่งเก็บเชื้อในห้องปฏิบัติการอีก 146 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ผ่านการจำแนกชนิดแล้วว่าเป็น *B. megaterium* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส มาใช้ในการทดสอบร่วมกันเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงต่อไป

2. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

หลังจากแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์แล้วจึงนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในอาหาร Christensen urea agar slant ซึ่งผลบวกดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบจากสีส้มเป็นสีชมพูบานเย็น จากการทดสอบโดยใช้อาหารชนิดนี้พบว่า 114 ไอโซเลทที่แยกเชื้อมาจากปูนซีเมนต์และขุยมะพร้าวโดยเพิ่มจำนวนบนอาหาร NB ที่มียูเรียเป็นส่วนประกอบนั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ในอาหาร Christensen urea agar slant ได้ทั้งหมด (ข้อมูลแสดงไว้ในตารางที่

6) เนื่องจากการใช้ basal medium เป็น NB มี peptone และ beef extract ในปริมาณเหมาะสมที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียทั่วไปเจริญได้อยู่แล้ว การเติมยูเรียอาจทำให้เชื้อบางส่วนที่สามารถย่อยสลายยูเรียสามารถเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นในระดับที่โดดเด่น จนทำให้สามารถพบได้ง่ายขึ้น ส่วนเชื้อที่สามารถเจริญได้ใน NB แต่ไม่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ ก็อาจลดจำนวนลงหลังจากที่พีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงไปเป็นต่างมากขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายยูเรียทำให้ได้แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ จะเห็นว่าเชื้อที่แยกจากปูนซีเมนต์และขุยมะพร้าว 114 ไอโซเลทมีเพียง 30 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ ส่วนเชื้อจากแหล่งเก็บเชื้อของห้องปฏิบัติการนั้นจากทั้งหมด 146 ไอโซเลทมี 97 ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ในอาหาร Christensen urea agar slant

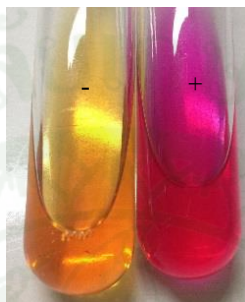


ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงสีในอาหาร Christensen urea agar slant หลังการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส เปรียบเทียบระหว่างผลบวก (+) และชุดควบคุม (-)

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงจากอาหาร urea broth

เมื่อได้ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในอาหารทดสอบ Christensen urea agar slant แล้วจึงนำมาคัดเลือกเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงในขั้นต่อไป โดยใช้อาหาร urea broth เนื่องจากอาหารสูตรนี้มีปริมาณบัฟเฟอร์สูงมากกว่าอาหารทดสอบ Christensen urea agar slant ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้มากเท่านั้นจึงจะสามารถเปลี่ยนแปลงพีเอชและทำให้สีของอินดิเคเตอร์ที่มีอยู่ในอาหารทดสอบเปลี่ยนแปลงได้ ผลการทดสอบพบว่า จากจำนวน 127 ไอโซเลท พบว่าเหลือเพียง 7 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกโดยวิธีการนี้ ปกติอาหารนี้ใช้แยกแบคทีเรียในยีส *Proteus* sp. ออกจากแบคทีเรียยีสอื่นๆในสกุล Enterobacteriaceae โดย Rustigian and Stuart (1941) Stuart *et al.* (1943) ได้อธิบายหลักการของการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างยูรีเอสได้สูงโดยใช้ urea broth ที่ใช้ Monopotassium phosphate monobasic 9.1 กรัม และ Dipotassium phosphate monobasic 9.5 กรัม ต่อสูตร

อาหารหนึ่งลิตรว่าหากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้มากเหนือการควบคุมของบัฟเฟอร์จนกระทั่งสามารถเปลี่ยนพีเอชของอาหารไป 8.1 จึงจะสามารถให้ผลบวกได้ เป็นสาเหตุที่งานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารนี้เพื่อการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างยูรีเอสได้สูงโดยวิธีที่เร็วและไม่ยุ่งยาก ก่อนจะนำไปศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดและตรวจหาปริมาณยูรีเอสที่ได้ในขั้นตอนต่อไปในเรื่องของกิจกรรมเอนไซม์



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงสีในอาหาร urea broth หลังจากที่เชื้อสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในปริมาณมากจนสามารถเปลี่ยนสีฟีนอลเรดให้เป็นสีบานเย็น เปรียบเทียบระหว่างผลบวก (+) และชุดควบคุม (-)

ตารางที่ 6 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ในอาหาร Christensen urea agar และอาหาร urea broth

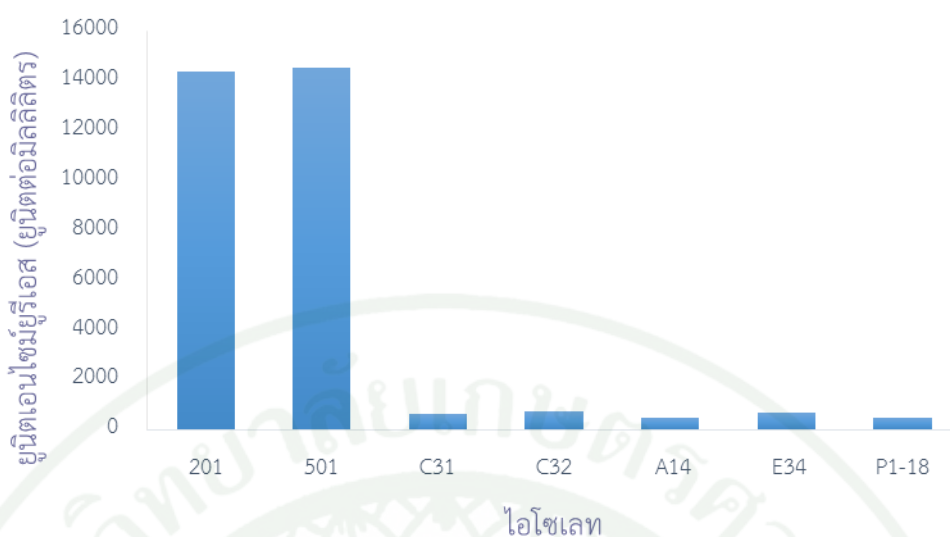
ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ	จำนวนไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ในอาหาร Christensen urea agar	จำนวนไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ในอาหาร urea broth
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตราอินทรีเพชร ถุงสีน้ำเงิน	6	1
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตราบัวแดง	1	0
ปูนซีเมนต์ตราเสือ ถุงสีเขียว	2	2
ปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ประเภท 1		
ตรา TPI ถุงสีแดง	1	0
ปูนซีเมนต์ตราช้าง	2	1
ขุยมะพร้าวชนิดอัดก้อน	4	0
ขุยมะพร้าวชนิดผง	8	0
ขุยมะพร้าวชนิดผงที่มี		
การผสมธาตุสังกะสี	6	0
เชื้อจาก stock culture ใน		
ห้องปฏิบัติการ	97	3
รวม	127	7

ตารางที่ 7 รหัสและแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกกว่าสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงโดยใช้อาหาร urea broth

รหัสเชื้อแบคทีเรีย	ค่าพีเอชใน urea broth	ที่มาของเชื้อ
201	9.3	ขุยมะพร้าว
501	9.4	ขุยมะพร้าว
C31	9.2	ปูนซีเมนต์
C31	9.3	ปูนซีเมนต์
A14	9.2	ปูนซีเมนต์
E34	9.3	ปูนซีเมนต์
P1-18	9.4	ขุยมะพร้าว

2. การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส จากการตรวจหาแอมโมเนียที่ได้โดยวิธี phenol-hypochlorite assay ดังที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 4 โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสทั้ง 7 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกกว่าสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงโดยใช้อาหาร urea broth



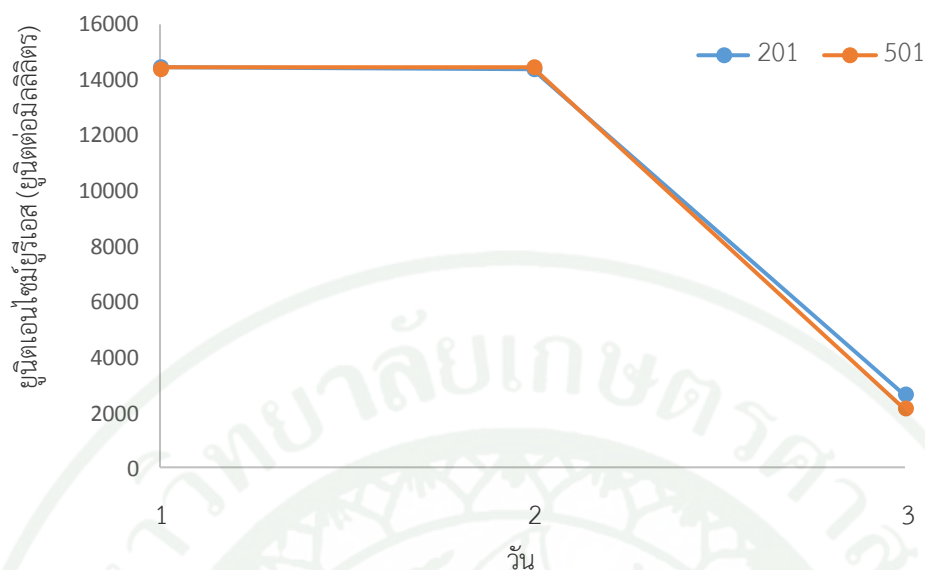
ภาพที่ 9 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (U/ml) ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในอาหาร urea broth เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที นาน 1 วัน

จากภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท 501 และ 201 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสูงที่สุดหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารนาน 24 ชั่วโมง และให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 14545.76 และ 14363.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่โดดเด่นมากเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ คือ C32, E34, C31, P1-18 และ A14 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสเท่ากับ 749.17, 683.25, 630.14, 461.13, และ 115.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Achal *et al.* (2010) ที่แยกเชื้อแบคทีเรียจากปูนซีเมนต์ได้ไอโซเลท CT2 และ CT5 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสเท่ากับ 575.87 และ 670.71 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รวมไปถึงงานวิจัยของ Achal *et al.* (2009) ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *Sporosarcina pasteurii* MTCC 1761 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสเท่ากับ 550 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร (0.025 โมลาร์) เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ข้อมูลยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลท C32, E34, C31, P1-18 และ A14 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงงานวิจัยของ Achal *et al.* (2009, 2010) และงานวิจัยของ Puspita *et al.* (2011) ศึกษา *B. lentus*, *Bacillus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 20 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัม และนิกเกิลคลอไรด์ 10 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส 244.28 และ 248.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน เนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลท 501 และ 201 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าแบคทีเรียอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด จึงเลือก 2 ไอโซเลทนี้ไปศึกษาผล

ของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์ และนำทั้ง 7 ไอโซเลทไปศึกษาการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในห้องปฏิบัติการต่อไป

3. การศึกษาผลของเวลาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์สูงสุด

ศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าไอโซเลทอื่นอย่างชัดเจน โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียงให้มีอายุ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 1 ลูกปลงในอาหาร NB นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ใส่เชื้อตั้งต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ และเก็บตัวอย่างตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในวิธีการทดลองข้อ 4 (เพื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เป็นระยะ ทุก 24 ชั่วโมงจนกว่าปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตจะน้อยลง) พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวันแรกและวันที่สองเท่ากับ 14488.36 และ 14408.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวันที่สามเท่ากับ 2645.71 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 501 ในวันแรกและวันที่สองเท่ากับ 14458.31 และ 14490.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวันที่สามเท่ากับ 2138.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผ่านไปสองวัน เชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงใกล้เคียงกัน เมื่อถึงวันที่สามค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งตั้งแต่วันที่สามเป็นต้นไปเชื้ออาจจะเริ่มเข้าสู่ death phase สารอาหารและยูเรียหมดลงทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนและผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ทำให้ค่ากิจกรรมที่วัดได้มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

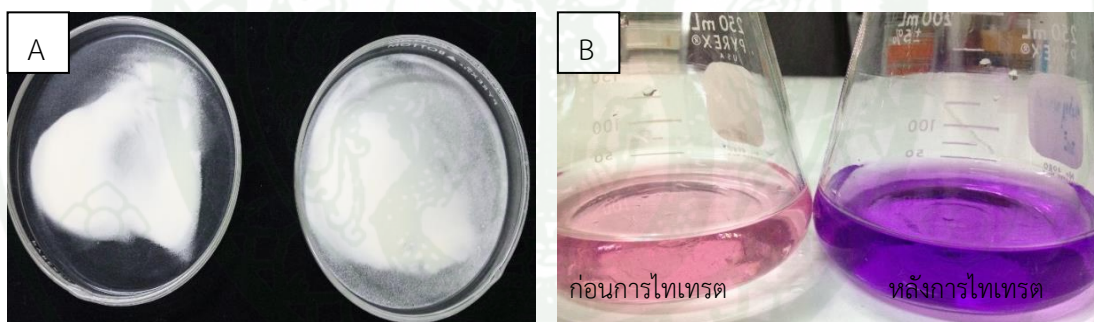


ภาพที่ 10 เปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท 201 และ 501 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์

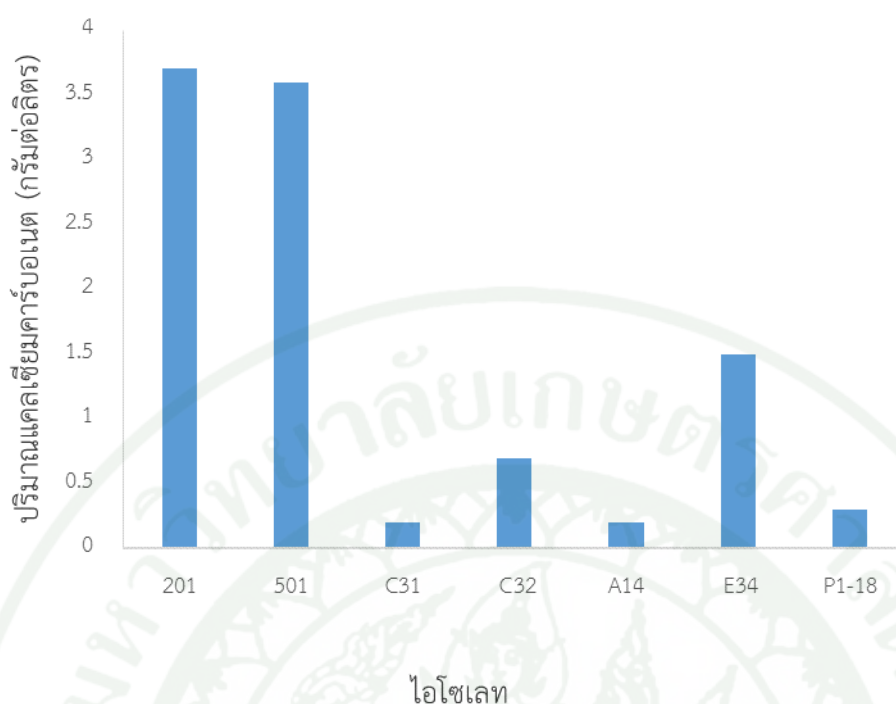
มีรายการการศึกษาการผลิตกิจกรรมเอนไซม์ที่ศึกษาและวัดปริมาณเอนไซม์โดยวิธี phenol-hypochlorite เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ ซึ่งศึกษาในเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เช่นกัน เช่น *B. simplex*, *B. megaterium*, *B. pasteurii* และ *B. lentus* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร และอาหารที่มี yeast extract 20 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัม และนิกเกิลคลอไรด์ 10 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร แต่เชื่อดังกล่าวให้ผล การศึกษาการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดที่วันที่ 3 วันและ 5 ซึ่งผลิตได้ อยู่ในช่วง 244-553 ยูนิต์ต่อ มิลลิตร เมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้แล้วที่ให้ผลการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดเพียง 1-2 วันเท่านั้น แต่ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีความแตกต่างกัน อาจเป็นผลทำให้ค่ากิจกรรมที่ได้มีความแตกต่างกัน ไปด้วย เพราะสูตรอาหารที่ต่างกันอาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (Achal *et al.*, 2009, 2010, 2011; Puspita *et al.*, 2011) ซึ่งการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 เพื่อให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดนั้นไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียเป็นระยะเวลานานๆ เพียงแค่ 1-2 วันก็เพียงพอแล้ว

4. การศึกษาการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในห้องปฏิบัติการ โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูง

สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือแบคทีเรียกลุ่ม ureolytic ที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้สูงนั้น ควรจะสามารถผลิตคาร์บอเนตได้ในปริมาณมาก ทำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากตามไปด้วย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ในปริมาณมากนั้นก็จะย่อยสลายยูเรียได้ในปริมาณที่มากด้วยเช่นกัน โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งพลังงานซึ่งจะทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของยูเรีย คือคาร์บอเนตและแอมโมเนียในปริมาณมาก และหากในระบบมีแคลเซียมไอออนอยู่ ก็จะเข้าจับกับคาร์บอเนตที่ได้มาจากการสลายตัวของยูเรียเกิดเป็นตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ในปริมาณมากเช่นกัน (Stocks - Fischer *et al*, 1999; Kroll, 1990) การวัดปริมาณการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต ทำโดยวิธีที่ได้อธิบายไว้แล้วในวิธีการทดลองข้อ 6 โดยอาศัยวิธี EDTA titration ผลที่ได้แสดงไว้ในภาพที่ 12



ภาพที่ 11 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกในอาหาร urea broth ในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร นาน 5 วัน ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (A) สีของสารละลายก่อนและหลังการไทเทรตด้วยวิธี EDTA titration (B)



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร นาน 5 วัน

แสดงให้เห็นว่าการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตของทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสที่วัดได้ คือไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสูงก็จะสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงตามไปด้วย โดยจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 มีการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตสูงที่สุดที่ 3.7 และ 3.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเช่นกัน รองลงมาเป็น E34, C32, P1-18 เท่ากับ 1.5, 0.7 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ C31 และ A14 เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งทั้งห้าไอโซเลทนี้เป็นไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้น้อยด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายๆ งาน กล่าวคือ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ยูรี เอสสูงจะได้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงด้วยเช่นกัน (Achal *et al.*, 2009, 2010, 2011; Chou *et al.*, 2011; Al-Thawadi, 2011; Hammad *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013) และเนื่องจากความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์อาจจะยังไม่เหมาะสม ทำให้แคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้มีปริมาณน้อย ซึ่งมีรายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์จะเพิ่มปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยเช่นกัน (Nemati *et al.*, 2003)

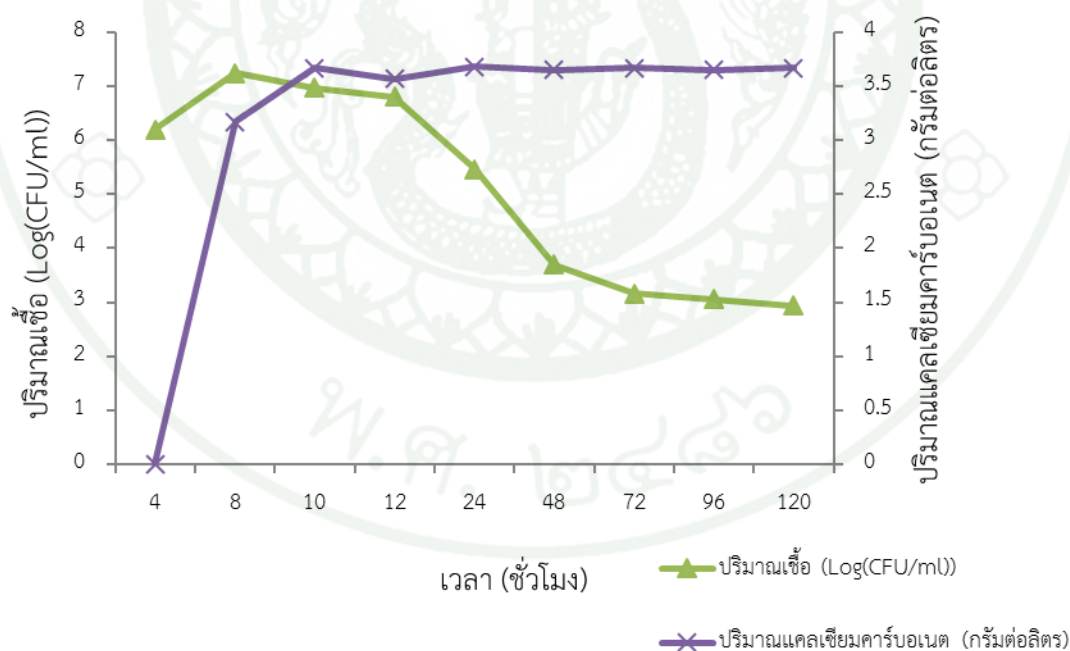
ส่วนปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2013) ซึ่งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 49 กรัมต่อลิตร (0.33 โมลาร์) ที่ 2, 4 และ 6 วัน โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. flexus*, *B. pasteurii* และ *B. sphaericus* และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียนาน 6 วัน พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดให้ค่าตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตอยู่ในช่วง 4.7-6.6 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนานขึ้น แต่ในงานวิจัยนี้ใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 3.67 กรัมต่อลิตร (0.025 โมลาร์) ซึ่งน้อยกว่าประมาณสิบสามเท่า จะเห็นว่าปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้มีความแตกต่างกันมาก แต่ปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน ของไอโซเลท 201 และ 501 คือ 3.6-3.7 กรัมต่อลิตร ในขณะที่งานวิจัยของ Kumar *et al.* (2013) ได้แคลเซียมคาร์บอเนตอยู่ในช่วง 4.7-6.6 กรัมต่อลิตร แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 นี้มีศักยภาพในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้มาก ซึ่งถ้าในงานวิจัยนี้มีการเพิ่มปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้ก็อาจจะเพิ่มมากขึ้นด้วย และจะเห็นว่าวิธีในการหาปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นสามารถทำได้หลากหลายวิธีด้วยกัน เช่น งานวิจัยของ Achal *et al.* (2011) ซึ่งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตรเท่ากับงานวิจัยนี้ หลังจากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองโดยแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จะอยู่บนกระดาษกรองและนำไปชั่งน้ำหนัก พบว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 5 วัน โดย *B. megaterium* AP6 ได้แคลเซียมคาร์บอเนต 2.26 มิลลิกรัม ต่อ cell mass 1 มิลลิกรัม *Bacillus* sp. AP4 ได้แคลเซียมคาร์บอเนต 1.9 มิลลิกรัม ต่อ cell mass 1 มิลลิกรัม และ *B. simplex* AP9 ได้แคลเซียมคาร์บอเนต 1.8 มิลลิกรัม ต่อ cell mass 1 มิลลิกรัม

5. การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและความสัมพันธ์ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต และการศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตของเชื้อแบคทีเรีย

5.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกและความสัมพันธ์ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงและให้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงเช่นกัน และค่าที่ได้ของทั้งสองกิจกรรมมีค่าใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 501 จึงเลือกเชื้อไอโซเลท 201 เป็นตัวแทนเพื่อศึกษาการเจริญและศึกษาความสัมพันธ์ในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตไปพร้อมกันโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์

และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร (0.025 โมลาร์) โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 4, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและหาแคลเซียมคาร์บอเนตไปพร้อมๆ กัน ผลจากการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่า ปริมาณสูงสุดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 อยู่ที่ชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 1.74×10^7 CFU/ml และเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจาก 8-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น เชื้อจะค่อยๆ สร้างแคลเซียมคาร์บอเนตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และสร้างมากที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไป หลังจากนั้นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตจะคงที่ ซึ่งอธิบายได้ว่าเนื่องจากปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์มีความจำกัดที่ 3.67 กรัมต่อลิตร เมื่อคาร์บอเนตจับกับแคลเซียมไอออนจนหมด ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตจึงไม่เพิ่มขึ้นแม้จะเลี้ยงเชื้อต่อไปก็ตาม ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Achal *et al.*, 2011 ที่ให้ผลการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตของแต่ละเชื้อสูงสุดในวันที่ 5 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 เจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 8 และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 ดังนั้นในการทดสอบการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตครั้งต่อไปจึงไม่จำเป็นต้องใช้เวลาทดสอบเกิน 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อชนิดนี้

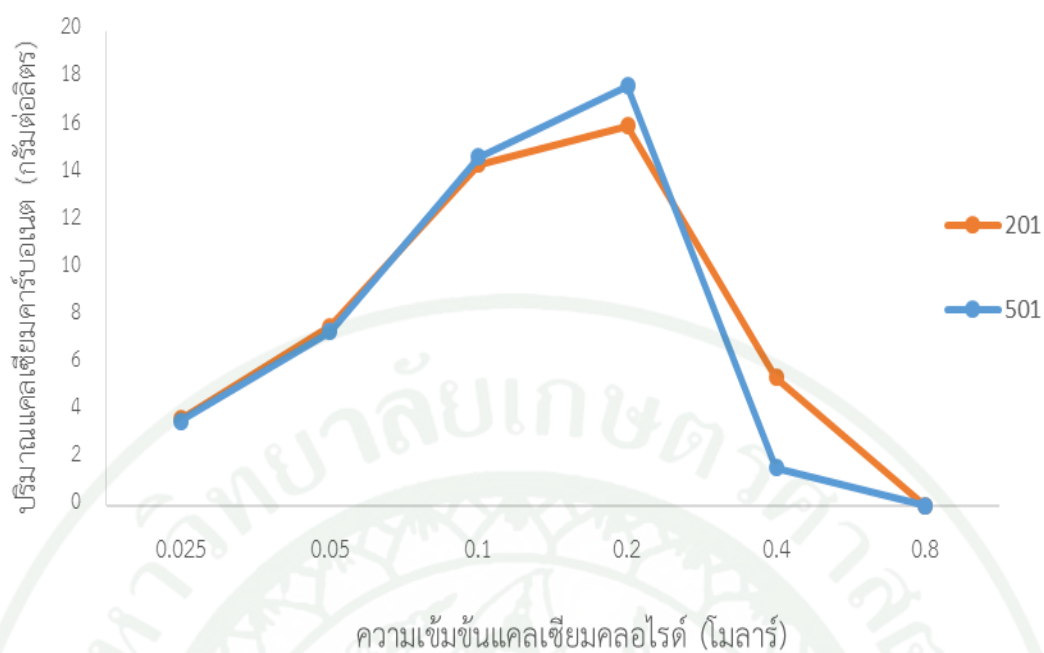


ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.67 กรัมต่อลิตร ที่เวลาต่างๆ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

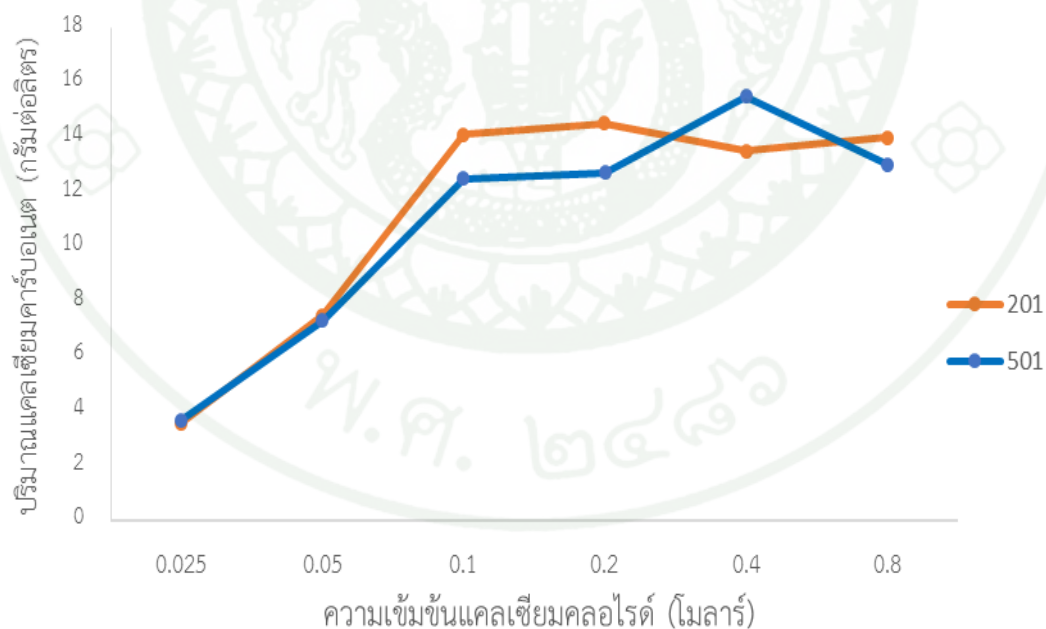
5.2 การศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ในสูตรอาหารต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต

เนื่องจากในการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญต่อของการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียก็สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากที่สุด จากภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต ชี้ให้เห็นว่าปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้คงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 จึงนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 มาศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนต โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กรรมวิธี คือการใส่แคลเซียมคลอไรด์ปริมาณต่างๆ กัน ลงในอาหาร basal medium ที่มี NB ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ก่อนที่จะมีการเลี้ยงเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อนาน 1 วัน ส่วนกรรมวิธีที่สองคือ ใส่แคลเซียมคลอไรด์หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ที่มีผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 วัน ผลจากกรรมวิธีแรก (ดังแสดงในภาพที่ 14) พบว่าปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของแคลเซียมคลอไรด์ด้วยเช่นกัน โดยจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 โมลาร์ หลังจากนั้นที่ความเข้มข้น 0.4 เป็นต้นไปปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตจะลดลงอย่างมาก ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์ควรเป็น 29.404 กรัมต่อลิตร (0.2 โมลาร์) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 สามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้ 16 กรัมต่อลิตร และไอโซเลท 501 ได้ 17.7 กรัมต่อลิตร มีข้อสังเกตว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 58.808 กรัมต่อลิตร (0.4 โมลาร์) และ 117.616 กรัมต่อลิตร (0.8 โมลาร์) นั้นเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปทำให้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท เจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเลย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นน้อยมาก ส่วนผลจากกรรมวิธีที่สอง (ดังแสดงในภาพที่ 15) ที่ใส่แคลเซียมคลอไรด์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB ที่มีการใส่ยูเรีย เพื่อให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ได้อย่างเต็มที่ก่อนแล้วค่อยใส่แคลเซียมคลอไรด์ลงไปทีหลังเพื่อให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้ก็จะค่อยๆ เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.025, 0.05 และ 0.1 โมลาร์ หลังจากนั้นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้ก็จะมีความคงที่และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 201 สามารถเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงสุด 14.5 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 29.404 กรัมต่อลิตร (0.2 โมลาร์) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 501 สามารถเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงสุด 15.5 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 58.808 กรัมต่อลิตร (0.4 โมลาร์) ซึ่งกรรมวิธีนี้วัดจากตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นทันทีที่มีการใส่แคลเซียมคลอไรด์ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสจากการย่อยสลายยูเรียและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บาเมตและแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียจะทำให้ค่าพีเอชในระบบสูงมากขึ้น คาร์บาเมตจะถูกย่อยได้เป็นแอมโมเนียและกรดคาร์บอนิก กรดคาร์บอนิกจะแตกตัวให้ไบคาร์บอเนตและแอมโมเนีย แอมโมเนียจะแตกตัวให้แอมโมเนียมไอออนและไฮดรอกไซด์ไอออน เมื่อมีไฮดรอกไซด์ไอออนในระบบจะทำให้ค่าพีเอชในระบบสูงขึ้น และจะไป

