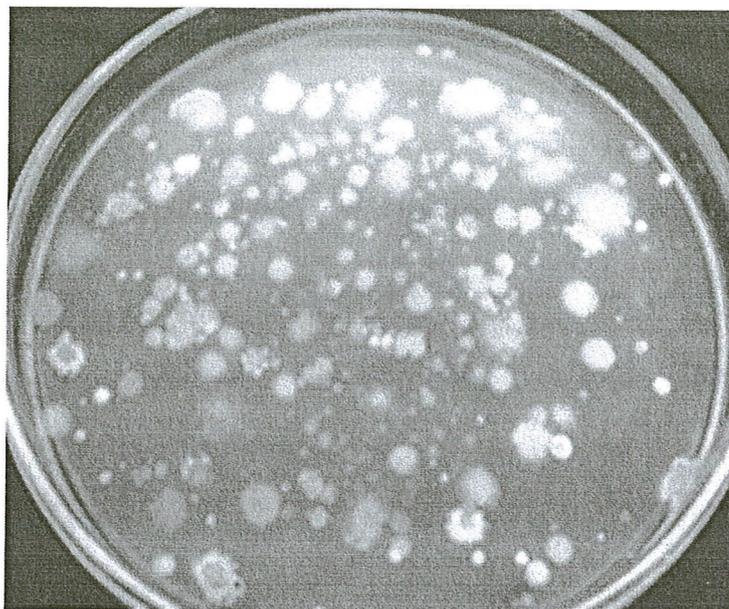


## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต

ผลการศึกษาหลังจากนำไปป้อนในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน โดยสังเกตผลการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอนเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน (ภาพ 10) จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอนเนต พบว่าในดินจากพื้นที่เกษตรกรรม, ดินภาคตะกอนแห่งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล และจากพื้นผิวสลูปเจดีย์ มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 33, 24 และ 39 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง 3) และเมื่อทำการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร urea agar โดยสังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้ม เป็นสีชมพู (ภาพ 11) พบจำนวนแบคทีเรีย 9, 4 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง 4) โดยมีจำนวนแบคทีเรียที่ให้ค่า Urease activity มากกว่า 0.15 unit/ml เท่ากับ 3, 2 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง 4) จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสในแบคทีเรีย ไอโซเลท G2, G9, G27, P30, S12, S14 พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ ให้ผลการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสดีที่สุดในสภาวะที่ระดับ pH 7 ความเข้มข้นของยูเรียที่ระดับ 50 ถึง 100 mM (ตาราง 6) และความเข้มข้นของ CaCl<sub>2</sub> ที่ระดับ 30 mM (ตาราง 7) หลังจากบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทั้งนี้แบคทีเรียไอโซเลท G27 มีการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ซึ่งให้น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนเนตสูงที่สุด 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 12 และ 13) และมีอัตราการเกิดตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียเบื้องต้น ไอโซเลท G27 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนกระจายตัวเป็นเชลล์เดี่ยวๆ สร้างเอนโดสปอร์รูปร่างวงรีรูปไข่อยู่ปลายเชลล์ด้านใดด้านหนึ่ง (ภาพ 14) สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างแท้จริง catalase test ให้ผลบวก oxidase test ให้ผลบวก Indole test ให้ผลลบ และ Voges-Proskauer (VP) test ให้ผลลบ หลังจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA (Full sequence: ~ 1,400 bp) ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย G27 คือเชื้อ *Sporosarcina koreensis* โดยในงานศึกษาวิจัยนี้ให้ชื่อว่า *Sporosarcina koreensis* G27 (ตาราง 8)



ภาพ 10 แสดงการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> agar



ภาพ 11 การทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูริเอส บนอาหาร urea agar

ตาราง 3 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอนบนอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> agar

แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอน
ดินพื้นที่เกษตรกรรม	33
ดินภาคตะกอนแห่งของระบบบำบัดน้ำเสีย	24
พื้นผิวสุญเจดีย์	39

ตาราง 4 จำนวนเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส และ Urease activity

แหล่งเก็บตัวอย่าง	แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส	Urease activity มากกว่า 0.15 unit/ml
ดินพื้นที่เกษตรกรรม	G2, G3, G5, G8, G9, G10, G23, G24, G27	G2, G9, G27
ดินภาคตะกอนแห่งของระบบบำบัดน้ำเสีย	S11, S12, S13, S14	S12, S14
พื้นผิวสุญเจดีย์	P17, P18, P29, P30, P31, P37	P30

ตาราง 5 ผลของระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสของแบคทีเรีย (n = 3)

ระดับ pH	Urease activity (unit/ml)					
	G2	G9	G27	S12	S14	P30
7	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01
8	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.03
9	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00

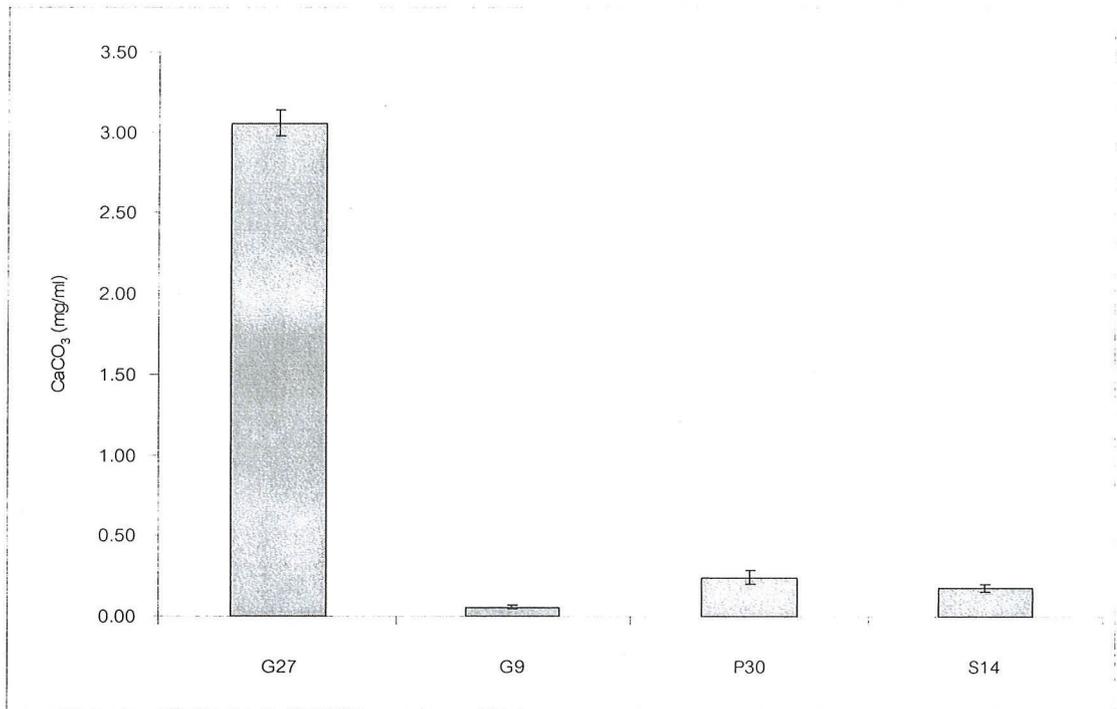
ตาราง 6 ผลของความเข้มข้นของยูเรียต่อการทำงานของเอนไซม์ยูริเอสของแบคทีเรีย  
ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth pH7 (n = 3)

ความเข้มข้นของ ยูเรีย (mM)	Urease activity (unit/ml)			
	G9	G27	P30	S14
25	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.03
50	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.22 ± 0.01
100	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.01
200	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.00
300	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.01
400	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.01

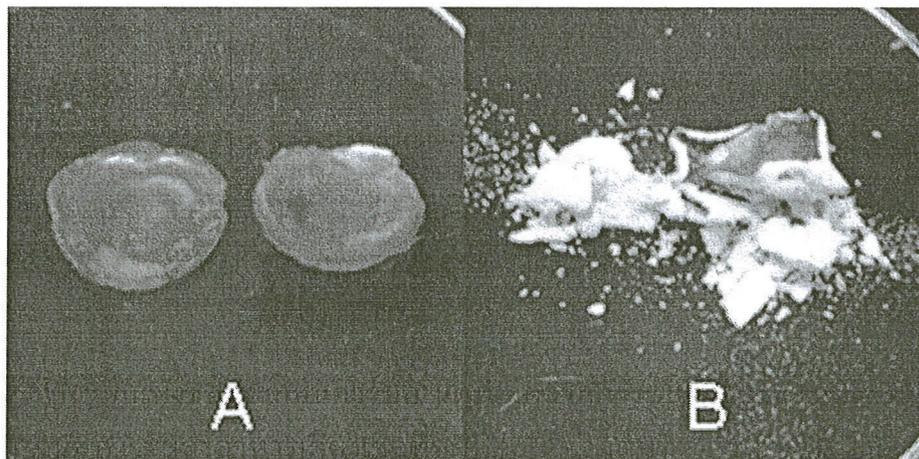
ตาราง 7 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์  
ยูริเอสของแบคทีเรีย ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth pH7 และ  
ยูเรียความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (n = 3)

ความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์ (mM)	Urease activity (unit/ml)			
	G9	G27	P30	S14
15	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01
30	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02
60	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01



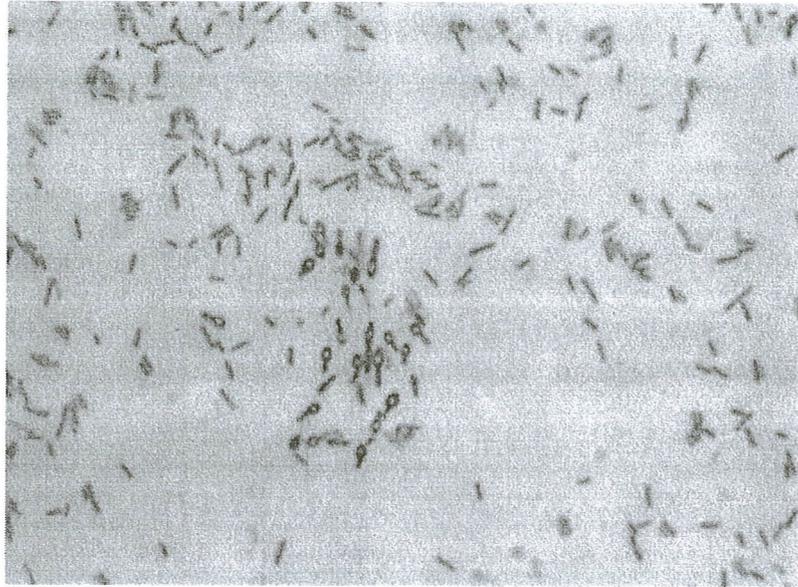


ภาพ 12 น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตที่เกิดจากการชักนำของแบคทีเรียในสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้นที่ 7 ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์ และ CaCl<sub>2</sub> 30 มิลลิโมลาร์



ภาพ 13 ปริมาณตะกอนคาร์บอเนตชีวภาพของแบคทีเรียไอโซเลท G27

หมายเหตุ: A คือชุดควบคุมที่ไม่มี CaCl<sub>2</sub> เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร  
 B คือชุดทดลองที่มี CaCl<sub>2</sub> เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร



ภาพ 14 การติดสีแกรมและลักษณะเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลท G27

ตาราง 8 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 16S rDNA ของไอโซเลท G27 กับแบคทีเรียชนิดอื่น

แบคทีเรีย	1	2	3
1 <i>Sporosarcina koreensis</i>	100.0	98.2	99.3
2 <i>Sporosarcina saromensis</i>	98.2	100.0	98.5
3 ไอโซเลท G27	99.3	98.5	100.0

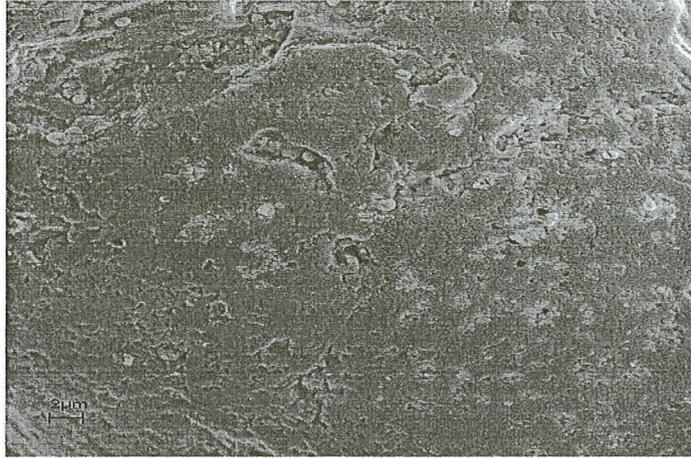
หมายเหตุ: พบว่าไอโซเลท G27 มี 16S rDNA ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* ถึง 99.3 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรีย  
ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27

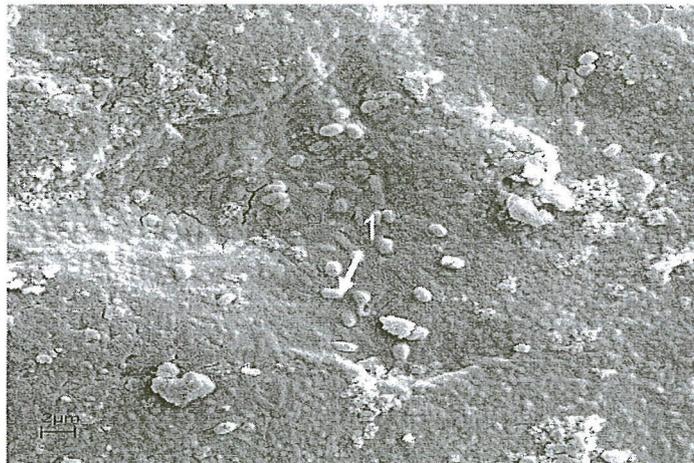
จากการศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย ด้วยวิธีคอลัมน์  
ทราย พบว่าชุดทดลองที่มีอาหารเหลว urea-CaCl<sub>2</sub> broth มีอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียม  
คาร์บอเนตสูงสุดเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน (ตาราง 9) และเมื่อทำการศึกษา  
ทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในส่วนของชุดทดลองที่มีเชื้อ  
*S. koreensis* G27 ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth มีเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27  
เจริญปกคลุมบริเวณพื้นผิวเม็ดทรายเป็นปริมาณมากซึ่งถูกเคลือบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (ภาพ  
16ข) และพบได้ปริมาณน้อยในชุดทดลองที่มีเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ซึ่งถูกเลี้ยงด้วย  
อาหาร urea broth (ภาพ 16ก) ในส่วนของชุดควบคุมซึ่งใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth โดย  
ปราศจากเชื้อ *S. koreensis* G27 พบว่ามีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญและสามารถชักนำให้เกิดตะกอน  
แคลเซียมคาร์บอเนตได้แต่มีปริมาณน้อยกว่าในชุดทดลองที่มีเชื้อ *S. koreensis* G27 และถูกเลี้ยง  
ด้วยอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth (ภาพ 15ข) เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวเม็ดทรายก่อนการนำไป  
ทดลอง (ภาพ 15ก)

ตาราง 9 อัตราการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทรายโดยแบคทีเรีย  
*S. koreensis* G27 (n = 5)

สภาวะการทดลอง	อัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (มิลลิกรัม/กรัมของทราย/วัน)
ชุดควบคุม Urea-CaCl <sub>2</sub> broth	0.03±0.01
ชุดทดลอง <i>S. koreensis</i> + Urea-CaCl <sub>2</sub> broth	0.08±0.01
ชุดทดลอง <i>S. koreensis</i> + Urea broth	0.01±0.01



