ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. การเตรียมสีย้อมแกรม (Gram – strain)

Crystal violet

เตรียมสารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

เตรียมสารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ และถ้าสีเข้มข้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

Safranin O counterstrain (Stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	80.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

Gram,s iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodine (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	กรัม

ละลาย Iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆก่อนแล้วเติมน้ำให้ครบ แล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

Alcohol – acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95%	250.0	มิลลิลิตร
Acetone	250.0	มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐาน NH_4Cl (50-250 ไมโครโมลาร์)

เตรียม Stock solution 100 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง NH_4Cl ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง 5.3490 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นทำการทำการปิเปตสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ NH_4Cl ปริมาตร 10

มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 1 มิลลิโมลาร์ NH_4Cl เพื่อนำไปเตรียมสารละลาย NH_4Cl ความเข้มข้นต่างๆ (ตาราง 12)

ตาราง 12 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 50-250 ไมโครโมลาร์ NH_4Cl

ความเข้มข้นของสารละลาย NH_4Cl (ไมโครโมลาร์)	ปริมาตร 1 มิลลิโมลาร์ NH_4Cl (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	100
50	5	95
100	10	90
150	15	85
200	20	80
250	25	75

นำสารละลายที่ได้ (NH4Cl 0-250 ไมโครโมลาร์) มาเติมน้ำยา Nessler's reagent ในอัตราส่วนสารละลายต่อน้ำยา Nessler's reagent 25:1 แล้วนำไปวัดค่าดูกลืนแสงด้วยเครื่องเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป

3. การเตรียมสารละลาย Nessler's Reagent

ทำการละลาย KI 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่นชนิดกลั่นสองครั้ง ปริมาตร 35 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอิ่มตัวของ HgCl จนกระทั่งสารละลายเกิดตะกอนสีส้มตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ หลังจากนั้นเติมสารละลาย 9 นอร์มอล NaOH ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (ละลาย NaOH 300 กรัม ด้วยน้ำกลั่นชนิดกลั่นสองครั้งแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร) ลงในสารละลายข้างต้น แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 วันก่อนนำใช้

4. การเตรียมสารละลาย CaCl2 เข้มข้น 1000 มิลลิโมลาร์

ทำการละลาย $CaCl_2$ 147.02 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร

5. การเตรียมสารละลาย ยูเรีย เข้มข้น 1000 มิลลิโมลาร์

ทำการละลาย ยูเรีย 60.06 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร

6. การเตรียมสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 9.0

เตรียมโดยละลาย Tris 12 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) จากนั้นทำการปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 9.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ HCl

7. การเตรียมสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0

เตรียม KH_2PO_4 + Na_2HPO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

การเตรียมสารละลาย stock 1 โมลาร์ Na_2HPO_4 (100 มิลลิลิตร)

Na_2HPO_4	14.196	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

จากนั้นนำ 1 โมลาร์ Na_2HPO_4 มาเจือจางให้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4 โดยการแบ่ง 1 โมลาร์ Na_2HPO_4 มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4

การเตรียมสารละลาย stock 1 โมลาร์ KH_2PO_4 (250 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	34.02	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

จากนั้นนำ 1 โมลาร์ KH_2PO_4 มาเจือจางให้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4 โดยการแบ่ง 1 โมลาร์ KH_2PO_4 มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4

นำสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH โดยค่อยๆเติม100 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4 จนกว่า pH เท่ากับ 7.0 จะได้สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0

8. การเตรียมผงเมอร์เรกไซด์ อินดิเคเตอร์ ใช้ในปฏิบัติการ EDTA Titrimetric Method เตรียมโดยทำการชั่ง Murexide 0.1 กรัม และ NaCl 50 กรัม ลงในขวดแก้วสีชาและเขย่าให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท

9. การเทียบหาความเข้มข้น EDTA กับสารละลายมาตรฐาน $CaCO_3$

ชั่ง anhydrous $CaCO_3$ หนัก 1.00 กรัม ใส่ใน Beaker แล้วเติม 50% HCl อย่างช้าๆเพื่อละลาย $CaCO_3$ เมื่อละลายหมด เติมน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร จากนั้น

นำไปต้มประมาณ 5 นาทีเพื่อไล่ก๊าซ CO_2 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับให้มี pH ให้ได้ 7 ด้วย 1 นอร์มอล NaOH ทำการรินสารละลายที่ปรับ pH แล้วลงในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลาย $CaCO_3$ ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ หลังจากนั้นทำการดูดสารละลาย $CaCO_3$ (0.01 โมลาร์) 50 มิลลิลิตร ด้วยไปเปตวัดปริมาตรลงในขวดปริมาตรทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 1 นอร์มอล NaOH 1-2 มิลลิลิตร เติมผงเมอร์เรกไซด์ อินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลาย EDTA ที่เตรียมได้ทำการไตเตรทจากสีชมพู (สีเริ่มต้น) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง (จุดสิ้นสุด) การคำนวณ โดยการอ่านปริมาตร EDTA (หน่วยเป็นมิลลิลิตร) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ด้วยสูตร

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

N1 คือ ความเข้มข้นของสารละลาย $CaCO_3$ 0.01 โมลาร์

V1 คือ ปริมาตรของสารละลาย $CaCO_3$ 50 มิลลิลิตร

N2 คือ ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ที่ต้องการหา

V2 คือ ปริมาตรของสารละลาย EDTA ที่ใช้ในการไตเตรท

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Nutrient agar (Merck)

