ศักยภาพการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตต่ออิฐและมอร์ตาร์โบราณด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ร่วมกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น

Potential of calcium carbonate precipitation on ancient bricks and mortars by *Bacillus sphaericus* LMG 22257 cooperating with local microorganism

มุกอันดา สุวัณณะสังข์[1,*] พรเกษม จงประดิษฐ์[1] ชนา พุทธนานนท์[1] ธนเดช นันทนะวานิช[1] และ ศักดิ์สิทธิ์ โชตนิธิสุวรรณ[1]

[1] ศูนย์วิจัยด้านนวัตกรรมการก่อสร้างและระบบโครงสร้างพื้นฐานสำหรับอนาคต ภาควิชาวิศวกรรมโยธา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

**Corresponding author; E-mail address: mukanda.sw@mail.kmutt.ac.th*

บทคัดย่อ

ฐานรากโบราณสถานมักมีความเปราะบางและได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง การบูรณะฐานรากโบราณด้วยเทคนิคที่หลีกเลี่ยงแรงสั่นสะเทือนและการปนเปื้อนของสารเคมีจึงถูกนำมาพิจารณา อีกทั้งแต่ละโบราณสถานยังมีการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์ท้องถิ่น การบูรณะโดยคำนึงถึงสภาพแวดล้อมเดิมจึงเป็นสิ่งจำเป็น งานวิจัยนี้ศึกษาศักยภาพการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตของอิฐและมอร์ตาร์โบราณด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ร่วมกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น วัสดุโบราณในงานวิจัยประกอบไปด้วยอิฐและมอร์ตาร์โบราณ สำหรับดินตัวอย่างเป็นดินใกล้โบราณสถานในจังหวัดลพบุรีที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินสภาพธรรมชาติ โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่นด้วยระยะเวลาการตกตะกอน 18 วัน จากการทดสอบพื้นผิวของวัสดุด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การทดสอบหาปริมาณแร่ธาตุที่เกิดขึ้นด้วยสเปกโทรเมตรีรังสีเอกซ์แบบกระจายพลังงานที่ใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และความลึกของรูพรุนบนผิววัสดุด้วยเครื่องมือสแกนพื้นผิวสามมิติ พบว่าพื้นผิวของวัสดุโบราณมีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นและส่วนหนึ่งได้เข้าไปเติมเต็มรูพรุนของวัสดุจนมีความลึกน้อยลง

คำสำคัญ: กระบวนการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลิทรีย์, จุลินทรีย์ท้องถิ่น, วัสดุโบราณสถาน, การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ, ความขรุขระของผิววัสดุ

Abstract

Most ancient monuments are sensitive to the change in environmental conditions. As a result, it is necessary to be concerned about restoring the monuments while preventing vibration and chemical contamination. Additionally, since ancient monuments cohabit with local microorganisms, it is essential to restore the site while considering the original habitat. This research investigates the potential of microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) on ancient bricks and mortar using *Bacillus sphaericus* LMG 22257 strain cooperating with local microorganism. Bricks and mortars were used for this study. The soil samples were taken from a site adjacent to a historical wall in Lopburi province with different preparations including, sterilized sand and natural local sand to compare the amount of calcium carbonate produced by MICP under treatment of 18 days. The surface profile of the material was analyzed using Scanning Electron Microscope (SEM), the mineral content by Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS), and the pore depth on the material surface by 3D Optical Surface Profilers (3D Scan). The results revealed that the calcium carbonate content of the material grows on its surface by filling in the pores and some contents are fulfilled inside the surface of the bricks, resulting in an additional $CaCO_3$ to be present in the materials.

Keywords: Microbially induced calcium carbonate precipitation, local microorganism, Ancient monument, Mineral content analysis, Roughness of material surface

1. คำนำ

อิฐก่อเป็นส่วนสำคัญสำหรับฐานรากโบราณสถานซึ่งประกอบไปด้วยอิฐและมอร์ตาร์ โดยทั่วไปอิฐก่อฐานรากโบราณสถานจะถูกฝังอยู่ใต้ดินเป็นระยะเวลานาน เมื่อเวลาผ่านไปอิฐก่อฐานรากดังกล่าวย่อมได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง อาทิ เช่น การกัดกร่อนจากดินที่เป็นกรด การชอนไชของรากไม้ และปรากฏการณ์แผ่นดินเหลว [1] การเปลี่ยนแปลง

