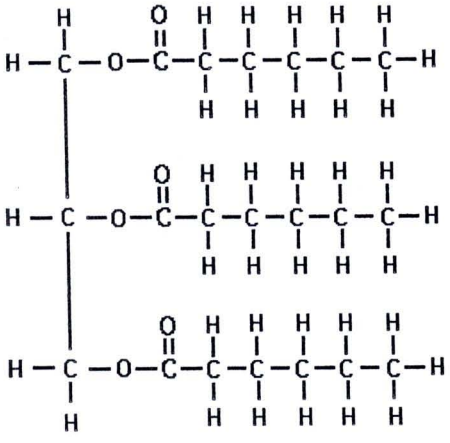
บทที่ 2

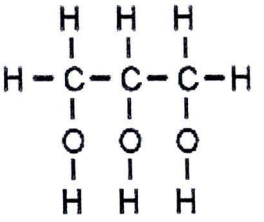
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะสมบัติของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน

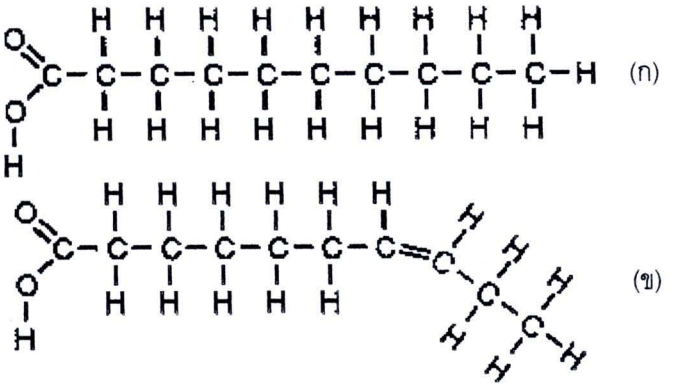
น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease) เรียกว่า ไทรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol) เป็นลิพิดที่มีหน้าที่สะสมพลังงานเป็นหลัก โมเลกุลไทรเอซิลกลีเซอรอลประกอบด้วย กลีเซอรอล (Glycerol) 1 โมเลกุล จับกับกรดไขมัน (Fatty acid) 3 โมเลกุล ไขมันแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fat) เช่น น้ำมันจากพืช (Plant oil) ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะคู่อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ทำให้ไขมันประเภทไม่อิ่มตัวไม่เป็นไขที่อุณหภูมิห้อง สำหรับไขมันอิ่มตัว (Saturated fat) เช่น น้ำมันจากสัตว์ ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบ และเกิดเป็นไขได้ที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในภาพ 1, 2 และ 3



ภาพ 1 แสดงโครงสร้างไทรเอซิลกลีเซอรอล



ภาพ 2 แสดงโครงสร้างกลีเซอรอล



ภาพ 3 แสดงโครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว (ก) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (ข)

ซึ่งลักษณะทั่วไปของน้ำมันและไขมันจะมีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ น้ำมันและไขมันจะพบบ่อยในน้ำเสียที่มาจากการเตรียมและการประกอบอาหาร ไขมันต่างๆเหล่านี้เป็นอินทรีย์สารที่มีความเสถียรและย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้ยาก น้ำมันและไขมันเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่พบในน้ำเสียชุมชน มีปริมาณร้อยละ 10 ของปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมด (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) น้ำเสียจากกบ้านเรือนที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากการประกอบอาหาร ได้ก่อให้เกิดปัญหาน้ำมันและไขมันปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก โดยอาจปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำผิวดินโดยตรง ทำให้เกิดสภาพไม่น่าดู และขวางกั้นการซึมผ่านของออกซิเจนจากอากาศลงสู่แหล่งน้ำ ส่งผลให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสียตามมาได้

ปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน

น้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากการประกอบอาหารของบ้านเรือน มีประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการคาดการณ์โดยการคำนวณประสิทธิภาพของบ่อดักไขมันที่ร้อยละ 60 พบว่า ปริมาณไขมันจากบ่อดักไขมันของบ้านเรือน เท่ากับ 0.8 และ 0.2 กิโลกรัม/วัน-ครัวเรือน ซึ่งขึ้นอยู่กับการติดตั้งและไม่ติดตั้งตะแกรงดักเศษอาหาร ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2538; สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2536)

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบน้ำมันและไขมันจากบ้านเรือน

พารามิเตอร์	หน่วย	ความเข้มข้น
ความเป็นกรดด่าง (pH)	-	5-7
สภาพนำไฟฟ้า (Conductivity)	µS/cm	300-2,500
สี (Color)	ADMI	60-700
ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN)	mg/l	9-106
กรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid)	%	0.02-85
ไขมันและน้ำมัน* (Grease and Oil)	g/kg wet	140-850
ไขมันและน้ำมัน** (Grease and Oil)	mg/l	14-38,000
ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus)	mg/l	0.13-100

ที่มา: ตัวอย่างน้ำเสียชุมชน ทำการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมและการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT), 2551

หมายเหตุ: * กรณีตัวอย่างกากไขมัน มีลักษณะเป็นตะกอน (Sludge)
** กรณีตัวอย่างกากไขมัน มีลักษณะเป็นของเหลว (Liquid)

แนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน

การลดปริมาณน้ำมันและไขมัน ณ แหล่งกำเนิด ซึ่งจะช่วยลดปัญหาและผลกระทบของน้ำมันและไขมันน้ำเสียที่มีต่อแหล่งน้ำ ไม่ว่าจะเป็นการลดการใช้น้ำมันในการปรุงอาหาร การกวาดเศษอาหารออกจากภาชนะก่อนนำไปล้าง การแยกน้ำมันใช้แล้วใส่ภาชนะเพื่อนำไปกำจัดหรือแปรรูป รวมไปถึงไม่เทน้ำมันที่ใช้แล้วลงน้ำหรือท่อระบายน้ำโดยตรง

การกำจัดน้ำมันและไขมันโดยใช้บ่อดักไขมัน เป็นการแยกไขมันไม่ให้ไหลปนไปกับน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะ หรือท่อระบายน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการลดน้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากบ้านเรือน โดยทั่วไปบ่อดักไขมันจะเป็นถังทรงกลมหรือสี่เหลี่ยม ประกอบด้วยแผ่นกั้นหรือระบบท่อเพื่อแยกชั้นไขมันและน้ำออกจากกัน ซึ่งสำหรับอากาศที่ร้อนการจับตัวของไขมันจะช้า ดังนั้นควรปล่อยให้ไขมันจับตัวในบ่อดักไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมงก่อนนำออกไปกำจัดหรือแปรรูป ซึ่งบ่อดักไขมันจะสามารถกำจัดไขมันได้ประมาณร้อยละ 60 หากมีการดูแลที่ดี (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological process)

การบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีววิทยา คือ ระบบบำบัดน้ำเสียโดยการกำจัดสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายหรือสารแขวนลอยขนาดเล็กที่ไม่สามารถตกตะกอนได้โดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก โดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากธรรมชาติมาย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำเสียในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเปลี่ยนเป็นผลผลิตสุดท้ายและเซลล์จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประมาณร้อยละ 95 รองลงมา ได้แก เชื้อรา สาหร่าย และโพรโทซัว

เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส ตามหลักการจัดจำแนกเอนไซม์ของคณะกรรมการเอนไซม์นานาชาติ (The International Enzyme Commission, EC) เอนไซม์ดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ของไลปิดที่มีกรดไขมันสายยาว (Long chain aliphatic acid) เป็นองค์ประกอบ เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ปฏิกิริยานี้ จะเกิดขึ้นตรงบริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสับสเตรทกับชั้นน้ำ (Oil-water interface) และเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและปฏิกิริยาทรานซ์เอสเทอริฟิเคชัน ผลิตภัณฑ์สุดท้ายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรทของแต่ละปฏิกิริยา (Macrae, 1983) เอนไซม์ไลเปสเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์ (Lanne and Tramper, 1990) และในของเหลวที่มีจุดวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid) (Gunnlaugsdottir and Sivik, 1995)

การจัดจำแนกเอนไซม์ไลเปส

การจัดจำแนกเอนไซม์ไลเปสขึ้นกับคุณสมบัติที่ใช้ เช่น ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และความจำเพาะต่อตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เป็นต้น

1. การจัดจำแนกเอนไซม์ไลเปสของ Villeneuve และ Thomas

Villeneuve and Thomas (1997) จำแนกเอนไซม์ไลเปสเป็น 5 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อสับสเตรทและความจำเพาะต่อตำแหน่งกรดไขมัน ความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมัน และความจำเพาะต่อสเตอริโอไอโซเมอร์

1.1 เอนไซม์ไลเปสจำเพาะต่อสับสเตรท สับสเตรทของเอนไซม์ไลเปส คือ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และฟอสโฟไลปิด ดังนั้นความจำเพาะของสับสเตรท หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในการไฮโดรไลซ์กลีเซอรอลเอสเทอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่จำเพาะ ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีกิจกรรมเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ ในขณะที่การเร่งปฏิกิริยาของโมโนกลีเซอไรด์จะน้อยมาก ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจาก *P. camembertii* ที่เร่งปฏิกิริยาของไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ได้ดีกว่าไตรกลีเซอไรด์ หรือไฮโดรไลซ์เฉพาะไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ แต่จะไม่ไฮโดรไลซ์ ไตรกลีเซอไรด์ เช่น เอนไซม์ไลเปส L2 จาก *Aspergillus oryzae* (Toida, et al., 1998)

1.2 เอนไซม์ไลเปสจำเพาะต่อตำแหน่ง เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความสามารถในการแยกความแตกต่างของตำแหน่งภายนอก (พันธะเอสเทอร์ปฐมภูมิ) กับตำแหน่งภายใน (พันธะเอสเทอร์ทุติยภูมิ) ของโครงสร้างหลักของไตรกลีเซอไรด์โดย 1,3 regioselective lipase ชอบไฮโดรไลซ์ตำแหน่ง sn-1 และ sn-3 มากกว่า sn-2 ทำให้ได้ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ 2,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ หากปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปจะเกิดการย้ายหมู่เอซิล (acyl migration) จากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ จึงถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ

1.3 เอนไซม์ไลเปสไม่จำเพาะต่อตำแหน่ง เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้จะสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์ได้ทั้งสามตำแหน่ง โดยไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมัน เมื่อปฏิกิริยาย่อยสมบูรณ์จะได้กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* (Virto, et al., 1991) *Bacillus* sp. (Sugihara, Tani and Tominaga, 1991)

