

ผลของโอโซนต่อการรอดชีวิตของ *Campylobacter jejuni*

Effects of ozone on the survival of *Campylobacter jejuni*

ทิพรัักษ์ วงชาติ (Thippharak Wongsadee)¹

ณฐนนท์ トラชู (Nathanon Trachoo)^{2*}

ไมตรี สุทธจิตต์ (Maitree Suttajit)³

บทคัดย่อ

Campylobacter jejuni เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในคน การทำลาย *C. jejuni* ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี แต่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในอาหารและสิ่งแวดล้อม มีงานวิจัยที่ศึกษาสัณยภาพของโอโซนในการทำลายแบคทีเรียได้บางชนิด งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *C. jejuni* ATTC 29428 ในน้ำ เมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 นาที ซึ่งมีปริมาณโอโซนที่ละลายในน้ำเป็น 0.03, 0.06, 0.12, 0.18, 0.30, 0.42 และ 0.54 mg/l ตามลำดับ ได้พบว่า เมื่อ *C. jejuni* ได้รับโอโซนเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 3, 5 และ 7 นาที พบว่าจำนวน *C. jejuni* รอดชีวิตเหลืออยู่จำนวน 7.5, 6.6, 3.7, 3.3, 2.9 และ 2.4 log CFU/ml ตามลำดับ จากเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/ml และเมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที *C. jejuni* รอดชีวิตเหลือต่ำกว่า 1 log/CFU/ml และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *C. jejuni* ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเมื่อ *C. jejuni* ได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 31.00 kDa–200.00 kDa มีการเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนจนไม่สามารถพบแถบโปรตีนดังกล่าวอีก และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนก่อโรค *C. jejuni* ด้วยวิธี PCR หลังจากได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที พบว่าสามารถทำลายยีนก่อโรค *cadF*, *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* ของ *C. jejuni* ได้ จากผลการทดลองจึงอาจสรุปได้ว่าโอโซนมีศักยภาพในการนำไปใช้ทำลายเชื้อ *C. jejuni* ในน้ำได้

Abstract

Campylobacter jejuni causes human enteritis. Chemical sanitizers have been widely used to inactivate *C. jejuni* but this can lead to chemical contamination in food and environment. The bacteriocidal effects of ozone have been studied on some bacteria. This work studied the effects of ozone on survival of *C. jejuni* ATTC 29428. *C. jejuni* were exposed to ozone for 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 min equivalent to ozone in water of 0.03, 0.06, 0.12, 0.18, 0.30, 0.42 and 0.54 mg/l, respectively. The survivals of *C. jejuni* after ozone treatment at 0.5, 1, 2, 3, 5 and 7 min were 7.5, 6.6, 3.7, 3.4, 2.9 and 2.4 log CFU/ml, respectively

¹นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

³ศาสตราจารย์ สำนักวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ.พิษณุโลก 56000

*corresponding author, e-mail: nathanon.t@msu.ac.th

(initial count was 8 log CFU/ml). After 9 min of ozone exposure, *C. jejuni* was reduced to less than detection limit (1 log CFU/ml). The whole cell soluble proteins (31kDa–200 kDa) were denatured and not detected by gel electrophoresis. In addition, ozone treatment resulted in virulence genes *cadF*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* damages as revealed by polymerase chain reaction technique. This research showed that ozone can potentially be used to inactivate *C. jejuni* in water.

คำสำคัญ : *Campylobacter jejuni*, โอโซน, ยีนก่อโรค, น้ำ

Keywords: *Campylobacter jejuni*, ozone, virulence genes, water

บทนำ

Campylobacter jejuni เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (*Campylobacter enteritis*) ในคน ในปี ค. ศ. 1992–1995 ที่ประเทศอังกฤษ พบการระบาดของโรคลำไส้อักเสบขึ้น 26 ครั้ง ในครั้งที่เกิดรุนแรงที่สุดมีผู้ป่วย 575 ราย และพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการดื่มน้ำที่มี *C. jejuni* ปนเปื้อนอยู่ด้วย (Furtado et al., 1998) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *C. jejuni* ในเนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภค คือ เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อแกะ และอาหารทะเล โดยเนื้อไก่มีรายงานการพบมากที่สุด (Whyte et al., 2004) การปนเปื้อนในเนื้อสัตว์เกิดจาก *C. jejuni* ที่อยู่ในลำไส้สัตว์ปนเปื้อนหลายขั้นตอนตั้งแต่ที่ฟาร์ม โรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ และตลาดสด (Alter et al., 2004; Ishihara et al., 2004; Zhao et al., 2001) ดังนั้นการทำลาย *C. jejuni* ในโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ และฟาร์มจะสามารถตัดวงจรการปนเปื้อนไปสู่ผู้บริโภคได้ ในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ (cleaning and sanitizing) โดยใช้สารเคมี ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่พื้นผิววัสดุทำให้เกิดการกักตุนมีอายุการใช้งานสั้นลง ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังผู้ใช้งาน และอาจเกิดสารตกค้างในอาหารเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ และนอกจากนี้ยังนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในสัตว์มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้การรักษาโรค enteritis ในคน ด้วยยาปฏิชีวนะพวก quinolones ไม่ได้ผล การศึกษาวิธีการทำลาย *C. jejuni* โดยไม่ก่อมลพิษและสารเคมีตกค้างจึงเป็นวิธีที่ดี วิธีการ

ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยโอโซนนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ โอโซน (O_3) เกิดจากก๊าซออกซิเจน (O_2) แตกตัวเป็นอะตอมของธาตุออกซิเจน (O) หลังจากนั้นอะตอมของธาตุออกซิเจนจะไปรวมกับก๊าซออกซิเจนกลายเป็นโอโซน โอโซนเป็นก๊าซที่ไม่คงตัวจะแตกสลายให้ก๊าซออกซิเจนและออกซิเจนอะตอมเดี่ยวๆ อะตอมของออกซิเจนที่แตกตัวบางส่วนจะทำหน้าที่เป็น oxidizing agents ซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ บางส่วนก็รวมตัวกันเองเป็นก๊าซออกซิเจน เป็นอย่างนี้เรื่อยๆ ไปจนหมดจึงไม่เกิดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม หากใช้ในปริมาณที่เหมาะสมและถูกต้อง (Thanomsub et al., 2002) ได้มีผู้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำลายและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยโอโซนอย่างแพร่หลาย คือ ในปี ค.ศ. 1995 Restino และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 0.188 ppm เป็นเวลา 1–5 นาที ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Enterococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ยีสต์ คือ *Candida albicans* และ *Zygosaccharomyces bacilli* และสปอร์ของ *Aspergillus niger* พบว่าโอโซนมีประสิทธิภาพในการฆ่ายีสต์ทั้งสอง และฆ่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ ยกเว้น *L. monocytogenes* จะไวต่อโอโซน ในทางตรงกันข้าม สปอร์ของ *A. niger* จะมีความทนทานต่อโอโซน นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษา

การประยุกต์ใช้โอโซนในอาหาร โดยในปีค.ศ. 2004 Guzel-Seydim และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนในการลดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ sterile Class C buffer, whipping cream, 1% locust bean gum, 1% soluble starch และ 1% sodium caseinate โดย 1% locust bean gum, 1% soluble starch และ 1% sodium caseinate ละลายใน deionized water จากนั้นทำการปลูกถ่ายเชื้อ ได้แก่ สปอร์ของ *B. stearothermophilus*, vegetative cells ของ *E. coli* และ *S. aureus* ลงในส่วนประกอบของอาหารดังกล่าว แล้วนำไปผ่านก๊าซโอโซนเป็นเวลา 2 และ 10 นาที พบว่าเมื่อสัมผัสกับโอโซนเป็นเวลา 10 นาที สปอร์ของ *B. stearothermophilus* ในส่วนประกอบอาหารต่างๆ คือ buffer, starch, locust bean gum และ caseinate มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน whipping cream จำนวนสปอร์ของ *B. stearothermophilus* ไม่ลดลง ($p > 0.05$) ส่วน *E. coli* และ *S. aureus* เชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในอาหารดังกล่าวทุกชนิด จะเห็นได้ว่าโอโซนมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้หลายชนิด แต่ยังไม่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้คลอรีนมากกว่า จากรายงานที่ผ่านมาของ Greene และคณะในปี ค.ศ. 1993 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนเปรียบเทียบกับคลอรีนในการทำลาย biofilm ของ *Pseudomonas fluorescens* และ *Alcaligenes faecalis* โดยจำลองการสร้าง biofilm บนแผ่น stainless steel ในน้ำนม เมื่อใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 10 นาที และใช้คลอรีนที่ความเข้มข้น 100 ppm 2 นาที พบว่าโอโซนสามารถฆ่าเชื้อ *P. fluorescens* และ *A. faecalis* ได้ $5.6 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ และ $4.4 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ และพบว่าโอโซนมีประสิทธิภาพในการทำลาย biofilm ของ *P. fluorescens* และ *A. faecalis* ได้ดีกว่าคลอรีน อย่างไรก็ตามจากรายงานที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาผลของโอโซนต่อ *C. jejuni* ในน้ำ ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการแพร่กระจายของ *C. jejuni* งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของโอโซนต่อการรอด

ชีวิตของ *C. jejuni* ในน้ำ โดยได้ทำการศึกษาผลของโอโซนต่อโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ และยับยั้งการก่อโรคของ *C. jejuni* ในน้ำ