สภาพแวดล้อมเหล่านี้อาจนำมาสู่การวิบัติของอิฐก่อฐานรากที่ผ่านการใช้งานมาด้วยระยะเวลาที่ยาวนาน อิฐก่อฐานรากโบราณสถานจึงจำเป็นต้องได้รับการบูรณะซ่อมแซม นอกจากนี้ การบูรณะซ่อมแซมด้วยเทคนิคเชิงกล เช่น การขุดเจาะพื้นดินเพื่อเปิดช่องสำหรับการซ่อมแซม หรือเทคนิคทางเคมี การบวนการเหล่านี้อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่ออิฐก่อฐานรากโบราณสถานได้ เนื่องจากแรงสั่นสะเทือนในระหว่างการขุดเจาะพื้นดิน หรือก่อให้เกิดสิ่งปนเปื้อนหลงเหลือเนื่องจากกระบวนการทางเคมีในบริเวณโบราณสถานซึ่งเป็นแหล่งอนุรักษ์ของชาติ สิ่งเหล่านี้ควรหลีกเลี่ยงให้ได้มากที่สุดตามกฎการอนุรักษ์โบราณสถาน [2] ดังนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายการอนุรักษ์โบราณสถานโดยการคงไว้ซึ่งสภาพเดิมและไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อบริเวณโดยรอบ เทคนิคชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจึงถูกนำมาพิจารณาเพื่อศึกษาศักยภาพในการบูรณะซ่อมแซมอิฐก่อฐานรากโบราณสถาน

การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ (Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation, MICP) เป็นเทคโนโลยีทางชีวภาพแขนงใหม่ซึ่งถูกนำมาใช้ในการบูรณะโครงสร้างสมัยใหม่ อาทิ เช่น วัสดุคอนกรีต [3] และยังเป็นเทคโนโลยีที่กำลังได้รับความสนใจจากทั่วโลก สำหรับกระบวนการทำงานของการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์นั้น จะใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตในปริมาณสูงเข้าไปเติมเต็มรูพรุนที่ผิวของวัสดุ และทำให้ผิวของวัสดุมีความหนาเพิ่มขึ้น [4] เมื่ออ้างอิงจากงานวิจัยที่ผ่านมายังพบอีกว่ากระบวนการตกตะกอนด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตมีส่วนช่วยลดช่องว่างของดิน [5] และทำให้ค่ากำลังของดินมีค่ามากขึ้น โดยที่มีกระบวนการเกิดเอนไซม์ยูรีเอสเป็นบทบาทสำคัญในกระบวนการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายเคมี โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวจะปลดปล่อยเอนไซม์ยูรีเอสซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายยูเรีย [6] เพื่อดำรงชีวิต จากนั้นเอนไซม์ยูรีเอสจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนของแร่แคลเซียมคาร์บอเนต

อย่างไรก็ตามการนำเทคโนโลยีการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์มาปรับปรุงโครงสร้างโบราณสถานยังพบเห็นได้น้อยในปัจจุบัน เนื่องจากงานวิจัยที่ศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างโบราณสถานมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง งานวิจัยที่ให้ความสนใจเกี่ยวกับการปรับปรุงฐานรากของโบราณสถานยังจำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบถึงศักยภาพการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตจากการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นและจุลินทรีย์ในท้องถิ่น เพื่อยืนยันว่าเทคโนโลยีการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์นั้นสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงอิฐและมอร์ตาร์ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของฐานรากโบราณสถานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โดยที่ขอบเขตของงานวิจัยนี้ จะดำเนินการศึกษาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตของอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่เหนี่ยวนำโดยการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 (ดินในสภาพฆ่าเชื้อ) และจุลินทรีย์ท้องถิ่น (ดินในสภาพธรรมชาติ) ในขั้นตอนแรกจะดำเนินการทดสอบหาชั่วโมงในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดโดยคำนึงถึงปริมาณเอนไซม์ยูรีเอสที่เหนี่ยวนำด้วยจุลินทรีย์ หลังจากนั้น นำวัสดุโบราณที่ใช้สำหรับการทดลองฝังกลบลงในดินแต่ละกรณี โดยบรรจุดินลงในภาชนะที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาควบคู่ไปกับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยชั่วโมงที่ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ในปริมาณสูง ในขั้นตอนสุดท้าย จึงจะทำการเทสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาตามด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบของเหลวเพื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต และดำเนินการทุกๆ 12 ชั่วโมง รวมทั้งสิ้น 18 วัน โดยเป็นการทดสอบนำร่องเพื่อศึกษาศักยภาพการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่น

2. ตัวอย่างทดสอบและวิธีการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

2.1 ตัวอย่างทดสอบ

2.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

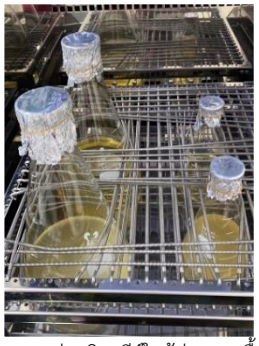
การศึกษานี้ได้นำจุลินทรีย์ต่างถิ่น “*Bacillus sphaericus* LMG 22257” ที่ได้รับการยืนยันว่ามีความสามารถผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในปริมาณมาก [7] ดังนั้น เพื่อศึกษาศักยภาพการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตจากการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ต่างถิ่นและจุลินทรีย์ในท้องถิ่น จึงทำการทดสอบหาชั่วโมงการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในรูปแบบอาหารเหลว หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบรรจุลงในขวดวัดปริมาตร (Erlenmeyer Flask) ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 1(ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ก่อนนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า (Shaking Incubator) ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 1(ข)

2.1.2 วัสดุโบราณ

สำหรับการศึกษานี้จะดำเนินการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ของอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ผ่านการรับรองจากกรมศิลปากร โดยทำการทดสอบอิฐและมอร์ตาร์โบราณจำนวนอย่างละ 9 ก้อน ซึ่งจะทำการตัดก้อนตัวอย่างทดสอบให้มีขนาด 5 ซม. x 5 ซม. x 5 ซม. เพื่อความเหมาะสมสำหรับการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2 (ขนาดเดิม 5 ซม. x 15 ซม. x 30 ซม.)



