

## TÁC DỤNG CỦA XUNG ÁNH SÁNG TRÊN *Bacillus subtilis* DẠNG HUYỀN PHÙ VÀ GÂY NHIỄM TRÊN GIA VỊ

Nguyễn Bảo Lộc<sup>1</sup>, Nicorescu Irina<sup>2</sup>, Chevalier Sylvie<sup>2</sup> và Orange Nicole<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> LMSM, University of Rouen, EA 4312, 55, rue Saint-Germain, 27000, Evreux, France

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 31/07/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

### Title:

Inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices by pulsed light effects

### Từ khóa:

Xung ánh sáng, khử nhiễm, gia vị, *B. subtilis*

### Keywords:

Pulsed light, decontamination, spices, *B. subtilis*

### ABSTRACT

The aim of our study was to assess the impact of a pulsed light (PL) technology on *B. subtilis* growth on two model matrixes, through bacterial inactivation and cell integrity. First, the effect of PL treatment (light flux of 0.6 J.cm<sup>2</sup>/flash) on *B. subtilis* vegetative cells in liquid state (DO<sub>580nm</sub> = 0.8) was evaluated. We found that PL treatment led to 8 log reduction of *B. subtilis* vegetative cells while bacterial morphology was not affected. When DNA extract from *B. subtilis* vegetative cells was analyzed, a significant difference was found between the control and the PL-treated samples. Second, spices, among which ground caraway, ground red pepper and ground black pepper were artificially inoculated with a known concentration of *B. subtilis* in vegetative state (at logarithmic phase) and then the spices were exposed to PL (light flux of 1 J.cm<sup>2</sup>/flash). In this case, PL treatment led to a bacterial reduction of about 1 log and serious damage of the microorganism's parietal structure occurred. To conclude, this work highlights that pulsed light had a potential for inactivation of *B. subtilis* in both, liquid and dry state but through different mechanisms.

### TÓM TẮT

Mục đích của thí nghiệm là nhằm đánh giá tác động của xung ánh sáng (PL) trên *B. subtilis* trong hai dạng môi trường (dạng huyền phù và gây nhiễm trên gia vị) thông qua hai chỉ tiêu chính là khả năng tiêu diệt vi sinh vật và tác động lên cấu trúc tế bào vi sinh vật. Đầu tiên, thí nghiệm về tác động của phương pháp xử lý xung ánh sáng (với cường độ năng lượng 0,6 J.cm<sup>2</sup>/xung) trên huyền phù của tế bào sinh dưỡng *B. subtilis* (DO<sub>580nm</sub> = 0,8) được thực hiện. Kết quả cho thấy phương pháp này tiêu diệt được 8 log tế bào trong khi hình dạng của tế bào không bị ảnh hưởng. Khi phân tích sự di chuyển của ADN trên gel agar, thì kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa mẫu xử lý và mẫu đối chứng. Tiếp theo, thí nghiệm nghiên cứu tác động của xung ánh sáng (với cường độ năng lượng 1 J.cm<sup>2</sup>/xung) trên ba loại gia vị (tiêu hồi, ớt đỏ và tiêu đen) được gây nhiễm nhân tạo với tế bào sinh dưỡng của *B. subtilis* (giai đoạn phát triển logarit) được thực hiện. Thí nghiệm này cho thấy phương pháp xử lý bằng xung ánh sáng có thể tiêu diệt được khoảng 1 log tế bào vi sinh vật, quan sát hình ảnh tế bào bằng kính hiển vi điện tử cho thấy hình dạng bên ngoài tế bào vi sinh vật bị phá hủy dưới tác động của phương pháp xử lý này. Tóm lại, thí nghiệm này cho thấy phương pháp xử lý bằng xung ánh sáng có thể tiêu diệt được tế bào sinh dưỡng của *B. subtilis*, nhưng cơ chế bắt hoạt thì khác nhau.

## 1 GIỚI THIỆU

Ngày nay, các yêu cầu thương mại và pháp luật liên quan đến sự an toàn, chất lượng và bảo quản các sản phẩm thực phẩm đã góp phần vào việc phát triển và cải thiện các phương pháp khử nhiễm. Đối với gia vị, phương pháp khử trùng thường xuyên áp dụng nhất là thanh trùng (bằng nhiệt khô hoặc hơi nước), ngoài ra còn có phương pháp chiếu xạ, hút chân không... Tuy nhiên, có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng những phương pháp khử trùng thường sử dụng này có thể gây ra sự mất màu sắc, phá huỷ vitamin, thay đổi hương vị hoặc làm mất mát tinh dầu trong các loại thảo mộc và gia vị (Gould, 1964; Vajdi & Pereira, 1973; Grahl & Markl, 1996). Ứng dụng của xung ánh sáng gây được sự chú ý đặc biệt đối với các nhà khoa học là do mức độ sử dụng năng lượng thấp hơn so với các quá trình xử lý nhiệt (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998) và sự thân thiện với môi trường của phương pháp này. Kỹ thuật xung ánh sáng là kỹ thuật sử dụng các xung năng lượng cao của phổ ánh sáng rộng với thời gian cực ngắn để tiêu diệt vi sinh vật (Woodling & Moraru, 2006). Tùy thuộc vào mức độ năng lượng xử dụng, cấu tạo của thiết bị, khoảng cách giữa nguồn sáng và mẫu, vi sinh vật mục tiêu, tính chất và thành phần của mẫu xử lý. Tác dụng diệt khuẩn của xung ánh sáng gây ra chủ yếu bởi phổ UV (là tác nhân tạo ra các liên kết nhị hợp trên ADN của vi khuẩn), và sự tăng nhiệt độ cục bộ do tác dụng của phổ hồng ngoại tạo nên sự phá vỡ tế bào vi sinh vật (Dunn *et al.*, 1995; Wekhof 2000; Takeshita *et al.*, 2003). Mặc dù, cơ chế chính xác về tác dụng của xung ánh sáng trên tế bào vi sinh vật vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã cho thấy một đóng góp quan trọng của phần phổ UV ngắn (250-260 nm) của xung ánh sáng trong bất hoạt vi khuẩn (Uesugi & Moraru, 2009).

