

## บทที่ 1

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ การผุพังหรือผุกร่อนของก้อนหิน ดึก อาคาร บ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือสถาปัตยกรรมต่างๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหิน โดยเฉพาะหินตะกอนนั้น เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการทางกายภาพ เคมีและชีวภาพตามสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป กรอบกับลักษณะและองค์ประกอบของเนื้อหินเป็นประเภทหินตะกอนคาร์บอเนต (carbonate stones) เกิดจากการทับถมของตะกอนคาร์บอเนตในท้องทะเล ทั้งจากสารอนินทรีย์ และซากสิ่งมีชีวิต เช่น ปะการัง และกระดองของสัตว์ทะเล ซึ่งทับถมกันภายใต้ความกดดันและตกผลึกใหม่เป็นแร่แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) จึงทำปฏิกิริยากับกรด มีลักษณะเนื้อแน่นละเอียดที่บ มีสีออกขาว เทา ชมพู หรือสีดำตัวอย่างเช่น หินปูน (limestones) โดโลสโตน (dolostones) หินอ่อน (marbles) และเป็นหินที่ละลายน้ำได้ อ่อนไหวต่อสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้ผุพังได้ง่าย โดยเฉพาะในปัจจุบันที่มีปัจจัยเสริมจากการเพิ่มขึ้นของมลภาวะทางอากาศ เช่น การเกิดฝนกรด ส่งผลให้เร่งการผุกร่อนเกิดเร็วยิ่งขึ้น

ได้มีความพยายามที่จะหยุดยั้งหรือชะลอการผุกร่อนพังทลาย โดยเฉพาะในส่วนพื้นผิวของวัสดุก่อสร้างเหล่านี้ โดยวิธีการอนุรักษ์ (conservation) ทั้งในรูปแบบของการปกป้อง (protection) โดยป้องกันน้ำ (waterproof) หรือสิ่งอื่นๆ ที่เป็นตัวการของการผุพัง (weathering agents) ไม่ให้สามารถเข้าถึงแกนกลาง (core) ของวัสดุก่อสร้างได้ และการเสริมสร้างความแข็งแรง (consolidation) โดยการปรับปรุงเพื่อลดการผุพังของรูพรุน (porous) ในวัสดุก่อสร้างด้วยซีเมนต์หรือวัสดุสร้างความแข็งแรงอื่นๆ แต่ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ด้วยวิธีใดก็ตาม วัสดุที่นำมาใช้นั้นมีทั้งที่ทำจากสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ต่างๆ เช่น อะคริลิก (acrylic) กาวเรซินอีพอกซี (epoxy resins) และสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์  $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$  เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนี้วิธีการใช้วัสดุต่างๆ เหล่านี้ ก็ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะการใช้วัสดุชนิดสารอินทรีย์นั้น อาจจะไม่สามารถเข้ากันได้กับวัสดุพื้นผิวเดิมและอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อพื้นผิวของวัสดุก่อสร้าง ในขณะที่การใช้วัสดุที่ทำจากสารอนินทรีย์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจกว่า ทั้งในแง่ของการเป็นวัสดุที่ใช้ปกป้องและสร้างความแข็งแรง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแร่ธาตุ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงกับองค์ประกอบของวัสดุก่อสร้าง ตัวอย่างเช่น การใช้วิธีการที่เรียกว่า limewater treatment ซึ่งมีสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  เป็นส่วนประกอบ ในการสร้างความแข็งแรงให้กับหินคาร์บอเนต เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถตกตะกอนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) ได้ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ แต่วิธีการนี้ก็มี

ข้อเสียคือ มีการตกตะกอนน้อย เกิดเป็นแค่ชั้นบางๆ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะปกป้องและสร้างความแข็งแรงให้กับวัสดุก่อสร้าง

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยในการนำแบคทีเรียชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ที่เรียกว่า microbial carbonate precipitation (MCP) หรือ biocementation ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวภาพที่ช่วยป้องกันการผุพังของวัสดุสิ่งก่อสร้าง และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วยโดยวิธีการอนุรักษณ์นี้ อาศัยการเลียนแบบวิถีทางธรรมชาติในอดีต เช่นเดียวกับการเกิดขึ้นของหินตะกอนคาร์บอเนตบนโลก จุลินทรีย์ที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน (heterotrophic soil bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน เช่น ยูเรีย (urea) ได้โดยใช้เอนไซม์ยูรีเอส (urease) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา แล้วได้สารผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอเนตไอออน (carbonate ions) และแอมโมเนียม (ammonium,  $\text{NH}_4^+$ ) ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง ซึ่งถ้าในสภาพแวดล้อมนั้นมีแคลเซียมไอออน (calcium ions) อยู่ จะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลไซต์ ( $\text{CaCO}_3$ ) ดังนั้นการอนุรักษณ์วัสดุสิ่งก่อสร้างด้วยวิธีนี้จึงขึ้นอยู่กับเกิดการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือรูช่องว่างของวัสดุสิ่งก่อสร้างโดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดีกว่าแบบวิธี limewater treatment

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการปกป้องและการเสริมความแข็งแรงของพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างโบราณวัตถุโดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเป็นการวิจัยแบบพัฒนาเชิงทดลองให้พื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้างโบราณวัตถุมีความทนทาน มีการดูดกลืนน้ำต่ำ เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษณ์และซ่อมแซมโบราณวัตถุต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาความแข็งแรงของวัสดุสิ่งก่อสร้างในระหว่างที่มีการตกตะกอนคาร์บอเนต (biomineralization) โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส
4. เพื่อศึกษาการปกป้องและการเสริมความแข็งแรงของวัสดุสิ่งก่อสร้างโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต

5. เพื่อศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอน โดยศึกษาเฉพาะสกุล *Bacillus* sp. เนื่องจากเป็นสกุลของแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนโดสปอร์ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้นาน แพร่กระจายได้ดี และทนทานต่อสารเคมีและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์
2. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส ได้แก่ pH ปริมาณยูเรียและแคลเซียม
3. ทำการศึกษาการพัฒนาความแข็งแรงของวัสดุก่อสร้างในระหว่างที่มีการตกตะกอนคาร์บอน (biomineralization) โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส โดยใช้โมเดลคอนกรีตทราย
4. ทำการศึกษาการปกป้องและการเสริมความแข็งแรงของวัสดุก่อสร้างโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอน โดยใช้วิธีตัวอย่างที่ทำจากวัสดุที่ใช้ในการทำอิฐบล็อกประสาน แบบที่ใช้ดินจากพื้นที่อำเภอวังทรายพูน จังหวัดพิจิตร มาใช้เป็นวัสดุหลักในการผลิต เป็นตัวแทนของโบราณวัตถุ เนื่องจากอิฐบล็อกประสานที่ทำจากดินดังกล่าวจะมีความแข็งแรงของพื้นผิวน้อย ผุกร่อนง่ายและมีรูพรุนบริเวณพื้นผิวของวัสดุมากกว่าแบบที่ใช้ดินลูกรังเป็นวัสดุหลัก โดยใช้วิธี soaking method แล้ววัดความแข็งแรง (consolidation test) โดยวิธีวัดน้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐบล็อกประสาน ตัวอย่างหลังจากผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) (Rodriguez-Navarro et al., 2003)
5. ทำการศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง โดยวิธีการพ่นและทำในรูปแบบของ fermentation culture และศึกษาประสิทธิภาพของตัวแทนของวัสดุก่อสร้างจากการทดสอบค่าดูดซึมน้ำ

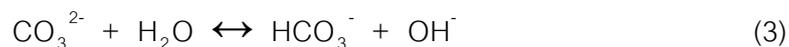
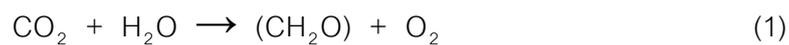
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

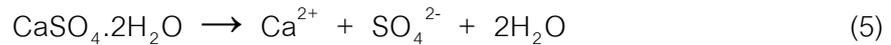
แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นแร่ธาตุชนิดหนึ่งที่มีการแพร่กระจายทั่วไปบนพื้นโลกพบประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเปลือกโลก พบได้มากในหินตะกอน (sedimentary rock) เช่น หินปูน หินอ่อน และหินทราย ทั้งในสภาพแวดล้อมทางทะเล แหล่งน้ำจืด และบนพื้นดิน (Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7; Klien and Hurlbut,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

### การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ (Microbial carbonate precipitation, MCP)

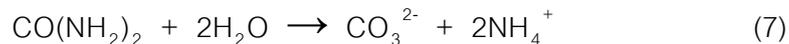
ในช่วงยี่สิบกว่าปีที่ผ่านมา การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากศักยภาพหรือบทบาทของจุลินทรีย์ในทะเล ซึ่งอาจเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนสำหรับการผลิตปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นบนโลก โดยมีสิ่งมีชีวิตสามกลุ่มใหญ่ที่สำคัญในการชักนำให้เกิด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



นอกจากนี้แคลไซต์ยังสามารถตกตะกอนได้โดยสิ่งมีชีวิตพวก heterotrophs ที่มีการผลิตคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต และเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการตกตะกอน (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23) การละลายของยิบซัม ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) โดยวิธีทางกายภาพ (สมการที่ 5) ทำให้สภาพแวดล้อมมีปริมาณซัลเฟตและแคลเซียมไอออนมากขึ้น ซึ่งในสภาพที่มีอินทรีย์วัตถุอยู่ แต่ปราศจากก๊าซออกซิเจน จุลินทรีย์กลุ่ม sulphate reducing bacteria จะสามารถรีดิวซ์ซัลเฟตให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) และปลดปล่อยไบคาร์บอเนตออกมา (สมการที่ 6) (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23; Ehrlich, 1998, pp. 45-60; Wright, 1999, pp. 147-157) และเมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ระเหยไปจากสภาพแวดล้อม ก็จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเหมาะแก่การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต (สมการที่ 4) (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23)



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



### การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย (Microbial carbonate precipitation by way of urea hydrolysis)

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

การเกิด MCP ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาการจับสารรังสี radionucleotide ของธาตุ strontium<sup>90</sup> (<sup>90</sup>Sr<sup>2+</sup>) ซึ่งพบว่าการตกตะกอนของ <sup>90</sup>SrCO<sub>3</sub> สามารถป้องกันการแพร่กระจายการปนเปื้อนของ radionucleotide ในชั้นใต้ผิวดินที่มีน้ำใต้ดินไหลผ่านได้ (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Warren, et al., 2001, pp. 93-115) นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่แล้ว (indigenous microbial population) และส่งเสริมให้เกิด MCP โดยการเติมยูเรียที่มีความเข้มข้นสูงและแคลเซียมที่มีความเข้มข้นต่ำลงไป เพื่อการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1 ซึ่งจากการศึกษาตัวอย่างของน้ำใต้ดินทั้งหมดนั้น ตรวจพบว่ามิกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity) เกิดขึ้น

ซึ่งชี้ให้เห็นว่า urease activity เป็นปฏิกิริยาที่ง่ายและสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Mobley and Haudinger, 1989, pp. 85-108) จากความสำเร็จในการศึกษาการจับสารรังสี radionucleotide ของธาตุ strontium<sup>90</sup> โดยการแทนที่แคลเซียมด้วย strontium ในผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตนั้น ได้ค้นพบว่าอัตราการตกตะกอนแคลไซต์มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรีย ซึ่งในเบื้องต้นนี้หมายความว่าจุลินทรีย์ส่งเสริมให้เกิดการตกตะกอนแคลไซต์ได้ เนื่องจากทำให้การเกิดสภาวะความเป็นด่าง (alkalinisation) ขึ้นในสภาพแวดล้อมของการตกตะกอน (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318)

การเกิด MCP ได้เคยถูกนำไปใช้ในการกำจัดแคลเซียมไอออนออกจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งการเกิด MCP ผ่านกระบวนการ urea hydrolysis นั้นดีกว่าการกำจัดแคลเซียมไอออน ด้วยสารเคมีโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เนื่องจากยูเรียมีราคาถูก และการตกตะกอนแคลไซต์อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ น้ำที่มีแคลเซียมไอออนปนอยู่จะก่อให้เกิดปัญหามากมายให้กับโรงงานอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากจะทำให้เกิดการตกตะกอนของ  $\text{CaPO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  และ  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ในอุปกรณ์หรือเครื่องมือในโรงงาน (Hammes, et al., 2003a, pp. 191-201; Hammes, et al., 2003c, pp. 699-704) และจากการวิจัยพบว่า สามารถกำจัดปริมาณแคลเซียมไอออนได้สูงถึง 0.5 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของแคลเซียมที่มีอยู่ในน้ำเสียที่ใช้ทดสอบ โดยการเติมยูเรียที่มีความเข้มข้นต่ำ (ตาราง 1) ในแบคทีเรียบางชนิด กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสสามารถเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่าเมื่อมีปริมาณแคลเซียมเข้มข้น 30 mM ปะกุกอยู่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแคลเซียมสามารถส่งเสริม urease activity ได้ นอกจากนี้ยังมีอัตราการเกิดผลึกตะกอนที่มีรูปร่างและขนาดของผลึกได้แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยการควบคุมอัตราการเกิด urea hydrolysis (Hammes, et al., 2003b, pp. 4901-4909)

ตาราง 1 การผลิต  $\text{CaCO}_3$  โดยจุลินทรีย์ที่สร้างคาร์บอเนตจากกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย

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

หมายเหตุ: n/s = not stated

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

สำหรับการศึกษาเพื่อวัตถุประสงค์ในด้านการก่อตัวเป็นซีเมนต์นั้น ถือว่าการเพิ่มความแข็งแรงระหว่างอนุภาคและคุณภาพของการตกตะกอนแคลไซต์เป็นสิ่งที่สำคัญมาก ซึ่ง Ramachandran, et al. (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของการเกิด MPC โดยผ่านปฏิกิริยา urea hydrolysis ในด้านอิทธิพลของปริมาณชีวมวลที่มีต่อความแข็งแรงของก้อนปูนซีเมนต์พอร์ตแลนด์ (Portland cement) โดยการใช้แบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนโดสปอร์และผลิตเอนไซม์ยูเรียเอสผสมกับปูนซีเมนต์และทราย แล้วใส่ลงในแม่พิมพ์เพื่อทำให้เป็นก้อนสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5 เซนติเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแกะออกจากแม่พิมพ์แล้วนำไปบ่มแช่ในสารละลายผสมของยูเรียและแคลเซียม เป็นเวลา 28 วัน (ตาราง 1) ผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในด้านปริมาณของแคลไซต์ที่ตรวจพบได้ระหว่างในชุดการทดลองและชุดควบคุม แต่พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียต่ำสุด ( $7.6 \times 10^3$  เซลล์/มิลลิลิตร) ความแข็งแรงของก้อนปูนซีเมนต์ในชุดการทดลองเพิ่มขึ้น 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียสูงสุด ( $7.6 \times 10^7$  เซลล์/มิลลิลิตร) พบว่าไม่ได้ช่วยทำให้ความแข็งแรงของก้อนปูนซีเมนต์เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอัตราการสร้างแคลไซต์อย่างช้าๆ ช่วยเพิ่มความแข็งแรงได้ดีกว่าอัตราที่เกิดขึ้นเร็ว แต่การทดลองนี้ก็ยังไม่

สามารถสรุปได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากขาดการตรวจวัดความแตกต่างของปริมาณแคลไซต์ที่สะสมทั้งก่อนและหลังทำการทดลอง

จากผลการทดลองต่างๆ โดยนักวิจัยหลายๆ ท่านที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จะพบว่าอยู่บนพื้นฐานของความคิดที่ว่าจุลินทรีย์สามารถช่วยส่งเสริมการตกตะกอนแคลไซต์โดยผ่านทางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ทำให้สภาพแวดล้อมมีความเป็นด่าง (alkalinity) เกิดขึ้น (Castanier, et al., 2000a, unpagged; Ehrlich, 1998, pp. 45-60; Fujita, et al., 2000, pp. 305-318) จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยูเรียทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตรา 1:1 โมลาร์ (ดังสมการที่ 7) ดังนั้นถ้ามีความเข้มข้นของยูเรียสูง ปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ก็ควรจะเพิ่มสูงมากขึ้นด้วย ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์นั้นถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการตกตะกอนแคลไซต์ ดังนั้นกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียจึงถือได้ว่าเป็นกระบวนการที่สำคัญยิ่งสำหรับการที่จะทำให้เกิด MCP ในอัตราสูง เพราะไม่เพียงแต่ทำให้เกิดสภาพความเป็นด่าง แต่ยังทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์อย่างรวดเร็วอีกด้วย

### **การเกิด MCP เพื่อสร้างความแข็งแรงของวัสดุที่มีรูพรุน**

นอกเหนือจากการเกิด MCP โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียแล้วยังมีนักวิจัยที่ทำการศึกษาโดยผ่านกระบวนการอื่นๆ เพื่อวัตถุประสงค์ในการสร้างความแข็งแรงให้ก้อนหิน เช่น Tiano, et al. (1999) ทำการศึกษาการตกตะกอนแคลไซต์โดยวิธีชีวภาพบนตัวอย่างหินปูน (limestone) เพื่อการป้องกัน (preservation) การผุพังของอนุสาวรีย์ที่ทำจากหินปูน และศึกษาผลกระทบที่มีต่อปริมาณของรูพรุน ความแข็งแรงทนทาน และสีของวัสดุ โดยนำขึ้นตัวอย่างหินปูนแช่ในสารละลายแบคทีเรียที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของรูพรุน (โดยดูจากปริมาณของน้ำที่สามารถซึมเข้าไปในก้อนหินปูน) ลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์หลังจากทำการทดลอง โดยครึ่งหนึ่งของเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงนี้เนื่องจากการตกตะกอนของแคลไซต์และอีกครึ่งหนึ่งเนื่องมาจากการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ได้สร้างแคลไซต์อุดขวางรูอยู่ นอกเหนือจากการตกตะกอนแคลไซต์ในรูพรุนของก้อนหิน ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความแข็งแรง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านของสีของวัสดุในบริเวณที่มีการตกตะกอน และพบมีการเจริญของเชื้อราบนพื้นผิวของตัวอย่าง นอกจากการทดลองของ Tiano, et al. (1999) แล้วได้มีการทดลองและประยุกต์ใช้การเกิด MCP เพื่อสร้างแคลไซต์ในอนุสาวรีย์หินและมีการจดสิทธิบัตรอีก 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกเกี่ยวกับการป้องกันพื้นผิวของหินโดยวิธีการสเปรย์แบคทีเรียและสารอาหาร จากนั้นตามด้วยการให้สารละลายอาหารอย่างเดียว ซึ่งผู้ที่คิดค้นวิธีการนี้รายงานว่ามีตะกอนแคลไซต์

เกิดขึ้นและหนา 2-3 ไมโครเมตร (Castanier, et al., 2000a, unpagged) ต่อมา Rodriguez-Navarro, et al. (2003) ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า มีความลึกของการเกิด cementation ถึงประมาณ 500 ไมโครเมตร เมื่อใช้วิธีการแซ่ชั้นหินปูนตัวอย่างในแบคทีเรียและสารอาหาร และเนื่องจากการเกิด cementation โดยวิธีนี้จะค่อนข้างบางและอยู่ที่พื้นผิวของหิน ดังนั้นการประยุกต์ใช้ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการป้องกันมากกว่าการทำเพื่อซ่อมแซมวัสดุและไม่เหมาะสำหรับการเสริมความแข็งแรงให้กับวัสดุที่ไม่แข็งแรง