1.4 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน เอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่างกันจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันต่างกัน บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* แยกได้เป็นเอนไซม์ไลเปส A และ B (pI 4.96 และ 4.15 น้ำหนักโมเลกุล 27000 และ 30000 ตามลำดับ) โดยเอนไซม์ไลเปส A แสดงความสามารถในการย่อยไตรบิวทิริน (C4) ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส B ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมัน C8 และ C10 และเอนไซม์ไลเปสทั้งสองชนิดย่อยน้ำมันมะกอกได้ดีเช่นเดียวกัน (Iwai, Okumura and Tsujisaka, 1975) หรือเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายยาวกว่า C12 ได้ต่ำและย่อยได้ดีขึ้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Sugihara, Tani and Tominaga, 1991)

1.5 เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อสเตอริโอไอโซเมอร์ ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ คือ เอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการแยกความแตกต่างระหว่างตำแหน่ง *sn*-1 และ *sn*-3 ของไตรกลีเซอไรด์ เช่น เอนไซม์ไลเปสของ *Pseudomonas fluorescens* มีความจำเพาะต่อสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง *sn*-1

2. **การจัดจำแนกประเภทเอนไซม์ไลเปสของ** Macrae

Macrae (1983) จัดจำแนกเอนไซม์ไลเปสเป็น 3 กลุ่ม ตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ คือ

2.1 กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีกิจกรรมจำเพาะต่อตำแหน่งกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Nonspecific lipase) เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ย่อยกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ทุกตำแหน่ง และเมื่อการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล อย่างไรก็ตามอาจพบไดกลีเซอไรด์ หรือโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ไลเปสของ *Chromobacterium viscosum, Candida cylindracae, Corynebacterium acnes, Geotrichum candidum, Pseudomonas fluorescens, Penicillium cyclopium, Staphylococcus aureus* (Macrae, et al., 1983; Virto, et al., 1991) และ *Bacillus* sp. (Sugihara, Tani, and Tominaga, 1991)

2.2 กลุ่มที่ 2 เอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipase) ปฏิกิริยาในช่วงแรกจะเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์จึงยังไม่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน ต้องบ่มเป็นเวลานานถึงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยอย่างสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลีเซอรอล และกรดไขมัน เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้พบในตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันของสัตว์ และราเส้นใย เช่น *Rhizopus arrhizus, Rhizopus delemar, Aspergillus niger, Mucor miehei* และ *Mucor javanicus* เป็นต้น (Malcata, et al., 1992)

2.3 กลุ่มที่ 3 เอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Fatty acid specific lipase) เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลและระดับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ แตกต่างกัน หากการย่อยสลายกรดไขมันเกิดขึ้นในอัตราสูง แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดไขมันชนิดดังกล่าว เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* MB 5001 (Chartrain, et al., 1993) มีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายสั้นมากกว่าสายยาว และไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้มากกว่าเอสเทอร์ที่มีกรดไขมันอิ่มตัว โดยเรียงลำดับแอคติวิตีจากมากไปน้อยดังนี้ C181:3 > C18:2 > C18:1 เอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน C18 ที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis-9 double bond) (sonnet, et al., 1993) เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium simplicissium* จำเพาะต่อกรดไขมันสายยาว เช่น กรดปาล์มมิติก บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวปานกลาง (C8-C14) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *R. arrhizus* และ *R. delemar* แต่บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายสั้น (ต่ำกว่า C8) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* (Iwai, et al., 1975) และจากคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายกรดไขมันชนิดต่างๆ ได้ในอัตราที่แตกต่างกันจึงมีการนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลาย ซึ่งจะได้กล่าวในลำดับต่อไป

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่พบในพืชส่วนใหญ่พบในเมล็ดที่กำลังงอกหรือต้นอ่อนของพวกธัญพืช เช่น ข้าวไรย์ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ถั่วเหลือง ฝ้าย และละหุ่ง (Arnole, et al., 1975; Woolley and Petersen, 1994) เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ พบในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ไต สมอง ตับ ตับอ่อน และน้ำนมของม้า หมู หนู ตะเภา ลูกแพะ ลูกแกะ และมนุษย์ (Shahani, 1975) เอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความเสถียร (stability) ต่ำกว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ และมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น ยีสต์สกุล *Candida, Geotrichum, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Torulaspora, Trichosporon* และ *Yarrowia* ราเส้นใยสกุล *Acremonium, Alternaria, Ashbya, Aspergillus, Beauveria, Eurotrium, Fusarium, Humicola, Mucor, Ophiostoma, Penicillium, Rhizomucor* และ *Rhizopus* เป็นต้น (Sharma, et al., 2001)

แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสมีหลายสกุลหลายชนิด แบคทีเรียแต่ละชนิดจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และกระบวนการหมักที่เหมาะสมเช่น *Pseudomonas* sp. 3AT ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด 1982.23 U/l เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนน้ำมันมะกอกต่อน้ำมันดอกทานตะวันเท่ากับ 1:1 ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง (Haba, et al., 2000) และ *Bacillus thermoleovorans* ID-1 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด 520 U/l เมื่อใช้น้ำมันมะกอก 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยเพาะเลี้ยงในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Batch culture) (Lee, et al., 1999)

