



การประยุกต์ใช้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอสและชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนต เพื่อการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้าง

จรรยา สารินทร์^{a*} สิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม^b และศิริพรรณ สารินทร์^b

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

Charoon Sarin^{a*}, Sittud Soypetcasem^b and Siripun Sarin^b

^aภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^bภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^aDepartment of Natural Resources and Environment, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment,
Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

^bDepartment of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* G27 ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต ผลการวิจัยพบว่า ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย (2.0×10^7 cfu/ml) ที่เตรียมในอาหาร urea-CaCl₂ broth ทั้งแบบฉีดพ่น (SUG) และแบบทา (PUG) บนพื้นผิวอิฐตัวอย่างที่ทดสอบ ขนาด 6x12x6 เซนติเมตร เป็นเวลา 30 วัน มีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุดควบคุม โดยเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแกนอิโที่กำลังขยาย 10 เท่า พบตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้นใหม่จับตัวกันหนาติดอยู่ตามพื้นผิวและผนังรูพรุนของก้อนอิฐ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการปกป้องพื้นผิวโดยการป้องกันน้ำที่เป็นตัวการทำให้เกิดการผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทา พบว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิวอิฐตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียมโดยการชักนำของแบคทีเรียซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิววัสดุก่อสร้างของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถาน หรือสถาปัตยกรรมต่างๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหินด้วยวิธีชีวภาพได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ยูรีเอส การตกตะกอนคาร์บอเนต พื้นผิววัสดุก่อสร้าง

Abstract

This research aimed to study method for application of the ureolytic bacteria, *Sporosarcina koreensis* G27, induced calcium carbonate precipitation on surface of support materials. Investigation by spraying (SUG) and painting (PUG) the bacterial culture prepared in urea-CaCl₂ broth onto the surface of support blocks (6x12x6 cm) showed that the highest calcium carbonate precipitation was induced when the culture of *S. koreensis* G27 (2.0×10^7 cfu/ml) was sprayed or painted onto the surface of support blocks for 30 days. The newly formed carbonate cements calcite also grained by depositing on the walls of the pores. *S. koreensis* G27 induced calcium carbonate precipitation presented efficiently water protection of the support materials according to the water absorption rate observed in the tested support blocks was statistically significant lower than the control blocks. There was no significant difference in the water absorption rate between the methods of application. This finding indicated the possibility of application of the ureolytic bacteria which capable of inducing carbonate precipitation on



surface of the support materials could be used for conservation of buildings, ornamental and monumental stones as an alternative surface treatment.

Keywords: ureolytic bacteria, carbonate precipitation, surface of supporting material

บทนำ

ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ การผุพังหรือผุกร่อนของอาคารบ้านเรือน โบราณวัตถุโบราณสถาน หรือสถาปัตยกรรมต่างๆ ที่ทำจากวัสดุก่อสร้างที่เป็นหิน โดยเฉพาะหินตะกอนคาร์บอเนต (carbonate stones) นั้น เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการทางกายภาพ เคมี และชีวภาพตามสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป กรอบกับลักษณะและองค์ประกอบของเนื้อหินที่เป็นประเภทหินตะกอนคาร์บอเนต ซึ่งเกิดจากการทับถมของตะกอนคาร์บอเนต ทั้งจากสารอนินทรีย์ และซากสิ่งมีชีวิต เช่น ปะการัง และกระดูกของสัตว์ทะเล ซึ่งทับถมกันภายใต้ความกดดันและตกผลึกใหม่เป็นแร่แคลไซต์หรือแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) จึงทำปฏิกิริยากับกรด มีลักษณะเนื้อแน่นละเอียดหยาบ มีสีออกขาวเทา ชมพู หรือสีดำ ตัวอย่างเช่น หินปูน (limestones) โดโลสโตน (dolostones) หินอ่อน (marbles) และเป็นหินที่ละลายน้ำได้ อ่อนไหวต่อสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้ผุพังได้ง่าย โดยเฉพาะในปัจจุบันที่มีปัจจัยเสริมจากการเพิ่มขึ้นของมลภาวะทางอากาศ เช่น การเกิดฝนกรด ส่งผลให้เร่งการผุกร่อนเกิดเร็วขึ้น (Price, 1996; Winkler, 1994) จึงมีความพยายามที่จะหยุดยั้งหรือชะลอการผุกร่อนพังทลาย โดยเฉพาะในส่วนพื้นผิวของวัสดุก่อสร้างเหล่านี้ โดยวิธีการอนุรักษ์ทั้งในรูปแบบของการปกป้องโดยป้องกันน้ำหรือป้องกันสิ่งอื่นๆ ที่เป็นตัวการของการผุพัง (weathering agents) ไม่ให้สามารถเข้าถึงแกนกลางของวัสดุก่อสร้างได้ รวมทั้งการเสริมสร้างความแข็งแรง โดยการปรับปรุงเพื่อลดการผุพังของรูพรุนในวัสดุก่อสร้างด้วยซีเมนต์หรือวัสดุสร้างความแข็งแรงอื่นๆ แต่ไม่ว่าจะเป็นวิธีการอนุรักษ์ด้วยวิธีใดก็ตาม วัสดุที่นำมาใช้นั้นมีทั้งที่ทำจากสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ต่างๆ เช่น อะคริลิก (acrylic) กาวเรซิน อีพอกซี (epoxy resins) (Horie, 1987) และสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ [$\text{Ba}(\text{OH})_2$] (Lewin & Baer, 1974) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีการใช้วัสดุต่างๆ เหล่านี้ ก็ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ

โดยเฉพาะการใช้วัสดุชนิดสารอินทรีย์นั้นอาจจะไม่สามารถเข้ากันได้กับวัสดุพื้นผิวเดิมและอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อพื้นผิวของวัสดุก่อสร้าง ในขณะที่การใช้วัสดุที่ทำจากสารอนินทรีย์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจกว่าทั้งในแง่ของการเป็นวัสดุที่ใช้ปกป้องและสร้างความแข็งแรง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแร่ธาตุ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงกับองค์ประกอบของวัสดุก่อสร้าง ตัวอย่างเช่น การใช้วิธีการที่เรียกว่า limewater treatment (Price, 1985) ซึ่งมีสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] เป็นส่วนประกอบ ในการสร้างความแข็งแรงให้กับหินคาร์บอเนต เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถตกตะกอนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ มีการตกตะกอนน้อย เกิดเป็นแค่ชั้นบางๆ ซึ่งไม่เพียงพอที่จะปกป้องและสร้างความแข็งแรงให้กับวัสดุก่อสร้าง (Price et al., 1988)

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยในการนำแบคทีเรียชนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตที่เรียกว่า microbial carbonate precipitation (MCP) หรือ biocementation ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวรูปที่ช่วยป้องกันการผุพังของวัสดุสิ่งก่อสร้าง และยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ด้วยวิธีการอนุรักษ์นี้จะอาศัยการเลียนแบบวิถีทางธรรมชาติ เช่นเดียวกับการเกิดขึ้นของหินตะกอนคาร์บอเนตบนโลก (Stocks-Fischer et al, 1999) โดยแบคทีเรียที่สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนตนั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน (heterotrophic soil bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน (Castanier et al., 1999; Hammes & Verstraete, 2002) เช่น ยูเรีย (urea) ได้โดยใช้เอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา แล้วได้สารผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอเนตไอออน (carbonate ions) และแอมโมเนียม (ammonium, NH_4^+) ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เป็นด่าง ซึ่งถ้าในสภาพแวดล้อมนั้นมีแคลเซียมไอออน (calcium ions) อยู่จะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลไซต์ (Fujita et al.,

2000; De Muynck et al., 2008; Tiano et al., 1999) ที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิว หรือในรูช่องว่างของวัสดุ โดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีผู้สนใจนำแบคทีเรียมานำมาวิจัยเพื่อการประยุกต์ใช้ เช่น การนำแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* มาชักนำให้เกิดตะกอนแร่ภายในรูช่องว่าง หรือรอยแตกของพื้นผิวแกรนิต ซึ่ง *B.pasteurii* มีความสามารถใช้อยูเรียเป็นแหล่งพลังงาน แล้วทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต (Kroll, 1990) หรือการใช้แบคทีเรีย *Myxococcus xanthus* ที่สามารถชักนำการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อเสริมความแข็งแรงและลดตามรูพรุนของหินปูน โดยพบว่าหินปูนที่เกิดใหม่จะไปสะสมที่ผนังรูพรุน (Rodriguez-Navarro et al., 2003) และการใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่นในการชักนำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในหินปูน ซึ่งพบว่าตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นใหม่ประสานกันได้ดีกับเนื้อหินปูนเดิม (Jimenez-Lopez et al., 2007) ดังนั้นการอนุรักษ์วัสดุก่อสร้างด้วยวิธีนี้จึงขึ้นอยู่กับ การเกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะเป็นซีเมนต์บนพื้นผิวหรือช่องว่างของวัสดุก่อสร้างโดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้เกิดการยึดติดแน่นของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตได้ดีกว่าวิธี limewater treatment