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

### Calcite In-situ Precipitation System (CIPS)

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

### ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิด cementation

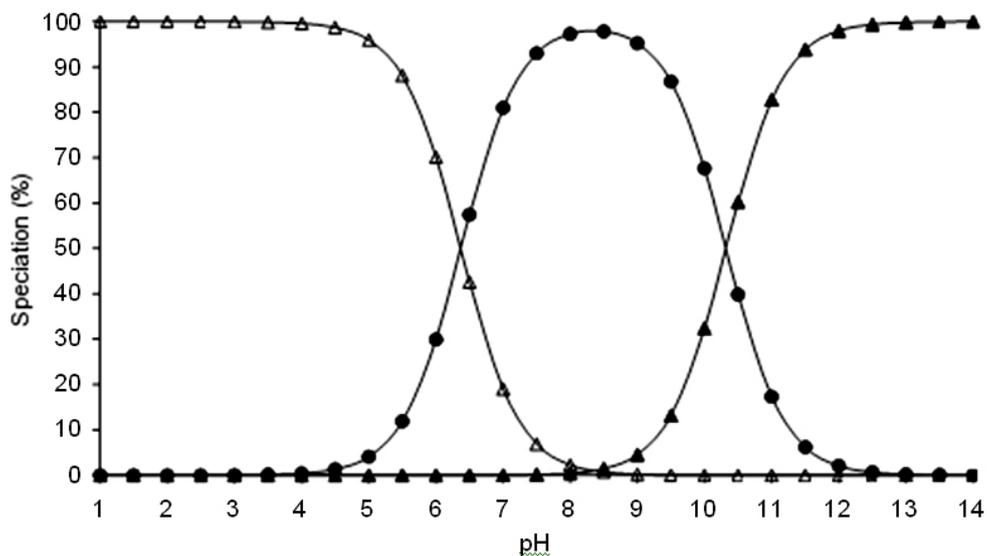
ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นโดยมีผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป็นจุดศูนย์กลางในการตกตะกอน โดยมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง 3 ประการ คือ 1) ปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียม 2) ปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอเนต และ 3) ความเป็นกรด-ด่างของสภาวะแวดล้อมที่ซึ่งมีผลต่อชนิดของคาร์บอเนต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

แคลไซต์ที่เกิดขึ้น (Ksp) มีค่าต่ำมาก ( $3.33 \times 10^{-9}$  โมลต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) (Sawada, 1998, pp. 39-68) การตกตะกอนสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายโดยการผสมไอออนที่ละลายได้ของแคลเซียมและคาร์บอเนต ที่ระดับความเข้มข้นปานกลาง โดยผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นผงแต่ยังมีความเป็นซีเมนต์ต่ำ

ความแตกต่างระหว่างปริมาณความเข้มข้นอิ่มตัว (saturation) และปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturation) เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ควบคุมอัตราการตกตะกอน (Bodek, et al., 1988, unpagged) โดยทั่วไปแล้ว เมื่อปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวมากมีปริมาณไอออนสูง อัตราการตกตะกอนก็จะเกิดขึ้นเร็ว และผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก ดังตัวอย่างเช่นในการผสมกันของแคลเซียมและคาร์บอเนตโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี และเมื่อมีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปริมาณความเข้มข้นที่อิ่มตัวมากเกินไป และระดับของความไม่สมดุล (degree of disequilibrium) ยังอยู่ในระดับที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับในตัวอย่างของสารเคมี จะส่งผลให้เกิดการสร้างผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อปล่อยให้เวลาผ่านไป รวมทั้งมีความเป็นซีเมนต์สูงขึ้นด้วย

ระดับความอิ่มตัวมากของคาร์บอเนตไอออนสามารถทำให้เกิดขึ้นได้โดยการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH) ซึ่งสัดส่วนของปริมาณคาร์บอเนตทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในรูปของ  $\text{CO}_3^{2-}$  ในสารละลายตลอดเวลานั้นขึ้นอยู่กับ pH ถ้า pH มีค่าต่ำกว่า 8 ความเข้มข้นของคาร์บอเนตจะต่ำมาก (ภาพ 1) ซึ่งหมายความว่า ถ้าต้องการให้ผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้นจะต้องลดค่า pH ลงและในทางกลับกันถ้าต้องการให้ผลึกมีขนาดเล็กลงจะต้องเพิ่มค่า pH ให้สูงขึ้น

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะใช้หลักการเกิด MCP และการประยุกต์ใช้ในลักษณะแบบ CIPS ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์สามารถช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับหินประดับ เช่น อิฐบล็อกจากประสานชนิดที่มีความแข็งแรงของพื้นผิวอ่อนนุ่ม ร่วนง่ายและมีรูพรุนในเนื้อวัสดุมาก ซึ่งในการที่จะทำให้ระดับการเกิด cementation มีเพิ่มมากขึ้นจึงจำเป็นต้องมีการสร้างแคลไซต์ในปริมาณที่มากด้วย ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้จึงต้องมีคุณสมบัติที่ทนต่อยูเรีย แคลเซียม แอมโมเนียม และไนเตรตหรือคลอไรด์ (ขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือแคลเซียมที่ใช้) ได้สูงด้วย



ภาพ 1 Chemical speciation ของ H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (△), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (●) และ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (▲) ที่ 25°C

ที่มา: Calculated from Atkins, 2002, unpagged

### แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

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

1. Constitutive: การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ที่สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมภายนอก

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

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

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

ดังนั้น จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ยูรีเอสสำหรับทำซีเมนต์ชีวภาพ (biocementation) จึงต้องทนต่อความเข้มข้นสูงๆ ของยูเรียและแคลเซียมได้ นอกจากนี้ จุลินทรีย์จะต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงและสร้างเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่องหรือสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้

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

เช่นเดียวกับความต้องการแบคทีเรียที่สามารถเกิด biocementation ได้ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ต้องปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และในกรณีที่ถูกนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์นั้นต้องไม่ก่อโรค ไม่มีการติดต่อทางพันธุกรรม และต้องไม่มีการส่งผ่านสารหรือคุณสมบัติใดๆ เช่น การดื้อยา ที่จะไปเพิ่มการก่อโรคหรือความรุนแรงในการเกิดโรคของจุลินทรีย์ที่อยู่ใน

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

**ตาราง 2** กลุ่มของจุลินทรีย์ที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสไม่ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม

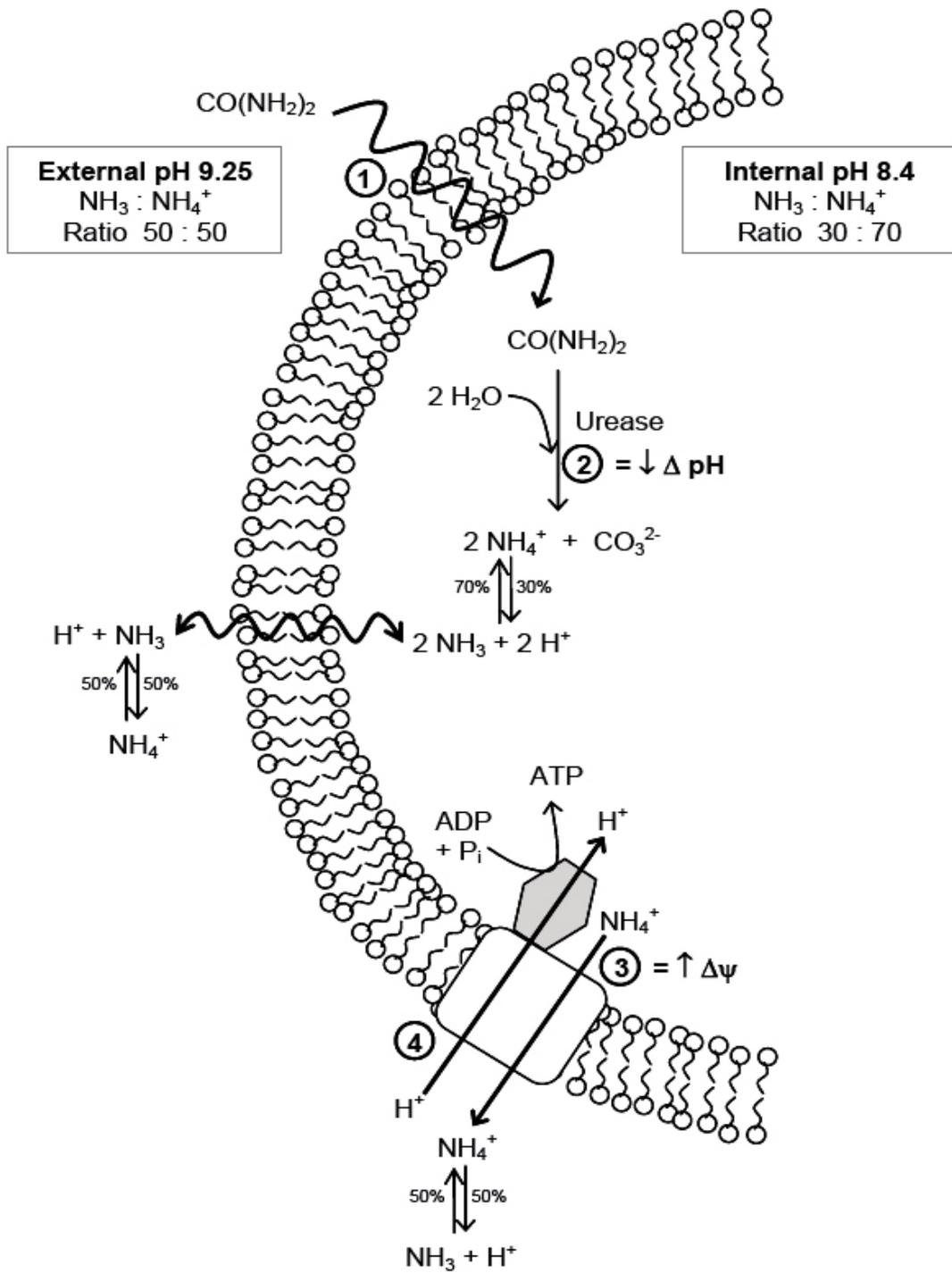
Microorganisms	High activity	Not repressed by NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Not Pathogenic or Genetically modified
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ( <i>Bacillus pasteurii</i> )	✓	✓	✓
<i>Proteus vulgaris</i>	Unknown	✓	Moderated
<i>Proteus mirabilis</i>	Unknown	✓	X
<i>Helicobacter pylori</i>	✓	✓	X
<i>Ureplasma</i> ( <i>Mocillicutes</i> )	✓	✓	X

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

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

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

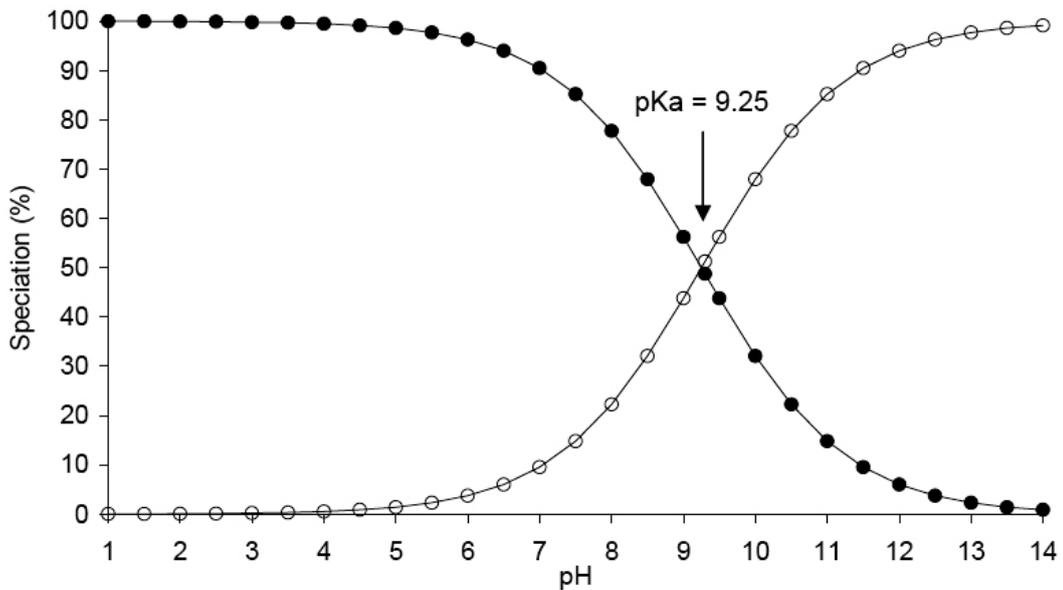
เข้มข้นของโปรตอนที่แตกต่างกันนี้ (high outside / low inside) จะทำให้เกิดการผลักโปรตอนกลับคืนเข้าไปในเซลล์โดยผ่านทาง ATP-synthase ส่งผลให้เกิดการสร้าง ATP ขึ้นมา (Prescott, et al., 1993, unpagged) ในสภาพแวดล้อมสำหรับจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างหรือมี pH สูง จะมีปริมาณโปรตอนภายนอกเซลล์ต่ำ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



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

ที่มา: Jahns, 1996, pp. 403-409

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า ค่า pH 9.25 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *S. pasteurii* นั้นยังมีค่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า dissociation constant (pKa) ของสมดุลเคมี  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  ที่ซึ่ง  $\text{NH}_3$  และ  $\text{NH}_4^+$  มีสัดส่วนปริมาณที่เท่ากัน (50 : 50) ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 Chemical speciation ของ Ammonia ( $\text{NH}_3$ ) (○) และ ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (●) ที่ pH ต่างๆ

ที่มา: Victoria S. W., 2004, unpagged

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

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการอนุรักษ์วัสดุก่อสร้างที่เป็นหินโดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุ เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์โบราณสถาน โบราณวัตถุต่อไป มีขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยเป็น 3 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต

- 1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย
- 1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอน

คาร์บอเนต

- 1.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)
- 1.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส

โดยการศึกษา Urease activity ของเชื้อที่คัดแยกได้

- 1.5 การศึกษาปริมาณตะกอนคาร์บอเนตชีวภาพ
- 1.6 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

ส่วนที่ 2 ขั้นตอนการศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

- 2.1 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย
- 2.2 การศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง

ส่วนที่ 3 ขั้นตอนการศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตกับพื้นผิววัสดุก่อสร้าง

- 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 หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ยี่ห้อ TOMY รุ่น ES315

1.8 ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ Contherm รุ่น M190P

1.9 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น CX21

1.10 กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ 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 บีเปตและไมโครบีเปต

2.4 เสียม พลับมีมือ ถังพลาสติก และกล่องโฟม

2.5 ไม้พันสำลี

2.6 หลอดทดลองขนาด 16X150 และ 13X100 มิลลิเมตร

2.7 แพงแก้วเกลี่ยเชื้อ

2.8 กระจกบดวงขนาด 250, 500, และ 1,000 มิลลิลิตร

2.9 ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

- 2.10 ปีกเกอร์ขนาด 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<sub>2</sub> agar
- 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea CaCl<sub>2</sub> broth
- 5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar ยี่ห้อ HIMEDIA
- 6. ชุดสีย้อมแกรม
- 7. น้ำยาทดสอบคาตาเลส (Catalase test)
- 8. 0.85% sterile saline

### วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูเรียเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต
  - 1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย
    - 1.1.1 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากดินโดยเก็บจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยยูเรียอย่างสม่ำเสมอ และดินจากตะกอนแห่งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งใช้วิธีเก็บตัวอย่างดินแบบ Composite sample โดยการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มอย่างทั่วถึงตลอดบริเวณจำนวน 16 จุดย่อยตามขั้นตอนดังนี้
 

ทำความสะอาดบริเวณที่กำหนดโดยใช้พลั่วมือขุดดินเป็นรูปตัววี (V) ให้มีระดับความลึกไม่เกิน 6 นิ้ว และใช้เสียมแซะด้านหนึ่งของตัววีให้มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว กดเสียมให้ลึกจนถึงก้นหลุม งดดินชั้น แบ่งดินด้านข้างทั้งสองของเสียมออก แล้วนำดินส่วนที่เหลือใส่ถังพลาสติก กระทำเช่นนี้จนครบทุกจุดที่กำหนด โดยมีปริมาณดินเท่ากันทุกจุด จากนั้นทำการคลุกเคล้าดินที่ได้จากทุกจุด แล้วเทดินกองลงบนแผ่นพลาสติกแล้วทำให้ดินกองพูนตรงกลาง

แบ่งดินออกเป็นสี่ส่วน โดยทำเครื่องหมายบวบนกของดิน แล้วแบ่งดินออกมาหนึ่งส่วน ประมาณ 1 กิโลกรัม สามส่วนที่เหลือให้ทิ้งไว้ในพื้นที่แปลงเดิม ดินที่แบ่งมานี้ให้บรรจุลงในถุงพลาสติก แล้วนำไปใส่กล่องโฟมเพื่อมายังห้องปฏิบัติการต่อไป

1.1.2 การสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากพื้นผิวสตูปเจดีย์ โดยเก็บจากสตูปเจดีย์วัดโบราณในเขตอำเภอเมืองพิษณุโลก และใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบ swab method โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วชุบ 0.85% sterile saline และข้างหลอด ให้นำน้ำไหลออกจากสำลี จากนั้นใช้ไม้พันสำลีเช็ดบริเวณพื้นผิวสตูปเจดีย์ให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางนิ้ว ต่อหนึ่งจุด แล้วนำไม้พันสำลีที่เช็ดพื้นผิวแล้วมาใส่ในหลอดเดิมพร้อมกับปิดฝาหลอด ทำเช่นนี้ทั้งหมดจำนวน 16 จุด หลังจากนั้นนำมาแช่ในกระตักน้ำแข็งเพื่อมายังห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต

1.2.1 นำดินจากพื้นที่เกษตรกรรม ดินภาคตะกอนแห้งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล และจากพื้นผิวสตูปเจดีย์แล้วนำตัวอย่างจากทั้งสามแหล่งมาทำการเจือจาง (serial dilution) และบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม endospore-forming bacteria จากนั้นทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea-CaCl<sub>2</sub> agar (Hammes, et al., 2003b, pp. 4901-4909) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน โดยสังเกตผลการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอนเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate ลงบนอาหาร nutrient agar plate จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นเลี้ยง nutrient agar slant เพื่อใช้ในการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสต่อไป

1.2.2 การทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ทำโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร urea agar โดยสังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหาร 10% glycerol medium เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

### 1.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส (urease activity)

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

1.3.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส ทำโดยการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कที่มีอาหาร 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, unpagged) นำส่วนของสารละลายใสจากข้อ 1.3.2 มาเติมน้ำยา Nessler reagent ในอัตราส่วนสารละลายใสต่อน้ำยา Nessler reagent 25:1 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่ 425 นาโนเมตร ซึ่งใช้สารละลาย  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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 ลูบ ลงในฟลาस्कที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.4.2 ความเป็นกรดต่าง (pH 7, pH 8 และ pH 9) เริ่มจากทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कที่มีอาหาร 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 นำส่วนของสารละลายไปทำการวัด urease activity

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

1.4.4 ความเข้มข้นของแคลเซียม (โดยใช้สารละลาย  $\text{CaCl}_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิโมลาร์) เริ่มจากทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงฟลาस्कที่มีอาหาร nutrient broth 3 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์และระดับ pH ที่เหมาะสม จากข้อ 1.4.2 และมีความเข้มข้นยูเรียที่เหมาะสมจากข้อ 1.4.3 แล้วบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำหมัก (fermentation broth) ไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ที่ความเร็วรอบ 10,750 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของสารละลายไปทำการวัดค่า urease activity

## 1.5 การศึกษาปริมาณตะกอนคาร์บอนेटชีวภาพ

1.5.1 ในชุดการทดลองที่มี  $\text{CaCl}_2$  และชุดควบคุมที่ไม่มี  $\text{CaCl}_2$  ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีระดับ pH ความเข้มข้นของยูเรียและความเข้มข้นของ  $\text{CaCl}_2$  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 แล้วใช้น้ำหนักค่าสุดท้ายเป็นค่าน้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนेट

### 1.5.2 การคำนวณหาน้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนเนตจากสูตร

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

$W_{Ca}$  คือ น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนเนตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 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. ขั้นตอนการศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