(ก) จุลินทรีย์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง



(ข) การบ่มจุลินทรีย์ในตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า

รูปที่ 1 จุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257



(ก) อิฐโบราณ



(ข) มอร์ตาร์โบราณ

รูปที่ 2 อิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ใช้ในการทดสอบ



(ก) การรองพื้นด้วยดิน

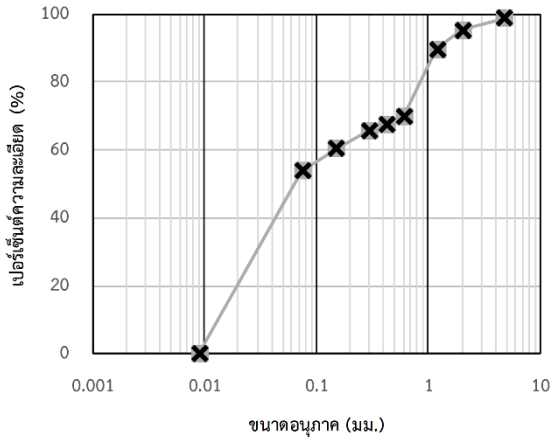


(ข) การฝังกลบด้วยดิน

รูปที่ 3 ตัวอย่างอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ถูกฝังกลบด้วยดิน

2.1.3 ดินตัวอย่าง

การทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ของอิฐและมอร์ตาร์โบราณสำหรับการศึกษานี้มีความตั้งใจที่จะจำลองให้มีสภาพเสมือนธรรมชาติมากที่สุด โดยที่จะทำการฝังกลบอิฐและมอร์ตาร์โบราณด้วยดินที่บรรจุในภาชนะขนาด 17 ซม. x 17 ซม. x 17 ซม. ดังแสดงในรูปที่ 3 สำหรับดินตัวอย่างที่ใช้ฝังกลบนั้นได้นำดินธรรมชาติ (มีการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์ท้องถิ่น) มาจากบริเวณใกล้เคียงกำแพงเมืองโบราณ จังหวัดลพบุรี มีลักษณะเป็นดินเหนียวปนตะกอนทรายโดยมีขนาดคละแสดงดังรูปที่ 4 โดยที่การศึกษานี้จะทำการทดสอบดินทั้งหมด 2 ลักษณะ คือ (1) ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (ไม่มีจุลินทรีย์ท้องถิ่น) และ (2) ดินในสภาพธรรมชาติ (มีจุลินทรีย์ท้องถิ่น) อย่างละจำนวน 1.4 กิโลกรัม



รูปที่ 4 ขนาดคละของตัวอย่างทดสอบ

2.2 วิธีการทดสอบ

2.2.1 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์

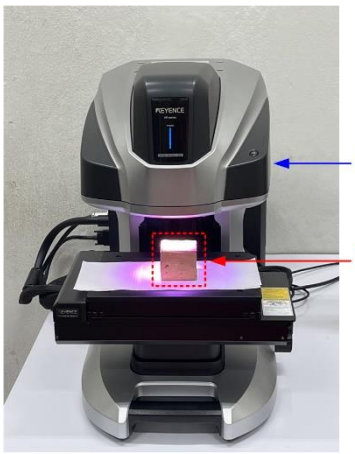
ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต สามารถประเมินผ่านค่าความขุ่นที่บ่งชี้ความหนาแน่นของจุลินทรีย์ (Optical Density, OD_{600}) [8] โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และตรวจสอบค่า OD_{600} ในตู้กรองอากาศแบบเป่าลม (Laminar Flow Cabinet) ที่อุณหภูมิห้อง ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB Broth ควบคู่กับยูเรีย (Urea) 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจหาชั่วโมงการเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ยูรีเอสสำหรับเหนี่ยวนำให้เกิดแคลเซียมคาร์บอเนตได้ในปริมาณสูงสุด