15ก



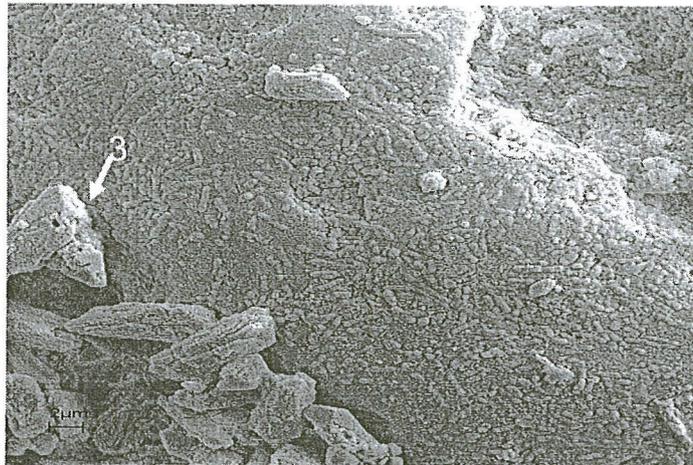
15ข

ภาพ 15 ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายก่อนการทดลองและในชุดควบคุม

หมายเหตุ: ภายได้กำลังขยาย 1600 เท่า (15ก) พื้นผิวเม็ดทรายที่ปราศจากเชื้อก่อนการนำไปทดลอง (15ข) ชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ซึ่งใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth แต่ยังสามารถพบแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญบนเบ้านี้ได้ (ลูกศร1)



16ก

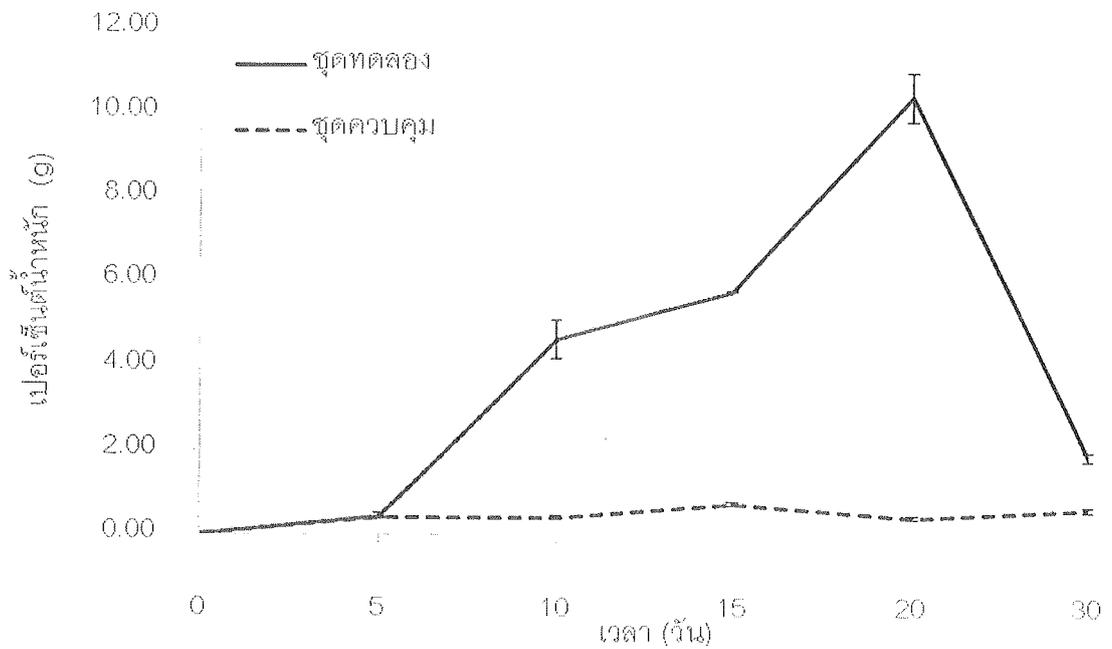


16ข

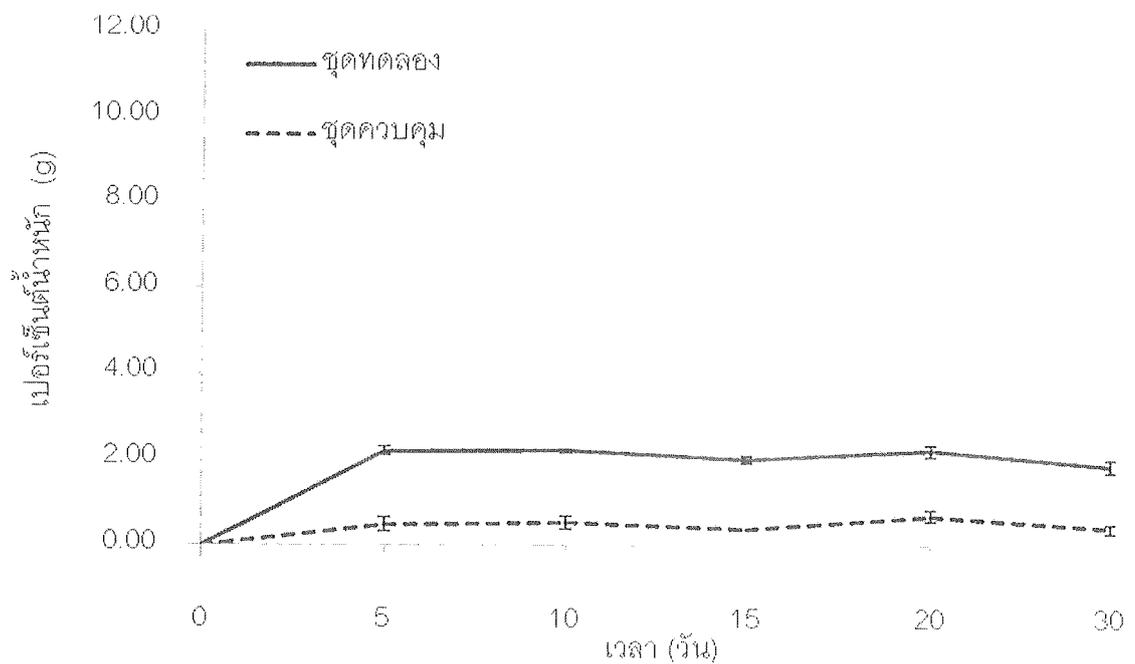
### ภาพ 16 ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายในชุดทดลอง

หมายเหตุ: ภายใต้อำนาจขยาย 1600 เท่า (16ก) ชุดทดลองซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เลี้ยงในอาหาร urea broth และพบแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ในปริมาณน้อย (ลูกศร2) (16ข) ชุดทดลองซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เลี้ยงในอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth และพบบริเวณการเชื่อมต่อกันระหว่างอนุภาคเม็ดทรายด้วยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่ชักนำโดยแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 (ลูกศร3)

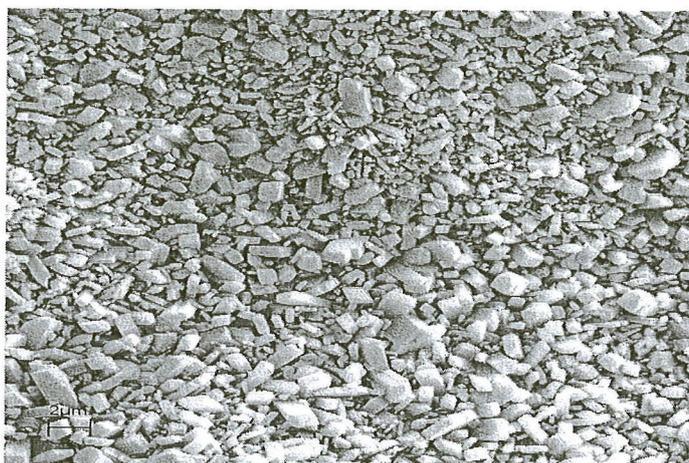
จากผลการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐ โดยการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำหนักของซันอิฐตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นพบว่าซันอิฐทั้งสองขนาดมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยซันอิฐตัวอย่างขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นจะมีค่าต่ำลงมากเมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ดังภาพ 17 ส่วนซันอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในอัตราคงที่และมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน (ภาพ 18) เมื่อทำการศึกษาทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในชุดทดลองมีเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเคลือบด้วยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตเจริญอยู่ และยังพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดทับถมกันเป็นชั้น หรือมีลักษณะเป็นก้อนทับถมกันค่อนข้างหลวมบริเวณพื้นผิวของตัวอย่างซันอิฐขนาดเล็ก (ภาพ 20ก) และพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดใหม่ทับถมกันหนาแน่นบริเวณพื้นผิวของตัวอย่างซันอิฐขนาดใหญ่และปรากฏรอยแตกของตะกอนที่เกิดใหม่ทับถมกันบนพื้นผิวตัวอย่างอิฐ (ภาพ 20ข) ในชุดควบคุมพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดใหม่ทับถมอยู่เป็นปริมาณน้อยและยังสามารถเห็นองค์ประกอบของพื้นผิวอิฐได้ (ภาพ 19ข) เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวซันอิฐตัวอย่างก่อนการนำไปทดลอง (ภาพ 19ก) จากผลการศึกษานี้บอกถึงศักยภาพของจุลินทรีย์ในการนำไปใช้อนุรักษ์พื้นผิววัสดุที่มีรูพรุนได้ต่อไป