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

1.7.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ โดยการถ่ายเชื้อ 1 ลูบ ลงพลาสติกที่มีอาหาร 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<sub>2</sub> 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<sub>3</sub> และล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ค่า pH ของน้ำล้างเท่ากับ 7 นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อทรายแห้งดีแล้ว ทำการชั่งทราย 70 กรัมจากนั้นนำมาทำปราคาจากเชื้อ โดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น

นำตัวอย่างทรายบางส่วนไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Leo1455VP

1.7.3 การทดลองการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทราย โดยนำเชื้อที่ทำเป็นเซลล์แขวนลอยในอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาผสมกับทรายที่ผ่านการเตรียมแล้ว นำส่วนผสมที่มีลักษณะคล้ายโคลนทรายไปบรรจุลงในกระบอกฉีดยาพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกันในชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียซึ่งใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth เพียงอย่างเดียว นำคอลัมน์ทั้งสามมาตั้งไว้ในแนวตั้ง (ภาพ 4) บ่มที่อุณหภูมิห้องและทำการให้อาหารชนิดเดียวกันกับการผสมครั้งแรกทุกวัน จนกระทั่งไม่สามารถให้ได้อีก โดยสังเกตจากการที่ไม่มีอาหารไหลออกมาจากคอลัมน์ จึงหยุดการทดลอง แล้วนำคอลัมน์ทรายที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาอัตราการเกิดตะกอน CaCO<sub>3</sub> โดยวิธี EDTA Titrimetric Method (APHA, 1980) และนำตัวอย่างทรายบางส่วน ไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.7.4 การหาอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยวิธี EDTA Titrimetric Method โดยชั่งทรายจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วค่อยๆเติมกรด HCl ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างช้าๆปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายแคลเซียมคาร์บอเนตออกจากเม็ดทราย ปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตในครั้งแรก ทำการกรองเอาเม็ดทรายออก นำสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต 300 มิลลิลิตรไปต้มประมาณ 5 นาทีเพื่อไล่ก๊าซ CO<sub>2</sub> 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 เติมผงเมอร์เฟกไซด์ อินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไทเตรทกับสารละลายมาตรฐาน EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ทำการไทเตรทจากสีชมพู (สีเริ่มต้น) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง (จุดสิ้นสุด) การคำนวณ โดยการอ่านปริมาตร EDTA (หน่วยเป็นมิลลิลิตร) นำมาคูณด้วย 20 จะได้ค่ามิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนตต่อลิตรกรัมของทรายตัวอย่าง

1.7.5 การศึกษาทางกายภาพบนพื้นผิวเม็ดทรายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำเม็ดทรายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทรายข้อ 2.1.2 และการทดลองการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทรายข้อ 2.1.3 ติดบน Stub ซึ่งมี

คาร์บอนเทปเป็นวัสดุยึดติดระหว่าง Stub กับเม็دتทราย พยายามติดให้เม็دتทรายเรียงตัวในลักษณะชั้นเดียวไม่เกาะกลุ่มกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ 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 ลักษณะการจัดโมเดลคอลัมน์ทรายตามแนวตั้ง

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 (0.5x1x1 เซนติเมตร) และขนาดใหญ่ (0.5x4.5x2.5 เซนติเมตร) จากนั้นบ่มขึ้นอิฐโดยใช้ผ้าเปียกห่อไว้ เป็นเวลา 7 วัน โดยที่ขึ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กจะเป็นตัวแทนในแง่สภาวะที่เหมาะสม คือมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต และขึ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่จะเป็นตัวแทนที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริง ที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำกว่า แล้วทำขึ้นอิฐตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อโดยการอบด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะห่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างอิฐบางส่วนไปศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

1.8.2 การทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1 ไร่ 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<sub>2</sub> broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และในหลอดทดลองขนาด 24x150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลวดังกล่าวปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำขึ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ที่ซังน้ำหนักรวบรวมแล้วใส่ลงในขวดจำนวน 1 ขึ้นต่อขวด จำนวน 5 ขวดต่อชุดการทดลองที่จะทำการเก็บตัวอย่าง สำหรับขึ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กที่ซังน้ำหนักรวบรวมแล้วใส่ลงในหลอด จำนวน 1 ขึ้นต่อหลอด จำนวน 5 หลอดต่อชุดการทดลองที่จะทำการเก็บตัวอย่าง โดยทำควบคู่ไปกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำหลอดทดสอบไปบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วัน ส่วนฟลาสก์นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ทำการเก็บตัวอย่างขึ้นอิฐทั้ง 2 ขนาด เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม 5, 10, 15, 20 และ 30 วัน ทำการล้างขึ้นอิฐด้วย น้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปซังเพื่อหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของขึ้นอิฐตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น 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 มาทำการแกะเพื่อให้เห็นส่วนของพื้นผิวหลุดล่อนออก จากนั้นนำส่วนของพื้นผิวที่มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร มาติดบน Stub ซึ่งมีคาร์บอนเทปเป็นวัสดุยึดติด พยายามหงายให้ส่วนของพื้นผิวขึ้นและเรียงตัวในลักษณะชั้นเดียวไม่เกาะกลุ่มกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสแตอริโอ 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 มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

3. ขั้นตอนการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตกับหินประดับ

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

วันจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักสุดท้าย ซึ่งเป็นน้ำหนักก่อนการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำ การทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใส ทำโดยใช้ด้านที่ทาสารเคลือบใสแช่ลงในน้ำกลั่นให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนน้ำ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวัน จนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักก่อนการทดลอง จากนั้นนำอิฐจำนวนสิบสองก้อนมาเรียงซ้อนกัน (ภาพ 5) โดยเรียงให้ด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสออกในทางเดียวกันทุกก้อนเพื่อใช้เป็นด้านของการทดลองต่อไป



ภาพ 5 การเรียงอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน

### 3.2 การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโดยวิธีการปั่นและทา

3.2.1 วิธีดำเนินการทดลองในรูปแบบการปั่น โดยทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียด้วยการถ่ายเชื้อ 1 ลูกบอลลูบลงฟลาस्कที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย 50% (v/v) ลงฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนหนึ่งของหัวเชื้อแบคทีเรีย นำไปตรวจสอบการมีชีวิตโดยวิธี Drop plate เพื่อหาค่า CFU ต่อ มิลลิลิตร) จากนั้นนำมาฉีดพ่นให้เป็นละอองด้วยอุปกรณ์ฉีดพ่น ขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ลงบนด้านของอิฐที่ไม่ได้ทาสารเคลือบสี โดยการกดตามฉีดให้สุดหนึ่งครั้งต่อหนึ่งก้อน 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<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร และชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร หลังจากทำการทดลองสิ้นสุดลงในทุกๆวัน ให้ทำการคลุมชุดอิฐการทดลองทุกชุดด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น แล้วคลุมทับด้วยฉนวนกันความร้อนเพื่อป้องกันความร้อนจากแสงแดดอีกหนึ่งชั้น (ภาพ 6 และ 7)

3.2.2 วิธีดำเนินการทดลองในรูปแบบการทำ โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับวิธีการปั่น 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



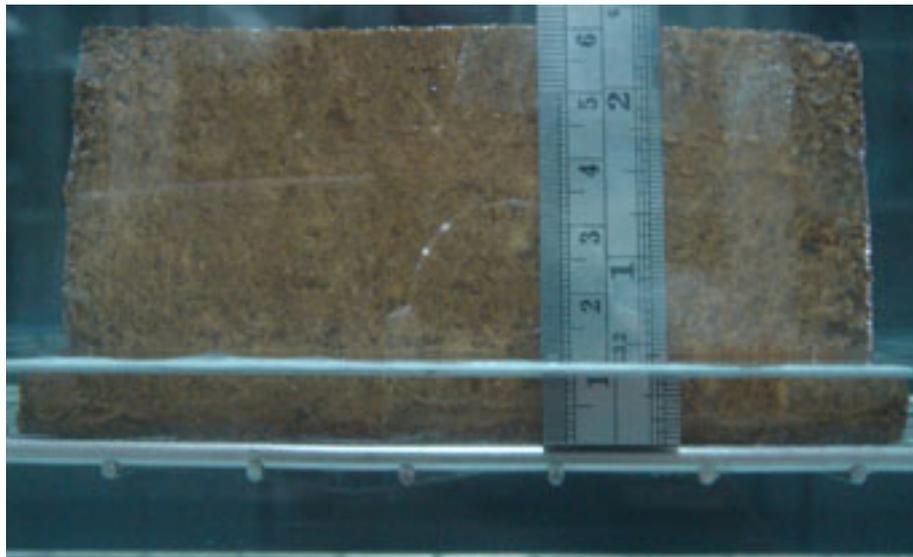
ภาพ 6 การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยถุงพลาสติก



ภาพ 7 การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยฉนวนกันความร้อน

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

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



ภาพ 8 อิฐตัวอย่างที่ถูกทำการแช่ในน้ำกลั่น



ภาพ 9 การซับน้ำส่วนเกินออก

## **การวิเคราะห์ข้อมูล**

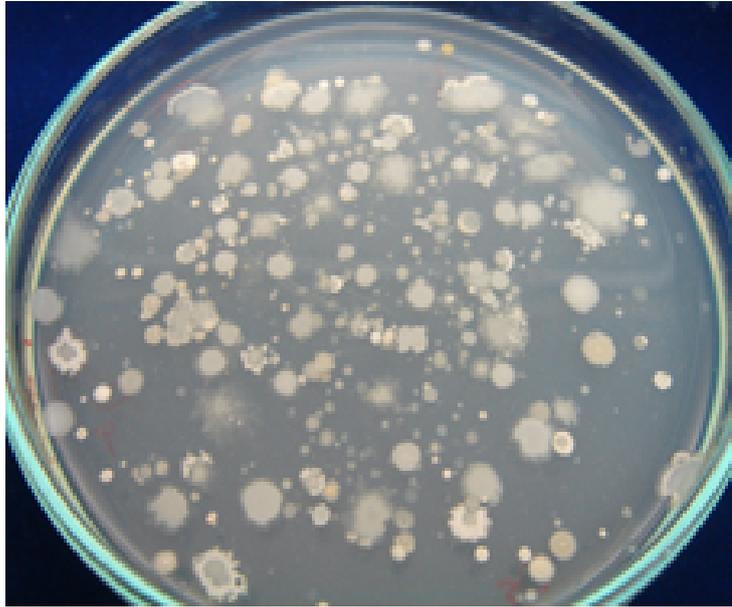
ข้อมูลผลการวิจัยทำการหาค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการแปลผลข้อมูล

## บทที่ 4

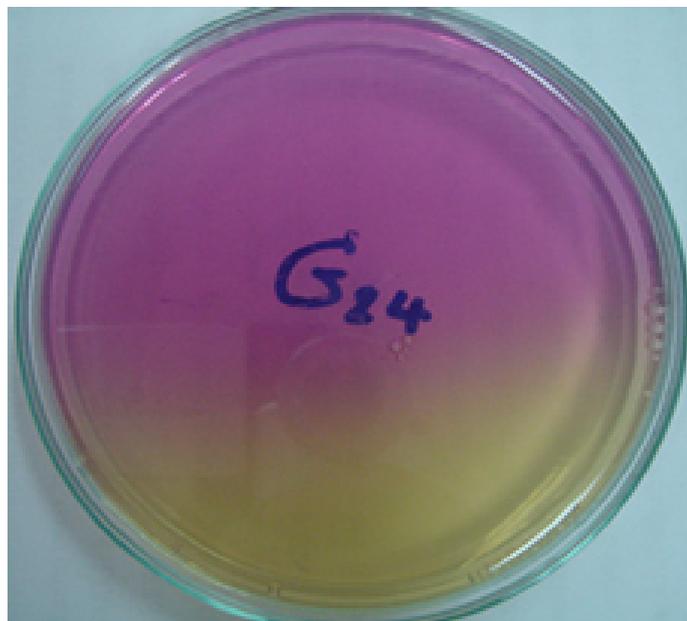
### ผลการวิจัย

#### การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต

ผลการศึกษาหลังจากนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน โดยสังเกตผลการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน (ภาพ 10) จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนต พบว่าในดินจากพื้นที่เกษตรกรรม, ดินภาคตะกอนแห้งของระบบบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล และจากพื้นผิวสฎฐเจดีย์ 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 ให้ผลการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสดีที่สุด (ตาราง 5) ที่ระดับ 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 ซึ่งให้น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตสูงที่สุด 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 12 และ 13) และมีอัตราการเกิดตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียเบื้องต้น ไอโซเลท G27 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ สร้างเอนโดสปอร์รูปร่างวงรีรูปไข่อยู่ปลายเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง (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 การทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส บนอาหาร urea agar

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

แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอน
ดินพื้นที่เกษตรกรรม	33
ดินภาคตะกอนแห่งของระบบบำบัดน้ำเสีย	24
พื้นผิวสตูปเจดีย์	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
พื้นผิวสตูปเจดีย์	P17, P18, P29, P30, P31, P37	P30

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

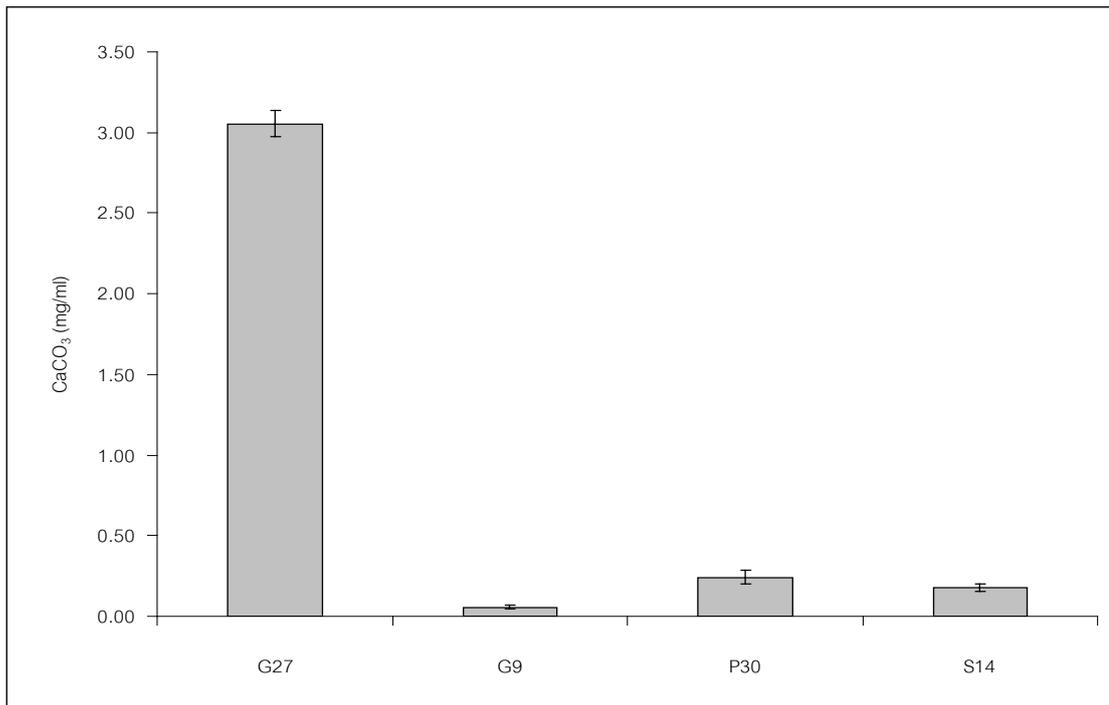
ระดับ pH	Urease activity (unit/ml)					
	G2	G9	G27	S12	S14	P30
7	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01
8	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.03
9	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00

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

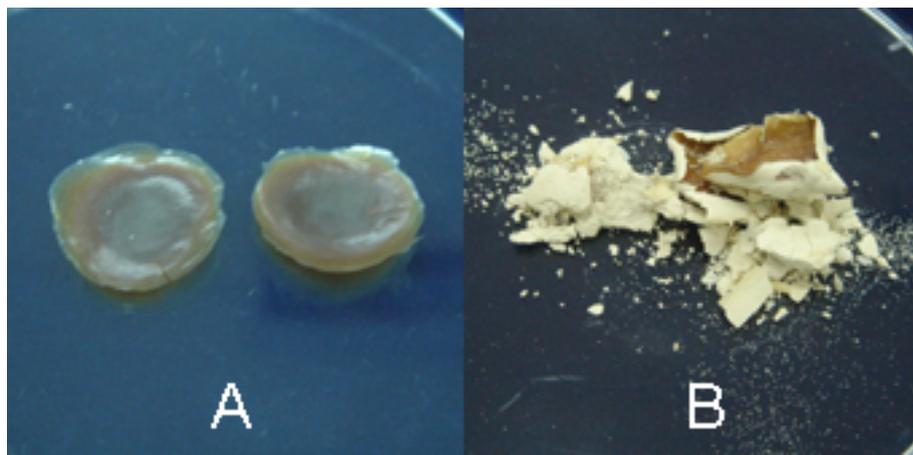
ความเข้มข้นของ ยูเรีย (mM)	Urease activity (unit/ml)			
	G9	G27	P30	S14
25	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.03
50	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.22 ± 0.01
100	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.01
200	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.00
300	0.13 ± 0.02	0.15 ±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

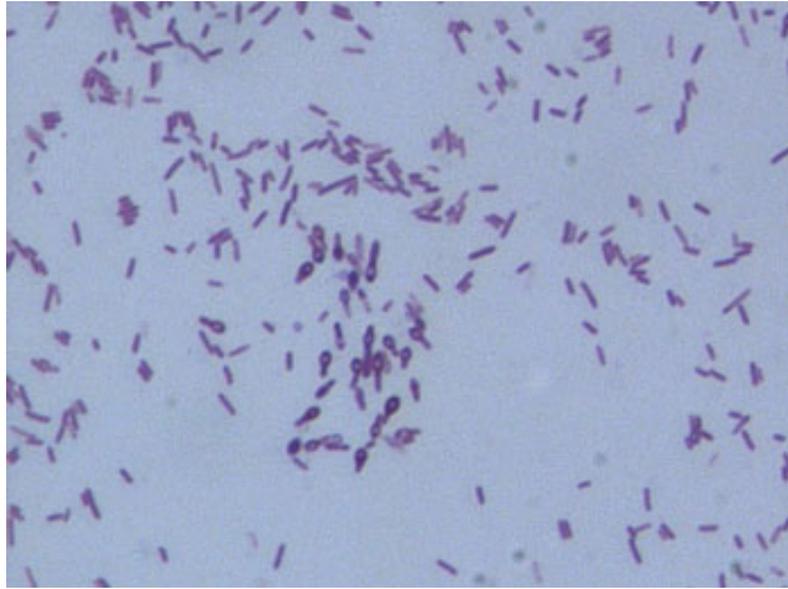


ภาพ 12 น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตที่เกิดจากการชักนำของแบคทีเรีย ในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้นที่ 7 ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์ และ CaCl<sub>2</sub> 30 มิลลิโมลาร์



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

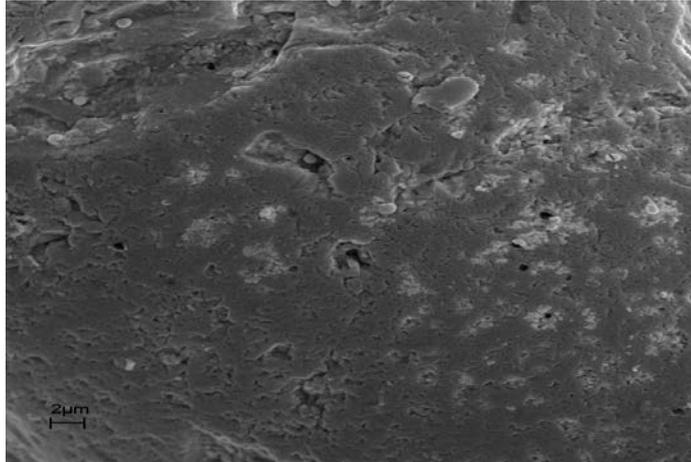
หมายเหตุ: พบว่าไอโซเลท G27 มี 16S rDNA ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* ถึง 99.3 เปอร์เซ็นต์

**การศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตโดยแบคทีเรีย  
ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27**

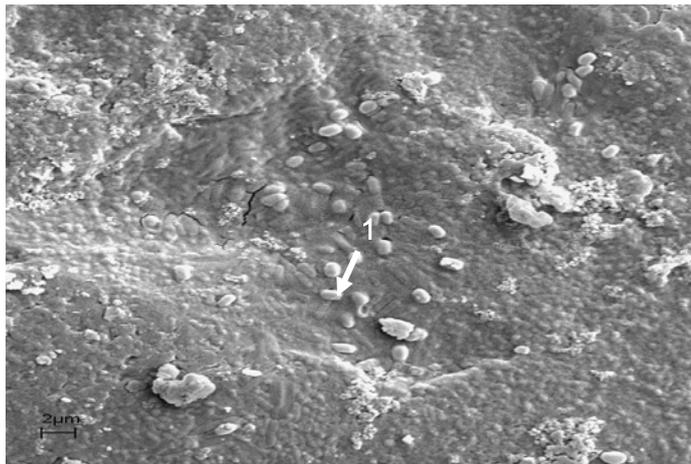
จากการศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเมล็ดทราย ด้วยวิธีคอลัมน์ทราย พบว่าชุดทดลองที่มีอาหารเหลว urea-CaCl<sub>2</sub> broth มีอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตสูงสุดเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน (ตาราง 9) และเมื่อทำการศึกษาทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในส่วนของชุดทดลองที่มีเชื้อ *S. koreensis* G27 ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth มีเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เจริญปกคลุมบริเวณพื้นผิวเมล็ดทรายเป็นปริมาณมากซึ่งถูกเคลือบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (ภาพ 16ข) และพบได้ปริมาณน้อยในชุดทดลองที่มีเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหาร urea broth (ภาพ 16ก) ในส่วนของชุดควบคุมซึ่งใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth โดยปราศจากเชื้อ *S. koreensis* G27 พบว่ามีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญและสามารถชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้แต่มีปริมาณน้อยกว่าในชุดทดลองที่มีเชื้อ *S. koreensis* G27 และถูกเลี้ยงด้วยอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth (ภาพ 15ข) เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวเมล็ดทรายก่อนการนำไปทดลอง (ภาพ 15ก)

**ตาราง 9 อัตราการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเมล็ดทรายโดยแบคทีเรีย  
*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



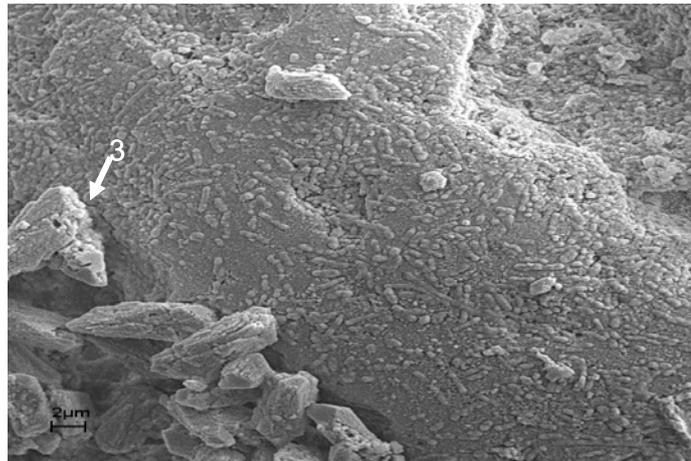
15ข

**ภาพ 15 ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายก่อนการทดลองและในชุดควบคุม**

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



16ก

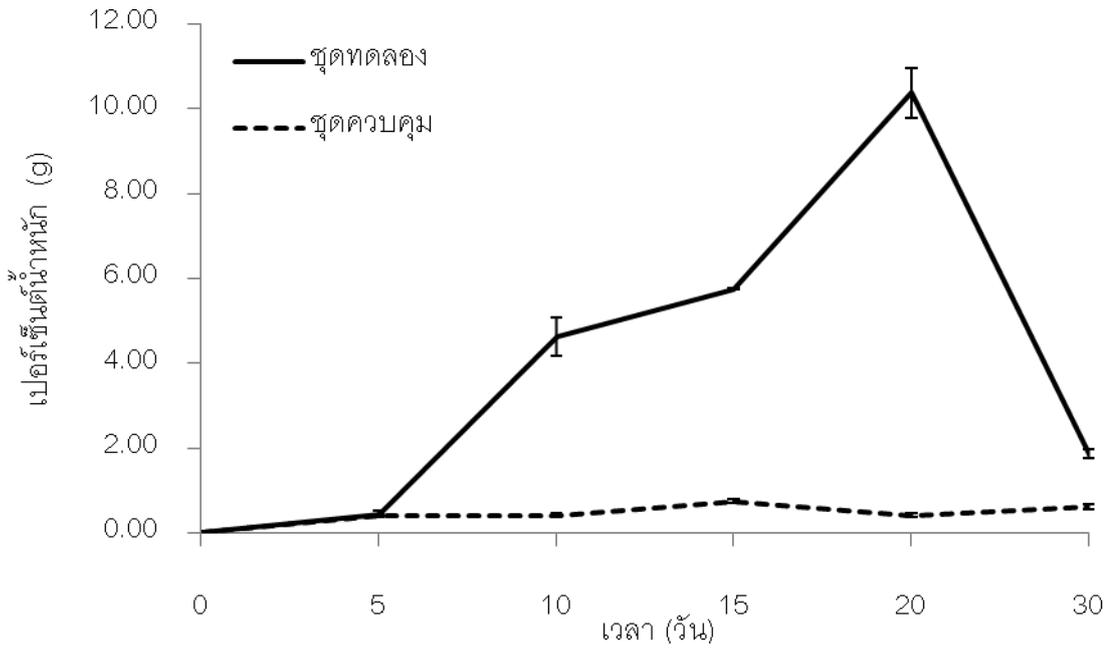


16ข

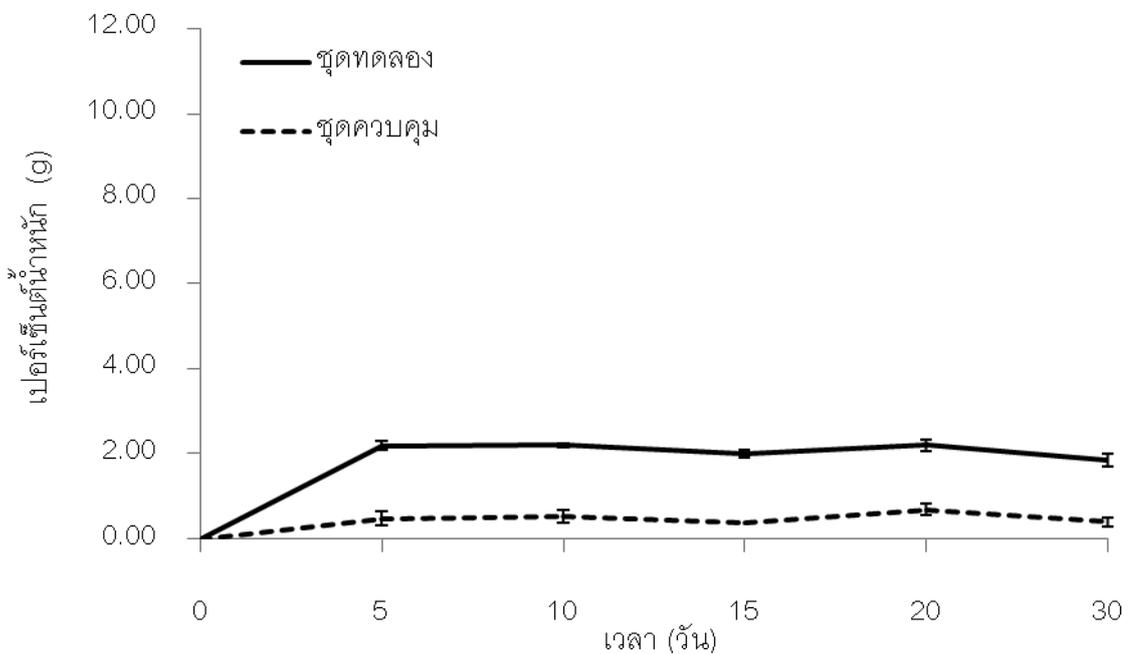
### ภาพ 16 ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายในชุดทดลอง

**หมายเหตุ:** ภายใต้อุปกรณ์ขยาย 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)

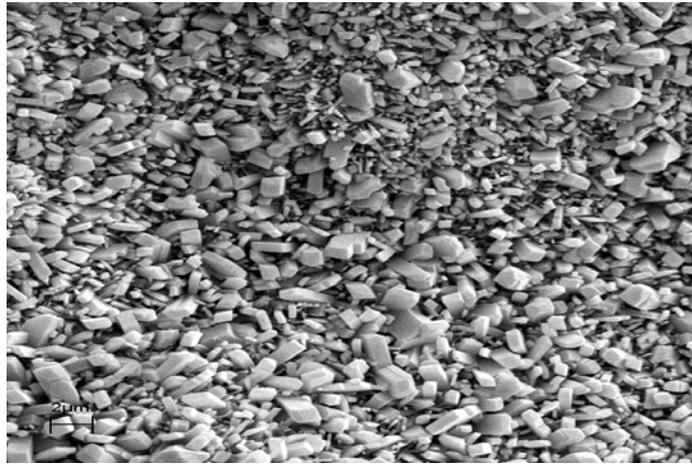
จากผลการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐ โดยการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชิ้นอิฐตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นพบว่าชิ้นอิฐทั้งสองขนาดมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นจะมีค่าต่ำลงมากเมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน ดังภาพ 17 ส่วนชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในอัตราคงที่และมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน (ภาพ 18) เมื่อทำการศึกษาทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในชุดทดลองมีเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเคลือบด้วยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตเจริญอยู่ และยังพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดทับถมกันเป็นชั้น หรือมีลักษณะเป็นก้อนทับถมกันค่อนข้างหลวมบริเวณพื้นผิวของตัวอย่างชิ้นอิฐขนาดเล็ก (ภาพ 20ก) และพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ทับถมกันหนาแน่นบริเวณพื้นผิวของตัวอย่างชิ้นอิฐขนาดใหญ่และปรากฏรอยแตกของตะกอนที่เกิดขึ้นใหม่ทับถมกันบนพื้นผิวตัวอย่างอิฐ (ภาพ 20ข) ในชุดควบคุมพบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ทับถมอยู่เป็นปริมาณน้อยและยังสามารถเห็นองค์ประกอบของพื้นผิวอิฐได้ (ภาพ 19ข) เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างก่อนการนำไปทดลอง (ภาพ 19ก) จากผลการศึกษาข้างต้นบ่งชี้ถึงศักยภาพของจุลินทรีย์ในการนำไปใช้อนุรักษ์พื้นผิววัสดุที่มีรูพรุนได้ต่อไป



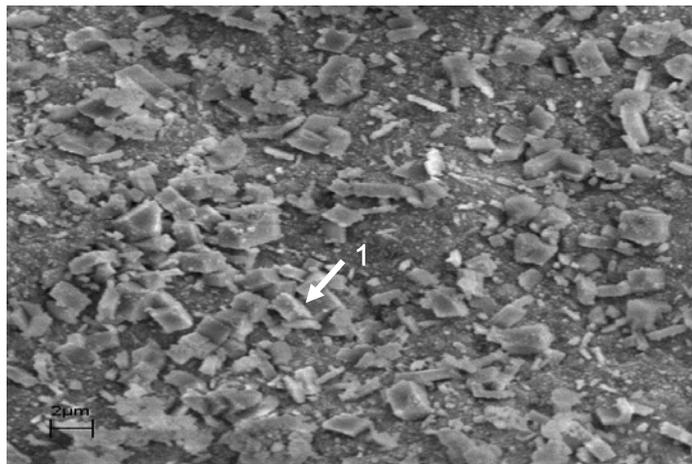
ภาพ 17 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุตัวอย่างขนาดเล็ก (n=5)



ภาพ 18 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุตัวอย่างขนาดใหญ่ (n=5)



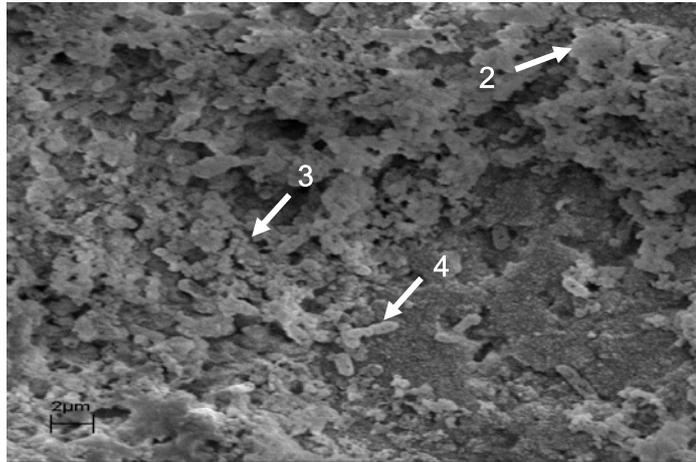
19ก



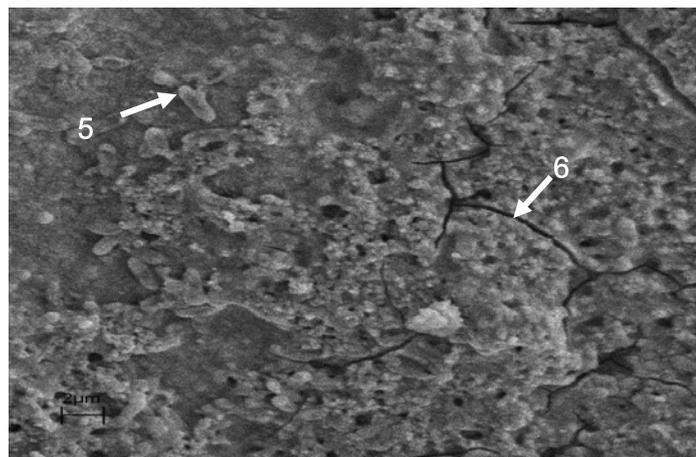
19ข

**ภาพ 19 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างก่อนนำไปทดลองและในชุดควบคุม**

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



20ก

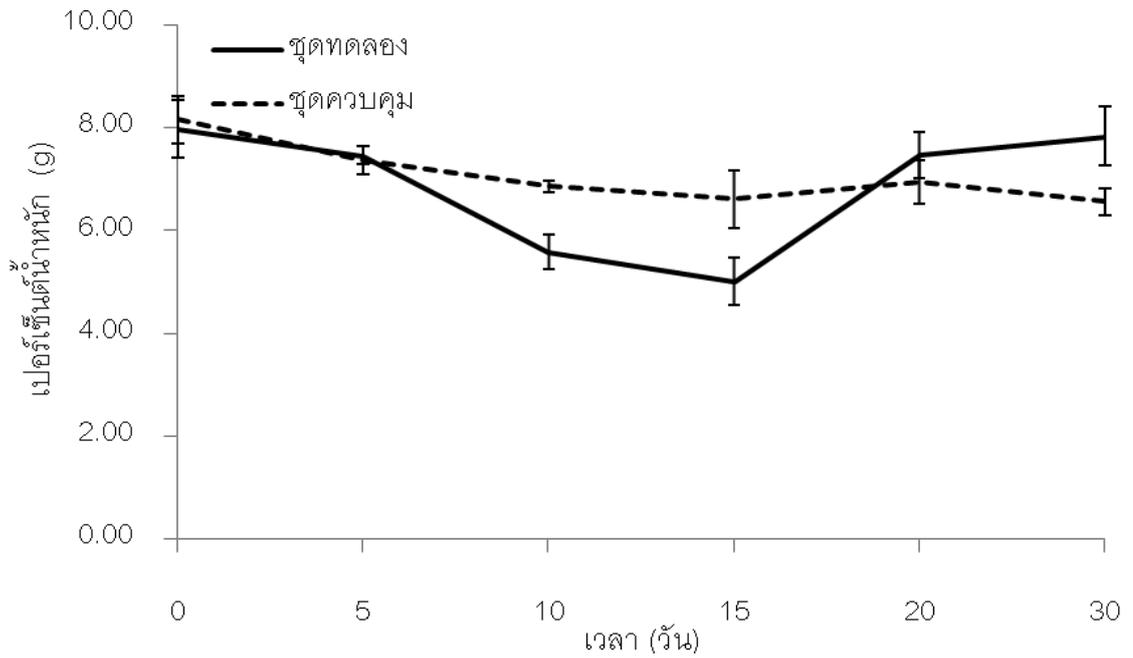


20ข

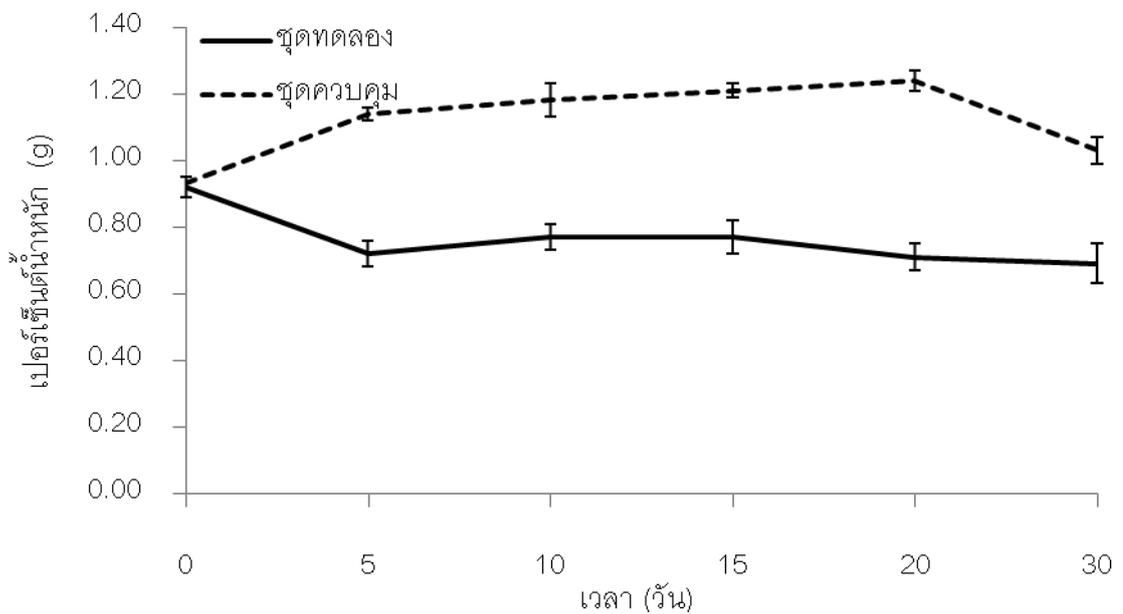
**ภาพ 20 ลักษณะพื้นผิวชั้นอิฐตัวอย่างในชุดทดลอง**

**หมายเหตุ:** ภายใต้กำลังขยาย 2000 เท่า(20ก) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็ก พบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดทับถมกัน (ลูกศร2) ตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนทับถมกัน(ลูกศร3) และตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เคลือบผิวเซลล์แบคทีเรีย (ลูกศร4และ5) (20ข) ชุดทดลองชั้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่พบรอยแตกของตะกอนที่เกิดขึ้นซึ่งทับถมกันบนพื้นผิว (ลูกศร6)