2.2.2 การทดสอบสภาพผิวของวัสดุ

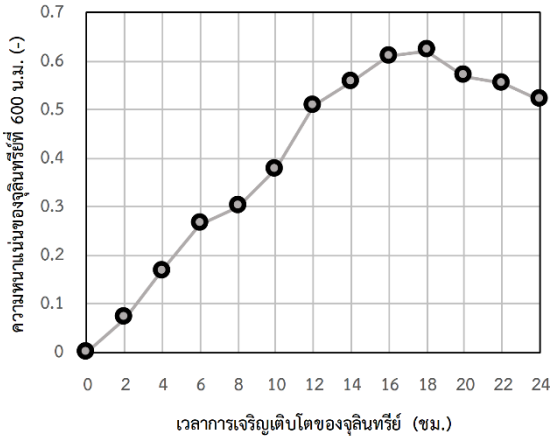
การตรวจสอบสภาพผิวของอิฐและมอร์ตาร์โบราณจะดำเนินผ่านการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope, SEM) การตรวจสอบหาปริมาณแร่ธาตุที่ผิวของอิฐและมอร์ตาร์โบราณด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยสเปกโทรเมตรีรังสีเอกซ์แบบกระจายพลังงานที่ใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDS) และวัดความสูงของผิวหน้าวัสดุด้วยเครื่องมือสแกนสามมิติ (3D scan) ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 5 ก่อนและหลังการปรับปรุงคุณภาพด้วยการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุที่เกิดขึ้นและสภาพผิวของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

2.2.3 ขั้นตอนการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์

ขั้นตอนแรก เตรียมสารละลายเคมีที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาปริมาตร 350 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย $CO(NH_2)_2$ 0.5 โมลาร์, NH_4Cl 10 กรัมต่อลิตร $NaHCO_3$ 2.12 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.5 โมลาร์ และเทลงบน



รูปที่ 5 การทดสอบความสูงผิวหน้าของวัสดุด้วยเครื่องมือสแกนสามมิติ



รูปที่ 6 ค่าความหนาแน่นของจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257

ผิวหน้าของดิน ตามด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลาทั้งสิ้น 18 วัน ในรูปแบบของเหลวปริมาตร 350 มิลลิลิตร โดยทำการอัดฉีดลงบนผิวหน้าของดินที่มีวัสดุทดสอบฝังอยู่ ในการศึกษานี้จะดำเนินการศึกษาเปรียบเทียบผลทั้งสิ้น 3 กรณี แยกย่อย ดังนี้ (1) ตัวอย่างทดสอบที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ (2) ตัวอย่างทดสอบที่ใส่สารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาโดยไม่มีจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และ (3) ตัวอย่างทดสอบที่ขังในน้ำกลั่นโดยไม่มีจุลินทรีย์และสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยา โดยที่ทั้ง 3 กรณีนี้จะทำการทดสอบด้วยดินฝังกลบ 2 ลักษณะ คือ ดินฆ่าเชื้อที่ปราศจากจุลินทรีย์ท้องถิ่น และดินธรรมชาติที่มีจุลินทรีย์ท้องถิ่น การทดสอบในกรณีที่ 2 และ 3 มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบศักยภาพการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ท้องถิ่นเมื่อไม่มีจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ในการเหนี่ยวนำ และศักยภาพการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อไม่มีทั้งจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาในการเหนี่ยวนำตามลำดับ

3. ผลการทดสอบและอภิปรายผล

3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 ค่าความหนาแน่นของจุลินทรีย์

ค่าความขุ่นที่บ่งชี้ความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่ 600 นาโนเมตร (Optical Density at 600 nm, OD_{600}) ถูกนำมาใช้ในการประเมินแนวโน้มความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในแต่ละช่วงเวลา การศึกษานี้ทำการตรวจสอบค่า OD_{600} ทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 6 จากผลการทดสอบพบว่าในช่วง 12-24 ชั่วโมง มีแนวโน้มความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตมากที่สุด และเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกระบวนการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต



รูปที่ 7 ความเข้มข้นของเอนไซม์ยูรีเอส ณ เวลาที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ที่ยังมีชีวิต

3.1.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส

การตรวจสอบค่า OD_{600} อาจยังไม่เพียงพอที่จะสรุปช่วงเวลาที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่า OD_{600} จะมีการเจือปนของจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิตร่วมด้วย [9] ดังนั้น การทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์ยูรีเอสจากจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตเพียงอย่างเดียวด้วยกระบวนการเปรียบเทียบความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์ชนิดฟีนอลเรด (Phenol Red) จึงถูกนำมาพิจารณา ทั้งนี้เนื่องจากฟีนอลเรดเป็นสารละลายสีเหลืองที่สามารถเปลี่ยนเป็นสีแดง [10] เมื่อสารละลายมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.2-8.4 [11] การหยดเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ลงในหลอดทดลองอินดิเคเตอร์จะสามารถบ่งชี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ยูรีเอส (สถานะเป็นเบส) ที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาได้ โดยอ้างอิงความเข้มข้นจากชั่วโมงเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ดังแสดงในรูปที่ 7 จากผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วงเวลาที่ 12-20 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดและมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทุก 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ของวัสดุอิฐและมอร์ตาร์โบราณวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลาทั้งสิ้น 18 วัน