วิธีการวิจัย

การเตรียมจุลินทรีย์

เชื้อ *Campylobacter jejuni* ATTC 29428 ได้รับมาจาก New Zealand Reference Culture Collection ซึ่งแยกออกมาจากอุจจาระของเด็กที่ป่วยเป็นโรคอุจจาระร่วง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. jejuni* คือ brucella agar ดัดแปลง (BTTCR) ซึ่งเติมสาร 2,3,5 -triphenyl tetrazolium chloride และ reducing agents (ferrous sulfate, sodium bisulfate, pyruvic acid: FBP) โดย BTTCR ประกอบด้วย brucella broth 28 กรัมต่อลิตร (Criterion, U.S.A.), agar 15 กรัมต่อลิตร ferrous sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร, sodium bisulfate 0.2 กรัมต่อลิตร, pyruvic acid 0.5 กรัมต่อลิตร และ 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sigma, St. Louis) ทำการกรองสารละลาย FBP และ TTC ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร แล้วเติมลงใน brucella agar ภายหลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อต้องการเพาะเชื้อเริ่มจากเชื้อแช่แข็งหรือ freeze-dried จะใช้ semi-solid brucella เติม reducing agent (semi-solid BR) ซึ่งมีส่วนผสมของ brucella broth 28 กรัมต่อลิตร agar 1.5 กรัมต่อลิตร และ FBP ในปริมาณเท่ากับใน BTTCR ส่วนการบ่มเชื้อ *C. jejuni* บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะบรรยากาศ microaerobic ซึ่งประกอบด้วย ออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และไนโตรเจน 85% (บริษัทขอนแก่นออกซิเจน ประเทศไทย) (Trachoo and J.D., 2005)

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ *C. jejuni* โดยใช้ น้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PU8625 UV/VIS Spectrophotometer: Philips) ให้ได้ค่าประมาณ 0.70 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ $10^8 \text{CFU}/\text{ml}$)

การเตรียมโอโซนและการวัดปริมาณโอโซนในน้ำ

ผ่านก๊าซโอโซนลงในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml จากเครื่องผลิตโอโซนรุ่น HGOZ-1000 (Shanghai Nailing Electron-tech, China) ที่ผลิตโอโซนด้วยวิธี corona discharge แล้ววัดปริมาณโอโซนที่ละลายในน้ำ ด้วยวิธี Indigo Colorimetric Method โดยทำการเตรียม Indigo reagent II ซึ่งประกอบด้วย 10 g/l sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), 7 ml/l phosphoric acid และ Indigo stock solution (1 ml/l phosphoric acid และ 770 mg/l potassium indigo trisulfonate) จากนั้นทำการวัดปริมาณโอโซนที่ละลายในน้ำ โดยเติม 10 ml indigo reagent II ใน 2 volumetric flask ขนาด 50 ml flask ที่ 1 (blank) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น flask ที่ 2 ปรับปริมาตรด้วย sample จากนั้นวัดค่า absorbance ของสารละลายทั้งสองที่ 600 ± 5 nm สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของโอโซนจากความแตกต่างของค่า absorbance ระหว่าง sample และ blank ด้วยสูตร $\text{mg O}_3/\text{l} = 100 \times \Delta A / f \times b \times V$ เมื่อ ΔA = ความแตกต่างของค่า absorbance ระหว่าง sample และ blank, b = ความยาวของ cell = 1 cm, V = ปริมาตรของ sample (ml), $f = 0.42$ (Clesceri et al., 1989)

การทดสอบการรอดชีวิตของ *C. jejuni* หลังจากผ่านโอโซน

นำก๊าซโอโซนจากเครื่องผลิตโอโซนผ่านลงไปในการแขวนลอยของ *C. jejuni* ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 ml สารละลาย 0.02% sodium thiosulfate แล้วนำไปเพาะเชื้อลงบน modified brucella agar (BTTC-R) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะ microaerophilic ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 10% และไนโตรเจน 85% และนำไปทำการ enrichment ใน modified brucella broth แล้วบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาที 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะ microaerophilic

เพื่อเป็นการยืนยันว่า *C. jejuni* รอดชีวิตหรือถูกทำลายไปทั้งหมด จากนั้นนำไปขีดลงบน modified brucella agar อีกครั้ง ทำการยืนยันเชื้อ *C. jejuni* ด้วยวิธี motility test ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast Olympus BX51 โดยสังเกตการเคลื่อนที่แบบลูกดอก และรูปร่างเป็นเกลียว ย้อมแกรมติดสีแดง ทดสอบ catalase และ oxidase ได้ผลบวก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *C. jejuni* หลังจากผ่านโอโซน