ส่วนประกอบ

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่สัดส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH 6.8±2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth (Merck)

ส่วนประกอบ

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่สัดส่วน 8 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร คนจนละลายหมด ปรับ pH 6.8±2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Urea-$CaCl_2$ agar (HIMEDIA)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
$NaHCO_3$	2.12	กรัม
NH_4Cl	10	กรัม
$CaCl_2 \cdot H_2O$	4.41	กรัม
สารละลาย Urea 50%	40	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	960	มิลลิลิตร

ชั่งส่วนประกอบแต่ละชนิดใส่ลงในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย ปรับ pH7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน

15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 50% ยูเรีย (w/v) ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. Urea – $CaCl_2$ broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 30 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย $CaCl_2 \cdot H_2O$ 1000 มิลลิโมลาร์	30	มิลลิลิตร
สารละลายยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	920	มิลลิลิตร

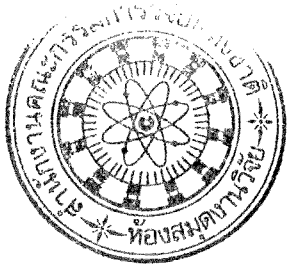
ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในน้ำกลั่น 920 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลายแล้วปรับ pH7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น จากนั้นเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2 \cdot H_2O$ และ 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตรตามลำดับ

5. Urea broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	950	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH7.0 ปริมาตร 950 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร



6. Urea broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, pH 8.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 8.0	950	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 950 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7. Urea broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, pH 9.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 9.0	950	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 950 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

8. Urea broth (ยูเรีย 25 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย Urea 1000 มิลลิโมลาร์	25	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	975	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 975 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ

45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

9. Urea broth (ยูเรีย 100 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	100	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	900	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

10. Urea broth (ยูเรีย 200 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	200	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	800	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 800 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

11. Urea broth (ยูเรีย 300 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	300	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	700	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 700 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

12. Urea broth (ยูเรีย 400 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย Urea 1000 มิลลิโมลาร์	400	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	600	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 600 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

13. Urea – $CaCl_2$ broth (Urea 50 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 15 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1000 มิลลิโมลาร์	15	มิลลิลิตร
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	935	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH 7 935 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2 \cdot H_2O$ และ 1000 มิลลิโมลาร์ Urea ที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ

14. Urea – $CaCl_2$ broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 30 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1000 มิลลิโมลาร์	30	มิลลิลิตร
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	920	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH7.0 920 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย1000 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2 \cdot H_2O$ และ 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตรตามลำดับ

15. Urea – $CaCl_2$ broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 60 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1000 มิลลิโมลาร์	60	มิลลิลิตร
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	890	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH7.0 890 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2 \cdot H_2O$ และ 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตรตามลำดับ

16. Urea – agar (HIMEDIA)

ส่วนประกอบสารละลาย Urea – agar base

Urea – agar base	29	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ water agar

Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ชั่ง Agar 15 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลายแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย Urea – agar base ที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ภาคผนวก ค วิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น

1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ การติดสีย้อมแกรมและรูปร่างของเชื้อโดยวิธีการย้อมแกรม ดังนี้

1.1 ทำความสะอาดสไลด์ด้วยผงซักฟอกให้ทั่วทั้งสองด้านของสไลด์ ทิ้งให้แห้งพอหมาดๆ แล้วใช้ผ้าสะอาดเช็ดคราบผงซักฟอกออกให้หมดของสไลด์ทั้ง 2 ด้าน

1.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะบนสไลด์ 1-2 ลูป เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ให้ติดห่วงเขี่ยเชื้อมาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วละเลงเชื้อให้กระจายปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วลนผ่านเปลวไฟค่อนข้างเร็วประมาณ 2-3 ครั้ง ไม่ต้องให้ร้อนเกินไปเพื่อให้เซลล์ยึดกับสไลด์

1.3 หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้ง

1.4 หยดสารละลาย Gram,s iodine นาน 1 นาที สารละลายไอโอดีนจะช่วยทำให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดียิ่งขึ้น

1.5 ล้างสีออกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์อาซีโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมาแล้วล้างน้ำทันที โดยให้ผ่านน้ำเบาๆ

1.6 ย้อมทับด้วยการหยดสี Safranin O ทิ้งไว้นาน 1 นาที

1.7 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำโดยให้น้ำผ่านเบาๆวางไว้ให้สีแห้ง

1.8 นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา โดยติดสีย้อมที่สองเป็นสีแดงของ Safranin O แสดงถึง แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram – Negative) ถ้าติดสีย้อมแรกเป็นสีน้ำเงินของ Crystal violet แสดงถึง แบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Gram – Positive)

2. Motility (hanging drop)

ทำความสะอาดสไลด์หลุมและ cover slip เพาะเชื้อลงอาหารเอียง (NA slant)บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะลงบน cover slip 1-2 ลูป แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นๆ แล้วเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารเอียงให้ติดลวดเขี่ยเชื้อมาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วเขี่ยเชื้อให้กระจายอยู่ในหยดน้ำ จากนั้นเผาห่วงเขี่ยเชื้ออีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดค้างอยู่แล้วจุ่มน้ำมาแตะลงบนมุมทั้ง 4 ของ cover slip และนำสไลด์หลุมมาปิดลงบนแผ่น cover slip ที่เตรียมเชื้อไว้จึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase) โดยปกติกระบวนการหายใจแบบไม่ต้องใช้ออกซเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O_2 + O_2$$

