



HIỆU QUẢ TIÊU DIỆT BÀO TỬ *Bacillus subtilis* DẠNG HUYỀN PHÙ VÀ DẠNG KHÔ BẰNG XUNG ÁNH SÁNG

Nguyễn Bảo Lộc¹, Nicorescu Irina² và Orange Nicole²

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 22/04/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

Pulsed light efficacy on the decontamination of bacillus subtilis spores in liquid and dry state

Từ khóa:

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

Keywords

Pulsed light, spices, decontamination, *Bacillus subtilis* spore

ABSTRACT

In this work, pulsed light (PL) efficacy was investigated on *B. subtilis* spores in liquid and dry state (glass marbles and spices). We studied the bacterial suspension in conditions (0.6 J.cm²/flash) and spices at 1 J.cm²/flash. In liquid state, only 0.9 log microbial reduction was recorded when 6 J.cm² was applied. SEM analysis showed that *B. subtilis* spores in suspension were not affected by the PL treatment. When DNA extracted from *B. subtilis* spores was analyzed, no significant difference was found between the control and PL-treated samples. In dry state the destruction level remained below 1 log when a treatment of 10 J.cm² was carried out on black pepper and ground caraway, while a 2.8 log microbial reduction was reached for glass marbles. When control and PL-treated *B. subtilis* spores in dry state were investigated by SEM, no disruption in spore structure was recorded but a significant number of PL-treated spores were flattened.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hiệu quả diệt khuẩn của xung ánh sáng được đánh giá trên bào tử *Bacillus subtilis* dạng huyền phù và dạng khô (bào tử vi khuẩn được gây nhiễm trên bi thủy tinh và gia vị). Nghiên cứu được thực hiện với cường độ 0,6 J.cm²/xung trên huyền phù vi sinh vật, và trên gia vị với cường độ 1 J.cm²/xung. Ở dạng huyền phù, với cường độ 6 J.cm² chỉ tiêu diệt được 0,9 log bào tử vi khuẩn. Hình ảnh phân tích bằng kính hiển vi điện tử (SEM) cho thấy bào tử *B. subtilis* ở dạng huyền phù không bị ảnh hưởng bởi xử lý xung ánh sáng. Qua phân tích ADN trích ly từ bào tử *B. subtilis*, không nhận thấy sự khác biệt ý nghĩa giữa mẫu xử lý và mẫu đối chứng. Ở dạng khô, mức độ tiêu diệt bào tử *B. subtilis* đạt được dưới 1 log khi xử lý ở cường độ 10 J.cm² trên hạt tiêu và tiêu hồi, trong khi trên bi thủy tinh thì mức độ này đạt tới 2,8 log. Khi phân tích hình ảnh bào tử *B. subtilis* dạng khô của mẫu đối chứng và mẫu xử lý bằng xung ánh sáng qua kính hiển vi điện tử, các bào tử đều không bị phá vỡ bởi xung ánh sáng, tuy nhiên có một số lượng đáng kể bào tử bị thay đổi hình dạng được phát hiện trong mẫu đã xử lý bằng xung ánh sáng.

1 GIỚI THIỆU

Xung ánh sáng là một kỹ thuật xử lý không dùng nhiệt với khả năng xuyên thấu rất thấp, đang được ứng dụng rất nhiều trong việc khử nhiễm bề mặt. Phương pháp này sử dụng đèn xenon phát ra ánh sáng trắng (có bước sóng trong khoảng 200 nm – 1100 nm) với cường độ cao (Wekhof, 2000). Khả năng khử nhiễm của phương pháp này chủ yếu là do tia cực tím (200 nm – 400 nm), tạo nên sự huỷ hoại ADN của tế bào vi sinh vật. Bên cạnh đó cũng có một số cơ chế khác được đề cập đến, ví dụ như sự phá vỡ màng tế bào và khả năng làm tăng kích thước không bào đã được nghiên cứu trên tế bào nấm men (Takeshita *et al.*, 2003).

Xung ánh sáng đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trên các vật liệu làm bao gói (Dunn *et al.*, 1995; Turtoi and Nicolau, 2007, Levy *et al.*, 2011, 2012), các thiết bị dùng trong công nghiệp (Ozen and Floros, 2001; Rajkovic *et al.*, 2010) và trên thực phẩm (Gomez-Lopez *et al.*, 2005; Ozer and Demirci, 2006; Sharma and Demirci, 2003; Ramos-Villaruel *et al.*, 2012; Palgan *et al.*, 2011).