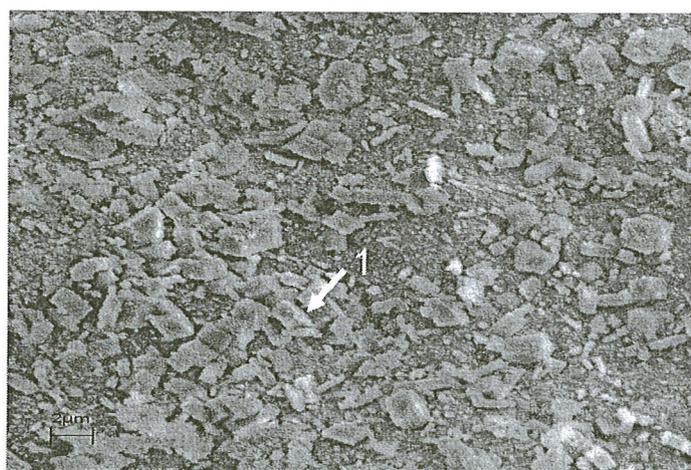
ภาพ 17 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการดกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุตัวอย่างขนาดเล็ก (n=5)



ภาพ 18 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการดกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุตัวอย่างขนาดใหญ่ (n=5)



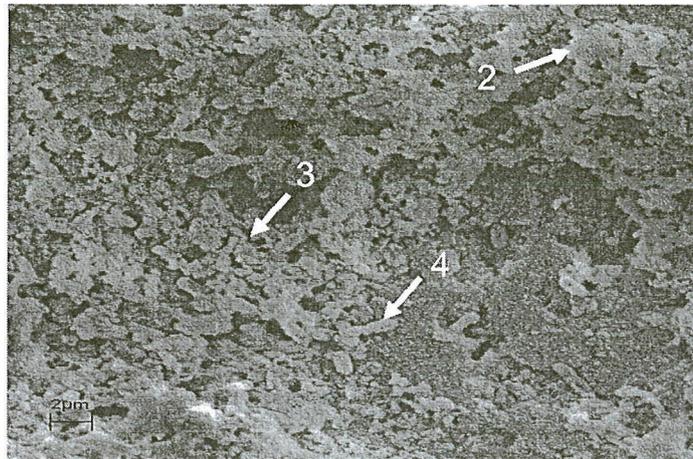
19ก



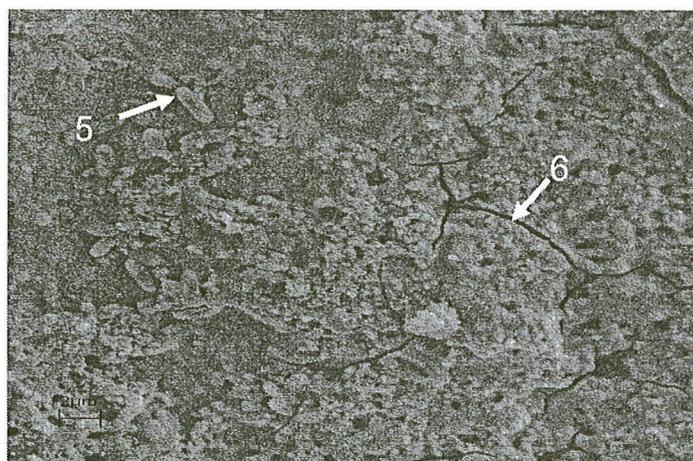
19ข

ภาพ 19 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างก่อนนำไปทดลองและในชุดควบคุม

หมายเหตุ: ภายใต้กำลังขยาย 2000 เท่า (19ก) พื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อก่อนนำไปทดลอง (19ข) ชุดควบคุมไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 และพบองค์ประกอบของพื้นผิวอิฐเดิมปรากฏให้เห็น (ลูกศร1)