รบกวนสมดุลของไบคาร์บอเนต ส่งผลให้เกิดคาร์บอเนตไอออน เมื่อใส่แคลเซียมคลอไรด์ลงไปจึงเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตทันทีตามสมการ จากกรรมวิธีที่ 2 ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้จะมีการใส่แคลเซียมคลอไรด์ไปมากเท่าใดก็ตาม ปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้ก็มีปริมาณจำกัด ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้อย่างจำกัด จะเห็นว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 0.2 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงที่สุดและมีความสอดคล้องกันทั้งสองกรรมวิธีสำหรับแบคทีเรียไอโซเลท 201 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 501 นั้นความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงที่สุดสำหรับกรรมวิธีแรก คือ 0.2 โมลาร์ ส่วนกรรมวิธีที่สอง คือ 0.4 โมลาร์ สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในครั้งต่อไปนั้น ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 0.2 โมลาร์ก็น่าจะเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท ถึงแม้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 0.4 โมลาร์ จะทำให้ได้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงที่สุดสำหรับแบคทีเรียไอโซเลท 501 ก็ตาม ซึ่งปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้จากการเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 โมลาร์ นั้นไม่แตกต่างกันมาก แต่แคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้มีความแตกต่างกันมากถึง 29 กรัมต่อลิตร ตามทฤษฎี หากการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตจากยูเรียเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ไม่มีการย้อนกลับเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระบบ ปฏิกริยาการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนต คือ ยูเรีย 1 โมลาร์ (น้ำหนักโมเลกุล 60.06 กรัมต่อลิตร) จะได้แคลเซียมคาร์บอเนต 1 โมลาร์ (น้ำหนักโมเลกุล 100.09 กรัมต่อลิตร) จากสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ คือใช้ยูเรีย 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งแคลเซียมคาร์บอเนตที่ควรจะได้ตามทฤษฎี คือ 33.36 กรัมต่อลิตร แต่จากการทดลองนี้ปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ได้ไม่เป็นไปตามทฤษฎี อาจเนื่องมาจากความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่มีจำกัดในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสเพื่อย่อยสลายยูเรีย หรืออาจเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์เพราะเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้นั่นเองและในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียควบคู่ไปด้วย



ภาพที่ 14 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นเมื่อใส่แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นเมื่อใส่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์

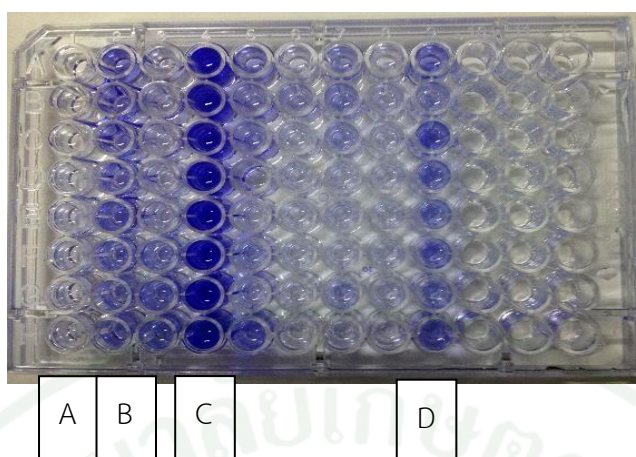
6. การทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างไบโอฟิล์ม

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการทดลองจะต้องมีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุได้ดี ซึ่งไบโอฟิล์มเป็นโครงสร้างยึดเกาะกับพื้นผิว สร้างโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Costerton *et al.*, 1987) จึงต้องมีการทดสอบคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์ม ในการทดลองนี้ได้วัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของแต่ละไอโซเลท โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยวิธีการของ Hesham, 2008 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 8 ผลการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท

Isolates	Average OD ₅₇₀	Biofilm production
control	0.1250	No biofilm producer
201	0.1849	No biofilm producer
501	0.1140	No biofilm producer
C31	0.2690	Moderate biofilm producer
C32	0.2831	Moderate biofilm producer
A14	0.1286	No biofilm producer
E34	0.1391	No biofilm producer
P1-18	0.8731	Strong biofilm producer

*measured and calculated followed by Hesham (2008)



ภาพที่ 16 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มใน microtiter plate โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร negative control (A), ไอโซเลท C31 (B), ไอโซเลท P1-18 (C) และ ไอโซเลท C32 (D)

ผลจากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม สูงที่สุดคือ P1-18 ซึ่งมีค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8731 ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมถึง 4 เท่า จึงจัดเป็น Strong biofilm producer รองลงมาเป็นไอโซเลท C31 และ C32 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2690 และ 0.2831 ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 2 เท่าแต่ไม่เกิน 4 เท่า จึงจัดเป็น Moderate biofilm producer ส่วนอีก 4 ไอโซเลทมีค่าการดูดกลืนแสงไม่มากกว่าชุดควบคุมจึงจัดเป็น No biofilm producer จากผลการทดลองเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท P1-18 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไบโอฟิล์มได้มากที่สุด แต่เนื่องจากเชื้อไอโซเลทดังกล่าว ขาดคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและแคลเซียมคาร์บอเนตที่โดดเด่น ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Achal and Pan, 2011 ที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและแคลเซียมคาร์บอเนตได้มากจะสามารถผลิตไบโอฟิล์มได้มาก ซึ่งไบโอฟิล์มนี้จะเป็นตัวจับให้แคลเซียมคาร์บอเนตเกาะกันเป็นชั้นๆ ได้ อีกด้วย อนึ่งการทดสอบไบโอฟิล์มในครั้งนี้ใช้อาหาร TSB ในการทดสอบ ซึ่งอาจจะเป็นอาหารที่ไม่เหมาะต่อการเจริญและสร้างไบโอฟิล์ม และเป็นอาหารที่มีความแตกต่างกับการทดลองอื่นๆ ที่ใช้อาหาร NB ซึ่งการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันอาจจะมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มด้วยเช่นกัน

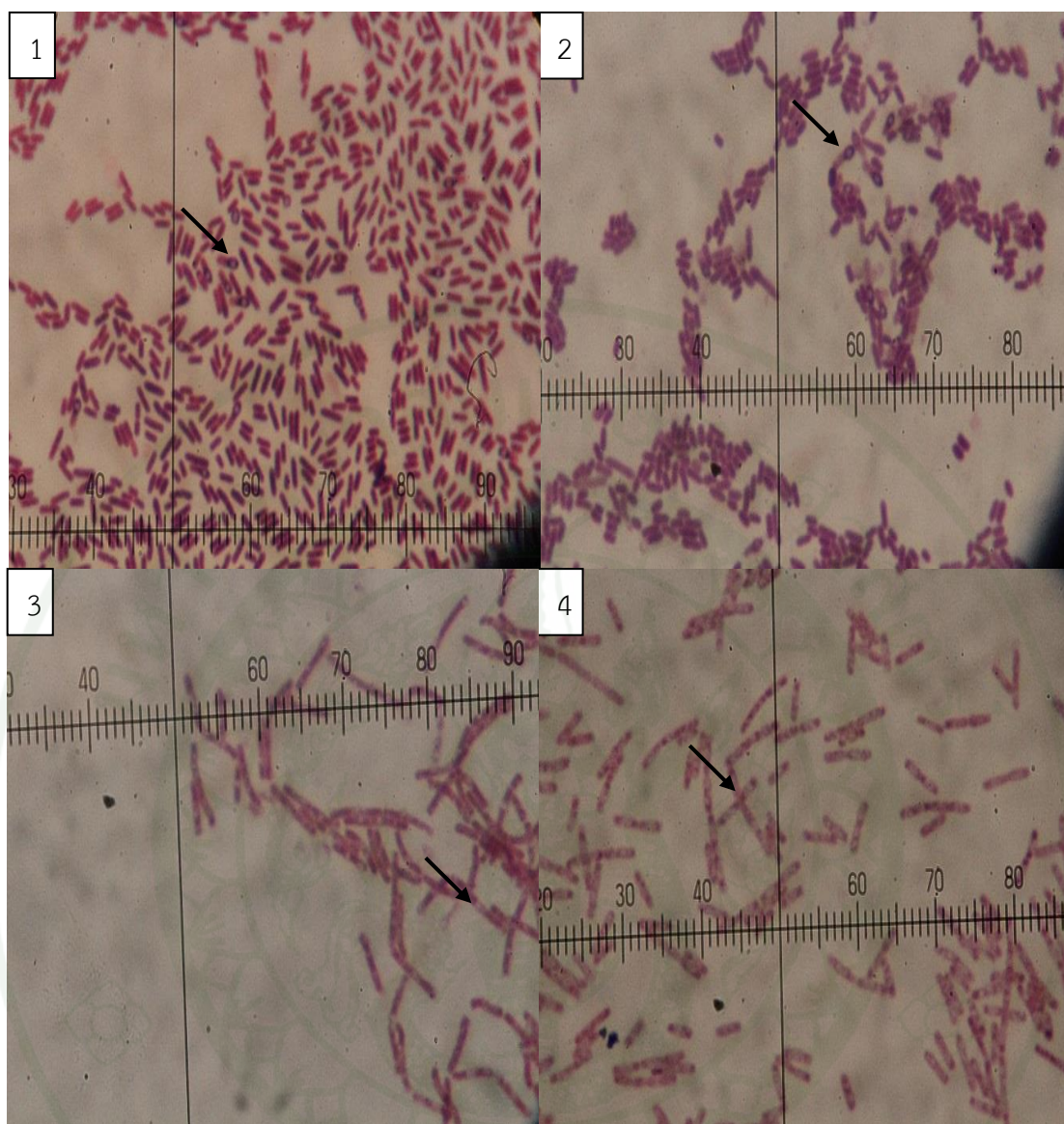
7. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดย conventional method เปรียบเทียบกับวิธี Biolog และเทคนิคทางโมเลกุล

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี การติดสีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 9

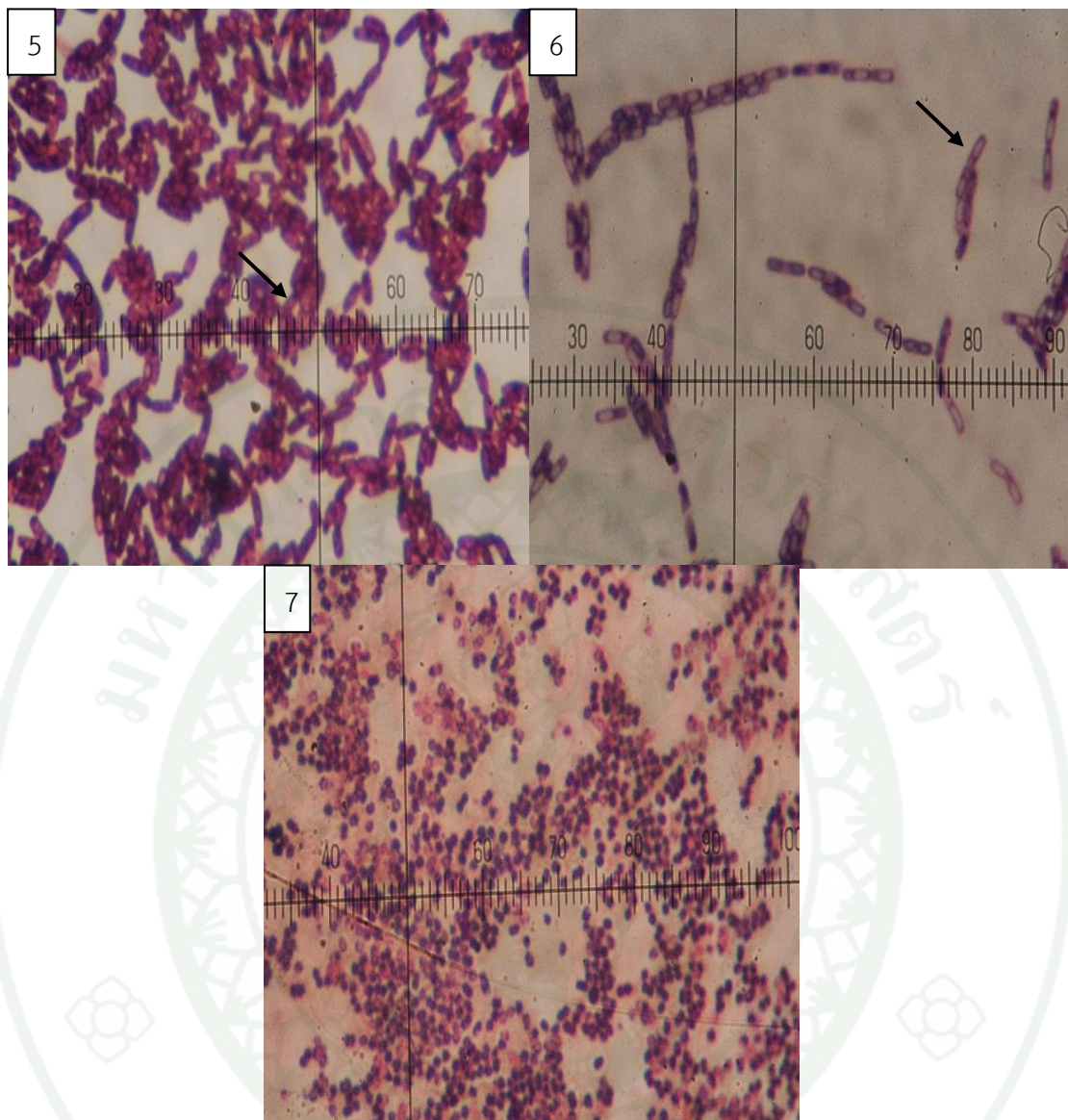


ตารางที่ 9 ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 7 ไอโซเลท

ไอโซเลท	สีโคโลนี	ลักษณะโคโลนี	รูปร่าง	การติดสีแกรม	การเรียงตัว	ลักษณะสปอร์	การจัดกลุ่มตามลักษณะสปอร์
201	ใส	กลม แบน ขอบเรียบโป่งแสง	ท่อน	บวก	อยู่เดี่ยวๆ	รูปกลม ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม III
501	ใส	กลม แบน ขอบเรียบ โป่งแสง	ท่อน	บวก	อยู่เดี่ยวๆ	รูปกลม ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม III
C31	ขาว	กลม แบน ขอบหยัก	ท่อน	บวก	ต่อกันเป็นสาย	รูปรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม IA
C32	ขาว	กลม แบน ขอบหยัก โป่งแสง	ท่อน	บวก	ต่อกันเป็นสาย	รูปรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม IA
A14	ขาว	กลม แบน ขอบหยัก มีเมือก	ท่อน	บวก	ต่อกันเป็นสาย	รูปรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม IA
P1-18	ขาว	กลม แบน ขอบหยัก	ท่อน	บวก	ต่อกันเป็นสาย	รูปรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง	กลุ่ม IA
E34	เหลือง	กลม แบน ขอบหยัก ทึบแสง	กลม	บวก	อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ และเป็นกลุ่ม	-	-



ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรมของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท 201 (1), 501 (2), C31 (3), C32 (4) และรูปร่างสปอร์ (บริเวณหัวลูกศรชี้)



ภาพที่ 18 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรมของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต A14 (5), P1-18 (6), E34 (7) และรูปร่างสปอร์ (บริเวณหัวลูกศรชี้)

จากการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไอโซเลต A14, P1-18, C31 และ C32 มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์รูปร่างรีหรือทรงกระบอกและไม่ได้ทำให้เซลล์โป่ง มีการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งทำให้การติดสีในเซลล์ไม่สม่ำเสมอ มีความกว้างของขนาดเซลล์มากกว่า 1 ไมโครเมตร จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. Group IA และไอโซเลต 201 และ 501 มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์เป็นรูปกลมตรงปลายและทำให้เซลล์โป่งออก จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. Group III และไอโซเลต E34 ซึ่งมีรูปร่างกลม ติด

สีแกรมบวก ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาเพิ่มเติม
 ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ *B. megaterium*,
B. thuringiensis และ *B. cereus* เปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลต A14 , P1-18,
 C31 และ C32

Characteristics	<i>B. megaterium</i> *	<i>B. thuringiensis</i> *	<i>B. cereus</i> *	Isolate A14	Isolate P1-18	Isolate C31	Isolate C32
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Width, μm	1.2-1.5	1.0-1.2	1.0-1.2	>1	>1	<1	<1
Length, μm	2-5	3-5	3-5	2-3	3-4	2-3	2-3
Swollen sporangia	-	-	-	-	-	-	-
Unstained globule in the protoplasm	+	+	+	+	+	+	+
Crystal protein formation	-	d	-	-	+	ND	ND
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	ND	-	-	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	+	+	-	+	+	+
VP reaction	-	+	+	-	+	+	+
pH in broth VP	4.5-6.8	4.3-5.6	4.3-5.6	4.95	4.96	4.67	4.74
Nitrate reduction	d	+	+	-	-	-	-
Growth at pH 5.7	+	+	+	+	+	+	+
Acid production from							
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	d	-	-	+	-	-	-
D-xylose	d	-	-	+	-	+	+
D-mannitol	+	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Characteristics	<i>B. megaterium</i> *	<i>B. thuringiensis</i> *	<i>B. cereus</i> *	Isolate A14	Isolate P1-18	Isolate C31	Isolate C32
Hydrolysis of							
Starch	+	+	+	+	-	-	-
Casein	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+
Tween80	-	+	+	-	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	d	-	-	+	-	-	-
Lecithin (egg yolk))	-	+	+	-	+	+	+
Tyrosine	d	+	+	+	+	+	+
NaCl tolerance							
NB + NaCl 5 %	+	+	+	+	+	+	+
NB + NaCl 7%	+	+	d	+	+	+	+
NB + NaCl 10%	-	ND	ND	+	+	+	+
Utilization of							
Citrate	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	ND	-	-	+	+	-	+

หมายเหตุ * Claus and Berkeley (1986), Gordon (1989), Niall and Paul (2009)

ND = not determined d= different strains gave different reactions (16-84% positive)

จากตารางที่ 10 แบคทีเรียไอโซเลท A14 ซึ่งมีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์รูปวงรีที่ไม่ทำให้เซลล์โป่ง มีการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งทำให้การติดสีในเซลล์ไม่สม่ำเสมอ มีความกว้างของขนาดเซลล์มากกว่า 1 ไมโครเมตร จึงจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. Group IA สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ เป็น aerobe สามารถเจริญได้ใน

อาหาร NB ที่พีเอช 5.7 อาหาร NB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล D-glucose D- mannitol L-arabinose และ D-xylose สามารถย่อย casein gelatin phenylalanine tyrosine สามารถใช้ citrate และ propionate ในการเจริญได้ ให้ผลการทดสอบ VP เป็นลบ และมีค่าพีเอช เท่ากับ 4.95 หลังจากเจริญ 7 วัน ไม่สร้างเอนไซม์ lecithinase ไม่สามารถเจริญในอาหาร NB ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อย Tween 80 จากคุณสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาเมื่อเปรียบเทียบกับสมาชิกในกลุ่ม IA ไอโซเลทดังกล่าวมีคุณสมบัติเหมือนกับ *B. megaterium* มากที่สุด ส่วนคุณสมบัติที่มีความแตกต่างกันคือ มีความสามารถในการใช้ propionate ในการเจริญ ซึ่งแตกต่างกับข้อมูลที่ยังมีรายงานว่า *B. megaterium* ไม่สามารถใช้ propionate ในการเจริญได้ (Claus and Berkeley, 1986; Gordon, 1989; Niall and Paul, 2009) เนื่องจากว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่ตรงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของ *B. megaterium* จึงสรุปว่าไอโซเลท A14 จำแนกชนิดว่าเป็น *B. megaterium*

ผลการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลท P1-18 จากการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการสร้างคริสตัลโปรตีนซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของ *B. thuringiensis* ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase เป็นบวก สามารถเจริญในอาหาร anaerobic agar จึงจัดเป็น facultative anaerobe การทดสอบ VP ให้ผลการทดสอบเป็นบวกและมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.96 เมื่อครบ 7 วัน สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล D-glucose ได้เพียงชนิดเดียว เจริญได้ใน NB ที่พีเอช 5.7 และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ย่อย casein gelatin tween 80 phenylalanine lecithin tyrosine ใช้ citrate และ propionate ในการเจริญได้ ซึ่งผลการทดสอบเกือบทั้งหมดให้ผลตรงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ *B. thuringiensis* ส่วนการทดสอบเอนไซม์ oxidase การรีดิวซ์ไนเตรท การย่อย casein และความสามารถในการใช้ propionate ในการเจริญ ไม่ตรงกับที่ได้มีรายงาน (Claus and Berkeley, 1986; Gordon, 1989; Niall and Paul, 2009) อย่างไรก็ตามได้เคยมีผู้รายงานว่า *B. thuringiensis* บางสายพันธุ์ไม่สามารถย่อย casein และรีดิวซ์ไนเตรทได้ (Priest and Susan, 2000) แต่เนื่องจากไอโซเลทนี้มีการสร้างคริสตัลโปรตีนซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะจึงสรุปได้ว่า ไอโซเลท P1-18 จำแนกชนิดได้เป็น *B. thuringiensis*

แบคทีเรียไอโซเลท C31 และ C32 ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับกลุ่มของ *B. cereus* คือ สร้างเอนไซม์ catalase ได้ เป็น facultative anaerobe ให้ผล VP เป็นบวกและมีค่าพีเอชในอาหาร VP 7 วันเท่ากับ 4.67 และ 4.74 ตามลำดับ สามารถเจริญได้ในอาหารที่พีเอช 5.7 และอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดจากน้ำตาล D-glucose ได้ สามารถย่อย casein gelatin tween 80 phenylalanine lecithin tyrosine ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนใน

การเจริญ คุณสมบัติเหล่านี้ตรงกับ *B. cereus* ที่เคยมีรายงาน ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์ oxidase การผลิตกรดจากน้ำตาล D-xylose การใช้ propionate ในการเจริญ ไม่สามารถยีสในเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อยแป้ง เป็นคุณสมบัติที่ไม่สอดคล้องกับ *B. cereus* จะเห็นว่าการทดสอบส่วนใหญ่ให้ผลใกล้เคียงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *B. cereus* แต่เนื่องจากไอโซเลท C31 และ C32 สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล D-xylose ซึ่งการสร้างกรดจากน้ำตาล D-xylose นั้นยังไม่มีผู้ใดเคยรายงานมาก่อนในแบคทีเรียชนิดนี้ อีกประการหนึ่ง เมื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์พบว่า ทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถสร้างสปอร์ หรือสร้างน้อยมากหลังจากที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการไประยะหนึ่ง ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการสร้างคริสตัลโปรตีนได้ นอกจากนั้นเชื้อ 2 ชนิดนี้ไม่สามารถยีสในเตรทเป็นไนไตรท์ ซึ่งโดยปกติกลุ่ม *B. cereus* จะให้ผลบวก จึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่า C31 และ C32 จะใกล้เคียง *B. cereus* และ *B. thuringiensis* หรือไม่ นอกจากนี้ขนาดความกว้างของเซลล์ C31 C32 ที่น้อยกว่า 1 ไมโครเมตร แต่พบแกนูลของ poly- β -hydroxybutyrate ซึ่งยิ่งเพิ่มความสับสน จึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน บอกได้เพียงคร่าวๆ ว่าน่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มของ *B. cereus* เมื่อมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธี biolog ได้ผลการจำแนกชนิดที่สอดคล้องกันว่าใกล้เคียง *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ส่วนการวิเคราะห์ ลำดับ 16S rRNA ก็เช่นเดียวกัน พบว่าเหมือน *B. cereus* group (100% identity) (ซึ่งจะเห็นว่าการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางก็ไม่สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม *B. cereus* ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์นี้ *B. cereus*, *B. thuringiensis* และ *B. anthracis* มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน) ดังนั้นจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธีอื่น เช่น เทคนิคทางโมเลกุลที่มีความจำเพาะ chemotaxonomy หรืออื่นๆ ต่อไป

ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ *B. sphaericus* เปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501

Characteristics	<i>B. sphaericus</i> *	Isolate 201	Isolate 501
Cell shape	rod	rod	rod
Width, μm	0.6-1	<1	<1
Length, μm	1.5-5	2-3	2-3
Swollen sporangia	+	+	+
Width, μm	0.6-1	<1	<1
Length, μm	1.5-5	2-3	2-3
Unstained globule in the protoplasm	-	-	-
Crystal protein formation	-	-	-
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-
VP reaction	-	-	-
pH in broth VP	7.4-8.6	8.25	8.37
Nitrate reduction	-	-	-
Growth at pH 5.7	d	-	-
Acid production from			
D-glucose	-	-	-
L-arabinose	-	-	-
D-xylose	-	-	-
D-mannitol	-	-	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Characteristics	<i>B. sphaericus</i> *	Isolate 201	Isolate 501
Hydrolysis of			
Starch	-	-	-
Casein	d	-	-
Gelatin	-	-	+
Tween80	-	-	-
Urea	+	+	+
Phenylalanine	+	-	-
Lecithin(rgg yolk)	-	-	-
Tyrosine	-	-	-
NaCl tolerance			
NB + NaCl 5%	+	+	+
NB + NaCl 7%	-	-	-
NB + NaCl 10%	-	-	-
Utilization of			
Citrate	-	-	-
Propionate	-	-	-

หมายเหตุ * Claus and Berkeley (1986), Gordon (1989), Niall and Paul (2009)

ND = not determined d= different strains gave different reactions (16-84% positive)

จากผลการทดสอบในตารางที่ 11 แสดงข้อมูลของแบคทีเรียไอโซเลท 201 และ 501 เปรียบเทียบกับ *B. sphaericus* เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีลักษณะสปอร์กลม และทำให้เซลล์โป่ง จึงถูกจัดกลุ่มอยู่ใน *Bacillus* group III ตามหลักการที่อธิบายโดย (Gordon, 1989) เมื่อทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase พบว่าให้ผลบวก และทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นพวก aerobe แบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้ให้ผลการทดสอบเกือบทั้งหมดเป็นลบ เช่น การทดสอบ VP

และมีค่าพีเอชในอาหาร VP 7 วันเท่ากับ 8.25 และ 8.37 ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด คือ D-glucose, L-arabinose, D-xylose และ D-mannitol สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อยแป้ง Casein Tween 80 phenylalanine lecithin tyrosine ส่วน gelatin ไอโซเลท 201 ให้ผลลบ ขณะที่ไอโซเลท 501 ให้ผลเป็นบวก รวมไปถึงไม่สามารถใช้ citrate และ propionate ในการเจริญได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวเมื่อเทียบกับ *Bacillus* ในกลุ่มนี้พบว่าใกล้เคียง *B. sphaericus* มากที่สุด และเมื่อมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วย วิธี biolog ไอโซเลท 201 ได้ผลการจำแนกชนิดเป็น *Lysinibacillus sphaericus* (similarity =0.582) ส่วนผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Lysinibacillus fusiformis* (97% identity) และ *Lysinibacillus sphaericus* (97% identity) ส่วนไอโซเลท 501 วิธี biolog ได้ผลการจำแนกชนิดเป็น *Lysinibacillus sphaericus* (similarity =0.562) ส่วนผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA ให้ผลการจำแนกชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Lysinibacillus fusiformis* (100% identity), *Lysinibacillus sphaericus* (100% identity) และ *Lysinibacillus sp.* (100% identity) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 เป็นต้นมา *B. sphaericus* ได้ถูกจัดอยู่ใน ยีนส์ใหม่โดย Ahmed et al. (2007) คือ *Lysinibacillus* โดยคุณสมบัติของเชื้อในยีนส์นี้คือเป็นเซลล์ ที่มีรูปร่างท่อน สร้างสปอร์ที่เป็นรูปวงรีหรือทรงกระบอกซึ่งจะทำให้เซลล์โป่ง สามารถเคลื่อนที่ได้ การทดสอบทางชีวเคมีทั้ง catalase และ oxidase จะให้ผลบวก ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ชนิดของกรดไขมันเป็น iso-C_{15:0} และ GC content เป็น 35-38 mol% ซึ่งความแตกต่างของยีนส์ *Lysinibacillus* และยีนส์ *Bacillus* คือ ยีนส์ *Lysinibacillus* จะมีกรดอะมิโนชนิด Lysine และ Aspartate ในเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์ ส่วนยีนส์ *Bacillus* จะมีกรดอะมิโน Lysine Ornithine นอกเหนือจากข้อมูลความแตกต่างของลำดับเบสของ 16S rRNA

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท E34

Characteristics	E34	<i>Paracoccus denitrificans</i> .*	<i>Micrococcus nishinomiyaensis</i> **
Cell shape	coccus	coccus	coccus
diameter, μm	<1	<1	0.9-1.5
Gram's stain	+ve	-ve	+ve
Granules of PHB	***	+	no data
colony color	yellow	cream	orange
motility	-	-	-
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-
VP reaction	-	no data	+
pH in VP broth	6.83	no data	no data
Nitrate reduction	+	+	+
Denitrification	ND	+	-
Growth at pH 5.7	-	no data	no data
Acid from			
D-glucose	+	-	d
L-arabinose	+	-	no data
D-xylose	+	-	no data
D-mannitol	-	-	no data
NaCl tolerance			
NB + NaCl 3%	ND	+	no data
NB + NaCl 5%	-	no data	no data
NB + NaCl 7%	-	no data	no data
NB + NaCl 10%	-	no data	no data

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Characteristics	E34	<i>Paracoccus denitrificans</i> *	<i>Micrococcus nishinomiyaensis</i> **
Utilization of			
Citrate	-	-	no data
Propionate	-	no data	no data
Hydrolysis of			
Starch	-	-	d
Casein	-	no data	no data
Gelatin	-	-	+
Tween80	-	no data	d
Urea	+	+	+
Lecithin (egg yolk)	-	no data	+
Esculin	-	no data	-
Phenylalanine	-	+	-
Tyrosine	+	+	no data

หมายเหตุ * Ohara *et al.* (1990)

** Kocur *et al.* (1975)

*** เมื่อย้อมสีเพื่อศึกษาแกรนูลของ PHB แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถเห็นได้อย่างชัดเจน

ND = not determined d= different strains gave different reactions (16-84% positive)

จากตารางที่ 12 เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางชีวเคมี สรีรวิทยา ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท E34 พบว่ามีลักษณะโคโลนีเยิ้มสีเหลือง ขอบหยัก ทึบแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร NA นาน 2 วัน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นแบคทีเรียรูปกลม ติดสีแกรมบวก มีการเรียงตัวแบบเดี่ยว เป็นคู่และเป็นกลุ่ม เมื่อย้อมสีแกรม พบว่ามีเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีเห็นแต่เส้นรอบวงเท่านั้น ในตอนแรกจึงคาดว่าอาจเป็นสปอร์ แต่เมื่อย้อมสีเอนโดสปอร์ ไม่พบการติดสีของ malachite green หลังจากนั้นจึงนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีในแต่ละอุณหภูมิ ไม่พบการเจริญเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร NA จึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีนั้นไม่ใช่สปอร์หรือเป็นสปอร์ที่ไม่สามารถทนความร้อนได้ และเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีนั้นอาจมีความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งว่าเป็นแกรนูลของ poly- β -hydroxybutyrate (PHB) จึงตรวจสอบโดยการย้อมสีเพื่อดูแกรนูลของ PHB แต่ก็ไม่สามารถเห็นแกรนูลได้อย่างชัดเจนเช่นกัน และเนื่องจากผลการจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของไอโซเลท E34 พบว่าเป็น *Paracoccus* sp. ที่มีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 99 จึงได้หาข้อมูลเพิ่มเติมของลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่ายีส *Paracoccus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม ติดสีแกรมลบ และสามารถสร้างแกรนูลของ PHB ได้ (Ohara et al., 1990) และเมื่อศึกษาคุณสมบัติของ *Paracoccus* sp. ที่มี PHB หลายๆ สปีชีส์ พบว่าไอโซเลท E34 มีความคล้ายคลึงกับ *Paracoccus denitrificans* มากกว่าสปีชีส์อื่น คุณสมบัติทางชีวเคมีที่เหมือนกัน คือ สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase เป็น aerobe สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ สามารถย่อยสลายยูเรียและ tyrosine ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล D-mannitol ไม่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และไม่สามารถย่อยแป้งได้ ส่วนการทดสอบที่ให้ผลแตกต่างกันคือ ไอโซเลท E34 สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล D-glucose L-arabinose D-xylose และไม่สามารถย่อย phenylalanine ได้ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท E34 นั้นจำแนกได้เป็นแบคทีเรียชนิดใด ขณะเดียวกันเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยากับแบคทีเรียรูปกลม ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างสปอร์ คือยีส *Micrococcus* โดยเลือกเฉพาะสปีชีส์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ และพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท E34 มีความคล้ายคลึงกับ *Micrococcus nishinomiyaensis* มากกว่าสปีชีส์อื่น (Kocur et al. 1975) ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ให้ผลเหมือนกัน คือ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็น aerobe สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อย lecithin esculin และ phenylalanine ส่วนผลการทดสอบที่แตกต่างกัน คือไอโซเลท E34 สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และผลการทดสอบ VP เป็นลบ ขณะที่ *M. nishinomiyaensis* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และให้ผล VP เป็นบวก และเนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการพบ PHB ใน *M. nishinomiyaensis* จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท E34 นั้นจำแนกได้เป็นแบคทีเรียชนิดใด จากเหตุผลดังกล่าวที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นจึง

ไม่สามารถบอกได้ว่าไอโซเลท E34 นั้นจัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในยีนส์ใด สามารถบอกได้เพียงว่าไอโซเลท E34 นั้นเป็นแบคทีเรียรูปกลมที่ติดสีแกรมบวกเท่านั้น

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท E34 ไปจำแนกชนิดด้วยวิธี biolog พบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดได้ อาจเป็นไปได้ว่าข้อมูลที่มีในฐานข้อมูลนั้นอาจไม่เพียงพอและผลการจำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rRNA ไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท E34 ด้วยเช่นกัน ถึงแม้เปอร์เซ็นต์ identity จะสูงถึง 99 ก็ตาม ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อหาความชัดเจนโดยใช้วิธีอื่น เช่น การทดสอบแหล่งคาร์บอนต่างๆ เป็นต้น

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียสร้างสปอร์ โดยวิธีดั้งเดิม วิธี Biolog และ 16S rRNA

Bacteria	ที่มา	สปีชีส์ที่จำแนกได้		
		conventional method	Biolog	16S rRNA
A14	ปูนซีเมนต์	<i>B. megaterium</i>	ND	ND
P1-18	ปูนซีเมนต์	<i>B. thuringiensis</i>	ND	ND
C31	ปูนซีเมนต์	<i>B. cereus</i> group	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> (similarity 0.535)	<i>B. cereus</i> (100% identity) <i>B. thuringiensis</i> (100% identity) <i>B. anthracis</i> (100% identity)
C32	ปูนซีเมนต์	<i>B. cereus</i> group	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> (similarity 0.503)	<i>B. cereus</i> (100% identity) <i>B. thuringiensis</i> (100% identity) <i>B. anthracis</i> (100% identity)
201	ขุยมะพร้าว	<i>B. sphaericus</i>	<i>L. sphaericus</i> (similarity 0.582)	ใกล้เคียงกับ <i>L. fusiformis</i> (97 % identity) <i>L. sphaericus</i> (97% identity)
501	ขุยมะพร้าว	<i>B. sphaericus</i>	<i>L. sphaericus</i> (similarity 0.562)	<i>L. fusiformis</i> (100% identity) <i>L. sphaericus</i> (100%identity) <i>Lysinbacillus</i> sp. (100%identity)
E34	ปูนซีเมนต์	unidentified	unidentified	<i>Paracoccus</i> sp. (99% identity)

ตารางที่ 13 (ต่อ)

หมายเหตุ ND = not determined

จากงานวิจัยของ Achal *et al.*, 2010 ที่ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสจากตัวอย่างปุ๋นซีเมนต์เช่นกันรายงานว่ 2 ไอโซเลทคือ CT2 ที่มีความใกล้เคียงกับ *B. fusiformis* และ *B. sphaericus* และ CT5 มีความใกล้เคียงกับ *B. cereus*, *B. anthracis* และ *B. mycoides* ส่วนผลจากการแยกเชื้อจากตัวอย่างขุยมะพร้าวและปุ๋นซีเมนต์ที่จำหน่ายเป็นการค้าในประเทศไทยจากงานนี้ พบเชื้อ *B. megaterium*, *B. thuringiensis* และเชื้อที่ใกล้เคียง *B. cereus* group แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้ชัดเจนดังที่กล่าวมาแล้ว

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากวัตถุประสงค์ที่ต้องการหาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสและสามารถสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในงาน biogROUT จึงแยกเชื้อจากตัวอย่างปูนซีเมนต์ที่จำหน่ายทางการค้าของประเทศไทยและขุยมะพร้าวโดยใช้อาหาร NB ที่ผสมยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ ได้แบคทีเรียจากตัวอย่างปูนซีเมนต์ 48 ไอโซเลทและจากขุยมะพร้าวจำนวน 66 ไอโซเลท แบคทีเรียที่แยกได้ นำมาทดสอบร่วมกับ *B. megaterium* และ *Bacillus* sp. จากแหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา 146 ไอโซเลท เพื่อหาแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้โดยใช้อาหาร Christensen urea agar พบว่า 127 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และเมื่อทดสอบโดยใช้อาหาร urea broth ที่มีบัฟเฟอร์สูงเพื่อคัดเลือกลายพันธุ์ที่สร้างยูรีเอสได้มาก พบว่ามี 7 ไอโซเลทที่ให้ผลบวก ผลการจำแนกชนิดของ 7 ไอโซเลทมีดังนี้ 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากปูนซีเมนต์ คือ *Bacillus megaterium* A14, *Bacillus* sp. C31 และ C32 ที่คล้าย *B. cereus* group และไอโซเลท E34 แบคทีเรียรูปกลมติดสี่แกรมบวกที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ส่วน 3 ไอโซเลท ที่แยกได้จากขุยมะพร้าว จำแนกชนิดเป็น *B. thuringiensis* P1-18, *Lysinibacillus* sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Lysinibacillus sphaericus* และ *Lysinibacillus fusiformis* เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลทมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส โดยใช้อาหารที่มี yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์และยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน และตรวจหาแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยวิธี phenol-hypochlorite พบว่า *Lysinibacillus* sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 14363.81 และ 14545.76 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 1 และ 2 และเมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร NB ที่มียูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ 3.76 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง และนำไปไทเทรตเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต โดยการวัดแคลเซียมไอออนด้วยวิธี EDTA titration พบว่า *Lysinibacillus* sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ให้ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงสุดคือ 3.7 และ 3.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่า *Lysinibacillus* sp. 201 มีการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 และเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 เป็นต้นไป จากการศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใส่แคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 โมลาร์ พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หรือ 29.404 กรัมต่อ

ลิตร ให้ค่าการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตมากขึ้นถึง 17.7 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติการสร้างไบโอฟิล์มพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lysinibacillus* sp. 201 และ *Lysinibacillus* sp. 501 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้มากและสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตได้สูงนั้น ไม่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ดังนั้นการที่จะนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงาน biogROUT นั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อให้ได้เชื้อที่มีความสามารถนำไปประยุกต์ใช้โดยอาจใช้เชื้อผสมเพื่อให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการก็อาจเป็นไปได้

ข้อเสนอแนะ

การทดสอบเพื่อหาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น เมื่อทราบความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อคร่าวๆ แล้วว่าอยู่ในช่วงใด ควรมีการศึกษาอย่างละเอียดเพิ่มเติมว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นใดเหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมากที่สุด

การตรวจสอบการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต อาจดัดแปลงเป็นการหาคาร์บอเนตแทน ว่าเชื้อนั้นมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสแล้วเกิดคาร์บอเนตเท่าใดเพื่อจะได้ไม่สิ้นเปลืองแคลเซียมคลอไรด์ หรือใช้การตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมีวิธีอื่นๆ

ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสในครั้งต่อไปนั้นอาจจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรคคือยูเรียให้มีหลากหลายมากขึ้น เพื่อจะเหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมากที่สุดและในการเจือจางเอนไซม์ดิบเพื่อหากิจกรรมเอนไซม์นั้นควรจะทำการเจือจางหลายๆ ความเข้มข้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม เนื่องจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์นั้นอาจจะมีตัวยับยั้งรวมอยู่ในเอนไซม์ดิบด้วย ถ้าไม่ทำการเจือจางกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสที่ได้อาจจะมีความน้อยได้

ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์และการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตควรใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหลากหลายเพื่อความเหมาะสมต่อการผลิตกิจกรรมนั้นๆ

การตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์ม ควรทำการทดสอบหลายๆ วิธีควบคู่กันไป และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ

การแยกเชื้อจากตัวอย่าง ควรเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีอากาศด้วย เพื่อจะได้เชื้อแบคทีเรียที่เป็น facultative anaerobe เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงาน biogROUT

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. 2555. แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3). แหล่งที่มา: http://caco3calciumcarbonate.blogspot.com/2012/03/blog-post_8893.html, 20 กุมภาพันธ์ 2557.
- คณะกรรมการบริหารโครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. 2542. การผลิตปูนซีเมนต์. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 24. โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, หน้า 189-207 กรุงเทพฯ
- พนิดา โต๊ะสุ. 2555. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp. NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ที่ตรึงบนวัสดุเศษเหลือปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Achal, A., A. Mukherjee, P. C. Basu and M. S. Reddy 2009a. Strain Improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 981-988.
- _____, _____, _____ and _____. 2009b. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:433-438.
- _____, _____, and _____. 2010. Characterization of Two Urease-Producing and Calcifying *Bacillus* spp. Isolated from Cement. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011: 1571-1576.
- _____ and X. Pan. 2011. Characterization of Urease and Carbonic Anhydrase Producing Bacteria and Their Role in Calcite Precipitation. *Current. Microbiol.* 62: 894-902.

- Ahmed, I, A. Yokota, A. Yamazoe and T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57(5): 1117-25.
- Al-Thawadi, S. M. 2008 . **High strength in-situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria.** Ph.D dissertation. Murdoch University, Western Australia.
- _____. 2011. Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanism of Strength Enhancement of Sand. **J. Adv. Sci. and Eng. Research.** 1: 98-114.
- Aloisi, G. 2008. The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history. **Geochimica. Et. Cosmochimica. Acta.** 72(24): 6037–6060.
- Anderson, S., V. D. Appanna, J. Huang, and T. Viswanatha. 1992. A novel role for calcite in calcium homeostasis. **FEBS. Lett.** 308: 94–96.
- APHA., (1980) APHA The Standard Methods for Water and Wastewater Examination. 15th ed, Am Publ Hlth Assoc, Washington, D.C.
- Ariyanti, D., and N. A. Handayani. 2012. Feasibility of using microalgae for biocement producing through biocementation. **J. Bioprocess. Biotechniq.** 2:1.
- Arunachalam, K., K. S. Sathyanarayanan, B. S. Darshan, R. B. Raja. 2010. Studies on the characterization of biosealant properties of *Bacillus sphaericus*. **Int of Engi Sci and Technol.** 2(3): 270-277.

- Bachmeier, K. L., A. E. Williams, J. R. Warmington, S. S. Bang. 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. **J. Biotechnol.** 93: 171–181.
- Barabesi, C., A. Galizzi, G. Mastromei, M. Rossi, E. Tamburini, and B. Perito. 2007. *Bacillus subtilis* Gene Cluster Involved in Calcium Carbonate Biomineralization. **J. Bacteriol.** 189: 228-235.
- Bazylinski, D. A., and B. M. Moskowitz. 1997. Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: microbiology, magnetism and environmental significance. **Rev. Mineral. Geochem.** 35: 181–223.
- Belie, N. D. and W. D. Muynck. 2009. Crack repair in concrete using biodeposition. **Concrete Repair, Rehabilitation. and Retrofitting.** P 777-781
- Boquet, E., A. Boronat, and A. Ramos-Cormenzana. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. **Nature.** 246: 527–529.
- Bryant, R. S. 1987. Potential uses of microorganisms in petroleum recovery technology. **Proceeding of the Oklahoma Academy of science**, 67: 97-104.
- Cacchio, P., C. Ercole, R. Contento, G. Cappuccio, M. P. Martinez, M. D. Gallo and A. Lepid. 2012. Involvement of bacteria in the origin of a newly described speleothem in the gypsum cave of grave grubbo (Crotone, Italy). **J. cave. karst. studies.** 74:7-18.
- Castanier, S., G. Le Métayer-Levrel and J. P. Perthuisot. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. **Sediment. Geol.** 126: 9-23

_____, _____, G. Orial, J. F Loubie're, J. P. Perthuisot. 2000. **Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property.** *In:* Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds.), *Of Microbes and Art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage.* Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, pp. 203–218.