วิธีการ

หยด 3% $2H_2O_2$ ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร nutrient agar แตะลงในหยดของ $2H_2O_2$ สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การอ่านผล

ผลเป็นบวก: มีฟองแก๊สเกิดขึ้นทันที แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส

ผลเป็นลบ: ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้

การทดสอบอินโดล

การทดสอบการสร้างสารอินโดล (indole) โดยใช้วิธี Kovacs' Method

วิธีการ

ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว tryptone หรืออาหารอื่นๆที่เหมาะสม ช่น MIO, SIM บ่มไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Kovacs' reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงไป

การอ่านผล

ผลเป็นบวก: สีแดงที่ผิวชั้นบนของอาหาร

ผลเป็นลบ: ไม่เกิดสี ถ้าเป็นสีส้มจัดเป็น variable เนื่องจาก tryptophan ถูกออกซิไดส์ไปเป็น Skatole (methyl indole)

สารทดสอบ Kovacs ละลาย 10 กรัมของ p-dimethylaminobenzaldehyde ใน butyl alcohol หรือ isoamyl 150 มิลลิลิตร ทำให้ร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมดทำให้เย็นเติม HCl เข้มข้น 50 มิลลิลิตร อย่างช้าๆเก็บในขวดหยดสีชาและไว้ในตู้เย็น สารทดสอบควรมีสีเหลืองอ่อน

5. การทดสอบออกซิเดส

การทดสอบ oxidase โดยใช้วิธี Kovacs' Method

วิธีการ

วางกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 0.5 % tetramethyl-p-phenylenediamine HCl ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบโดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ

การอ่านผล

ผลเป็นบวก: สีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลเป็นลบ: ไม่เกิดสี

6. การทดสอบ Voges–Proskauer test

การทดสอบ Voges–Proskauer โดยใช้วิธี Barritt's Method

วิธีการ

ปลูกเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อที่เพาะได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5 % narphthol solution แล้วเติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5 % KOH เขย่าให้เข้ากัน

การอ่านผล

ผลเป็นบวก: สีแดงภายใน 10 นาที

ผลเป็นลบ: สีเหลือง

7. การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการ cross streak เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท G27 ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar จากนั้นส่งไปยัง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เลขที่ 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังตาราง 13

ตาราง 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย ไอโซเลท G27

แบคทีเรีย	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
G27	16S rDNA	TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG
		CAAGTCGAGCGGATTGAAGGGAGCTTGCTCCCTGATA
		TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
		GCCCTGCAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGC
		TAATACCGAATAATCGGTTCTTCCGCATGGAAGAACTC
		TGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTGCAGGATGGGCCC
		GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACC
		AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
		GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
		CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG
		AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAG
		GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCGAGGGAAGAAC
		AAGTACGGGAGTAACTGCCCGTACCTTGACGGTACCT
		CGTCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
		GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
		TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCT
		GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATT
		GGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGCG
		GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG
		GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGT
		AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
		AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
		GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGC
		TGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
		GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA

ตาราง 13 (ต่อ)

แบคทีเรีย	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
G27	16S rDNA	CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
		CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCT
		GACCGGTGTAGAGATACATCTTTCCCTTCGGGGACAG
		CGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
		CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
		CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTA
		AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
		ATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
		CACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCTGCAAA
		CCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCATAAAACCGTTCCC
		AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC
		CGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT
		GAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC
		ACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTA
		ACCCTTACGGGAG

ผลงานตีพิมพ์

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานอธิการบดี กองบริหารการวิจัย งานส่งเสริมและเผยแพร่ผลงานวิจัย โทร.๘๖๔๑

ที่ ศธ ๐๕๒๗.๐๑.๓๓(๓)/๐๗๗๔ **วันที่** ๑๙ มีนาคม ๒๕๕๕

เรื่อง ขอแจ้งการได้รับบทความ

เรียน ดร.จรูญ สารินทร์

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานนิพนธ์ ประเภทบทความวิจัย กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี เรื่อง "การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนต เพื่อการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้าง" พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล ๑ ชุด มายังวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร นั้น

วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวรได้รับเรื่องดังกล่าวแล้ว เมื่อวันที่ ๙ มีนาคม ๒๕๕๕ และขณะนี้อยู่ในระหว่างการตรวจสอบรูปแบบและองค์ประกอบของบทความโดยกองบรรณาธิการฯ หากพิจารณาเห็นว่ามีข้อเสนอแนะหรือควรปรับแก้ไขจะดำเนินการแจ้งกลับไปยังผู้นิพนธ์ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภูมิศักดิ์ อินทนนท์)
บรรณาธิการวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนต เพื่อการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้าง

จรูญ สารินทร์[a*] สิทธัตถ์ สร้อยเพชรเกษม[b] และ ศิริพรรณ สารินทร์[b]

Application of ureolytic bacteria induced carbonate precipitation for conservation of surface of supporting materials

Charoon Sarin[a*], Sittud Soypetcasem[b], and Siripun Sarin[b]

[1]ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[1]Department of Natural Resources and Environment, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[2]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