Đã có nhiều nghiên cứu về hiệu quả tác động của xung ánh sáng trên tế bào vi khuẩn (Feuilleux *et al.*, 2006; Massier *et al.*, 2011; Farrell *et al.*, 2011; Nicorescu *et al.*, 2013). Tuy nhiên, chỉ có một vài nghiên cứu (Fine and Gervais, 2005; Levy *et al.*, 2011; 2012) đánh giá khả năng tiêu diệt bào tử của xung ánh sáng trong lĩnh vực an toàn thực phẩm.

Một trong những loại bào tử vi khuẩn thường gặp nhất trong các loại gia vị là bào tử của *B. subtilis*, với mức độ nhiễm thường xuyên lên tới 8 log cfu/g (McKee, 1995; Keith, 1998). Đây là loại vi khuẩn gây một số loại ngộ độc thực phẩm, có thể kể đến như ói mửa, tiêu chảy, đau bụng. Hầu hết các báo cáo đưa ra đều liên quan đến việc tiêu thụ mayonnaise, hành ngâm, rau đậu đóng hộp (Kramer and Gilbert, 1989). Khả năng chống chịu của bào tử *B. subtilis* trong quá trình chế biến thực phẩm là rất tốt, điều này có thể giúp chúng tồn tại sau quá trình thanh trùng. Thực sự, để ức chế bào tử vi khuẩn bằng nhiệt, tia cực tím, các loại chiếu xạ và xung ánh sáng thì cần phải sử dụng cường độ cao hơn so với tế bào sinh dưỡng (Farkas, 2007). Hơn nữa, bào tử nấm mốc, ví dụ như bào tử *A. niger*, được biết với khả năng chống chịu rất tốt với tia cực tím. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích so sánh hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng trên bào tử *B. subtilis* dạng huyền phù và dạng khô (gây nhiễm trên bi thủy tinh và gia vị).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chủng vi khuẩn

Bào tử *B. subtilis* (ATCC 31 324, DSMZ 704, Braunschweig, Đức) cung cấp bởi INRA Dijon, được pha loãng trong môi trường peptone (PS) (Biokar Diagnostics, Pháp) đến nồng độ 10^8 bào tử/mL. 10 mL dung dịch vừa pha loãng được xử lý bằng xung ánh sáng (được mô tả trong mục 2.3). Một đơn vị log bào tử vi khuẩn là logarit của mật số bào tử vi khuẩn (cfu/mL hoặc cfu/g).

2.2 Phương pháp gây nhiễm nhân tạo gia vị và bi thủy tinh với bào tử *B. subtilis*

Bi thủy tinh (đường kính 4 mm), hạt tiêu đen và tiêu hồi được gây nhiễm với dung dịch bào tử *B. subtilis* (được mô tả trong mục 2.1). Mẫu được sấy khô trong điều kiện vô trùng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 15 giờ, tiếp theo, mẫu được xử lý bằng xung ánh sáng (được mô tả trong mục 2.3). Mẫu xử lý và đối chứng được hoà tan trong môi trường PS và khuấy trộn trong thời gian 2 phút. Phương pháp pha loãng theo dãy thập phân được sử dụng để cấy trang trên bề mặt môi trường Columbia-agar (AES, Pháp). Phương pháp đếm khuẩn lạc (cfu) được thực hiện để đánh giá khả năng sống sót của bào tử *B. subtilis* sau khi xử lý với xung ánh sáng so với mẫu đối chứng.

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 μ s. Trong thí nghiệm này, cường độ năng lượng sử dụng để xử lý huyền phù bào tử là 0,6 J.cm⁻²/xung và gia vị là 1 J.cm⁻²/xung.

Huyền phù của bào tử *B. subtilis* 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 năng lượng sử dụng là 0,6 J.cm⁻²/xung. Trường hợp của gia vị và bi thủy tinh được gây nhiễm nhân tạo với bào tử *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⁻²/xung. Sau khi được xử lý, thì mẫu đối chứng và mẫu được xử lý sẽ được phân tích ngay lập tức. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại.

2.4 Phương pháp trích ly ADN của bào tử *B. subtilis*

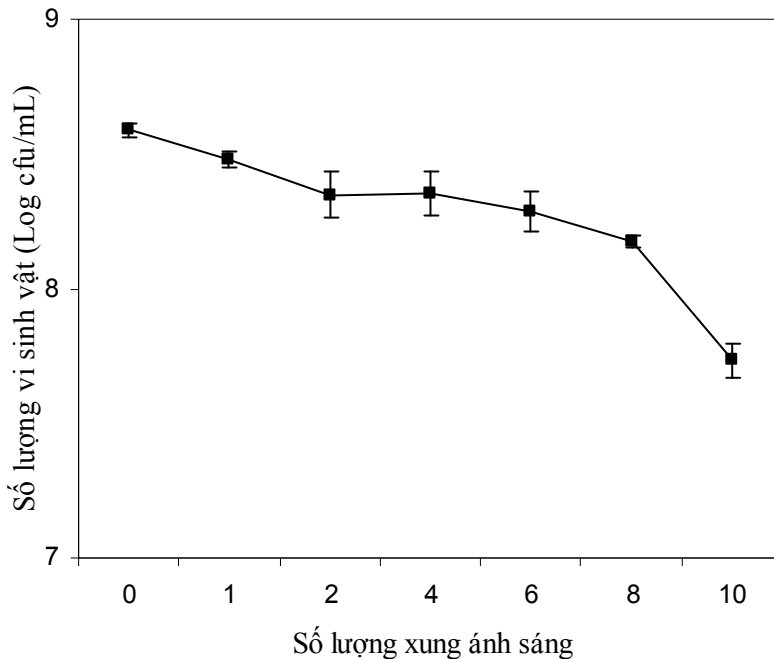
ADN của bào tử *B. subtilis* được trích ly dựa theo phương pháp của Riesenman and Nicholson (2000) với một số thay đổi. 0,02 g bột bào tử (khoảng 10^{10} bào tử/g) được cho vào ống eppendorf cùng với 2 mL dung dịch SE (50 mM tris base [pH 10], 8 M urea, 50 mM dithiothreitol, 1% SDS) và được ủ ở 60°C trong thời gian 90 phút. Tiếp theo là giai đoạn xử lý sốc nhiệt (3 lần) liên tiếp từ -80°C rồi 100°C và tiếp theo dung dịch được ly tâm ở 7000g trong thời gian 10 phút ở 20°C để thu được phần cặn tế bào. Phần cặn tế bào này tiếp theo được rửa 3 lần với dung dịch STE (pH 8) (10 mM tris HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Giai đoạn thủy phân bằng enzyme được thực hiện bằng cách bổ sung thêm dung dịch đệm P1 (10 mM tris base [pH 8], 2 mM EDTA, RNase I $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và lysozyme (10 mg/mL), sau đó mẫu được ủ ở 37°C . Sau 1 giờ ủ, mẫu được thêm vào 100 μL SDS 10% và trộn đảo ngược nhiều lần (đến khi hỗn hợp trở nên mờ đục). Sau đó hỗn hợp được rửa với 625 μL dung dịch phenol-chloroform và ly tâm ở 13000g, 20°C trong thời gian 10 phút. Tiếp theo hỗn hợp được thêm vào 625 μL phenol bão hòa và ly tâm ở 13000g, 20°C trong thời gian 10 phút. Các bước tiếp theo của phương pháp trích ly và đánh giá ADN bào tử vi khuẩn giống với phương pháp trích ly và đánh giá ADN của tế bào sinh dưỡng vi sinh vật được viết bởi Nicorescu *et al.* (2013).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tác dụng của xung ánh sáng đến bào tử *B. subtilis* dạng huyền phù

Trong thí nghiệm này, việc đánh giá hiệu quả của xung ánh sáng được thực hiện trên huyền phù

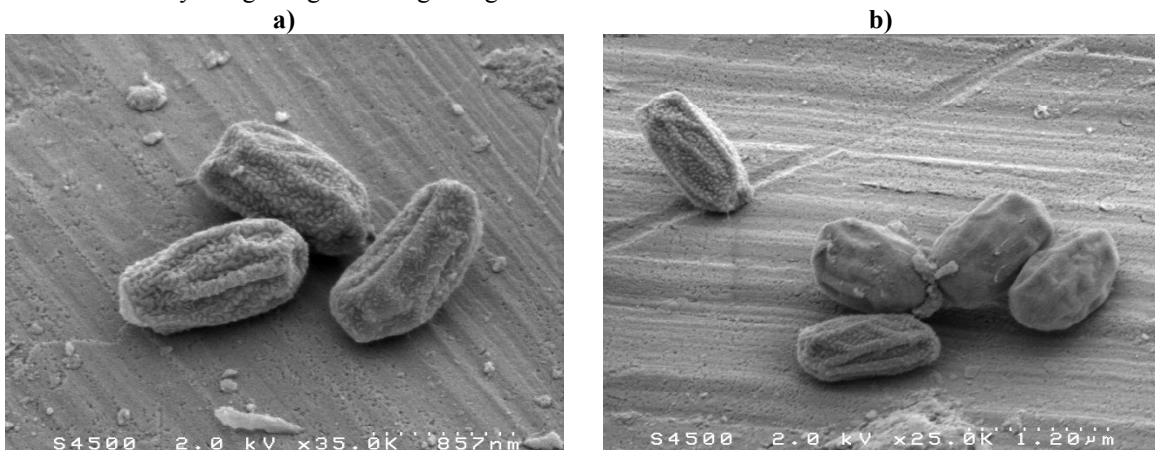
của bào tử *B. subtilis* ở nồng độ 10^8 bào tử/mL và kết quả được thể hiện trên Hình 1. Kết quả cho thấy ở điều kiện xử lý $6\ \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, mức độ tiêu diệt bào tử chỉ đạt được 0,9 log, điều này khẳng định khả năng chịu đựng rất tốt của bào tử so với tế bào sinh dưỡng (Nicorescu *et al.*, 2013). Khả năng khử nhiễm thấp của phương pháp này có thể được giải thích bởi mức độ dày đặc của bào tử trong huyền phù (10^8 bào tử/mL) và cũng do cường độ năng lượng sử dụng thấp ($6\ \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Mức độ dày đặc của bào tử trong huyền phù ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả khử nhiễm của xung ánh sáng, là do: i) các bào tử này có thể hấp thụ một phần các bước sóng có khả năng diệt khuẩn của phổ xung năng (Levy *et al.*, 2011), và ii) các bào tử này có thể tạo ra tác dụng che khuất (Elmnasser *et al.*, 2007). Theo nghiên cứu của Bushnell *et al.* (1998); Wekhof (2003), hiệu quả khử nhiễm của xung ánh sáng trên bào tử *B. subtilis* trong nước muối phụ thuộc rất nhiều vào cường độ năng lượng sử dụng. Thật vậy, mức độ tiêu diệt bào tử đạt được khi xử lý 1 xung là 2,5 và 6 log với mức độ năng lượng sử dụng tương ứng là 600 J và 1200 J. Với kết quả tương tự, Sonenshein (2003) nghiên cứu tác dụng khử nhiễm của xung ánh sáng với mức độ năng lượng sử dụng là $15,8\ \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ /xung trên bào tử *B. subtilis* trong môi trường nước đã khử ion và với 3 xung thì mức độ tiêu diệt bào tử đạt được là 6 log. Một số nghiên cứu khác cho thấy việc tiêu diệt toàn bộ (6 – 8 log) bào tử *B. subtilis*, *B. pumilus* đạt được khi xử lý 1 - 3 xung với cùng mức độ năng lượng như trên (Bushnell *et al.*, 1998). Một cách tổng quát, để tiêu diệt bào tử thì phải cần một mức độ năng lượng cao hơn so với việc tiêu diệt tế bào sinh dưỡng. Tuy vậy, xung ánh sáng vẫn có thể được sử dụng một cách hiệu quả trong việc tiêu diệt bào tử trên bề mặt thực phẩm (Anderson *et al.*, 2000; Jun *et al.*, 2003).



Hình 1: Tác dụng khử khuẩn của xung ánh sáng trên huyền phù bào tử *B. subtilis*

Kết quả trên được bổ sung bằng thí nghiệm phân tích hình ảnh bên ngoài của bào tử *B. subtilis*. Hình SEM (Hình 2a và 2b) cho thấy bào tử *B. subtilis* không bị phá hủy bởi xung ánh sáng. Kết quả này không đồng nhất với kết quả của Wekhof (2001) đưa ra. Thật vậy, nghiên cứu của Wekhof (2001) cho thấy có sự phá hủy bào tử *B. subtilis* khi xử lý bằng xung ánh sáng trong môi

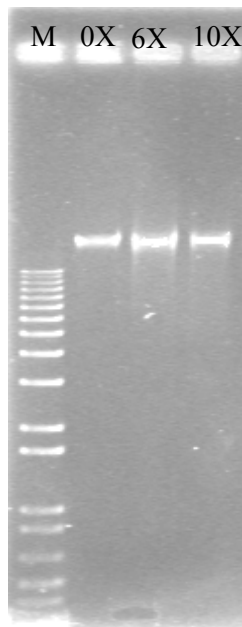
trường khô (trang mỏng trên PET hoặc trên mặt kính thủy tinh). Tuy nhiên, Phạm vi nghiên cứu này được thực hiện trên huyền phù vi sinh vật, điều đó có thể dẫn đến việc bào tử không bị phá hủy bởi xung ánh sáng. Setlow and Setlow (1998) đã chỉ ra rằng, cơ chế tiêu diệt bào tử khác nhau đáng kể khi xử lý trong môi trường rắn và môi trường lỏng.



Hình 2: Hình SEM của bào tử *B. subtilis*

a) mẫu đối chứng; b) mẫu xử lý 6 J.cm⁻² (3000 V, 1 Hz, 10 xung)

Tiếp theo, thí nghiệm kiểm tra khả năng phá huỷ ADN của bào tử *B. subtilis* bởi xung ánh sáng được thực hiện. Hình 3 cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa mẫu đối chứng và mẫu xử lý bằng xung ánh sáng.



Hình 3: Ảnh hưởng của xung ánh sáng lên ADN của bào tử *B. subtilis*

M: chuẩn; X: xung

Theo các tài liệu tham khảo, khả năng diệt khuẩn của tia cực tím chủ yếu là do tác dụng quang hoá, gây ra sự thay đổi trong cấu trúc ADN (chủ yếu là các pyrimidine) của vi khuẩn, vi rút và các tác nhân gây bệnh khác sang dạng liên kết nhị hợp (Mitchell *et al.*, 1992). Sự hình thành các cầu nối này sẽ ngăn chặn giai đoạn giải nén của phân tử ADN trong quá trình nhân bản và vì thế, vi sinh vật sẽ mất khả năng sinh sản. Nếu không có cơ chế sửa chữa thích hợp, thì kết quả sẽ dẫn tới sự đột biến, sự phiên mã và nhân bản gen bị suy giảm và cuối cùng dẫn đến sự tiêu diệt sinh vật (McDonald *et al.*, 2000). Một vài nghiên cứu cho rằng sự khác nhau giữa cơ chế tiêu diệt bào tử vi khuẩn và tế bào sinh dưỡng chủ yếu là do sự khác nhau trong cấu

trúc và khả năng chịu đựng tốt của bào tử. Hơn nữa, ADN của bào tử vi khuẩn có hình dạng khác hơn so với ADN của tế bào sinh dưỡng. Theo Setlow and Setlow (1987) bào tử *B. subtilis* không tạo ra bất kỳ liên kết nhị hợp nào của pyrimidine. Những giả thuyết gần đây liên quan đến việc ức chế bào tử bằng tia cực tím cho rằng chức năng của AND bị gián đoạn là do liên kết ngang và/hoặc vỡ sợi ADN (Harm, 1980). Ngoài ra, Riesenman and Nicholson (2000) khẳng định rằng, màng protein dày của bào tử *B. subtilis* cũng tạo cho nó khả năng chống chịu tốt với các điều kiện bên ngoài. Chính vì thế, theo nhiều tác giả, khả năng chịu đựng cao của bào tử vi khuẩn với tia cực tím, đặc biệt là ở trạng thái khô (Gardner and Shama, 1998) sẽ hạn chế khả năng khử nhiễm của xung ánh sáng, do đó mà việc chỉ sử dụng xung ánh sáng sẽ không đủ mạnh để đảm bảo khử trùng hoàn toàn.

3.2 Hiệu quả khử nhiễm của xung ánh sáng trên bi thủy tinh và gia vị đã được gây nhiễm với bào tử *B. subtilis*

Trong thí nghiệm này, hiệu quả của xung ánh sáng được nghiên cứu trên mẫu dạng khô (bi thủy tinh và gia vị) đã được gây nhiễm với bào tử *B. subtilis*. Kết quả thí nghiệm cho thấy việc xử lý trên bi thủy tinh thì xung ánh sáng cho hiệu quả khử nhiễm cao hơn so với việc xử lý trên hạt tiêu và tiêu hồi (Bảng 1). Thật vậy, kết quả trong Bảng 1 cho thấy, mức độ tiêu diệt bào tử chỉ đạt dưới 1 log khi sử lý 10 J.cm⁻² trên hạt tiêu đen và tiêu hồi, trong khi trên bi thủy tinh thì mức độ này đạt 2,8 log. Với nghiên cứu tác dụng khử khuẩn của tia hồng ngoại trên bột ớt gây nhiễm với bào tử *B. cereus*, Staack *et al.* (2008) cũng cho thấy tác dụng thấp của phương pháp này (khả năng khử khuẩn đạt cao nhất là 1 log). Theo tác giả, nguyên nhân là do bột ớt có độ hoạt động của nước a_w thấp (0,8), điều này làm tăng khả năng chịu nhiệt của bào tử. Kết quả thí nghiệm phù hợp với nghiên cứu trước đó của Jun *et al.* (2003). Thật vậy, khi xử lý bột ngô đã được gây nhiễm với bào tử *Aspergillus niger* bằng xung ánh sáng ở cường độ 2900 V và khoảng cách 8 cm, thì hiệu quả khử nhiễm đạt được là 1,3 log.

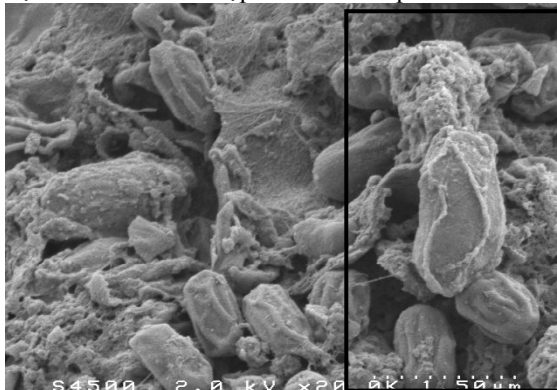
Bảng 1: Kết quả xử lý xung ánh sáng trên bi thủy tinh và gia vị đã được gây nhiễm với bào tử *B. subtilis*

| Mẫu | Mức độ giảm theo số thập phân (log) sau khi xử lý ở cường độ 10 J.cm ⁻² |
|--------------|--|
| Bi thủy tinh | 2,8 ± 0,1 |
| Hạt tiêu đen | 0,8 ± 0,03 |
| Tiêu hồi | 0,9 ± 0,04 |

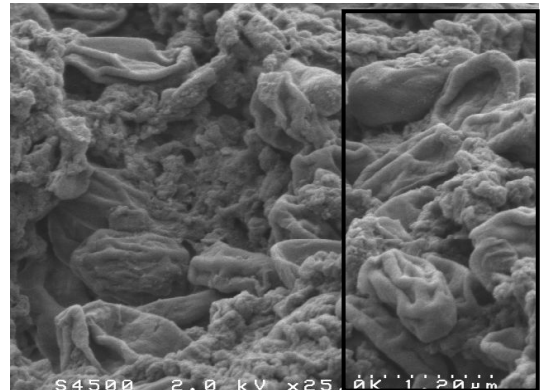
Hiệu quả khử khuẩn thấp hơn trong trường hợp của tiêu và tiểu hồi so với bi thủy tinh (Bảng 1), có thể được giải thích bởi bề mặt không đồng nhất của hai loại gia vị này. Thật vậy, trong trường hợp của hai loại gia vị, bào tử không chỉ bám trên bề mặt của hạt, mà chúng còn có thể ẩn nấp ở những vị trí lõm của hạt, làm cho vi sinh vật có thể ít hoặc không chịu tác động khử khuẩn của ánh sáng, điều đó làm hạn chế hiệu quả khử khuẩn của phương pháp này (Fine and Gervais, 2005). Lagunas-Solar *et al.*, (2006) cũng đã đưa ra một giả thuyết tương tự, các tác giả này cho rằng vi sinh vật có thể ẩn nấp trong các đường nứt trên bề mặt thực phẩm hoặc có thể thâm nhập vào dưới lớp biểu bì sản

phẩm, điều đó làm giảm hiệu quả khử nhiễm của phương pháp này và nó đòi hỏi phải sử dụng một mức độ năng lượng cao hơn. Hơn nữa, bào tử có khả năng chống chịu với tia cực tím cao hơn nhiều so với tế bào sinh dưỡng, đặc biệt là trong điều kiện độ ẩm thấp và do đó rất khó để tiêu diệt chúng.