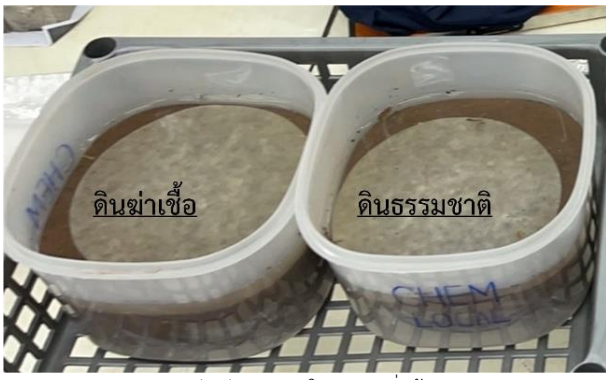


(ก) ตัวอย่างทดสอบในสถานะเริ่มต้น

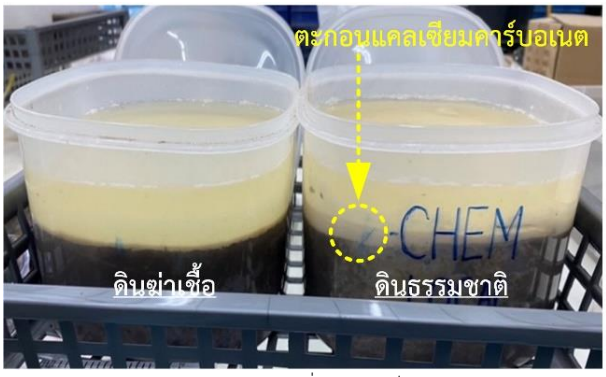


(ข) ตัวอย่างทดสอบหลังจากเริ่มทดสอบเป็นเวลา 18 วัน

รูปที่ 8 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ในดินฆ่าเชื้อและดินธรรมชาติ



(ก) ตัวอย่างทดสอบในสถานะเริ่มต้น



(ข) ตัวอย่างทดสอบหลังจากเริ่มทดสอบเป็นเวลา 18 วัน

รูปที่ 9 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในดินฆ่าเชื้อและดินธรรมชาติเนื่องจากการเติมสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาโดยปราศจากจุลินทรีย์

3.2 วิเคราะห์การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

3.2.1 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์

สำหรับการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ของวัสดุอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ถูกฝังลงในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินในสภาพธรรมชาติ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 วัน ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะถูกควบคุมให้เกิดการเหนี่ยวนำแคลเซียมคาร์บอเนตจากจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียว ส่วนดินในสภาพธรรมชาติ จะเป็นตรวจสอบการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ดำรงอยู่ในดินธรรมชาติ รูปที่ 8 แสดงการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตจากการทดสอบทั้ง 2 กรณี ที่ได้กล่าวข้างต้น โดยพบว่ามีการตกตะกอนและทับถมของแคลเซียมคาร์บอเนตที่บริเวณผิวหน้าของดินทั้ง 2 กรณีในระดับเดียวกัน และสามารถสรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ท้องถิ่นและจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพื่อก่อให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีประสิทธิภาพที่ไม่ด้อยไปกว่าการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ดำรงอยู่ในดินธรรมชาตินั้นมีความสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

3.2.2 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตหลังเติมสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาโดยปราศจากจุลินทรีย์

ภายหลังการเติมสารละลายเคมีที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 วัน ลงในตัวอย่างทดสอบวัสดุอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ถูกฝังกลบด้วยดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินในสภาพธรรมชาติ พบว่าเกิดการทับถมของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตเฉพาะในดินท้องถิ่นธรรมชาติ ผลการทดสอบนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ดำรงอยู่ในดินธรรมชาตินั้นมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต ดังแสดงในรูปที่ 9 อย่างไรก็ตาม ปริมาณของการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นนั้นยังคงมีระดับที่น้อยกว่าการตกตะกอนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่น

3.2.3 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตตัวอย่างทดสอบที่ชังในน้ำกลั่นโดยไม่มีจุลินทรีย์

การแช่ตัวอย่างทดสอบวัสดุอิฐและมอร์ตาร์โบราณที่ถูกฝังกลบด้วยดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินในสภาพธรรมชาติเป็นการทดสอบโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ว่ากระบวนการเกิดแคลเซียมคาร์บอเนตจำเป็นต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ทำงานร่วมกับสารละลายเคมีเพื่อเกิดปฏิกิริยา จากผลการทดสอบพบว่าไม่เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในทั้ง 2 กรณีทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 10 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตจำเป็นต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ทำงานร่วมกับสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยา



(ก) ตัวอย่างทดสอบในสถานะเริ่มต้น



(ข) ตัวอย่างทดสอบหลังจากเริ่มทดสอบเป็นเวลา 18 วัน

รูปที่ 10 การตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในดินฆ่าเชื้อและดินธรรมชาติเนื่องจากการเติมน้ำกลั่น

3.3 การวิเคราะห์พื้นผิวของวัสดุทดสอบ

3.3.1 วิเคราะห์พื้นผิววัสดุด้วยเครื่องมือ 3D Scan

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเครื่องมือสแกนพื้นผิวสามมิติสามารถนำมาใช้ตรวจสอบสภาพพื้นผิวของอิฐและมอร์ตาร์ได้อย่างแม่นยำ [12] จากการตรวจสอบสภาพพื้นผิวของอิฐและมอร์ตาร์โบราณภายหลังการผ่านกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ เป็นเวลา 18 วัน พบว่าตัวอย่างทดสอบทุกตัวอย่างมีค่าความสูงที่ผิวหน้าวัสดุเพิ่มขึ้นเนื่องจากการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่ากระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียวที่ถูกฝังกลบในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ส่งผลให้วัสดุมอร์ตาร์โบราณมีผิวหน้าสูงขึ้นโดยเฉลี่ยประมาณ 9.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อิฐโบราณมีผิวหน้าสูงขึ้นคิดเป็นประมาณ 14.45 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉลี่ย ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่าการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในอิฐโบราณมีประสิทธิภาพ มากกว่าในมอร์ตาร์โบราณ โดยประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ร่วมกับจุลินทรีย์ท้องถิ่นในดินสภาพธรรมชาติ พบว่าอิฐโบราณยังคงมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตมากกว่ามอร์ตาร์ โดยที่อิฐโบราณมีค่าความสูงที่เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยในบริเวณผิวหน้าเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ และในมอร์ตาร์มีค่าเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยประมาณ 11.26 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงความสูงของตัวอย่างทดสอบอิฐและมอร์ตาร์โบราณหลังการทดสอบ 18 วัน

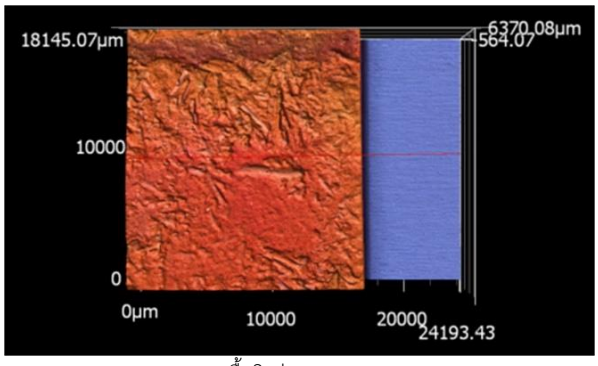
ดินทดสอบ	วัสดุทดสอบ	ความสูงของวัสดุ (ไมโครเมตร)		ส่วนต่างความสูงที่ผิวหน้าวัสดุ (ไมโครเมตร)	ส่วนต่างความสูงที่ผิวหน้าวัสดุ (%)	ส่วนต่างความสูงเฉลี่ยที่ผิวหน้าวัสดุ (%)
		ก่อนทดสอบ	หลังทดสอบ			
ดินฆ่าเชื้อ	มอร์ต้าร์ No. 1.4	7578.19	7992.85	414.66	5.47	9.56
	มอร์ต้าร์ No. 1.6	6851.61	7787.03	935.42	13.65	
	อิฐ No. 2.1	5865.41	6481.72	616.31	10.51	14.45
	อิฐ No. 3.2	5503.84	6515.82	1011.98	18.39	
ดินธรรมชาติ	มอร์ต้าร์ No. 1.1	7497.6	8737.14	1239.54	16.53	11.26
	มอร์ต้าร์ No. 1.2	6905.52	7319.08	413.56	5.99	
	อิฐ No. 2.4	7066.27	8368.61	1302.34	18.43	12.00
	อิฐ No. 2.5	5819.22	6221.03	401.81	6.91	

ตารางที่ 2 น้ำหนักของแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ยบริเวณผิวของอิฐโบราณ (ความลึก 1 มม. และ 2 มม.) และดินหลังการทดสอบ 18 วัน

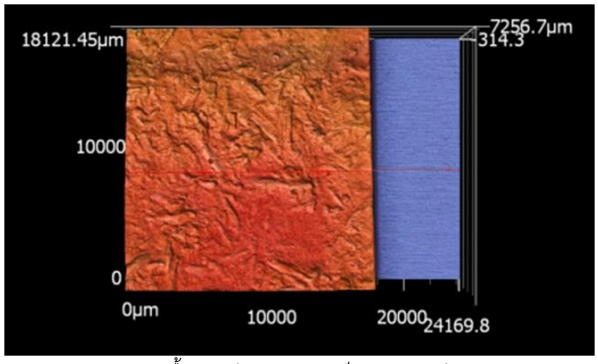
ตัวอย่างทดสอบ	ดินฆ่าเชื้อ		ดินธรรมชาติ	
	1 มม.	2 มม.	1 มม.	2 มม.
กรณีที่ 1 *	0.42	0.28	0.77	0.43
กรณีที่ 2 **	0.73	N.A.	0.62	N.A.
กรณีที่ 3 ***	38.97		42.49	

** อิฐที่ผ่านกระบวนการการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์;*
*** อิฐที่ใส่สารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาโดยไม่มีจุลินทรีย์;*
**** ดินที่ผ่านกระบวนการการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์*

เมื่อเปรียบเทียบความสูงที่เพิ่มขึ้นบริเวณผิวหน้าของมอร์ตาร์ที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตในดินทั้ง 2 กรณี พบว่าในกรณีที่ใช้จุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ร่วมกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น (ในดินสภาพธรรมชาติ) ให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตมากกว่าการทำงานของจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* เพียงชนิดเดียวในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย) ในทางกลับกัน อิฐโบราณที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียวในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนที่ผิวหน้าของวัสดุที่มากกว่า

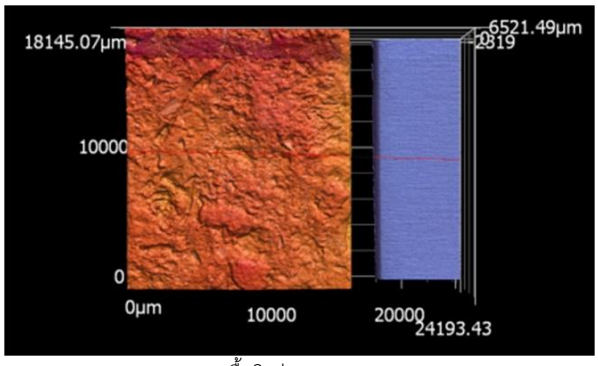


(ก) พื้นผิวก่อนการทดสอบ

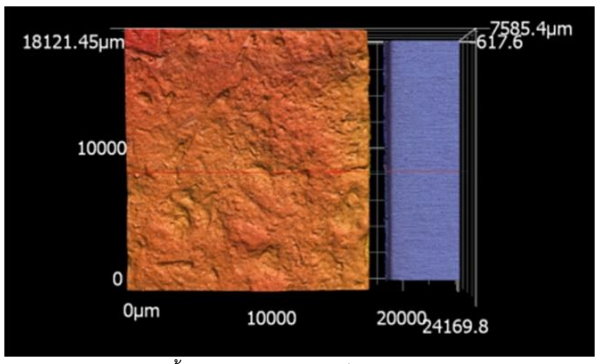


(ข) พื้นผิวหลังการทดสอบเป็นเวลา 18 วัน

รูปที่ 11 พื้นผิวตัวอย่างทดสอบอิฐโบราณหมายเลข 2.1 สำหรับการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ในดินฆ่าเชื้อ



(ก) พื้นผิวก่อนการทดสอบ



(ข) พื้นผิวหลังการทดสอบเป็นเวลา 18 วัน

รูปที่ 12 พื้นผิวตัวอย่างทดสอบอิฐโบราณหมายเลข 2.5 สำหรับการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ในดินธรรมชาติ

การทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 กับจุลินทรีย์ท้องถิ่นเพียงแค่ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม ส่วนต่างค่าเฉลี่ยดังกล่าวถือว่ามีค่าน้อยจนสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นสามารถทำงานร่วมกันกับจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ได้เป็นอย่างดีต่อกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต

นอกจากนี้ จากผลการถ่ายภาพผิวของตัวอย่างทดสอบก่อนและหลังกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ ยังพบว่าภายหลังจากกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต บริเวณผิวหน้าของวัสดุมีความขรุขระและรูพรุนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12

3.3.2 วิเคราะห์โครงสร้างจุลภาคของดินและพื้นผิวของอิฐโบราณด้วยเครื่องมือ EDS

ในการศึกษานี้ เครื่องมือ EDS จะถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักของธาตุแคลเซียมที่เกิดขึ้นในดิน สำหรับแคลเซียมที่เกิดขึ้นบนวัสดุในระดับจุลภาคจะดำเนินการทดสอบในอิฐโบราณเพียงอย่างเดียว เนื่องจากตัวอย่างของมอร์ตาร์โบราณประกอบไปด้วยแคลเซียมจำนวนมาก ส่งผลให้มีข้อจำกัดในการแยกวิเคราะห์ตะกอนแคลเซียมที่เกิดจากกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ และแคลเซียมที่มาจากส่วนผสมของตัวมอร์ตาร์เอง

ภายหลังการวิเคราะห์หาน้ำหนักของแคลเซียมที่เกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าที่ความลึก 1 มิลลิเมตร ของผิวอิฐโบราณ หลังผ่านกระบวนการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียวในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มีการตกตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 0.42 เปอร์เซ็นต์ และลดลงมาที่ 0.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ในพื้นผิวอิฐโบราณที่มีระดับความลึกที่มากขึ้น (2 มิลลิเมตร) สำหรับดินในสภาพธรรมชาติ การเหนี่ยวนำแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่น พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับผลของการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 เพียงชนิดเดียว โดยที่ความลึก 1 มิลลิเมตร พบว่ามีน้ำหนักของแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดขึ้นเท่ากับ 0.77 เปอร์เซ็นต์ และลดลงสู่ 0.43 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ในระดับความลึกที่ 2 มิลลิเมตร นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นบนผิวอิฐโบราณที่ฝังอยู่ในดินท้องถิ่น (มีจุลินทรีย์ท้องถิ่นอยู่) มีค่ามากกว่าแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้นจากการฝังอิฐโบราณในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ไม่มีจุลินทรีย์ท้องถิ่นอยู่) ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และจุลินทรีย์ท้องถิ่นจะยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งนำไปสู่การเติมเต็มรูพรุน (ช่องว่าง) ที่ผิวของวัสดุโบราณได้อย่างมีศักยภาพ

