บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นแร่ธาตุชนิดหนึ่งที่มีการแพร่กระจายทั่วไปบนพื้นโลกพบประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเปลือกโลก พบได้มากในหินตะกอน (sedimentary rock) เช่น หินปูน หินอ่อน และหินทราย ทั้งในสภาพแวดล้อมทางทะเล แหล่งน้ำจืด และบนพื้นดิน (Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7; Klien and Hurlbut, 1999, unpaged) โดยพบว่าแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการเกิดตะกอนและการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตในแทบทุกสภาพแวดล้อมบนโลก นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคารีโอตที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างตะกอนคาร์บอเนต คือไมโตคอนเดรียหรือคลอโรพลาสต์ ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้ถือว่าเป็น primitive endosymbiotic bacteria (Castanier, et al., 2000a, unpaged) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตมี 4 อย่างคือ 1) ปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียม 2) ปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอเนต 3) สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ 4) จุดศูนย์กลางที่ทำให้เกิดการตกตะกอน (nucleation sites) (Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7) โดยทฤษฎีแล้วการตกตะกอนคาร์บอเนตตามธรรมชาติจะเกิดขึ้น เมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมและ/หรือคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นในสารละลาย หรือโดยการลดความสามารถในการละลายของแคลเซียมและ/หรือคาร์บอเนตลง การตกตะกอนแคลไซต์อาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น การระเหยหรือการเปลี่ยนแปลงของระดับอุณหภูมิและความดัน หรือโดยปัจจัยทางชีวภาพผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียนั้นถือว่าเป็นศูนย์กลางของการเกิดแร่ธาตุระหว่างที่มีกระบวนการเกิดขึ้นของหิน (Ferris, et al., 1987, pp. 225-232) และจากการศึกษาวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ยืนยันและพบว่ามีการตกตะกอนเกิดขึ้นบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Hammes, et al., 2003c, pp. 699-704; Warren, et al., 2001, pp. 93-115; Kile, et al., 2000, pp. 2937–2950) เนื่องจากไม่มีปัญหาในเรื่องการขาดแคลน nucleation sites ของเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามปัจจัยแรกจะมีบทบาทสำคัญมากในการเกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์

การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ (Microbial carbonate precipitation, MCP)

ในช่วงยี่สิบกว่าปีที่ผ่านมา การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากศักยภาพหรือบทบาทของจุลินทรีย์ในทะล ซึ่งอาจเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนสำหรับการผลิตปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นบนโลก โดยมีสิ่งมีชีวิตสามกลุ่มใหญ่ที่สำคัญในการชักนำให้เกิด MCP ผ่านทางกระบวนเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้แก่ 1) สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ เช่น cyanobacteria และ algae ซึ่งสามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (สมการที่1-3) 2) แบคทีเรียกลุ่ม sulphate reducing bacteria (SRB) โดยผ่านกระบวนการ dissimilatory reduction of sulphate และ 3) สิ่งมีชีวิตอีกหลายๆ ชนิดที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23; Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7)

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow (CH_2O) + O_2 \quad (1)$$

$$2HCO_3^- \longleftrightarrow CO_2 + CO_3^{2-} + H_2O \quad (2)$$

$$CO_3^{2-} + H_2O \longleftrightarrow HCO_3^- + OH^- \quad (3)$$

$$Ca^{2+} + HCO_3^- + OH^- \longrightarrow CaCO_3 + 2H_2O \quad (4)$$

นอกจากนี้แคลไซต์ยังสามารถตกตะกอนได้โดยสิ่งมีชีวิตพวก heterotrophs ที่มีการผลิตคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต และเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการตกตะกอน (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23) การละลายของยิบซัม ($CaSO_4.2H_2O$) โดยวิธีทางกายภาพ (สมการที่ 5) ทำให้สภาพแวดล้อมมีปริมาณซัลเฟตและแคลเซียมไอออนมากขึ้น ซึ่งในสภาพที่มีอินทรียวัตถุอยู่ แต่ปราศจากก๊าซออกซิเจน จุลินทรีย์กลุ่ม sulphate reducing bacteria จะสามารถรีดิวส์ซัลเฟตให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และปลดปล่อยไบคาร์บอเนตออกมา (สมการที่ 6) (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23; Ehrlich, 1998, pp. 45-60; Wright, 1999, pp. 147-157) และเมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ระเหยไปจากสภาพแวดล้อม ก็จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเหมาะแก่การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต (สมการที่ 4) (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23)

$$CaSO_4.2H_2O \longrightarrow Ca^{2+} + SO_4^{2-} + 2H_2O \quad (5)$$

$$2(CH_2O) + SO_4^{2-} \longrightarrow HS^- + HCO_3 + CO_2 + H_2O \quad (6)$$

การเกิด MCP ยังสามารถถูกชักนำโดยสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจน โดยผ่านกระบวนการ ammonification ของกรดอะมิโน กระบวนการ nitrate reduction และกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย (urea hydrolysis) ซึ่งกลไกของกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส (urease) เป็นกลไกที่ง่ายที่สุดสำหรับการอธิบายการเกิด MCP เนื่องจากทำให้เกิดการสร้างคาร์บอเนตไอออนและมีแอมโมเนียมอยู่ (สมการที่ 7) ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด –ด่างเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นเมื่อมีแคลเซียมปรากฏอยู่ แคลไซต์จึงสามารถตกตะกอนได้ทันทีภายใต้สภาวะแวดล้อมนี้ แบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้จึงมักถูกนำไปประยุกต์ใช้ให้สร้างแคลไซต์ (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Muynck, et al., 2008, pp. 875-885; Taino, et al., 1999, pp. 139-145)