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย *Sporosarcina koreensis* G27 ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย ผลิตภัณฑ์ยูเรียเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตบนพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง เพื่อประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์สิ่งก่อสร้างให้มีความทนทาน และมีการดูดซึมน้ำต่ำ ซึ่งจะเป็นการปกป้องและการเสริมความแข็งแรงของพื้นผิววัสดุที่ใช้ในการก่อสร้าง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียชนิดแกรมบวก *Sporosarcina koreensis* G27 ที่แยกได้จากดินพื้นที่เกษตรกรรม โดย สิทธิศักดิ์ และคณะ (2552) มีรูปร่างท่อน

สร้างเอนโดสปอร์ได้ สามารถเคลื่อนที่ได้ ผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาเลสไตด์ และมีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้สร้างพลังงานให้ประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ ยูเรียเอสดีที่สุดที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7.0 และมีระดับความเข้มข้นของยูเรียและแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ที่เหมาะสมระหว่าง 50 ถึง 100 mM และ 30 mM ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดตะกอนคาร์บอเนตได้น้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีอัตราการสร้างตะกอนเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชั่วโมง

2. การเตรียมอิฐตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวแทนของวัสดุ ก่อสร้างทำการผสมทราย เนื้อดิน ปูนซีเมนต์ และน้ำในอัตราส่วน 5:2:1:1 ตามลำดับ แล้วนำมาอัดลงในแม่พิมพ์ เพื่อให้ได้อิฐตัวอย่างขนาด 6x12x6 เซนติเมตร จากนั้นบ่มชิ้นอิฐโดยใช้ผ้าชุบน้ำให้เปียกทั่วไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วันทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจึงทำการคัดเลือกอิฐที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน จากนั้นนำอิฐไปทาด้วยสารเคลือบไล่ประเภทกันน้ำ (water repellent) จำนวนห้าด้านของก้อนอิฐ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและทำการทาซ้ำเช่นนี้อีกจำนวนสองครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวัน จนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้ว ทำการบันทึกน้ำหนักสุดท้าย ซึ่งเป็นน้ำหนักก่อนการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันน้ำ ทำการทดสอบประสิทธิภาพ การป้องกันน้ำของสารเคลือบไล่ โดยใช้ด้านที่ทาสารเคลือบไล่แชลงในน้ำกลั่นให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออกทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดน้ำ จากนั้นจึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และทำการชั่งน้ำหนักทุกวัน จนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงจึงทำการบันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักก่อนการทดลอง แล้วนำอิฐจำนวนสิบสองก้อนมาเรียง ซ้อนกัน (รูปที่ 1) โดยเรียงให้ด้านที่ไม่ได้ทาสารเคลือบไล่ออกในทางเดียวกันทุกก้อนเพื่อใช้เป็นด้านของการทดลองต่อไป



3. การศึกษารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย

3.1 รูปแบบการพ่น ทำโดยการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ด้วยการถ่ายเชื้อ 1 ลูกปลงฟลาस्कที่มีอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร (2.0×10^7 cfu/ml) ลงฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร urea-CaCl₂ broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียเป็นของเหลวในการฉีดพ่น (SUG) จากนั้นนำมาฉีดพ่นให้เป็นละอองด้วยอุปกรณ์พ่นขนาดบรรจุ 650 มิลลิลิตร ลงบนด้านของอิฐที่ไม่ได้ทาสีเคลือบสี โดยการกดตามฉีดให้สุดหนึ่งครั้งต่อหนึ่งก้อนให้มีระยะห่างจากอิฐตัวอย่างประมาณ 10 เซนติเมตร ฉีดพ่นตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 12 เรียงตามลำดับ แล้วกลับมาฉีดพ่นวนใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนกระทั่งของเหลวที่เหลือไม่สามารถฉีดพ่นในรอบต่อไปได้อีก จากนั้นทำการวัดปริมาตรของเหลวที่เหลือเพื่อคำนวณปริมาณเชื้อที่ใช้ไป กำหนดการฉีดพ่นทุกวันๆ ละสองครั้ง คือ ช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 9.00 น. และในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ตั้งแต่วันที่ 16 ถึงวันที่ 30 ของการทดลอง ทำเช่นเดียวกันนี้กับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร urea-CaCl₂ broth 100 มิลลิลิตร (SU) และชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร (SW) หลังจากทำการทดลองสิ้นสุดลงในแต่ละวันทำการคลุมชุดอิฐการทดลองทุกชุดด้วยถุงพลาสติก เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น แล้วคลุมทับด้วยฉนวนกันความร้อนเพื่อป้องกันความร้อนจากแสงแดดอีกหนึ่งชั้น

3.2 รูปแบบการทา ทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธีการฉีดพ่น แต่เปลี่ยนวิธีการเป็นการทา โดยใช้แปรงทาสีปราศจากเชื้อขนาด 1 นิ้ว ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร (PW) ชุดควบคุมที่ใช้ อาหาร urea-CaCl₂ broth 100 มิลลิลิตร (PU) และชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร urea-CaCl₂ broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (PUG)

โดยขณะที่ทำการทดลองทั้งสองรูปแบบมีการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่นำมา

ทดลอง ก่อนทำการฉีดพ่นหรือทาในช่วงเวลา 17.00 น. ถึง 18.00 น. ของทุกวัน ด้วยการนำไม้พ่นสำลีปราศจากเชื้อชุบ 0.85% sterile saline ป้ายลงบนพื้นผิวของอิฐที่ทำการฉีดพ่นพื้นที่ 1 ตารางนิ้ว จากนั้นนำไปป้ายลงบนจานอาหาร urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตจากอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพู แล้วทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารได้และทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่างวันภายใต้ถุงพลาสติกและแผ่นฉนวนกันความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่างตลอดการทดลอง

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่าง โดยการทดสอบหาค่าดูดซึมน้ำ ทำโดยนำอิฐตัวอย่างมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทุกวันจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง นำอิฐตัวอย่างที่ได้ไปแช่ในน้ำกลั่นโดยคว่ำด้านที่ไม่ได้ทาสีเคลือบสีลงให้ลึก 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้ววางในลักษณะเดิมลงบนกระดาษกรองที่ซ้อนกันหนา 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อซับน้ำส่วนเกินออก จากนั้นชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างในชุดการทดลองด้วย t-Test: Paired Two Sample for Means แบบทางเดียว (One-tail)

ผลการศึกษา

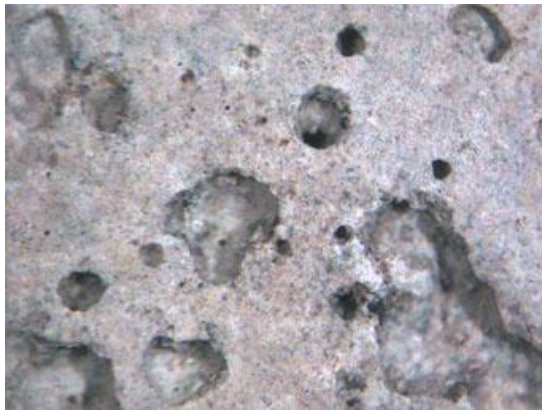
จากการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนบนพื้นผิวอิฐตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ในชุดควบคุมทั้ง SW และ PW ลักษณะพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณน้อยมาก เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า พบว่า มีตะกอนสีขาวนั้นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมบางมาก ในชุดควบคุมทั้ง SU และ PU ลักษณะพื้นผิวอิฐโดยรวมมีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากกว่าชุดควบคุม SW และ PW เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า

พบตะกอนสีขาวติดอยู่ตามผนังรูปพรุน หรือตามผนังหลุม เช่นเดียวกันกับชุดควบคุม SW และ PW แต่พบใน ปริมาณมากกว่า สำหรับชุดทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแบบ SUG และ PUG พบว่าบนพื้นผิวอิฐที่ทดสอบมี คราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่ปริมาณมากที่สุด และเมื่อ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า พบว่ามีตะกอนสีขาวจับตัวกันหนาติดอยู่ตาม ผนังรูปพรุนหรือตามผนังหลุมเช่นเดียวกัน แต่พบใน ปริมาณมากกว่าชุดควบคุมทั้งสอง (รูปที่ 2) โดยตลอด การทดลองนี้พบว่ามีค่าความชื้นและอุณหภูมิโดยเฉลี่ย ระหว่างวัน ภายใต้อุณหภูมิพลาสติกและแผ่นฉนวนกัน ความร้อนที่ใช้คลุมอิฐตัวอย่างเท่ากับ 77.4 เปอร์เซ็นต์ และ 29.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสามารถพบ แบคทีเรียที่มีชีวิตและผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยสังเกต จากอาหารเลี้ยงเชื้อ urea agar เปลี่ยนจากสีเหลืองส้ม

เป็นสีชมพูหลังจากบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และเมื่อ ทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง เชื้อ urea agar ที่มาจากชุดทดลอง พบว่ามีแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ที่มีลักษณะรูปร่างท่อน และการติดสี แกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างแท้จริง และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ อย่างไรก็ตามพบ แบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นเจริญอยู่ด้วย และจาก การศึกษาประสิทธิภาพของอิฐตัวอย่างโดยการทดสอบ การดูดซึมน้ำ พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อ แบคทีเรียทั้งแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการ จิตพ่นหรือทานั้น มีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำน้อยที่สุด เท่ากับ 1.51 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมภายใต้อุณหภูมิของการ ทดลองเดียวกัน (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะการเรียงอิฐตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง



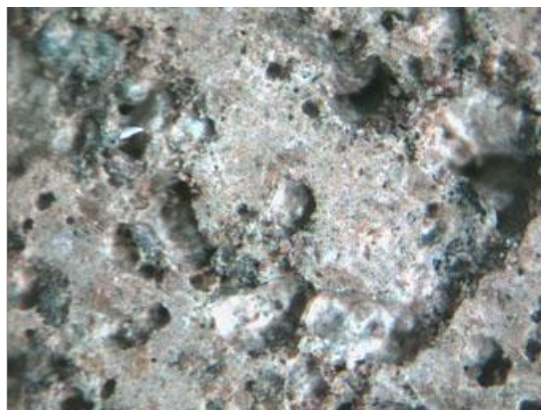
ก. SW



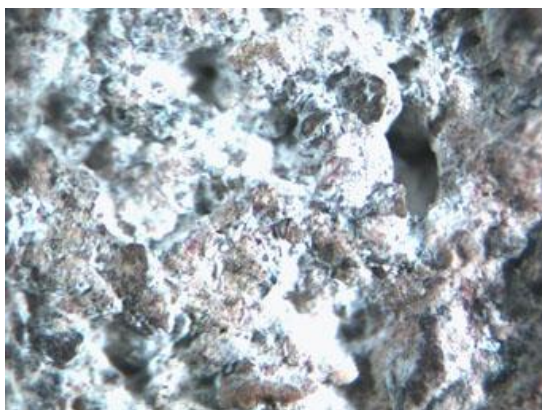
ง. PW



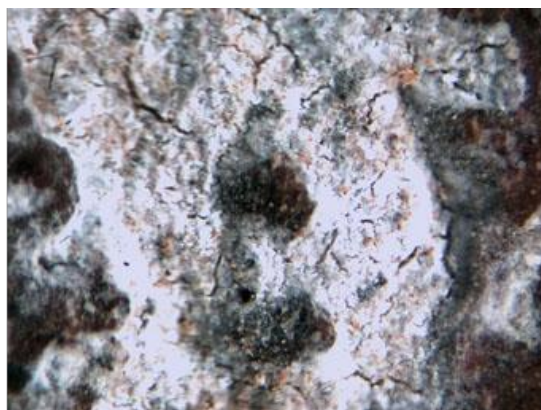
ข. SU



จ. PU



ค. SUG



ฉ. PUG

รูปที่ 2 ลักษณะพื้นผิวตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 10 เท่า
หลังการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

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

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

หมายเหตุ: ns = ไม่มีนัยสำคัญ * นัยสำคัญที่ระดับ 0.05

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาและพัฒนารูปแบบการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอส *S. koreensis* G27 พบว่าชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนบนผิววัสดุตัวอย่าง โดยในชุดควบคุมทั้ง SW PW SU และ PU มีคราบตะกอนสีขาวปรากฏอยู่บนพื้นผิววัสดุ ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนคาร์บอนได้เองของไอออนที่หลุดออกมาจากองค์ประกอบของวัสดุซึ่งใช้เป็นส่วนผสมวัสดุตัวอย่างโดยมีน้ำเป็นตัวทำละลาย (Jimenez-Lopez et al., 2008) อีกทั้งสภาวะที่เป็นต่างอันเกิดจากส่วนผสมของปูนซีเมนต์ร่วมด้วย (De Muynck et al., 2008) จึงทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนคาร์บอนได้แต่มีปริมาณน้อย และเมื่อมีตะกอนสะสมไม่มากพอที่จะส่งผลให้ผนังรูพรุนมีขนาดเล็กลง จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดน้ำของพื้นผิววัสดุตัวอย่างมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองแบบ SUG และ PUG และถึงแม้จะมีการพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นบนพื้นผิวของวัสดุตัวอย่างที่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ urea-CaCl₂ broth ได้ และเมื่อให้อาหารใหม่ทุกวัน จึงชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมเกิดขึ้น แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนได้ไม่มากพอเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *S. koreensis* G27 ดังนั้นจึงมีปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นน้อยกว่าในชุดทดลองเนื่องจากพื้นผิววัสดุตัวอย่างของชุดทดลองแบบ SUG และ PUG มีการเจริญของแบคทีเรีย *S. koreensis* G27

อีกทั้งยังได้รับเชื้อใหม่พร้อมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มในทุกวัน จึงสามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอนได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเหตุให้พบตะกอนสีขาวจับตัวสะสมกันอย่างหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนหรือตามผนังหลุมเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และเมื่อมีตะกอนสะสมหนาแน่นติดอยู่ตามผนังรูพรุนส่งผลให้ขนาดของรูพรุนที่ปรากฏในส่วน of พื้นผิววัสดุตัวอย่างมีขนาดเล็กลง หรืออาจตกตะกอนสะสมปิดรูพรุนได้ในกรณีที่รูพรุนมีขนาดเล็กมาก (Le Métyer-Levrel et al., 1999; Jimenez-Lopez et al., 2007; De Muynck et al., 2010) จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิววัสดุตัวอย่างมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยในชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียทั้งรูปแบบ SUG และ PUG เป็นของเหลวในการฉีดพ่นหรือทาลงให้เปอร์เซ็นต์การดูดซึมน้ำของพื้นผิววัสดุตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรีย *S. koreensis* G27 สามารถชักนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอนบนพื้นผิววัสดุก่อสร้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในรูปแบบวิธีการฉีดพ่นและวิธีการทา โดยตะกอนแคลเซียมคาร์บอนจะจับตัวกันหนาแน่นติดอยู่ตามพื้นผิวรูพรุนหรือตามผนังหลุมทำให้ลดการดูดซึมน้ำที่เป็นสาเหตุของการผุพังของวัสดุก่อสร้างได้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตกตะกอนแคลเซียม



โดยการชักนำของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พื้นผิวของวัสดุก่อสร้างได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2554 และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านของภาควิชา ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยา และปรสตีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ รวมทั้งเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม, กัลยา ปรีชากุล และศิริพรรณ สรินทร์. (2552). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ ยูรีเอสและชักนำให้เกิดการตกตะกอนคาร์บอเนต. ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 14. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า-พระนครเหนือ.

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

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

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

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

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

Horie, C.V. (1987). *Materials for Conservation: Organic Consolidants Adhesives and Coatings*. London United Kingdom: Butterworths.

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

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

Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubiere, J.F. & 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.

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., Ross, K. & White, G. (1988). A further appraisal of the 'lime technique' for limestone consolidation using a radioactive tracer. *Studies Conservation*, 33, 178 –186.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B. & Gonzalez-Munoz, M.T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralisation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2182–2193.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1563–1571.
- Tiano, P., Biagiotti, L. & Mastromei, G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 139–145.
- Winkler, E. M. (1994). *Stone in Architecture*. Springer-Verlag. Berlin: n.p.