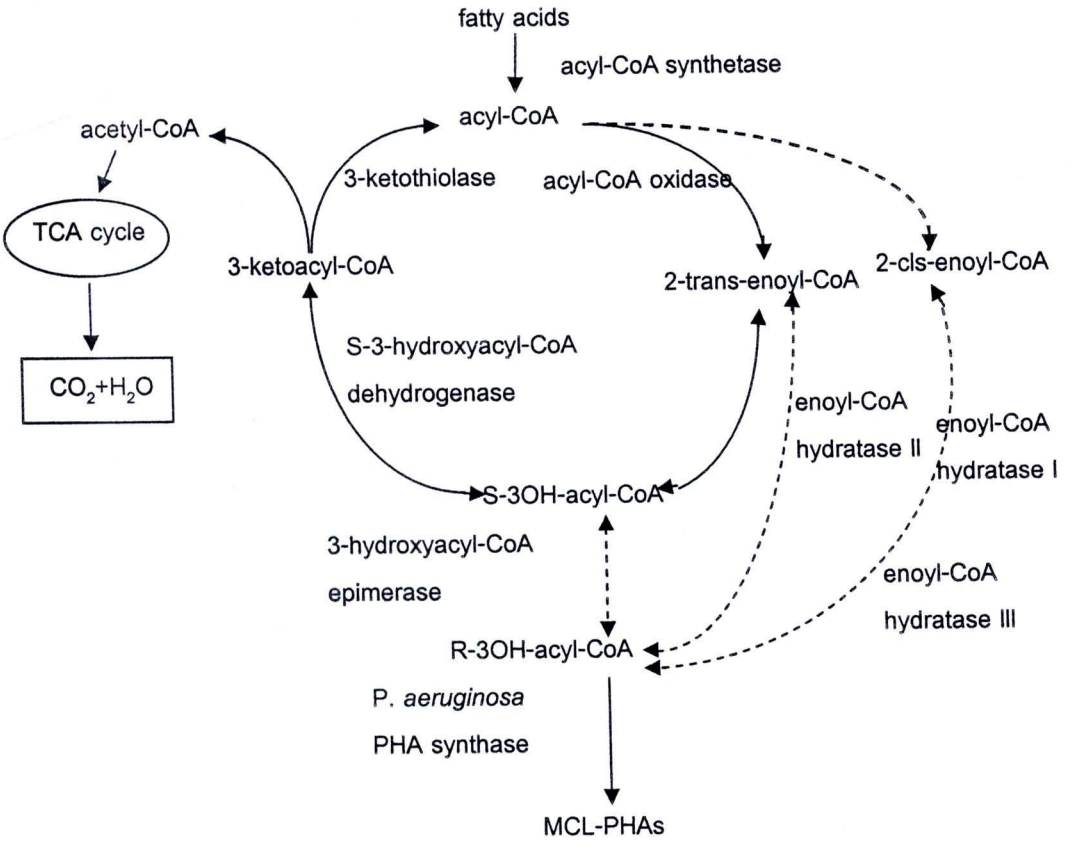
ตาราง 2 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

สกุล	ชนิด	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas	*Ae. hydrophila*	Anguita, et al., 1993
	Ae. sorbia LP004	Lotrakul and Dharmsthiti, 1997
Bacillus	*B. brevis*	Hou, 1994
	B. subtilis 168	Lesuisse, et al., 1993
Corynebacterium	*Co. acnes*	Brune and Gotz, 1992
Mycobacterium	*MY. chelonae*	Pandey, et al., 1999
Pseudomonas	*P. aeruginosa*	Aoyama, et al., 1988
		Hou, 1994
Staphylococcus	*S. aureus*	Simons, et al., 1996
Vibrio	*V. chloreae*	Jaeger, et al., 1999

เมตาบอลิซึมของไลปิดในแบคทีเรีย

แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสภายในเซลล์และขับออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยโมเลกุลของไลปิด ผลจากการย่อยอย่างสมบูรณ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยกรดไขมันจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการย่อยภายในเซลล์ผ่านวิถีเบตาออกซิเดชัน (β-oxydation) ได้เป็นอะซิทิลโคเอ (Acetyl CoA) เข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอสิก (Tricarboxylic acid cycle) ได้สารประกอบพลังงานสูง คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในส่วนของกลีเซอรอล จุลินทรีย์สามารถเมตาบอไลซ์

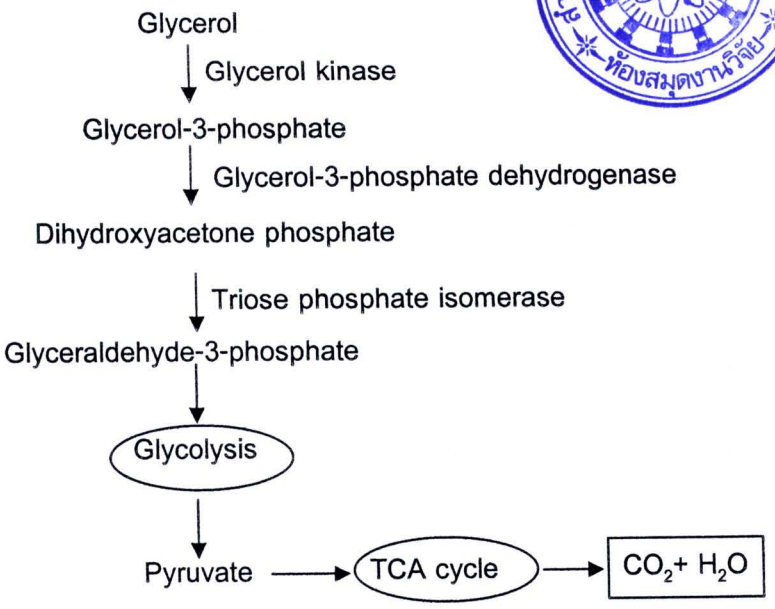
ภายในเซลล์ โดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นกลีเซอราลดีไฮด์ 3 ฟอสเฟต (glyceraldehyde-3-phosphate) ซึ่งใช้ตัวกลางในวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis) และถูกเมตาบอไลซ์ต่อไปเป็นไพรูเวต (Pyruvate) ก่อนเข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอสิก ผ่านโมเลกุลของอะซิทิลโคเอ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบพลังงานสูง คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เช่นเดียวกัน (Gupta, R., 2004) ดังแสดงในภาพ 4 และ 5