Tiếp theo, hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng trên bào tử *B. subtilis* được đánh giá bằng hình SEM. Hình 4b cho thấy mẫu xử lý bằng xung ánh sáng, bào tử không bị phá hủy, nhưng có một số đáng kể bị biến dạng dưới tác dụng của phương pháp này.



a) Mẫu đối chứng



b) Mẫu xử lý bằng xung ánh sáng ở 10 J.cm⁻² (3000 V, 1 Hz, 10 xung)

Hình 4: Hình SEM của hạt tiểu hồi được gây nhiễm với bào tử *B. subtilis*

Kết quả thí nghiệm này phù hợp với nghiên cứu của Wekhof (2001), bào tử *B. subtilis* ở trạng thái khô (trải trên lớp nhựa PET hoặc trên lớp kính thủy tinh) được xử lý bằng xung ánh sáng (7 J.cm⁻²) và kết quả là bào tử hoàn toàn bị biến dạng nhưng không xuất hiện vết vỡ hoặc nứt nào. Khi so sánh tác dụng của xung ánh sáng trên tế bào sinh dưỡng (Nicorescu *et al.*, 2013) và bào tử *B. subtilis* (Hình 4b), nhận thấy rằng bào tử ít bị tác động hơn rất nhiều so với tế bào sinh dưỡng. Điều này có thể được giải thích bằng 2 giả thuyết sau: i) bào tử có kích thước nhỏ hơn nhiều so với tế bào sinh dưỡng, điều này làm cho chúng dễ dàng ẩn nấp trong các vết nứt hoặc ở giữa những hạt gia vị (Elmnasser *et al.*, 2007) và ii) với kích thước nhỏ bé của bào tử, sẽ làm cho việc hấp thụ tia cực tím của chúng giảm đi, điều này sẽ làm hạn chế hiệu quả khử nhiễm của phương pháp này. Wekhof (2001) cho rằng hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng cũng phụ thuộc vào kích thước của tế bào vi sinh vật.

4 KẾT LUẬN

Thí nghiệm này được thực hiện nhằm mục đích so sánh hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng trên

bào tử *B. subtilis* dạng huyền phù và dạng khô (bào tử được gây nhiễm trên bi thủy tinh và gia vị). Kết quả nghiên cứu đã cho thấy, đối với bào tử dạng huyền phù, xung ánh sáng chỉ giảm được 0,9 log so với số lượng ban đầu. Tuy nhiên, qua quan sát trên hình SEM, bào tử ở dạng huyền phù không bị phá hủy bởi xung ánh sáng. Khi phân tích ADN, thì kết quả cũng cho thấy phương pháp xử lý này không ảnh hưởng đến ADN của bào tử. Đánh giá hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng trên bi thủy tinh và gia vị đã được gây nhiễm với bào tử *B. subtilis*. Mức độ diệt khuẩn đạt được dưới 1 log khi xử lý trên mẫu gia vị, trong khi mẫu bi thủy tinh thì kết quả đạt được là 2,8 log. Qua phân tích hình ảnh bào tử của mẫu đối chứng và mẫu xử lý bằng xung ánh sáng, không có sự phá hủy tế bào nào được phát hiện, nhưng có một số đáng kể bào tử bị thay đổi hình dạng sau khi xử lý bằng xung ánh sáng. Nghiên cứu này cho thấy: (1) rất khó để đạt được mức độ tiêu diệt lớn hơn 1 log đối với bào tử *B. subtilis* dạng huyền phù hoặc dạng khô (gây nhiễm trên gia vị) và (2) cấu trúc bề mặt của thực phẩm ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả diệt khuẩn của xung ánh sáng, điều đó khẳng định để

