บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการอนุรักษ์วัสดุก่อสร้างที่เป็นหินโดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุ เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์โบราณสถาน โบราณวัตถุต่อไป มีขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยเป็น 3 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต

1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย

1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต

1.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

1.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสโดยการศึกษา Urease activity ของเชื้อที่คัดแยกได้

1.5 การศึกษาปริมาณตะกอนคาร์บอเนตชีวภาพ

1.6 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

ส่วนที่ 2 ขั้นตอนการศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

2.1 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย

2.2 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง

ส่วนที่ 3 ขั้นตอนการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตกับพื้นผิววัสดุก่อสร้าง

3.1 การเตรียมอิฐตัวอย่างซึ่งใช้เป็นตัวแทนของพื้นผิววัสดุก่อสร้าง

3.2 การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโดยวิธีการพ่นและทา

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของตัวแทนของพื้นผิววัสดุก่อสร้างจากการทดสอบค่าดูดซึมน้ำ

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือสำหรับการทดลอง

1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Pharmacia LKB รุ่น Novaspace II

1.2 ตู้บ่มเชื้อพร้อมเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ยี่ห้อ NBS รุ่น innova 4340

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ EUTECH รุ่น 510

1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น innova ED2245

1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น S3100

1.6 ตู้อบอุณหภูมิสูง ยี่ห้อ Contherm รุ่น Digital series 260 M

1.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ยี่ห้อ TOMY รุ่น ES315

1.8 ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ Contherm รุ่น M190P

1.9 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น CX21

1.10 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Nikon รุ่น MSZ-1B

1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Heto รุ่น 11DT -1

1.12 ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ Holten รุ่น HBB 2472

1.13 เครื่องผสมสารแบบหมุนวน ยี่ห้อ VORTEX รุ่น GENIE -2

1.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ BECKMAN รุ่น J2 - MC

1.15 อ่างน้ำกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง ยี่ห้อ Branson รุ่น 254

1.16 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Leo1455VP

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 จานเพาะเชื้อ

2.2 ห่วงเขี่ยเชื้อและเข็มเขี่ยเชื้อ

2.3 ปิเปตและไมโครปิเปต

2.4 เสียม พลั่วมือ ถุงพลาสติก และกล่องโฟม

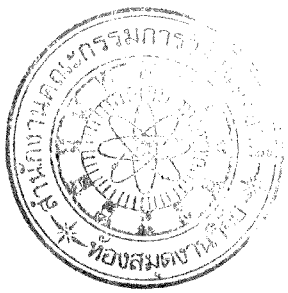
2.5 ไม้พันสำลี

2.6 หลอดทดลองขนาด 16X150 และ 13X100 มิลลิเมตร

2.7 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ

2.8 กระบอกตวงขนาด 250, 500, และ 1,000 มิลลิลิตร

2.9 ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร



2.10 บีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

2.11 กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร

2.12 บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.13 กระจกสไลด์ กระจกสไลด์หลุม และกระจกปิดสไลด์

2.14 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100, 250, 500, และ 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ยี่ห้อ Merck
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ยี่ห้อ Merck
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea $CaCl_2$ agar
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea $CaCl_2$ broth
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar ยี่ห้อ HIMEDIA
6. ชุดสีย้อมแกรม
7. น้ำยาทดสอบคาตาเลส (Catalase test)
8. 0.85% sterile saline

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต

1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย

1.1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากดินโดยเก็บจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยยูเรียอย่างสม่ำเสมอ และดินกากตะกอนแห้งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งใช้วิธีเก็บตัวอย่างดินแบบ Composite sample โดยการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มอย่างทั่วถึงตลอดบริเวณจำนวน 16 จุดย่อยตามขั้นตอนดังนี้ ทำความสะอาดผิวดินบริเวณที่กำหนดโดยใช้พลั่วมือขุดดินเป็นรูปตัววี (V) ให้มีระดับความลึกไม่เกิน 6 นิ้ว และใช้เสียมแซะด้านหนึ่งของตัววีให้มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว กดเสียมให้ลึกจนถึงก้นหลุม งัดดินขึ้น แบ่งดินด้านข้างทั้งสองของเสียมออก แล้วนำดินส่วนที่เหลือใส่ถังพลาสติก กระทำเช่นนี้จนครบทุกจุดที่กำหนด โดยมีปริมาณดินเท่ากันทุกจุด จากนั้นทำการคลุกเคล้าดินที่ได้จากทุกจุด .แล้วเทดินกองลงบนแผ่นพลาสติกแล้วทำให้ดินกองพูนตรงกลาง