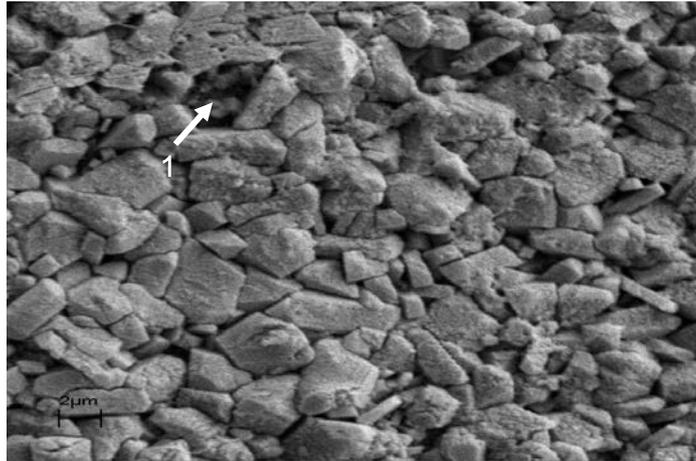
จากผลการทดสอบความแข็งแรง โดยการวัดน้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่าง หลังจากผ่านการ sonication โดยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปมีค่าแปรผกผันลักษณะกับความแข็งแรง พบว่าชุดทดลองชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยที่สุดในช่วงของการบ่มเป็นเวลา 10 และ 15 วัน (ภาพ 21) ส่วนของอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยกว่าชุดควบคุมในทุกช่วงระยะเวล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



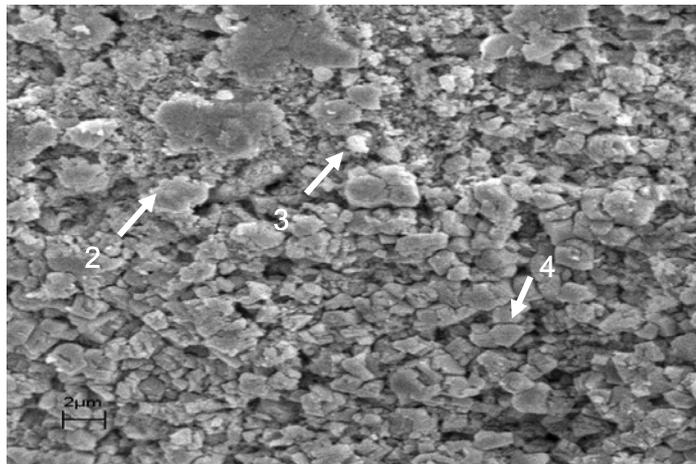
ภาพ 21 น้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กหลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)



ภาพ 22 น้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่หลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)



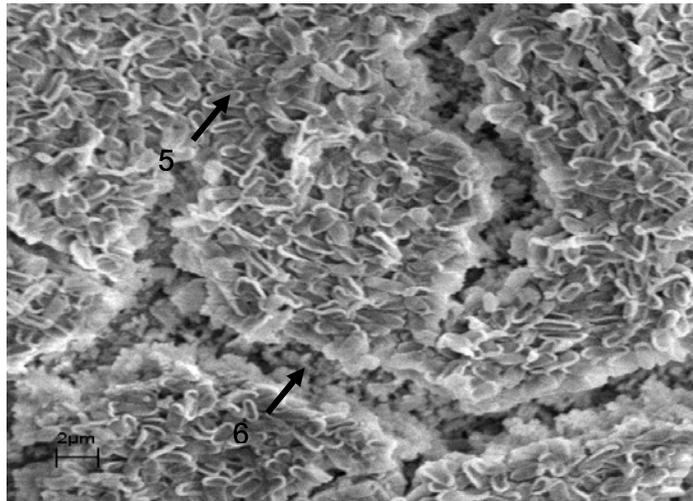
23ก



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 ในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตกับหินประดับ

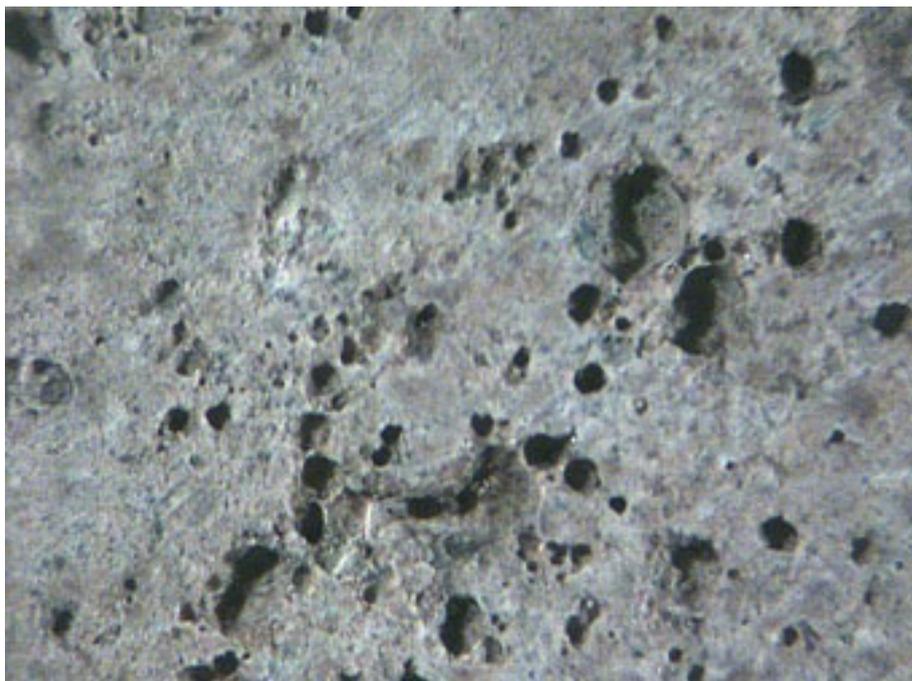
ผลการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตกับหินประดับ (อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร) ในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวนั้นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมบางมาก (ภาพ 26 และ ภาพ 27) และชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร พบว่าพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่ามีตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกันแต่พบปริมาณมากกว่าชุดควบคุมข้างต้น (ภาพ 28 และ 29) ในส่วนของชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พบว่าพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าตะกอนสีขาวนั้นจับตัวกันหนาติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกัน และพบในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมทั้งสอง (ภาพ 30 และ ภาพ 31) เมื่อเทียบกับพื้นผิวโดยรวมและจากกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอของชิ้นอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสก่อนนำมาทำการทดลอง (ภาพ 25) จากการตรวจสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียโดยวิธี Drop plate เพื่อหาค่า CFU ต่อ มิลลิลิตรของหัวเชื้อแบคทีเรียหลังจากบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเชื้อ 2.0x10<sup>7</sup> CFU ต่อ มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้ถุงพลาสติกและแผ่นฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่าง ในตลอดการทดลองนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 77.4 เปอร์เซ็นต์ และ 29.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสที่พื้นผิวอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส ในชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร และชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้น พบว่ามีแบคทีเรียที่มีชีวิตและสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยสังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar เปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพูหลังจากบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (ตาราง 10) และเมื่อทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียซึ่งพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 ทำให้พื้นผิวอิฐตัวอย่างมีโอกาสในการฟูพองเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพการป้องกันน้ำในการเข้าถึงแกนกลางของอิฐตัวอย่างลดลง โดยทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นหลังจากทำการแช่น้ำ ทั้งในรูปแบบการฉีดพ่นและทา พบว่ามีการดูดซึมน้ำเกิดขึ้นที่พื้นผิวอิฐตัวอย่างที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส โดยทั้งนี้ในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้น พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสมีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำน้อยที่สุดคือ 1.51 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และจากการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใสพบว่าสารเคลือบใสมีประสิทธิภาพในการป้องกันน้ำซึมเข้าสู่เนื้ออิฐตัวอย่างเป็นอย่างดีโดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิของการทดลองเดียวกัน (ตาราง 11)



25ก



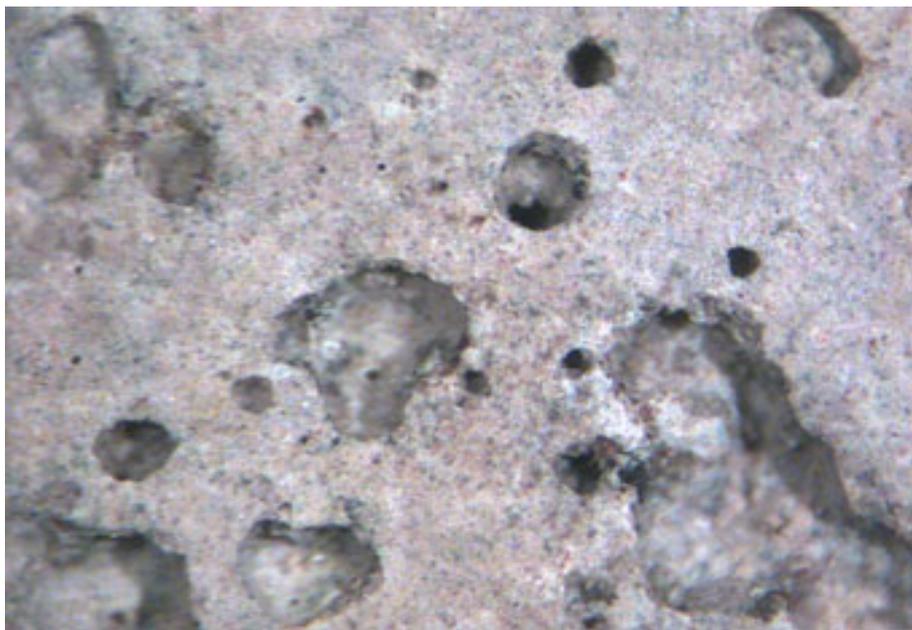
25ข

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



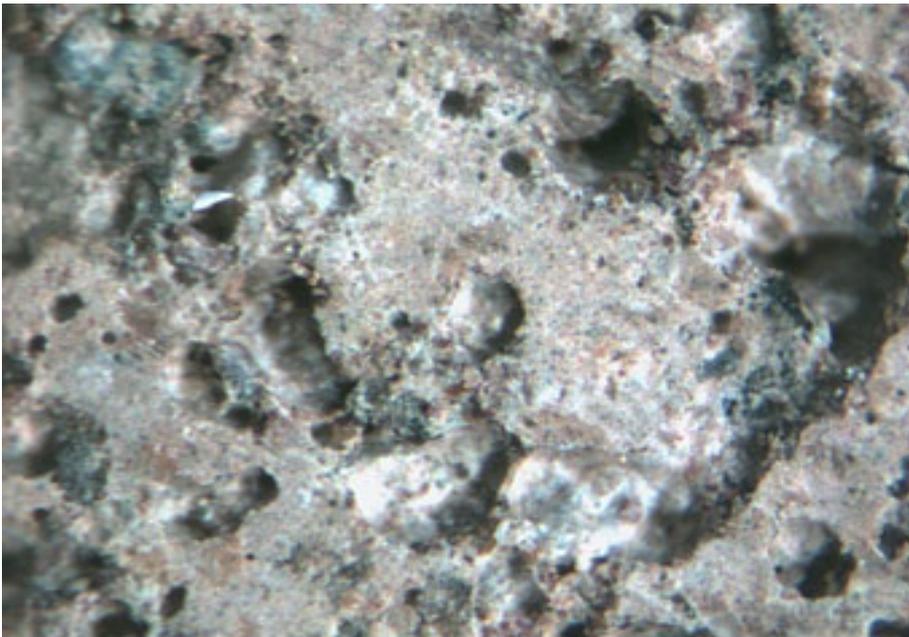
28ข

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

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



29ก



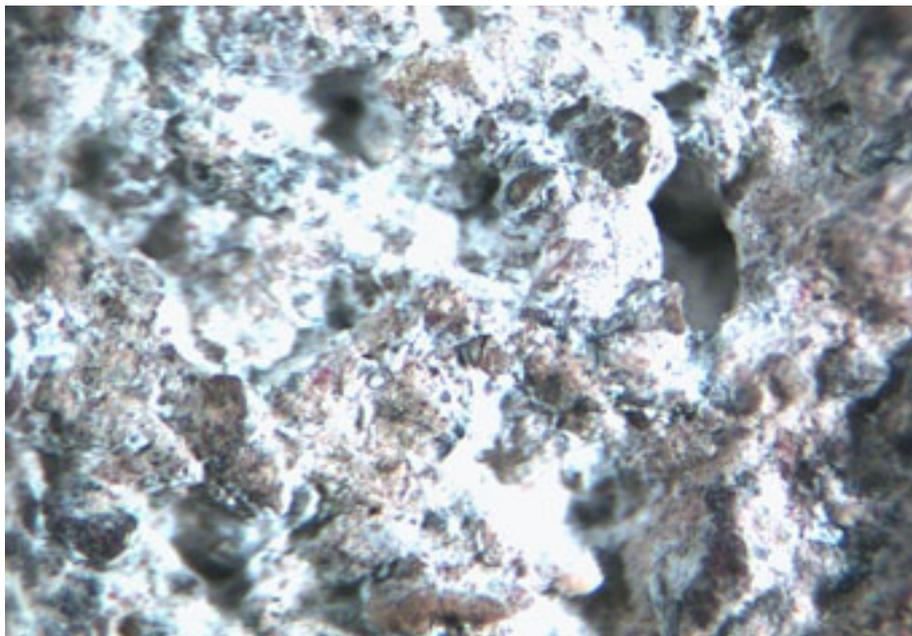
29ข

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

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



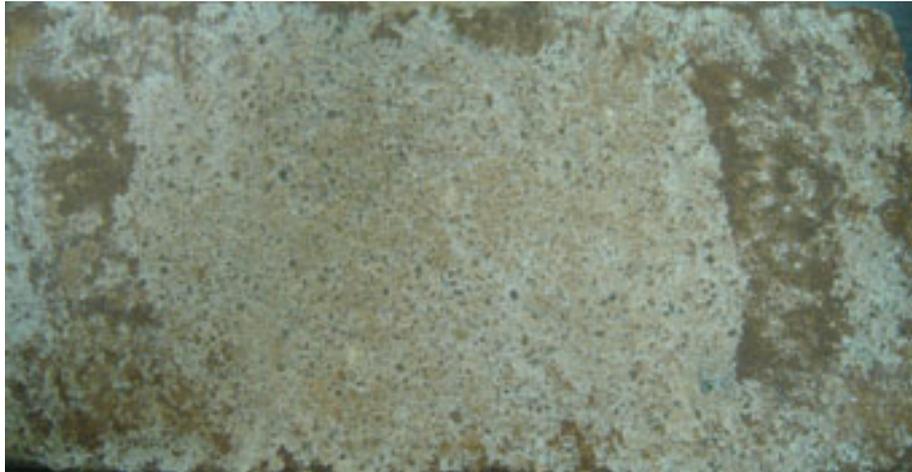
30ก



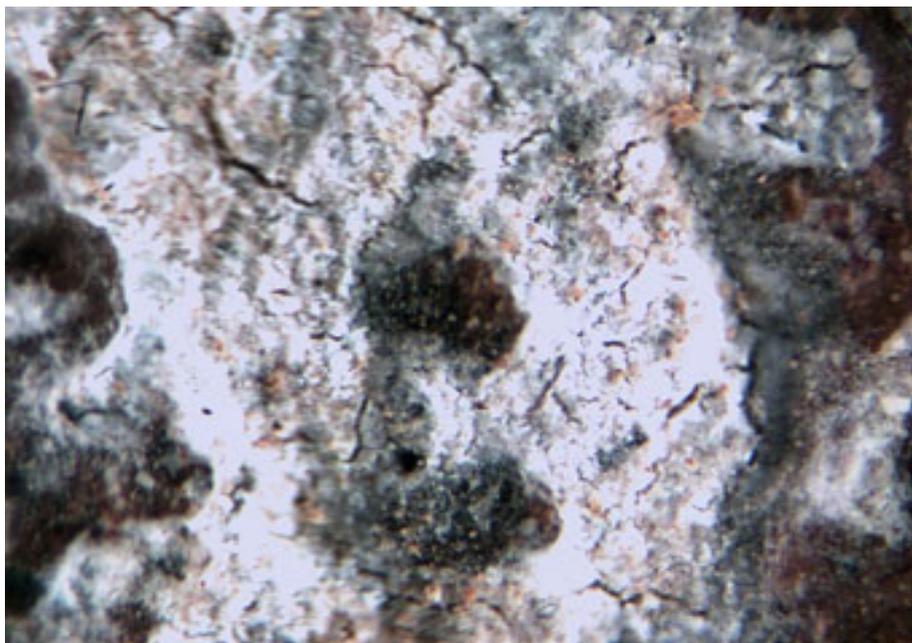
30ข

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 การมีชีวิตของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูเรียเอสบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง

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

หมายเหตุ: SW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีด  
พ่น

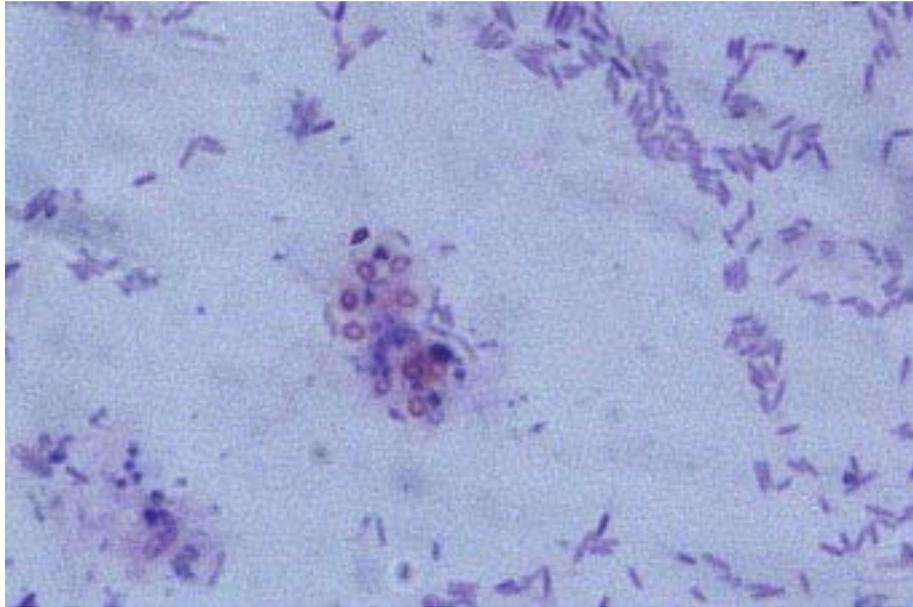
SU คือชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการ  
ฉีดพ่น

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

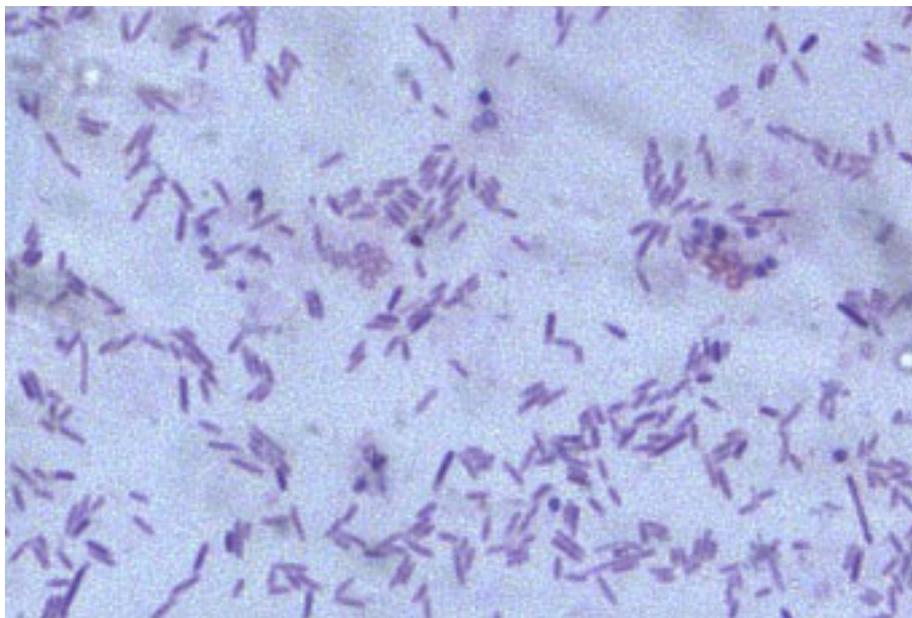
PW คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการทา

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 รูปร่างท่อนสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis* G27

ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส (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 มิลลิลิตรเป็นของเหลวในการฉีดพ่น

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

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

**การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต**

จากการศึกษาสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอนเนตได้ โดยพบว่าไอโซเลท G27 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ได้ สามารถเคลื่อนที่ได้ และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ ให้ประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสดีที่สุดที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 และมีระดับความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสม 50-100 มิลลิโมลาร์ และ  $\text{CaCl}_2$  30 มิลลิโมลาร์ และสามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอนเนตได้น้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีอัตราการสร้างตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง และจากผลการทดลองดังกล่าวจะได้นำไปศึกษาเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

**การศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27**

แบคทีเรีย *S. koreensis* G27 สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตบนพื้นผิวหินอิฐตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตบนพื้นผิวเม็ดทรายสูงถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน และสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง โดยมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตใหม่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความแข็งแกร่งซึ่งสามารถลดการผุกร่อนจากการทำลายโดยวิธีจำลองด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง

## การศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27 ในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง

จากการศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง ซึ่งใช้อิฐตัวอย่างเป็นตัวแทน พบว่าแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตะกอนแคลเซียมคาร์บอนเนตจับตัวกันหนาติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุม เป็นเหตุให้สามารถลดโอกาสการผุพังของอิฐตัวอย่างได้ โดยลดการดูดซึมน้ำซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการผุพังของอิฐตัวอย่าง ทั้งในรูปแบบของการใช้ประโยชน์โดยวิธีการฉีดพ่นและวิธีการทาด้วยของเหลวที่ได้จากการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ( $2.0 \times 10^7$  CFUต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทั้งสองรูปแบบมีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนน้ำลดลงใกล้เคียงกัน

### อภิปรายผลการวิจัย

#### การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนต

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสในแบคทีเรีย ไอโซเลท G2, G9, G27, P30, S12, S14 พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ ให้ผลการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสดีที่สุดที่ pH 7 (ตาราง 5) ความเข้มข้นของยูเรีย 50 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ (ตาราง 6) และความเข้มข้นของ CaCl<sub>2</sub> 30 มิลลิโมลาร์ (ตาราง 7) โดยแบคทีเรีย ไอโซเลท G27 มีการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสสูงสุดในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ซึ่งให้น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนเนตสูงสุด 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 12 และภาพ 13) และมีอัตราการเกิดตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจาก pH 7 เป็นสภาวะเริ่มต้นที่เหมาะสมกับการเจริญและกิจกรรมชีวเคมีของแบคทีเรีย (Wiley and Stokes, 1962, pp. 730-734; Wiley and Stokes, 1963, pp. 1152-1156) โดยแบคทีเรียไอโซเลท G27 เมื่อเพิ่มจำนวนมากขึ้นจึงมีการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสมากขึ้นส่งผลให้เกิดการไฮโดรไลซิสยูเรียได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) และแอมโมเนียมไอออน (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ซึ่ง NH<sub>4</sub><sup>+</sup> นี้เป็นผลให้ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (pH ประมาณ 8) ทำให้ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของไบคาร์บอนเนตไอออน (HCO<sub>3</sub>) เป็นปริมาณมาก (Atkins and Paula, 2002, unpagged) จึงทำปฏิกิริยากับแคลเซียมไอออน

(Ca<sup>2+</sup>) ได้มากขึ้น ทำให้มีการตกตะกอนของ CaCO<sub>3</sub> มากขึ้นไปด้วย สำหรับไอโซเลท P30 และ S14 ที่ให้น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่า ถึงแม้ว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสสูงก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากการไฮโดรไลซิสของยูเรียได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็น CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> และ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> มากและ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ที่มากนั้นเป็นผลให้ pH สูงขึ้นมาก (pH>8.5) ทำให้ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> เป็นปริมาณน้อยจึงทำปฏิกิริยากับ Ca<sup>2+</sup> ได้น้อยลง จึงเป็นผลให้มีการตกตะกอนของ CaCO<sub>3</sub> น้อยลงไปด้วย สำหรับไอโซเลท G9 พบว่าระดับ pH สุดท้ายของอาหารมีค่าต่ำ (pH ประมาณ 6.5) เป็นเหตุให้ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ปริมาณน้อย จึงทำปฏิกิริยากับ Ca<sup>2+</sup> ได้น้อยลง เป็นเหตุให้มีการตกตะกอนของ CaCO<sub>3</sub> ลดลงไปด้วย

#### **การศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27**

จากผลการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนไดออกไซด์บนพื้นผิวเมล็ดทราย ในชุดของการทดลองซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรียให้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ซึ่งมีอัตราการเกิดตะกอนคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียมีกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส แล้วทำให้การเกิด MCP ขึ้นได้ เนื่องจากมีคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียในไอออนเกิดขึ้น ซึ่งทำให้มีค่า pH เป็นด่างเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อมีแคลเซียมปรากฏอยู่ในอาหารจึงสามารถเกิดตะกอนคาร์บอนไดออกไซด์ที่ภายใต้สภาวะแวดล้อมดังกล่าว (Fujita, et al., 2000, pp. 305-318; Muynck, et al., 2008, pp. 875-885; Taino, et al., 1999, pp. 139-145) เมื่อทำการศึกษาทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์แบคทีเรียถูกเคลือบด้วยตะกอนแคลเซียมคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเซลล์ของแบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นจุดศูนย์รวมที่ทำให้เกิดการตกตะกอน (nucleation sites) (Hammes and Verstraete, 2002, pp. 3-7) ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรานั้นถือว่าเป็น nucleation sites ที่ดีมากสำหรับเป็นศูนย์รวมของการเกิดแร่ธาตุต่างๆ (Ferris, et al., 1987, pp. 225-232) และเมื่อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนเจริญปกคลุมบนพื้นผิวเมล็ดทราย จึงทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างอนุภาคเมล็ดทรายขนาดเล็กกับใหญ่ด้วยตะกอนคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรียและให้อาหาร urea broth พบว่ามีตะกอนแคลเซียมคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ปริมาณเล็กน้อย (0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน) เนื่องจากมีไอออนบวกอื่นๆ ในเมล็ดทรายที่หลุดออกมาและสามารถรวมตัวกับ (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ซึ่งได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย จึงทำให้ยังสามารถเห็นแบคทีเรียถูกเคลือบด้วยตะกอนคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดศึกษาทางกายภาพ และในส่วนของชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียซึ่งให้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth พบว่ามีตะกอนแคลเซียมคาร์บอนไดออกไซด์ (0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมของทรายต่อวัน) ทั้งนี้เนื่องจากขั้นตอนการให้อาหารทุกวัน

เป็นเวลามากกว่า 30 วัน จึงอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น มีโอกาสเจริญปนเปื้อนได้ในชุดควบคุม ซึ่งสังเกตจากภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถทำให้เกิด MCP ได้เนื่องจากมีความสามารถในการไฮโดรไลซิสของยูเรีย ประกอบกับการมี  $\text{CaCl}_2$  ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นแหล่ง ( $\text{Ca}^{2+}$ ) จึงทำให้พบตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านการเสริมประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะแวดล้อมจริงในธรรมชาติ และเมื่อมีการอยู่ร่วมกันกับกลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีในการช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงและป้องกันการรุกรานของโบราณสถาน โบราณวัตถุได้ต่อไป

จากผลการศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐ โดยการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชิ้นอิฐตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น พบว่าชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเป็นเวลา 10, 15 และ 20 วัน เนื่องจากการบ่มแบบเขย่าเป็นสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญ ทั้งในด้านอาหารและการแลกเปลี่ยนก๊าซ ทำให้แบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เจริญได้ดี และชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตจับตัวสะสมที่พื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วันพบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของชิ้นอิฐลดลง ทั้งนี้เนื่องจากค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 8.0 จึงทำให้  $\text{CO}_3^{2-}$  มีปริมาณลดลง เพื่อให้เกิดสมดุลปฏิกิริยา  $\text{HCO}_3^-$  จึงต้องเปลี่ยนไปเป็น  $\text{CO}_3^{2-}$  เพิ่มขึ้น และเมื่อ  $\text{HCO}_3^-$  ลดลงเพื่อให้เกิดสมดุลปฏิกิริยาอีกครั้ง  $\text{CaCO}_3$  จึงละลายกลับเพื่อให้ได้  $\text{HCO}_3^-$  เพิ่มมากขึ้น จากการเกิดสมดุลปฏิกิริยาย้อนกลับ จึงเป็นเหตุให้  $\text{CaCO}_3$  มีปริมาณลดลง (Atkins and Paula, 2002, unpagged) สำหรับชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มขึ้นน้อยกว่าเนื่องจากมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่ต่ำกว่าจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อยเมื่อครบระยะเวลาบ่ม ส่วนในชุดควบคุมของชิ้นอิฐตัวอย่างทั้งสองขนาดมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อยมาก เนื่องจากการตกตะกอนทางเคมีโดยมีการรวมตัวกันของ  $\text{HCO}_3^-$  กับ  $\text{Ca}^{2+}$  ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบกับไอออนอื่นๆ ในชิ้นอิฐตัวอย่างที่ละลายออกมาภายหลังจึงทำให้มีตะกอนของคาร์บอเนตได้เล็กน้อย ซึ่งสังเกตได้จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งให้เห็นว่าพื้นผิวมีลักษณะที่เรียบมากขึ้น เมื่อเทียบกับภาพถ่ายของพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างเก่าเชื่อก่อนนำมาทดลอง ส่วนลักษณะของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในชุดทดลองที่มีการทับถมกัน เกิดจากการเกาะตัวเชื่อมต่อกันของตะกอนที่เคลือบอยู่บนผิวเซลล์แบคทีเรียและปลดปล่อยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตลักษณะคล้ายรังไหมซึ่งเซลล์แบคทีเรียตายและได้หลุดออกไปแล้ว (Castanier, et al., 1999, pp. 9-23; Castanier, et al., 2000b, pp. 32-39)

จากผลการทดสอบความแข็งแรงของชิ้นอิฐตัวอย่าง โดยการวัดน้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างหลังจากผ่านกระบวนการ sonication พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กใกล้เคียงกับชุดควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน เนื่องจากเป็นช่วงที่มีตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตทับถมกันน้อยและจับตัวกันไม่แข็งแรงพอกับพื้นผิวของอิฐตัวอย่าง แต่เมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 10 และ 15 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยลงเนื่องจากมีการทับถมกันของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตหนาแน่นและการยึดเกาะกันดีขึ้น และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 20 และ 30 วัน เปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปมากขึ้นเนื่องจาก ที่ระยะเวลา 20 วัน มีปริมาณตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตมากที่สุดจึงมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปมากขึ้น และที่ระยะเวลาการบ่ม 30 วัน มีการละลายกลับของแคลเซียมคาร์บอเนตเนื่องจากค่า pH มีค่าต่ำกว่า 8.0 ทำให้การยึดเกาะตัวกันของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตไม่ดีพอจึงทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปมาก สำหรับของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อยกว่าชุดควบคุมเนื่องจากมีตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตทับถมและยึดเกาะกันดีกว่าสังเกตได้จากรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มพบว่าน้ำหนักหายไปไม่ต่างกันมาก เนื่องมาจากสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำจึงมีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหายไปน้อย ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Rodriguez-Navarro, et al., 2003, pp. 2182-2193

### **การศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *Sporosarcina koreensis* G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง**

จากผลการศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis* G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุก่อสร้าง (อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร) ในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบสีพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตรอิโอพบว่ามีตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมค่อนข้างบาง เนื่องจากมีการตกตะกอนคาร์บอเนตได้เองของไอออนที่หลุดออกมาจากองค์ประกอบของวัสดุซึ่งใช้เป็นส่วนผสมอิฐตัวอย่างโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย (Jimenez-Lopez, et al., 2008, pp. 352–363) อีกทั้งสภาวะที่เป็นต่างอันเกิดจากส่วนผสมของปูนซีเมนต์ร่วมด้วย (Muynck, et al., 2008, pp. 875–885) จึงทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนคาร์บอเนตได้แต่มีปริมาณน้อย และเมื่อมีตะกอนสะสมไม่มากพอที่จะส่งผลให้ผนังรูพรุนมีขนาดเล็กลง จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดกลืนน้ำของพื้นผิวอิฐ

ตัวอย่างมีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับชุดทดลองและชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา ในส่วนของชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใฝ่พื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาว และเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอพบว่า มีตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือผนังหลุมหนาแน่นกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เนื่องจากพื้นผิวของอิฐตัวอย่างยังมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ urea-CaCl<sub>2</sub> broth และเมื่อทำการให้อาหารใหม่ในทุกๆวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนेटได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมเกิดขึ้นได้ ซึ่งให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับงานวิจัยของนักวิจัยหลายๆท่าน (Le Métayer-Levrel, et al., 1999, pp. 25-34; Jimenez-Lopez, et al., 2008, pp. 352-363; Muynck, et al., 2010, pp. 118-136) แต่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนेटไม่มากพอ เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ดังนั้นจึงมีปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นน้อยกว่าในชุดทดลอง จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าในชุดทดลอง แต่มีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา สำหรับชุดทดลองของรูปแบบการฉีดพ่นและรูปแบบของการทา ที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พบว่าพื้นผิวโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมทั้งสอง เนื่องจากพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีการเจริญของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 อีกทั้งยังได้รับเชื้อใหม่พร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มในทุกวันจึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนेटได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมกันอย่างหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุม เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และเมื่อมีตะกอนสะสมหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนส่งผลให้ขนาดของรูพรุนที่ปรากฏในส่วนของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีขนาดเล็กลง หรืออาจตกตะกอนสะสมปิดรูพรุนได้ในกรณีที่รูพรุนมีขนาดเล็กมาก จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้นให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีอย่างมีนัยสำคัญ

#### ข้อเสนอแนะ

1. การนำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอนेटไปประยุกต์ใช้ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการตกตะกอนคาร์บอนेटกับตัวอย่างพื้นผิวหินในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ

2. ควรมีการศึกษารูปแบบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอนเนตกับกลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีในการช่วยเสริมสร้างความแข็งแกร่งและป้องกันการผุกร่อนของโบราณสถาน และโบราณวัตถุ

3. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการตกตะกอนคาร์บอนเนตโดยประยุกต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่หาได้ง่ายตามธรรมชาติหรือราคาถูก

## บรรณานุกรม

- APHA, (1980). **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water** (15<sup>th</sup> ed.). American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington: American Public Health Association.
- Atkins, P and J. de Paula. (2002). **Atkins' Physical Chemistry** (7<sup>th</sup> ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Bachmeir, K.L., A.E. Williams, J.R. Warmington and S.S. Bang. (2002). Urease activity in microbiological-induced calcite precipitation. **Journal of Biotechnology**, 93, 171-181.
- Bodek, I., W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt. (1988). **Environmental Inorganic Chemistry- Properties, Processes and Estimation Methods**. Pergamon: Paragon Press.
- Buczynski, C. and H. S. Chafetz. (1991). Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. **Journal of Sedimentary Petrology**, 61, 226-233.
- Castanier, S., G. Le Metayer-Levrel and J.P. Perthuisot. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiologist point of view. **Sedimentary Geology**, 126, 9-23.
- Castanier, S., G. Le Metayer-Leverl and J.P. Perthuisot. (2000a). Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property. In *O.Ciferri, P. Tiano, and G. Mastromei* (Eds.), **Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage**. New York: Plenum.
- Castanier, S., G. Le Metayer-Leverl and J.P. Perthuisot. (2000b). Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals, pp. 32-39. In *R.E. Riding and S.M. Awramik* (Eds.), **Microbial sediments**. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Dick, J., W. De Windt, B. De Graef, H. Saveyn and P. Van der Meeren. (2006). Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degrade limestone by *Bacillus* species. **Biodegradation**, 17, 357-367.
- Ehrlich, H.L. (1998). Geomicrobiology: its significance for geology. **Earth-Science Reviews**, 45, 45-60.
- Falkingam III, J.O. and P.S. Hoffman. (1984). Unique developmental characteristics of the swarm and short cells of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*. **Journal of Bacteriology**, 158, 1037-1040.
- Ferris, F.G., W.S. Fyfe and T. J. Beveridge. (1987). Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment. **Chemical Geology**, 63, 225-232.

- Folk, R. (1993). SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks. **Journal of Sedimentary Petrology**, 63, 990–999.
- Friedrich, B. and B. Magasanik. (1977). Use of *Klebsiella aerogenes*: control of its synthesis by glutamine synthetase. **Journal of Bacteriology**, 28, 313-322.
- Fujita, Y., F.G. Ferris, R.D. Lawson, F.S. Colwell and R.W. Smith. (2000). Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. **Geomicrobiology Journal**, 17, 305-318.
- Gauckler Th., L. J. and G.F. Baader. (1999). Ceramic forming using enzyme catalyzed reactions. **Material Chemistry and Physics**, 2509, 1-25.
- Gollapudi, U.K., C.L. Knutson, S.S. Bang and M.R. Islam. (1995). A new method for controlling leaching through permeable channels. **Chemosphere**, 30, 695-705.
- Greenberg, A.E., L.S. Clesceri and A.D. Eaton (Eds.). (1992). **Standard methods for the examination of water and wastewater** (18<sup>th</sup> ed.). Washington D.C.: American Public Health Association.
- Hammes, F., N. Boon, G. Clement, J. de Villiers, S.D. Siciliano and W. Verstrate. (2003a). Molecular, biochemical and ecological characterisation of a bio-catalytic calcification reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62, 191-201.
- Hammes, F., N. Boon, J. De Villiers, W. Verstraete and S.D. Siciliano. (2003b). Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 4901-4909.
- Hammes, F., A. Seka, S. de Knijf and W. Verstraete. (2003c). A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater. **Water Research**, 37, 699-704.
- Hammes, F. and W. Verstrate. (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.
- Ismail, M.A., H.A. Joer, M.F. Randolph and A. Meritt. (2002). Cementation of porous materials using calcite. **Geotechnique**, 52, 313-324.
- Jahns, T. (1996). Ammonium/urea-dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pasteurii*. **Journal of Bacteriology**, 178, 403-409.
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Pinar-Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M., et al. (2008). Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62 (4), 352–363.
- Kaltwasser, H., J. Kramer and W.R. Conger. (1972). Control of urease formation in certain aerobic bacteria. **Archiv fur Mikrobiologie**, 81, 178-196.

- Kile, D.E., Eberl, D.D., Hoch, A.R. and Reddy, M.M. (2000) An assessment of calcite crystal growth mechanisms based on crystal size distributions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64(17), 2937–2950
- Klein, C. and C.S.J. Hurlbut. (1999). **Manual of Mineralogy** (21<sup>st</sup>ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubière, 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.
- Lee, S.G. and D.H. Calhoun. (1997). Urease from a potential pathogenic coccid isolate-purification, characterization and comparison to other microbial urease. *Infection and Immunity*, 10(65), 3991-3996.
- Lewin, S. Z. and N. S. Baer. (1974). Rationale of the barium hydroxide-urea treatment of decayed stone. *Studies Conserv*, 19, 24–35.
- Mobley, H.L.T. and R.P. Hausinger. (1989). Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53, 85-108.
- Mobley, H.L.T., M.D. Island and R.P. Hausinger. (1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*, 59, 85-108.
- Mulrooney, S., T. Zakharian, R.A. Schaller and R.P. Hausinger. (2001). Dual effects of ionic strength on *Klebsiella aerogenes* urease: pH-dependent activation and inhibition. *Archives of Biotechnology and Biophysics*, 394, 280-282.
- 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 and W. Verstraete. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22, 875-885.
- Nielsen, T.H., T.A. Bonde and J. Sorensen. (1998). Significance of microbial urea turnover in N cycling in three Danish agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 147-157.
- Prescott, L. M., J. P. Harley and D. A. Klein. (1993). **Microbiology** (2<sup>nd</sup>ed.). Dubuque: Wm.C. Brown Publishers.
- 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 Conserv*, 33, 178 –186.