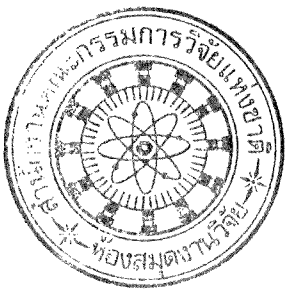
*Corresponding author. E-mail : csarin@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* G27 ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ผลการวิจัยพบว่า ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย ($2.0x10^7$ cfu/ml) ที่เตรียมในอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ทั้งแบบฉีดพ่น (SUG) และแบบทา (PUG) บนพื้นผิวอิฐตัวอย่างที่ทดสอบขนาด 6x12x6 เซนติเมตร เป็นเวลา 30 วัน มีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุดควบคุม โดยเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า พบตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้นใหม่จับตัวกันหนาติดอยู่ตามพื้นผิวและผนังรูพรุนของก้อนอิฐ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการปกป้องพื้นผิวโดยการป้องกันน้ำที่เป็นตัวการทำให้เกิดการผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การ

ดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการชักนำของแบคทีเรียซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้างของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือสถาปัตยกรรมต่าง ๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหินด้วยวิธีชีวภาพได้

คำสำคัญ : แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอส การตกตะกอนคาร์บอเนต



Abstract

This research aimed to study method for application of the ureolytic bacteria, *Sporosarcina koreensis* G27, induced calcium carbonate precipitation on surface of support materials. Investigation by spraying (SUG) and painting (PUG) the bacterial culture prepared in urea-$CaCl_2$ broth onto the surface of support blocks (6x12x6 cm) showed that the highest calcium carbonate precipitation was induced when the culture of *S. koreensis* G27 ($2.0x10^7$ cfu/ml) was sprayed or painted onto the surface of support blocks for 30 days. The newly formed carbonate cements calcite also grained by depositing on the walls of the pores. *S. koreensis* G27 induced calcium carbonate precipitation presented efficiently water protection of the support materials according to the water absorption rate observed in the tested support blocks was statistically significant lower than the control blocks. There was no significant difference in the water absorption rate between the methods of application. This finding indicated the possibility of application of the ureolytic bacteria which capable of inducing carbonate precipitation on surface of the support materials could be used for conservation of buildings, ornamental and monumental stones as an alternative surface treatment.

Keywords : ureolytic bacteria, carbonate precipitation

บทนำ

ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ การผุพังหรือผุกร่อนของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือสถาปัตยกรรมต่าง ๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหิน โดยเฉพาะหินตะกอนคาร์บอนเต (carbonate stones) นั้น

เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการทางกายภาพ เคมีและชีวภาพตามสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป กรอปกับลักษณะและองค์ประกอบของเนื้อหินที่เป็นประเภทหินตะกอนคาร์บอเนต ซึ่งเกิดจากการทับถมของตะกอนคาร์บอเนต ทั้งจากสารอนินทรีย์ และซากสิ่งมีชีวิต เช่น ปะการัง และกระดองของสัตว์ทะเล ซึ่งถับถมกันภายใต้ความกดดันและตกผลึกใหม่เป็นแร่แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) จึงทำปฏิกิริยากับกรด มีลักษณะเนื้อแน่นละเอียดทึบ มีสีออกขาว เทา ชมพู หรือสีดำ ตัวอย่างเช่น หินปูน (limestones) โดโลสโตน (dolostones) หินอ่อน (marbles) และเป็นหินที่ละลายน้ำได้ อ่อนไหวต่อสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้ผุพังได้ง่าย โดยเฉพาะในปัจจุบันที่มีปัจจัยเสริมจากการเพิ่มขึ้นของมลภาวะทางอากาศ เช่น การเกิดฝนกรด ส่งผลให้เร่งการผุกร่อนเกิดเร็วยิ่งขึ้น (Price, 1996; Winkler, 1994) จึงได้มีความพยายามที่จะหยุดยั้งหรือชะลอการผุกร่อนพังทลาย โดยเฉพาะในส่วนพื้นผิวของวัสดุก่อสร้างเหล่านี้ โดยวิธีการอนุรักษ์ (conservation) ทั้งในรูปแบบของการปกป้อง (protection) โดยป้องกันน้ำ (waterproof) หรือป้องกันสิ่งอื่น ๆ ที่เป็นตัวการของการผุพัง (weathering agents) ไม่ให้สามารถเข้าถึงแกนกลาง (core) ของวัสดุก่อสร้างได้ รวมทั้งการเสริมสร้างความแข็งแกร่ง (consolidation) โดยการปรับปรุงเพื่อลดการผุพังของรูพรุน (porous) ในวัสดุก่อสร้างด้วยซีเมนต์หรือวัสดุสร้างความแข็งอื่น ๆ แต่ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ด้วยวิธีใดก็ตาม วัสดุที่นำมาใช้นั้นมีทั้งที่ทำจากสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ต่าง ๆ เช่น อะคริลิก (acrylic) กาวเรซิน อีพอกซี (epoxy resins) (Horie, 1987) และสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ [$Ba(OH)_2$] (Lewin & Baer, 1974) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีการใช้วัสดุต่าง ๆ เหล่านี้ ก็ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะการใช้วัสดุชนิดสารอินทรีย์นั้นอาจจะไม่สามารถเข้ากันได้กับวัสดุพื้นผิวเดิมและอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อพื้นผิวของวัสดุก่อสร้าง ในขณะที่การใช้วัสดุที่ทำจากสารอนินทรีย์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจกว่า ทั้งในแง่ของการเป็นวัสดุที่ใช้ปกป้องและสร้างความแข็งแกร่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแร่ธาตุ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงกับองค์ประกอบของวัสดุก่อสร้าง ตัวอย่างเช่น การใช้วิธีการที่เรียกว่า limewater treatment (Price, 1985) ซึ่งมีสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] เป็นส่วนประกอบ ในการสร้างความแข็งแกร่งให้กับหินคาร์บอเนต เนื่องจากแคลเซียมไฮดร