ภาพ 4 แสดง β-oxidation of fatty acid

ที่มา: Gupta, R., 2004

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพ 5 แสดง Glycerol degradation pathway

ที่มา: Gupta, R., 2004

งานวิจัยในครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ เชื้อ *B. subtilis* TP8 และเชื้อ *P. fluorescens* G7 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณอู่ซ่อมรถที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพ Emulsification (%EC) และ Emulsification activity ($\%EA_{24}$) ในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) ที่มีกลูโคส 2% ให้ค่า %EC สำหรับเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 คือ 14.48±2.01 และ 9.27±1.79 ตามลำดับ สำหรับค่า $\%EA_{24}$ ของเชื้อ *B. subtilis* TP8 และ *P. fluorescens* G7 คือ 42.65±5.04 และ 36.19±7.9 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี TLC และ FT-IR พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *B. subtilis* TP8 เป็นกลุ่มของลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) และมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนมีการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *P. fluorescens* G7 เป็นกลุ่มแรมโนสลิปิด (Rhamnolipids) และมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน สร้างเม็ดสีละลายน้ำ (กฤษฎา บุญชัย, 2552) ดังแสดงในตาราง 3 และ 4

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 16 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 250003
เลขเรียกหนังสือ

ตาราง 3 แสดงคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TP8

Characteristics	reaction	Characteristics	reaction
Gram reaction	+ve	esculine	+
glycerol	_	salicine	+
erythitol	_	cellobiose	+
D-arabinose	_	maltose	+
L-arabinose	+	lactose	_
ribose	+	melibiose	_
D-xylose	+	sucrose	+
L-xyrose	_	trehalose	+
adonital	_	inuline	+
β-methyl-D-xyloside	_	melezitose	_
galactose	_	D-raffinose	_
D-glucose	+	starch	+
D-fructose	+	glycogene	+
D-mannose	+	xylitol	_
L-sorbose	_	β-gentiobiose	+
rhamnose	_	D-turanose	_
dulcitol	_	D-lyxose	_
inositol	_	D-tagatose	_
mannitol	+	D-fucose	_
sorbitol	+	L-fucose	_
α-methyl-D-mannoside	_	D-arabitol	_
α-methyl-D-glucosamine	+	L-arabitol	_
N-acetyl-glucosamine	+	gluconate	_

ตาราง 3 (ต่อ)

Characteristics	reaction	Characteristics	reaction
amygdaline	+	2-keto-gluconate	_
arbutine	+	5-keto-gluconate	_
β-galactosidase production	+	Indole production of tryptophane	_
Arginine dihydrolase Production	_	Acetoin production	+
Lysine decarboxylase Production	_	Hydrolysis of gelatin	+
Oinithine decarboxylase Production	_	Reduction of nitrate	+
Citrate utilization	_	Urease production	_
H_2S production	_	Tryptophane deaminase production	_
10% NaCl	+		

หมายเหตุ: + ve = gram positive bacteri

+ = positive reaction;

- = negative reaction

% identification = 99.0%

ตาราง 4 แสดงคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* G7

Characteristics	reaction
Gram reaction	-ve
Reduction of nitrate	+
Indole production of tryptophane	–
Fermentative of acid from glucose	–
Arginine dihydrolase	+
Urease production	–
Hydrolysis of esculin	–
Hydrolysis of gelatin	+
β-galactosidase production	–
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	–
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	–
Malate	+
Citrate	+
Phenyl-acetate	+
Cytocrome oxidase	+

หมายเหตุ: - ve = gram negative bacteri

\+ = positive reaction;

\- = negative reaction

% identification = 99.0%

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ลิตจากจุลินทรีย์ เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแอมฟิฟาติก (Amphipathic) โดยมีขั้วทั้งสองข้างที่ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ซึ่งคุณสมบัติของสารเหล่านี้มีผลมาจากการรวมตัวกันของสารมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน ความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไป เช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ความมีขั้วหรือกลุ่มที่ชอบน้ำ เช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟไลปิดและน้ำตาลของไกลโคไลปิด (Cooper, et al., 1980; Desai and Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกลุ่มโครงสร้างของ surface-active molecules ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ โดยโมเลกุลเหล่านี้เมื่ออยู่ในสารละลาย จะลดแรงตึงผิวหน้าและแรงตึงระหว่างผิวหน้าในสารละลายทั้งสองชนิด ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำหรือส่วนของน้ำละลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งคุณสมบัติที่ดีในการชำระล้าง สารเกิดฟองและการเกิดอิมัลชัน (Desai and Banat, 1997)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ จำแนกตามโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล แต่วิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่ การจัดจำแนกตามโครงสร้างโมเลกุลทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีภาพ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่ม ดังนี้

1. **ไกลโคไลปิด (Glycolipid)**

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยมีการรวมตัวกันของ aliphatic acid สายยาวหรือ hydroxyaliphatic acid และมีส่วนประกอบของ monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้มักประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น glucose, mannose, galactose, rhamnose, glucuronic acid และ galactose sulphate มี fatty acid ที่มีองค์ประกอบอย่างง่ายของ phospholipids สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มของไกลโคลิปิดที่รู้จักกันมีดังนี้

1.1 Monosylerythritol lipids เป็นผลผลิตจากเชื้อยีสต์สกุล *Candida* sp. SY16 โดยส่วนประกอบในโครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ คือ β-D-monopyranosy-(1→4)-O-mesoserythriol ส่วนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำคือ fatty acid เมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectroscopy พบว่าประกอบด้วย hexanoic, dodecanoic, tetradecanoic และ tetradecenoic acid และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ด้วยเทคนิค NMR ได้

เป็น 6-O-acetyl-2,3-di-O-alkanoyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-meso-erythriol โดยหมู่ acetyl group เชื่อมต่อกับน้ำตาล mannose ตรงตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (Kim, et al., 1999)

1.2 Trehalolipids มักพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยโครงสร้างของ Trehalolipids ประกอบด้วยน้ำตาม trehalose 2 โมเลกุล ที่เชื่อมต่ออยู่กับ mycolic acid ซึ่งประกอบด้วยสายยาวของ α-branced-β-hydroxy fatty acid ซึ่ง Trehalolipids ถูกผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Arthrobacter* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp. และ *Rhodococcus* erythropolis โดย trehalolipids ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันในส่วนของอะตอมคาร์บอน โดยแบคทีเรียสกุล *Arthrobacter* sp. สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างผิวน้ำกับอากาศ และแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Broth culture) ได้ต่ำถึงประมาณ 1-5 มิลลินิวตันต่อเมตร (Li, et al., 1984)

1.3 Rhamnolipids เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* sp. โดย rhamnolipids ประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมอยู่กับ β-hydroxydecanoic acid ด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic linkage) ปัจจุบันพบว่า rhamnolipids มีโครงสร้างที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ โดยโครงสร้างแรกพบเมื่อปี ค.ศ.1946 โดยผลิตจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* (Deziel, 2000; Lang, 2002)

1.4 Sophorolipids เป็นที่รู้จักตั้งแต่ปี 1961 มักพบในยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Torulopsis petrophillum* และ *Torulopsis bombicola* (Cooper and Paddock, 1983) โดยโครงสร้างของ sophorolipids ประกอบด้วยน้ำตาล sophorose ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิคกับ hydroxyl fatty acid คือ 17-hydroxyoctadecanoic และ 17-L-hydroxy-9-octadecenoic acid

2. **ลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) และลิโปโปรตีน (Lipoproteins)**

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์มักพบในจุลินทรีย์สกุล *Bacillus* ซึ่งสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์จัดเป็นกลุ่มของสารพวก cyclic lipopeptides ได้แก่ decapeptide antibiotic (Gramicidins) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus brevis* และ lipopeptides antibiotic (Polymyxins) ที่ผลิตโดย *Bacillus polymyxa* โดยที่ cyclic lipopeptides surfactin ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ATCC 21332 จัดเป็น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากในกลุ่มนี้ และสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72.0 มิลลินิวตันต่อเมตรลงถึง 27.9 มิลลินิวตันต่อเมตรที่ระดับความเข้มข้นของสารร้อยละ 0.005 (Desai and Banat,

1997) *Bacillus licheniformis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายชนิดซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม (McInerney, et al., 1990) BL-86 เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* 86 สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ (Surface tension) ได้ต่ำถึง 27 มิลลินิวตันต่อเมตร และลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน hexadecane ให้ต่ำถึง 0.36 มิลลินิวตันต่อเมตร (Horowitz, et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ เช่น ornithine-containing lipid จากเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* และ *Pseudomonas rubescens* หรือสาร cerilipin ซึ่งมี ornithine และ taurine เป็นองค์ประกอบโดยผลิตจากเชื้อ *Gluconbacter cerinus* IFO 3267 และชนิดที่มีกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) เป็นองค์ประกอบโดยผลิตจาก *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 Surfactin, Itirin และ Fengycin ซึ่งจะแตกต่างกันตรงที่โครงสร้างและคุณสมบัติ กล่าวคือ Surfactin มีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu และ β-hydroxyl fatty acid คาร์บอน 13-15 อะตอม สำหรับ Fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14-17 คาร์บอนอะตอม ในขณะที่ Iturin A ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมันสารในกลุ่ม Iturin A ประกอบด้วย Bacillomycin D, Bacillomycin F, Bacillomycin L และ mucosubtillin ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้โดย *B. subtillis* (Besson, et al., 1992) Fengycin และ Lturin A มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อรา (Antifungal) (Ron and Rosenberg, 1997; 1999; Lang, 2002)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ซึ่งคุณสมบัติและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ เป็นผลมาจากการรวมตัวกันของความมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน ความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไป เช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของไขมัน สำหรับความมีขั้วหรือกลุ่มที่ชอบน้ำ เช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด และน้ำตาลเป็นส่วนประกอบของไกลโคไลปิด (Desai and Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวที่ดีควรให้ค่า CMC ต่ำ แต่ให้ค่าลดแรงตึงผิวที่สูง (Lin, et al., 1998) ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ดังแสดงในตาราง 5

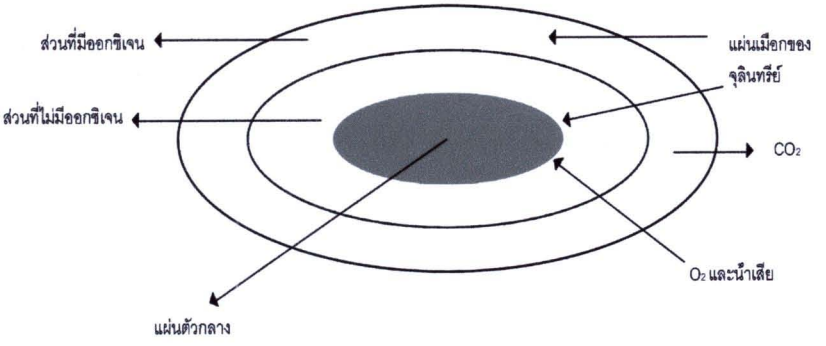
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตาราง 5 แสดงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

กลุ่ม	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Low molecular weight	Rhamnolipids	*Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidea*	Benincasa, et al., 2001
	Sophorose lipids	*Candida lipolytica,*	Hommel, et al., 1994
	Surfactin	*Torulopsis bombicola*	Carrillo, et al., 2003
	Phospholipids	*Bacillus subtilis, Bacillus pumilus*	Lemke, Churchill and Wetzel, 1995
		Acinitobacter, Thiobacillus thiooxidans	
Hight molecular weight	Fatty acids	*Nocardia erythopolis, Arthrobacter parafineus, Corynebacterium lepus, Penicillium spiculisporum,*	Makkar and Cameotra, 2002
	Liposan	*Candida lipolytica*	Cirigliano and Carman, 1984
		Halomonas eurihalina	
	N-acetyl and O-pyruvil heteropolysacccharide	*Pseudomonas fluorescens*	Bonilla, et al., 2005

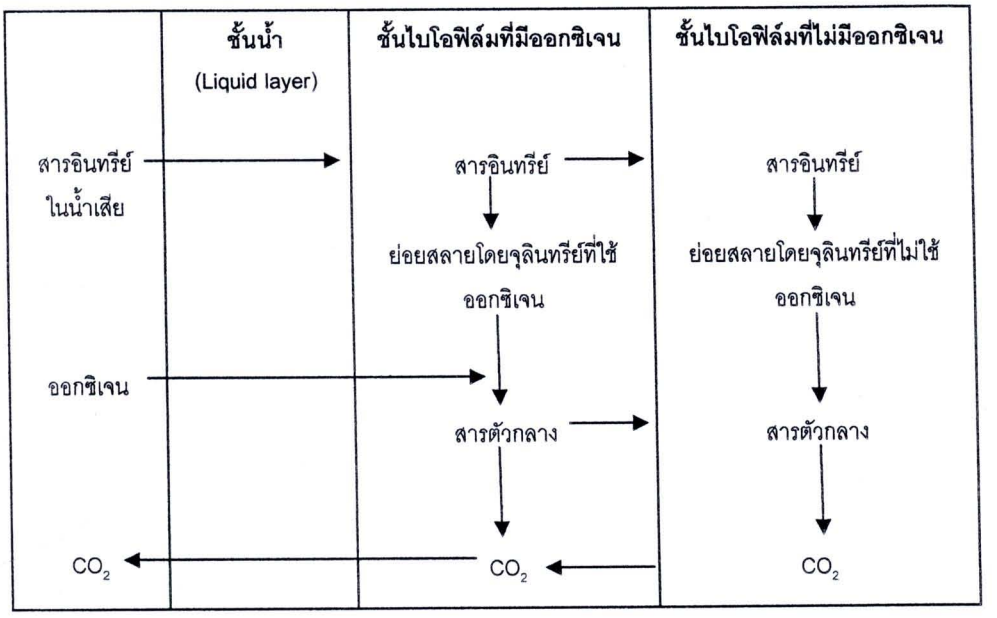
ระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางชีวภาพแบบเกาะติด

ระบบการเจริญแบบเกาะติด (Attached Growth system) จุลินทรีย์ในระบบบำบัดแบบนี้ส่วนใหญ่จะเกาะอยู่กับตัวกลางที่เหมาะสมโดยเจริญเป็นเมือกบางๆ เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (Biofilm) หรือเมือกชีวภาพ เช่น ระบบโปรยกรอง (Trickling filter) ซึ่งประกอบด้วยถังที่บรรจุตัวกลางที่มีไบโอฟิล์มเคลือบอยู่พร้อมที่จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำเสีย วิธีการบำบัดของระบบโปรยกรองคือ น้ำเสียจะถูกปล่อยจากที่ปล่อยน้ำเสียจากด้านบนของถังผ่านตัวกลางลงสู่ด้านล่างในขณะที่น้ำเสียผ่านตัวกลางจะเกิดการย่อยสลาย โดยสารอินทรีย์ในน้ำเสียจะแพร่เข้าไปในชั้นน้ำและไปยังไบโอฟิล์ม เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นสารตัวกลาง รวมทั้งเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ร่วมกับการแลกเปลี่ยน ก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซอื่นๆ และที่ก้นถังจะมีน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว รวมทั้งเมือกชีวภาพที่หลุดออกมาบางส่วนจึงจำเป็นที่จะต้องนำไปกำจัดตะกอนต่อไป (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) ดังแสดงในภาพ 6 และ 7



ภาพ 6 แสดงการเกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนผิวของตัวกลาง (Biofilm formation) **ในระบบบำบัดโปรยกรอง**

ที่มา: สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548, หน้า 114



ภาพ 7 แสดงลักษณะไบโอฟิล์มบนตัวกลางของระบบโปรยกรอง

ที่มา: สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548, หน้า 115

ไบโอฟิล์ม (Biofilm)

การบำบัดแบบชีวภาพโดยใช้ระบบการตรึงจุลินทรีย์บนพื้นผิววัสดุตัวกลาง (Immobilization system) จะแสดงให้เห็นได้ชัดเจนที่สุดโดยใช้หลักการของไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นเครื่องมือทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับการขจัดน้ำมันและไขมัน โดย bacterial biofilm จะเกาะติดกับพื้นผิวของแข็งที่จะถูกใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่เข้ามา (Campere, et al., 1993)

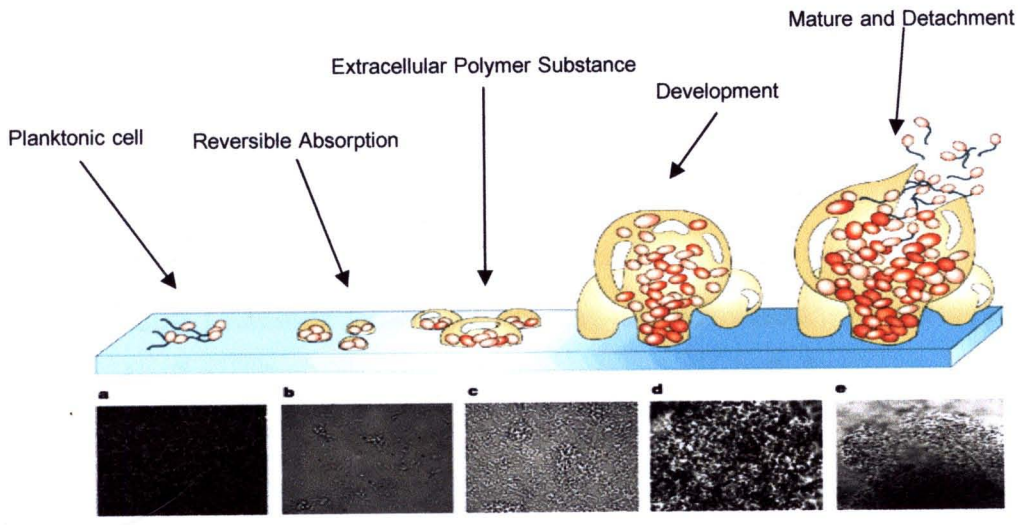
ไบโอฟิล์มเป็นโครงสร้างยึดเกาะกับพื้นผิว สร้างโดยกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่รวมกัน ดังนั้น biofilm mode คือ การที่เชื้อเกาะกลุ่มกันอยู่และมีเมือก (Slime) หรือไบโอฟิล์มซึ่งเป็น glycocalyx มาหุ้ม ทำหน้าที่เป็นชั้นป้องกันแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม ในสิ่งแวดล้อมนั้น แบคทีเรียที่เกาะติดกับพื้นผิวส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปแบบของ biofilm communities ซึ่งอาจจะหนาถึงไมโครเมตร โดยกระบวนการเกิดไบโอฟิล์ม (Biofilm formation) มีขั้นตอนการเกิดตามลำดับดังนี้ (Watnick and Kolter, 2000) ดังแสดงในภาพ 8

1. แบคทีเรียที่เป็นเซลล์อิสระ (Planktonic cell) จะมาดูดซับกับพื้นผิวสัมผัสเซลล์จำนวนหนึ่งที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวได้ชั่วขณะหนึ่งจะมีบางส่วนที่หลุดออกมาจากพื้นผิว ขั้นตอนนี้เรียกว่า "Reversible Absorption" การหลุดของเซลล์อาจเกิดจากแรงดัน (Shear force) ของของไหล

2. ส่วนเซลล์ที่ถูกดูดซับแบบถาวรก็จะเจริญบนพื้นผิวสัมผัส และใช้สารอาหารจากน้ำที่อยู่โดยรอบ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม เซลล์เหล่านี้จะสร้างสารจากกระบวนการเมตาบอริซึม โดยใช้พลังงานจากสารอาหารในน้ำและสารบางอย่างจะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ คือสารพอลิเมอร์ที่เรียกโดยทั่วไปว่า Extracellular Polymer Substance (EPS) ซึ่งจะเป็นสารที่จับไบโอฟิล์มเข้าด้วยกัน

3. การสะสมของไบโอฟิล์มจะเพิ่มขึ้นจากการที่เซลล์เข้ามาเกาะติดที่ไบโอฟิล์มโดยจะอยู่ในขั้นตอนของการ development แล้วก็ดำเนินต่อไปถึงขั้น mature การเกาะติดนี้ (Attachment) คือการที่เซลล์เกาะติดและไม่มีการเคลื่อนที่ในไบโอฟิล์มส่วนการดูดซับ (Absorption) นั้นจะหมายถึงกระบวนการแบบเดียวกัน แต่จะเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของผิวยึดติด

4. ไบโอฟิล์มบางส่วนจะหลุดออกจากผิวหน้าของผิวยึดติดและกลับเข้าไปในน้ำ การหลุดออกไปนี้ (Detachment) หมายถึง การสูญเสียที่เกิดขึ้นในไบโอฟิล์มส่วนการ Desorption จะหมายถึงการสูญเสียของเซลล์จากผิวหน้าของผิวยึดติด การหลุดไปนี้อาจจะหมายถึงการกร่อน (Erosion) หรือการหลุดลอก (Sloughing) และจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของการสูญเสียของไบโอฟิล์ม การเพิ่มจำนวนของเซลล์ก็จะมีการปล่อยให้เซลล์ใหม่ไปสู่น้ำได้



ภาพ 8 แสดงขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม

ที่มา: Davies, 2003