tiêu diệt vi sinh vật trên thực phẩm dạng bột thì cần có 1 phương pháp đủ mạnh hoặc kết hợp nhiều phương pháp với nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anderson, J. G., Rowan, N. J., MacGregor, S. T., Fouracre, R. A., & Farish, O. (2000). Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 83–88.
- Bushnell, A., Cooper, J. R., Dunn, J., Leo, F., & May, R. (1998). Pulsed light sterilization tunnels and sterile-pass-throughs. *Pharmaceutical Engineering*, March/April, 48–58.
- Dunn, J., Clark, R., & Ott, T. (1995). Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Technology*, 49, 95–98.
- Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., & Federighi, M. (2007). Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 813–821.
- Farkas, J. (2007) Physical methods of food preservation. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington pp. 685–712.
- Farrell, H., Hayes, J., Laffey, J., & 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.
- Feuilloley, M. G. R., Bourdet, G., & 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.
- Fine, F., & Gervais, P. (2005). Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67, 787–792.
- Gardner, D. W. M., & Shama, G. (1998). The kinetics of *Bacillus subtilis* spore inactivation on filter paper by UV light and UV light in combination with hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 633–641.
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 79–89.
- Harm, W. (1980). Repair related phenomena. In W. Harm, (Eds.), *Biological Effects of Ultraviolet Radiation* (pp. 124-134). Cambridge: Cambridge University Press.
- Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., & Geiser, D. (2003). Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 883–888.
- Keith, W. D. (1998). *Microbial reduction in flour and spice using pulsed electric fields* (pp. 22-24). PhD thesis (in English). University of Guelph, Canada.
- Kramer, J. M., & 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.
- Lagunas-Solar, M. C., Pina, C., MacDonald, J. D., & Bolkan, L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection*, 69, 376–384.
- Levy, C., Bornard, I., & Carlin, F. (2011). Deposition of *B. subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 223–227.
- Levy, C., Aubert X., Lacour B., & Carlin, F. (2012) Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 168–174.
- Massier, S., Rincé, A., Maillot, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., & Chevalier, S. (2011). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a pulsed light-induced stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 502–511.
- McDonald, K. F., Curry, R. D., Clevenger, T. E., Unklesbay, K., Eisensstark, A., Golden, J., & Morgen, R. D. (2000). A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surfaces.

- IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 1581–1587.
20. McKee, L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 1–11.
 21. Mitchell, D. L., Jen, J., & Cleaver, J. E. (1992). Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated solar (ultra-violet B) radiation. *Nucleic Acids Research*, 20, 225–229.
 22. Nicorescu I., Nguyen B., Moreau-Ferret M, Agoulon A., Chevalier S., & Orange N. (2013) Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices. *Food Control*, 31, 151–157.
 23. Ozen, B.F., & Floros, J.D., (2001) Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 60–67.
 24. Ozer, N. P., & Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon filets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 354–360.
 25. Palgan I., Caminiti I. M., Munoz A., Noci F., Whyte P., Morgan D. J., Cronin D. A., & Lyng J. G. (2011) Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiology*, 28, 14–20.
 26. Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R., & Devlieghere, F. (2010) Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *Journal of Food Engineering*, 100, 446–451.
 27. Ramos-Villarroel, A. Y., Aron-Maftei N., Martin-Belloso O., & Soliva-Fortuny, R. (2012). Influence of spectral distribution on bacterial inactivation and quality changes of fresh-cut watermelon treated with intense light pulses. *Postharvest Biology and Technology*, 69, 32–39.
 28. Riesenman, P. J., & Nicholson, W. L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 620–626.
 29. Setlow, B., & Setlow, P. (1987). Thymine-containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores that lack small acid-soluble proteins. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 84, 421–423.
 30. Setlow, B., & Setlow, P. (1998). Heat killing of *Bacillus subtilis* spores in water is not due to oxidative damage. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4109–4112.
 31. Sharma, R. R., & Demirci, A., (2003) Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science*, 68, 1448–1453.
 32. 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.
 33. Staack, N., Ahrné, L., Borch, E., & Knorr, D. (2008). Effect of infrared heating on quality and microbial decontamination in paprika powder. *Journal of Food Engineering*, 86, 17–24.
 34. Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K., & Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 151–158.
 35. Turtoi, M., & Nicolau, A., 2007. Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering*, 83, 47–53.
 36. Wekhof, A. (2000). Desinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 264–276.
 37. 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.
 38. 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.