สำหรับอิฐโบราณที่ถูกเติมด้วยสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยาโดยปราศจากจุลินทรีย์และถูกฝังกลบในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เกิดขึ้น มีน้ำหนักเท่ากับ 0.73 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เป็นสาเหตุมาจากการที่สารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยามีส่วนผสมของ $CaCl_2.2H_2O$ ใน

224(2524((7)] TJ ETกคQ q 0.000008869 0 595.2 841.8 re W* n BT /F4 12 Tf 1 0 0 1 14.98 645.78 Tm 0 g 0

(ก) ดินฆ่าเชื้อ

(ข) ดินธรรมชาติ

รูปที่ 13 ภาพกำลังขยายตะกอนแคลเซียมคต ยอเนตที่ค ต็ล กระดั

ก ผ

อิ

ถมของตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนหน้าดิน จากนั้นทำการวิเคราะห์พื้นผิวของวัสดุด้วยเครื่องมือ 3D Scan คำนวณหาปริมาณการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วย เครื่องมือ EDS และตำแหน่งของตะกอนแคลเซียมที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องมือ SEM จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบสามารถสรุปได้ดังนี้

1. จุลินทรีย์ท้องถิ่นสามารถทำงานร่วมกันกับจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตบนผิวของฐานรากโบราณได้เป็นอย่างดี
2. จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่มีอยู่ในดินธรรมชาติมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารละลายเคมีเร่งปฏิกิริยา
3. การมีอยู่ของจุลินทรีย์ท้องถิ่นในธรรมชาติมีส่วนช่วยพัฒนาศักยภาพการตกตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 และสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงอิฐและมอร์ตาร์อันเป็นส่วนประกอบหลักของฐานรากโบราณสถานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยนำร่องเพื่อศึกษาศักยภาพของการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus sphaericus* LMG 22257 ร่วมกับดินในสภาพธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปดินในสภาพธรรมชาติจะมีความเป็นไปได้สูงว่ามีการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์ท้องถิ่นเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้การตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ท้องถิ่นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและสร้างความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ผลการทดสอบในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรม ภายใต้ทุนวิจัยพื้นฐานปี 2565 (โครงการ การก่อสร้างขั้นสูงสำหรับ Thailand 4.0) จนทำให้งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

[1] Zhang, J., Shi, X., Chen, X., Huo, X. and Yu, Z. (2021). Microbial-induced carbonate precipitation: a review on influencing factors and applications. *Advances in Civil Engineering*, 2021, pp. 9974027.

[2] Chansawang, S. (2021). Conservation and restoration of historic buildings: A case study Bismai Bimalasataya building Suan Sunandha Rajabhat University. *Engineering Transactions*, 24, pp. 73-84.

[3] Yang, Z., Cheng, X. and Li, M. (2011). Engineering properties of MICP-bonded sandstones used for historical masonry building restoration. *Geo-Frontiers Congress 2011*, Dallas, Texas, United States, 13-16 March 2011, pp. 4031-4040.

[4] Kashif, M., Cao, Y., Yuan, G., Asif, M., Javed, K., Mendez, J.N., Khan, D. and Miruo, L. (2019). Pore size distribution, their geometry and connectivity in deeply buried Paleogene Es1 sandstone reservoir, Nanpu Sag, East China. *Petroleum Science*, 16, pp. 981-1000.

[5] Yu, T., Souli, H., Pechaud, C. and Fleureau, J.M. (2021). Review on engineering properties of MICP-treated soils, Geomechanics and Engineering, 27, pp. 13-30.

[6] Leeprasert, L., Chonuudomkul, D. and Boonmak, C. (2022). Biocalcifying potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair. *Microorganisms,* 10, pp. 963.

[7] Wang, J., Souli, Jonkets, H., Boon, N. and De Belie, N. (2017). Bacillus sphaericus LMG 22257 is physiologically suitable for self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, pp. 5101-5114.

[8] Beal, J., Farny N.G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., Workman, T. and iGEM Interlab Study Contributors. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3, pp. 512.

[9] Duedu, K. and French, C. (2017). Data for discriminating dead/live bacteria in homogenous cell suspensions and the effect of insoluble substrates on turbidimetric measurements. *Data in Brief*, 12, pp. 169-174.

[10] Kuncharoenwirat, N., Chatuphonprasert, W. and Jarukamjorn, K. (2021) Effect of phenol red on cell cultures. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17, pp. 13-23.

[11] Helmenstine, A. (2020). Definition and examples of acid-base indicator. *ThoughtCo*, 2020, pp. 604738.

[12] Wang, J. (2020). 3D scanning technology application in the imperfect cultural relic. *Journal of Historical Archaeology & Anthropological Sciences*, 5, pp. 2573-2897.