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \longrightarrow CO_3^{2-} + 2NH_4^+ \quad (7)$$

การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย
(Microbial carbonate precipitation by way of urea hydrolysis)

การเกิดไฮโดรไลซิสของยูเรียเป็นปฏิกิริยาที่ควบคุมการเกิดคาร์บอเนตที่ง่ายที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมสูงในช่วงเวลาอันสั้น ที่ผ่านมามีความพยายามในการนำการเกิด MCP ไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันงานส่วนใหญ่ให้ความสนใจไปที่การนำ MCP ไปใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาความแข็งแกร่ง (strength development)

การเกิด MCP ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาการจับสารรังสี radionucleotide ของธาตุ strontium^{90} ($^{90}Sr^{2+}$) ซึ่งพบว่าการตกตะกอนของ $^{90}SrCO_3$ สามารถป้องกันการแพร่กระจายการปนเปื้อนของ radionucleotide ในชั้นใต้ผิวดินที่มีน้ำใต้ดินไหลผ่านได้ (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Warren, et al., 2001, pp. 93-115) นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่แล้ว (indigenous microbial population) และส่งเสริมให้เกิด MCP โดยการเติมยูเรียที่มีความเข้มข้นสูงและแคลเซียมที่มีความเข้มข้นต่ำลงไป เพื่อการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1 ซึ่งจากการศึกษาตัวอย่างของน้ำใต้ดินทั้งหมดนั้น ตรวจพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity) เกิดขึ้น

ซึ่งชี้ให้เห็นว่า urease activity เป็นปฏิกิริยาที่ง่ายและสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Mobley and Haudinger, 1989, pp. 85-108) จากความสำเร็จในการศึกษาการจับสารรังสี radionucleotide ของธาตุ strontium^{90} โดยการแทนที่แคลเซียมด้วย strontium ในผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น ได้ค้นพบว่าอัตราการตกตะกอนแคลไซต์มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรีย ซึ่งในเบื้องต้นนี้หมายความได้ว่าจุลินทรีย์ส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนแคลไซต์ได้ เนื่องจากทำให้การเกิดสภาวะความเป็นด่าง (alkalinisation) ขึ้นในสภาพแวดล้อมของการตกตะกอน (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318)

การเกิด MCP ได้เคยถูกนำไปใช้ในการกำจัดแคลเซียมไอออนออกจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งการเกิด MCP ผ่านกระบวนการ urea hydrolysis นั้นดีกว่าการกำจัดแคลเซียมไอออน ด้วยสารเคมีโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เนื่องจากยูเรียมีราคาถูกและการตกตะกอนแคลไซต์อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้น้ำที่มีแคลเซียมไอออนปนอยู่จะก่อให้เกิดปัญหามากมายให้กับโรงงานอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากจะทำให้เกิดการตกตะกอนของ $CaPO_4$ $CaCO_3$ และ $CaSO_4.2H_2O$ ในอุปกรณ์หรือเครื่องมือในโรงงาน (Hammes, et al., 2003a, pp. 191-201; Hammes, et al., 2003c, pp. 699-704) และจากการวิจัยพบว่า สามารถกำจัดปริมาณแคลเซียมไอออนได้สูงถึง 0.5 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมที่มีอยู่ในน้ำเสียที่ใช้ทดสอบ โดยการเติมยูเรียที่มีความเข้มข้นต่ำ (ตาราง 1) ในแบคทีเรียบางชนิด กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสามารถเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่าเมื่อมีปริมาณแคลเซียมเข้มข้น 30 mM ปรากฏอยู่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแคลเซียมสามารถส่งเสริม urease activity ได้ นอกจากนี้ยังมีอัตราการเกิดผลึกตะกอนที่มีรูปร่างและขนาดของผลึกได้แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยการควบคุมอัตราการเกิด urea hydrolysis (Hammes, et al., 2003b, pp. 4901-4909)

ตาราง 1 การผลิต $CaCO_3$ โดยจุลินทรีย์ที่สร้างคาร์บอเนตจากกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย

Purpose	Urea (mM)	Ca^{2+} (mM)	Urease activity (mM urea.min^{-1})	References
Sr^{90} sequestration	333	25	0.045	(Fujita, et al., 2000, pp. 305-318)
Sr^{90} sequestration	330	0.025	0.042	(Warren, et al., 2001, pp. 93-115)
removal of Ca^{2+} from wastewater	16	14	0.293	(Hammes, et al., 2003c, pp. 699-704)
removal of Ca^{2+} from wastewater	8	15	0.032	(Hammes, et al., 2003a pp. 191-201)
stone remediation	333	12-50	0.190	(Stocks-Fisher, et al., 1999, pp. 1563-1571)
stone remediation	66	25	0.041	(Bachmeir, et al., 2002, pp. 171-181)
portland cement remediation	333	50	n/s	(Ramachandran, et al., 2001, pp. 3-9)
plugging of rock pores	333	0.025	n/s	(Gollapudi, et al., 1995, pp. 695-705)
surface treatment for degraded limestone	167	14	n/s	(Dick, et al., 2006, pp. 357-367)
surface treatment for concrete	167	67.5	n/s	(Muynck, et al., 2008, pp. 875-885)

หมายเหตุ: n/s = not stated

Gollapudi, et al. (1995) ได้ศึกษาศักยภาพของการเกิด MCP เพื่อนำไปใช้ในการทำให้เกิดการอุดรูช่องว่างหรือรูพรุน (plugging) ในดินทราย โดยใช้แบคทีเรียหลายชนิดผสมกับดินทราย แล้วบรรจุลงในกระบอก จากนั้นจึงผ่านสารละลายที่มีไอออนของ urea/calcium/carbonate ลงไป (ตาราง 1) พบว่าสามารถลดอัตราการไหลลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 45 ชั่วโมง และสามารถอุดรูช่องว่างในดินทรายจนสมบูรณ์ได้เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าระดับของการอุดรูพรุนหรือการคงให้มีการซึมผ่านได้ (permeability) สามารถควบคุมได้ด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง และในปี 1999 Stocks-Fischer, et al. ได้ทำการศึกษาการอุดรูพรุนในดินทรายโดยจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน พบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทเกี่ยวข้องโดยตรงกับการตกตะกอนแคลไซต์ด้วยการเป็น nucleation site โดยเกิดขึ้นบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเอง และเป็นตัวการสำคัญในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างซึ่งเหมาะสมต่อการตกตะกอนของแคลไซต์ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อมีจำนวนชีวมวลสูงขึ้น อัตราการตกตะกอนแคลไซต์ต่อเซลล์จะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากแคลไซต์ที่เกิดขึ้นไปห่อหุ้มที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียมากขึ้น จนทำให้ยูเรียซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ลดลง

สำหรับการศึกษาเพื่อวัตถุประสงค์ในด้านการก่อตัวเป็นซีเมนต์นั้น ถือว่าการเพิ่มความแข็งแกร่งระหว่างอนุภาคและคุณภาพของการตกตะกอนแคลไซต์เป็นสิ่งที่สำคัญมาก ซึ่ง Ramachandran, et al. (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของการเกิด MPC โดยผ่านปฏิกิริยา urea hydrolysis ในด้านอิทธิพลของปริมาณชีวมวลที่มีต่อความแข็งแกร่งของก้อนปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ (Portland cement) โดยการใช้แบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนโดสปอร์และผลิตเอนไซม์ยูรีเอสผสมกับปูนซีเมนต์และทราย แล้วใส่ลงในแม่พิมพ์เพื่อทำให้เป็นก้อนสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5 เซนติเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแกะออกจากแม่พิมพ์แล้วนำไปบ่มแช่ในสารละลายผสมของยูเรียและแคลเซียม เป็นเวลา 28 วัน (ตาราง 1) ผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในด้านปริมาณของแคลไซต์ที่ตรวจพบได้ระหว่างในชุดการทดลองและชุดควบคุม แต่พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียต่ำสุด (7.6×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร) ความแข็งแกร่งของก้อนปูนซีเมนต์ในชุดการทดลองเพิ่มขึ้น 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียสูงสุด (7.6×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) พบว่าไม่ได้ช่วยทำให้ความแข็งแกร่งของก้อนปูนซีเมนต์เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอัตราการสร้างแคลไซต์อย่างช้าๆ ช่วยเพิ่มความแข็งแกร่งได้ดีกว่าอัตราที่เกิดขึ้นเร็ว แต่การทดลองนี้ก็ยังไม่

สามารถสรุปได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากขาดการตรวจวัดความแตกต่างของปริมาณแคลไซต์ที่สะสมทั้งก่อนและหลังทำการทดลอง

จากผลการทดลองต่างๆ โดยนักวิจัยหลายๆ ท่านที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จะพบว่าอยู่บนพื้นฐานของความคิดที่ว่าจุลินทรีย์สามารถช่วยส่งเสริมการตกตะกอนแคลไซต์โดยผ่านทางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ทำให้สภาพแวดล้อมมีความเป็นด่าง (alkalinity) เกิดขึ้น (Castanier, et al., 2000a, unpaged; Ehrlich, 1998, pp. 45-60; Fujita, et al., 2000, pp. 305-318) จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียทำให้เกิดคาร์บอเนตไอออนในอัตรา 1:1 โมลาร์ (ดังสมการที่ 7) ดังนั้นถ้ามีความเข้มข้นของยูเรียสูง ปริมาณความเข้นของคาร์บอเนตก็ควรจะเพิ่มสูงมากขึ้นด้วย ซึ่งคาร์บอเนตไอออนนั้นถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการตกตะกอนแคลไซต์ ดังนั้นกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียจึงถือได้ว่าเป็นกระบวนการที่สำคัญยิ่งสำหรับการที่จะทำให้เกิด MCP ในอัตราสูง เพราะไม่เพียงแต่ทำให้เกิดสภาพความเป็นด่าง แต่ยังทำให้เกิดคาร์บอเนตไอออนได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย

การเกิด MCP เพื่อสร้างความแข็งแรงของวัสดุที่มีรูพรุน

นอกเหนือจากการเกิด MCP โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียแล้วยังมีนักวิจัยที่ทำการศึกษาโดยผ่านกระบวนการอื่นๆ เพื่อวัตถุประสงค์ในการสร้างความแข็งแรงให้ก้อนหิน เช่น Tiano, et al. (1999) ทำการศึกษาการตกตะกอนแคลไซต์โดยวิธีชีวภาพบนตัวอย่างหินปูน (limestone) เพื่อการป้องกัน (preservation) การผุพังของอนุสาวรีย์ที่ทำจากหินปูน และศึกษาผลกระทบที่มีต่อปริมาตรของรูพรุน ความแข็งแกร่งทนทาน และสีของวัสดุ โดยนำชิ้นตัวอย่างหินปูนแช่ในสารละลายแบคทีเรียที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาตรของรูพรุน (โดยดูจากปริมาณของน้ำที่สามารถซึมเข้าไปในก้อนหินปูน) ลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์หลังจากทำการทดลอง โดยครึ่งหนึ่งของเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงนี้เนื่องจากมีการตกตะกอนของแคลไซต์และอีกครึ่งหนึ่งเนื่องมาจากมีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ได้สร้างแคลไซต์อุดขวางรูอยู่ นอกเหนือจากการตกตะกอนแคลไซต์ในรูพรุนของก้อนหิน ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความแข็งแกร่ง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านของสีของวัสดุในบริเวณที่มีการตกตะกอน และพบมีการเจริญของเชื้อราปนเปื้อนบนพื้นผิวของตัวอย่าง นอกจากการทดลองของ Tiano, et al. (1999) แล้วได้มีการทดลองและประยุกต์ใช้การเกิด MCP เพื่อสร้างแคลไซต์ในอนุสาวรีย์หินและมีการจดสิทธิบัตรอีก 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกเกี่ยวกับการป้องกันพื้นผิวของหินโดยวิธีการสเปรย์แบคทีเรียและสารอาหาร จากนั้นตามด้วยการให้สารละลายอาหารอย่างเดียว ซึ่งผู้ที่คิดค้นวิธีการนี้รายงานว่ามีตะกอนแคลไซต์

เกิดขึ้นและหนา 2-3 ไมโครเมตร (Castanier, et al., 2000a, unpaged) ต่อมา Rodriguez-Navarro, et al. (2003) ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า มีความลึกของการเกิด cementation ถึงประมาณ 500 ไมโครเมตร เมื่อใช้วิธีการแช่ชิ้นหินปูนตัวอย่างในแบคทีเรียและสารอาหาร และเนื่องจากการเกิด cementation โดยวิธีนี้จะค่อนข้างบางและอยู่ที่พื้นผิวของหิน ดังนั้น การประยุกต์ใช้ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการป้องกันมากกว่าการทำเพื่อซ่อมแซมวัสดุและไม่เหมาะสำหรับการเสริมความแข็งแกร่งให้กับวัสดุที่ไม่แข็งแรง

สำหรับวิธีการที่สอง ทำโดยมีวัตถุประสงค์เพื่ออุดรูหรือรอยแตกของหิน ซึ่งเกี่ยวกับการสร้างปูนชีวภาพ (biological mortar) ที่ประกอบด้วยผงหินปูนบดละเอียดและเซลล์แบคทีเรียหลังจากที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารและกำจัดอาหารออกแล้ว (bacterial paste หรือ pelleted bacterial cells) ซึ่งสามารถนำมาบรรจุลงในรอยแตกหรือรูของพื้นผิวหิน โดยวิธีการนี้จะมีการผสมสารกำจัดเชื้อราลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราปนเปื้อนด้วย

Calcite In- situ Precipitation System (CIPS)

นอกเหนือจากผลงานวิจัยที่ได้มีการเผยแพร่ทางวารสารวิชาการแล้ว ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้ด้วยวิธีที่เรียกว่า Calcite in-situ Precipitation System (CIPS) ซึ่งถูกพัฒนาโดยบริษัท Calcite Technology Pty Ltd. (Perth, Australia) วิธี CIPS เป็นการทำให้เกิดการตกตะกอนแคลไซต์ภายในช่องว่างของวัสดุ ตัวอย่างเช่น ดินทราย ซึ่งจะทำให้เกิดการเชื่อมความแข็งแกร่งกันภายในช่องว่างของวัสดุ และเป็นการทำในพื้นที่ที่ต้องการดูแลรักษาโดยไม่ต้องมีการเคลื่อนย้ายออก และผลที่ได้จากวิธีนี้มีลักษณะคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุเทียบเท่ากับการเกิดตะกอนขนาดกลางอย่างแคลเซียมคาร์บอเนตโดยทางธรรมชาติ (natural calcarenite) (Ismail, et al., 2002, pp. 313-324)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิด cementation