Bột gia vị được sử dụng rất rộng rãi trong thực phẩm với vai trò đóng góp mùi vị và màu sắc cho thực phẩm. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy các loại gia vị này thường bị nhiễm khuẩn với mức độ rất cao, có thể kể đến các loại như *Bacillus spp.*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* và các độc tố của *Aspergillus* (USFDA, 2002). Nguyên nhân của sự nhiễm khuẩn này là do điều kiện trồng trọt cũng như quá trình sản xuất, bảo quản, vận chuyển và phân phối kém vệ sinh. *Bacillus subtilis* là một trong những loại vi khuẩn thường gặp trong các loại gia vị dạng bột. Các loại gia vị này có mức độ nhiễm khuẩn thường xuyên lên tới khoảng 8 log CFU/g (McKee, 1995; Keith, 1998). *B. subtilis* có khả năng sinh bào tử và là loại

vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm, có thể gặp các loại như ói mửa, đau bụng và tiêu chảy. Hầu hết các nghiên cứu cho thấy liên quan đến xốt, hành ngâm, rau đậu đóng hộp và các loại bột (Gilbert *et al.*, 1981; Kramer *et al.*, 1982; Kramer & Gilbert, 1989). *B. subtilis* và bào tử của chúng có khả năng chống chịu rất tốt với một số công đoạn trong quá trình chế biến và có thể sống sót sau quá trình thanh trùng. Chính vì vậy, *B. subtilis* có thể được coi là một trong những loại vi khuẩn mục tiêu trong quá trình thanh trùng nhằm đảm bảo an toàn thực phẩm.

Xung ánh sáng cho hiệu quả tiêu diệt vi sinh vật rất cao trên các loại bề mặt, bao gói và gần đây được nghiên cứu nhiều trên thực phẩm (thịt, bánh mì, rau quả và trái cây) (Sauer & Moraru, 2009; Uesugi & Moraru, 2009) nhưng rất ít tài liệu đề cập đến tác dụng của phương pháp này trên các loại thực phẩm dạng hạt và dạng bột (Fine & Gervais, 2004). Những năm gần đây, một vài nghiên cứu (Keith *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 2003; Fine & Gervais, 2004; Staack *et al.*, 2008) hướng đến việc đánh giá khả năng khử nhiễm trên thực phẩm dạng bột bằng các kỹ thuật không sử dụng nhiệt. Keith *et al.* (1997) đã nghiên cứu hiệu quả khử nhiễm của xung điện trường (PEF) trên gia vị. Các tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số PEF (ví dụ như thời gian, số lượng xung, hình dạng xung) và phương pháp xử lý liên tiếp đến mức độ giảm mật số vi khuẩn trên húng quế, thì là và bột hành tây. Hiệu quả diệt khuẩn của tia hồng ngoại trên bột ớt cũng được nghiên cứu bởi Staack *et al.* (2008) và ở  $a_w$  0,8, hiệu quả khử khuẩn đạt được từ 1 – 2 log CFU/g với năng lượng xử lý là 11 và 5 kw/m<sup>2</sup>. Mặc dù vậy, các nghiên cứu liên quan tới khả năng khử nhiễm của xung ánh sáng trên thực phẩm dạng bột vẫn còn rất khiêm tốn. Mục đích của thí nghiệm này là đánh giá khả năng khử nhiễm của xung ánh sáng trên một số loại gia vị đã được gây nhiễm với *B. subtilis*.

## 2 PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Chủng *B. subtilis* (ATCC 6633, viện Pasteur, Pháp) được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh M17 (Merck, Đức) có bổ xung 0,5% glucose với điều kiện nuôi cấy khuấy đảo tự động (180 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C và thời gian 24 giờ. Tiếp theo, môi trường được ly tâm ở 10.000 g, 20 °C và thời gian 20 phút, sau đó pha loãng phần tế bào thu được vào dung dịch nước muối sinh lý 0,9% và điều chỉnh mật độ quang học (OD<sub>580nm</sub>) về 0,8. Sau đó, 10 ml dung dịch sẽ được xử lý bằng

xung ánh sáng (được đề cập trong mục 2.3). Một đơn vị log vi khuẩn là logarit của mật số vi khuẩn (cfu/mL hoặc cfu/g).

**2.2 Phương pháp gây nhiễm gia vị với B. subtilis**

Cho 3 g gia vị (tiểu hồi, tiêu đen và ớt đỏ) (Colin Palc, Pháp) vào 25 mL dung dịch huyền phù của *B. subtilis* (Pha cân bằng), hỗn hợp được khuấy đảo liên tục (180 vòng/phút) trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 30°C. Sau đó hỗn hợp được ly tâm ở điều kiện 10.000 g, 20 phút và 20°C. Tiếp theo, phần gia vị sau ly tâm được trải thành một lớp mỏng trên đĩa Petri và sấy khô trong thời gian 15 giờ ở điều kiện vô trùng và nghiền nhỏ bằng máy dập mẫu (Smasher AES, Pháp). Sau đó, nguyên liệu được xử lý bằng xung ánh sáng (được mô tả trong mục 2.3). Mẫu xử lý và mẫu đối chứng được pha loãng