อกไซด์สามารถตกตะกอนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์ในบรรยายกาศ แต่วิธีการนี้ก็มีข้อเสียคือ มีการตกตะกอนน้อย เกิดเป็นแค่ชั้นบาง ๆ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะปกป้องและสร้างความแข็งแรงให้กับวัสดุก่อสร้าง (Price, et al., 1988)

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยในการนำแบคทีเรียชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ที่เรียกว่า microbial carbonate precipitation (MCP) หรือ biocementation ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวภาพที่ช่วยป้องกันการผุพังของวัสดุสิ่งก่อสร้าง และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย วิธีการอนุรักษ์นี้จะอาศัยการเลียนแบบวิถีทางธรรมชาติ เช่นเดียวกับการเกิดขึ้นของหินตะกอนคาร์บอนเนตบนโลก (Stocks-Fischer, et al, 1999) โดยแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตนั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน (heterotrophic soil bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน (Castanier et al., 1999 ; Hammes & Verstraete, 2002) เช่น ยูเรีย (urea) ได้ โดยใช้เอนไซม์ยูรีเอส (urease) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา แล้วได้สารผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอเนตไอออน (carbonate ions) และแอมโมเนียม (ammonium, NH_4^+) ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง ซึ่งถ้าในสภาพแวดล้อมนั้นมีแคลเซียมไอออน (calcium ions) อยู่ จะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลไซต์ (Fujita et al., 2000 ; Muynck et al., 2008 ; Tiano et al., 1999) ที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือในรูช่องว่างของวัสดุโดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีผู้สนใจนำแบคทีเรียนี้มาวิจัยเพื่อการประยุกต์ใช้ เช่นการนำแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* มาชักนำให้เกิดตะกอนแร่ภายในรูช่องว่างหรือรอยแตกของพื้นผิวแกรนิต ซึ่ง *B. pasteurii* มีความสามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งพลังงานแล้วทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Kroll, 1990) หรือการใช้แบคทีเรีย *Myxococcus xanthus* ที่สามารถชักนำการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อเสริมความแข็งแกร่งและอุดตามรูพรุนของหินปูน โดยพบว่าหินปูนที่เกิดใหม่จะไปสะสมที่ผนังรูพรุน (Rodriguez-Navarro et al., 2003) และการใช้จุลินทรีย์

ประจำถิ่นในการชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในหินปูน ซึ่งพบว่าตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ประสานกันได้ดีกับเนื้อหินปูนเดิม (Jimenez-Lopez et al., 2007) ดังนั้นการอนุรักษ์วัสดุก่อสร้างด้วยวิธีนี้จึงขึ้นอยู่กับการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือช่องว่างของวัสดุก่อสร้างโดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดีกว่าวิธี limewater treatment

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง เพื่อประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์สิ่งก่อสร้างให้มีความทนทานและมีการดูดซึมน้ำต่ำ ซึ่งจะเป็นการปกป้องและการเสริมความแข็งแกร่งของพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้แบคทีเรียชนิดแกรมบวก *Sporosarcina koreensis* G27 ที่แยกได้จากดินพื้นที่เกษตรกรรม โดย สิทธัตถ์ และคณะ (2552) มีรูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ได้ สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ และมีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สร้างพลังงาน ให้ประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสดีที่สุดที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7 และมีระดับความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่เหมาะสมระหว่าง 50 ถึง 100 mM และ 30 mM ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนตได้น้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีอัตราการสร้างตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมอิฐตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนของวัสดุก่อสร้าง

ทำการผสมทราย เนื้อดิน ปูนซีเมนต์ และน้ำ ในอัตราส่วน 5:2:1:1 ตามลำดับ แล้วนำมาอัดลงในแม่พิมพ์เพื่อให้ได้อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร จากนั้นบ่มชิ้นอิฐโดยใช้ผ้าชุบน้ำให้เปียกห่อไว้ เป็นเวลา 7 วัน แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่

เปลี่ยนแปลงจึงทำการคัดเลือกอิฐที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน จากนั้นนำอิฐไปทาด้วยสารเคลือบใสประเภทกันน้ำ (water repellent) จำนวนห้าด้านของก้อนอิฐ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและทำการทาซ้ำเช่นนี้อีกจำนวนสองครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักสุดท้าย ซึ่งเป็นน้ำหนักก่อนการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำ ทำการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใส โดยใช้ด้านที่ทาสารเคลือบใสแช่ลงในน้ำกลั่นให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก ทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดน้ำ จากนั้นจึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจึงทำการบันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักก่อนการทดลอง แล้วนำอิฐจำนวนสิบสองก้อนมาเรียงซ้อนกัน (ภาพที่ 1) โดยเรียงให้ด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสออกในทางเดียวกันทุกก้อนเพื่อใช้เป็นด้านของการทดลองต่อไป

2. การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย

2.1 รูปแบบการพ่น ทำโดยการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ด้วยการถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงฟลาสก์ที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร (2.0×10^7 cfu/ml) ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเป็นของเหลวในการฉีดพ่น (SUG) จากนั้นนำมาฉีดพ่นให้เป็นละอองด้วยอุปกรณ์พ่นขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ลงบนด้านของอิฐที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส โดยการกดด้ามฉีดให้สุดหนึ่งครั้งต่อหนึ่งก้อน ให้มีระยะห่างจากอิฐตัวอย่างประมาณ 10 เซนติเมตร ฉีดพ่นตั้งแต่ก้อนที่ 1 ถึงก้อนที่ 12 เรียงตามลำดับ แล้วกลับมาฉีดพ่นวนใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนกระทั่งของเหลวที่เหลือไม่สามารถฉีดพ่นในรอบต่อไปได้อีก จากนั้นทำการวัดปริมาตรของเหลวที่เหลือเพื่อคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ไป กำหนดการฉีดพ่นทุกวัน ๆ ละสองครั้ง คือ

ช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 9.00 น. และในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 15 ของการทดลอง หลังจากนั้นฉีดพ่นเพียงครั้งเดียวในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ตั้งแต่วันที่ 16 ถึงวันที่ 30 ของการทดลอง ทำเช่นเดียวกันนี้กับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร urea-$CaCl_2$ broth 100 มิลลิลิตร (SU) และชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร (SW) หลังจากทำการทดลองสิ้นสุดลงในแต่ละวัน ทำการคลุมชุดอิฐการทดลองทุกชุดด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น แล้วคลุมทับด้วยฉนวนกันความร้อนเพื่อป้องกันความร้อนจากแสงแดดอีกหนึ่งชั้น

2.2 รูปแบบการทา ทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธีการฉีดพ่น แต่เปลี่ยนวิธีการเป็นการทา โดยใช้แปรงทาสีปราศจากเชื้อขนาด 1 นิ้ว ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลอง คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร (PW) ชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-$CaCl_2$ broth 100 มิลลิลิตร (PU) และชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-$CaCl_2$ broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (PUG)

โดยขณะที่ทำการทดลองทั้งสองรูปแบบมีการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่นำมาทดลอง ก่อนทำการฉีดพ่นหรือทาในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ของทุกวัน ด้วยการนำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบ 0.85% sterile saline ป้ายลงบนพื้นผิวของอิฐที่ทำการฉีดพ่นพื้นที่ 1 ตารางนิ้ว จากนั้นนำไปป้ายลงบนจานอาหาร urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แล้วทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารได้ และทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้ถุงพลาสติกและแผ่นฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่างตลอดการทดลอง

2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่างโดยการทดสอบหาค่าดูดซึมน้ำ ทำโดยนำอิฐตัวอย่างมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง นำอิฐตัวอย่างที่ได้ ไปทำการแช่ในน้ำกลั่นโดยคว่ำด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสลงให้ลึก 1 เซนติเมตร

เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเติมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำและทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างในชุดการทดลองด้วย **t-Test: Paired Two Sample for Means แบบทางเดียว (One-tail)**

ผลการศึกษา

จากการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย *S koreensis* G27 ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ในชุดควบคุมทั้ง SW และ PW ลักษณะพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวนั้นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมบางมาก ในชุดควบคุมทั้ง SU และ PU ลักษณะพื้นผิวอิฐโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุดควบคุม SW และ PW เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกันกับชุดควบคุม SW และ PW แต่พบในปริมาณมากกว่า สำหรับชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งแบบ SUG และ PUG พบว่าบนพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากที่สุด และเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวจับตัวกันหนาติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกัน แต่พบในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมทั้งสอง (ภาพที่ 2) โดยในตลอดการทดลองนี้พบว่ามีค่าความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้ถุงพลาสติกและแผ่นฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่างเท่ากับ 77.4 เปอร์เซ็นต์และ 29.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสามารถพบแบคทีเรียที่มีชีวิตและผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยสังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar เปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพูหลังจากบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และเมื่อทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar ที่มาจากชุดทดลอง พบว่ามีแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่มีลักษณะรูปร่างท่อนและการติดสีแกรมบวก

สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างแท้จริง และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ และพบแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นเจริญอยู่ด้วย และจากการศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่างโดยการทดสอบการดูดซึมน้ำ พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้น มีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำน้อยที่สุด คือ 1.51 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใต้สภาวะของการทดลองเดียวกัน (ตารางที่ 1)

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis* G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตบนผิวอิฐตัวอย่าง โดยในชุดควบคุมทั้ง SW PW SU และ PU พบว่ามีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่บ้างบนพื้นผิวอิฐ ทั้งนี้เนื่องจากมีการตกตะกอนคาร์บอเนตได้เองของไอออนที่หลุดออกมาจากองค์ประกอบของวัสดุซึ่งใช้เป็นส่วนผสมอิฐตัวอย่างโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย (Jimenez-Lopez, et al., 2008) อีกทั้งสภาวะที่เป็นด่างอันเกิดจากส่วนผสมของปูนซีเมนต์ร่วมด้วย (Muynck, et al., 2008) จึงทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนคาร์บอเนตได้แต่มีปริมาณน้อย และเมื่อมีตะกอนสะสมไม่มากพอที่จะส่งผลให้ผนังรูพรุนมีขนาดเล็กลง จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับชุดทดลองแบบ SUG และ PUG และถึงแม้จะมีการพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นบนพื้นผิวของอิฐตัวอย่างที่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ urea-$CaCl_2$ broth ได้ และเมื่อทำการให้อาหารใหม่ในทุกวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมเกิดขึ้น แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตไม่มากพอ เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ดังนั้นจึงมีปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นน้อยกว่าในชุดทดลอง เนื่องจากพื้นผิวอิฐตัวอย่างของชุดทดลองแบบ SUG และ PUG มีการเจริญของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 อีกทั้งยังได้รับเชื้อใหม่พร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มในทุกวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบ

ตะกอนสีขาวจับตัวสะสมกันอย่างหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และเมื่อมีตะกอนสะสมหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนส่งผลให้ขนาดของรูพรุนที่ปรากฏในส่วนของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีขนาดเล็กลง หรืออาจตกตะกอนสะสมปิดรูพรุนได้ในกรณีที่รูพรุนมีขนาดเล็กมาก (Le Métayer-Levrel, et al., 1999; Jimenez-Lopez, et al., 2008; Muynck, et al., 2010) จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้นให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรีย *S. koreensis* G27 สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุก่อสร้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในรูปแบบวิธีการฉีดพ่นและวิธีการทา โดยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตจะจับตัวกันหนาติดอยู่ตามพื้นผิว รูพรุนหรือตามผนังหลุมทำให้ลดการดูดซึมน้ำที่เป็นสาเหตุของการผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการชักนำของแบคทีเรียซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิวของวัสดุก่อสร้างได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2554 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านของภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ตลอดการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สิทธัตถ์ สร้อยเพชรเกษม, กัลยา ปรีชานุกูล และ ศิริพรรณ สารินทร์. (2552). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 14, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ.

Castanier, S., G. Le Metayer-Levrel., & J.P. Perthuisot. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiologist point of view. Sedimentary Geology, 126, 9-23.

Fujita, Y., F.G. Ferris, R.D. Lawson, F.S. Colwell., & R.W. Smith. (2000). Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. Geomicrobiology Journal, 17, 305-318.

Hammes, F. & W. Verstraete. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Reviews in Environmental Science & Biotechnology, 1, 3-7.

Horie, C. V. (1987). Materials for conservation: organic consolidants adhesives and coatings. London United Kingdom: Butterworths.

Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Pinar, G., C. R., & Gonzalez-Munoz, M.T. (2007). Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. Chemosphere, 68, 1929–1936.

Kroll, R.G., (1990). Alkalophiles. In: Edwards, C. (Ed.), Microbiology of Extreme Environments. McGraw-Hill, New York, 55-92.

Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubiére, J.-F. and Perthuisot, J.-P. (1999). Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. Sedimentary Geology, 126, 25-34.

Muynck, W. De., Belie, N. D. and Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. Ecological Engineering, 36, 118-135.

Muynck, W. De, K. Cox, N. De Belie & W. Verstraete. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. Construction and Building Materials, 22, 875-885.

Price, C. A. (1985). The consolidation of limestone using a lime poultice and limewater. Bayerisches Denkmalpflege Arbeitsh, 31, 14–151.

Price, C. A. (1996). Stone conservation. An overview of current research. Getty Conservation Institute. Los Angeles: Calif.

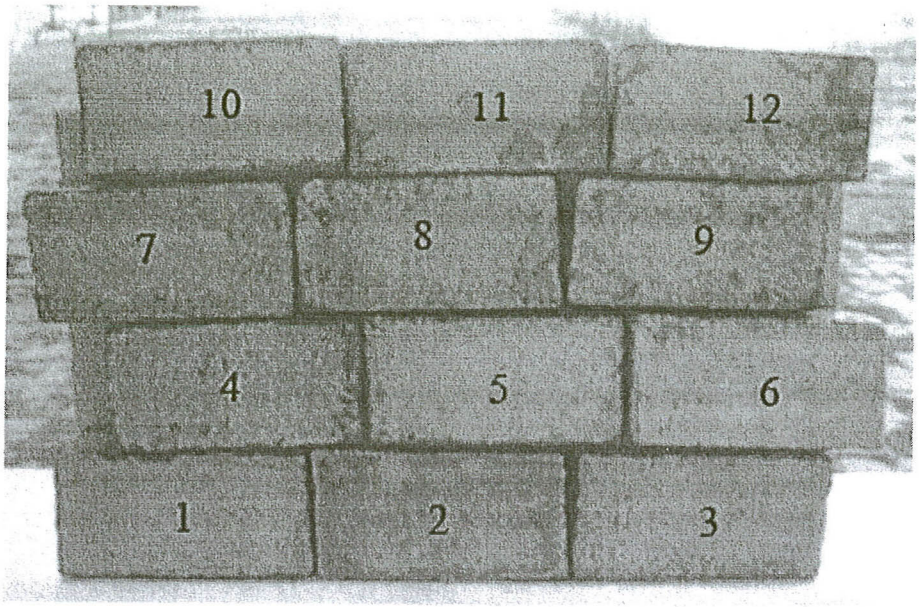
Price, C., K. Ross and G. White. (1988). A further appraisal of the 'lime technique' for limestone consolidation using a radioactive tracer. Studies Conservation, 33, 178 –186.

Rodriguez-Navarro, C., M. Rodriguez-Gallego, K. B. Chekroun, & M. T. Gonzalez-Munoz. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralisation. Applied and Environmental Microbiology, 69, 2182-2193.