- Provorov, N.A. and N.I. Vorobyov. (2000). Population genetics of Rhizobia: Construction and analysis of an "infection and release" model. **Journal of Theoretical Biology**, 205, 105-119.
- Ramachandran, S.K., V. Ramakrishnan and S.S. Bang. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. **ACI Material Journal**, 98, 3-9.
- Rodriguez-Navarro, C., M. Rodriguez-Gallego, K.B. Chekroun and M.T. Gonzalez-Munoz. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralisation. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 2182-2193.
- Sawada, K. and Ohtaki, H. (Ed.). (1998). Mechanisms of crystal growth of ionic crystals in solution formation transformation and growth inhibition of calcium carbonates. **Crystallization Processes vol. 3**. John Wiley & Sons, 19, 39-68.
- Sloan, J.J. and W.B. Anderson. (1995). Calcium chloride and ammonium thiosulfate as ammonia volatilization inhibitors for urea fertilizers. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 26, 2425-2447.
- Sneath, P.H.A. (1986). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2**. Williams & Wilkins, Baltimore: n.p.
- Stocks-Fischer, S., J.K. Galian and S.S. Bang. (1999). Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. **Soil Biology and Biochemistry**, 31, 1563-1571.
- Tiano, P., L. Biagiotti and G. Mastromei. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, 36, 139-145.
- Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. **Annual Review of Biochemistry**, 47, 1127-1162.
- Victoria, S. W. (2004). **Microbial CaCO<sub>3</sub> Precipitation for the production of Biocement**. Doctoral dissertation, Ph.D., Murdoch University, Western Australia.
- Warren, L.A., P.A. Maurice, N. Parmar and F.G. Ferris. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. **Geomicrobiology Journal**, 18, 93-115.
- Wiley, W. R. and J. L. Stokes.(1962). Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by *Bacillus pasteurii*. **Journal of Bacteriology**, 84, 730-734.
- Wiley, W. R. and J. L. Stokes. (1963). Effect of pH and ammonium ions on the permeability of *Bacillus pasteurii*. **Journal of Bacteriology**, 86, 1152-1156.
- Winkler, E. M. (1994). Stone in architecture. **Springer-Verlag**. Berlin: n.p.

Wright, D. T. (1999). The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. **Sedimentary Geology**, 126, 147-157.

Yoon, J.H., K.C. Lee, N. Weiss, Y.H. Kho, K.H. Kang and Y.H. Park. (2001).

*Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 1079-1086.

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 และถ้าสี

เข้มขึ้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย 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 $\text{NH}_4\text{Cl}$ (50-250 ไมโครโมลาร์)

เตรียม Stock solution 100 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง 5.3490 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นทำการทำการปิเปตสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ปริมาตร 10

มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 1 มิลลิโมลาร์  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เพื่อนำไปเตรียมสารละลาย  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ความเข้มข้นต่างๆ (ตาราง 12)

ตาราง 12 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 50-250 ไมโครโมลาร์  $\text{NH}_4\text{Cl}$

ความเข้มข้นของสารละลาย $\text{NH}_4\text{Cl}$ (ไมโครโมลาร์)	ปริมาตร 1 มิลลิโมลาร์ $\text{NH}_4\text{Cl}$ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	100
50	5	95
100	10	90
150	15	85
200	20	80
250	25	75

นำสารละลายที่ได้ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0-250 ไมโครโมลาร์) มาเติมน้ำยา Nessler's reagent ในอัตราส่วนสารละลายต่อน้ำยา Nessler's reagent 25:1 แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป

### 3. การเตรียมสารละลาย Nessler's Reagent

ทำการละลาย KI 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่นชนิดกลั่นสองครั้ง ปริมาตร 35 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอิมตัวของ  $\text{HgCl}_2$  จนกระทั่งสารละลายเกิดตะกอนสีส้มตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ หลังจากนั้นเติมสารละลาย 9 นอร์มอล NaOH ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (ละลาย NaOH 300 กรัม ด้วยน้ำกลั่นชนิดกลั่นสองครั้งแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร) ลงในสารละลายข้างต้น แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 วันก่อนนำไปใช้

### 4. การเตรียมสารละลาย $\text{CaCl}_2$ เข้มข้น 1000 มิลลิโมลาร์

ทำการละลาย  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

การเตรียมสารละลาย stock 1 โมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (100 มิลลิลิตร)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	14.196	กรัม
---------------------------	--------	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

จากนั้นนำ 1 โมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มาเจือจางให้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  โดยการแบ่ง 1 โมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

การเตรียมสารละลาย stock 1 โมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (250 มิลลิลิตร)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34.02	กรัม
--------------------------	-------	------

น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

จากนั้นนำ 1 โมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  มาเจือจางให้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  โดยการแบ่ง 1 โมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

นำสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH โดยค่อยๆเติม 100 มิลลิโมลาร์  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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  $\text{CaCO}_3$

ชั่ง anhydrous  $\text{CaCO}_3$  หนัก 1.00 กรัม ใส่ใน Beaker แล้วเติม 50% HCl อย่างช้าๆเพื่อละลาย  $\text{CaCO}_3$  เมื่อละลายหมด เติมน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร จากนั้น

นำไปต้มประมาณ 5 นาทีเพื่อไล่ก๊าซ  $\text{CO}_2$  แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับให้มี pH ให้ได้ 7 ด้วย 1 นอร์มอล  $\text{NaOH}$  ทำการรินสารละลายที่ปรับ pH แล้วลงในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลาย  $\text{CaCO}_3$  ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ หลังจากนั้น ทำการดูดสารละลาย  $\text{CaCO}_3$  (0.01 โมลาร์) 50 มิลลิลิตร ด้วยไปเปตวัดปริมาตรลงในขวด ปริมาตรทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 1 นอร์มอล  $\text{NaOH}$  1-2 มิลลิลิตร เติมผงเมอร์เรกไซต์ อินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลาย EDTA ที่ เตรียมได้ ทำการไตเตรทจากสีชมพู (สีเริ่มต้น) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง (จุดสิ้นสุด) การคำนวณ โดยการอ่านปริมาตร EDTA (หน่วยเป็นมิลลิลิตร) แล้วคำนวณหา ความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ด้วยสูตร

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

$N1$  คือ ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{CaCO}_3$  0.01 โมลาร์

$V1$  คือ ปริมาตรของสารละลาย  $\text{CaCO}_3$  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  $6.8 \pm 2$  นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 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  $6.8 \pm 2$  นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Urea-CaCl<sub>2</sub> agar (HIMEDIA)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	2.12	กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	10	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	4.41	กรัม
สารละลาย Urea 50%	40	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	960	มิลลิลิตร

ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดใส่ลงในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย ปรับ pH 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน

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

4. Urea – CaCl<sub>2</sub> broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 30 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O 1000 มิลลิโมลาร์	30	มิลลิลิตร
สารละลายยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	920	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในน้ำกลั่น 920 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลายแล้วปรับ pH 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น จากนั้นเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O และ 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Millipore 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 ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	950	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 950 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Millipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

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

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 8.0	950	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 8.0 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

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

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 9.0	950	มิลลิลิตร

ซึ่ง 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

ซึ่ง 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 Millipore 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

ซึ่ง 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 Millipore 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

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Millipore 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

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 700 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 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

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 600 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 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<sub>2</sub> broth (Urea 50 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 15 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1000 มิลลิโมลาร์	15	มิลลิลิตร

มิลลิลิตร

สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	935	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH 7 935 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O และ 1000 มิลลิโมลาร์ Urea ที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ

14. Urea – CaCl<sub>2</sub> broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 30 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1000 มิลลิโมลาร์	30	มิลลิลิตร
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	920	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH7.0 920 มิลลิลิตร

นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O และ 1000 มิลลิโมลาร์ ยูเรียที่ผ่านการกรองด้วย Milipore 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตรตามลำดับ

15. Urea – CaCl<sub>2</sub> broth (ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์, CaCl<sub>2</sub> 60 มิลลิโมลาร์ , pH 7.0)

ส่วนประกอบ

Nutrient broth	3.0	กรัม
สารละลาย CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1000 มิลลิโมลาร์	60	มิลลิลิตร
สารละลาย ยูเรีย 1000 มิลลิโมลาร์	50	มิลลิลิตร
สารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0	890	มิลลิลิตร

ซึ่ง Nutrient broth ใส่ลงในสารละลาย Phosphate buffer pH7.0 890 มิลลิลิตร

นำไปต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย 1000 มิลลิโมลาร์ CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 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 นำไปต้มให้ละลายแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลาย Urea – agar base ที่ผ่านการกรองด้วย Millipore 0.2 ไมครอนเมตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

## ภาคผนวก ค วิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อเบื้องต้น

1. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ การติดสีย้อมแกรมและรูปร่างของเชื้อโดยวิธีการย้อมแกรม ดังนี้

1.1 ทำความสะอาดสไลด์ด้วยผงซักฟอกให้ทั่วทั้งสองด้านของสไลด์ ทิ้งให้แห้งพอสมควร แล้วใช้ผ้าสะอาดเช็ดคราบผงซักฟอกออกให้หมดของสไลด์ทั้ง 2 ด้าน

1.2 ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะบนสไลด์ 1-2 ลูบ เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ให้ติดห้วงเขี่ยเชื้อมาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วละเลงเชื้อให้กระจายป่นย่อยไว้ให้แห้ง แล้วลนผ่านเปลวไฟค่อนข้างเร็วประมาณ 2-3 ครั้ง ไม่ต้องให้ร้อนเกินไปเพื่อให้เซลล์ยึดกับสไลด์

1.3 หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือค้ำบนสไลด์ทิ้ง

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

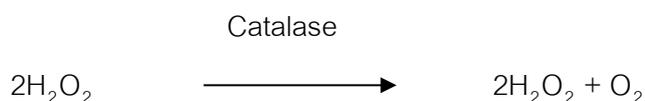
1.8 นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตา โดยติดสีย้อมที่สองเป็นสีแดงของ Safranin O แสดงถึง แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram – Negative) ถ้าติดสีย้อมแรกเป็นสีน้ำเงินของ Crystal violet แสดงถึง แบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Gram – Positive)

### 2. Motility (hanging drop)

ทำความสะอาดสไลด์หลอดและ cover slip เพราะเชื้อลงอาหารเอียง (NA slant ) บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะลงบน cover slip 1-2 ลูบ แล้วใช้ห้วงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นๆ แล้วเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารเอียงให้ติดลวดเขี่ยเชื้อมาเพียงเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วเขี่ยเชื้อให้กระจายอยู่ในหยดน้ำ จากนั้นเผาห้วงเขี่ยเชื้ออีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดค้างอยู่แล้วจุ่มน้ำมาแตะลงบนมุมทั้ง 4 ของ cover slip และนำสไลด์หลอดมาปิดลงบนแผ่น cover slip ที่เตรียมเชื้อไว้จึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 3. การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase) โดยปกติกระบวนการหายใจแบบไม่ต้องใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ



วิธีการ

หยด 3%  $H_2O_2$  ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร nutrient agar แต่ละลงในหยดของ  $H_2O_2$  สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การอ่านผล

ผลเป็นบวก: มีฟองแก๊สเกิดขึ้นทันที แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส

ผลเป็นลบ: ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้

### 4. การทดสอบอินโดล

การทดสอบการสร้างสารอินโดล (indole) โดยใช้วิธี Kovacs' Method

วิธีการ

ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว tryptone หรืออาหารอื่นๆที่เหมาะสม เช่น 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 ทำให้อ่อนที่ 56 องศาเซลเซียส จนกระทั่งละลายหมดทำให้เย็นเติม HCl เข้มข้น 50 มิลลิลิตร อย่างช้าๆเก็บในขวดหยดสีขาวและไว้ในตู้เย็น สารทดสอบควรมีสีเหลืองอ่อน

#### 5. การทดสอบออกซิเดส

การทดสอบ oxidase โดยใช้วิธี Kovacs' Method

วิธีการ

วางกระดาษกรองที่อ้อมตัวด้วย 0.5 % tetramethyl-p-phenylenediamine HCl ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ห่วงเย็บเชื้อ เชื้อโคโลนีออกมาทดสอบโดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ

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 % naphthol 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	บริเวณของ ลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
G27	16S rDNA	TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG CAAGTCGAGCGGATTGAAGGGAGCTTGCTCCCTGATA TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT GCCCTGCAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGC TAATACCGAATAATCGGTTCTTCCGCATGGAAGAACTC TGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTGCAGGATGGGCC GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACC AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAG GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCGAGGGAAGAAC AAGTACGGGAGTAACTGCCCCGTACCTTGACGGTACCT CGTCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCT GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATT GGAAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGCG GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGT AACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC

---

TGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA

---

ตาราง 13 (ต่อ)

---

แบคทีเรีย	บริเวณของ ลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')
G27	16S rDNA	CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCT GACCGGTGTAGAGATACATCTTCCCTTCGGGGACAG CGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTA AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCTGCAAA CCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCATAAAACCGTTCCC AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC CGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT GAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTA ACCCTTACGGGAG

---

ผลงานตีพิมพ์



1 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนต

2 เพื่อการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้าง

3 จริญญา สารินทร์<sup>a\*</sup> สิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม<sup>b</sup> และ ศิริพรรณ สารินทร์<sup>b</sup>

4

5 **Application of ureolytic bacteria induced carbonate precipitation**

6 **for conservation of surface of supporting materials**

7 Charoon Sarin<sup>a\*</sup>, Sittud Soypetcasem<sup>b</sup>, and Siripun Sarin<sup>b</sup>

8

9 <sup>1</sup>ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

10 จังหวัดพิษณุโลก

11 <sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

12 <sup>1</sup>Department of Natural Resources and Environment, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University,

13 Phitsanulok, Thailand 65000

14 <sup>2</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

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

16

17 **บทคัดย่อ**

18 งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* G27 ที่ผลิต

19 เอนไซม์ยูรีเอสและสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ผลการวิจัยพบว่า ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย ( $2.0 \times 10^7$

20 cfu/ml) ที่เตรียมในอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ทั้งแบบฉีดพ่น (SUG) และแบบทา (PUG) บนพื้นผิววัสดุตัวอย่างที่ทดสอบ

21 ขนาด 6x12x6 เซนติเมตร เป็นเวลา 30 วัน มีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุดควบคุม โดยเมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง

22 จุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า พบตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้นใหม่จับตัวกันหนาติดอยู่ตามพื้นผิวและผนังรูพรุนของก้อนอิฐ ซึ่ง

23 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการปกป้องพื้นผิวโดยการป้องกันน้ำที่เป็นตัวการทำให้เกิดการผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การ

1 ดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย  
2 ทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่าง  
3 ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการชักนำของแบคทีเรียซึ่ง  
4 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้างของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือสถาปัตยกรรมต่าง ๆ ที่ทำ  
5 จากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหินด้วยวิธีชีวภาพได้  
6 **คำสำคัญ :** แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอส การตกตะกอนคาร์บอเนต

7

8

#### Abstract

9 This research aimed to study method for application of the ureolytic bacteria, *Sporosarcina*  
10 *koreensis* G27, induced calcium carbonate precipitation on surface of support materials. Investigation by  
11 spraying (SUG) and painting (PUG) the bacterial culture prepared in urea-CaCl<sub>2</sub> broth onto the surface  
12 of support blocks (6x12x6 cm) showed that the highest calcium carbonate precipitation was induced  
13 when the culture of *S. koreensis* G27 ( $2.0 \times 10^7$  cfu/ml) was sprayed or painted onto the surface of  
14 support blocks for 30 days. The newly formed carbonate cements calcite also grained by depositing on the  
15 walls of the pores. *S. koreensis* G27 induced calcium carbonate precipitation presented efficiently water  
16 protection of the support materials according to the water absorption rate observed in the tested support  
17 blocks was statistically significant lower than the control blocks. There was no significant difference in the  
18 water absorption rate between the methods of application. This finding indicated the possibility of  
19 application of the ureolytic bacteria which capable of inducing carbonate precipitation on surface of  
20 the support materials could be used for conservation of buildings, ornamental and monumental stones as an  
21 alternative surface treatment.

22 **Keywords :** ureolytic bacteria, carbonate precipitation

23

24 **บทนำ**

25 ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ การผุพังหรือผุกร่อนของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือ  
26 สถาปัตยกรรมต่าง ๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหิน โดยเฉพาะหินตะกอนคาร์บอเนต (carbonate stones) นั้น

1 เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการทางกายภาพ เคมีและชีวภาพตามสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป กรอบกับลักษณะ  
2 และองค์ประกอบของเนื้อหินที่เป็นประเภทหินตะกอนคาร์บอเนต ซึ่งเกิดจากการทับถมของตะกอนคาร์บอเนต ทั้งจาก  
3 สารอนินทรีย์ และซากสิ่งมีชีวิต เช่น ปะการัง และกระดองของสัตว์ทะเล ซึ่งอัดถมกันภายใต้ความกดดันและตกผลึก  
4 ใหม่เป็นแร่แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) จึงทำปฏิกิริยากับกรด มีลักษณะเนื้อแน่นละเอียดหีบ มีสี  
5 ออกขาว เทา ชมพู หรือสีดำ ตัวอย่างเช่น หินปูน (limestones) โดโลสโตน (dolostones) หินอ่อน (marbles)  
6 และเป็นหินที่ละลายน้ำได้ อ่อนไหวต่อสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้ผุพังได้ง่าย โดยเฉพาะในปัจจุบันที่มีปัจจัยเสริมจาก  
7 การเพิ่มขึ้นของมลภาวะทางอากาศ เช่น การเกิดฝนกรด ส่งผลให้เร่งการผุกร่อนเกิดเร็วยิ่งขึ้น (Price, 1996;  
8 Winkler, 1994) จึงได้มีความพยายามที่จะหยุดยั้งหรือชะลอการผุกร่อนพังทลาย โดยเฉพาะในส่วนพื้นผิวของ  
9 วัสดุก่อสร้างเหล่านี้ โดยวิธีการอนุรักษ์ (conservation) ทั้งในรูปแบบของการปกป้อง (protection) โดยป้องกัน  
10 น้ำ (waterproof) หรือป้องกันสิ่งอื่น ๆ ที่เป็นตัวการของการผุพัง (weathering agents) ไม่ให้สามารถเข้าถึง  
11 แกนกลาง (core) ของวัสดุก่อสร้างได้ รวมทั้งการเสริมสร้างความแข็งแรง (consolidation) โดยการปรับปรุงเพื่อ  
12 ลดการผุพังของรูพรุน (porous) ในวัสดุก่อสร้างด้วยซีเมนต์หรือวัสดุสร้างความแข็งแรงอื่น ๆ แต่ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์  
13 ด้วยวิธีใดก็ตาม วัสดุที่นำมาใช้นั้นมีทั้งที่มาจากสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ต่าง ๆ เช่น อะคริลิก (acrylic) กาวเรซิน  
14 อีพอกซี (epoxy resins) (Horie, 1987) และสารละลายเบเรียมไฮดรอกไซด์ [ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ] (Lewin &  
15 Baer, 1974) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีการใช้วัสดุต่างๆ เหล่านี้ ก็ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะการใช้วัสดุ  
16 ชนิดสารอินทรีย์นั้นอาจจะไม่สามารถเข้ากันได้กับวัสดุพื้นผิวเดิมและอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อพื้นผิวของวัสดุก่อสร้าง  
17 ในขณะที่การใช้วัสดุที่ทำจากสารอนินทรีย์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจกว่า ทั้งในแง่ของการเป็นวัสดุที่เข้าปกป้องและสร้างความ  
18 แข็งแกร่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแร่ธาตุ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงกับองค์ประกอบของวัสดุ  
19 ก่อสร้าง ตัวอย่างเช่น การใช้วิธีการที่เรียกว่า limewater treatment (Price, 1985) ซึ่งมีสารละลายแคลเซียมไฮ  
20 ดรอกไซด์ [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] เป็นส่วนประกอบ ในการสร้างความแข็งแรงให้กับหินคาร์บอเนต เนื่องจากแคลเซียมไฮดร