Chahal, N., A. Rajor and R. Siddique. 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. **Afr. J. Biotechnol.** 10(42): 8359-8372.

Chen, L., P. Boeckx, L. Zhou, O. V. Cleemput, and R. Li. 1996. Effect of hydroquinone, dicyandiamide and encapsulated calcium carbide on urea N uptake by spring wheat, soil mineral N content and N₂O emission. **Soil. Use. Manage.** 14(4): 230– 233.

Chou, Chiung-Wen., A. S. Eric, H. A Ahmet and L. Michael. 2011. Biocalcification of Sand through Ureolysis. **J. Geotech. Geoenviron.** p1179-1189.

Christensen, W.B. 1946. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. **J. Bacteriol.** 52(4):461–466.

Chunxiang, Q., W. Jianyun, W. Ruixing, C. Liang. 2009. Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*. **Mater. Sci. Eng. C.** 29: 1273–1280

_____ and R. C. W. Berkeley, 1986. **Genus *Bacillus*.** *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 1st ed, Vol 2. P 1104-1138. The Williams &Wilkins. New york.

- Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. M. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 435–464.
- De Muynck, W., C. K. Belie and W. Verstraete. 2008. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. **Constr. Build. Mater.** 22: 875–885.
- _____, W., D. Debrouwer, N. Belie and W. Verstraete. 2008. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious material. **Cement. concrete res.** in press.
- Dejong, J. T., B. F. Michael, and K. Nüsslein. 2006. Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. **J. Geotech. Geoenviron. Eng.** 132: 1381-1392.
- Dick, J., W. D. Windt, B. D. Graef, H. Saveyn, P. V. Meeren, N. D. Belie and W. Verstraete. 2006. Biodeposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. **Biodegrad.** 17(4): 357–367.
- Ehrlich, H. L. 1998. Geomicrobiology: Its significance for geology. **Earth. Sci.** 45: 45-60.
- Focus Biotech. 2014. **ID-GEN III**. Available Source: <http://www.focusbiotech.com.my>, February 10, 2014.
- Friedrich, B and B. Magasanik. 1977. Urease of *Klebsiella aerogenes*: control of its synthesis by glutamine synthetase. **J. Bacteriol.** 131(2): 446-52.

- Fujita, Y., F. G. Ferris, R. D. Lawson, F. S. Colwell, and R. W. Smith. 2000. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. **Geomicrobiol. J.** 17: 305–318.
- González-Muñoz, M, T., K. Ben-Chekroun, A. Ben-Aboud, J. M. Arias. and M. Rodriguez-Gallego. 2000. Bacterially induced Mg-Calcite formation: Role of Mg^{2+} in development of crystal morphology. **J. Sediment. Res.** 70: 559-564.
- Gordon, R, E. 1989. **The Genus Bacillus**. In Practical handbook of Microbiology. 2nd ed, P109-123. CRC Press, Inc.
- Hammad, I, A., , F. N. Talkhan, A. E. Zoheir. 2013. Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. **J. of. App. Sci. Res.** 9(3): 1525-1533.
- Hammes, F., N. Boon, J. D. Villiers, W. Verstraete and S. D. Siciliano. 2003. Strain-Specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. **Appl. Environ. microbial.** 69(8): 4901-4909.
- _____, A. Seka, S. D. Knijf, W. Verstraete. 2003. A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater. **Water. Res.** 37: 699–704.
- Hesham, E., 2008. Biofilm formation by Endospore-forming Bacilli on Plastic Surface under Some Food-related and Environment Stress Conditions. **Global. J. Biotech. & Biochem.** 3(2): 69-78.
- Holt, J, G., N. R. Kried, P. H. A. Senath, J. T. Staley. and S. T. Williams. 1993. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (pp. 787). Philadelphia. PA: Lippincott, Williams and Wikins.

Jiao, X., W. Liang, L. Chen, H. Zhang, Q. Li, P. Wang, and D. Wen. 2005. Effects of slow-release urea fertilizers on urease activity, microbial biomass, and nematode communities in an aquic brown soil. **Sci. China. C. Life. Sci.** 1: 26-32.

Jimenez-Lopez, C., C. Rodriguez-Navarro, G. Pin˜ar, F. J. Carrillo-Rosu, M. Rodriguez-Gallego, M. T. Gonzalez-Mun˜oz. 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. **Chemosphere.** 68: 1929–1936.

Kaltwasser, H., J. Krämer, and W. Conger. 1972. Control of urease formation in certain aerobic bacteria. **Archiv. für. Mikrobiologie.** 81(2): 178-196.

Kroll, R. G. 1990. Microbiology of extreme environments, McGraw- Hill, New York.

Kocur, M., Schleifer. K. H., and Kloos. W. E. 1975. Taxonomic Status of *Micrococcus nishinomiyaensis* Oda 1935. **Int. J. of Syst. Bacteriol.** 25(3): 290-293.

Kumar, J., R. Prabhakara, H. Pushpa. 2013. Bio Mineralisation of calcium carbonate by different bacterial strains and their application in concrete crack remediation. **Adv. In. Eng. & Technol.** 6: 202-213.

Laboratory of Bioinorganic Chemistry. n. d. **Nickel trafficking and urease active site synthesis.** Available Source: <http://bioinorg.agrsci.unibo.it>, January 3, 2014.

Lee, N. Y. 2003. Calcite producing by *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01. **J. microbiol.** P 345-348.

- Me'tayer-Levrel, G. L., S. Castanier, G. Orial, J. F. Loubie`re, J. P. Perthuisot. 1999. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. **Sediment. Geol.** 126: 25–34.
- Mobley, H, L, T., M. D. Island., and R. P. Hausinger. 1995. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol.** 59: 451-480.
- Niall, A, L., and P. D. Vos. 2009. **Genus Bacillus**. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2st ed, Vol 3. P 79-92. William B. Whitman. USA.
- Nemati, M., G. Voordouw. 2003. Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. **Enzyme. Microbiol. Tech.** 33: 635–642.
- _____, E. A. Greene and G. Voordouw. 2005. Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: Comparison with enzymic option. **Process. Biochem.** 40(2): 925-933.
- Ohara, M., Y. Karayama., M. Tsuzaki., S. Nakamoto and H. Kuraishi. 1990. *Paracoccus kocurii* sp. nov. a Tetramethylammonium-Assimilating Bacterium. **Int. J. of Syst. Bacteriol.** 40(3): 292-296.
- Paassen, L, 2009. **Kinetics of microbially induced carbonate precipitation by urea hydrolysis**. In Biogrout; Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation. 1st . P 14. Delft University. France.
- Park, S., Y. Park, W. Chun, W. Kim. and S. Ghim. 2010. Calcite-forming bacteria for compressive strength improvement in mortar. **J. Microbiol. Biotechniol.** 20(4): 782-788.

- Planavsky, N., R. P. Reid, T. W. Lyons, K. L. Myhrall, and P. T. Visscher. 2009. Formation and diagenesis of modern marine calcified cyanobacteria. **Geobiology**. 7(5): 566-76.
- Priest, G. F. and D. J. Susan. 2000. **Bacteria and insects**. In *Applied Microbial Systematics*. 1st. P165-195. Kluwer Academic Publisher. Norwell.
- Puspita, L., S. Eko, R. Shanti, N. S. Miranti, and F. G. Gusmawati. 2011. Bacterial carbonate precipitation for biogrouting. **Proceeding national symposium on Ecohydrol**. P.204-219.
- Qian, C., R. Wang, L. Cheng and J. Wang. 2010. Theory of Microbiology Carbonate Precipitation and Its Application in Restoration of Cement-base Materials Defects. **Chin. J. Chem.** 28: 847-857.
- Riding, R. 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. **Sedimentol.** 47 (1): 179-214.
- Rivadeneira, M. A., R. Delgado, A. del Moral, M. R. Ferrer, and A. Ramos-Cormenzana. 1993. Precipitation of carbonates by *Bacillus* sp. isolated from saline soils. **Geomicrobiol. J.** 11(3-4).
- _____, R. Delgado, A. del Moral, M. R. Ferrer, and A. Ramos-Cormenzana. 1994. Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern. **FEMS. Microbiol. Ecol.** 13: 197-204.
- _____, A. Ramos-Cormenzana, G. Delgado, and R. Delgado. 1996. Process of carbonate precipitation by *Deleya halophila*. **Curr. Microbiol.** 32(6): 308-313.

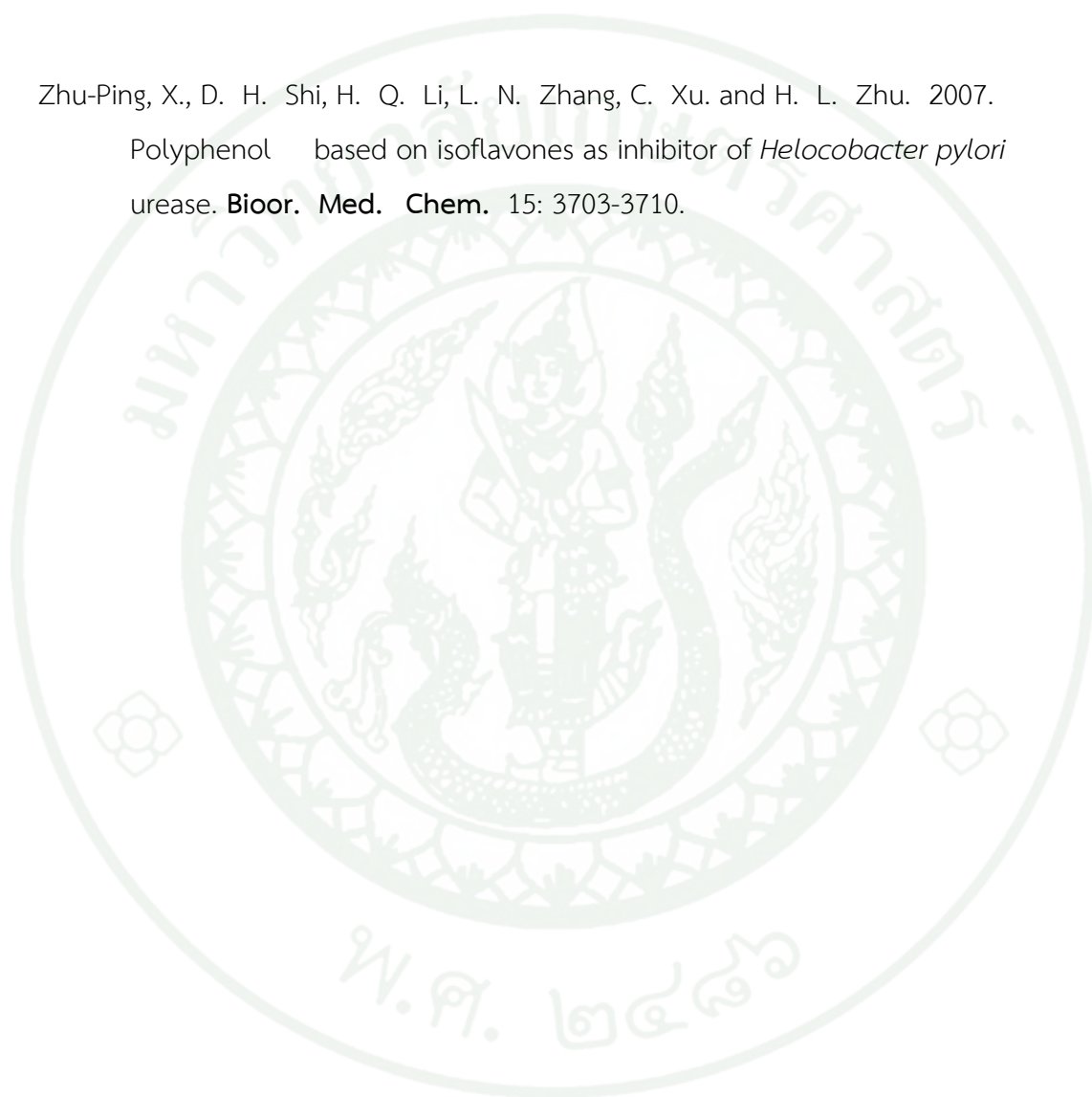
- Rodriguez-Navarro, C., M. Rodriguez-Gallego, K. Ben Chekroun, and M. T. Gonzalez-Munoz. 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 2182–2193.
- Rosche, B., Z. X. Li, B. Hauer, A. Schmid. and K. Buehler. 2009. Microbial biofilm: a concept for industrial catalysis. **Trends. in. Biotech.** 27: 636-643.
- Rustigian, R., C. A. Stuart. 1941. Decomposition of urea by *Proteus*. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** 47: 108-112.
- Sahrawat, K. L., 1984. Effects of temperature and moisture on urease activity in semi-arid tropical soils. **Plant. Soil.** 78: 401-408
- Sanchez-Moral, S., J. C. Canaveras, L. Laiz, C. Saiz-Jimenez, J. Bedoya, and L. Luque. 2003. Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments: A short review. **Geomicrobiol. J.** 20(5): 491-500.
- Sarayu, K., R. I. Nagesh and A. M. Ramachandra. 2014. Exploration on the Biotechnological Aspect of the Ureolytic Bacteria for the Production of the Cementitious Materials—a Review. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 172: 2308–2323.
- Shirakawa, A. M., M. A. Cincotto, D. A. Atencio, C. C. Gaylarde and V. M. John. 2011. Effect of culture medium on biocalcification by *Pseudomonas putida*, *Lysinibacillus sphaericus*. and *Bacillus subtilis* . **Braz. J. microbiol.** 42: 499-507.
- Stocks-Fischer. S., J. K. Galinat, S. S. Bang, 1999. Microbiological precipitation of CaCO_3 . **Soil. Biol. Biochem.** 31: 1563-1571.

- Stuart, C, A., Van. Stratum, E. Rustigian R. 1945. Further Studies on Urease Production by *Proteus* and Related Organisms. **J. Bacteriol.** 49(5): 437–444.
- Sumner, J, B., 1926. The isolation and crystalization of the enzyme urease. **J. Biol. Chem.** 69: 435-411.
- Tiano, P., L. Biagiotti and G. Mastromei. 1999. Bacterial biomediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. **J. Microbiol. Meth.** 36: 139–145.
- Tourney, J. and B. T. Ngwenya, 2009. Bacterial exopolymeric substances (EPS) mediate CaCO_3 morphology and polymorphism. **Chem. Geol.** 262(3-4): 138-146.
- Van Langerak, E, P.A., H. V. M. Hamelers and G. Lettinga. 1997. Influent calcium removal by crystallization reusing anaerobic effluent alkalinity. **Water. Sci. Technol.** 36(6-7):3 41–8.
- Van Paassen, L, A., M. P. Harkes, G. A. van Zwieten, W. H. van der Zon, W. R. L. vander Star, and M. C. M. van Loosdrecht. 2009. **Proceedings from ICSMGE: 17th International Conference on Soil Mechanics & Geotechnical Engineering. Alexandria, Egypt.**
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal. Chem.** 39: 971-974.
- Wei, S., Min. L. and H. Siew. 2012. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. **World. Academy. Sci. Engi. Tech.** 62: 723-729.