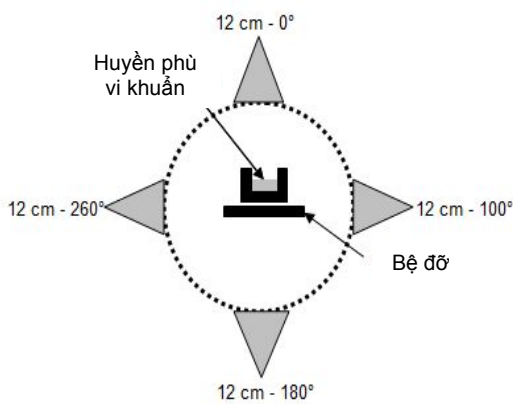
theo dãy thập phân bằng dung dịch muối sinh lý (Biokar Diagnostics, Pháp). Cuối cùng, dãy pha loãng thập phân được cấy trang trên bề mặt môi trường PCA (AES, Pháp) và đếm số khuẩn lạc đạt được sau khi ủ ở nhiệt độ 30 °C trong thời gian 24 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

**2.3 Phương pháp xử lý xung ánh sáng**

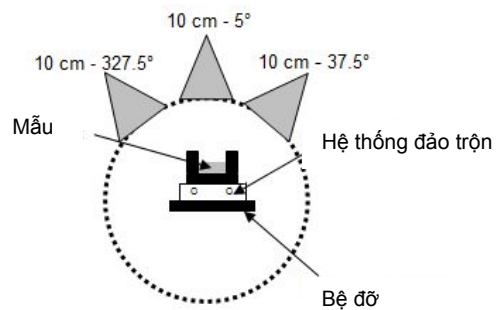
Thiết bị xử lý xung ánh sáng được cung cấp bởi Claranor (Pháp) gồm có 1 bộ phận tích điện và 1 buồng xử lý, trong đó có 4 đèn xenon dạng hình trụ (Massier *et al.*, 2011). Thiết bị thí nghiệm này tạo ra một loạt các xung ánh sáng có bước sóng từ 200 đến 1100 nm và thời gian của mỗi xung là 300 μs. Trong thí nghiệm này, cường độ năng lượng sử dụng để xử lý huyền phù vi khuẩn là 0.6 J.cm<sup>-2</sup>/xung và gia vị là 1 J.cm<sup>-2</sup>/xung.

**Bảng 1: Điều kiện xử lý theo cấu hình của thiết bị**

Số lượng xung	Điện áp (V)	Khoảng cách từ đèn tới mẫu (cm)	Cường độ năng lượng đạt được (J.cm <sup>-2</sup> )	Cấu hình của thiết bị
1	3000	12	0.6	4 đèn
		10	1	3 đèn
2	3000	12	1.2	4 đèn
		10	2	3 đèn
4	3000	12	2.4	4 đèn
		10	4	3 đèn
6	3000	12	3.6	4 đèn
		10	6	3 đèn
8	3000	12	4.8	4 đèn
		10	8	3 đèn
10	3000	12	6	4 đèn
		10	10	3 đèn



(a)



(b)

**Hình 1: Sơ đồ minh họa buồng xử lý xung ánh sáng (Claranor): (a) cấu hình 4 đèn sử dụng cho huyền phù vi sinh vật và (b) cấu hình 3 đèn sử dụng cho bột gia vị**

Huyền phù vi khuẩn được đựng trong một hộp hình chữ nhật bằng thạch anh và được xử lý ở 3000

V, 1 Hz với 1, 2, 4, 6, 8, 10 xung có cấu hình 4 đèn và cường độ năng lượng sử dụng là 0.6 J.cm<sup>-2</sup>/xung

(Hình 1a và Bảng 1). Trường hợp của gia vị được gây nhiễm nhân tạo với *B. subtilis*, thì mẫu được xử lý trong điều kiện đảo trộn ở 3000 V, 1 Hz và 10 xung với cùng thiết bị như trên nhưng có cấu hình 3 đèn để đạt được cường độ năng lượng là 1 J.cm<sup>-2</sup>/xung (Hình 1b và Bảng 1). Sau khi được xử lý, tất cả các mẫu sẽ được phân tích ngay lập tức. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

#### 2.4 Phương pháp trích ly ADN

ADN của tế bào *B. subtilis* được trích ly theo phương pháp được sử dụng trong phòng thí nghiệm LMSM (Laboratoire Microbiologique Signaux et Microenvironnement). Tế bào thu được sau khi ly tâm huyền phù vi khuẩn ở điều kiện 10.000 g, 20°C, 20 min được cho vào ống eppendorf cùng với 2 x 650 µL dung dịch đệm P1 (10 mM tris base [pH 8], 2 mM EDTA, RNase I 100 µg/mL) và lysozyme (5 mg/mL), sau đó mẫu được ủ ở 37°C. Sau khi ủ 5 – 10 phút, mẫu được thêm vào 25 µL proteinase K (20 mg/mL) và 50 µL dung dịch SDS 10%, tiếp theo mẫu được ủ ở 60°C trong thời gian 45 phút. Sau khi ủ, hỗn hợp được thêm vào 625 µL phenol bão hòa và ly tâm ở 13.000 g, 20°C trong thời gian 10 phút. Phần trong phía trên được thu giữ và cho vào ống eppendorf mới cùng với 625 µL of phenol-chloroform, hỗn hợp được trộn đều và ly tâm ở 13.000 g, 20°C trong thời gian 10 phút, phần trong phía trên được thu nhận và cho vào một eppendorf mới cùng với 625 µL chloroform, hỗn hợp được trộn đều và ly tâm ở 13.000 g, 20°C trong thời gian 10 phút, phần trong phía trên được thu nhận và cho vào một eppendorf mới. Tiếp theo, isopropanol được cho thêm vào và trộn đảo đều nhẹ nhàng giúp cho các sợi ADN kết hợp lại với nhau tạo thành một mảng màu trắng. Dùng pipet thủy tinh vớt mảng ADN cho vào một eppendorf mới và sấy khô ở nhiệt độ phòng, sau đó ADN được hoà tan trong 50 – 100 µL dung dịch đệm TE (10 mM tris base, pH 7,5; 1mM EDTA). Sau khi trích ly, hàm lượng ADN (µg/mL) được xác định bằng thiết bị quang phổ ở bước sóng 260 nm và 280 nm, để phục vụ cho việc tính toán lượng ADN cần thiết cho phương pháp điện di một chiều trên gel agar (0,8%) với cường độ dòng điện 90V, thời gian 1 giờ trong môi trường TAE 1X (0,04 M tris base, 0,196 mM acid acetic, 1 mM EDTA). Tiếp theo, gel được nhuộm màu trong dung dịch BET, thời gian 15 phút và cuối cùng hình ảnh của gel điện di được chụp bằng thiết bị sử dụng tia UV và điều khiển bằng máy tính.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

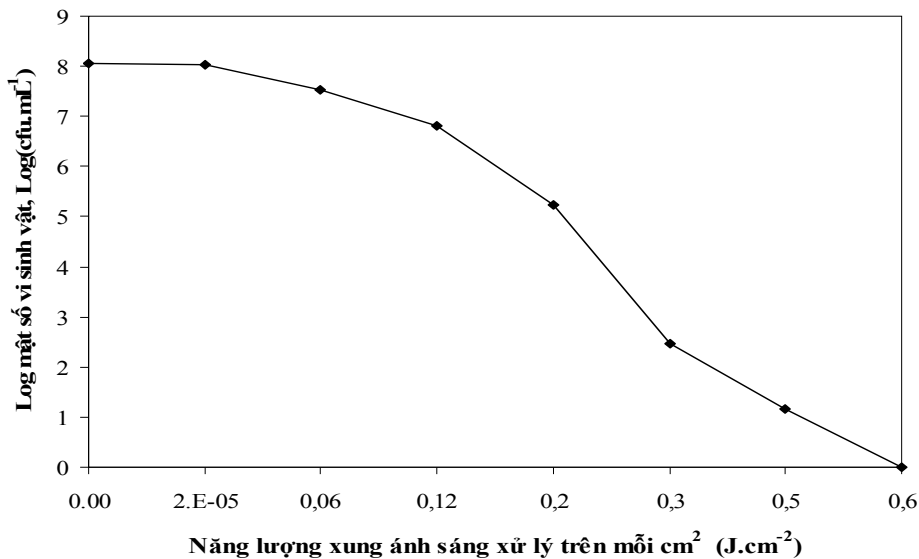
#### 3.1 Hiệu quả xử lý huyền phù *B. subtilis* của xung ánh sáng

Thí nghiệm đầu tiên được thực hiện nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của số lượng xung ánh sáng trên huyền phù của vi khuẩn *B. subtilis* ở giai đoạn phát triển ổn định. Kết quả thí nghiệm (Hình 2) cho thấy chỉ cần xử lý một xung (0,6 J.cm<sup>-2</sup>) đã đủ tiêu diệt hoàn toàn 8 log vi khuẩn *B. subtilis*. Kết quả thí nghiệm này hoàn toàn trùng khớp với kết quả nghiên cứu của Feuilletoy *et al.* (2006), chỉ cần xử lý một xung đã tiêu diệt hoàn toàn 6 log vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Với 5 giây xử lý bằng xung ánh sáng, Krishnamurthy *et al.* (2004) có thể tiêu diệt được trên 8 log vi khuẩn *Staphylococcus aureus* trong môi trường đệm phốt phát. Một điều cần lưu ý là huyền phù vi khuẩn trong phạm vi thí nghiệm này được pha trong môi trường nước muối sinh lý (0,9%), đây là môi trường gần như trong suốt đối với phổ ánh sáng kể cả những tia ánh sáng thấy được và các tia tử ngoại, có nghĩa là sự hấp thụ tia UV của dung dịch nước muối sinh lý rất thấp, tạo điều kiện cho các tia này có cơ hội tiếp xúc với vi khuẩn cao hơn. Điều đó dẫn đến hiệu quả khử khuẩn cao của phương pháp xử lý này (Oms-Oliu *et al.*, 2010).