1 ออกไซด์สามารถตกตะกอนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ แต่วิธีการ  
2 นี้ก็มีข้อเสียคือ มีการตกตะกอนน้อย เกิดเป็นแค่ชั้นบาง ๆ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะปกป้องและสร้างความแข็งแรงให้กับวัสดุ  
3 ก่อสร้าง (Price, et al., 1988)

4           ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยในการนำแบคทีเรียชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ที่  
5 เรียกว่า microbial carbonate precipitation (MCP) หรือ biocementation ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวภาพที่  
6 ช่วยป้องกันการผุพังของวัสดุสิ่งก่อสร้าง และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย วิธีการอนุรักษ์นี้จะอาศัยการเลียนแบบ  
7 วิถีทางธรรมชาติ เช่นเดียวกับการเกิดขึ้นของหินตะกอนคาร์บอเนตบนโลก (Stocks-Fischer, et al, 1999)  
8 โดยแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตนั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน  
9 (heterotrophic soil bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน  
10 (Castanier et al., 1999 ; Hammes & Verstraete, 2002 ) เช่น ยูเรีย (urea) ได้ โดยใช้เอนไซม์ยูเรียเอส  
11 (urease) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา แล้วได้สารผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอเนตไอออน (carbonate ions) และแอมโมเนียม  
12 (ammonium,  $\text{NH}_4^+$ ) ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นต่าง ซึ่งถ้าในสภาพแวดล้อมนั้นมีแคลเซียมไอออน  
13 (calcium ions) อยู่ จะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลไซต์ (Fujita et al., 2000 ; Muynck et al., 2008 ;  
14 Tiano et al., 1999) ที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือในรูช่องว่างของวัสดุโดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำ  
15 ให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีผู้สนใจนำแบคทีเรีนีมาวิจัยเพื่อ  
16 การประยุกต์ใช้ เช่นการนำแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* มาชักนำให้เกิดตะกอนแร่ภายในรูช่องว่างหรือรอยแตก  
17 ของพื้นผิวแกรนิต ซึ่ง *B. pasteurii* มีความสามารถใช้อูเรียเป็นแหล่งพลังงานแล้วทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อ  
18 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Kroll, 1990) หรือการใช้แบคทีเรีย *Myxococcus xanthus* ที่สามารถชัก  
19 นำการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อเสริมความแข็งแกร่งและอุดตามรูพรุนของหินปูน  
20 โดยพบว่าหินปูนที่เกิดขึ้นใหม่จะไปสะสมที่ผนังรูพรุน (Rodriguez-Navarro et al., 2003) และการใช้จุลินทรีย์

1    ประจําถิ่นในการชักนําให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในหินปูน ซึ่งพบว่าตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้น  
2    ใหม่ประสานกันได้ดีกับเนื้อหินปูนเดิม (Jimenez-Lopez et al., 2007) ดังนั้นการอนุรักษ์วัสดุก่อสร้างด้วยวิธีนี้  
3    จึงขึ้นอยู่กับเกิดการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือช่องว่างของวัสดุก่อสร้างโดยการ  
4    ชักนําของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดีกว่าวิธี limewater  
5    treatment  
6                   งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอส  
7    และชักนําให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง เพื่อประโยชน์ในด้านการ  
8    อนุรักษ์สิ่งก่อสร้างให้มีความทนทานและมีการดูดซึมนํ้าต่ำ ซึ่งจะเป็นการปกป้องและการเสริมความแข็งแรงของ  
9    พื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้แบคทีเรียชนิดแกรมบวก *Sporosarcina koreensis* G27 ที่  
10    แยกได้จากดินพื้นที่เกษตรกรรม โดย สิทธิศักดิ์ และคณะ (2552) มีรูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ได้ สามารถเคลื่อนที่  
11    ได้ ผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ และมีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สร้างพลังงาน ให้ประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์  
12    ยูรีเอสดีที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7 และมีระดับความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์  
13    (CaCl<sub>2</sub>) ที่เหมาะสมระหว่าง 50 ถึง 100 mM และ 30 mM ตามลำดับ และสามารถชักนําให้เกิดตะกอน  
14    คาร์บอเนตได้นํ้าหนัก 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีอัตราการสร้างตะกอนเท่ากับ 0.19  
15    มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง  
16    **วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ**  
17    1. การเตรียมอิฐตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนของวัสดุก่อสร้าง  
18                   ทำการผสมทราย เนื้อดิน ปูนซีเมนต์ และนํ้า ในอัตราส่วน 5:2:1:1 ตามลำดับ แล้วนำมาอัดลงใน  
19    แม่พิมพ์เพื่อให้ได้อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร จากนั้นบ่มขึ้นอิฐโดยใช้ผ้าชุบนํ้าให้เปียกห่อไว้ เป็นเวลา  
20    7 วัน แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการชั่งนํ้าหนักทุกวันจนนํ้าหนักไม่

- 1 เปลี่ยนแปลงจึงทำการคัดเลือกอริฐที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน จากนั้นนำอริฐไปทาด้วยสารเคลือบใสประเภทกันน้ำ
- 2 (water repellent) จำนวนห้าด้านของก้อนอริฐ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและทำการทาท้าเช่นนี้อีกจำนวน
- 3 สองครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่ง
- 4 น้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วทำการบันทึกน้ำหนักสุดท้าย ซึ่งเป็นน้ำหนักก่อนการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำ
- 5 ทำการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำของสารเคลือบใส โดยใช้ด้านที่ทาสารเคลือบใสแช่ลงในน้ำกลั่นให้ลึก 1
- 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา
- 7 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก ทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดน้ำ จากนั้นจึง
- 8 นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนกระทั่งน้ำหนักไม่
- 9 เปลี่ยนแปลงจึงทำการบันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักก่อนการทดลอง แล้วนำอริฐจำนวนสิบสองก้อนมาเรียงซ้อนกัน
- 10 (ภาพที่ 1) โดยเรียงให้ด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใสออกในทางเดียวกันทุกก้อนเพื่อใช้เป็นด้านของการทดลองต่อไป
- 11 2. การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย
- 12 2.1 รูปแบบการพ่น ทำโดยการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ด้วยการถ่ายเชื้อ 1 ลูก
- 13 ลงพลาสติกที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศา
- 14 เซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- 15 ( $2.0 \times 10^7$  cfu/ml) ลงพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- 16 เป็นชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเป็นของเหลวในการฉีดพ่น (SUG) จากนั้นนำมาฉีดพ่นให้เป็นละอองด้วย
- 17 อุปกรณ์พ่นขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ลงบนด้านของอริฐที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส โดยการกดตามฉีดให้สุดหนึ่งครั้ง
- 18 ต่อหนึ่งก้อน ให้มีระยะห่างจากอริฐตัวอย่างประมาณ 10 เซนติเมตร ฉีดพ่นตั้งแต่ก่อนที่ 1 ถึงก่อนที่ 12 เรียง
- 19 ตามลำดับ แล้วกลับมาฉีดพ่นวนใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนกระทั่งของเหลวที่เหลือไม่สามารถฉีดพ่นในรอบต่อไปได้อีก
- 20 จากนั้นทำการวัดปริมาตรของเหลวที่เหลือเพื่อคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ไป กำหนดการฉีดพ่นทุกวัน ๆ ละสองครั้ง คือ

1 ช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 9.00 น. และในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 15 ของการ  
2 ทดลอง หลังจากนั้นฉีดพ่นเพียงครั้งเดียวในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ตั้งแต่วันที่ 16 ถึงวันที่ 30 ของ  
3 การทดลอง ทำเช่นเดียวกันนี้กับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร (SU) และ  
4 ชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร (SW) หลังจากทำการทดลองสิ้นสุดลงในแต่ละวัน ทำ  
5 การคลุมชุดอิฐการทดลองทุกชุดด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น แล้วคลุมทับด้วยฉนวนกันความร้อน  
6 เพื่อป้องกันความร้อนจากแสงแดดอีกหนึ่งชั้น

7 2.2 รูปแบบการทำ การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธีการฉีดพ่น แต่เปลี่ยนวิธีการเป็นการท  
8 โดยใช้แปรงทาสีปราศจากเชื้อขนาด 1 นิ้ว ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลอง คือชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ  
9 100 มิลลิลิตร (PW) ชุดควบคุมที่ใช้อาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth 100 มิลลิลิตร (PU) และชุดทดลองที่ใช้หัว  
10 เชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl<sub>2</sub> broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (PUG)

11 โดยขณะที่ทำการทดลองทั้งสองรูปแบบมีการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่  
12 นำมาทดลอง ก่อนทำการฉีดพ่นหรือทาในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ของทุกวัน ด้วยการนำไม้พันสำลี  
13 ปราศจากเชื้อชุบ 0.85% sterile saline ป้ายลงบนพื้นผิวของอิฐที่ทำการฉีดพ่นพื้นที่ 1 ตารางนิ้ว จากนั้นนำไป  
14 ป้ายลงบนจานอาหาร urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตจากอาหาร  
15 เปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แล้วทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารได้ และทำการเก็บ  
16 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้ถุงพลาสติกและแผ่นฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุม  
17 อิฐตัวอย่างตลอดการทดลอง

18 2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่างโดยการทดสอบหาค่าดูดซึมน้ำ ทำโดยนำอิฐตัวอย่างมาอบให้  
19 แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่  
20 เปลี่ยนแปลง นำอิฐตัวอย่างที่ได้ ไปทำการแช่ในน้ำกลั่นโดยคว่ำด้านที่ไม่ได้ทาสีเคลือบสีลงให้ลึก 1 เซนติเมตร

1 เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที

2 เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นทำการซ้มน้ำหนักอีกครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำและทำการ

3 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างในชุดการทดลองด้วย **t-Test: Paired Two**

4 **Sample for Means** แบบทางเดียว (**One-tail**)

5 ผลการศึกษา

6 จากการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่ผลิตเอนไซม์

7 ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเดบ่นพื้นผิวอิฐตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ในชุดควบคุมทั้ง

8 SW และ PW ลักษณะพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง

9 จุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวนั้นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมบาง

10 มาก ในชุดควบคุมทั้ง SU และ PU ลักษณะพื้นผิวอิฐโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุด

11 ควบคุม SW และ PW เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบตะกอนสีขาวติดอยู่

12 ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกับชุดควบคุม SW และ PW แต่พบในปริมาณมากกว่า สำหรับชุด

13 ทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งแบบ SUG และ PUG พบว่าบนพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่

14 ปริมาณมากที่สุด และเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวจับตัว

15 กันหนาติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกัน แต่พบในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมทั้งสอง (ภาพที่ 2)

16 โดยในตลอดการทดลองนี้พบว่ามีความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวัน ภายใต้อุณหภูมิและแผ่นฉนวนกัน

17 ความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่างเท่ากับ 77.4 เปอร์เซ็นต์และ 29.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสามารถพบ

18 แบคทีเรียที่มีชีวิตและผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยสังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar เปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็น

19 สีชมพูหลังจากป่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และเมื่อทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea

20 agar ที่มาจากชุดทดลอง พบว่ามีแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่มีลักษณะรูปร่างท่อนและการติดสีแกรมบวก

1 สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างแท้จริง และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ และพบแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นเจริญอยู่  
2 ด้วย และจากการศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่างโดยการทดสอบการดูดซึมน้ำ พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อ  
3 แบคทีเรียทั้งแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้น มีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำน้อยที่สุด  
4 คือ 1.51 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใต้สภาวะของการทดลองเดียวกัน  
5 (ตารางที่ 1)

#### 6 อภิปรายผลการศึกษา

7 จากผลการศึกษาและพัฒนาารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis*  
8 G27 ชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตบนผิวอิฐตัวอย่าง โดยในชุดควบคุมทั้ง SW PW SU และ PU พบว่า  
9 มีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่บ้างบนพื้นผิวอิฐ ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนคาร์บอนเนตได้เองของไอออนที่หลุด  
10 ออกมาจากองค์ประกอบของวัสดุซึ่งใช้เป็นส่วนผสมอิฐตัวอย่างโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย (Jimenez-Lopez, et  
11 al., 2008) อีกทั้งสภาวะที่เป็นต่างอันเกิดจากส่วนผสมของปูนซีเมนต์ร่วมด้วย (Muynck, et al., 2008) จึงทำ  
12 ให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนคาร์บอนเนตได้แต่มีปริมาณน้อย และเมื่อมีตะกอนสะสมไม่มากพอที่จะ  
13 ส่งผลให้ผนังรูพรุนมีขนาดเล็กลง จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างมีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับชุด  
14 ทดลองแบบ SUG และ PUG และถึงแม้จะมีการพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นบนพื้นผิวของอิฐตัวอย่างที่สามารถใช้  
15 อาหารเลี้ยงเชื้อ urea-CaCl<sub>2</sub> broth ได้ และเมื่อทำการให้อาหารใหม่ในทุกวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการ  
16 ตกตะกอนคาร์บอนเนตได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมเกิดขึ้น แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย  
17 ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตไม่มากพอ เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *S.*  
18 *koreensis* G27 ดังนั้นจึงมีปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นน้อยกว่าในชุดทดลอง เนื่องจากพื้นผิวอิฐตัวอย่างของชุด  
19 ทดลองแบบ SUG และ PUG มีการเจริญของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 อีกทั้งยังได้รับเชื้อใหม่พร้อมกับ  
20 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มในทุกวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนเนตได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบ

1 ตะกอนสีขาวจับตัวสะสมกันอย่างหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์  
2 แบบสเตอริโอ และเมื่อมีตะกอนสะสมหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนส่งผลให้ขนาดของรูพรุนที่ปรากฏในส่วนของ  
3 ผนังผิวอิฐตัวอย่างมีขนาดเล็กลง หรืออาจตกตะกอนสะสมปิดรูพรุนได้ในกรณีที่รูพรุนมีขนาดเล็กมาก (Le  
4 Métayer-Levrel, et al., 1999; Jimenez-Lopez, et al., 2008; Muynck, et al., 2010) จึงทำให้  
5 เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของผนังผิวอิฐตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดย  
6 ในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทานั้นให้  
7 เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของผนังผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

#### 8 สรุปผลการศึกษา

9                   แบคทีเรีย *S. koreensis* G27 สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุ  
10 ก่อสร้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในรูปแบบวิธีการฉีดพ่นและวิธีการทา โดยตะกอน  
11 แคลเซียมคาร์บอเนตจะจับตัวกันหนาแน่นติดอยู่ตามพื้นผิว รูพรุนหรือตามผนังหลุมทำให้ลดการดูดซึมน้ำที่เป็นสาเหตุของ  
12 การผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการ  
13 ชักนำของแบคทีเรียซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิวของวัสดุก่อสร้างได้

#### 14 กิตติกรรมประกาศ

15                   ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2554  
16 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านของภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะ  
17 เกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์  
18 มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนการวิจัย ทำให้  
19 งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

20

1 เอกสารอ้างอิง

- 2 สิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม, กัลยา ปรีชานุกูล และ ศิริพรรณ สารินทร์. (2552). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์  
3 ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ  
4 ครั้งที่ 14, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ.
- 5 Castanier, S., G. Le Métayer-Levrel., & J.P. Perthuisot. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone  
6 genesis - the microbiologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126, 9-23.
- 7 Fujita, Y., F.G. Ferris, R.D. Lawson, F.S. Colwell., & R.W. Smith. (2000). Calcium carbonate precipitation  
8 by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17, 305-318.
- 9 Hammes, F. & W. Verstraete. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate  
10 precipitation. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 1, 3-7.
- 11 Horie, C. V. (1987). *Materials for conservation: organic consolidants adhesives and coatings*. London United  
12 Kingdom: Butterworths.
- 13 Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Pinar, G., C. R., & Gonzalez-Munoz, M.T. (2007).  
14 Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation  
15 induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, 68, 1929–1936.
- 16 Kroll, R.G., (1990). Alkalophiles. In: Edwards, C. (Ed.), *Microbiology of Extreme Environments*. McGraw-  
17 Hill, New York, 55-92.
- 18 Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J.-F. and Perthuisot, J.-P. (1999). Applications of  
19 bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic  
20 patrimony. *Sedimentary Geology*, 126, 25-34.
- 21 Muynck, W. De., Belie, N. D. and Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction  
22 materials: A review. *Ecological Engineering*, 36, 118-135.
- 23 Muynck, W. De, K. Cox, N. De Belie & W. Verstraete. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an  
24 alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22, 875-885.
- 25 Price, C. A. (1985). The consolidation of limestone using a lime poultice and limewater. *Bayerisches*  
26 *Denkmalpflege Arbeitsh*, 31, 14–151.
- 27 Price, C. A. (1996). *Stone conservation. An overview of current research*. Getty Conservation Institute. Los  
28 Angeles: Calif.

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

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

6 Stocks-Fischer, S., J. K. Galinat, & S. S. Bang. (1999). Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil*  
7 *Biology and Biochemistry*, 31, 1563-1571.

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

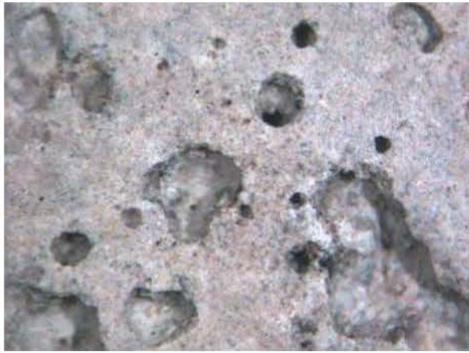
10 Winkler, E. M. (1994). *Stone in architecture*. Springer-Verlag, Berlin: n.p.

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24



ภาพที่ 1 ลักษณะการเรียงอิฐตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21



1

ก. SW

2

3



9

ง. PW

10

11

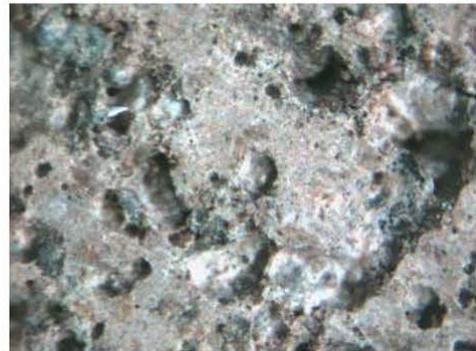


4

ข. SU

5

6

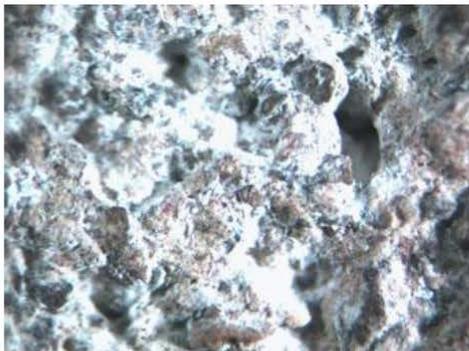


12

จ. PU

13

14



7

ค. SUG

8



15

ฉ. PUG

16

17 ภาพที่ 2 ลักษณะพื้นผิวตัวอย่างภายใต้จุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กัลังชยาย 10 เท่า

18 หลังการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

1 ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิววัสดุตัวอย่าง (n = 12) หลังจากการทดลองโดยวิธีการฉีดพ่นและการทา  
 2 ด้วยแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 เป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3

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 *

4 หมายเหตุ ns = ไม่มีนัยสำคัญ \* นัยสำคัญที่ระดับ 0.05

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19