Whiffin, V.S. 2004. Microbial CaCO_3 precipitation for the production of biocement. Ph.D dissertation. Murdoch University, Western Australia.

Wilson, R., V. and Lam, L. T. 2008. CLO test in helicobacter gastritis. **ANZ. J. Surg.** 78: 722.

Zhu-Ping, X., D. H. Shi, H. Q. Li, L. N. Zhang, C. Xu. and H. L. Zhu. 2007. Polyphenol based on isoflavones as inhibitor of *Helocobacter pylori* urease. **Bioor. Med. Chem.** 15: 3703-3710.







ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเอนไซม์ยูรีเอสและแคลเซียมคาร์บอเนต

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient Agar (NA)

Beef extrac	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มผสมส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย บรรจุลงภาชนะและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มผสมส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย บรรจุลงภาชนะและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

2.1 Christensen urea agar (Christensen, 1946)

Bacto peptone	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม

Monopotassium phosphate	2.0	กรัม
D-glucose	1.0	กรัม
Urea	20	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol red	0.1	กรัม

ปรับพีเอชให้มีค่าประมาณ 6.8 - 7.0 แล้วจึงต้มผสม basal medium (ส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้นยูเรีย) นำไปบรรจุในภาชนะและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้น เมื่ออาหารเย็นลงเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อลงไป 0.5 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์

2.2 Urea broth (Stuart *et al.*, 1945)

Yeast Extract	0.1	กรัม
Monopotassium Phosphate	9.1	กรัม
Dipotassium Phosphate	9.5	กรัม
Urea	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol Red	0.01	กรัม

นำ basal medium (ส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้นยูเรีย) ไปต้มให้ละลาย บรรจุลงภาชนะ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที จากนั้น เมื่ออาหารเย็นลงเติม 20 เปอร์เซ็นต์ urea solution ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อลงไป 0.5 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์

3. อาหารทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส

Yeast extract	0.1	กรัม
Urea	20	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ต้มผสมส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย บรรจุลงภาชนะและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้น เมื่ออาหารเย็นลงเติม 20 เปอร์เซ็นต์ urea solution ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อลงไป 0.5 มิลลิลิตรโดยปรับให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์

4. อาหารทดสอบการสร้างตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Achal, 2009)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
CaCl ₂	3.67	กรัม
Urea	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มผสมส่วนผสมทั้งหมดจนละลาย บรรจุลงภาชนะและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้น เมื่ออาหารเย็นลงเติม 20 เปอร์เซ็นต์ urea solution ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อลงไป 0.5 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์
กราฟมาตรฐานและการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอส

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. การเตรียม potassium phosphate buffer พีเอช 8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์

1.1 เตรียมสารละลายความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง

KH_2PO_4 136.09 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

K_2HPO_4 174.18 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

1.2 ผสมสารละลาย KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 94 มิลลิลิตร และ K_2HPO_4 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 6 มิลลิลิตร และวัดพีเอชและปรับค่าพีเอชให้ได้เป็น 8

2. การเตรียมสารละลาย A และ B สำหรับการหาปริมาณแอมโมเนีย (Wetherburn, 1967)

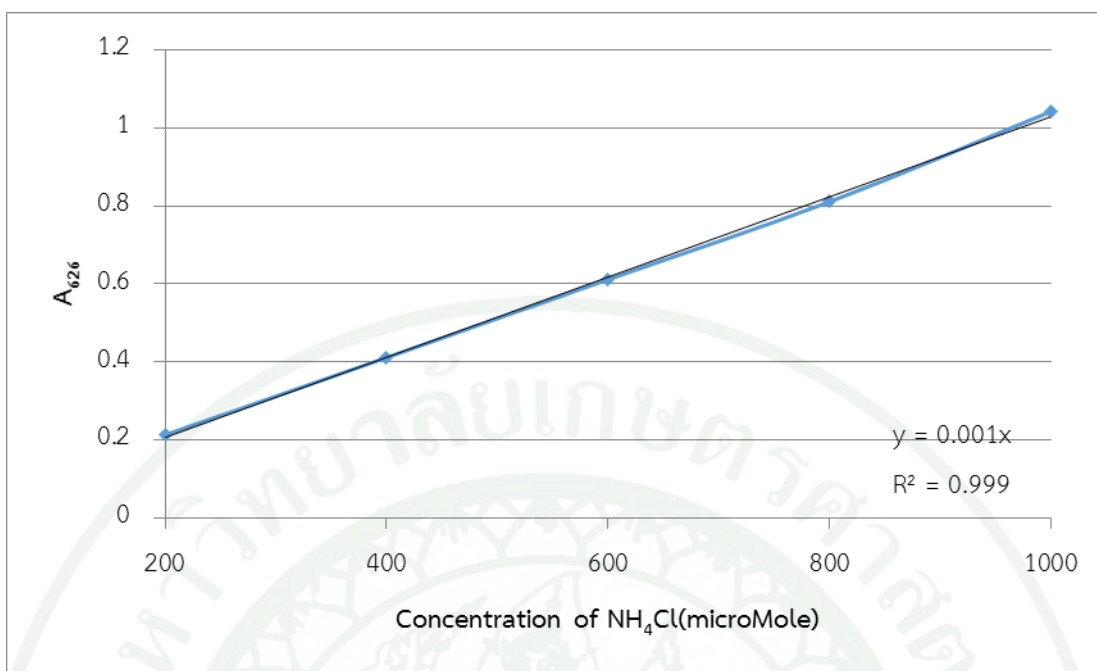
สารละลาย A

Phenol	5	กรัม
Sodium nitroprusside	0.025	กรัม
น้ำ	500	มิลลิลิตร

สารละลาย B

NaOH	2.5	กรัม
Sodium hypochlorite (5% available chlorine)	4.2	มิลลิลิตร
น้ำ	500	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายในขวดสีชาและไม่ควรทิ้งไว้นานเกิน 1 เดือน



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{โดย } y = ax + b$$

หากมีการเจือจางต้องคูณ dilution ไปด้วย

$$X = (y * \text{dilution}) / a$$

เมื่อ ; y = ค่า OD ที่วัดได้ของตัวอย่าง

b = จุดตัดแกน y ที่ศูนย์

x = ความเข้มข้นที่เราจะหา

a = slope จากกราฟมาตรฐาน

ยกตัวอย่างเช่น

วัดค่า OD ได้ 0.1905 เจือจางไป 20 เท่า

ดังนั้น $x = (0.1905 * 20) / 0.001 = 3810$

กิจกรรมเอนไซม์ = (ความเข้มข้น * ปริมาตรรวมของสารในปฏิกิริยา)

(ปริมาตรรวมกับสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา * ระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา * ปริมาตรเอนไซม์ในตัวอย่าง)

เมื่อ ; ปริมาตรรวมของสารในปฏิกิริยาเท่ากับ 5.75 มิลลิลิตร

ปริมาตรสารที่ทำปฏิกิริยากับ reagent เท่ากับ 3.75 มิลลิลิตร

ระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที

ปริมาตรเอนไซม์ในตัวอย่างเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{กิจกรรมเอนไซม์} &= \frac{3810 \times 5.75}{3.75 \times 30 \times 0.25} \\ &= 778.93 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

โดย 1 unit เอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยยูเรีย 1 $\mu\text{mole/min}$ ที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต
และวิธีการคำนวณปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยวิธี Titration method (APHA, 1989)

1. สารละลาย EDTA 0.01 โมลาร์ (เก็บในขวด PE หรือแก้ว Borosilicate)

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 4 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นเพื่อละลาย EDTA ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน EDTA ที่มีความเข้มข้น เกิน 0.01 M เล็กน้อย จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นที่แท้จริงโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน CaCO_3 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นเพิ่มให้ได้ความเข้มข้น 0.01 M พอดี

หากชั่ง Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 3.723 กรัมจะได้สารละลายมาตรฐาน EDTA เข้มข้น 0.01 M แต่ก็ควรเทียบ (Standardize) กับสารละลายมาตรฐาน CaCO_3 เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริง

2. วิธีการเทียบหาความเข้มข้น EDTA กับ สารละลายมาตรฐาน

2.1 ละลายผง CaCO_3 ด้วยกรด HCl

ชั่ง anhydrous CaCO_3 หนัก 1.00 กรัม ใส่ใน Beaker ค่อยๆ เติมกรด HCl 50 เปอร์เซ็นต์ ช้าๆ เพื่อละลาย CaCO_3 เมื่อละลายหมดเติมน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มประมาณ 5 นาที เพื่อไล่ก๊าซ CO_2 ตั้งทิ้งให้เย็น

หมายเหตุ การละลาย CaCO_3 ด้วยกรด HCl 50 เปอร์เซ็นต์ ควรใส่ถุงมือและแว่นตา และในการใช้ละลาย CaCO_3 ควรใช้กรวยใส่ในพลาสติกเพื่อความปลอดภัย

2.2 ปรับพีเอชสารละลาย CaCO_3

นำสารละลาย CaCO_3 ที่เย็นแล้วมาปรับพีเอชให้มีค่าประมาณ 7 โดยใช้ NaOH 1 นอร์มอล

2.3 ปรับปริมาตรสารละลาย CaCO_3 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

เทสารละลาย CaCO_3 ที่ปรับพีเอชแล้วลงใน volumetric flask จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

2.4 ดูดสารละลาย CaCO_3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพื่อนำไปไทเทรต

ดูดสารละลาย CaCO_3 (ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน ฟลาสก์ แล้วเติม NaOH 1 นอร์มอล 1-2 มิลลิลิตร แล้วเติมผงอินดิเคเตอร์ 0.1-0.2 กรัม เขย่าให้เข้า กัน

2.5 ไทเทรตสารละลาย CaCO_3 กับ EDTA

ไทเทรตสารละลาย CaCO_3 กับ EDTA จนถึงจุดยุติ แล้วคำนวณความเข้มข้นของ สารละลาย EDTA โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

ตัวอย่าง หากใช้ EDTA ปริมาตร 47 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของ EDTA จะเท่ากับ 0.0106 M คือ $0.01 \text{ M} \times 50 \text{ M} = C_2 \times 47 \text{ มิลลิลิตร}$ จึงเท่ากับ 0.0106 M

2.6 ปรับความเข้มข้นของ EDTA ให้ได้เป็น 0.01 โมลาร์พอดี

ปรับความเข้มของ EDTA จาก 0.0106 โมลาร์ ให้เป็น 0.01 โมลาร์ โดยการเติมน้ำกลั่น ลงไป โดยใช้สูตรการคำนวณ $C_1V_1 = C_2V_2$

การคำนวณปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

ปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต = ปริมาตร EDTA ที่ใช้ * 20 * dilution g/l

1000

ตัวอย่างเช่น

ปริมาตร EDTA ที่ใช้ในการไทเทรต = 3.5 มิลลิลิตร และเจือจาง 50 เท่า

ปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต = $3.5 * 20 * 50$

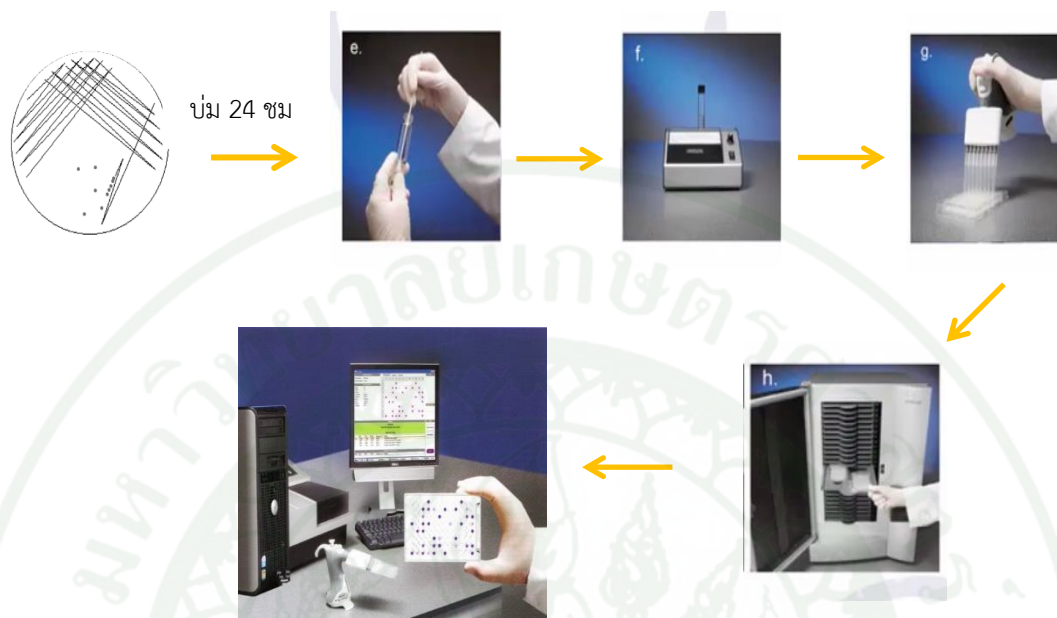
$$\frac{\quad}{1000}$$

$$= 3.5 \text{ g/l}$$





วิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog



ภาพผนวกที่ ง1 วิธีการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog และวิเคราะห์ผลโดยฐานข้อมูล Biolog

ที่มา: focus biotech

การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog (GenIII) นั้นจะเป็นการวิเคราะห์ลักษณะทาง phenotype ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งประกอบไปด้วยการทดสอบแหล่งคาร์บอน 71 แหล่ง เช่น น้ำตาล D-mannose D-mannitol (คอลัมน์ A1-A9) และการวิเคราะห์ความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารเคมี และสารปฏิชีวนะ (คอลัมน์ A10-12) ดังการทดสอบที่แสดงในภาพผนวกที่ ง2 และเปรียบเทียบผลการทดสอบต่างๆ ในฐานข้อมูลเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

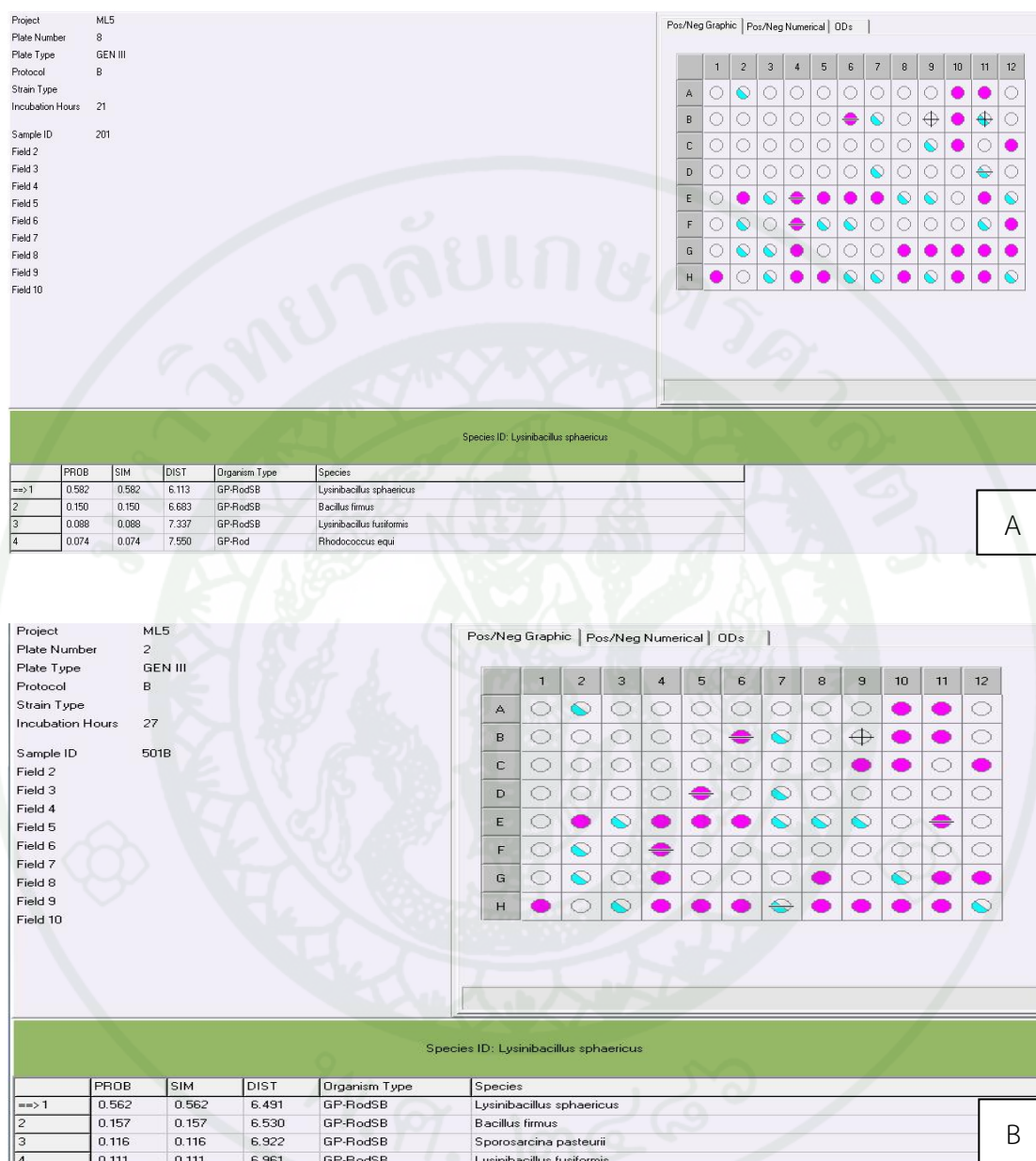
GEN III MicroPlate™

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 8	A12 pH 6
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lauryl Sulfate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabinol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose-6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifampicin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyrogutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Nipropof 4
F1 Peptin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Gluconic Acid	F6 Gluconamide	F7 Mucic Acid	F8 Gulonic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino-Butyric Acid	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	H4 β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

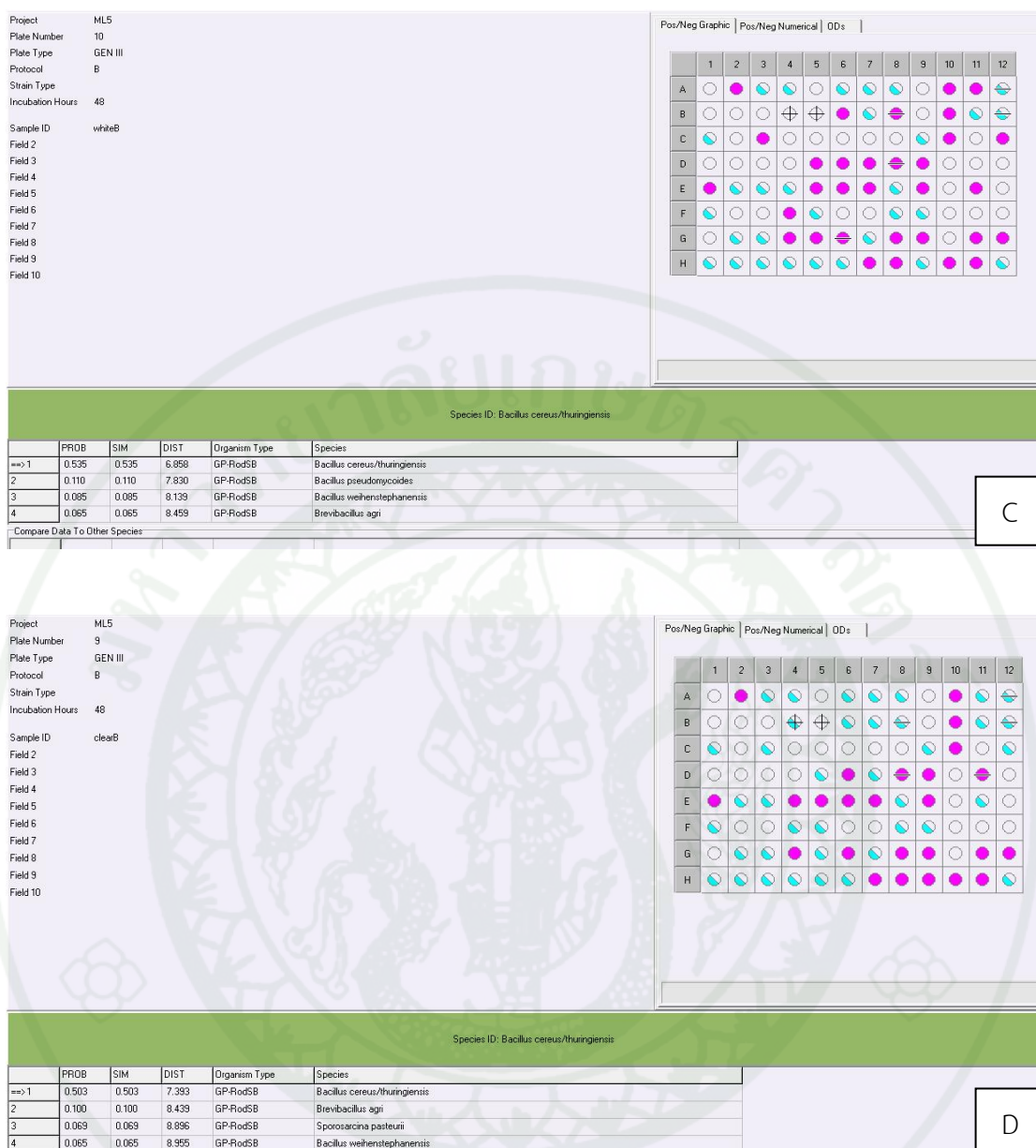
ภาพผนวกที่ ๖2 การทดสอบต่างๆ ใน microtiterplate ด้วยวิธี biolog

ที่มา: focus biotech

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี Biolog



ภาพผนวกที่ 3 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท 201 (A), และ ไอโซเลท 501 (B)



ภาพผนวกที่ ง4 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท C31 (C) และ ไอโซเลท C32 (D)



ภาพผนวกที่ 5 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียและการแปลผลด้วยวิธี Biolog ไอโซเลท E34 (E)



ผล sequencing ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย

>201

TGGGAAGGCGGGGGCTATAATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCC
TATAGTTTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGCATCTCGCTGTCGCTTTAGGAGG
GGCCCCGCGCGCATTACCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCGACAATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGG
CCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAAGGGGCGAAAGCCTGATGGAGCACCGCCGCGGGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAC
TCTGTTGTAAGGGAAGACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGACCTTGACGGTGACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCACGACCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATGGGCGCTAAAGCGCGCAGGCGGTCTTAAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTACCCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGGGACTTGAGTGCAAAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGACCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTTCTTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTC
CGCCCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACCGGGGGCCGCGACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAAGATATAGTTTCCCTTCGGGGCAACGGTGACA
GGGGTGATGGTTGCTCAGTCGTGTCGGGATGTTGGTTAGTCCCGCACCAGCGCACCTTGATCTAGTTGCATCATTAAATGGGCTCTAAGGGACTG
CCGTGACAACCGAAGGAAGGGGATGACTCAATCACATGCCCTTATGACTGGGTACCTGCTACATGGCGATCAACGGTTCACCTCCCGAAGGGACTATC
CGAAAATCTCCAGTCGGATGGAGCTGCACTGCCTACTAAACCGGATCCTTTATCCGGGACAN

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Lysinibacillus fusiformis strain IRI-THW-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	97%	KF054963.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain 44A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	97%	KC329831.1
☐ Lysinibacillus sphaericus strain RNB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KJ576904.1
☐ Bacterium 2311-S4-10-2 1.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KF373378.1
☐ Lysinibacillus sphaericus strain SK13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KF032717.1
☐ Proteus mirabilis strain BCr 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KF471508.1
☐ Lysinibacillus sp. Y20 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KC708570.1
☐ Firmicutes bacterium K17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KC887936.1
☐ Bacillus sp. SS1.32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KC160865.1
☐ Lysinibacillus sp. SS1.22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	KC160856.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain R3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	JQ991002.1
☐ Bacillus sp. B-34L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	JQ917119.1
☐ Lysinibacillus sphaericus strain BL7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	JQ923445.1
☐ Bacterium NLAE-zl-P8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	JQ606849.1
☐ Bacterium T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	641	641	100%	1e-180	97%	HQ877618.1

ภาพผนวกที่ ๑1 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastn ไอโซเลท 201

>501

TGGGGAGTGC GGTCCTATAATGCAGTCGAGCGACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTT
 ATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAACACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGG
 CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGTTCGTAACCT
 CTGTTGTAAGGGAAGAACAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA
 AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA TTTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTATCTGG
 TCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTC
 CGCCCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGAAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATGGTTTCCCTTCGGGGGCAACGGTGACA
 GGTGGTGATGTTGTCTCAGCTCCGGGTCGTGAGATGTTTGGTTAAGTCCCGCACCAGCGCAACCCCTTGATCTTAATTTGCCATCATTTTAGTTGGG
 GCACTCTAAGTGGACTGCCCGTGAACAAACCGGAAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATTCATTCGCCCTTAAGGACCTGGGGCTACCCACCGTGCTT
 ACAATGGGACAATAACAAACGGGTGCCAACTCCCCGAAGAGGAAGCTAAATCCCAATAAAGTCCGTTCTCAAGTCCGGAATTGTAGGGCTTGAATTT
 CCCCTTAACTTGAAACCCGGGAAACGCTTTTTTATCCCG

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Lysinibacillus fusiformis strain BT 179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ848540.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain BT 173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ848535.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain BT 159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ848523.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain BF13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ524511.1
☐ Lysinibacillus sp. TA_AJ partial 16S rRNA gene, strain TA_AJ	1173	1173	100%	0.0	100%	HG942115.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain Lr11/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ722467.1
☐ Lysinibacillus sp. ZK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ191429.1
☐ Lysinibacillus sp. SCU-B143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KJ000808.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain SXRT-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF973299.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain CGS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF886273.1
☐ Bacillus sp. hb95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF863884.1
☐ Bacillus sp. Sped833 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KC462936.1
☐ Lysinibacillus fusiformis strain KN19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF439825.1
☐ Bacillus sp. FJAT-4678 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF995695.1
☐ Bacillus sp. FJAT-4639 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	100%	KF995665.1

ภาพผนวกที่ ๖2 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastn ไอโซเลข 501

>C31

AAAGGCATTGGCGCGTGCCTATAATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC
 CCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGCGCTTCGGCTGTCACTTATGGAT
 GGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAA
 CTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGCGTCAACCGTGAGGGTCAT
 TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTTGAGAGGG
 TTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
 GTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACAGGCTTGACATCCTTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTG
 ACAGGTGGTGATGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCAC
 TCTAAGGTGACTGCCGCTGACAAACCGGAAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTTACACACGTGTACAAGGACGGTA
 CAAAAAGCTTCAAGACCGCGAGGTGGACCTAATCCATAAAACGG

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Bacterium mmp4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ547780.1
☐ Bacillus cereus strain MML2533 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ655552.1
☐ Bacillus cereus partial 16S rRNA gene, strain ISU-02	1227	1227	100%	0.0	100%	LK392517.1
☐ Bacillus anthracis strain ALS-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ638990.1
☐ Bacillus sp. HT-269-B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ526901.1
☐ Bacillus anthracis strain HA523 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ535332.1
☐ Bacillus sp. BDRC2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ643910.1
☐ Bacillus anthracis strain YT1305-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ619958.1
☐ Bacillus cereus strain HM85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ634473.1
☐ Bacillus cereus strain JD89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ54501.1
☐ Bacillus cereus strain L-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ534397.1
☐ Bacillus sp. D1(2014b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ545610.1
☐ Bacillus cereus strain EGY-SC^R1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ545607.1
☐ Bacillus anthracis strain EGY-WOL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	100%	KJ545580.1
☐ Uncultured Bacillus sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Pisol7	1227	1227	100%	0.0	100%	AB872331.1

ภาพผนวกที่ ๑3 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastn ไอโซเลต C31

>C32

AATGGGCATGCGGGCGCTATAATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCC
 ATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATG
 GACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGAAC
 TCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
 CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATT
 GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTC
 TGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGT
 TTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCG
 GGGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCTCTTCGGGAGCAGA
 ATTGACAGGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTTCTGGTCTGAGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACCGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCATT
 CATTGAGTTGGGGCACTCTAAAGTTGACTGCCCCGTTGACCAACCCGAGGGAAGGGTGGGGGATTACCGTCCAAATCATTATGCCCCCTTATGGAC
 CTGGGGCTTACCCACCGTGGCTAACAATGGGACGGGTACCAAGAGCTTGCAAGAACCCGCCGAGGTGAAGCTTAATCTCTATAAAACCCGCTTTCAGTT
 CCCGGAATTGTGAGGCGTGCGAAACTCCGCCCTACATAGGAAGCTGGGAAATCCCGTTTAGGTAATCCGGGGGGATA

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Bacillus sp. CF-S21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ781392.1
☐	Bacterium mmp4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ547780.1
☐	Bacterium mb13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ547777.1
☐	Bacterium SM95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KF999580.1
☐	Bacillus cereus strain MVK04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ399985.1
☐	Bacillus cereus strain C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ156984.1
☐	Bacillus cereus strain LH-Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ398239.1
☐	Bacillus anthracis strain WTA-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ210673.1
☐	Bacillus anthracis strain WL-210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ210667.1
☐	Bacillus anthracis strain WL-190 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ210666.1
☐	Bacillus bombysepticus str. Wang, complete genome	1007	13037	100%	0.0	100%	CP007512.1
☐	Bacillus cereus strain HC23a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ206081.1
☐	Bacillus cereus strain HC19a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ206080.1
☐	Bacillus cereus strain HC8a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ206076.1
☐	Bacillus cereus strain HC3b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	0.0	100%	KJ206075.1

ภาพผนวกที่ ๔๑ ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยโปรแกรม blastn ไอโซเลท C32

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่มีแถบสีเหลืองคือ ลำดับเบสที่ใช้ในการ alignment ด้วยโปรแกรม blastn

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวปัญจพร อนุรัตน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	14 สิงหาคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-