20ก

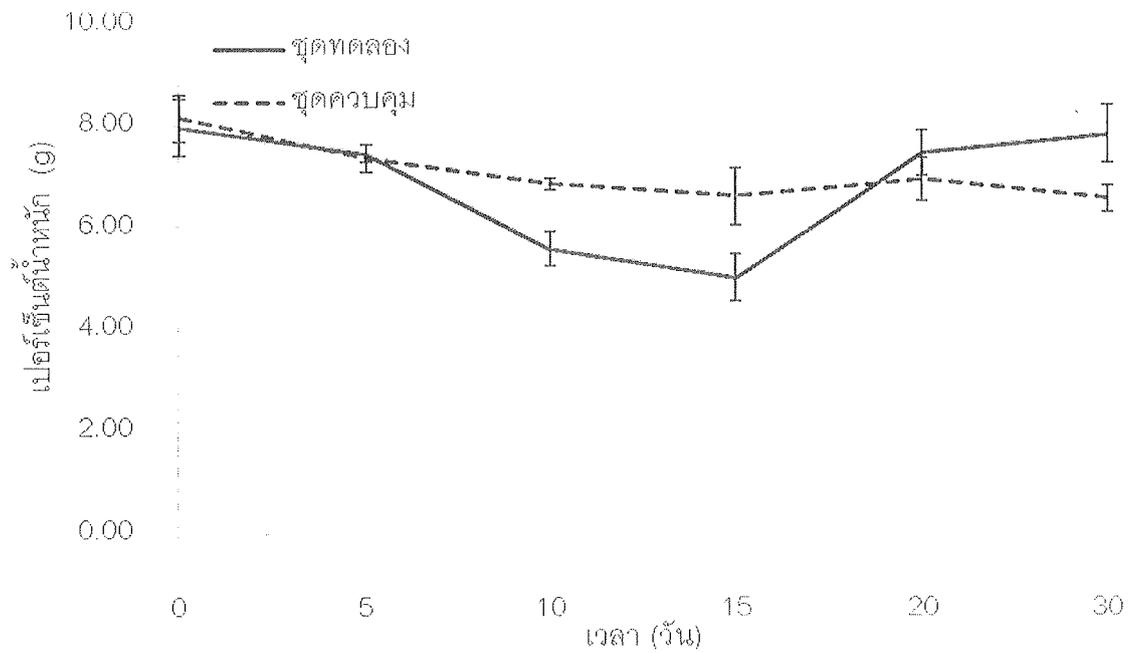


20ข

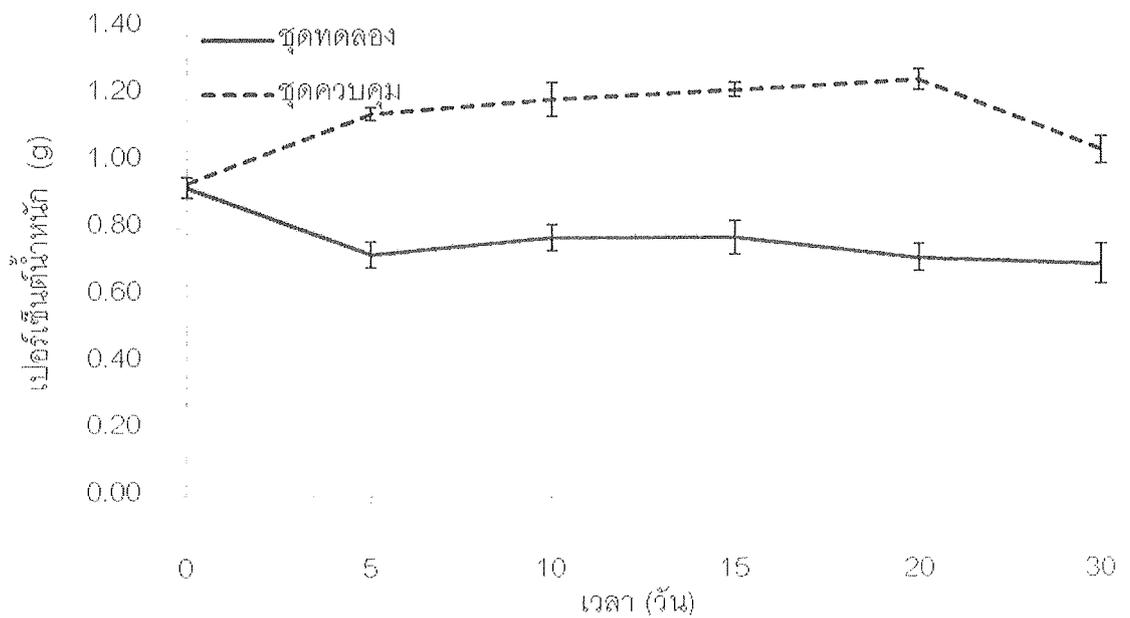
ภาพ 20 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างในชุดทดลอง

หมายเหตุ: ภายใต้กำลังขยาย 2000 เท่า(20ก) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็ก พบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดทับถมกัน (ลูกศร2) ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนทับถมกัน(ลูกศร3) และตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เคลือบผิวเซลล์แบคทีเรีย (ลูกศร4และ5) (20ข) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่พบรอยแตกของตะกอนที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งทับถมกันบนพื้นผิว (ลูกศร6)

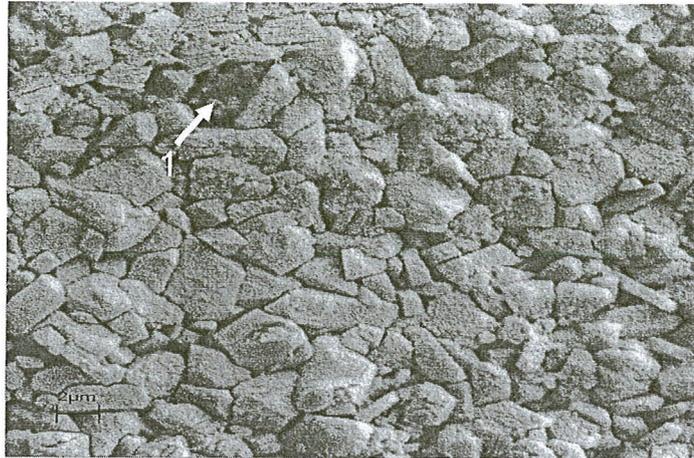
จากผลการทดสอบความแข็งแรง โดยการวัดน้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่าง หลังจากผ่านการ sonication โดยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปมีค่าแปรผกผันลักษณะกับความแข็งแรง พบว่าชุดทดลองชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยที่สุดในช่วงของการบ่มเป็นเวลา 10 และ 15 วัน (ภาพ 21) ส่วนของอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยกว่าชุดควบคุมในทุกช่วงระยะเวลาการบ่ม คือ 5, 10, 15, 20 และ 30 วัน ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยที่สุดในช่วงของการบ่มเป็นเวลา 30 วัน (ภาพ 22) เมื่อทำการศึกษาทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลังจากผ่านการ sonication พบว่าชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กปรากฏแบคทีเรียที่ถูกละเลาะด้วย ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต ตะกอนใหม่ที่มีลักษณะเป็นเกล็ดและเป็นก้อน มีปริมาณน้อย และปรากฏลักษณะพื้นผิวเดิมของชิ้นอิฐตัวอย่างให้เห็น (ภาพ 23ข) และปรากฏลักษณะพื้นผิวเดิมของชิ้นอิฐตัวอย่างชัดเจนมากขึ้นในชุดควบคุม (ภาพ 23ก) สำหรับชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ พบว่ามีเกาะตัวเชื่อมกันและทับถมกันของตะกอนที่เคลือบอยู่บนเซลล์แบคทีเรีย มีปลอกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตลักษณะคล้ายรังไหมอยู่ในสภาพที่แตกเสียหาย และปรากฏรอยแยกของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่ทับถมกัน (ภาพ 24ก) ในชุดควบคุมพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตมีลักษณะเป็นก้อนกลมกระจายตัวอยู่บนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง (ภาพ 24ข)



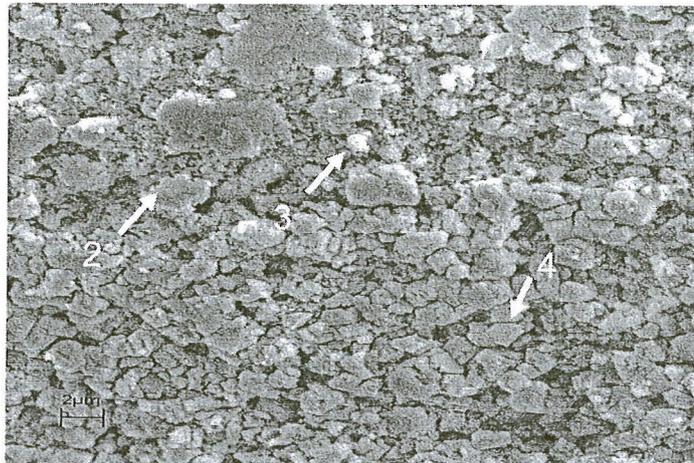
ภาพ 21 น้ำหนักที่หายไปของชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กหลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)



ภาพ 22 น้ำหนักที่หายไปของชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่หลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)



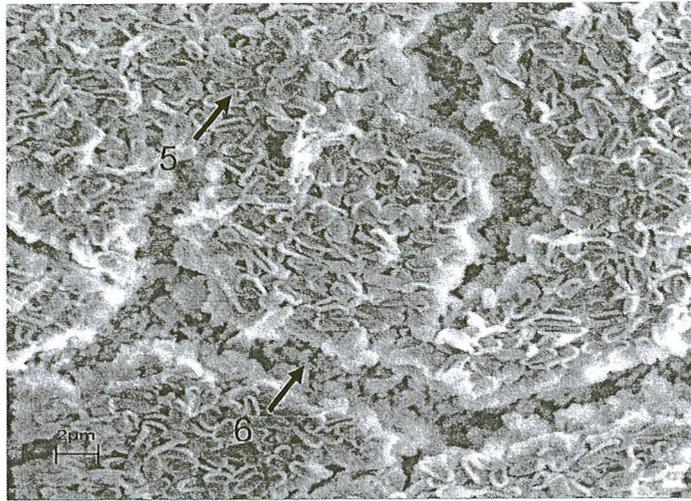
23ก



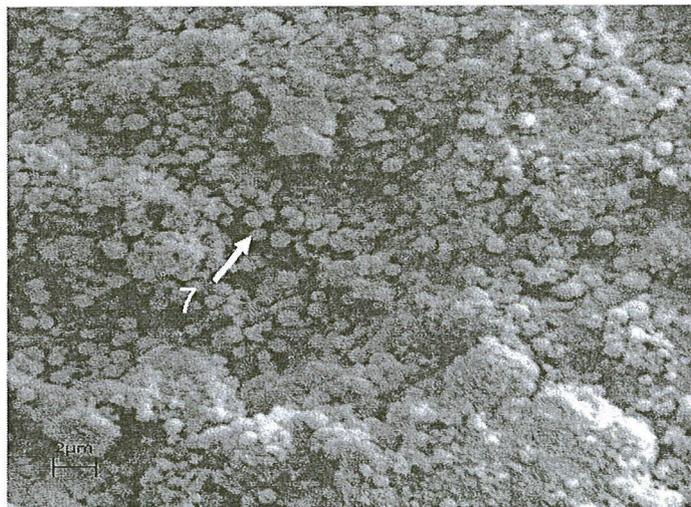
23ข

ภาพ 23 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กจากการทดสอบความแข็งแรง