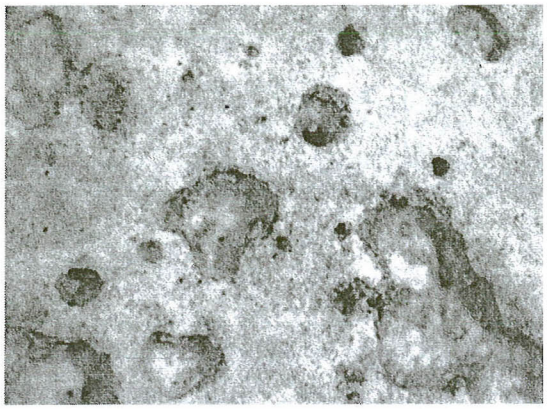
Stocks-Fischer, S., J. K. Galinat, & S. S. Bang. (1999). Microbiological precipitation of $CaCO_3$. Soil Biology and Biochemistry, 31, 1563-1571.

Tiano, P., L. Biagiotti & G. Mastromei. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. Journal of Microbiological Methods, 36, 139-145.

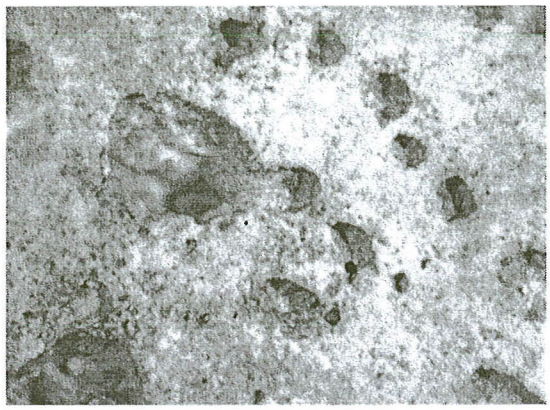
Winkler, E. M. (1994). Stone in architecture. Springer-Verlag. Berlin: n.p.



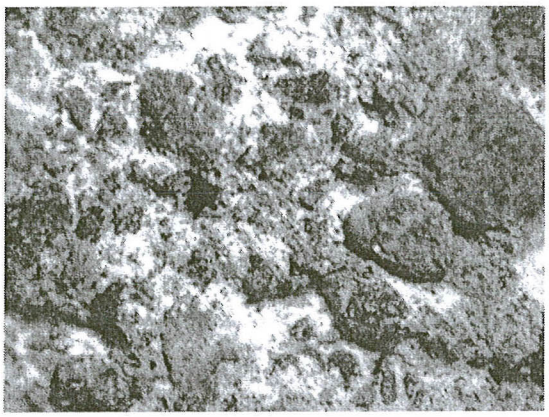
ภาพที่ 1 ลักษณะการเรียงอิฐตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง



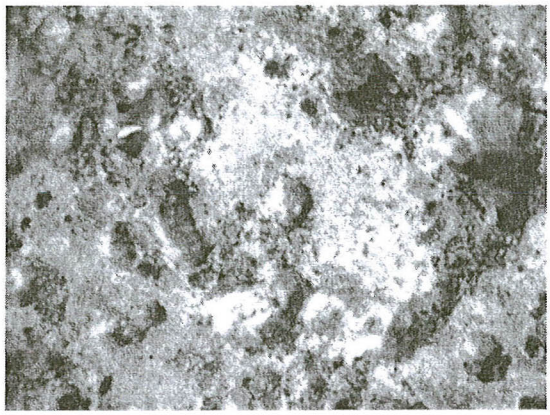
ก. SW



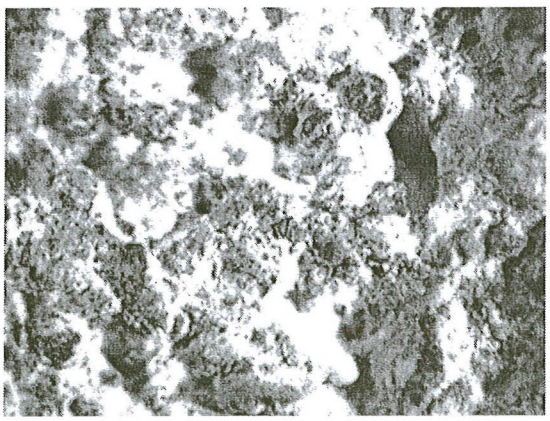
ง. PW



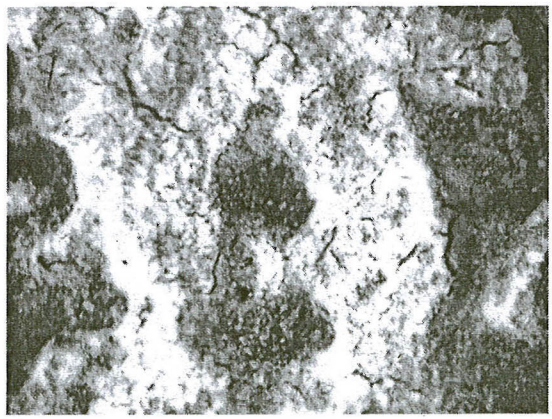
ข. SU



จ. PU



ค. SUG



ฉ. PUG

ภาพที่ 2 ลักษณะพื้นอิฐตัวอย่างภายใต้จุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า หลังการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่าง (n = 12) หลังจากการทดลองโดยวิธีการฉีดพ่นและการทาด้วยแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

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

หมายเหตุ ns = ไม่มีนัยสำคัญ * นัยสำคัญที่ระดับ 0.05