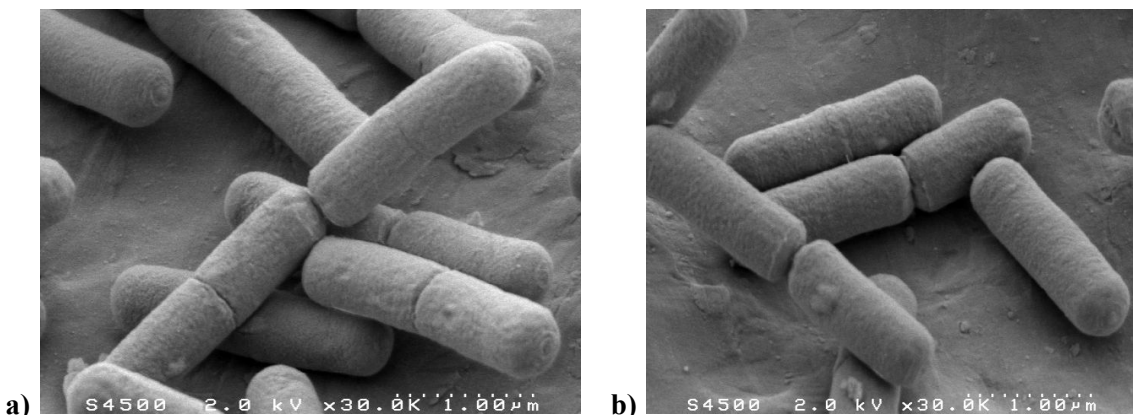
Để bổ sung cho kết quả trên, thí nghiệm nghiên cứu tác động của xung ánh sáng trên hình dạng bên ngoài của tế bào *B. subtilis* được thực hiện với phương pháp quét ảnh bằng kính hiển vi điện tử (scanning electron microscopy, SEM). Hình 3a và 3b cho thấy xung ánh sáng không có ảnh hưởng đến hình dáng bên ngoài của tế bào *B. subtilis* ngay cả với mức xử lý năng lượng xung ánh sáng 6 J.cm<sup>-2</sup> (10 xung). Thật sự, hình dáng bên ngoài của tế bào vi khuẩn hoàn toàn không có sự thay đổi trước và sau khi xử lý (6 J.cm<sup>-2</sup>), điều đó cho thấy với các điều kiện xử lý trong thí nghiệm này thì mặc dù xung ánh sáng tiêu diệt rất tốt vi khuẩn *B. subtilis* dạng huyền phù, nhưng nó không gây ra sự phá vỡ hay thay đổi hình dạng bên ngoài của tế bào đã xử lý. Kết quả thí nghiệm này trái ngược với một số kết quả thí nghiệm đã được công bố trước đây trên tế bào nấm men. Cho tới nay, chưa có một báo cáo nào liên quan tới tác động của xung ánh sáng trên vách tế bào *B. subtilis* ở dạng huyền phù. Thật vậy, Takeshita *et al.* (2003) nhận thấy có sự thay đổi cấu trúc của tế bào *Saccharomyces cerevisiae* ở dạng huyền phù khi xử lý với 2 và 3 xung (ở cường độ 0.7 J.cm<sup>-2</sup>/xung). Sự thay đổi này ở các tế bào sau xử lý bao gồm sự gia tăng kích

thước của không bào, sự biến dạng màng tế bào và sự thay đổi một số hình dạng khác. Bằng nhiều phương pháp khác nhau, Farrell *et al.* (2011) đã nghiên cứu tác động của xung ánh sáng đến màng tế bào nấm men. Các tác giả này nhận thấy tia UV làm thay đổi tính thấm thấu của màng tế bào và làm giảm đáng kể số lượng tế bào sống sót sau khi xử lý. Sau khi xử lý ở cường độ 90 và 100 xung (tương đương với mức năng lượng xử lý UV trên mỗi  $\text{cm}^2$  là 2,4 và 4,1 J.) thì 90 và 99% tế bào nấm men bị xử lý bắt màu với thuốc nhuộm PI (Propidium Iodide), điều đó cho thấy tính thấm thấu của màng tế bào bị ảnh hưởng đáng kể, có

nghĩa là màng tế bào nấm men không còn toàn vẹn sau quá trình xử lý xung ánh sáng. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng kết quả thí nghiệm này được thực hiện trên tế bào *B. subtilis*, được biết đến như một loại vi khuẩn có khả năng chống chịu với xung ánh sáng tốt hơn so với nấm men (*S. cerevisiae*). Thật vậy, tế bào nấm men chỉ được bảo vệ bởi một lớp màng mỏng, trong khi đó lớp màng bảo vệ của tế bào vi khuẩn rất dày và chắc chắn. Một giả thuyết khác có thể được dùng để giải thích cho kết quả thí nghiệm của chúng tôi là sự hư hại ADN có thể là nguyên nhân dẫn đến sự tiêu diệt vi khuẩn bởi xử lý xung ánh sáng.



Hình 2: Tác dụng khử khuẩn của xung ánh sáng trên huyền phù tế bào *B. subtilis*

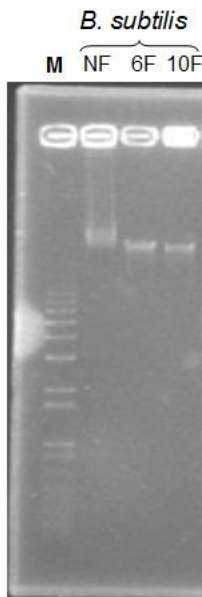


Hình 3: Ảnh tế bào *B. subtilis* : a) mẫu đối chứng; b) mẫu xử lý ở 3 000V, 1Hz, 10 xung ( $0.6 \text{ J.cm}^{-2}/\text{xung}$ )

Thí nghiệm tiếp theo được thực hiện để đánh giá tác động của xung ánh sáng đến ADN của vi

khẩn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Hình 3, kết quả này cho thấy phương pháp xử lý

xung ánh sáng đã ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của ADN trên gel agar. Thật vậy, ADN được trích ly từ tế bào đã xử lý bằng xung ánh sáng dịch chuyển xa hơn so với ADN được trích ly từ tế bào của mẫu đối chứng. Điều này cho thấy đã có sự thay đổi trong cấu trúc ADN của các tế bào được xử lý bằng xung ánh sáng. Sự thay đổi này có thể là sự gãy đoạn của các sợi ADN, giả thuyết này phù hợp với kết luận của (Giese & Darby, 2000; Takeshita *et al.*, 2003), các tác giả này cho rằng tia cực tím là nguyên nhân gây ra các thay đổi hoá học và gãy vỡ trong cấu tạo của ADN. Theo Krishnamurthy (2006) thì ADN hấp thụ năng lượng chủ yếu ở bước sóng khoảng 254 nm, đây là khoảng bước sóng chính của tia UVC và cũng là tác nhân chính gây ra những thay đổi hoá học trong cấu trúc của ADN. Tóm lại, kết quả thí nghiệm này cho thấy phương pháp xử lý xung ánh sáng đã gây ra những thay đổi trong cấu trúc ADN của tế bào *B. subtilis*, đây chính là tác dụng chính của phương pháp xử lý xung ánh sáng.

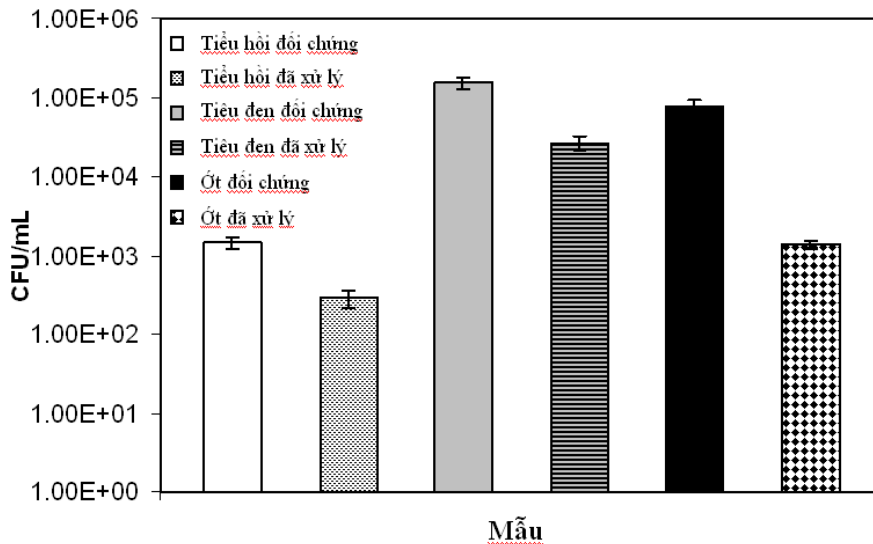


**Hình 4: Ảnh hưởng của xử lý xung ánh sáng trên tốc độ di chuyển của ADN tế bào *B. subtilis* (M-marker; NF - Không xử lý; 6F – mẫu xử lý 6 xung và 10F – mẫu xử lý 10 xung)**

### 3.2 Hiệu quả xử lý của xung ánh sáng trên gia vị được gây nhiễm bởi *B. subtilis*

Hiệu quả diệt khuẩn của xung ánh sáng trên gia vị được gây nhiễm nhân tạo với *B. subtilis*

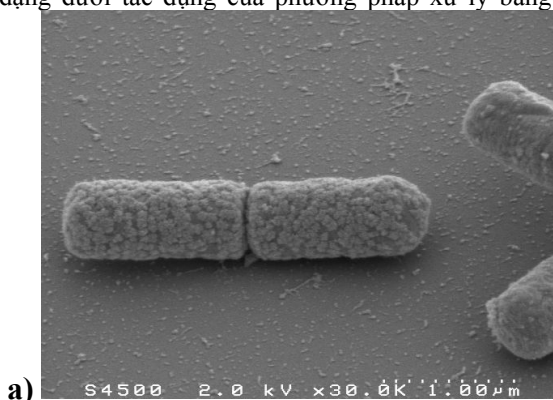
được thể hiện trong Hình 5. Mức độ khử nhiễm của xung ánh sáng khác nhau đáng kể giữa các loại gia vị thí nghiệm điều này có thể được giải thích bởi mỗi loại gia vị có các chất ức chế khác nhau, chính các chất này đã ảnh hưởng đến khả năng gây nhiễm của vi khuẩn *B. subtilis* lên gia vị cũng như khả năng khử khuẩn của xung ánh sáng (Arora & Kaur, 1999; Indu *et al.*, 2006). Kết quả thí nghiệm (Hình 5) cho thấy với cường độ năng lượng  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  ( $1 \text{ J.cm}^{-2} \times 10$  xung), thì xung ánh sáng tiêu diệt được 0,8 log vi khuẩn trên mẫu tiêu hồi và tiêu đen và đạt được trên 1 log vi khuẩn đối với bột ớt đỏ. Kết quả này không đồng nhất với một số nghiên cứu trước đây (Bialka & Demirci, 2008; Wekhof, 2003). Tuy nhiên, điều này có thể được giải thích bởi giới hạn nghiên cứu này, cường độ năng lượng sử dụng tối đa chỉ đạt  $10 \text{ J.cm}^{-2}$ , với cường độ năng lượng này thì mức độ khử khuẩn đạt được (khoảng 1 log) là đã đạt yêu cầu. Thật vậy, một số nghiên cứu (Keith *et al.*, 1997) đánh giá khả năng khử nhiễm của trường điện từ (PEF) (100 xung với năng lượng 80 kV/cm) trên bột gia vị (húng quế, thì là và hành tây) và kết quả đạt được là dưới 3 log vi khuẩn. Mức độ khử khuẩn thấp của xung ánh sáng trên bột gia vị có thể được giải thích bởi khả năng tiếp xúc thấp của vi khuẩn với ánh sáng, đặc biệt là tia cực tím. Thật vậy, những vi khuẩn nằm ở lớp trên sẽ tiếp xúc với ánh sáng và bị tiêu diệt, và chính những vi khuẩn này sẽ cản trở sự tiếp xúc của ánh sáng với phần còn lại của mẫu. Lý thuyết này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Gómez-López *et al.* (2007), các nhà nghiên cứu này cho rằng khả năng tạo độ che khuất của vi sinh vật càng cao khi các vi sinh vật này hấp thụ ánh sáng mạnh. Điều này làm cho các vi sinh vật nằm ở lớp dưới rất khó bị tiêu diệt và ngược lại với các vi sinh vật nằm ở lớp trên. Hơn nữa, để tiêu diệt được vi sinh vật thì photon và vi sinh vật phải tiếp xúc với nhau trong quá trình xử lý. Do đó, các vật thể nằm giữa nguồn sáng và vi sinh vật sẽ hấp thụ các photon và nó sẽ hạn chế tác dụng khử khuẩn của phương pháp này. Hơn nữa, hạn chế này sẽ rất khác nhau giữa các mẫu thực phẩm dạng rắn, dạng lỏng hay huyền phù vi sinh vật. Thật vậy, để đạt được hiệu quả diệt khuẩn cao khi xử lý thực phẩm dạng bột ví dụ như gia vị, thì đòi hỏi phải có một giải pháp kỹ thuật hợp lý như thiết kế thiết bị xử lý xung ánh sáng kết hợp với đảo trộn thực phẩm trong quá trình xử lý (Gardner & Shama, 2000).



**Hình 5: Hiệu quả diệt khuẩn của xung ánh sáng trên gia vị được gây nhiễm với *B. subtilis***

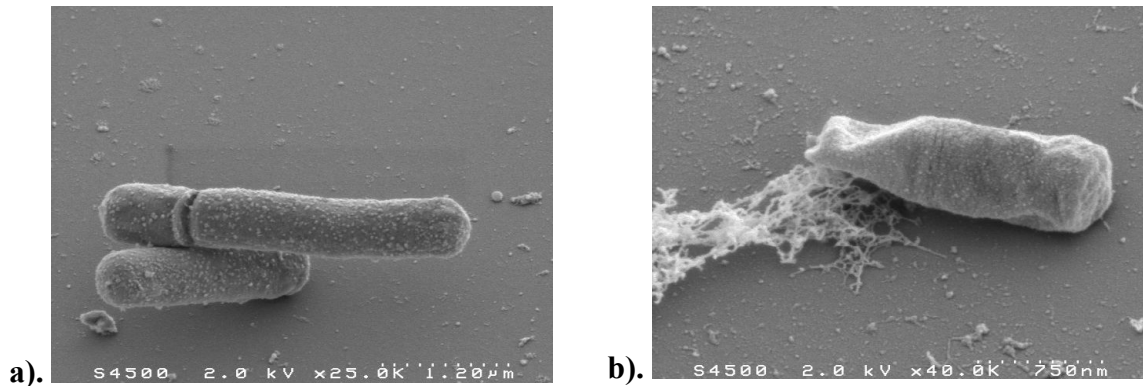
Tiếp theo, tác động của xung ánh sáng trên tế bào *B. subtilis* gây nhiễm trên gia vị được đánh giá qua hình ảnh chụp được bằng kính hiển vi điện tử. Hình 6a, 6b, 7a và 7b cho thấy kết quả trái ngược với việc xử lý tế bào trong huyền phù, hình dạng bên ngoài của tế bào vi khuẩn được xử lý ở trạng thái khô bị thay đổi rõ ràng trong quá trình xử lý xung ánh sáng. Sự nóng lên quá mức của tế bào (June *et al.*, 2003) đã gây ra các vết nứt trên màng tế bào (Hình 6b). Hình ảnh tế bào vi khuẩn *B. subtilis* được thể hiện trong hình 6b và 7b hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của Wekhof (2001) và Sonenshein (2003). Những tác giả này thấy rằng bào tử *B. subtilis* bị phá hủy hoặc biến dạng dưới tác dụng của phương pháp xử lý bằng

xung ánh sáng. Một số nhà nghiên cứu cho rằng nguyên nhân chính gây phá hủy tế bào vi sinh vật khi xử lý bằng xung ánh sáng là do hiện tượng quang hóa gây ra do tác dụng của tia cực tím (Wekhof, 2000; Wekhof, 2001). Theo tài liệu tham khảo, có giả thuyết cho rằng xung ánh sáng cũng gây ra tác dụng nhiệt lên tế bào vi sinh vật trong trường hợp sử dụng nguồn năng lượng cao và thời gian dài. Điều này gây ra sự bốc hơi nước của tế bào và tạo thành những dòng hơi nước nhỏ, làm cho màng tế bào bị phá hủy (Takeshita *et al.*, 2003). Đồng quan điểm, Wekhof (2000) cho rằng cơ chế tiêu diệt vi sinh vật của xung ánh sáng bao gồm cả hai tác động quang hóa và quang nhiệt.



**Hình 6: Hình ảnh tế bào *B. subtilis* trên bột tiêu đen**

**a) mẫu không xử lý; b) mẫu xử lý ở 10 xung (1 J.cm<sup>2</sup>/xung)**



**Hình 7: Hình ảnh tế bào *B. subtilis* trên tiểu hồi**

**a) mẫu không xử lý; b) mẫu xử lý ở 10 xung (1 J.cm<sup>-2</sup>/xung)**

#### 4 KẾT LUẬN

Thí nghiệm này được thực hiện nhằm mục đích so sánh hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng trên tế bào *B. subtilis* dạng huyền phù và gây nhiễm trên bột gia vị. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đối với huyền phù vi khuẩn, chỉ cần 1 xung (0,6 J.cm<sup>-2</sup>) đã đủ để tiêu diệt toàn bộ 8 log tế bào *B. subtilis*. Ngược lại, ở điều kiện gây nhiễm trên bột gia vị, với cường độ 10 J.cm<sup>-2</sup> (10 xung), phương pháp này chỉ tiêu diệt được trên dưới 1 log tế bào vi khuẩn. Qua quan sát trên hình SEM, hình dạng của tế bào *B. subtilis* trong bột gia vị bị biến dạng và phá vỡ bởi xử lý xung ánh sáng. Ngược lại, đối với huyền phù vi khuẩn thì không có hiện tượng này mặc dù toàn bộ tế bào đã bị tiêu diệt.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng phong phú của công nghệ xử lý xung ánh sáng trong việc tiêu diệt vi sinh vật trong huyền phù và cả trong thực phẩm dạng bột. Điều này đưa đến nhiều hứa hẹn cho việc sử dụng xung ánh sáng thay thế cho phương pháp vô hoạt vi sinh vật bằng nhiệt hiện nay. Tuy nhiên, đối với bột gia vị, để tăng hiệu quả của phương pháp này, thì thiết bị cần phải được nghiên cứu và phát triển hơn trong tương lai nhằm tăng khả năng tiếp xúc của gia vị với nguồn sáng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arora, D. S. and Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 257–262.
2. Barbosa-Canovas, G. V., Gongora-Nieto, M. M., and Swanson, B. G. (1998). Nonthermal electrical methods in food preservation. *Food Science and Technology International*, 4, 363–370.
3. Bialka, K. L., and Demirci, A. (2008). Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on raspberries and strawberries. *Journal of Food Science*, 73, 201–207.
4. Dunn, J., Clark, R., and Ott, T. (1995). Pulsed-light treatment of food and packaging, *Food Technology*, 49, 95–98.
5. Farrell, H., Hayes, J., Laffey, J., and Rowan, N. (2011). Studies on the relationship between pulsed UV light irradiation and the simultaneous occurrence of molecular and cellular damage in clinically-relevant *Candida albicans*. *Journal of Microbiological methods*, 84, 317–326.
6. Feuilleley, M. G. R., Bourdet, G. and Orange, N. (2006). Effect of white pulsed light on *Pseudomonas aeruginosa* culturability and its endotoxin when present in ampoules for injectables. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Science*, 11, 9–14.
7. Fine, F., and Gervais, P. (2004). Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67, 787–792.
8. Gardner, D. W. M., and Shama, G. (2000). Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. *Journal of Food Protection*, 63, 63–70.
9. Giese, N., and Darby, J. (2000). Sensitivity of microorganisms to different wavelengths of UV light: implications on modeling of



- medium pressure UV system. *Water Research*, 34, 4007–4013.
10. Gilbert, R. J., Turnbull, P. C. B., Parry, J. M., and Kramer, J. M. (1981). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: their part in food poisoning and other clinical infections. In: R. C. W. Berkeley, M. Goodfellow (Ed.) *The aerobic endospore-forming bacteria; classification and identification*. Academic Press, London, pp. 297-314.
  11. Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., and Devlieghere, F. (2007) Pulsed light for food decontamination: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 464–473.
  12. Gould, G. (1964). Gas sterilization of packaged, dried ingredients. *Food Processing*, 25, 97–106.
  13. Grahl, T., and Markl, H. (1996). Killing microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 148–157.
  14. Indu, M. N., Hatha, A. A. M., Abirosh, C., Harsha, U., and Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 153–158.
  15. Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., and Geiser, D. (2003). Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38: 883–888.
  16. Keith, W. D., Harris, L. J., Hudson, L., and Griffiths, M. W. (1997). Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spices. *Food Research International*, 30, 185–191.
  17. Keith, W. D. (1998). Microbial reduction in flour and spice using pulsed electric fields (pp. 22-24). PhD thesis. University of Guelph, Canada.
  18. Kramer, J. M., Turnbull, P. C. B., Munshi, G., and Gilbert, R. J. (1982). Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In: J. E. L. Corry et al. (Ed.) *Isolation and identification methods for food poisoning organisms*. Academic Press, London, pp. 261-286.
  19. Kramer, J. M., and Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In M. P. Doyle (Ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 21–70.
  20. Krishnamurthy, K., Demirci, A., and Irudayaraj, J. (2004). Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light treatment. *Journal of Food Protection*, 67, 1027–1030.
  21. Krishnamurthy, K. (2006). Decontamination of milk and water by pulsed UV-light and infrared heating (pp. 84-85). PhD thesis (in English). Pennsylvania State University, USA.
  22. Massier, S., Rincé, A., Maillot, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N. and Chevalier, S. (2011). Adaptation *Pseudomonas aeruginosa* to a pulsed light induced stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 502–5011.
  23. McKee, L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 1–11.
  24. Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O., and Soliva-Fortuny, R. (2010) Pulsed Light Treatments for Food Preservation. A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 13–23.
  25. Sauer, A., and Moraru, C. I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection*, 72, 937–944.
  26. Sonenshein, A. L. (2003). Killing of *Bacillus* spores by high-intensity ultraviolet light. In *Sterilization and decontamination using high-energy light*. Xenon Corporation, Woburn, Mass., pp. 15–19.
  27. Staack, N., Ahmé, L., Borch, E., and Knorr, D. (2008). Effect of infrared heating on quality and microbial decontamination in paprika powder. *Journal of Food Engineering*, 86, 17–24.
  28. Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K., and Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 151–158.

29. Uesugi, A. R., and Moraru, C. I. (2009). Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *Journal of Food Protection*, 72, 347–353.
30. USFDA (U.S. Food and Drug Administration) (2002). Enforcement report, recalls, and field corrections: foods–class I. [www.fda.gov/bbs/topics/enforce/2002/enf00762.html](http://www.fda.gov/bbs/topics/enforce/2002/enf00762.html). Accessed May 2008.
31. Vajdi, M., and Pereira, R. R. (1973). Comparative effects of ethylene oxide, gamma irradiation and microwave treatments on selected spices. *Journal of Food Science*, 38, 893–895.
32. Wekhof, A. (2000). Desinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 264–276.
33. Wekhof, A. (2001). Pulsed UV disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. The First International Conference on Ultraviolet Technologies, 14 – 16 June, Washington D.C., USA.
34. Wekhof, A. (2003). Sterilisation of packaged pharmaceutical solutions, packaging and surgical tools with pulsed light. The 2nd International Congress on Ultraviolet Technologies, 9 – 11 July, Vienna, Austria.
35. Woodling, S. E., and Moraru, C. I. (2006). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Protection*, 70, 909–916.