หมายเหตุ: ภายใต้กำลังขยาย 2000 เท่า (23ก) ชุดควบคุมชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กซึ่งปรากฏลักษณะพื้นผิวเดิมของชั้นอิฐตัวอย่างให้เห็นอย่างชัดเจน และมีรอยหลุมที่เกิดจากการหลุดของเม็ดดินที่เป็นองค์ประกอบที่ผิวอิฐ (ลูกศร1) (23ข) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็ก ตะกอนลักษณะเป็นเกล็ดแคลเซียมคาร์บอเนต (ลูกศร2) ตะกอนลักษณะก้อนแคลเซียมคาร์บอเนต (ลูกศร3) ลักษณะพื้นผิวเดิมของชั้นอิฐตัวอย่าง (ลูกศร4)



24ก



24ข

ภาพ 24 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่จากการทดสอบความแข็งแรง

หมายเหตุ: ภายใต้กำลังขยาย 2000 เท่า (24ก) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตเคลือบบนผิวเซลล์ซึ่งแตกและเซลล์หลุดออกไปแล้ว (ลูกศร5) รอยแยกของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตใหม่ซึ่งมีขนาดใหญ่ (ลูกศร6) (24ข) ชุดควบคุมชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะก้อนกลม (ลูกศร7)

การศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27 ในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตกับหิน ปรระดับ

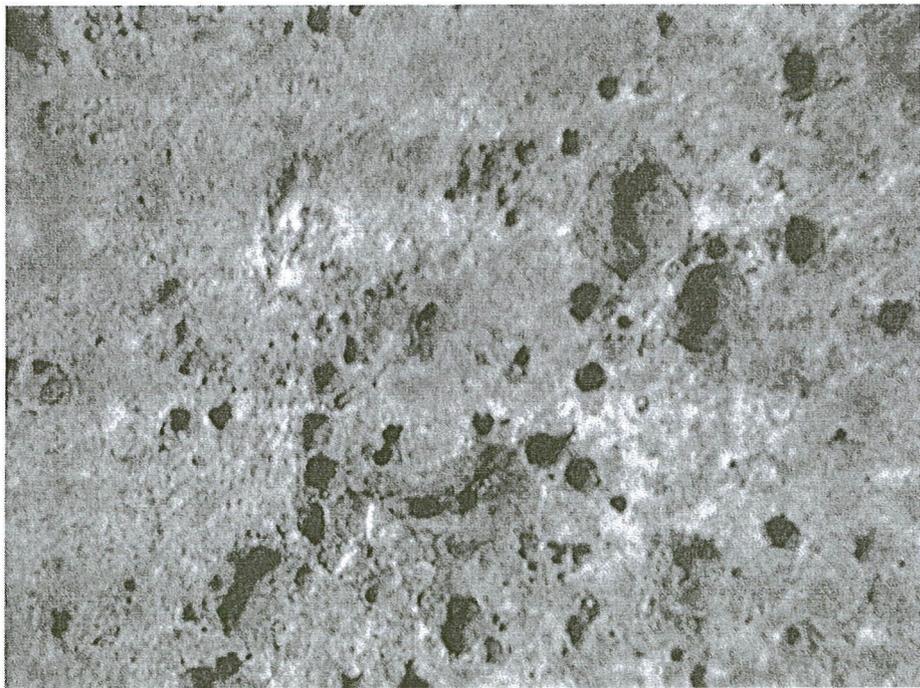
ผลการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตกับหินระดับ (อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร) ในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอน สีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวนั้นติดอยู่ตามผนังรูปทรงหรือตามผนังหลุมบางมาก (ภาพ 26 และ ภาพ 27) และชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร พบว่าพื้นผิวโดยรวมมี คราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่ามีตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูปทรงหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกันแต่พบปริมาณมากกว่าชุด ควบคุมข้างต้น (ภาพ 28 และ 29) ในส่วนของชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พบว่าพื้นผิวโดยรวมมี คราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าตะกอนสีขาวนั้นจับตัวกันหนาติดอยู่ตามผนังรูปทรงหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกัน และพบ ในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมทั้งสอง (ภาพ 30 และ ภาพ 31) เมื่อเทียบกับพื้นผิวโดยรวมและ จากกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอของชิ้นอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสก่อนนำมาทำการ ทดลอง (ภาพ 25) จากการตรวจสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียโดยวิธี Drop plate เพื่อหาค่า CFU ต่อ มิลลิลิตรของหัวเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศา เซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเชื้อ 2.0x10<sup>7</sup> CFU ต่อ มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้ถูกพลาสติกและแผ่น ฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่าง ในตลอดการทดลองนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 77.4 เปอร์เซ็นต์ และ 29.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ ยูรีเอสที่พื้นผิวอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส ในชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร และชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้น พบว่ามี แบคทีเรียที่มีชีวิตและสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยสังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar เปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพูหลังจากบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (ตาราง 10) และเมื่อทำ การย้อมสีแกรมแบคทีเรียซึ่งพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar ที่มาจากชุดทดลอง พบว่ามี

แบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อนและการติดสีแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างแท้จริง และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ ซึ่งมีลักษณะสัณฐานของเซลล์คล้ายกับแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 (ภาพ 33) เมื่อเทียบกับหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ก่อนนำมาทดลองซึ่งบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพ 32) และยังสามารถพบแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นได้อีก

จากการศึกษาประสิทธิภาพของตัวแทนของหินประดับโดยการทดสอบหาค่าการดูดซึมน้ำของอิฐตัวอย่าง พบว่าเมื่อค่าดูดซึมน้ำเพิ่มขึ้น ทำให้พื้นผิวอิฐตัวอย่างมีโอกาสในการผุพังเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพการป้องกันน้ำในการเข้าถึงแกนกลางของอิฐตัวอย่างลดลง โดยทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นหลังจากทำการแช่น้ำ ทั้งในรูปแบบการจืดพ่นและทา พบว่ามีการดูดซึมน้ำเกิดขึ้นที่พื้นผิวอิฐตัวอย่างที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส โดยทั้งนี้ในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการจืดพ่นหรือทานั้น พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสมีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำน้อยที่สุดคือ 1.51 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และจากการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใสพบว่าสารเคลือบใสมีประสิทธิภาพในการป้องกันน้ำซึมเข้าสู่เนื้ออิฐตัวอย่างเป็นอย่างดีโดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะของการทดลองเดียวกัน (ตาราง 11)



25ก



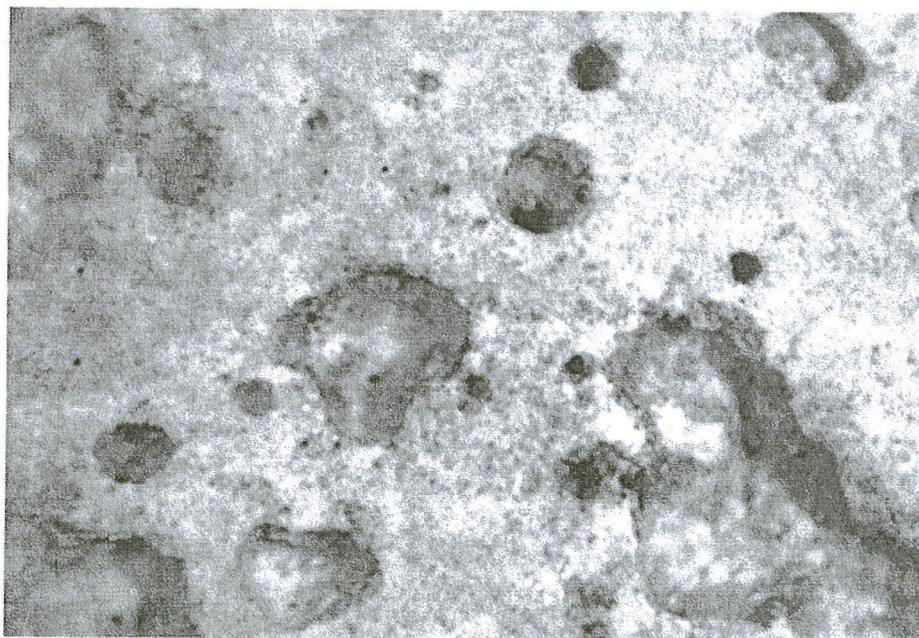
25ข

ภาพ 25 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ก่อนนำมาทดลอง

หมายเหตุ: (25ก) พื้นผิวโดยรวม (25ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



26ก



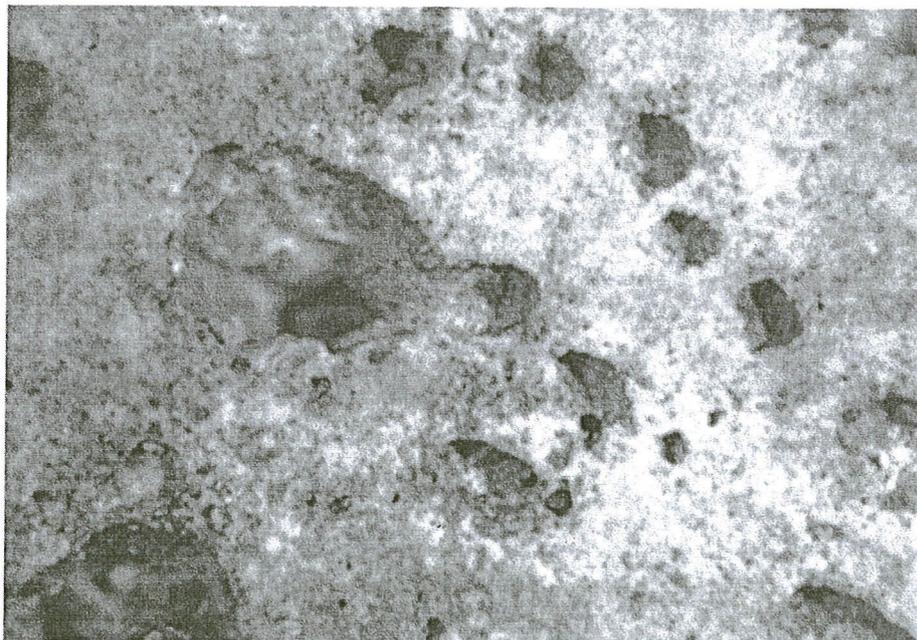
26ข

ภาพ 26 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุมที่ฉีดพ่น  
โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ: (26ก) พื้นผิวโดยรวม (26ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



27ก



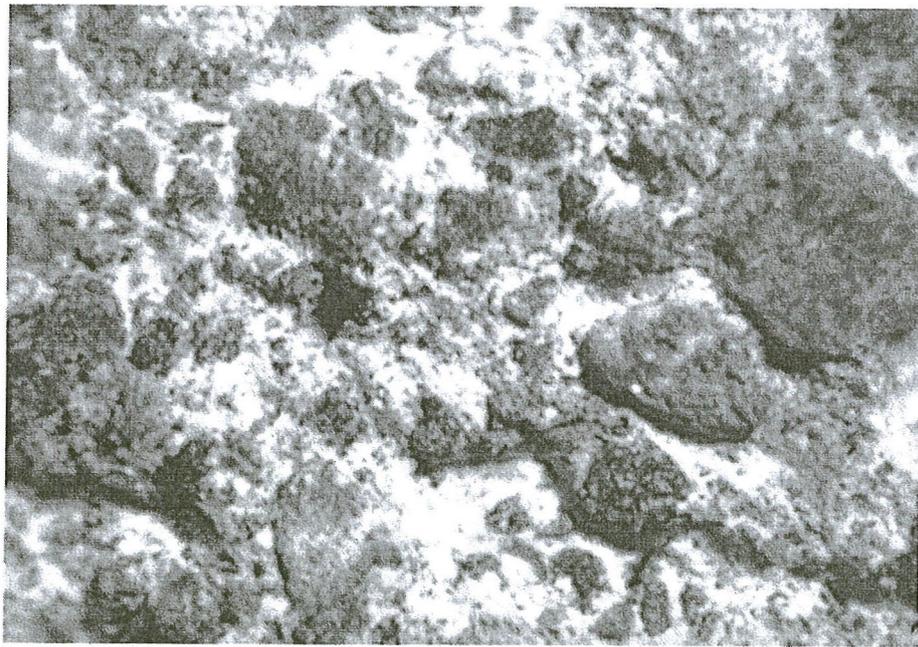
27ข

ภาพ 27 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุมที่ทำโดย  
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ: (27ก) พื้นผิวโดยรวม (27ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



28ก



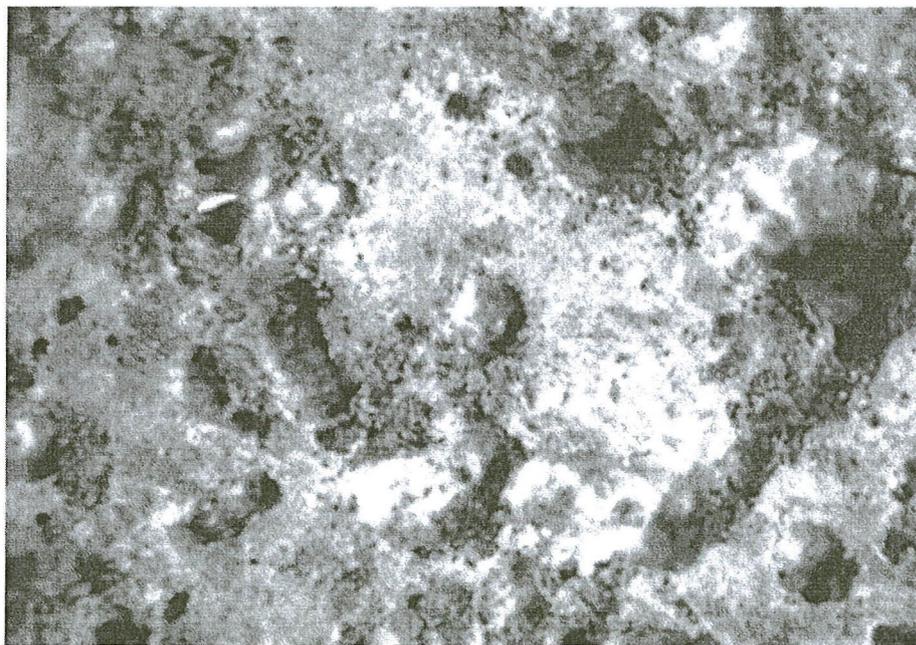
28ข

ภาพ 28 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุมที่ฉีดพ่น  
โดย urea-CaCl<sub>2</sub> broth

หมายเหตุ: (28ก) พื้นผิวโดยรวม (28ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



29ก



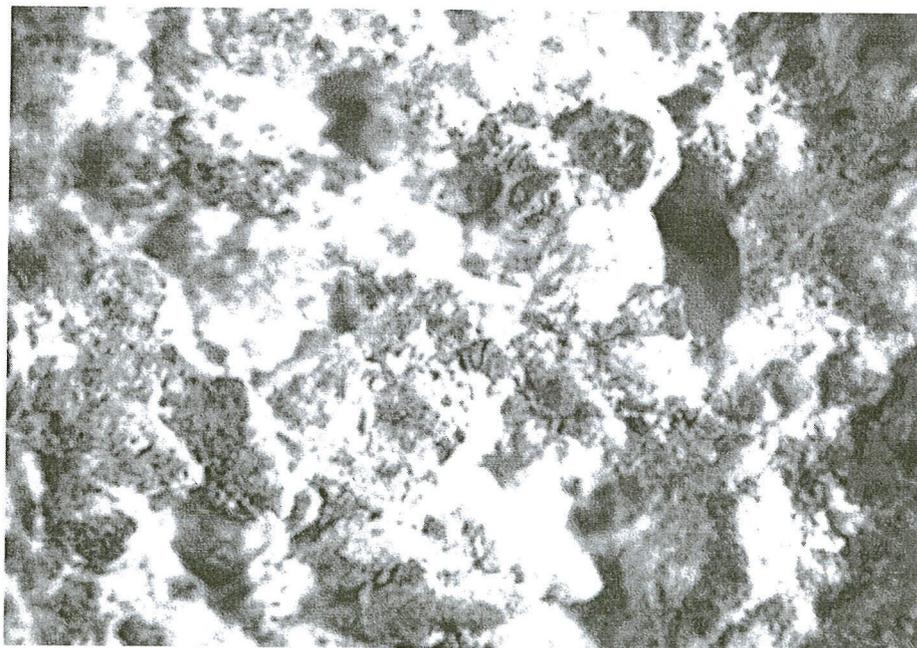
29ข

ภาพ 29 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุมที่ทำโดย urea-CaCl<sub>2</sub> broth

หมายเหตุ: (29ก) พื้นผิวโดยรวม (29ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



30ก



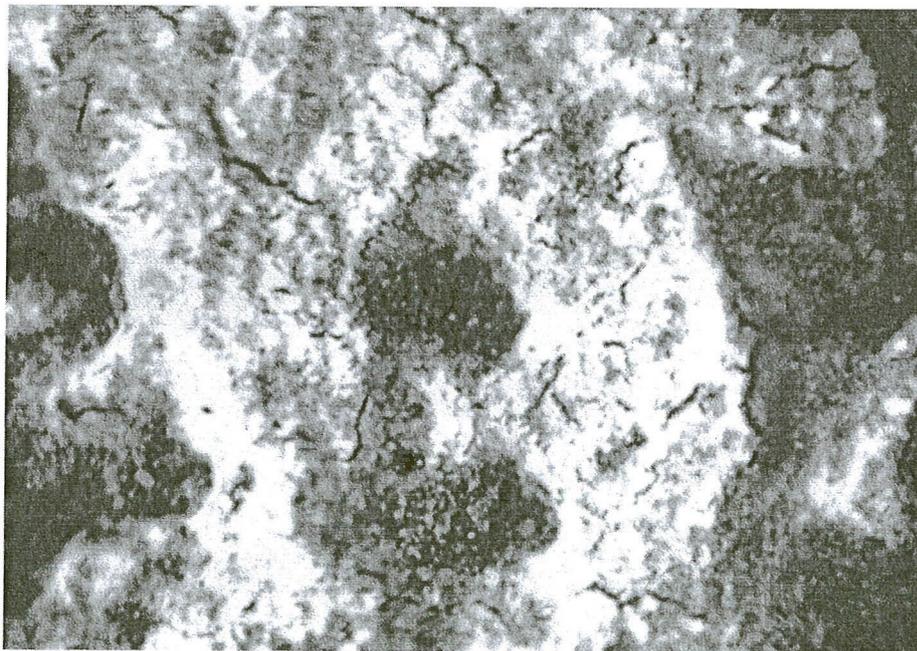
30ข

ภาพ 30 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดทดลองที่ฉีดพ่น  
โดยหัวเชื้อแบคทีเรียผสมกับ urea-CaCl<sub>2</sub> broth

หมายเหตุ: (30ก) พื้นผิวโดยรวม (30ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า



31ก



31ข

ภาพ 31 ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดทดลองที่ทำโดย  
หัวเชื้อแบคทีเรียผสมกับ urea-CaCl<sub>2</sub> broth

หมายเหตุ: (31ก) พื้นผิวโดยรวม (31ข) พื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ  
กำลังขยาย 10 เท่า

ตาราง 10 การมีชีวิตของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูเรียเอสบนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง

ชุดการทดลอง	การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar จากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู
SW	-
SU	+
SUG	+
PW	-
PU	+
PUG	+

หมายเหตุ: SW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีด  
พ่น

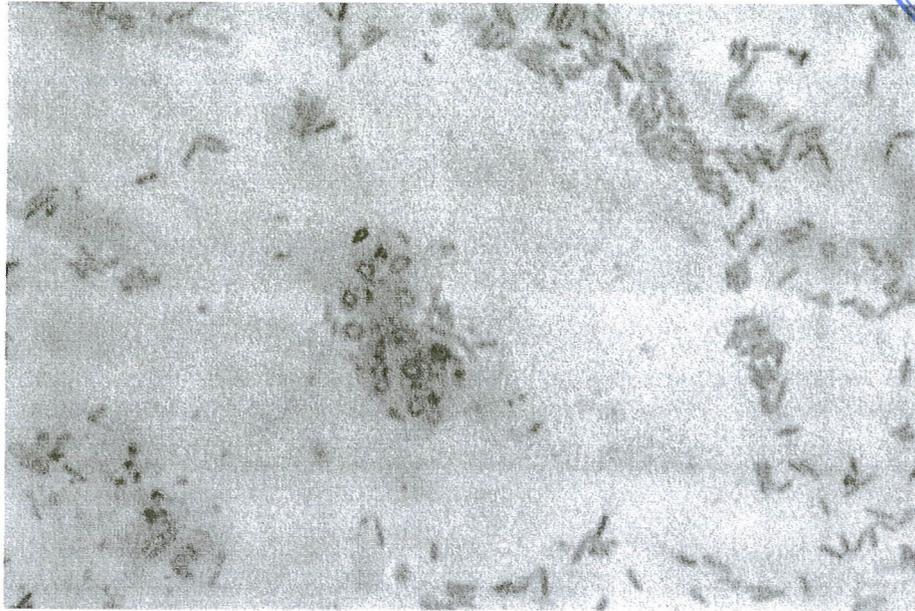
SU คือชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวใน  
การฉีดพ่น

SUG คือชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร  
urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตรเป็นของเหลวในการฉีดพ่น

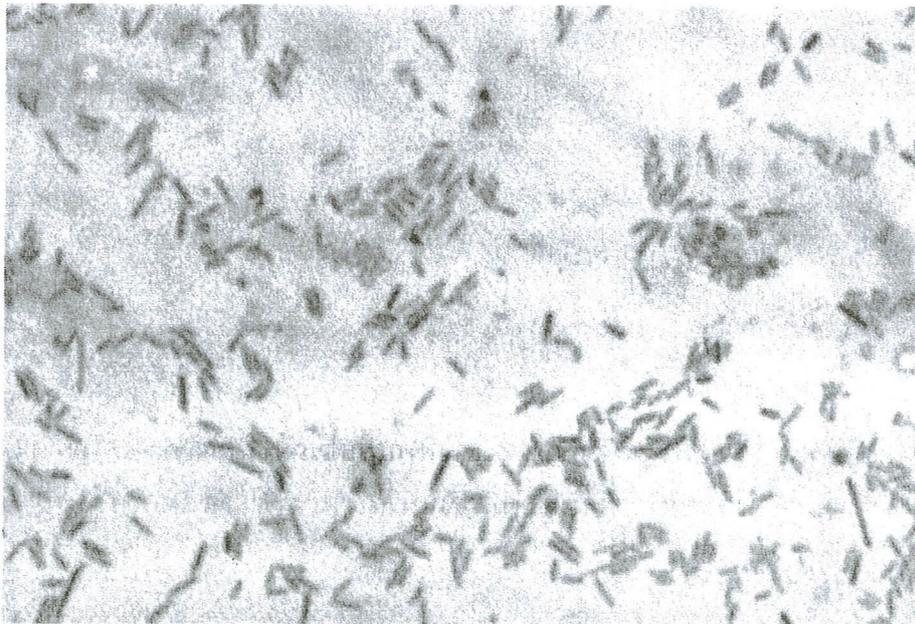
PW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการ  
ทา

PU คือชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการ  
ทา

PUG คือชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร  
urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการทา



ภาพ 32 การติดสีแกรมของหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 อายุ 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ทดลอง ซึ่งสามารถเห็นเอ็นโดสปอร์ที่หลุดออกมาจากเซลล์



ภาพ 33 การติดสีแกรมของแบคทีเรียบน urea agar จากชุดทดลอง

หมายเหตุ: ติดสีแกรมบวก รูปร่างค่อนข้างสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis* G27

ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิววัสดุตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส (n = 12)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำ
ด้านทาสารเคลือบใส	0.00 ± 0.00
SW	3.11 ± 0.67
SU	2.08 ± 0.59
SUG	1.51 ± 0.68 *
PW	3.18 ± 0.50
PU	2.13 ± 0.58
PUG	1.68 ± 0.55 *

หมายเหตุ: SW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่น

SU คือชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่น

SUG คือชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่น

PW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการทา

PU คือชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการทา

PUG คือชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการทา

ns = มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการฉีดพ่นและการทา

\* มีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม