รหัสโครงการ SUT1-104-44-12-03

รายงานการวิจัย

การตรวจหา Biofilm ในระบบเครื่องปรับอากาศ

(Biofilm detection in Air Conditioning System)

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ **SUT1-104-44-12-03**

รายงานการวิจัย

การตรวจหา Biofilm ในระบบเครื่องปรับอากาศ

(Biofilm detection in Air Conditioning System)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ สุโกศล

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2550

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ.2544 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ คุณบ๊อบบี้ ฤทธิรัตน์ และบุคลากรส่วนอาคารสถานที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและ คุณอารียา กลิ่นโพธิ์กลาง ที่ช่วยทั้งด้านการเก็บตัวอย่าง การตรวจสอบและรวบรวมข้อมูล ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการกระตุ้นให้เกิดความตระหนักในการดูแลสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตในชุมชนที่ดีขึ้น

รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ สุโกศล
หัวหน้าคณะวิจัย

บทคัดย่อ

biofilm คือ กลุ่มของจุลชีพที่เกาะติดบนพื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศ งานวิจัยนี้ได้ตรวจหา biofilm ในเครื่องปรับอากาศในห้องเรียนที่มีอายุการใช้งาน 1 ปีขึ้นไป โดยการตรวจหาจุลชีพใน biofilm ด้วยการย้อม acridine orange และเพาะเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของเครื่องปรับอากาศ เช่น ส่วนที่มีหยดน้ำขัง แผ่นกรอง และผนังเครื่องปรับอากาศที่มีความชื้นและน้ำหยดเกาะ พบ biofilm ในเครื่องปรับอากาศ 96.9% และ 100% และจำนวนจุลชีพตั้งแต่ 87 ถึง > 50,000 และ 83.2 - > 50,000 โคโลนี/ ซม^2 ในการตรวจ 2 ครั้งห่างกันประมาณ 1 เดือน กลุ่มของจุลชีพมีทั้งแบคทีเรียรูปแท่ง (rod) และ fungi (yeast และ mold) ส่วนการเพาะเชื้อจากการ swab พื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศ พบแบคทีเรียรวมมีค่าระหว่าง 10-1.57 x 10^5 และ 1.94 x 10^2 – 3.81 x 10^7 CFU/cm^2 ในการตรวจ 2 ครั้งที่ทำพร้อมกับการตรวจหา biofilm ทั้งนี้จำนวนจุลชีพใน biofilm และแบคทีเรียรวมจากการ swab ในการตรวจ 2 ครั้งไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ (r = 0.139, p = 0.448 และ r = 0.141, p = 0.501) ในขณะเดียวกันในการตรวจทั้ง 2 ครั้งนี้ได้ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียรวมในอากาศที่เก็บในห้องเรียนเดียวกันพบว่ามีค่าระหว่าง 3-19.33 และ 3-12.33 โคโลนี/จาน โดยปริมาณในทั้ง 2 ครั้ง มีความสัมพันธ์ทางสถิติ (r = 0.396, p = 0.025) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้แจ้งผู้เกี่ยวข้องเพื่อทำการดูแลรักษาเครื่องปรับอากาศ เป็นการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลชีพซึ่งอาจมีเชื้อก่อโรครวมอยู่ด้วยไม่ให้แพร่กระจายสู่คนกลุ่มใหญ่ที่อยู่รวมกัน และป้องกันผนังเครื่องปรับอากาศผุจากการที่มี biofilm เกิดขึ้นอีกด้วย

Abstract

Biofilm is a group of microorganisms attaching on the surfaces inside the air conditioners. This research was to detect the biofilm in the air conditioners operated in the classrooms which have been used for at least 1 year. Microbial detection in the biofilm using acridine orange staining method and the cultures for the microorganisms were observed from different parts of the air conditioners such as the areas where water was not well drained, moisture and water droplets on filters and surfaces. The biofilm formations in the air conditioners were 96.9 and 100% and the amount of the microorganisms were 87 to > 50,000 and 83.2 to > 50,000 colonies/cm^2 in 2 observations with approximately one month interval. The groups of microorganisms were bacteria with rod shape and fungi (yeast and mold). The total bacterial counts swabbed from the surfaces inside the air conditioners, ranged from 10 to 1.57×10^5 and 1.94×10^2 to 3.81×10^7 CFU/cm^2. Both observations were carried out at the same time as biofilm observations. The amount of the microorganisms in the biofilm and the total bacterial counts from the swab in these 2 observations did not significantly statistical correlate. ($r = 0.139$, $p = 0.448$ and $r = 0.141$, $p = 0.501$). During these 2 observation, the total bacterial counts in air collected from the same classrooms were investigated. It was 3 to 19.33 colonies/plate. The amount from these 2 observations had significant correlation. ($r = 0.396$, $p = 0.025$). The findings were disseminated to the maintenance personnel so as to be aware of the microbial dissemination which might contains the pathogenic microorganisms that could affect students in the classrooms and to maintain the air conditioning systems since biofilm could corrode the metal surfaces.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
ขอบเขตของการวิจัย	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 การตรวจจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ	9
2.2 การตรวจจำนวนแบคทีเรียรวม (total bacterial count) จากการ swab พื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศ	9
2.3 การตรวจจำนวนแบคทีเรียรวม (total bacterial count) ในอากาศ	10
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 จำนวนจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ	11
3.2 จำนวนแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศ	15
3.3 จำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศ	18
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผล	
วิจารณ์และสรุปผล	23
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการสร้าง biofilm.....	2
2	laminar flow ผ่านระบบท่อ.....	3
3	turbulent flow ผ่านระบบท่อ.....	4
4(ก)	microcolony บนพื้นผิวสแตนเลส.....	5
4(ข)	microcolony ของแบคทีเรียรูปแท่งบนผิววุ้นของ extracellular material.....	5
5(ก)	เซลล์ยีสต์ที่อยู่ใน biofilm.....	6
5(ข)	เซลล์ยีสต์ที่เคลือบด้วย extracellular material ใน biofilm.....	6
6	จุลชีพใน biofilm ที่ถูกย้อมด้วย acridine orange.....	11
7	เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	13
8	Scatter plot ระหว่างจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	14
9	เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	17
10	Scatter plot ระหว่างแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	18
11	เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	20
12	Scatter plot ระหว่างแบคทีเรียรวมในอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข).....	21
13	เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพจาก biofilm และแบคทีเรียรวมจาก swab ครั้งที่ 1 (ก).....	22
14	เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพจาก biofilm และแบคทีเรียรวมจาก swab ครั้งที่ 2 (ข).....	22

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

Biofilm คืออะไร

Biofilm คือ กลุ่มของจุลชีพที่เกาะติดบนพื้นผิวชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีสารที่หลั่งออกมาจากจุลชีพนั้น ๆ เป็น extracellular polymeric substance (EPS) จำพวก polysaccharide และ glycoprotein (Geesey, 1982) biofilm ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปตามธรรมชาติมักประกอบด้วยจุลชีพและสารประกอบทางเคมีหลายชนิด (Geesey *et al*, 1982) แต่การเพาะเลี้ยงจุลชีพจาก biofilm ในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมักจะเจริญเติบโตช้าหรือไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้ว่าจุลชีพเหล่านั้นยังมีชีวิตอยู่ก็ตาม นอกจากนี้การเกิด biofilm ในธรรมชาตินั้นมักจะเกิดที่พื้นผิววัสดุมากกว่าเกิดในสารละลาย biofilm เกิดได้ทั่วไปในธรรมชาติเพราะจุลชีพจะได้รับประโยชน์จากการดำรงชีพอยู่ใน biofilm โดย biofilm จะช่วยป้องกันอันตรายต่าง ๆ ที่มาจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอุลตราไวโอเลต ยาปฏิชีวนะ ความร้อน และ bacteriophage เป็นต้น รวมทั้งสาร polysaccharide ใน biofilm ที่มีประจุลบจะจับสารต่าง ๆ และเกลือแร่ที่อยู่รอบ ๆ ไว้เป็นอาหารให้กับจุลชีพใน biofilm อีกด้วย

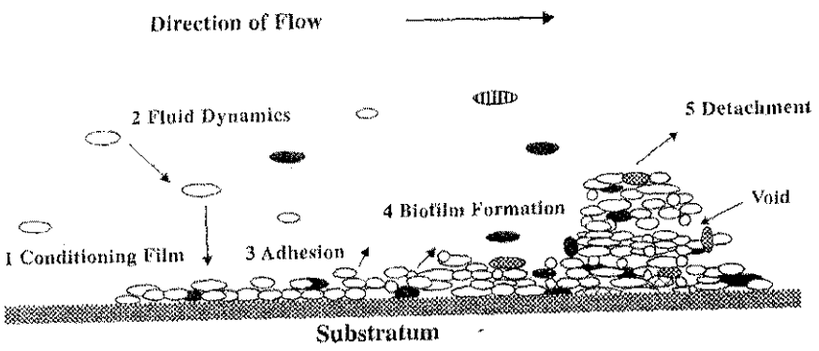
แต่อย่างไรก็ตาม การสร้าง biofilm ในธรรมชาติดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดปัญหาในหลายด้านทั้งทางอุตสาหกรรม เช่น การอุดตันของท่อในระบบทำความเย็น และท่อน้ำประปา (Le Chevallier *et al*, 1987) ในอุตสาหกรรมอาหารเกิด biofilm ในถังหมักและภาชนะต่าง ๆ (Holah and Kearney, 1992; Mattila – Sandholm and Wirtanen, 1992) รวมถึงอุตสาหกรรมนมและเบียร์ที่เกิดปัญหาในท่อส่ง ยางระหว่างข้อต่อ สายพานลำเลียง ท่อระบายน้ำเสีย และพื้นโรงงาน โดย biofilm เกิดได้รวดเร็วในระบบลำเลียงเพราะจุลชีพได้อาศัยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นอาหาร (Marshall, 1992) โดยทั่วไปโรงงานที่ดำเนินการเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่เปียกชื้นเป็นแหล่งที่ก่อให้เกิด biofilm ได้ดีโดยเฉพาะอุปกรณ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ หากมีจุลชีพปนเปื้อนก็สามารถที่จะเกิด biofilm ได้ภายในเวลา 15 นาที หรือ 2-3 ชั่วโมง หรือเป็นเดือน นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่ม sulphate – reducing bacteria และ acid – producing bacteria ใน biofilm ยังเป็นสาเหตุทำให้โลหะเกิดการผุกร่อนได้ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดประจุบวกและลบบนผิวโลหะ ประจุมีการเคลื่อนที่ทำให้เกิดการผุกร่อน เช่น การผุของตัวเรือ เป็นต้น (Costerton and Lappin – Scott, 1989)

นอกจากนี้ biofilm ยังก่อปัญหาทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เช่น ในด้านความสะอาด สุขอนามัย รวมถึงการก่อโรคโดยการสร้าง glycocalyx อุดตันปอด ทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ มีรายงานทางการแพทย์ว่าในประเทศอังกฤษ 40% ของการติดเชื้อจุลชีพจากโรงพยาบาล (nosocomial infections) มาจากการติดเชื้อจากสายสวนปัสสาวะ (urinary catheter) โดยพบว่าจุลชีพสามารถก่อ biofilm ได้หนาถึง 400μm ภายในเวลา 42 วัน ซึ่งจุลชีพเหล่านี้จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune system) ทำให้เกิดการอักเสบ ส่วนจุลชีพที่อยู่ในชั้น biofilm ที่ลึกลงไปสามารถหลบหนีจากการจับกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) และทนทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (Costerton *et al.*, 1987: Anwar And Costerton, 1992) เนื่องจากแบคทีเรียใน biofilm มักจะหยุดการเจริญแบ่งตัว ในขณะที่ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะมีผลต่อแบคทีเรียในระยะดังกล่าว

Biofilm ถูกสร้างขึ้นมาได้อย่างไร

หากนำของเหลวที่มีสารอินทรีย์ต่าง ๆ เกลือแร่ และจุลชีพ ไหลผ่านหรือคลุมพื้นผิวที่สะอาดจะเกิดการสร้าง biofilm ขึ้น โดยแบ่งเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การพัฒนาพื้นผิวให้เหมาะสมกับการเกิด biofilm (conditioning film)
2. การขนส่งจุลชีพมายังพื้นผิว (transport)
3. การเกาะติดของจุลชีพ (adhesion)
4. การสร้าง biofilm (biofilm formation)
5. การหลุดลอกของ biofilm (detachment)



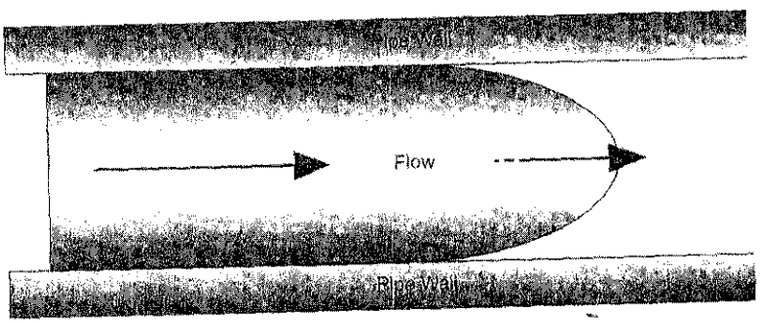
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสร้าง biofilm (Percival *et al.*, 2000)

โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

1. การพัฒนาพื้นผิวให้เหมาะสมกับการเกิด biofilm (conditioning film) โดยพื้นผิวที่สัมผัสกับสารอาหารและเกลือแร่ต่าง ๆ จากของเหลวที่ไหลผ่านหรือคลุมอยู่จะเกิดการพัฒนาเตรียมการก่อนเกิดการสร้าง biofilm ได้มีการศึกษาว่าพื้นผิวที่สัมผัสกับของเหลว 15 นาที จะเกิดการพัฒนาพื้นผิวเป็นฟิล์มบาง ๆ หนา 30 – 80 nm (Bryers, 1987) โดยพื้นผิวที่มีประจุบวกหรือลบจะดูดซึมโมเลกุลต่างๆ ไว้ ซึ่งในฟิล์มบาง ๆ นี้ประกอบด้วย polysaccharide glycoprotein และโปรตีนต่าง ๆ สารเหล่านี้จะมีผลต่อ pili หรือ fimbriae ของแบคทีเรียทำให้เกิดการเกาะติดในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ฟิล์มบาง ๆ ดังกล่าวยังเป็นแหล่งอาหารและเกลือแร่สำหรับจุลชีพและยังลดความเป็นพิษของผิวโลหะอีกด้วย อย่างไรก็ตามคงต้องมีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อให้เข้าใจกลไกได้มากกว่านี้

2. การขนส่งจุลชีพมายังพื้นผิว (transport) จุลชีพในของเหลวจะถูกขนส่งมายังพื้นผิวโดยแบ่งเป็น 2 วิธีคือ

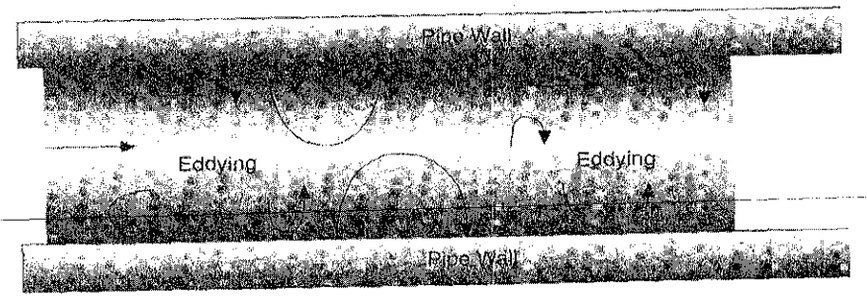
2.1 Laminar flow ของเหลวไหลผ่านท่อเป็นลักษณะผ่านในแนวราบ ซึ่งวิธีนี้จุลชีพจะถูกขนส่งมายังพื้นผิวในปริมาณจำกัด



ภาพที่ 2 laminar flow ผ่านระบบท่อ (Percival *et al.*, 2000)

2.2 Turbulent flow ของเหลวจะอยู่ในท่อเกิดการหมุนเวียนที่เรียกว่า eddy current ทำให้จุลชีพมีโอกาสสัมผัสกับพื้นผิวและเกิด biofilm ได้มากกว่าวิธีแรก

นอกจากนี้แรงดึงดูดของโลก (gravity) การหมุนเวียนจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ chemotaxis และแรงดันของของเหลว (fluid dynamic force) ก็มีผลร่วมด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 3 turbulent flow ผ่านระบบท่อ (Percival *et al.*, 2000)

3. การเกาะติดของจุลชีพ (adhesion)

ขั้นตอนของการเกาะติดแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

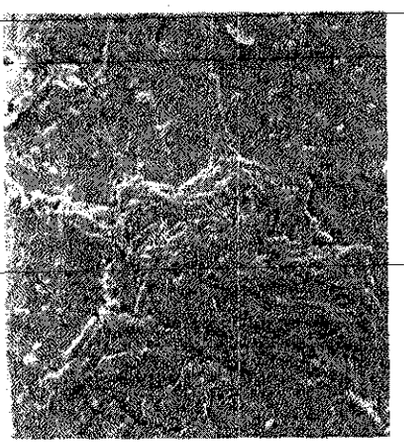
3.1 Reversible adhesion เป็นการเกาะติดแบบหลวม ๆ จุลชีพเกาะติดที่พื้นผิว โดยยังมีการเคลื่อนไหวแบบ Brownian จึงสามารถหลุดออกได้หากถูกชะล้างเบา ๆ

3.2 Irreversible adhesion เป็นการเกาะติดโดยอาศัย extracellular polymeric substance (EPS) ทำให้จุลชีพเกาะติดกับพื้นผิวได้แน่น การจะขจัดให้หลุดจะต้องใช้สารเคมีหรือการขัดถูจึงจะหลุดออกได้ ทั้งนี้สาร EPS จะช่วยให้มีแรงยึดติดแน่นขึ้น ช่วยดูดซับอาหารให้จุลชีพและป้องกันจุลชีพไม่ให้ถูกทำลายจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม

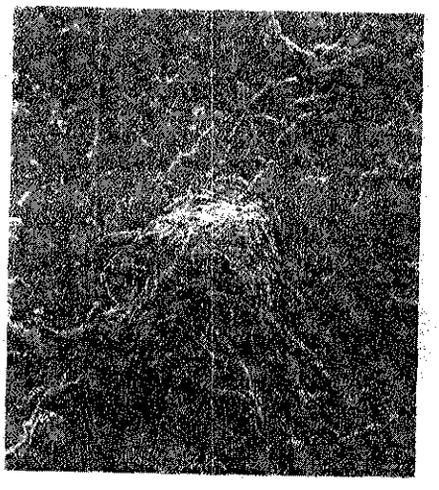
ทั้งนี้ในการที่จุลชีพเกาะติดพื้นผิวนี้จะเกิดจาก (1) Van der Waals force (2) electrostatic force (เพราะแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบ) (3) hydrophobic interaction และ (4) steric force ระหว่าง polymer กับพื้นผิว

4. การสร้าง biofilm (biofilm formation)

เมื่อจุลชีพเกาะติดที่พื้นผิวและสร้าง EPS ออกมา จุลชีพก็จะเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็น microcolony และยังจะทำให้จุลชีพชนิดอื่น ๆ มาเกาะติดเพิ่มจำนวนร่วมด้วยเกิดการสร้างเป็น biofilm ขั้นตอนนี้อาจใช้เวลาเป็นนาที ชั่วโมงหรือนานเป็นหลาย ๆ เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพของอาหารและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ pH หรือสภาพพื้นผิวที่เกาะที่มีลักษณะหยาบ ขรุขระ หรือมีประจุ จะทำให้เชื้อเจริญเติบโตช้าเร็วต่างกันไป



ภาพที่ 4 (ก) microcolony บนพื้นผิวสเตนเลส (Percival *et al.*, 2000 ซึ่งคัดลอกมาจาก Water Research, 32, Percival. S., Biofilms, mains water and stainless steel, 2187-2201, พิมพ์เมื่อ 1998, โดยได้รับอนุญาตจาก Elsevier Science.)



ภาพที่ 4 (ข) microcolony ของแบคทีเรียรูปแท่งบนผิววุ้นของ extracellular material (Percival *et al.*, 2000 ซึ่งคัดลอกมาจาก Water Research, 32, Percival. S., Biofilms, mains water and stainless steel, 2187-2201, พิมพ์เมื่อ 1998, โดยได้รับอนุญาตจาก Elsevier Science.)

ภาพที่ 5 (ก) เซลล์ยีสต์ที่อยู่ใน biofilm (Percival *et al.*, 2000 ซึ่งคัดลอกมาจาก Water Research, 32, Percival. S., Biofilms, mains water and stainless steel, 2187-2201, พิมพ์เมื่อ 1998, โดยได้รับอนุญาตจาก Elsevier Science.)

ภาพที่ 5 (ข) เซลล์ยีสต์ที่เคลือบด้วย extracellular material ใน biofilm (Percival *et al.*, 2000 ซึ่งคัดลอกมาจาก Water Research, 32, Percival. S., Biofilms, mains water and stainless steel, 2187-2201, พิมพ์เมื่อ 1998, โดยได้รับอนุญาตจาก Elsevier Science.)

5. การหลุดลอกของ biofilm (detachment)

การหลุดลอกของ biofilm ส่วนใหญ่มักจะเกิดจากการกัดเซาะ เนื่องจากสารละลายไหลผ่านเร็ว ๆ หรือการถูกขูดโดยชิ้นส่วนเล็ก ๆ ในสารละลาย สารเคมี หรือการขัดถู รวมทั้งจากโปรโตซัว งู หนอนที่อยู่ในน้ำนิ่งและน้ำทะเลก็จะเป็นปัจจัยทำให้ biofilm หลุดลอกได้ขณะที่สัตว์เหล่านี้เคลื่อนที่ หรือกินจุลชีพใน biofilm เป็นอาหาร นอกจากนี้สภาพแวดล้อม เช่น pH อุณหภูมิ สารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ถูกดูดซับเข้าไปใน biofilm อาจมีผลทำให้ biofilm หลุดลอกออกมาได้ ซึ่งการหลุดลอกของ biofilm นี้มีผลต่อระบบสุขอนามัย การเกิดโรคที่มาจากน้ำ (waterborne disease) ส่วนในระบบอุตสาหกรรมจะมีผลต่อสุขอนามัยในโรงงานซึ่งจะมีผลกระทบถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่จะจำหน่ายไปยังผู้บริโภคต่อไปด้วย

Biofilm ในเครื่องปรับอากาศ

ในปัจจุบันประเทศไทยนิยมใช้เครื่องปรับอากาศในแหล่งที่มีผู้คนรวมกันเป็นจำนวนมาก เช่น โรงมหรสพ ห้องประชุม ซึ่งการอยู่รวมกันในพื้นที่ลักษณะดังกล่าว หากการระบายหมุนเวียนของอากาศและระบบการกรองของเครื่องปรับอากาศไม่ดีพอ จะเกิดการแพร่กระจายของจุลชีพที่ก่อโรคต่อระบบทางเดินหายใจได้ จุลชีพที่แพร่กระจายในบรรยากาศนั้นนอกจากเป็นจุลชีพที่เพาะเชื้อโดยอาหารเลี้ยงเชื้อได้แล้ว ยังมีจุลชีพอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถเพาะเชื้อขึ้นได้ สำหรับจุลชีพทั้งที่เพาะเชื้อได้และที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้นั้นสามารถเกาะติดในเครื่องปรับอากาศในลักษณะของ biofilm ได้โดยก่อตัวขึ้นเมื่อมีหยดน้ำที่รวมตัวขึ้นจากการที่อุณหภูมิของเครื่องปรับอากาศเปลี่ยนแปลง โดยปกติเครื่องปรับอากาศไม่ควรมีน้ำขังเพราะโรงงานจะออกแบบให้หยดน้ำที่เกิดขึ้นไหลระบายออกจากเครื่อง แต่อย่างไรก็ตามในเครื่องปรับอากาศที่มีปัญหาหรือใช้งานไประยะหนึ่งแล้วอาจมีน้ำขังได้ ดังนั้นจึงสามารถพบ biofilm ได้ในที่ที่มีน้ำขัง แผ่นกรองและผนังของเครื่องปรับอากาศที่มีความชื้นและหยดน้ำเกาะ

จุลชีพที่สร้าง biofilm สามารถทำอันตรายต่อสุขภาพได้ จากการทบทวนเอกสารมีการพบเชื้อ *Legionella pneumophila* ในระบบระบายน้ำของเครื่องปรับอากาศทั้งชนิดที่เพาะเชื้อได้และชนิดที่เพาะเชื้อไม่ได้แต่ก่อ biofilm นอกจากนี้จุลชีพอื่น ๆ ที่สร้าง biofilm เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas,Enterobacter, Flavobacterium, Algaligenes, Staphylococcus* และ *Bacillus* หากอยู่ในเครื่องปรับอากาศและแพร่กระจายก็สามารถทำอันตรายต่อสุขภาพของคนหมู่มากได้เช่นกัน ซึ่งการกำจัด biofilm ให้หมดไปจากระบบต่าง ๆ ทำได้ยากมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

จากความสำคัญดังกล่าว จึงได้ทำการวิจัยตรวจหา biofilm ในระบบเครื่องปรับอากาศในห้องเรียนที่มีการเรียนการสอนให้นักศึกษา เพื่อศึกษาถึงปริมาณจุลชีพต่าง ๆ ที่อยู่ใน biofilm ซึ่งอาจแพร่กระจายให้คนกลุ่มใหญ่ที่อยู่รวมกันได้ โดยการตรวจหา biofilm และเพาะเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของเครื่องปรับอากาศ เช่น ส่วนที่มีหยดน้ำขัง แผ่นกรองและผนังเครื่องที่มีหยดน้ำเกาะ เพื่อให้ได้ข้อมูลแล้วแจ้งผู้รับผิดชอบทำการปรับปรุงแก้ไขเครื่องปรับอากาศ เป็นการกำจัดต้นเหตุให้หมดไป

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการตรวจหา biofilm ในเครื่องปรับอากาศที่มีอายุการใช้งานเกิน 1 ปี ตามห้องเรียน ห้องประชุม ที่มีผู้ใช้จำนวน □ 30 คน/ห้อง โดยจะทำการเพาะเชื้อจากบรรยากาศและตรวจเครื่องปรับอากาศ 2 ครั้งระยะเวลาห่างกันประมาณ 1 เดือน จำนวนไม่ต่ำกว่า 30 เครื่อง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิควิธีการตรวจหา biofilm ซึ่งสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ ได้
2. เป็นการเฝ้าระวังและดูแลสิ่งแวดล้อมไม่ให้เกิดการแพร่เชื้อที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในห้องเรียนที่มีกลุ่มคนอยู่รวม ๆ กัน
3. เป็นการดูแลรักษาเครื่องปรับอากาศ เพราะ biofilm จะเกาะและทำให้ผนังของเครื่องปรับอากาศผุ ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณในการซ่อมแซมหรือจัดซื้อหาใหม่

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การตรวจจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ (Vatanyoopaisan *et al.*, 2000)

ตัดโลหะอลูมิเนียมที่เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ทำผนังของเครื่องปรับอากาศให้มีขนาด 1.5 x 1.5 ซ.ม. ล้างและฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 °ซ 15 นาที นำชิ้นโลหะดังกล่าวไปวางบนแผ่นกรอง ผนังหรือพื้นล่างของเครื่องปรับอากาศที่มีความเปียกชื้น รวม 3 ชิ้น 3 จุดต่อเครื่องปรับอากาศ 1 เครื่อง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้าง biofilm บนพื้นโลหะ จากนั้นเก็บมาวางทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง เมื่อชิ้นโลหะแห้งดีแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก 1 ชิ้น/ถุง เขียนรายละเอียดหมายเลขห้องที่ติดเครื่องปรับอากาศและวันที่เก็บที่ถุงให้เรียบร้อย

จากนั้นนำชิ้นโลหะดังกล่าวมาย้อมด้วยสารเรืองแสง acridine orange 1% เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วยด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นโลหะที่ย้อมสีแล้วไปตรวจด้วยกล้อง epifluorescence ที่กำลังขยาย 400 เท่า ถ่ายภาพบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ ตรวจนับจุลชีพใน biofilm บนโลหะแต่ละชิ้นโดยนับ 20 microscopic field/ชิ้น และเก็บข้อมูลโดยใช้ WinLight software (EG&G Berthold) ภาพ biofilm ถูกวิเคราะห์ด้วย Adobe Photoshop 3.0 software และวิเคราะห์ คำนวณหาค่าเฉลี่ยและรายงานผลเป็น โคโลนี/ซ.ม.^{2} โดย Image analysis software program กรดนิวคลิอิค (nucleic acid) ในจุลชีพจะถูกย้อมด้วย acridine orange ทั้งนี้ขนาดและรูปร่างลักษณะจากกล้องจะทำให้จำแนกกลุ่มของจุลชีพใน biofilm ได้อย่างคร่าว ๆ

หลังจากนั้น 1 เดือน ทำการตรวจสอบซ้ำเหมือนเดิมอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบ

2.2 การตรวจจำนวนแบคทีเรียรวม (total bacterial count) จากการ swab พื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศ

ทำการ swab พื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศ 3 แห่ง คือ ที่แผ่นกรอง พื้นด้านในที่เป็นเมือกหรือเปียกชื้น และผนังช่องลมด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ตัดแผ่นพลาสติกใสโดยเจาะช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 3x3 ซ.ม.
2. เช็ดแผ่นพลาสติกนี้ด้วย 70% แอลกอฮอล์
3. วางแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์แล้ว ลงบนพื้นที่ที่ต้องการตรวจ
4. นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (steriled swab) จุ่ม nutrient broth บิดให้หมาด
5. ป้ายไม้พันสำลีถี่ ๆ จากด้านหนึ่งขนานไปจนถึงขอบอีกด้านหนึ่ง
6. ป้ายไม้พันสำลีถี่ ๆ เหมือนข้อ 5 แต่เป็นแนวตั้งฉากกับแนวเดิม

7. นำไม้พันสำลีจากข้อ 6 ใส่ในหลอดทดลองที่มี nutrient broth 1 ม.ล. และหักส่วนที่มือสัมผัสทิ้ง ปิดฝาหลอดทดลองโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ
8. ทำการเจือจางตัวอย่างในหลอดทดลองในอัตราส่วน 1 : 10, 1:100, 1:1000
9. นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 ม.ล. จากแต่ละหลอดใส่ลงใน plate count agar (PCA) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) 3 จาน/ตัวอย่าง (3 ซ้ำ) จากนั้นทำ spread plate technic โดยเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิววุ้นโดยใช้แท่งแก้วงอ (spreader) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
10. บ่มเพาะเชื้อที่ 37 ^{0}ซ 24 ชั่วโมง
11. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อโดยนับจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี/จาน หาค่าเฉลี่ยจากการทำ 3 ซ้ำ และคำนวณกลับ จากพื้นที่ที่ทำการ swab 9 ซม^{2} รายงานจำนวนแบคทีเรียรวมเป็น CFU/cm^{2}

หลังจากนั้น 1 เดือน ทำการตรวจสอบซ้ำเหมือนเดิมอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบ

2.3 การตรวจจำนวนแบคทีเรียรวม (total bacterial count) ในอากาศ

นำ plate count agar (PCA) เปิดฝาวางไว้กลางห้องที่จะตรวจ (3 จาน/ห้อง) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ PCA นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 ^{0}ซ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในจาน PCA คำนวณหาค่าเฉลี่ยและรายงานผลเป็นโคโลนี/จาน

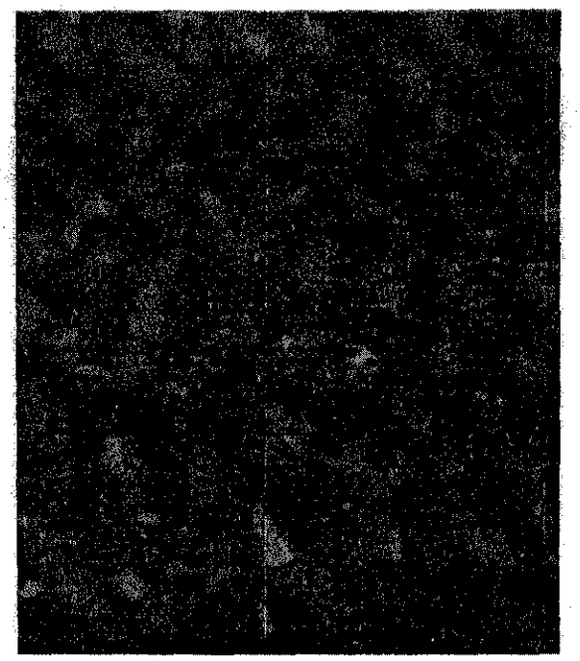
หลังจากนั้น 1 เดือน ทำการตรวจสอบซ้ำเหมือนเดิมอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 จำนวนจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ

จำนวนจุลชีพใน biofilm บนชิ้นโลหะที่ถูกย้อมด้วยสารเรืองแสง acridine orange 1% เมื่อตรวจดูด้วยกล้อง epifluorescence จะปรากฏผลดังภาพที่ 6 บนโลหะแต่ละชิ้นที่มี biofilm จะพบฝุ่นและจุลชีพที่อยู่ใน biofilm โดยกรดนิวคลิอิคในจุลชีพจะถูกย้อมเห็นเป็นสีส้ม ในห้องเรียน 32 ห้อง พบจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ 31 ห้อง (96.9%) โดยมีจำนวนจุลชีพตั้งแต่ 87 ถึง > 50,000 โคโลนี/ซม.^{2} ส่วนกลุ่มของจุลชีพจะมีทั้งแบคทีเรียรูปแท่ง (rod) fungi (yeast และ mold) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จำนวนจุลชีพจากการตรวจครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข) ห่างกันประมาณ 1 เดือน โดยครั้งที่ 2 พบจุลชีพใน biofilm 100% มีค่าตั้งแต่ 83.2 - > 50,000 โคโลนี/ซม.^{2} ซึ่งได้แสดงเปรียบเทียบในภาพที่ 7 และได้ทำการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี paired samples correlations พบว่าจำนวนจุลชีพในการตรวจทั้ง 2 ครั้งไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ($r = 0.139$, $p = 0.448$)



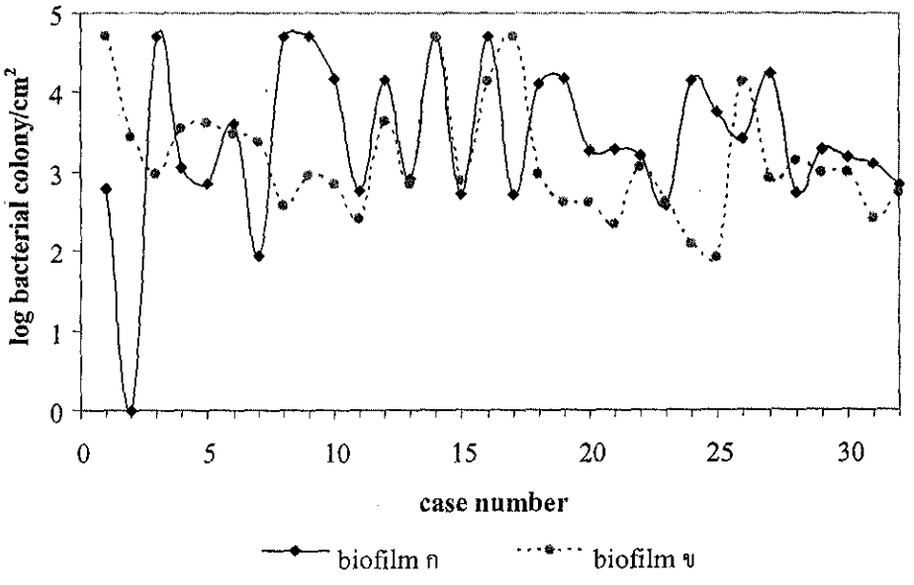
ภาพที่ 6 จุลชีพใน biofilm ที่ถูกย้อมด้วย acridine orange

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจหาจำนวนจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข)

ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	ครั้งที่ 1 (ก)		ครั้งที่ 2 (ข)	
		colony/cm^2	ชนิด	colony/cm^2	ชนิด
1	1112	624	rod bacteria	> 50000	rod bacteria
2	1113	0	-	2704	bacteria
3	1114	> 50000	bacteria & fungi	956.8	mold, bacteria
4	1117	1123.2	mold, bacteria	3452.8	bacteria
5	1118	707.2	mold, bacteria	4035.2	mold, bacteria
6	1120	4035.2	bacteria & fungi	3078.4	mold, bacteria
7	1121	87	mold, bacteria	2371.2	mold, bacteria
8	1122	> 50000	bacteria	374.4	mold, bacteria
9	1123	> 50000	bacteria	915.2	mold, bacteria
10	1125	14809.6	mold, bacteria	707.2	mold, bacteria
11	1132	582.4	bacteria	249.6	mold, bacteria
12	1133	14393.6	mold, bacteria	4243.2	bacteria
13	1202	826	mold, bacteria	707.2	bacteria
14	1203	> 50000	rod bacteria	> 50000	mold, bacteria
15	1204	521	Short rod bacteria	790.4	mold, bacteria
16	1205	> 50000	bacteria	13769.6	mold, bacteria
17	1206	521	mold, bacteria	> 50000	mold, bacteria
18	1207	13145.6	bacteria	956.8	bacteria
19	1208	15267.2	mold, bacteria	416	mold, bacteria
20	1209	1830.4	bacteria	416	bacteria
21	1210	1913.6	mold, bacteria	219.2	mold, bacteria
22	1213	1580.8	bacteria	1123.2	mold, bacteria
23	1214	374.4	bacteria	416	mold, bacteria

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	ครั้งที่ 1 (ก)		ครั้งที่ 2 (ข)	
		colony/cm^2	ชนิด	colony/cm^2	ชนิด
24	1208	15267.2	mold, bacteria	416	mold, bacteria
25	2102	5699.2	mold, bacteria	83.2	bacteria
26	2103	2579.2	bacteria	13436.8	bacteria
27	2104	17264	bacteria	832	mold, bacteria
28	1115	540.8	mold, bacteria	1414.4	mold, bacteria
29	1119	2000	bacteria	998.4	mold, bacteria
30	1127	1539.2	bacteria	998.4	mold, bacteria
31	1128	1248	mold, bacteria	249.6	bacteria
32	1129	707.2	bacteria	540.8	mold, bacteria



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพใน biofilm จากเครื่องปรับอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข)

3.2 จำนวนแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศ

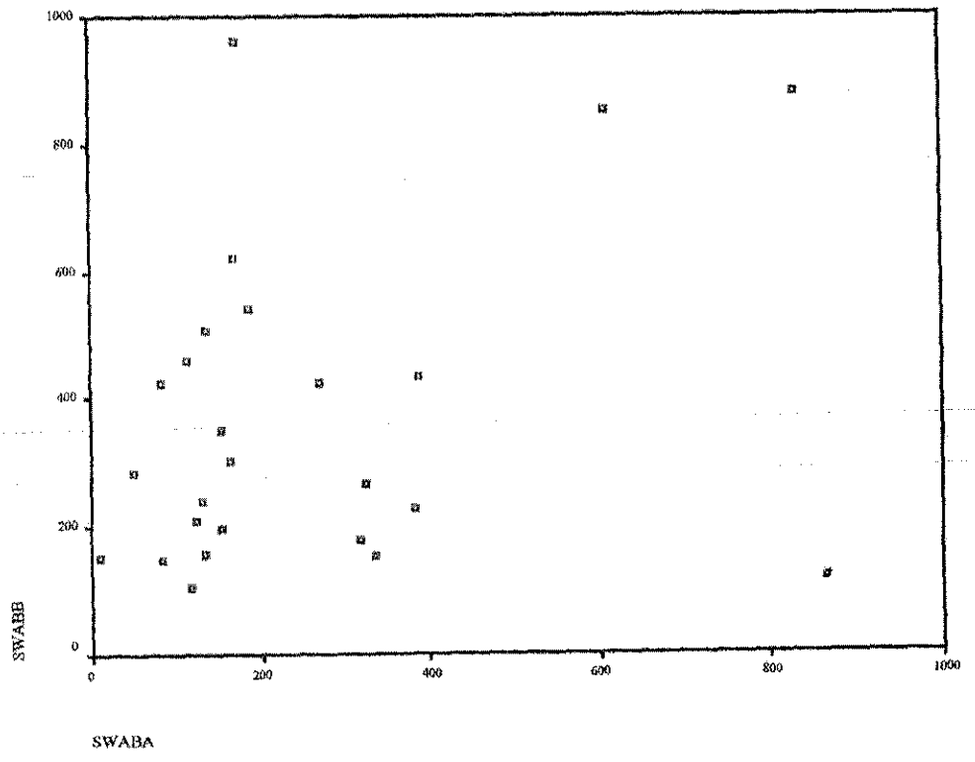
จำนวนแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศ (โคโลนี/ซ.ม.^{2}) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 โดยมีจำนวนแบคทีเรียจากห้องเรียน 25 ห้องในการตรวจครั้งที่ 1 (ก) มีค่าระหว่าง 10 – 1.57x10^5 CFU/cm^2 และจากห้องเรียน 32 ห้องในการตรวจครั้งที่ 2 (ข) ซึ่งห่างกันประมาณ 1 เดือนมีค่าระหว่าง 1.94 x 10^2 – 3.81 x 10^7 CFU/cm^2 จำนวนแบคทีเรียในการตรวจ 2 ครั้งได้นำมาเปรียบเทียบในภาพที่ 8 และทำการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี paired samples correlations พบว่าจำนวนแบคทีเรียจากห้องเรียน 25 ห้อง ในการตรวจทั้ง 2 ครั้งไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ($r = 0.141, p = 0.501$)

ตารางที่ 3.2 ผลการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข)

ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	**ครั้งที่ 1 (ก)** CFU /cm^2	**ครั้งที่ 2 (ข)** CFU /cm^2
1	1112	1.80 x 10^4	5.14 x 10^5
2	1113	8.32 x 10^4	1.12 x 10^6
3	1114	1.57 x 10^5	2.89 x 10^4
4	1117	3.13 x 10^4	2.56 x 10^4
5	1118	3.70 x 10^3	2.22 x 10^2
6	1120	1.25 x 10^4	2.33 x 10^4
7	1121	1.30 x 10^2	1.49 x 10^5
8	1122	1.14 x 10^3	1.03 x 10^3
9	1123	1.35 x 10^2	4.89 x 10^4
10	1125	1.50 x 10^2	1.94 x 10^2
11	1132	1.22 x 10^3	2.00 x 10^4
12	1133	3.80 x 10^2	4.17 x 10^4
13	1202	2.67 x 10^2	4.17 x 10^2
14	1203	83	1.44 x 10^3
15	1204	8.17 x 10^2	8.53 x 10^3

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	ครั้งที่ 1 (ก) CFU /cm^2	ครั้งที่ 2 (ข) CFU /cm^2
16	1205	3.05×10^4	1.67×10^6
17	1206	1.10×10^5	4.42×10^4
18	1207	1.67×10^4	9.44×10^2
19	1208	6.00×10^2	8.33×10^2
20	1209	50	2.78×10^2
21	1210	83	4.17×10^2
22	1213	10	1.43×10^6
23	2102	1.50×10^4	3.31×10^5
24	2103	1.67×10^2	6.03×10^3
25	2104	3.25×10^3	1.50×10^3
16	1205	3.05×10^4	1.67×10^6
17	1206	1.10×10^5	4.42×10^4
18	1207	1.67×10^4	9.44×10^2
19	1208	6.00×10^2	8.33×10^2
20	1209	50	2.78×10^2
21	1210	83	4.17×10^2
22	1213	10	1.43×10^6
23	2102	1.50×10^4	3.31×10^5
24	2103	1.67×10^2	6.03×10^3
26	1115	-	3.06×10^5
27	1119	-	3.81×10^7
28	1127	-	1.81×10^3
29	1128	-	6.94×10^2
30	1129	-	2.50×10^2
31	1214	-	1.67×10^6
32	1215	-	3.61×10^2



ภาพที่ 10 Scatter plot ระหว่างแบคทีเรียรวมจากการ swab ภายในเครื่องปรับอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข) ($r = 0.141$, $p = 0.501$)

3.3 จำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศ

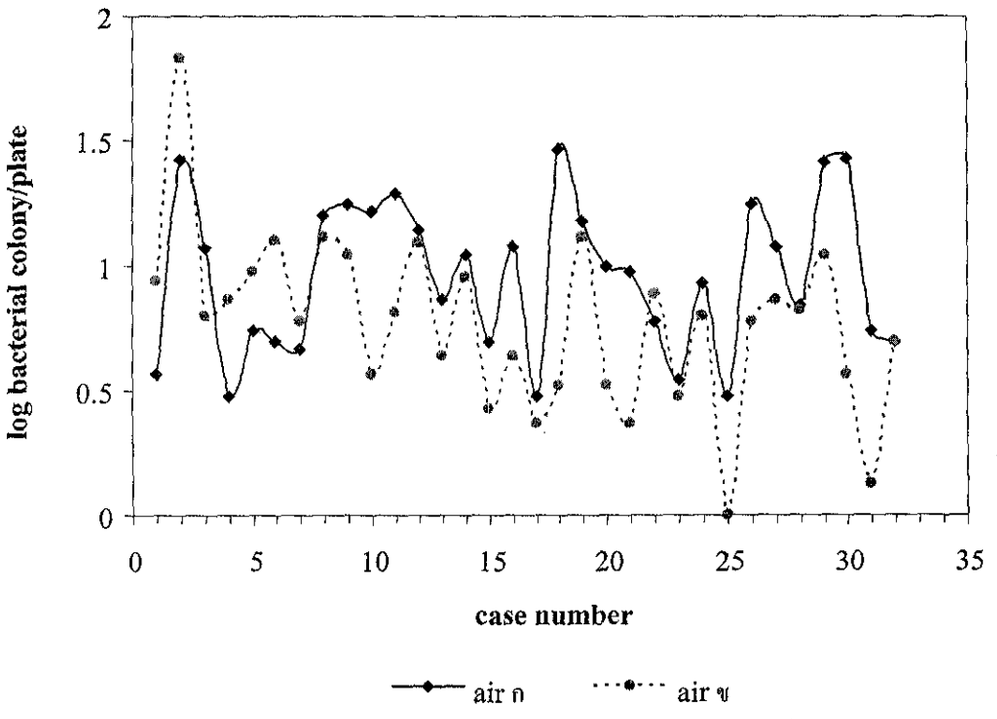
จำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศ (โคโลนี/จาน) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3 โดยมีจำนวนแบคทีเรียจากห้องเรียน 32 ห้อง ในการตรวจครั้งที่ 1 (ก) มีค่าระหว่าง 3-19.33 โคโลนี/จาน และครั้งที่ 2 (ข) ซึ่งห่างกันประมาณ 1 เดือน มีค่าระหว่าง 3-12.33 โคโลนี/จาน จำนวนแบคทีเรียในการตรวจ 2 ครั้ง ได้นำมาเปรียบเทียบในภาพที่ 11 และ 12 ซึ่งปริมาณในทั้ง 2 ครั้ง มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($r = 0.396$, $p = 0.025$)

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศ ครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข)

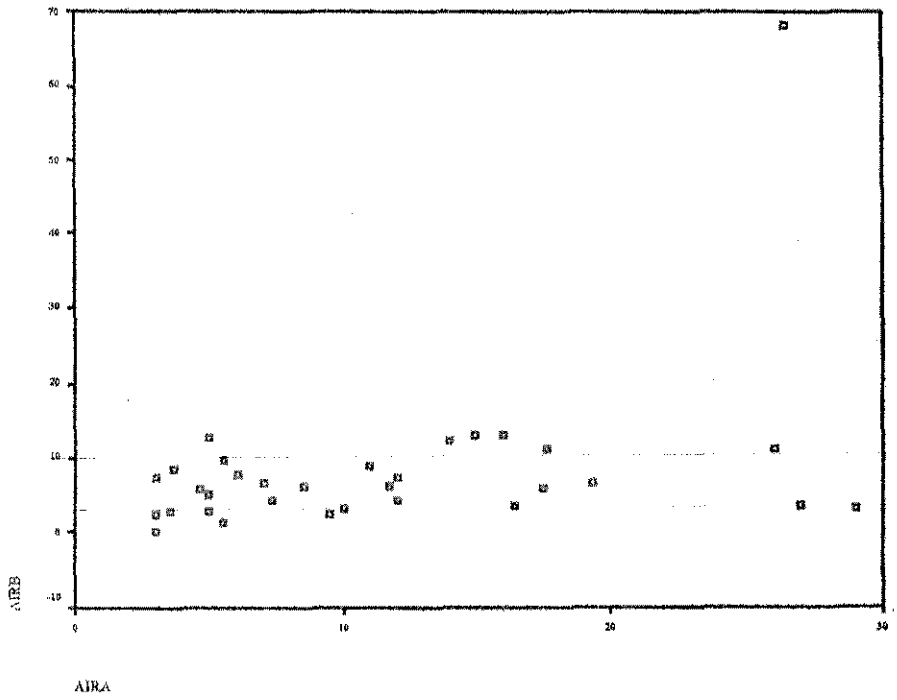
ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	ครั้งที่ 1 (ก) colony/plate	ครั้งที่ 2 (ข) colony/plate
1	1112	3.67	8.67
2	1113	26.5	68
3	1114	11.67	6.33
4	1117	3	7.33
5	1118	5.5	9.5
6	1120	5	12.5
7	1121	4.67	6
8	1122	16	13
9	1123	17.67	11
10	1125	16.5	3.67
11	1132	19.33	6.5
12	1133	14	12.33
13	1202	7.33	4.33
14	1203	11	9
15	1204	5	2.67
16	1205	12	4.33
17	1206	3	2.33
18	1207	29	3.33
19	1208	15	13
20	1209	10	3.33
21	1210	9.5	2.33
22	1213	6	7.67
23	2102	3.5	3

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ลำดับที่	เลขห้องที่ตรวจ	ครั้งที่ 1 (ก) colony/plate	ครั้งที่ 2 (ข) colony/plate
24	2103	8.5	6.33
25	2104	3	0.33
26	1115	17.5	6
27	1119	12	7.33
28	1127	7	6.67
29	1128	26	11
30	1129	27	3.67
32	1215	5	5

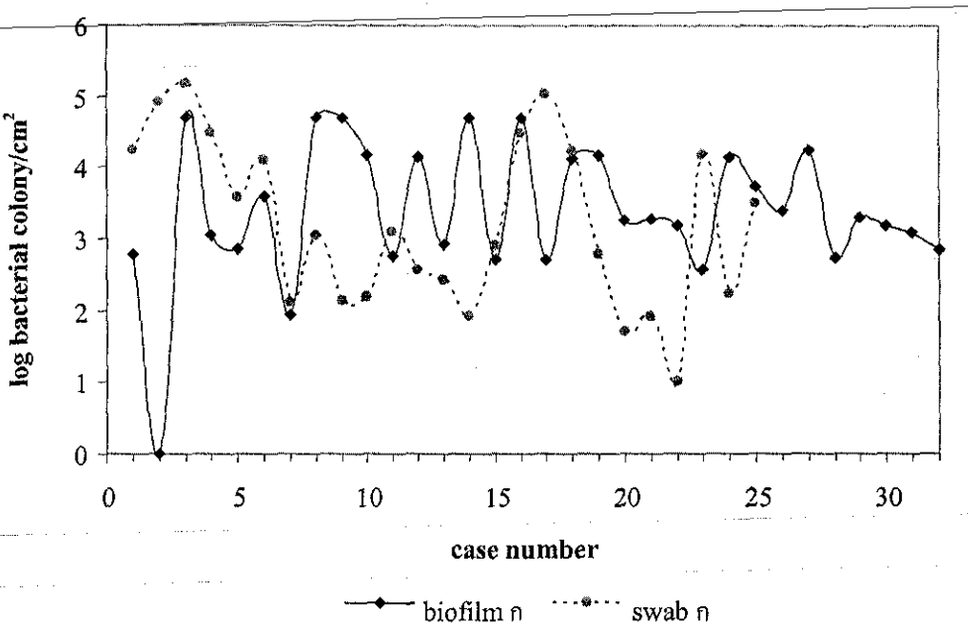


ภาพที่ 11 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียรวมในอากาศครั้งที่ 1 (ก) และครั้งที่ 2 (ข)

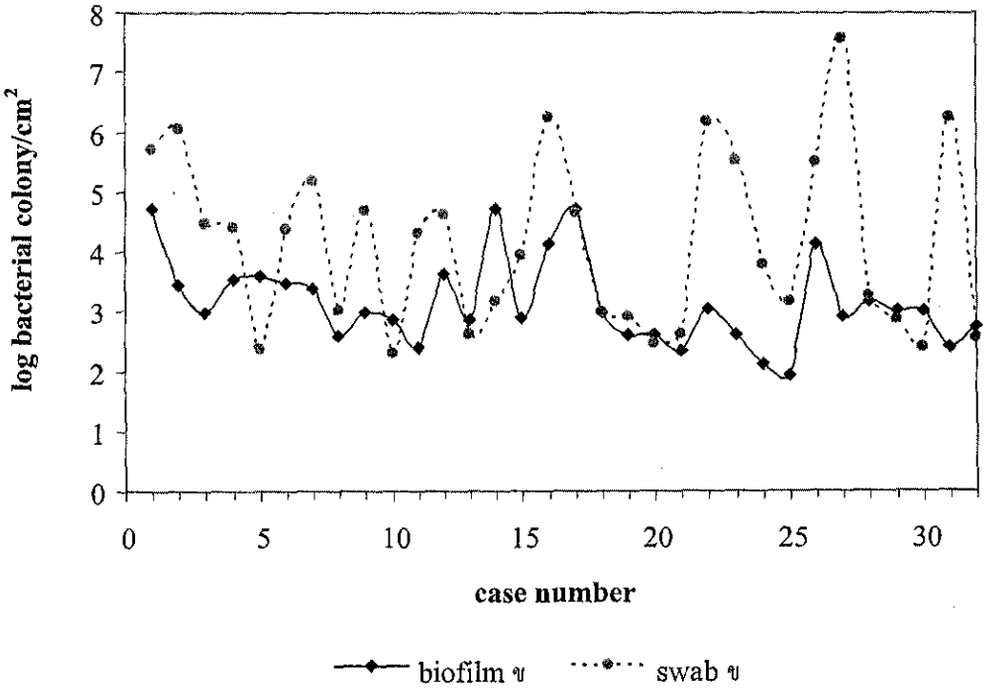


ภาพ 12 Scatter plot ระหว่างแบคทีเรียรวมในอากาศครั้งที่ 1 (ก) และ ครั้งที่ 2 (ข) ($r = 0.396$, $p = 0.025$)

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพจาก biofilm และจำนวนแบคทีเรียรวมจาก swab ในการตรวจครั้งที่ 1 (ก) ดังแสดงในภาพที่ 13 และในการตรวจครั้งที่ 2 (ข) ดังแสดงในภาพที่ 14 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($r = -0.174$, $p = 0.405$ และ $r = 0.021$, $p = 0.911$ ตามลำดับ)



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพจาก biofilm และแบคทีเรียรวมจาก swab ครั้งที่ 1 (ก)



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบจำนวนจุลชีพจาก biofilm และแบคทีเรียรวมจาก swab ครั้งที่ 2 (ข)

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผล

ปัจจัยที่ทำให้มีจุลชีพในระบบเครื่องปรับอากาศนั้นขึ้นกับสภาพแวดล้อม แผ่นกรอง และระบบอากาศที่ผ่านเข้าเครื่อง ซึ่งหากการออกแบบตัวเครื่องปรับอากาศดีก็จะทำให้ทำความสะอาดได้ง่ายโดยเฉพาะแผ่นกรองที่ต้องทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ ส่วนการเกิด biofilm ในระบบเครื่องปรับอากาศนั้นจำเป็นจะต้องมีความชื้นจากการรวมตัวของหยดน้ำ ซึ่งโดยปกติเครื่องปรับอากาศไม่ควรจะมีน้ำขังในเครื่อง แต่เมื่อใช้เครื่องปรับอากาศไประยะหนึ่งอาจเกิดความชื้นในเครื่องได้เพราะอุณหภูมิที่แตกต่างกันทำให้เกิดการควบแน่นเป็นหยดน้ำขึ้นที่แผ่นกรองหรือผนังเครื่อง ทำให้เกิดการสร้าง biofilm ขึ้นได้ ซึ่ง biofilm ที่เกิดในระบบเครื่องปรับอากาศอาจเป็นสาเหตุที่ก่อปัญหาทางสุขภาพต่อไปได้

ผลจากการทดลองการตรวจเครื่องปรับอากาศที่มีอายุการใช้งานตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป พบ biofilm 96.9% (31 จาก 32 ตัวอย่าง) ในการตรวจครั้งแรกและ 100% ในการตรวจครั้งที่ 2 โดยเป็นจุลชีพจำพวกแบคทีเรีย fungi (yeast และ mold) และได้ swab พื้นผิวภายในเครื่องปรับอากาศพบแบคทีเรียรวมดังตารางที่ 3.2 ทั้งนี้การตรวจ biofilm และ swab ในครั้งที่ 1(ก) และครั้งที่ 2(ข) ไม่มีความสัมพันธ์กัน อาจเป็นเพราะการเก็บตัวอย่างแม้จะทำภายในเครื่องปรับอากาศเครื่องเดิมแต่อาจไม่ใช่พื้นที่ตรงที่เดิมและเก็บห่างกันเป็นเวลาประมาณ 1 เดือนด้วย แต่การหาแบคทีเรียรวมในอากาศ 2 ครั้ง (ตารางที่ 3.3) จำนวนแบคทีเรียรวมมีความสัมพันธ์กันแสดงว่าคุณภาพอากาศ (ด้านแบคทีเรีย) คงเดิม ส่วนการเปรียบเทียบผลจาก biofilm และ swab ในแต่ละครั้งไม่มีความสัมพันธ์กัน เพราะวิธีตรวจจุลชีพใน biofilm นั้นเป็นการย้อมกรดนิวคลีอิค แต่การ swab นั้นเป็นการนำจุลินทรีย์มาเพาะให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีจุลินทรีย์ใน biofilm จำนวนมากที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

จุลชีพที่มักพบใน biofilm ทั่วไปส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่เป็นจุลชีพฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) เช่น *Pseudomonas* และ กลุ่ม *Flavobacterium* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* spp., *Bacillus*, *Algaligenes*, *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter pylori* และ *Legionella* spp. เป็นต้น กลุ่ม fungi เช่น *Cephalosporium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Trichoderma sporulosum*, *Nectria verdesceus* และ *Verticillium* spp. กลุ่มโปรโตซัว เช่น *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Naegleria*, *Hartmanella* และ *Acanthamoeba* นอกจากนี้ยังมีจุลชีพกลุ่มไวรัส เช่น Calcivirus, Rotavirus, Astrovirus, Hepatitis A virus และ

Norwalk virus รวมอยู่ด้วย จุลชีพดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่มักพบใน biofilm ที่สร้างขึ้นในระบบน้ำดื่มซึ่งจะก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารได้ ยกเว้นเชื้อ *Legionella* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *Legionella pneumophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิด Legionnaires' disease และ Pontiac fever ซึ่งเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เชื้อนี้แพร่กระจายทั่วไป พบเชื้อได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ในดิน ในหอหล่อเย็น เครื่องทำน้ำร้อน ระบบน้ำร้อนที่ใช้ในบ้านเรือน อ่างน้ำพุหรือน้ำพุประดับอาคาร ฝักบัวอาบน้ำหรือแอร์น้ำ ถาดรองรับน้ำจากเครื่องปรับอากาศซึ่งสกปรกไม่ได้รับการทำความสะอาดเท่าที่ควร เชื้อนี้สามารถมีชีวิตทนทานอยู่ได้ในอุณหภูมิ 7-70^{0}ซ (Bentham *et al.*, 1993) และสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ในอุณหภูมิ 20-45^{0}ซ และที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.0-8.5 ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีน้ำขังนิ่ง ดังนั้นแหล่งน้ำขังต่าง ๆ เป็นแหล่งเพาะและแพร่เชื้อได้อย่างดี ผู้ที่รับเชื้อโดยการหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อเข้าไปบางคนจะไม่มีอาการใด ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสภาพร่างกายที่สมบูรณ์ แข็งแรง ส่วนบางรายที่สภาพร่างกายไม่แข็งแรงจะแสดง 2 ลักษณะ ซึ่งจะเกิดเพียงอาการใดอาการหนึ่งเท่านั้น คือ

- ลักษณะอาการ Pontiac fever ประมาณร้อยละ 95 ของคนที่ได้รับเชื้อจะเกิดอาการป่วยโดยมีลักษณะคล้ายไข้หวัดใหญ่ (flu – like symptoms) ระยะฟักตัวสั้นประมาณ 1 – 2 วัน มีไข้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออาการไม่รุนแรงและโรคหายได้เอง
- ลักษณะอาการของโรค Legionnaires' disease (Pneumonia – like symptoms) พบประมาณร้อยละ 1 ถึง 5 ของคนสัมผัสกับเชื้อจะป่วยเป็นโรค โดยมีระยะฟักตัวยาวกว่าแบบแรก ตั้งแต่หลายวันจนถึง 2 สัปดาห์ มีไข้สูง ไอ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย มีการติดเชื้อในปอด อาการอาจรุนแรงถึงแก่ชีวิต

  อาการแทรกซ้อน : ผู้ป่วยอาจมีอาการของระบบประสาท และอุจจาระร่วงได้ บางรายอาจพบการติดเชื้อในอวัยวะต่าง ๆ เช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ผนังด้านในของหัวใจอักเสบ ไซนัสอักเสบ สมองอักเสบ ไตอักเสบหรือช็อกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีภาวะบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น งานที่ควรทำต่อไปคือการหาชนิดของจุลชีพใน biofilm และ swab ว่าเป็นจุลชีพชนิดใด ก่อโรคใดได้บ้าง สำหรับการทดลองในงานวิจัยนี้เป็นการย้อม biofilm ด้วยสารเรืองแสง acridine orange กรดนิวคลิอิคในเซลล์จะถูกย้อมด้วย acridine orange ติดสีส้ม และจำแนกตามลักษณะรูปร่างคร่าว ๆ ว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรีย หรือ yeast หรือ mold ส่วนการ swab และการตรวจจุลินทรีย์ในอากาศเป็นการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์รวม (total bacterial count) เพื่อให้ได้ภาพรวมว่ามีจุลชีพหรือไม่ จำนวนรวมมากน้อยเพียงใด จากนั้นได้นำข้อมูลแจ้งผู้เกี่ยวข้อง เพื่อจะได้ทำความสะอาดระบบเครื่องปรับอากาศไม่ให้มีน้ำขัง ซึ่งเป็นการป้องกันการ

เกิด biofilm ที่จะมีผลต่อเนื่องโดยหากมีการสร้าง biofilm จากเชื้อ *Legionella* spp. หรือจุลชีพอื่น ๆ ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจก็จะมีผลต่อสุขภาพของประชากรที่อยู่ในห้องนั้น ๆ ดังที่เคยเกิดการระบาดของโรค Legionnaires ในอดีตมาแล้ว (Barnstein *et al.*, Lee and West, 1991) นอกจากนี้หากปล่อยทิ้งไว้นาน ๆ ผนังและพื้นเครื่องปรับอากาศที่เป็นโลหะอาจเกิดการผุกร่อนสร้างความเสียหายได้

สำหรับการดูแลป้องกันไม่ให้เกิด biofilm นั้น เริ่มต้นจากการดูแลทำความสะอาดเครื่องอย่างสม่ำเสมอร่วมกับการใช้สารชีวภาพ (biocide) เช่น chlorine chloramines chlorine dioxide ozone และการใช้แสง ultraviolet ซึ่งมีข้อดีข้อเสียต่างกันดังนี้

สารชีวภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย
chlorine	ออกฤทธิ์กว้าง ออกฤทธิ์ในความเข้มข้นน้อย ๆ ได้	มีสารตกค้างที่เป็นพิษทำลายท่อและโลหะผุกร่อนได้
chloramines	ซึมเข้า biofilm ได้ดี สารตกค้างมีพิษต่ำ	พบว่าจุลชีพมีการดื้อต่อสารนี้
chlorine dioxide	ออกฤทธิ์ในความเข้มข้นน้อย ๆ ได้	เป็นแก๊สที่อาจระเบิดได้จึงเป็นปัญหาด้านความปลอดภัย
ozone	ออกฤทธิ์คล้าย chlorine สลายตัวเป็นออกซิเจนได้ ไม่มีสารตกค้าง	จะไป oxidize bromide ได้ half life สั้น

ส่วนแสง ultraviolet นั้นสามารถทำลายแบคทีเรียและไวรัสได้ดี ไม่มีสารตกค้างที่เป็นพิษ และไม่มีปัญหาในการเก็บและขนสารเคมี แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ความเข้มข้นสูงเพื่อทำลายจุลชีพที่อยู่ในรูปของ cyst ซึ่งการควบคุมให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการนั้นค่อนข้างยาก และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าใช้ chlorine มาก

ส่วนเชื้อ *Legionella* ในเครื่องปรับอากาศนั้นกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกหลักเกณฑ์มาตรฐานหรือข้อปฏิบัติเพื่อเป็นแนวทางให้กับหน่วยงานท้องถิ่นนำไปออกข้อปฏิบัติท้องถิ่น ควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ *Legionella* ในหอหล่อเย็นของโรงแรมหรืออาคารต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย

- การออกแบบ วัสดุที่ใช้ก่อสร้างต้องไม่สึกกร่อนง่าย ทำความสะอาดได้ง่าย มีแผงดักฝอยละออง มีรั้วหรือกำแพงล้อมรอบ มีอ่างรองรับน้ำในหอหล่อเย็น
- ลักษณะสถานที่ติดตั้งต้องอยู่ห่างจากทางลมเข้าเพื่อระบายและหมุนเวียนอากาศในอาคารบริเวณที่มีคนอาศัย และไม่ตั้งอยู่จุดที่ทิศทางลมจะพัดพาละอองน้ำไปสู่คน
- มีการบำรุงรักษา ดูแลระบบหล่อเย็นอยู่เป็นประจำ
- การทำความสะอาดต้องขัดล้าง กำจัดตะกอน ตะกรัน และการทำลายเชื้อจะต้องกระทำตามความจำเป็นอย่างน้อย 1 ครั้งใน 6 เดือน
- การบำบัดคุณภาพน้ำเพื่อควบคุมเชื้อ *Legionella* ต้องป้องกันและลดปริมาณ ตะกรัน ตะกอน แบคทีเรีย และจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยการเติมสารชีวภาพ (biocide) รวมถึงการใช้สารช่วยกระจายหรือสารเคมีที่ช่วยให้เกิดการรวมตัว (formulated chemicals)
- การใช้สารชีวภาพในหอหล่อเย็นต้องใช้อย่างน้อย 2 ชนิด โดยใส่สลับกันสัปดาห์ละครั้ง เพื่อป้องกันอุบัติการณ์ดื้อสารเคมีของเชื้อจุลินทรีย์
- การจัดทำแผนปฏิบัติการควบคุมโรคเมื่อเกิดการระบาดของโรค Legionellosis เจ้าของอาคารหรือผู้ได้รับอนุญาตจัดตั้งโรงแรม ต้องทำการแจ้งต่อเจ้าพนักงานท้องถิ่น หรือเจ้าพนักงานสาธารณสุขทราบทันทีเพื่อทำการสอบสวนทางระบาดวิทยา
- การเฝ้าระวังและเก็บตัวอย่างน้ำ โดยการเก็บตัวอย่างน้ำส่งตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Legionella* อย่างน้อยทุก ๆ 6 เดือนต่อครั้ง
- บุคคลซึ่งมีหน้าที่ในการดูแลบำรุงรักษาการบำบัดน้ำเสีย และการทำงานของระบบหล่อเย็นต้องผ่านการฝึกอบรมในการบำรุงรักษาหอหล่อเย็นให้ปราศจากเชื้อ *Legionella*
- การจัดทำแผนแก้ไขในกรณีตรวจพบเชื้อ *Legionella* ให้ดำเนินการแก้ไขปรับปรุงตามระดับการปนเปื้อนของเชื้อที่กำหนดไว้ในหลักเกณฑ์ข้อปฏิบัติการควบคุมเชื้อ *Legionella* ที่ออกโดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

บรรณานุกรม

Anwar, H. and Costerton, J.W. (1992). Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm-associated infections. *American Society of Microbiology News* 58, 665-668.

Barnstein N, Vieilly C, Nowicki M, *et al.*, (1986). Epidemiological evidence of Legionellosis transmission through domestic hot water supply systems and possibilities of control. *Isr. J. Med. Sci.*, 22, 655.

Bellon-Fontaine, M.-N., Mozes, N., Van Der Mer, H.C., Sjollema, J., Cerf, O., Rouxhet, P.G. and Busscher, H.J. (1990). A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy micro-organisms to solid substrata. *Cells Biophysics* 17, 93-106.

Bentham, R.H., Broadbent, C.R., Marwood, L.N., *et al.* (1993). The ecology and control of *Legionella* in cooling towers : Report of a field study in Adelaide. Adelaide : Federal Department of Administrative Services.

Block, J.C. (1992). Biofilms in drinking water distribution systems. In *Biofilms-Science and Technolgy* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 469-485. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Bott, T.R. (1992). Introduction to the problem of biofouling in industrial equipment. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 3-11. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Boulange-Petermann, L., Baroux, B. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1992). The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology* 7, 221-230.

Bryers, J.D. (1987). Biologically active surfaces processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnology*, 3, 57.

Cargill, K.L., Pyle, B.H., Sauer, R.L. and McFeters, G.A. (1992). Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 423-429.

Chamberlain, A.H.L. (1992). The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 59-68. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Characklis, W.G. (1981). Fouling biofilm development : a process analysis. *Biotechnology Bioengineering* 14, 1923-1960.

Characklis, W.G. (1989). Microbial biofouling control. In Biofilms ed. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. pp. 585 – 633. New York: Wiley-Intersciences.

Christensen, B.E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology* 10, 181-202.

Christensen, B.E. and Characklis, W.G. (1990). Physical and chemical properties of biofilms. In *Biofilms* ed. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. pp. 83-138, New York : Wiley-Intersciences.

Cooksey, K.E. (1992). Extracellular polymers in biofilms. In *Biofilms-Science and Technology* ed Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 137-148. Dordrecht; Kluwer Academic Press.

Cooksey, K.E. and Wigglesworth-Cooksey, B. (1992). The design of antifouling surfaces : background and some approaches. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 529-549. Dordrecht: Kluwer Academic Press.

Costerton, J.W. and Lappin-Scott, H.M. (1989). Behavior of bacteria in biofilms. *American Society of Microbiology News* 55, 650-654.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* 41, 435-464.

Czechowski, M.H. (1991). Biofilms and biodeterioration and biodegradation. Biofilms and surface sanitation in the food industry. *Biodeterioration and Biodegradation* 8, 453-454.

Czechowski, M.H. and Banner, M.J. (1989). Detection of surface attached, viable *Salmonella* and *Yersinia* bacteria. *Institute of Food Technologists Annual Meeting*, Chicago, June 25-29, 1989.

Dagostino, L., Goodman, A.E. and Marshall, K.C. (1991). Physiological responses induced in bacterial adhering to surface. *Biofouling* 4, 113-119.

Exner, M., Tuschewitzki, G.-J. and Scharnagel, J. (1987). Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning. *Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene* B183, 549-563.

Flamming, H.C., Schaule, G. and McDonogh, R. (1992). Biofouling on membranes. A short review. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B.pp. 487-497. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Fletcher, M. and Floodgate, G.D. (1973). An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *Journal of General Microbiology* 74, 325-334.

Fletcher, M. and Loeb, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine Pseudomonad to solid surfaces. *Applied and Environment Microbiology* 37, 67-72.

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., *et al.* (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. 41(1), 9-16.

Geesey, G.G. (1982). Microbial exopolymers; ecological and economic considerations. *American Society of Microbiology News* 48, 9-14.

Gessey, G.G., Characklis, W.G. and Costerton, J.W. (1992). Centers, new technologies focus on biofilm heterogeneity. *American Society of Microbiology News* 58, 546-547.

Gilbert, P., Evans, D.J. and Brown, M.R.W. (1991a). Surface properties of Gram-negative bacteria in relation to growth and dispersal of biofilm (abstr.). *Biofouling* 4, 238.

Gilbert, P., Evans, D.J., Evans, E., Duguid, I.G. and Brown. M.R.W. (1991b). Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 72-77.

Hanlon, G.W., Bridgett, J., Davies, M.C. and Denyer. S.P. (1992). Control of staphylococcal adhesion to model biopolymers. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B.pp. 557-558. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Holah, J.T. and Kearney, L.R. (1992). Introduction to biofilms in the food industry. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 35-41. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Humphrey, B.A., Dickson, M.R. and Marshall, K.C. (1979). Physicochemical and *in situ* observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces. *Archives of Microbiology* 120, 231-238.

LeChevallier, M.W., Babcock, T.M. and Lee, R.G. (1987). Examination and characterisation of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2714-2724.

LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. and Lee, R.G. (1988b). Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2492-2498.

Lee, J.V. and West, A.A. (1991). Survival and growth of *Legionella* spp. in the environment. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 20, 121 S.

Marshall, K.C. (1992). Biofilms : an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *American Society of Microbiology News* 8, 202-207.

Marshall, P.A., Loeb, G.I., Cowan, M.M. and Fletcher, M. (1989). Response of microbial adhesives and biofilm matrix polymers to chemical treatments as determined by interference reflection microscopy and light section microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2827-2831.

Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G. (1992). Biofilm formation in the industry : a review. *Food Reviews International* 8, (4) 573-603.

McFeters, G.A., Bazin, M.J., Bryers, J.D., Caldwell, D.E., Characklis, W.G., Lund, D.B., Mirelman, D., Mitchell, R., Subert, R.H.W., Tanaka, T. and White, D.C. (1984). Biofilm development and its consequences. Group report. In *Microbial Adhesion and Aggregation* ed. Marshall, K.C. pp. 109-124 New York : Springer-Verlag.

Nichols, W.W. (1989). Susceptibility of biofilms to toxic compounds. In *Structure and Functions of Biofilms* ed. Characklis, W.G. and Wilderer, P.A. pp. 321-331. New York : Wiley.

Nickel, J.C., Ruseska, I., Wright, J.B. and Costerton, J.W. (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27, 619-624.

Notermans, S., Dormans, J. and Mead, G.C. (1991). Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plant : a review. *Biofouling* 5, 21-36.

Oliveira, D.R. (1992). Physico-chemical aspect of adhesion. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 45-58. Dordrecht : Kluwer Academic Press.

Percival S.L., Walker J.T. and Hunter P.R. (2000). Microbiological aspects of biofilms and drinking water. CRC Press. USA.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987a). Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews 51, 365-379.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987b). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2889-2893.

Selan, L., Thaller, M.C., Berlutti, F., Passariello, C., Scazzochio, F. and Renzini, G. (1989). Effect of slime production on the antibiotic susceptibility of isolates from prosthetic infections. *Journal of Chemotherapy* 1, 369-373.

Sheretz, J., Raad, I.I., Belani, A., Koo, L.C., Rnad, K.H., Pickett, D.L., Straub, S.A. and

Fauerbach, L.L. (1990). Three year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 76-82.

Skaliy, P., Thompson, T.A, Gorman, G.W., *et al.* (1980). Laboratory studies of disinfectants against *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 40(4), 697-700.

Spenceley, H., Dow, C.S. and Holah, J.T. (1992). Development of mixed culture biofilms on stainless steel. In *Biofilms-Science and Technology* ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. pp. 395-402. Dordrecht : kluwer Academic Press.

Trulear, M.G. and Characklis, W.G. (1982). Dynamics of biofilm Process. *Journal of Water Pollution Control Federation* 54, 1288-1301.

Turakhia, M.H., Cooksey, K.E. and Characklis, W.G. (1983). Influence of calcium specific chelant of biofilm removal. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1236-1238.

Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. And Zehnder. A.J.B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* 54, 75-87.

Vatanyoopaisan S, Nazli A, Dodd C, *et al.* (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2), 860-863.

Wrangstadh, M., Szewzyk, U., Ostling, J. And Kjelleberg, S. (1990). Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp. Strain S9. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2065-2072.

ภาคผนวก

1% acridine orange

acridine orange	10	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายแล้วเก็บในขวดแก้วสีชา

Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมให้เข้ากันปรับ pH 7.0

นำไป autoclave 121^{0}ซ 15 นาที

Plate count agar (Tryptone glucose yeast agar)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมให้เข้ากันปรับ pH 7.0 ($\pm$ 0.2)

นำไป autoclave 121 ^{0}ซ 15 นาที

เทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ประวัติผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ สุโกศล

เกิด 26 สิงหาคม 2498 ที่กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.2535 วท.ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน) สาขา Microbiology & Immunology มหาวิทยาลัยมหิดล
- พ.ศ.2522 วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน) สาขา Microbiology & Immunology มหาวิทยาลัยมหิดล
- พ.ศ.2519 วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสบการณ์

- อาจารย์บัณฑิตวิทยาลัย ปฏิบัติราชการที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (2524-2538)
- อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (2538-ปัจจุบัน)

ผลงานทางวิชาการ

- ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์ 28 เรื่อง

รางวัลที่ได้รับ

- รางวัลงานวิจัยดีเด่นทางปรีคลินิก ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ประจำปี 2537

ดร.สาวิตรี วทัญญูไพศาล
ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