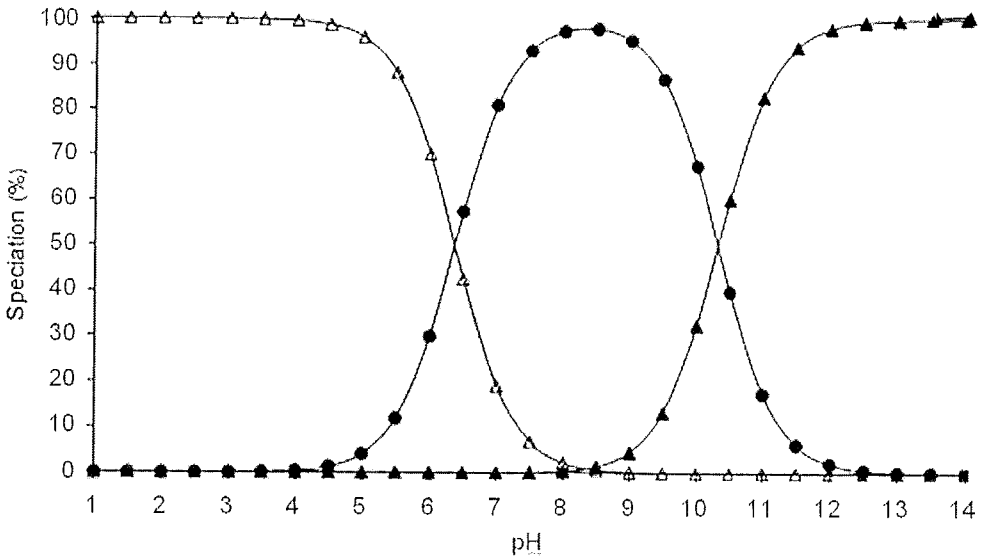
ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นโดยมีผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป็นจุดศูนย์กลางในการตกตะกอน โดยมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง 3 ประการ คือ 1) ปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียม 2) ปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอเนต และ 3) ความเป็นกรด-ด่างของสภาวะแวดล้อมที่ซึ่งมีผลต่อชนิดของคาร์บอเนต (carbonate speciation) และการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต (Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7) ซึ่งในการตกตะกอนที่เกิดขึ้นได้นั้น ไอออนชนิดต่างๆ ต้องอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวมากๆ (supersaturation) ทั้งนี้เนื่องจากค่าการละลายของผลิตภัณฑ์

แคลไซต์ที่เกิดขึ้น (Ksp) มีค่าต่ำมาก ($3.33X10^{-9}$ โมลต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) (Sawada, 1998, pp. 39-68) การตกตะกอนสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายโดยการผสมไอออนที่ละลายได้ของแคลเซียมและคาร์บอเนต ที่ระดับความเข้มข้นปานกลาง โดยผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นผงแต่ยังมีความเป็นซีเมนต์ต่ำ

ความแตกต่างระหว่างปริมาณความเข้มข้นอิ่มตัว (saturation) และปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ควบคุมอัตราของการตกตะกอน (Bodek, et al., 1988, unpaged) โดยทั่วไปแล้ว เมื่อปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวมากมีปริมาณไอออนสูง อัตราการตกตะกอนก็จะเกิดขึ้นเร็ว และผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก ดังตัวอย่างเช่นในการผสมกันของแคลเซียมและคาร์บอเนตโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี และเมื่อมีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวมากเกิดขึ้น และระดับของความไม่สมดุล (degree of disequilibrium) ยังอยู่ในระดับที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกันในตัวอย่างของสารเคมี จะส่งผลให้เกิดการสร้างผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อปล่อยให้เวลาผ่านไป รวมทั้งมีความเป็นซีเมนต์สูงขึ้นด้วย

ระดับความอิ่มตัวมากของคาร์บอเนตไอออนสามารถทำให้เกิดขึ้นได้โดยการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH) ซึ่งสัดส่วนของปริมาณคาร์บอเนตทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในรูปของ CO_3^{2-} ในสารละลายตลอดเวลานั้นขึ้นอยู่กับ pH ถ้า pH มีค่าต่ำกว่า 8 ความเข้มข้นของคาร์บอเนตจะต่ำมาก (ภาพ 1) ซึ่งหมายความว่า ถ้าต้องการให้ผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้นจะต้องลดค่า pH ลงและในทางกลับกันถ้าต้องการให้ผลึกมีขนาดเล็กลงจะต้องเพิ่มค่า pH ให้สูงขึ้น

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะใช้หลักการเกิด MCP และการประยุกต์ใช้ในลักษณะแบบ CIPS ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์สามารถช่วยเสริมสร้างความแข็งแกร่งให้กับหินประดับ เช่น อิฐบล็อกประสานชนิดที่มีความแข็งแกร่งของพื้นผิวน้อย ผุกร่อนง่ายและมีรูพรุนในเนื้อวัสดุมาก ซึ่งในการที่จะทำให้ระดับการเกิด cementation มีเพิ่มมากขึ้นจึงจำเป็นต้องมีการสร้างแคลไซต์ในปริมาณที่มากด้วย ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้จึงต้องมีคุณสมบัติที่ทนต่อยูเรีย แคลเซียม แอมโมเนียม และไนเทรตหรือคลอไรด์ (ขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือแคลเซียมที่ใช้) ได้สูงด้วย



ภาพ 1 Chemical speciation ของ H_2CO_3 (△), HCO_3^- (●) และ CO_3^{2-} (▲) ที่ 25°C

ที่มา: Calculated from Atkins, 2002, unpaged

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 05 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 249179
เลขเรียกหนังสือ

แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

ในปัจจุบันความต้องการเอนไซม์ยูรีเอสในทางการค้ายังมีไม่มากนัก โดยมีผู้ผลิตรายใหญ่ เช่น บริษัท Roche กอปรกับส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคและการทำเซรามิคด้วยเทคโนโลยีระดับสูงเท่านั้น (Gauckler and Baader, 1999, pp. 1-25; Roche, 2001, unpaged) ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีราคาแพงมากและมีความบริสุทธิ์มากเกินความต้องการสำหรับการนำไปใช้ทำปุนชีวภาพ เป็นที่ทราบดีว่าจุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ เช่น มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ (Lee and Calhoun, 1997, pp. 3991-3996; Mobley, et al., 1995, pp. 85-108; Provorov and Vorobyov, 2000, pp. 105-119) และพบในวัฏจักรไนโตรเจนของดินที่มีการทำเกษตรกรรม (Nielsen, et al., 1998, pp. 147-157; Sloan and Anderson, 1995, pp. 2425-2447) โดยทั่วไป กลไกควบคุมการสังเคราะห์หรือการแสดงออกของเอนไซม์ยูรีเอส (Mode of regulation and expression) ในจุลินทรีย์มีอยู่ 4 กลไก คือ

1. Constitutive: การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมภายนอก

2. Inducible: การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่สามารถถูกชักนำให้เกิดขึ้นได้ โดยการมีโมเลกุลของตัวชักนำ (inducer molecule) เช่น ยูเรีย หรือสภาวะแวดล้อมอื่นๆ

3. Repressible: การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ถูกควบคุมหรือถูกกดไว้โดยการมีแอมโมเนียหรือ ammonia precursors อยู่ รวมทั้งยูเรียเองด้วย การสังเคราะห์เอนไซม์แบบนี้สามารถถูก de-repressed หรือทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจน

4. Developmental: การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในบางช่วงของการเจริญ เช่น swarming และ non-swarming ซึ่งจะมีการแสดงออกของเอนไซม์ยูรีเอสเปลี่ยนแปลงไป (Falkinham III and Hoffman, 1984, pp. 1037-1040)

ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ยูรีเอสสำหรับทำซีเมนต์ชีวภาพ (biocementation) จึงต้องทนต่อความเข้มข้นสูงๆ ของยูเรียและแคลเซียมได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์จะต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงและสร้างเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่องหรือสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกัน ตามปฏิกิริยาการเปลี่ยนยูเรียไปเป็นแอมโมเนียม คือ กลุ่มที่กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม (ตาราง 2) และ กลุ่มที่กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium* (Kaltwasser, et al., 1972, pp. 178-196) และ *Klebsiella aerogenes* (Friedrich and Magasanik, 1977, pp. 313-322) ใน *K. aerogenes* พบว่าแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะชักนำให้เกิดการสร้าง glutamine ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรีย (Murlrooney, et al., 2001, pp. 280-282) การที่ปริมาณความเข้มข้นที่สูงของยูเรียซึ่งถูกย่อย (hydrolysed) ในขณะที่เกิดกระบวนการ biocementation จะเป็นประโยชน์อย่างมาก เฉพาะในกลุ่มจุลินทรีย์ที่กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียมเท่านั้น

เช่นเดียวกับความต้องการแบคทีเรียที่สามารถเกิด biocementation ได้ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ต้องปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และในกรณีที่ถูกนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์นั้นต้องไม่ก่อโรค ไม่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม และต้องไม่มีการส่งผ่านสารหรือคุณสมบัติใดๆ เช่น การดื้อยา ที่จะไปเพิ่มการก่อโรคหรือความรุนแรงในการเกิดโรคของจุลินทรีย์ที่อยู่ใน

สิ่งแวดล้อม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากทั้งความสามารถในการเกิด biocementation และข้อจำกัดต่างๆทางสิ่งแวดล้อมแล้วจะพบว่า แบคทีเรียโดยเฉพาะในกลุ่มของ *Bacillus* sp. (ตาราง 2) มีศักยภาพและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ *Sporosarcina pasteurii*

ตาราง 2 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสไม่ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม

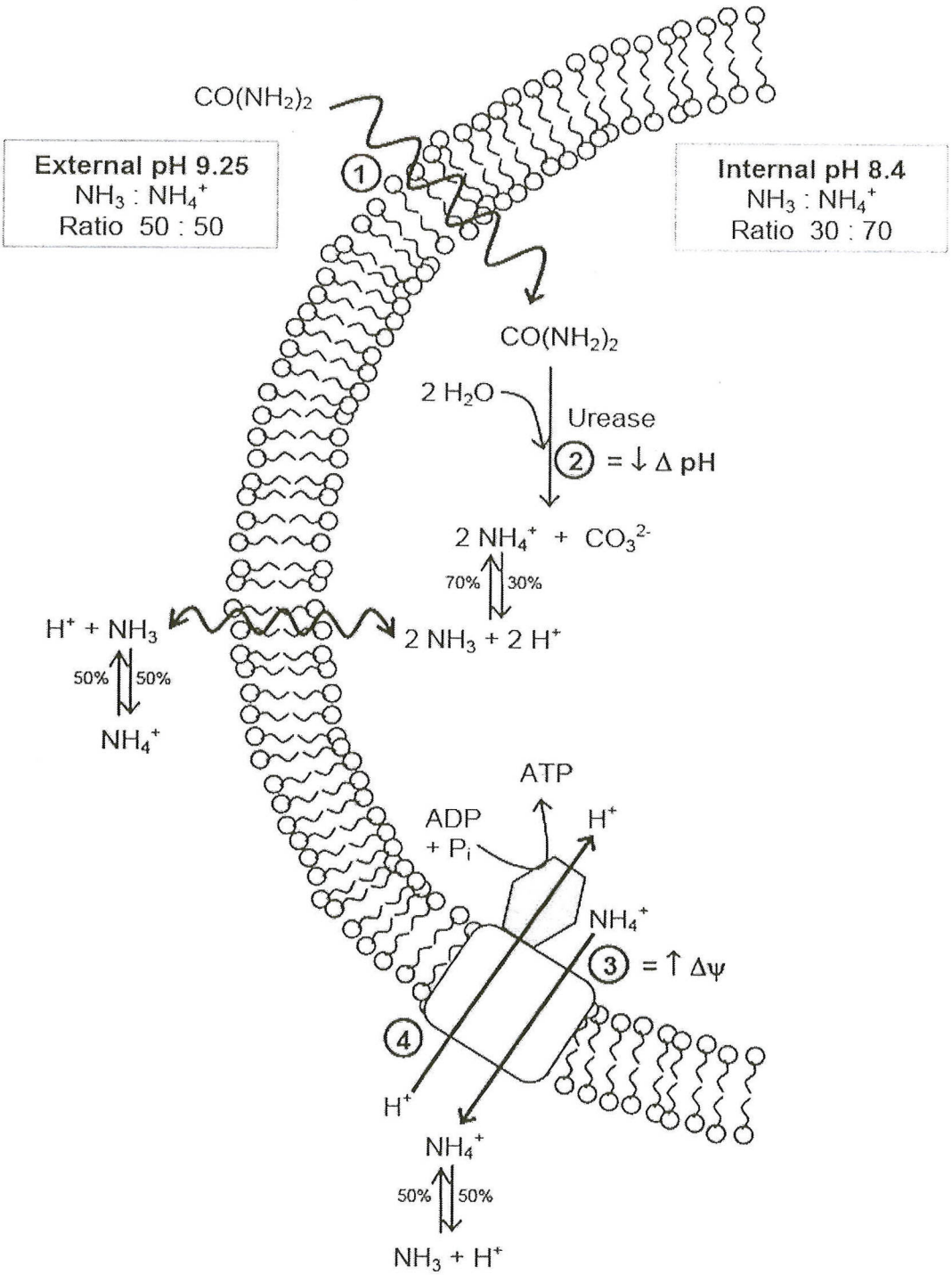
Microorganisms	High activity	Not repressed by NH_4^+	Not Pathogenic or Genetically modified
Sporosarcina pasteurii (*Bacillus pasteurii*)	✓	✓	✓
Proteus vulgaris	Unknown	✓	Moderated
Proteus mirabilis	Unknown	✓	X
Helicobacter pylori	✓	✓	X
Ureplasmas (*Mocillicutes*)	✓	✓	X

Sporosarcina pasteurii (*Bacillus pasteurii*) (Yoon, et al., 2001, pp. 1079-1086) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง (alkaliphilic bacteria) สามารถพบได้ทั่วไปในดินและ น้ำเสีย (Sneath, 1986, unpaged) แบคทีเรีย *S. pasteurii* มีกลไกการสร้าง ATP ที่มีลักษณะเฉพาะ คือเกิดขึ้นควบคู่ไปกับการไฮโดรไลซิสของยูเรีย โดยการสร้าง ATP นั้นจะถูกควบคุมด้วย proton motive force (Δp) ซึ่งเป็นผลรวมของ transmembrane pH gradient (ΔpH) และ charge gradient หรือ membrane potential ($\Delta \psi$):

$$(\Delta p) = (\Delta pH) + (\Delta \psi)$$

ส่วนสิ่งมีชีวิตที่เจริญในสภาพแวดล้อมที่เป็นกลาง (neutrophilic organisms) จะสร้าง ATP จากความแตกต่างของโปรตอน (proton gradient) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากมีการปั๊มโปรตอนออกนอกเซลล์โดยผ่านกระบวนการ electron transport chain และจากความ

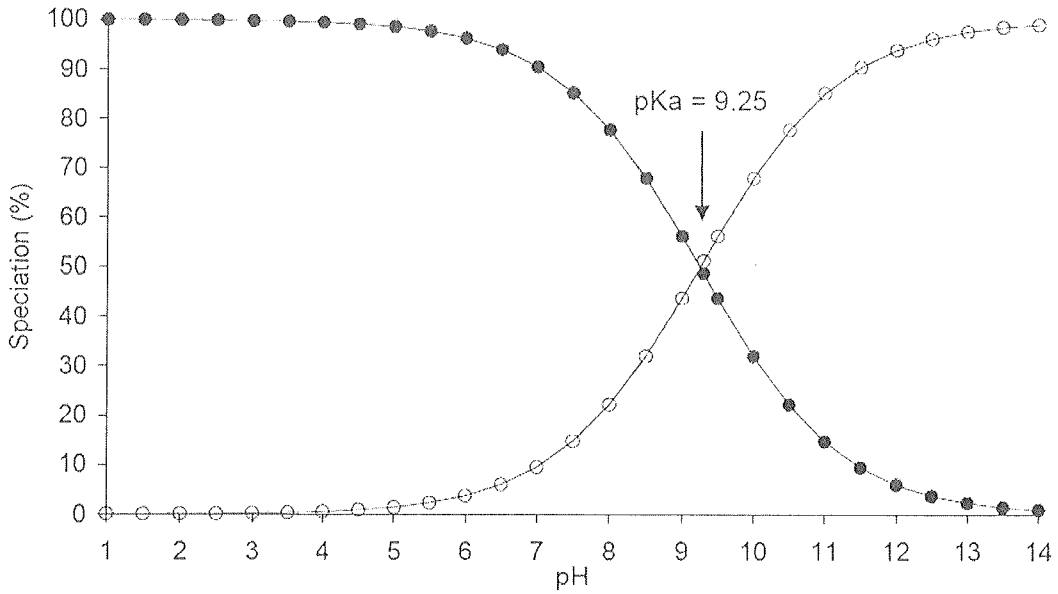
เข้มข้นของโปรตอนที่แตกต่างกันนี้ (high outside / low inside) จะทำให้เกิดการผลักโปรตอนกลับคืนเข้าไปในเซลล์โดยผ่านทาง ATP-synthase ส่งผลให้เกิดการสร้าง ATP ขึ้นมา (Prescott, et al., 1993, unpaged) ในสภาพแวดล้อมสำหรับจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างหรือมี pH สูง จะมีปริมาณโปรตอนภายนอกเซลล์ต่ำ และมีค่า pH ภายในเซลล์ต่ำก็จะมีปริมาณโปรตอนภายในเซลล์สูง (low outside/high inside) ส่งผลให้เกิด reversed ΔpH ซึ่งทำให้โปรตอนเคลื่อนย้ายจากภายในเซลล์ออกสู่นอกเซลล์ ซึ่งตรงกันข้ามกับทิศทางการสร้าง ATP ตามปกติ ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ประเภท alkaliphiles มีการปรับตัวได้ 2 แนวทางที่จะเพิ่มปริมาณ proton motive force และขับโปรตอนเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อสร้าง ATP โดยการ 1) ทำให้สภาพแวดล้อมของไซโตรพลาสซึมเป็นด่าง (alkalinisation of the cytoplasm) ส่งผลให้ลดค่า ΔpH ลง แต่วิธีนี้จะเกิดขึ้นได้ในช่วง pH แคบๆ เท่านั้น และ 2) ทำให้เกิดการไหลออก (efflux) ของแคทไอออนตัวอื่นๆ นอกเหนือจากโปรตอน ซึ่งส่งผลให้ค่า $\Delta\psi$ เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งถ้าค่า $\Delta\psi$ มีมากเพียงพอ proton motive force ก็จะมีแรงมากพอที่จะขับโปรตอนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ โดยจะเป็นการต้านหรือสวนทางกับ proton gradient ซึ่งในกรณีของเชื้อ *S. pasteurii* นั้น ชนิดของไอออนที่ถูกนำเข้า เพื่อเพิ่มค่า $\Delta\psi$ จะขึ้นอยู่กับลักษณะการเจริญของเชื้อ สำหรับเซลล์ที่เจริญในที่มีความเข้มข้นของยูเรียต่ำ (ประมาณ 15 มิลลิโมลาร์) ไอออนที่สามารถเคลื่อนออกจากเซลล์เพื่อเพิ่มค่า $\Delta\psi$ ได้แก่ K^+, Na^+ หรือ NH_4^+ ส่วนเซลล์ที่เจริญในที่มีความเข้มข้นของยูเรียสูง (300 มิลลิโมลาร์) จะไม่สามารถใช้ K^+ หรือ Na^+ เคลื่อนออกจากเซลล์ เพื่อเพิ่มค่า $\Delta\psi$ ได้ จะมีเพียง NH_4^+ เท่านั้นที่สามารถสร้าง ATP ได้ (Jahns, 1996, pp. 403-409) (ภาพ 2) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้มีระดับของกิจกรรมเอนไซม์ยูรีเอสที่สูง เพียงแค่เมื่อมียูเรียอยู่ในอาหารช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ก็สามารถที่จะย่อยยูเรียให้กลายเป็น NH_4^+ และ CO_3^{2-} ได้ในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรก และหลังจากที่ปริมาณยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง NH_3 ก็จะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยผ่านทางการแพร่ทางเยื่อหุ้มเซลล์



ภาพ 2 Coupling of urea hydrolysis และ ATP generation ของ *S. pasteurii*

ที่มา: Jahns, 1996, pp. 403-409

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า ค่า pH 9.25 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *S. pasteurii* นั้นยังมีค่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า dissociation constant (pKa) ของสมดุลเคมี NH_3/NH_4^+ ที่ซึ่ง NH_3 และ NH_4^+ มีสัดส่วนปริมาณที่เท่ากัน (50 : 50) ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 Chemical speciation **ของ** Ammonia (NH_3) (O) **และ** ammonium (NH_4^+) (●) **ที่** pH **ต่างๆ**

ที่มา: Victoria S. W., 2004, unpaged

สำหรับเชื้อ *Proteus vulgaris* นั้นเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน โดยปกติแล้วจะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งบทบาทหลักของเอนไซม์ยูรีเอสในแบคทีเรียชนิดนี้ก็เพื่อหาแหล่งของแอมโมเนียที่สามารถถูกนำมาใช้ภายในเซลล์เพื่อการเจริญของเซลล์หรือสร้างมวลชีวภาพโดยผ่านวิถีทาง glutamine synthase-glutamate synthase (GS- GOGAT) หรือโดยปฏิกิริยาของ glutamate dehydrogenase (GDH) (Tyler, 1978, pp. 1127-1162)