# ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านของภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดการวิจัย

ดร. จรูญ สารินทร์

รศ.ดร. ศิริพรรณ สารินทร์

พฤษภาคม 2555

# สารบัญ


| บทที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | **บทนำ**..... | 1 |
| 2 | **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**..... | 4 |
| | การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ (Microbial carbonate precipitation, MCP)..... | 5 |
| | การตกตะกอนคาร์บอเนตโดยจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย ( Microbial carbonate precipitation by way of urea Hydrolysis )..... | 6 |
| | การเกิด MCP เพื่อสร้างความแข็งแรงของวัสดุที่มีรูพรุน..... | 10 |
| | Calcite In- situ Precipitation System (CIPS)..... | 11 |
| | ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิด cementation ..... | 11 |
| | แหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส..... | 13 |
| 3 | **วิธีดำเนินการวิจัย**..... | 19 |
| | เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... | 20 |
| | อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี..... | 21 |
| | วิธีดำเนินการวิจัย..... | 21 |
| | การวิเคราะห์ข้อมูล..... | 34 |
| 4 | **ผลการวิจัย**..... | 35 |

# สารบัญ (ต่อ)

**บทที่** **หน้า**


5 **บทสรุป**..... 64

สรุปผลการวิจัย..... 64

อภิปรายผลการวิจัย..... 65

ข้อเสนอแนะ..... 70

**บรรณานุกรม**..... 71

**ภาคผนวก**..... 76

**ผลงานตีพิมพ์**..... 93

# สารบัญตาราง

**ตาราง** **หน้า**


1 การผลิต $CaCO_3$ โดยจุลินทรีย์ที่สร้างคาร์บอเนตจากกระบวนการไฮโดรไลซิสของยูเรีย..... 8

2 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่กิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสไม่ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม..... 15

3 จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนตบนอาหาร urea-$CaCl_2$ agar ..... 37

4 จำนวนเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอสและ Urease activity ..... 37

5 ผลของระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสของแบคทีเรีย (n = 3)..... 37

6 ผลของความเข้มข้นของยูเรียต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth pH7 (n = 3)..... 38

7 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสของแบคทีเรีย ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth pH7 และยูเรียความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (n = 3)..... 38

8 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 16S rDNA ของไอโลเลท G27 กับแบคทีเรียชนิดอื่น ..... 40

9 อัตราการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวเม็ดทรายโดยแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 (n = 5)..... 41

10 การมีชีวิตของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบนพื้นผิวอิฐตัวอย่าง..... 61

11 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบใส (n = 12)..... 63

12 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 50-250 ไมโครโมลาร์ $NH_4Cl$..... 80

13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย ไอโซเลท G27..... 93

# สารบัญภาพ


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | Chemical speciation ของ $H_2CO_3$ (△), $HCO_3^-$ (●)และ $CO_3^{2-}$ (▲) ที่ 25°C..... | 13 |
| 2 | Coupling of urea hydrolysis และ ATP generation ของ *S. pasteurii* | 17 |
| 3 | Chemical speciation ของ Ammonia ($NH_3$) (○)และ ammonium ($NH_4^+$) (●)ที่ pH ต่างๆ..... | 18 |
| 4 | ลักษณะการจัดโมเดลคอลัมน์ทรายตามแนวดิ่ง..... | 27 |
| 5 | การเรียงอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน..... | 30 |
| 6 | การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยถุงพลาสติก..... | 32 |
| 7 | การคลุมชุดอิฐตัวอย่างจำนวนสิบสองก้อน ด้วยฉนวนกันความร้อน..... | 32 |
| 8 | อิฐตัวอย่างที่ถูกทำการแช่ในน้ำกลั่น..... | 33 |
| 9 | การซับน้ำส่วนเกินออก..... | 33 |
| 10 | การตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนอาหาร urea-$CaCl_2$ agar..... | 36 |
| 11 | การทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ยูรีเอส บนอาหาร urea agar..... | 36 |
| 12 | น้ำหนักแห้งของตะกอนคาร์บอเนตที่เกิดจากการชักนำของแบคทีเรียในสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้นที่ 7 ยูเรีย 50 มิลลิโมลาร์ และ $CaCl_2$ 30 มิลลิโมลาร์..... | 39 |
| 13 | ปริมาณตะกอนคาร์บอเนตชีวภาพของแบคทีเรียไอโซเลท G27..... | 39 |
| 14 | การติดสีแกรมและลักษณะเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลท G27..... | 40 |
| 15 | ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายก่อนการทดลองและในชุดควบคุม..... | 42 |
| 16 | ลักษณะพื้นผิวเม็ดทรายในชุดทดลอง..... | 43 |
| 17 | น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาดเล็ก (n = 5)..... | 45 |
| 18 | น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่ (n = 5)..... | 45 |
| 19 | ลักษณะพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างก่อนนำไปทดลองและในชุดควบคุม..... | 46 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพ | | หน้า |
|---|---|---|
| 20 | ลักษณะพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างในชุดทดลอง..... | 47 |
| 21 | น้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กหลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)..... | 49 |
| 22 | น้ำหนักที่หายไปของชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่หลังจากผ่านการ Sonication (n = 5)..... | 49 |
| 23 | ลักษณะพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดเล็กจากการทดสอบความแข็งแกร่ง..... | 50 |
| 24 | ลักษณะพื้นผิวชิ้นอิฐตัวอย่างขนาดใหญ่จากการทดสอบความแข็งแกร่ง..... | 51 |
| 25 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ก่อนนำมาทดลอง..... | 54 |
| 26 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุม ที่ฉีดพ่นโดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ..... | 55 |
| 27 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุม ที่ทาโดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ..... | 56 |
| 28 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุม ที่ฉีดพ่นโดย urea-$CaCl_2$ broth..... | 57 |
| 29 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดควบคุม ที่ทาโดย urea-$CaCl_2$ broth..... | 58 |
| 30 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดทดลอง ที่ฉีดพ่นโดยหัวเชื้อแบคทีเรียผสมกับ urea-$CaCl_2$ broth..... | 59 |
| 31 | ลักษณะพื้นผิวอิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร ของชุดทดลอง ที่ทาโดยหัวเชื้อแบคทีเรียผสมกับ urea-$CaCl_2$ broth..... | 60 |
| 32 | การติดสีแกรมของหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 อายุ 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ทดลอง ซึ่งสามารถเห็นเอ็นโดสปอร์ที่หลุดออกมาจากเซลล์..... | 62 |
| 33 | การติดสีแกรมของแบคทีเรียบน urea agar จากชุดทดลอง..... | 62 |