แบ่งดินออกเป็นสี่ส่วน โดยทำเครื่องหมายบวกบนกองดิน แล้วแบ่งดินออกมาหนึ่งส่วน ประมาณ 1 กิโลกรัม สามส่วนที่เหลือให้ทิ้งไว้ในพื้นที่แปลงเดิม ดินที่แบ่งมานี้ให้บรรจุลงในถุงพลาสติก แล้วนำใส่กล่องโฟมเพื่อมายังห้องปฏิบัติการต่อไป

1.1.2 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากพื้นผิวสถูปเจดีย์ โดยเก็บจากสถูปเจดีย์วัดโบราณในเขตอำเภอเมืองพิษณุโลก และใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบ swab method โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วชุบ 0.85% sterile saline แตะข้างหลอดให้น้ำไหลออกจากสำลี จากนั้นใช้ไม้พันสำลีเช็ดบริเวณพื้นผิวสถูปเจดีย์ให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางนิ้ว ต่อหนึ่งจุด แล้วนำไม้พันสำลีที่เช็ดพื้นผิวแล้วมาใส่ในหลอดเดิมพร้อมกับปิดฝาหลอด ทำเช่นนี้ทั้งหมดจำนวน 16 จุด หลังจากนั้นนำมาแช่ในกระติกน้ำแข็งเพื่อมายังห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต

1.2.1 นำดินจากพื้นที่เกษตรกรรม ดินกากตะกอนแห้งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล และจากพื้นผิวสถูปเจดีย์แล้วนำตัวอย่างจากทั้งสามแหล่งมาทำการเจือจาง (serial dilution) และบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม endospore -forming bacteria จากนั้นทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea-$CaCl_2$ agar (Hammes, et al., 2003b, pp. 4901-4909) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน โดยสังเกตผลการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate ลงบนอาหาร nutrient agar plate จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar slant เพื่อใช้ในการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสต่อไป

1.2.2 การทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร urea agar โดยสังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อที่คัดแยกได้ไว้ในอาหาร 10% glycerol medium เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

1.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.3.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ทำโดยการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่มียูเรียอยู่ด้วย 20 กรัม/ลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำน้ำหมัก (fermentation broth) ไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของสารละลายใสไปทำการวัด urease activity

1.3.3 การวัด urease activity โดยวิธี Nessler assay method (Greenberg, Clesceri, and Eaton 1992, unpaged) นำส่วนของสารละลายใสจากข้อ 1.3.2 มาเติมน้ำยา Nessler reagent ในอัตราส่วนสารละลายใสต่อน้ำยา Nessler reagent 25:1 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่ 425 นาโนเมตร ซึ่งใช้สารละลาย NH_4Cl เข้มข้น 50-250 ไมโครโมลาร์ เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส 1 unit เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดแอมโมเนีย 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้ค่า urease activity สูงไว้สำหรับการทดลองต่อไป

1.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส โดยการศึกษา urease activity ของเชื้อที่คัดแยกได้

1.4.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.4.2 ความเป็นกรดด่าง (pH 7, pH 8 และ pH 9) เริ่มจากทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth 3 กรัม ซึ่งถูกละลายใน สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (สำหรับ pH 7 และ pH 8) และสารละลาย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (สำหรับ pH 9) โดยใช้สารละลายยูเรียความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำหมัก (fermentation broth) ไปปั่น

เหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของสารละลายใสไปทำการวัด urease activity

1.4.3 ความเข้มข้นของยูเรีย (โดยใช้สารละลายยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิโมลาร์) เริ่มจากทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth 3 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์และระดับ pH ที่เหมาะสม จากข้อ 1.4.2 แล้วบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำน้ำหมัก (fermentation broth) ไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของสารละลายใสไปทำการวัด urease activity

1.4.4 ความเข้มข้นของแคลเซียม (โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิโมลาร์) เริ่มจากทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth 3 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์และระดับ pH ที่เหมาะสม จากข้อ 1.4.2 และมีความเข้มข้นยูเรียที่เหมาะสมจากข้อ 1.4.3 แล้วบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำน้ำหมัก (fermentation broth) ไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของสารละลายใสไปทำการวัดค่า urease activity

1.5 การศึกษาปริมาณตะกอนคาร์บอเนตชีวภาพ

1.5.1 ในชุดการทดลองที่มี $CaCl_2$ และชุดควบคุมที่ไม่มี $CaCl_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีระดับ pH ความเข้มข้นของยูเรียและความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสม บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออกที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของเซลล์ (ชุดควบคุม) และตะกอนร่วมกับเซลล์ (ชุดทดลอง) อบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง แล้วใช้น้ำหนักค่าสุดท้ายเป็นค่าน้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนต

1.5.2 การคำนวณหาน้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตจากสูตร

$$W_{Ca} = (W_s - W_c) / 100$$

W_{Ca} คือ น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

W_s คือ น้ำหนักแห้งของชุดทดลอง

W_c คือ น้ำหนักแห้งของชุดควบคุม

1.6 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสทำโดยการย้อมสีแกรม (Gram's stain) ทดสอบการเคลื่อนที่โดยวิธีการ Hanging drop การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ catalase test, oxidase, indole และ Voges–Proskauer test จากนั้นส่งจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA (Full sequence : ~ 1,400 bp) ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

2. ขั้นตอนการศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

1.7 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย (Stocks-Fischer, et al., 1999, pp. 1563-1571)

1.7.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ โดยการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,750 x g เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มาทำเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension) ในอาหาร urea-$CaCl_2$ broth สำหรับชุดการทดลองที่ 1 และ urea broth สำหรับชุดการทดลองที่ 2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อรอการผสมกับทราย

1.7.2 การเตรียมตัวอย่างทราย ทำโดยการร่อนทรายด้วยตะแกรงขนาดรู 250 ไมโครเมตร และ 500 ไมโครเมตร โดยคัดเลือกเอาทรายที่มีขนาดระหว่าง 250 ไมโครเมตร ถึง 500 ไมโครเมตร มาใช้ในการทดลอง ทำการแช่ทรายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อขจัด $CaCO_3$ และล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ค่า pH ของน้ำล้างเท่ากับ 7 นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อทรายแห้งดีแล้ว ทำการชั่งทราย 70 กรัมจากนั้นนำมาทำปราศจากเชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น

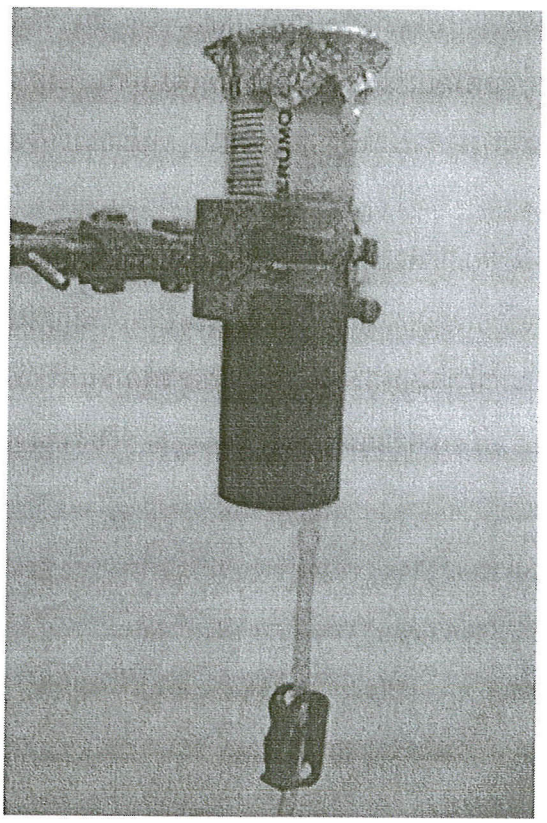
นำตัวอย่างทรายบางส่วนไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Leo1455VP

1.7.3 การทดลองการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย โดยนำเชื้อที่ทำเป็นเซลล์แขวนลอยในอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาผสมกับทรายที่ผ่านการเตรียมแล้ว นำส่วนผสมที่มีลักษณะคล้ายโคลนทรายไปบรรจุลงในกระบอกฉีดยาพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกันในชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียซึ่งใช้อาหาร urea-$CaCl_2$ broth เพียงอย่างเดียว นำคอลัมน์ทั้งสามมาตั้งไว้ในแนวดิ่ง (ภาพ 4) บ่มที่อุณหภูมิห้องและทำการให้อาหารชนิดเดียวกันกับการผสมครั้งแรกทุกวัน จนกระทั่งไม่สามารถให้ได้อีก โดยสังเกตจากการที่ไม่มีอาหารไหลออกมาจากคอลัมน์ จึงหยุดการทดลอง แล้วนำคอลัมน์ทรายที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาอัตราการเกิดตะกอน $CaCO_3$ โดยวิธี EDTA Titrimetric Method (APHA, 1980) และนำตัวอย่างทรายบางส่วนไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.7.4 การหาอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยวิธี EDTA Titrimetric Method โดยชั่งทรายจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วค่อยๆเติมกรด HCl ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างช้าๆปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายแคลเซียมคาร์บอเนตออกจากเม็ดทราย ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตในครั้งแรก ทำการกรองเอาเม็ดทรายออก นำสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต 300 มิลลิลิตรไปต้มประมาณ 5 นาทีเพื่อไล่ก๊าซ CO_2 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับให้มี pH ให้ได้ 7 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ทำการดูดสารละลายที่ปรับปริมาตรแล้ว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 1-2 มิลลิลิตร เติมผงเมอร์เรกไซด์อินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ทำการไตเตรทจากสีชมพู (สีเริ่มต้น) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง (จุดสิ้นสุด) การคำนวณ โดยการอ่านปริมาตร EDTA (หน่วยเป็นมิลลิลิตร) นำมาคูณด้วย 20 จะได้ค่ามิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อสิบกรัมของทรายตัวอย่าง

1.7.5 การศึกษาทางกายภาพบนพื้นผิวเม็ดทรายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำเม็ดทรายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทรายข้อ 2.1.2 และการทดลองการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทรายข้อ 2.1.3 ติดบน Stub ซึ่งมี

คาร์บอนเทปเป็นวัสดุยึดติดระหว่าง Stub กับเม็ดทราย พยายามติดให้เม็ดทรายเรียงตัวในลักษณะชั้นเดียวไม่เกาะกลุ่มกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉาบผิว (Coating) ด้วยเครื่องฉาบผิวตัวอย่าง (Sputter coater) ยี่ห้อ Palaron Range รุ่น SC7620 โดยกำหนดค่ากระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ ที่ความดันบรรยากาศ 0.05 มิลลิบาร์ ระยะห่างระหว่างตัวอย่างกับแผ่นทอง 50 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 150-200 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพ 4 ลักษณะการจัดโมเดลคอลัมน์ทรายตามแนวดิ่ง

1.8 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐ (ดัดแปลงจาก Rodriguez-Navarro, et al., 2003, pp. 2182-2193)

1.8.1 การเตรียมตัวอย่างอิฐ โดยทำการผสมทราย เนื้อดิน ปูนซีเมนต์และน้ำ ในอัตราส่วน 5:2:1:1 ตามลำดับ แล้วนำมาอัดลงในแม่พิมพ์เพื่อให้ได้อิฐตัวอย่างสองขนาด คือขนาดเล็ก (0.5x1x1เซนติเมตร) และขนาดใหญ่ (0.5x4.5x2.5 เซนติเมตร) จากนั้นบ่มชิ้นอิฐโดยใช้ผ้าเปียกห่อไว้ เป็นเวลา 7 วัน โดยที่ชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กจะเป็นตัวแทนในแง่สภาวะที่เหมาะสม คือมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต และชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่จะเป็นตัวแทนที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริง ที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิว ต่อปริมาตรต่ำกว่า แล้วทำชิ้นอิฐตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะห่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างอิฐบางส่วนไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.8.2 การทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ 10% (v/v) ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และในหลอดทดลองขนาด 24x150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลวดังกล่าวปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วใส่ลงในขวด จำนวน 1 ชิ้นต่อขวด จำนวน 5 ขวดต่อชุดการทดลองที่จะทำการเก็บตัวอย่าง สำหรับชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วใส่ลงในหลอด จำนวน 1 ชิ้นต่อหลอด จำนวน 5 หลอดต่อชุดการทดลองที่จะทำการเก็บตัวอย่าง โดยทำควบคู่ไปกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำหลอดทดสอบไปบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน ส่วนฟลาสก์นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นอิฐทั้ง 2 ขนาด เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม 5, 10, 15, 20 และ 30 วัน ทำการล้างชิ้นอิฐด้วย น้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งเพื่อหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชิ้นอิฐตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น จากนั้นนำไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

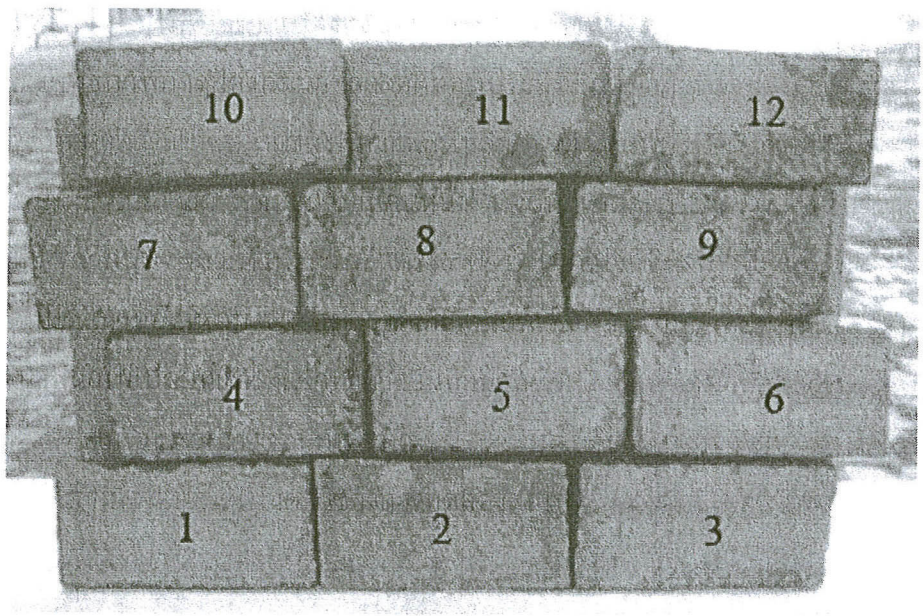
1.8.3 การทดสอบความแข็งแกร่ง (consolidation) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) จากอ่างน้ำกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง Branson รุ่น 5210 โดยใช้ความถี่ 50 kHz กระทำต่อชิ้นอิฐตัวอย่างเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งเพื่อหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชิ้นอิฐตัวอย่างที่ลดลง ทำเช่นนี้จนกระทั่งครบ 5 ครั้ง จากนั้นนำไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.8.4 การศึกษาทางกายภาพบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำอิฐตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.2.1 จากการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวในข้อ 2.2.2 และจากการทดสอบความแข็งแกร่งในข้อ 2.2.3 มาทำการกะเทาะเพื่อให้ส่วนของพื้นผิวหลุดล่อนออก จากนั้นนำส่วนของพื้นผิวที่มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร มาติดบน Stub ซึ่งมีคาร์บอนเทปเป็นวัสดุยึดติด พยายามหงายให้ส่วนของพื้นผิวขึ้นและเรียงตัวในลักษณะชั้นเดียวไม่เกาะกลุ่มกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉาบผิว (Coating) ด้วยเครื่องฉาบผิวตัวอย่าง (Sputter coater) โดยกำหนดค่ากระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ ที่ความดันบรรยากาศ 0.05 มิลลิบาร์ ระยะห่างระหว่างตัวอย่างกับแผ่นทอง 50 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 150-200 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. ขั้นตอนการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตกับหินประดับ

3.1 การเตรียมอิฐตัวอย่างซึ่งใช้เป็นตัวแทนของหินประดับ โดยทำการผสมทรายเนื้อดิน ปูนซีเมนต์และน้ำ ในอัตราส่วน 5:2:1:1 ตามลำดับ แล้วนำมาอัดลงในแม่พิมพ์เพื่อให้ได้อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ทำการชั่งน้ำหนักเปียกของตัวอย่างอิฐที่ได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการชั่งส่วนผสมสำหรับอัดลงในแม่พิมพ์ครั้งในต่อไป จากนั้นบ่มชิ้นอิฐโดยใช้ผ้าเปียกห่อไว้ เป็นเวลา 7 วัน แล้วอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการคัดเลือกอิฐที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันเนื่องจากมีปริมาณเนื้ออิฐที่ถูกแรงอัดสม่ำเสมอ นำอิฐไปทาด้วยสารเคลือบใสประเภทกันน้ำ (Water repellent) ทั้งห้าด้านแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและทำการทาซ้ำเช่นนี้อีกจำนวนสองครั้ง จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุก

วันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักสุดท้าย ซึ่งเป็นน้ำหนักก่อนการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำ การทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใสทำโดยใช้ด้านที่ทาสารเคลือบใสแช่ลงในน้ำกลั่นให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนน้ำ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักก่อนการทดลอง จากนั้นนำอิฐจำนวนสิบสองก้อนมาเรียงซ้อนกัน (ภาพ 5) โดยเรียงให้ด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสออกในทางเดียวกันทุกก้อนเพื่อใช้เป็นด้านของการทดลองต่อไป



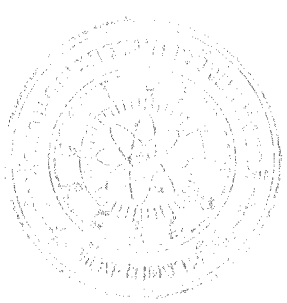
ภาพ 5 การเรียงอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน

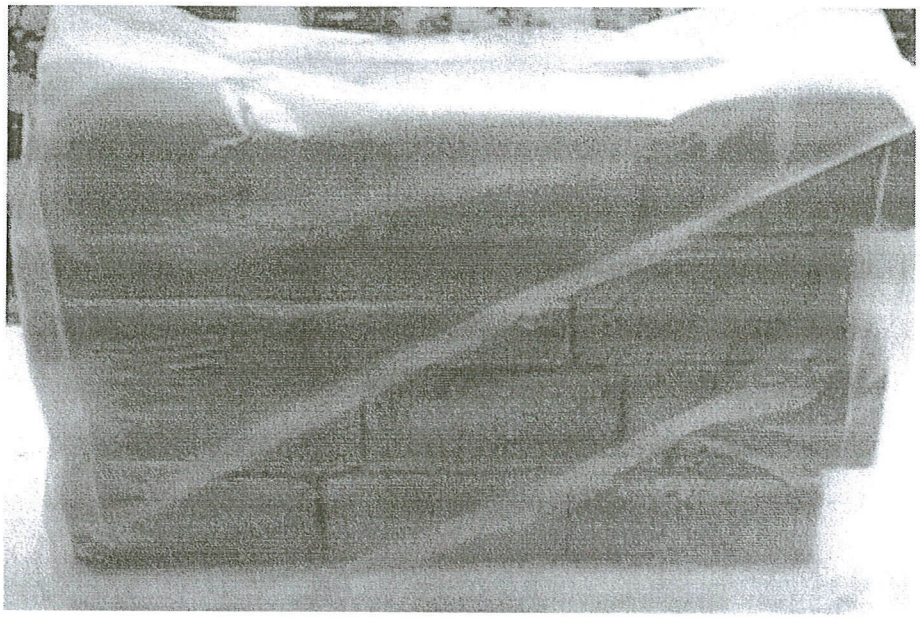
3.2 การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโดยวิธีการพ่นและทา

3.2.1 วิธีดำเนินการทดลองในรูปแบบการพ่น โดยทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียด้วยการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย 50% (v/v) ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนหนึ่งของหัวเชื้อแบคทีเรีย นำไปตรวจสอบการมีชีวิตโดยวิธี Drop plate เพื่อหาค่า CFU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำมาฉีดพ่นให้เป็นละอองด้วยอุปกรณ์ฉีดพ่น ขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ลงบนด้านของอิฐที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส โดยการกดด้ามฉีดให้สุดหนึ่งครั้งต่อหนึ่งก้อน ให้มีระยะห่างจากอิฐตัวอย่างประมาณ 10 เซนติเมตร ฉีดพ่นตั้งแต่ก้อนที่ 1 ถึงก้อนที่ 12 เรียงตามลำดับ แล้วกลับมาฉีดพ่นวนใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนกระทั่งของเหลวที่เหลือไม่สามารถฉีดพ่นในรอบต่อไปได้อีก จากนั้นทำการวัดปริมาตรของเหลวที่เหลือเพื่อคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ไป กำหนดการฉีดพ่นทุกวัน ช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 9.00 น. หนึ่งครั้ง และในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. หนึ่งครั้ง ตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 15 ของการทดลอง หลังจากนั้นฉีดพ่นหนึ่งครั้งในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. เพียงอย่างเดียว ตั้งแต่วันที่ 16 ถึงวันที่ 30 และเก็บผลในวันที่ 31 ของการทดลอง ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร urea-$CaCl_2$ broth 100 มิลลิลิตร และชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร หลังจากทำการทดลองสิ้นสุดลงในทุกๆวัน ให้ทำการคลุมชุดอิฐการทดลองทุกชุดด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น แล้วคลุมทับด้วยฉนวนกันความร้อนเพื่อป้องกันความร้อนจากแสงแดดอีกหนึ่งชั้น (ภาพ 6 และ 7)

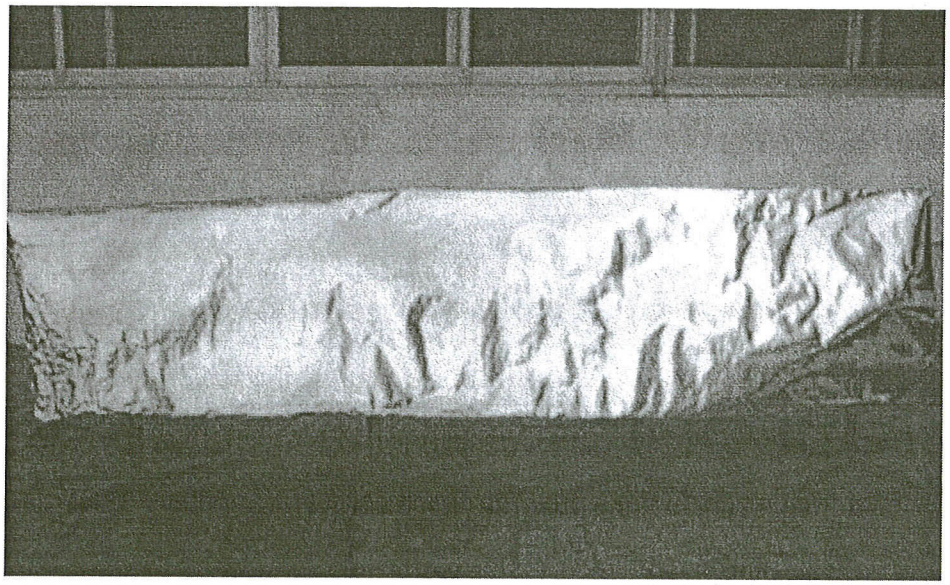
3.2.2 วิธีดำเนินการทดลองในรูปแบบการทา โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับวิธีการพ่น เพียงแต่เปลี่ยนเป็นการทาโดยใช้แปรงทาสีปราศจากเชื้อขนาด 1 นิ้ว

3.2.3 ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดลอง โดยก่อนทำการฉีดพ่นหรือทาในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ของทุกวัน นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบ 0.85% sterile saline ป้ายลงบนพื้นผิวของอิฐที่ทำการฉีดพ่นพื้นที่ 1 ตารางนิ้ว จากนั้นนำไปป้ายลงบนจานอาหาร urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แล้วทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารได้





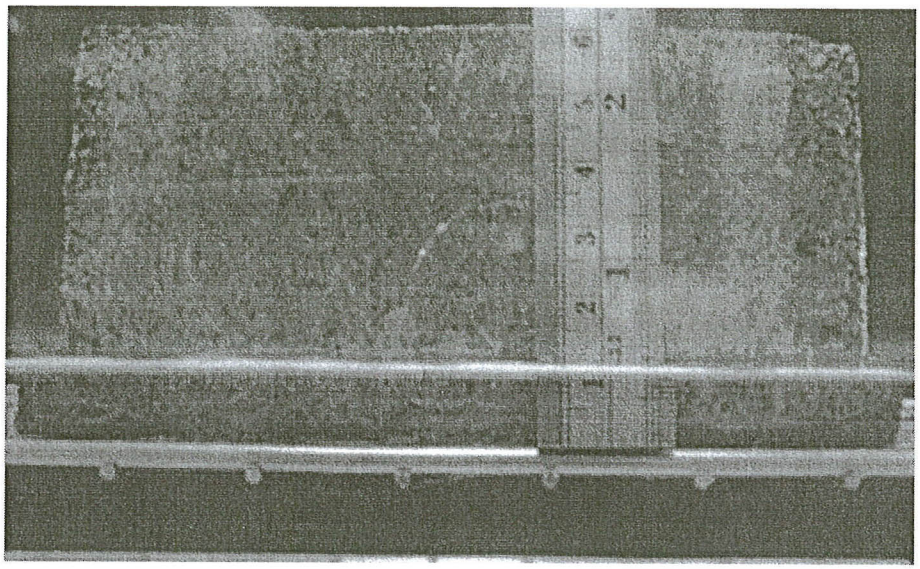
ภาพ 6 การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยถุงพลาสติก



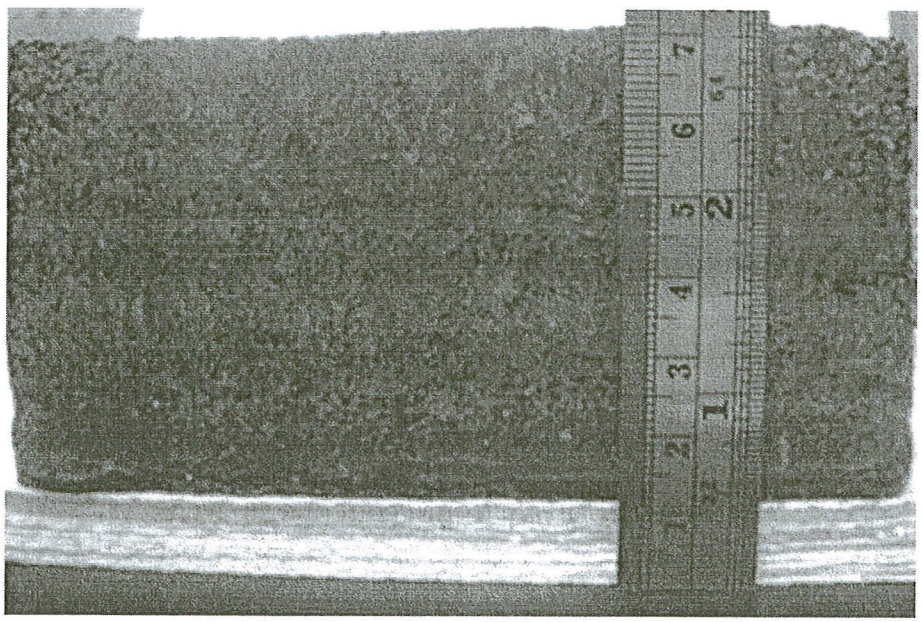
ภาพ 7 การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยฉนวนกันความร้อน

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของตัวแทนของหินประดับจากการทดสอบหาค่าดูดซึมน้ำ ทำโดยนำอิฐตัวอย่างมาอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง นำอิฐตัวอย่างที่ได้ ไปทำการแช่ในน้ำกลั่นโดยคว่ำด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสลงให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะ

เดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก (ภาพ 8 และ 9) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำต่อไป



ภาพ 8 อิฐตัวอย่างที่ถูกทำการแช่ในน้ำกลั่น



ภาพ 9 การซับน้ำส่วนเกินออก

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลผลการวิจัยทำการหาค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้การแปลผลข้อมูล