ชื่อเรื่อง **การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซมยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนตเพื่อการอนุรักษ์และซ่อมแซมโบราณวัตถุ**

Application of urease-producing bacteria induced carbonate precipitation for conservation and restoration of ancient property

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต จากดินพื้นที่เกษตรกรรม ดินกากตะกอนแห้งของระบบบำบัดน้ำเสีย และพื้นผิวสถูปเจดีย์ เพื่อทดสอบศักยภาพในการอนุรักษ์พื้นผิวหินประดับ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พื้นผิวโบราณสถานและโบราณวัตถุด้วยวิธีชีวภาพ ผลการวิจัยพบโคโลนีแบคทีเรียที่มีตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนอาหาร urea-$CaCl_2$ agar จำนวน 96 ไอโซเลท ในจำนวนนี้เมื่อทำการทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสพบว่ามี 19 ไอโซเลทที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหาร urea agar และเมื่อทำการวัดปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจนทั้งหมดที่ถูกปล่อยออกมา ด้วยวิธี Nessler assay method พบว่ามี 6 ไอโซเลท (G2, G9, G27, P30, S12, S14) ที่ให้ค่า Urease activity สูงกว่า 0.15 unit/ml สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอส ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร (7, 8 และ 9) ความเข้มข้นยูเรีย (25, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิโมลาร์) และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (15, 30 และ 60 มิลลิโมลาร์) พบว่าไอโซเลท G27 สามารถชักนำการตกตะกอนคาร์บอเนตได้มากที่สุดโดยให้น้ำหนักแห้งของตะกอนเท่ากับ 3.1 mg/ml เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ ระดับ pH7 ซึ่งมีความเข้มข้นของ ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 30 มิลลิโมลาร์ เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์โดยการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA (Full sequence: ~ 1,400 bp) พบว่าไอโซเลท G27 คือ *Sporosarcina koreensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และเมื่อนำแบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* G27 มาศึกษาการชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต บนพื้นผิววัสดุก่อสร้างด้วยวิธีคอลัมน์ทราย พบว่ามีอัตราการเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตสูงสุดเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักทราย 1 กรัมต่อวัน จากการตรวจสอบทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์แบคทีเรียถูก

เคลือบด้วยตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต สำหรับผลการชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างสองขนาดซึ่งแช่อยู่ในอาหารเหลว urea-$CaCl_2$ ภายใต้สภาวะแบบเขย่าสำหรับอิฐตัวอย่างชิ้นเล็กและสภาวะแบบไม่เขย่าสำหรับอิฐตัวอย่างชิ้นใหญ่ พบว่าชิ้นอิฐตัวอย่างมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นในชุดทดลองทั้งสองสภาวะ โดยในชุดทดลองของชิ้นอิฐตัวอย่างชิ้นเล็กมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดใหม่ โดยวัดน้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างหลังจากการผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงในระยะเวลาของการบ่มที่ต่างกัน พบว่าที่ผิวของชิ้นอิฐตัวอย่างชิ้นใหญ่มีความเสียหายเกิดขึ้นน้อยกว่าอิฐตัวอย่างชิ้นเล็กและชุดควบคุม จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 มีศักยภาพในการนำไปใช้อนุรักษ์พื้นผิววัสดุที่มีรูพรุนได้ จากการศึกษาวิธีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์พื้นผิวหินประดับ โดยวิธีการการฉีดพ่นหรือทาแบคทีเรียลงบนพื้นผิวของอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร พบว่าการใช้ *S. koreensis* G27 ที่เตรียมในอาหารเหลว urea-$CaCl_2$ เข้มข้น 2.0×10^7 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ฉีดพ่นหรือทาลงบนอิฐตัวอย่างสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในปริมาณสูงสุด และพบว่าอิฐที่ใช้ทดสอบมีอัตราการดูดซึมน้ำลดลง จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการชักนำของแบคทีเรียซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้างของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถานหรือสถาปัตยกรรมต่างๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหินด้วยวิธีชีวภาพได้