ทำการสกัด whole cell protein ด้วยวิธี freeze-thawing และเขย่าด้วยทราย ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีของ Elliott และคณะ, 1991 โดยนำสารแขวนลอยของ *C. jejuni* ที่ผ่านโอโซนและไม่ผ่านโอโซน (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml) มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,600 x g 30 นาที แล้วล้าง pellet ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำมาแช่แข็งแล้วจนหลอมละลาย ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง โดยแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส และนำมาแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำ pellet มาแขวนลอยด้วยน้ำกลั่น 1 ml เติม 1.5 กรัมของทรายขนาด 0.22 mm x 0.33 mm แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,600 x g 30 นาที (Elliott et al., 1991) จากนั้นนำส่วนใสมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ เติม sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 นำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำไปทำให้เย็นแล้วนำตัวอย่างที่ได้ load 15-20 μl ลงแผ่น polyacrylamide gel 4% stacking gel และ 16% resolving gel ให้กระแสไฟฟ้าจาก power supply Model 4001 4P ความต่างศักย์ไฟฟ้า 160 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที ย้อมเจลด้วย silver (Logan and Trust, 1983)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนก่อโรคของ *C. jejuni* หลังจากผ่านโอโซน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนก่อโรคของ *C. jejuni* หลังจากผ่านโอโซนโดยการเพิ่มจำนวนยีนก่อโรค คือ *cadF*, *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* ด้วยวิธี PCR

โดยการสกัด DNA จากเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยวิธีการย่อยด้วย Proteinase-K digestion และทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenol-chloroform มีวิธีการดังนี้ ล้าง 1 ml ของ *C. jejuni* broth culture ด้วย Tris-EDTA buffer (TE buffer) pH 8 โดยการใช้การปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 x g เป็นเวลา 3 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วย TE buffer 2 ครั้ง แล้วเติม 500 μ l TE buffer และ 100 μ l Lysozyme (10 mg/ml) (Promega, U.S.A.) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเติม 100 μ l 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) บ่มต่ออีก 30 นาที แล้วเติม 5 μ l Proteinase K (10mg/ml) (Promega, U.S.A.) แล้วบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ภายหลังจากการบ่มแล้ว เติม 25:24:1 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Peirce, U.S.A.) 705 μ l ผสมให้เข้ากันดี แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g นาน 10 นาที ดูดส่วนบนใส่ centrifuge หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ในปริมาตรที่เท่ากัน และเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนบนทิ้งแล้วล้าง pellet ด้วย 70% alcohol แล้วบ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม TE buffer ปริมาตร 200 μ l

DNA ที่สกัดได้จะถูกนำไปใช้ทำ PCR โดยใช้ Oligonucleotide primer ดังนี้ การตรวจวิเคราะห์หายีน *cadF* (*cadF* – PCR product มีขนาด 400 bp) ใช้ Primer F2B: 5'-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG-3' และ R1B: 5'-CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC-3' (Konkel et al., 1999) การตรวจวิเคราะห์หายีน *cdtA* (*cdtA* – PCR product มีขนาด 165 bp) ใช้ Primer GNW: 5'-GGA AAT TGG ATT TGG GGc TAT ACT-3' และ IVH : 5'-ATC ACA AGG ATA ATG GAC AAT-3' การตรวจวิเคราะห์หายีน *cdtB* (*cdtB* – PCR product มีขนาด 495 bp) ใช้ Primer VAT2 : 5'-GTT AAA ATC CCC TGC

TAT CAA CCA-3' และ WMI-R : 5'-GTT GGC ACT TGG AAT TTG CAA GGC-3' การตรวจวิเคราะห์หายีน *cdtC* (*cdtC* – PCR product มีขนาด 555 bp) ใช้ Primer WMI-F: 5'-TGG ATG ATA GCA GGG GAT TTT AAC-3' และ LPF-X : 5'-TTG CAC ATA ACC AAA AGG AAG-3' (Pickett et al., 1996) ใช้ 0.2 ml PCR tubes ใน Thermocycler โดยทำการ amplification 30 รอบด้วยสภาวะดังนี้ สำหรับยีน *cadF* ทำการ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (Konkel et al., 1999) สำหรับยีน *cdtA* *cdtB* และ *cdtC* ทำการ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (Pickett et al., 1996) ทำการวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนยีนโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gels ใน 1% Tris-Borate-EDTA (TBE) ที่ 80 volts เป็นเวลา 75 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.012 % ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอหลังย้อมด้วยเครื่อง UV transilluminator (UVP, Upland, U.S.A.) และถ่ายภาพด้วยกล้อง KODAK DC290 ด้วยโปรแกรม KODAK ID Image Analysis software

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธี ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลที่นำวิเคราะห์มาจากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำการทดลอง ตัวอย่างชุดควบคุมในการทดลองคือตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านไอโซน

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษารอดชีวิตและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *Campylobacter jejuni* เมื่อได้รับโอโซนที่เวลาต่างกัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 นาที ซึ่งมีปริมาณโอโซนที่ละลายในน้ำเป็น 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.18, 0.30, 0.42 และ 0.54 mg/l ตามลำดับ จากการทดสอบการรอดชีวิตของ *C. jejuni* หลังจากได้รับโอโซน โดยการนับเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าโอโซนสามารถลดจำนวน *C. jejuni* ได้ ซึ่งการลดลงเป็นลำดับสอดคล้องไปกับเวลาในการสัมผัสโอโซนที่เพิ่มขึ้น ดังที่แสดงในตารางที่ 1 จนสามารถลดจำนวนจาก 8 log CFU/ml เหลือต่ำกว่า 1 log CFU/ml เมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที ซึ่งมีโอโซนที่ละลายในน้ำ 0.54 mg/l จากนั้นทำการ enrichment เชื้อ *C. jejuni* ที่ผ่านโอโซนเป็นเวลา 9 นาที ใน modified brucella broth เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า *C. jejuni* นั้นได้ถูกทำลายลงไปหมดหรือไม่ พบว่า *C. jejuni* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการ enrichment แสดงว่าโอโซนสามารถทำลาย *C. jejuni* ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาที่ผ่านมาในปีค.ศ. 1995 ของ Restino และคณะ พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ได้ 6 log CFU/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นโอโซน 0.188 mg/l เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ คือ เมื่อ *C. jejuni* สัมผัสกับโอโซนที่ความเข้มข้น 0.18 mg/l จำนวนเชื้อ *C. jejuni* ลดลง 4.83 log CFU/ml และในปีค.ศ. 2001 Baker และคณะ ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Helicobacter pylori* พบว่าสามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองได้ 2 log CFU/ml เมื่อ *E. coli* และ *H. pylori* สัมผัสกับน้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 0.09 mg/l และ 0.24 mg/l เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ และพบว่า *H. pylori* มีความทนทานต่อโอโซนมากกว่า *E. coli* ซึ่ง *H. pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญในสภาวะ microaerophilic เช่นเดียวกับกับ *C. jejuni*

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางธรรมชาติของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (whole cell protein) *C. jejuni* หลังจากได้รับโอโซนเป็นเวลา 2 และ 9 นาที ดังที่แสดงในรูปที่ 1 พบว่า *C. jejuni* ที่ได้รับโอโซน 2 นาที เมื่อนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นจากลงเมื่อเทียบกับ *C. jejuni* ที่ไม่ได้ผ่านโอโซน และเมื่อได้รับโอโซน 9 นาที พบลักษณะแถบโปรตีนจากมากในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 6.50 kDa – 21.50 kDa ไม่พบแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 31.00 kDa – 200.00 kDa แต่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าโอโซนทำให้โปรตีนของ *C. jejuni* เสียสภาพทางธรรมชาติ โปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเซลล์ เช่น ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ เป็นส่วนประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ และส่วนประกอบของออร์แกเนลล์ที่อยู่ใน cytoplasm ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Greene และคณะในปีค.ศ. 1993 ที่กล่าวว่าจุดแรกที่โอโซนเข้าไปทำลาย คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (cell membrane) บริเวณไกลโคโปรตีน (glycoproteins), ไกลโคลิปิด (glycolipids) หรือบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน อย่างเช่น ทริปโตฟาน (tryptophan) ซึ่งทริปโตฟาน (tryptophan) จะมีความไวต่อโอโซนมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น นอกจากนี้โอโซนยังมีประสิทธิภาพในการทำลายกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มไทออล (thiol group) ของซิสเตอีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนำไปสู่การเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน (Cataldo, 2003) เช่นเดียวกันกับ Guzel-Seydim และคณะ ที่กล่าวว่าโอโซนสามารถออกซิไดส์ sulfhydryl group ของโปรตีนทำให้เกิด polymerization เนื่องจากมี disulfide bond (-S-S) โมเลกุลของโปรตีนไม่สามารถคงรูปอยู่และไม่ทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ และในการทำลายแบคทีเรียแกรมลบด้วยโอโซนนั้น site of action จะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Guzel-Seydim et al., 2004, Khadre and Yousef. 2001)

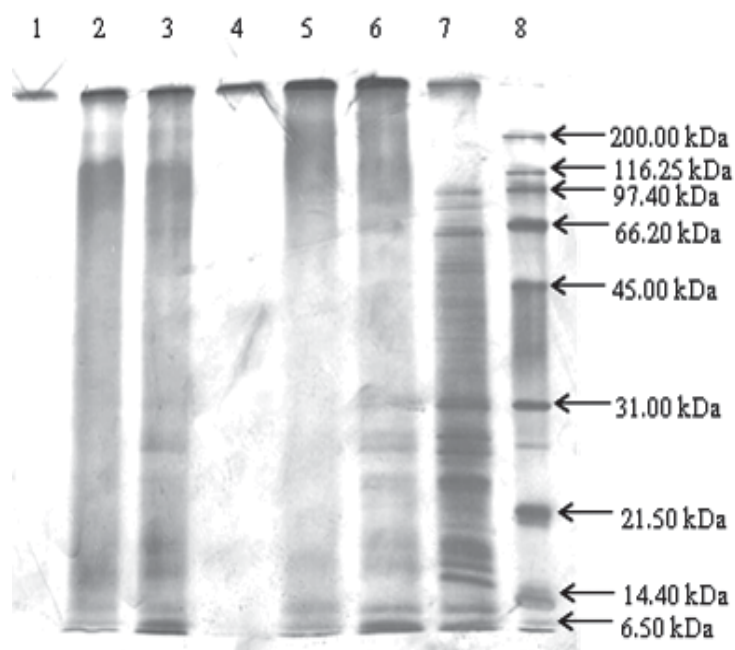
นอกจากนี้โอโซนยังสามารถออกซิไดส์ sulfhydryl group ที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ทำให้เกิดการแตกสลายของโครงสร้างปกติของเอนไซม์มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียหน้าที่ทางด้าน enzymatic activity สำหรับการตายของแบคทีเรียด้วยโอโซนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้านการซึมผ่านของสารเข้าออกของเซลล์ (cellular permeability) ซึ่งเป็นผลมาจากการแตกสลายของเซลล์ (cell lysis) อย่างไรก็ตามการเกิดการแตกสลายของเซลล์นั้นไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาขั้นแรกของโอโซนในการทำลายแบคทีเรีย แต่เกิดภายหลังที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์เพิ่มสูงขึ้น (Greene et al., 1993)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนก่อโรค *C. jejuni* คือ *cadF* (*cadF* – PCR product มีขนาด 400 bp), *cdtA* (*cdtA* – PCR product มีขนาด 165 bp) , *cdtB* (*cdtB* – PCR product มีขนาด 495 bp) และ *cdtC* (*cdtC* – PCR product มีขนาด 555 bp) หลังจากผ่านโอโซนเป็นเวลา 2 และ 9 นาทีโดยการเพิ่มจำนวนยีนก่อโรคด้วยวิธี PCR พบว่า หลังจาก *C. jejuni* ได้รับโอโซนเป็นเวลา 2 นาที ไม่สามารถตรวจพบยีน *cdtA* และ *cdtC* และ หลังจากได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที ไม่สามารถตรวจพบยีน *cadF*, *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* ดังแสดงในรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าโอโซนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ของเชื้อ *C. jejuni* ซึ่งเมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลาเพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น และเมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที สามารถทำลายยีนก่อโรคของ *C. jejuni* ได้ทั้ง 4 ยีน คือ *cadF*, *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในปีค.ศ. 1997 ของ Komanapalli และคณะ ในการศึกษาผลของโอโซนที่มีต่อ *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* K-12 (wild type) และ *E. coli* K-12 (*rec A*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีระบบการซ่อมแซม DNA (DNA repair system) หลังจากได้รับโอโซน 600 ppm เป็นเวลา 10 นาที พบว่า *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสาร non protein sulfhydryl, total

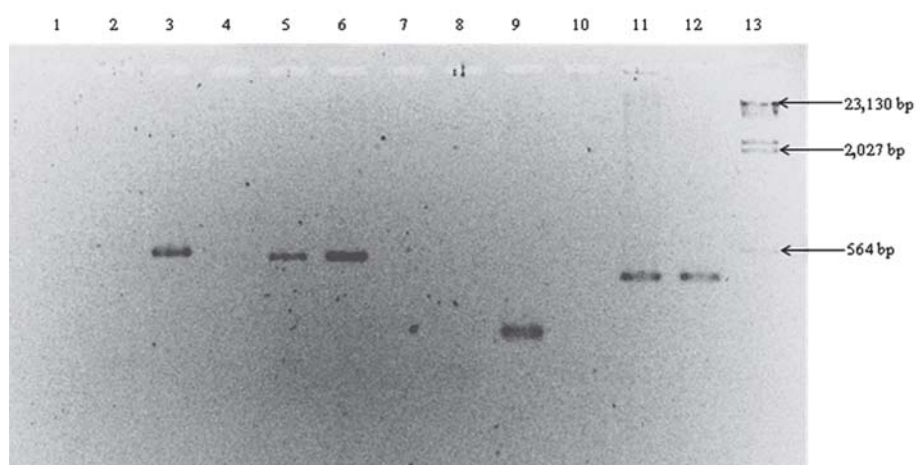
sulphydryl และเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งสามารถลดลง 90%, 50% และ 95% ตามลำดับ และพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวใน *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ในปีค.ศ. 1993 Greene และคณะยังกล่าวอีกว่าโอโซนยังมีผลต่อสารประกอบภายในนิวเคลียส (nuclear material) ของเซลล์แบคทีเรีย โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในกรดนิวคลีอิก คือ พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) เช่นเดียวกันกับ Hunt และคณะ ที่กล่าวว่าหลังจากโอโซนเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้านการซึมผ่านของสารเข้าออกของเซลล์ (cellular permeability) ต่อจากนั้นจะเกิดการรั่วไหลของสารประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ เนื่องจากพบความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น และพบสารประกอบภายในเซลล์ลดน้อยลง และโอโซนยังทำให้นิวคลีโอโปรตีน (nucleoproteins) ภายในเซลล์เกิดการตกตะกอนรวมกลุ่มกัน (aggregation) ซึ่งจะไม่มีผลต่อกรดนิวคลีอิก เนื่องจากกรดนิวคลีอิกรั่วไหลออกมาสู่ภายนอกเซลล์ก่อนแล้ว จากนั้นโอโซนจะสามารถทะลุผ่านเข้าไปในเซลล์ได้และเข้าไปทำปฏิกิริยากับกลุ่มซัลเฟอร์ เช่น sulfhydryl group ของกลูตาไทโอน (glutathione) ภายในเซลล์ แต่โอโซนไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของกลูตาไทโอนภายในเซลล์ได้ ในทางตรงกันข้ามโอโซนจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วและมีผลกระทบต่อกลูตาไทโอนภายนอกเซลล์ (Hunt and Marinas, 1999)

ดังนั้นโอโซนสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยเป้าหมายแรกในการทำลายอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย จากนั้นจะทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ และสุดท้ายจะทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ ซึ่งจะทำให้โอโซนสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ (Hunt and Marinas, 1999)



รูปที่ 1 แถบของ whole cell protein ของ *C. jejuni* ATCC 29428 หลังจากผ่านโอโซน บนแผ่น polyacrylamide gel 4% stacking gel และ 16% resolving gel แยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากเครื่องจ่ายกำลังไฟที่ 160 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที และย้อมเจลดด้วยวิธี Silver stain: Lane 1 และ Lane 4 = น้ำกลั่น, Lane 2 และ Lane 5 = *C. jejuni* ที่ผ่านโอโซน 9 นาที, Lane 3 และ Lane 6 = *C. jejuni* ที่ผ่านโอโซน 2 นาที, Lane 7 = *C. jejuni* ไม่ผ่านโอโซน, Lane 8 = standard



รูปที่ 2 แอ็บ DNA ของ *C. jejuni* ATCC 29428 หลังจากผ่านโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน บนแผ่น 1.5% agarose gel แยกด้วยกระแสไฟฟ้าจากเครื่องจ่ายกำลังไฟที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 75 นาที: Lane 1 = ยีน *cdtC* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 9 นาที, Lane 2 = ยีน *cdtC* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 2 นาที, Lane 3 = ยีน *cdtC* ของ *C. jejuni* ไม่ผ่านโอโซน, Lane 4 = ยีน *cdtB* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 9 นาที, Lane 5 = ยีน *cdtB* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 2 นาที, Lane 6 = ยีน *cdtB* ของ *C. jejuni* ไม่ผ่านโอโซน, Lane 7 = ยีน *cdtA* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 9 นาที, Lane 8 = ยีน *cdtA* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 2 นาที, Lane 9 = ยีน *cdtA* ของ *C. jejuni* ไม่ผ่านโอโซน, Lane 10 = ยีน *cadF* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 9 นาที, Lane 11 = ยีน *cadF* ของ *C. jejuni* หลังผ่านโอโซน 2 นาที, Lane 12 = ยีน *cadF* ของ *C. jejuni* ไม่ผ่านโอโซน และ Lane 13 = Marker Hind III

ตารางที่ 1 ผลการรอดชีวิตของ *C. jejuni* เมื่อผ่านโอโซนที่ระดับต่างๆ

เวลาที่ได้รับโอโซน	ความเข้มข้น ของโอโซนที่ละลาย ในน้ำ (mg/l)	จำนวน <i>C. jejuni</i> ที่รอดชีวิต (log CFU/ml $\pm$ SD) ¹	การเจริญหลัง(นาที) Enrichment ²
0	0	8.1 $\pm$ 0.06 ^a	3/3
0.5	0.03	7.5 $\pm$ 0.19 ^b	3/3
1	0.06	6.6 $\pm$ 0.08 ^c	3/3
2	0.12	3.7 $\pm$ 0.07 ^d	3/3
3	0.18	3.3 $\pm$ 0.12 ^c	3/3
5	0.30	2.9 $\pm$ 0.07 ^f	3/3
7	0.42	2.4 $\pm$ 0.07 ^g	3/3
9	0.54	<1 ^h	0/3

¹จำนวน *C. jejuni* ที่สามารถเจริญใน modified brucella agar (BTTC-R)

²จำนวนตัวอย่างที่พบ/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ตัวอักษร a, b, c... ที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05)

สรุป

โอโซนสามารถลดการเจริญของ *C. jejuni* ได้ทุกช่วงเวลาสัมผัสโอโซน คือ ตั้งแต่ 0.5–9 นาที และพบว่า *C. jejuni* ไม่สามารถรอดชีวิตเมื่อได้รับโอโซนเป็นเวลา 9 นาที ซึ่งมีโอโซนละลายในน้ำ 0.54 mg/l และโอโซนทำให้โปรตีนของเซลล์ *C. jejuni* เสียสภาพทางธรรมชาติ และสามารถทำลายยีนก่อโรคของ *C. jejuni* คือ *cadF*, *cdtA*, *cdtB* และ *cdtC* ได้ จากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงว่าโอโซนมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อหรือทำลายเชื้อ *C. jejuni* ได้ดีมาก สมควรจะทำแนวทางที่จะพัฒนานำโอโซนมาใช้ควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์หรืออาหารประเภทอื่นๆ ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหาสารคาม งบรายได้ ปีงบประมาณ 2550

เอกสารอ้างอิง

Alter, Thomas, Gaull, Florian, Froeb, Annekathrin, and Fehlhaber, Karsten. 2004. Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. **Food Microbiology** 22: 345–351.

Baker, Katherine H., P.Hegarty, John, Redmond, Brady, Reed, Nathan A., and Herson, Diane S. 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine and ozone) on *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 981–984.

Cataldo, Franco. 2003. On the action of ozone on proteins. **Polymer Degradation and Stability** 82: 105–114.

Clesceri, Lenore S., Greenberg, Arnold F., and Trussell, R. Rhodes. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Elliott, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E., and Facklam, R.R. 1991. Differentiation of *Lactococcus lastis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. **American Society for Microbiology**: 2731–2734.

Furtado, Adak, G.K., Stuart, J.M., Wall, P.G., Evans, H.S., and Casemore, D.P. 1998. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–5. **Epidemiology And Infection**: 109–119.

Greene, Annel K., Few, Brian K., and Serafini, Joao C. 1993. A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science** 76: 3617–3620.

Guzel–Seydim, Zeynep B., Greene, Annel K., and Seydim., A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. **Lebensm–Wiss u–Technol** 37: 453–460.

Guzel–Seydim, Zeynep, Jr., Paul I. Bever, and Greene, Annel K. 2004. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology** 21: 475–479.

Hunt, Nimrata K., and Marinas., Benito J. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone chemical and inactivation kinetics. **Water Research** 33: 2633–2641.

Ishihara, Kanako, Kira, Tomoko, Ogikubo, Kaori, Morioka, Ayako, Kojima, Akemi, Kijima–Tanaka, Mayumi, Takahashi, Toshio, and Tamura, Yutaka. 2004. Antimicrobial

- susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farm (1999–2001) : results from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. **International Journal of Antimicrobial Agent** 24: 63–69.
- Khadre, M.A., and Yousef., A.E. 2001. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology** 71: 131–138.
- Komanapalli, Indira Ruth, Mudd, John Brian, and Lau, Benjamin H.S. 1997. Effect of ozone on metabolic activities of *Escherichia coli* K- 12. **Toxicology Letters** 90: 61–66.
- Konkel, Michael E., Gray, Sean A., Kim, Bong J., Garvis, Steven G., and Yoon, Julie. 1999. Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Based on the cadF Virulence Gene and Its Product. **Journal of Clinical Microbiology** 37: 510–517.
- Logan, Susan M., and Trust., Trevor J. 1983. Molecular Identification of Surface Protein Antigens of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity** 42: 675–682.
- Pickett, Carol L., Pesci, Everett C., Cottle, Daniel L., Russell, Gina, Erdem, Aysegul Nalca, and Zeytin, Hasan. 1996. Prevalence of Cytolethal Distending Toxin Production in *Campylobacter jejuni* and Relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB Genes. **Infection and Immunity** 64: 2070–2078.
- Restaino, Lawrence, Frampton, Elon W., Hemphill, Jenifer B., and Palnikar, Paul. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 3471–3475.
- Thanomsub, Benjamas, Anupunpisit, Vipavee, Chanphetch, Silchai, Watcharachaipong, Thanomrat, Poonkhum, Raksawan, and Srisukonth, Chuda. 2002. Effect of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology** 48: 193–199.
- Trachoo, N., and J.D., Brooks. 2005. Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm. **Journal of Biological Sciences** 8: 599–605.
- Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., Carroll, C., O’Leary, A., Fanning, S., Collins, J.D., McNamara, E., Moore, J.E., and Cormican, M. 2004. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. **International Journal of Food Microbiology** 95: 111–118.
- Zhao, Cuiwei, Ge, Beilei, Villena, Juan De, Sudler, Robert, Yeh, Emily, Zhao, Shaohua, White, David G., Wagner, David, and Meng, Jianghong. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 5431–5436.