ABSTRACT

The objective of this research was to isolate ureolytic bacteria which capable of inducing carbonate precipitation from agricultural soil, digested sludge and surface of historic pagoda in order to apply as biological method for conservation of historical antiques and ancient remains. 96 morphologically different isolates were found to form $CaCO_3$ precipitation on urea-$CaCl_2$ agar medium. Among them, 19 isolates were confirmed to be ureolytic bacteria by changing in color of urease test agar medium. 6 out of 19 isolates (G2, G9, G27, P30, S12, and S14) showed urease activities over 0.15 unit/ml. The conditions for urease activity were optimized by varying pH of media (7, 8, and 9), urea concentrations (25, 50, 100, 200, 300, and 400 mM), and $CaCl_2$ concentrations (15, 30, and 60 mM). It was found that the isolate G27 could induce carbonate precipitation at the higest level of 3.1 mg/ml dry weight, when the culture was incubated at 30 °C for 16 h on the optimized media containing 50 mM urea and 30 mM $CaCl_2$, pH7. For identification the full sequence of 16S rDNA (~1,400 bp) of the isolate were investigated. The result showed that G27 was Gram-positive bacteria and classified as *Sporosarcina koreensis* . Induction of calcium carbonate or calcite precipitation on surface and subsurface of the support blocks (used as ornamental stone) by *Sporosarcina koreensis* G27 was, then, determined by microbial plugging of sand column. The results showed the highest precipitation rate at 0.08 mg/g of sand/day. Examination by scanning electron microscope revealed the bacterial cells located in the middle of calcite crystal as nucleation sites. Weight increase through biomineralization experiment was carried out on different sizes of support blocks and conducted in liquid medium (urea-$CaCl_2$) under shaking condition for small blocks and stationary condition for large blocks. The consolidation efficiency of the newly formed calcite was determined by ultrasonic treatment at different incubation times. Increases of weight were observed in samples cultured under both conditions. Maxiumum weight increases were found with the small blocks after incubation for 20 days while the large blocks subjected to bacterially induced mineralization showed much lesser

damage than the small blocks and controls after sonication. The findings further suggest a potential use of microbial calcite precipitation process in remediation of the surface and subsurface of porous materials. Method for application of the ureolytic bacteria for conservation of ornamental stone was, then, studied by spraying or painting the bacterial culture prepared in urea-$CaCl_2$ broth onto the surface of support blocks (6x12x6 cm). The results indicated that the highest calcium carbonate precipitation was induced when the 50 ml culture of *S. koreensis* G27 ($2.0x10^7$ cfu/ml) was sprayed or painted onto the surface of support blocks. In addition, decrease of water absorption rate was also observed in test support blocks. This finding indicated the possibility of application of the ureolytic bacteria which capable of inducing carbonate precipitation on surface of the support materials could be used for conservation of buildings, ornamental and monumental stones as an alternative surface treatment.

Executive Summary

โครงการวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซมยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนตเพื่อการอนุรักษ์และซ่อมแซมโบราณวัตถุ ได้บรรลุผลสำเร็จดังต่อไปนี้

ผลสำเร็จเบื้องต้น (Preliminary results : P) คือองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยกจุลินทรีย์ที่เอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคในการคัดแยกที่ปรับปรุงจากงานวิจัยอื่นๆ เพื่อให้เหมาะสมและได้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดและการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ยูรีเอสที่ได้ และการศึกษาการพัฒนาความแข็งแกร่งของวัสดุก่อสร้างในระหว่างที่มีการตกตะกอนคาร์บอเนตโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงและปรับปรุงกระบวนการต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นให้เหมาะสมต่อการวิจัย และผลสำเร็จที่ได้เป็นของใหม่และมีความแตกต่างจากที่เคยมีมาแล้ว

ผลสำเร็จกึ่งกลาง (Intermediate results : I) คือข้อมูลชนิดจุลินทรีย์ที่เอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตที่ได้จะสามารถนำไปสู่การศึกษาวิจัยที่สูงขึ้น ได้แก่ การศึกษาการปกป้องและการเสริมความแข็งแกร่งของพื้นผิวโบราณวัตถุโดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต และการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรีย และสามารถนำไปใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป

ผลสำเร็จตามเป้าประสงค์ (Goal results : G) คือข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่เอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตจะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้แทนสารเคมีสังเคราะห์หรือวิธีการอื่นๆ ในการปกป้องรักษาและเสริมสร้างความแข็งแกร่งให้กับโบราณวัตถุและโบราณสถาน ตลอดจนวัสดุก่อสร้างอื่นๆ ที่ใช้ก่อสร้างอาคารบ้านเรือน หน่วยงานต่างๆ และเป็นข้อมูลในการพัฒนาไปสู่การจัดการคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป