

## KHẢ NĂNG ĐÁP ỨNG VÀ ĐỘT BIẾN CỦA *Bacillus subtilis* VÀ *Pseudomonas fluorescens* DƯỚI TÁC DỤNG CỦA XUNG ÁNH SÁNG

Nguyễn Bảo Lộc<sup>1</sup> và Nicorescu Irina<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: 07/04/2015

Ngày chấp nhận: 21/12/2015

### Title:

Adaptation and mutation ability of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* vegetative cells under the effect of a pulsed light stress

### Từ khóa:

Xung ánh sáng, ức chế, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, đáp ứng, đột biến

### Keywords:

Pulsed light, inactivation, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, adaptation, mutation

### ABSTRACT

The main objectives of this work were: (a) to compare the inactivation mechanisms and (b) to discuss similarities and differences in the adaptation and mutation behaviours of two bacterial model systems (*Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*) under a Pulsed Light (PL)-induced stress. When adaptation ability was investigated, firstly cells were exposed to sublethal PL doses ( $2 \times 10^5$  or  $0.06 \text{ J.cm}^{-2}$ ) and then submitted to a lethal PL treatment of  $0.3$  or  $0.5 \text{ J.cm}^{-2}$ . Antibiotic resistance assays were carried out on bacterial suspensions in exponential growth phase in order to determine their mutagenic ability. For that, the effect of three PL lethal doses ( $0.2$ ,  $0.3$  and  $0.4 \text{ J.cm}^{-2}$ ) was investigated. Experimental results showed that a low-energy PL dose ( $0.06 \text{ J.cm}^{-2}$ ) was sufficient to produce *B. subtilis* adaptation, leading to an enhanced resistance to a subsequent lethal treatment. Conversely, *P. fluorescens* was not able to adapt to sublethal PL doses and more, 1 log additional microbial reduction was found when applying a lethal treatment. Applying a  $0.2 \text{ J.cm}^{-2}$  PL dose strongly increased the number of *P. fluorescens* resistant mutants compared to non-treated cells, while the mutation frequency was not modified for *B. subtilis*. As a conclusion, this study showed that these two highly adaptable Gram negative and positive bacteria have developed different behaviour as a response to low-energy PL.

### TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là (a) so sánh cơ chế tiêu diệt vi sinh vật và (b) khảo sát khả năng đáp ứng và đột biến của 2 giống vi sinh vật (*Bacillus subtilis* và *Pseudomonas fluorescens*) dưới tác dụng của xung ánh sáng. Để đánh giá khả năng đáp ứng, đầu tiên tế bào được xử lý bằng xung ánh sáng với liều năng lượng thích nghi ( $2 \times 10^5$  hoặc  $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$ ), sau đó những tế bào này được xử lý tiếp với liều năng lượng tiêu diệt  $0,3$  hoặc  $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ . Thí nghiệm thử khả năng kháng kháng sinh được thực hiện trên huyền phù vi sinh vật ở giai đoạn phát triển logarit để xác định khả năng đột biến của các vi sinh vật này. Thí nghiệm được thực hiện với 3 mức độ năng lượng của xung ánh sáng ( $0,2$ ;  $0,3$  và  $0,4 \text{ J.cm}^{-2}$ ). Kết quả thí nghiệm cho thấy ở mức độ năng lượng xử lý thấp ( $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$ ) làm tăng khả năng đáp ứng của vi khuẩn *B. subtilis*, giúp cho vi khuẩn này chống chịu tốt hơn với liều năng lượng tiêu diệt xử lý tiếp theo. Ngược lại, *P. fluorescens* không đáp ứng với liều năng lượng thấp và hơn thế, việc tiền xử lý bằng liều năng lượng thấp còn làm tăng mức độ nhạy cảm của loài vi khuẩn này với liều năng lượng cao tiếp theo. Năng lượng xử lý  $0,2 \text{ J.cm}^{-2}$  làm tăng đáng kể số lượng vi khuẩn *P. fluorescens* đột biến so với mẫu không xử lý, trong khi đó kết quả này không được thể hiện ở vi khuẩn *B. subtilis*. Tóm lại, kết quả thí nghiệm cho thấy cả hai loại vi khuẩn Gram âm và Gram dương trong thí nghiệm này đều có khả năng đáp ứng với phương pháp xử lý xung ánh sáng, tuy nhiên cơ chế đáp ứng của mỗi loại không giống nhau.

## 1 GIỚI THIỆU

*Bacillus subtilis*, vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử và là vi khuẩn không gây bệnh. Tuy nhiên, đôi khi vi khuẩn này cũng liên quan tới nhiều vụ ngộ độc thực phẩm. Đã có một số trường hợp ngộ độc do ăn phải thực phẩm bị nhiễm *B. subtilis* như gà tây, bánh nướng xốp, bột sữa trứng, hành tây ngâm, nước sốt salad, món salad đậu đóng hộp (Kramer & Gilbert, 1989). Các triệu chứng phổ biến của ngộ độc thực phẩm do *B. subtilis* là đau bụng, nôn mửa và tiêu chảy. *B. subtilis* cũng được sử dụng trong các lĩnh vực nghiên cứu để thay thế cho các vi sinh vật nguy hiểm khác như *B. cereus* và *B. anthracis* (Krishnamurthy, 2006). Vi khuẩn thứ hai trong nghiên cứu này là *Pseudomonas fluorescens*, vi khuẩn Gram âm, được tìm thấy trong nước, đất và thường là nguyên nhân gây hư hỏng của các dạng thực phẩm như trứng, thịt, cá, rau và sữa (Tyrer, 1998). Đây là một trong những loại vi sinh vật đóng vai trò chính trong việc hư hỏng các sản phẩm thịt, cá ướp lạnh (Beit-Halachmy & Mannheim, 1992).

Công nghệ xung ánh sáng (PL) đã tạo được nhiều chú ý từ giới khoa học, đây là một phương pháp mới dùng để tiêu diệt vi sinh vật trên các loại bề mặt, bao bì và gần đây đã được nghiên cứu nhiều trên thực phẩm như thịt, bánh mì, rau và trái cây (Sauer & Moraru, 2009; Uesugi & Moraru, 2009). Phương pháp này sử dụng đèn xenon phát ra ánh sáng trắng (200 nm – 1100 nm) với cường độ năng lượng 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). Cho đến hiện tại, cơ chế chính xác của việc tiêu diệt tế bào vi sinh vật bằng PL vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn, phần lớn các nghiên cứu cho thấy rằng phổ UV đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả diệt khuẩn của phương pháp này và các bức xạ UV có bước sóng ngắn đóng vai trò quan trọng hơn hết (Rowan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Woodling and Moraru, 2007). Đã có nhiều bài tổng quan viết về kỹ thuật xung ánh sáng (Elmnasser *et al.*, 2007; Gómez-López *et al.*, 2007) và nhiều công trình nghiên cứu liên quan tới hiệu quả khử nhiễm trên thực phẩm của phương pháp này (Bialka & Demirci, 2008; Gómez-López *et al.*, 2005; Ozer & Demirci, 2006) hay khử nhiễm môi trường nước (Huffman *et al.*, 2000; Sonenshein, 2003). Tuy

hiệu quả khử khuẩn của phương pháp này trên thực phẩm vẫn chưa cao, nguyên nhân là do tác dụng che khuất hoặc do mật số vi sinh vật quá nhiều (Marquenie *et al.*, 2003; Wuytack *et al.*, 2003; Gómez-López *et al.*, 2005). Và kết quả là khi xử lý PL với cường độ năng lượng thấp thì có thể tạo nên khả năng thích nghi và đột biến của vi sinh vật (Alcántara-Díaz *et al.*, 2004; Massier *et al.*, 2012a). Nghiên cứu của Massier *et al.*, (2012a; 2012b) cho thấy rằng cường độ năng lượng xử lý PL thấp đã tạo nên sự thích nghi của *P. aeruginosa* và *E. faecalis*, giúp cho các vi khuẩn này chống chịu tốt hơn với cường độ năng lượng xử lý PL mạnh tiếp theo sau.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Chủng vi khuẩn và điều kiện phát triển

*B. subtilis* (ATCC 6633, viện Pasteur, Pháp) và *P. fluorescens* MF37 (LMSM, Pháp) được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh M17 (Merck, Đức) có bổ sung 0,5% glucose với điều kiện nuôi cấy khuấy đảo tự động (180 vòng/phút) ở nhiệt độ tương ứng là 30 °C và 28 °C trong thời gian 24 giờ. Tiếp theo, môi trường được ly tâm ở 10.000 g, 20 °C trong 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 ( $OD_{580nm}$ ) về 0,8. Sau đó, 10 ml dung dịch sẽ được xử lý bằng xung ánh sáng (được đề cập trong mục 2.2). Một đơn vị log vi khuẩn là logarit của mật số vi khuẩn (cfu/mL hoặc cfu/g).

### 2.2 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.*, 2012a). 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  $\mu$ s. Huyền phù vi khuẩn được đựng trong một hộp hình chữ nhật bằng thạch anh và được xử lý với cường độ năng lượng từ  $2 \times 10^{-5}$  đến  $1,2 \text{ J.cm}^{-2}$  (Massier *et al.*, 2012a). Sau khi xử lý, mẫu đối chứng và mẫu thí nghiệm được cấy trang trên môi trường GM17 có bổ sung 0,5% glucose cho phương pháp đếm khuẩn lạc. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

### 2.3 Kiểm tra màng bán thấm của vi khuẩn bằng phương pháp Bradford

Mẫu tế bào vi khuẩn *B. subtilis* và *P. fluorescens* được xử lý bằng xung ánh sáng và mẫu đối chứng được ly tâm ở 10.000 g, 4°C trong thời

gian 10 phút. Phần dịch lỏng thu được sẽ được lọc qua màng lọc cellulose-acetate 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore Whatman, Đức) và được bảo quản trong đá vảy. Cho vào cuvet 400  $\mu\text{L}$  dịch lọc, 400  $\mu\text{L}$  nước cất và 200  $\mu\text{L}$  dịch thử Bradford 5X (kit Bio-rad Protein Assay, Biorad). Tất cả dung dịch được lắc nhẹ bằng tay và để yên 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, mẫu sẽ được đo mật độ quang ở OD<sub>595nm</sub> (Helios Epsilon Spectrophotometer, Thermospectronic, Mỹ). Nồng độ protein trong dung dịch sẽ được tính dựa vào đường chuẩn của albumin huyết thanh bò (BSA, Sigma) với nồng độ từ 0 and 8 mg.mL<sup>-1</sup> (Bradford, 1976).

#### 2.4 Phương pháp xác định mức độ thích nghi của vi khuẩn

*B. subtilis* và *P. fluorescens* được nuôi cấy trên môi trường tăng sinh M17 (Merck, Đức) đến OD<sub>580nm</sub> = 0,4  $\pm$  0,05 (giai đoạn giữa của pha logarit). Các vi khuẩn này được tiền xử lý bằng xung ánh sáng với cường độ năng lượng thích nghi (2 x 10<sup>-5</sup> hoặc 0,06 J.cm<sup>-2</sup>). Tiếp theo, mẫu được xử lý và mẫu đối chứng được cấy qua môi trường tăng sinh mới và ủ 24 giờ ở nhiệt độ thích hợp của từng loại vi khuẩn. Cuối cùng huyền phù vi khuẩn được xử lý lần thứ hai với cường độ năng lượng 0,3 hoặc 0,5 J.cm<sup>-2</sup> và cấy trang trên môi trường GM17 (Merck, Đức) phục vụ cho việc đếm khuẩn lạc. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

#### 2.5 Phương pháp xác định khả năng đột biến của vi khuẩn

Khả năng gây đột biến của *B. subtilis* và *P. fluorescens* chủng MF37 dưới tác dụng của xung ánh sáng được nghiên cứu với sự hiện diện của hai loại kháng sinh (tetracyclin và rifampicin). Với *P. fluorescens* MF37, tetracyclin được chọn vì chủng này có khả năng kháng rất cao với rifampicin (Elmnasser *et al.*, 2007). Khi đạt tới giai đoạn tăng trưởng logarit (OD<sub>580nm</sub> = 0,8  $\pm$  0,05) hai chủng vi khuẩn này được xử lý bằng xung ánh sáng với cường độ năng lượng (0,2; 0,3 và 0,4 J.cm<sup>-2</sup>). Tiếp theo, các mẫu được xử lý và mẫu đối chứng được cấy qua môi trường tăng sinh mới và ủ 24 giờ ở

điều kiện nhiệt độ thích hợp cho từng chủng vi khuẩn. Cuối cùng dung dịch vi khuẩn được cấy trang trên môi trường GM17 (Merck, Đức) có hoặc không có bổ sung tương ứng rifampicin (0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) hay tetracyclin (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Mẫu được ủ 48 giờ ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng vi khuẩn và phương pháp đếm khuẩn lạc được thực hiện sau khi ủ. Các vi khuẩn tạo được trên môi trường GM17 có bổ sung chất kháng sinh là những vi khuẩn đã phát sinh đột biến sau khi xử lý xung ánh sáng. Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

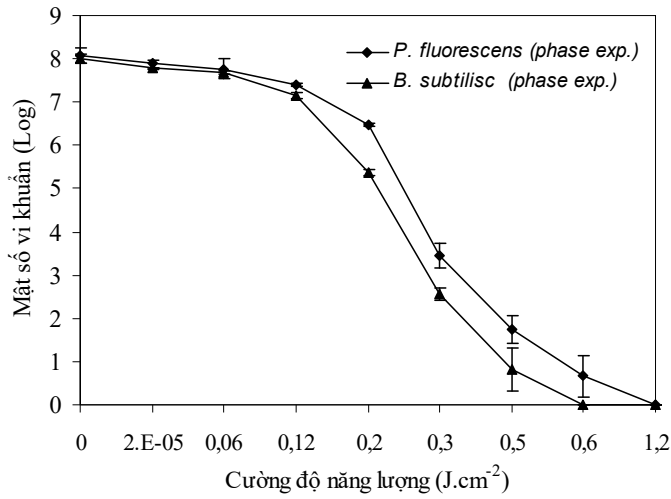
### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Cơ chế bất hoạt *B. subtilis* và *P. fluorescens* bởi xung ánh sáng

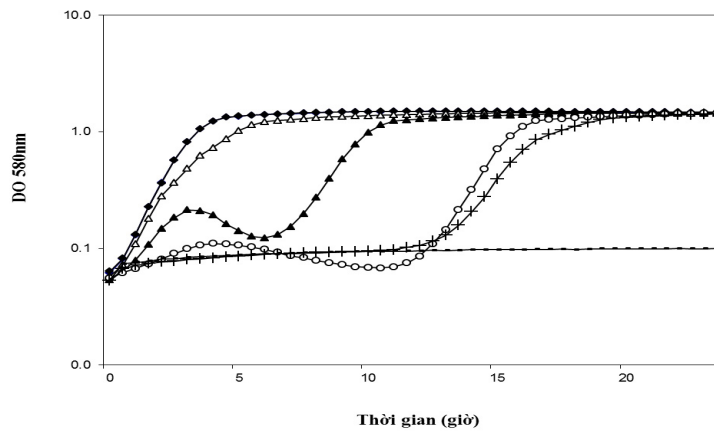
##### 3.1.1 Tác dụng tiêu diệt vi sinh vật của xung ánh sáng

Hiệu quả của các phương pháp tiệt trùng phụ thuộc vào nhiều yếu tố như vi sinh vật mục tiêu, giai đoạn phát triển, đã được xử lý trước với cường độ năng lượng thấp hay chưa và cũng phụ thuộc vào chính phương pháp tiệt trùng. Với lý do này, thí nghiệm đầu tiên được thực hiện nhằm xác định cường độ năng lượng thích nghi và cường độ năng lượng tiêu diệt của phương pháp xử lý xung ánh sáng.

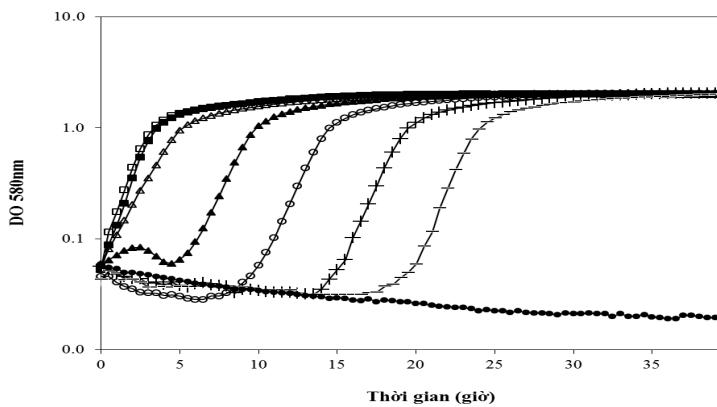
Kết quả thể hiện ở Hình 1 cho thấy *P. fluorescens* và *B. subtilis* bị tiêu diệt hoàn toàn khi xử lý xung ánh sáng ở cường độ năng lượng tương ứng 1,2 và 0,6 J.cm<sup>-2</sup>. Đồ thị thể hiện khả năng chống chịu với xung ánh sáng của *P. fluorescens* tốt hơn so với *B. subtilis*. Cường độ năng lượng xử lý từ 0,2 đến 0,5 J.cm<sup>-2</sup> được coi là cường độ năng lượng tiêu diệt đối với *B. subtilis*, vì ở cường độ năng lượng này, mức độ tiêu diệt của phương pháp xử lý đạt trên 1 log. Tương tự, cường độ năng lượng tiêu diệt với *P. fluorescens* là từ 0,2 đến 0,6 J.cm<sup>-2</sup>. Khi huyền phù vi khuẩn được xử lý với cường độ năng lượng thấp (từ 2x10<sup>-5</sup> to 0,06 J.cm<sup>-2</sup>), thì mức độ tiêu diệt đạt được dưới 1 log (Hình 1). Và đây được định nghĩa là cường độ năng lượng thích nghi của cả hai giống vi khuẩn này.



**Hình 1: khả năng tiêu diệt của xung ánh sáng trên *B. subtilis* và *P. fluorescens* ở giai đoạn phát triển logarit**



a)



b)

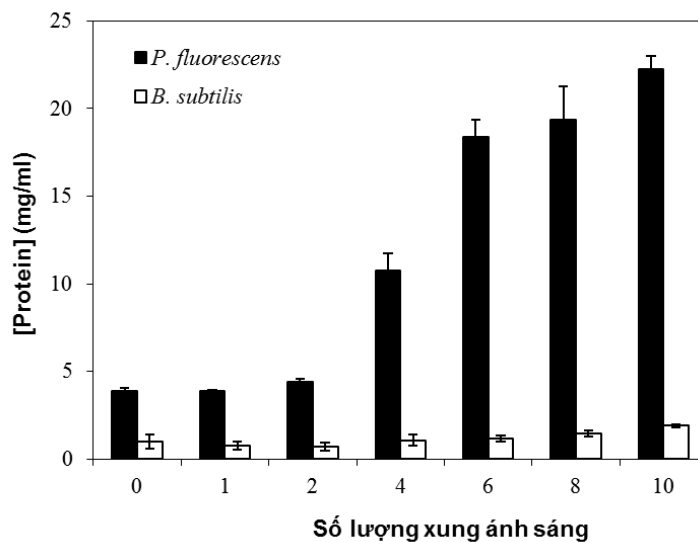
**Hình 2: Sự phát triển của *B. subtilis* (a) và *P. fluorescens* (b) sau khi xử lý xung ánh sáng. Không xử lý(◇) và xử lý với các cường độ năng lượng 2.10<sup>-5</sup> (◆), 0,06 (△), 0,2 (▲), 0,3 (○), 0,5 (+), 0,6 (-), 1,2 (●) J.cm<sup>-2</sup>**

Sự phát triển của vi khuẩn sau khi xử lý xung ánh sáng (từ  $2 \times 10^{-5}$  to  $1,2 \text{ J.cm}^{-2}$ ) được thể hiện trong Hình 2a và 2b. Kết quả này cho thấy có sự thay đổi rõ rệt về thời gian của pha tiềm phát khi cả hai loại vi khuẩn này chịu sự tác động của xung ánh sáng. Thật vậy, khi xử lý với cường độ năng lượng 0,2 and  $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ , thì thời gian của pha tiềm phát kéo dài từ 7 giờ tới 15 giờ. Ngoài ra, khi xử lý với cường độ năng lượng trên  $0,6 \text{ J.cm}^{-2}$  thì vi sinh vật hoàn toàn bị tiêu diệt. Ngược lại khi xử lý với cường độ năng lượng  $\leq 0,06 \text{ J.cm}^{-2}$  thì đồ thị thể hiện sự phát triển của cả hai loại vi khuẩn không thay đổi so với mẫu đối chứng. Kết quả này giúp khẳng định cường độ năng lượng  $2 \times 10^{-5}$  đến  $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$  là cường độ năng lượng thích nghi của cả hai giống vi khuẩn, cường độ năng lượng từ 0,2 đến  $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$  được coi là cường độ năng lượng tiêu diệt đối với *B. subtilis* và cường độ năng lượng tiêu diệt với *P. fluorescens* là từ 0,2 đến  $0,6 \text{ J.cm}^{-2}$ .

### 3.1.2 Ảnh hưởng của xung ánh sáng đến màng tế bào vi khuẩn

Trong thí nghiệm này, tác động của xung ánh sáng lên tính toàn vẹn của màng tế bào vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp Bradford (Hình 3). Khi nghiên cứu trên *B. subtilis*, thì lượng protein được giải phóng ra khỏi màng tế bào rất ít và không có sự khác biệt ý nghĩa giữa mẫu xử lý với xung ánh sáng và mẫu đối chứng. Điều này cho thấy xung ánh sáng dường như không tác động đến vách tế bào sinh dưỡng của *B. subtilis*. Ngược lại,

đối với trường hợp của *P. fluorescens* lượng protein thu được trong dịch chiết cao hơn rất nhiều so với *B. subtilis*. Sự gia tăng hàm lượng protein này càng được thể hiện rõ ràng hơn khi dịch huyền phù của *P. fluorescens* được xử lý từ 4 xung trở lên (Hình 3). Kết quả này cho thấy sự khác nhau về cấu tạo của màng tế bào giữa hai loại vi khuẩn Gram + và Gram - . Để kiểm tra những tác động vật lý của xung ánh sáng trên màng tế bào vi khuẩn *B. subtilis* và *P. fluorescens*, Nicorescu *et al.*, 2013 đã sử dụng phương pháp quét hình ảnh bằng kính hiển vi điện tử (SEM). Kết quả cho thấy xung ánh sáng không ảnh hưởng đến hình dạng bên ngoài của tế bào khi được xử lý trong dịch huyền phù. Nghiên cứu của Wekhof *et al.*, 2000 cho thấy cơ chế tiêu diệt vi sinh vật của xung ánh sáng chủ yếu là do tác động của phổ UV lên ADN của tế bào và hình thành các liên kết nhị hợp của thymin. Đồng quan điểm này, các nghiên cứu của Giese & Darby, 2000; Takeshita *et al.*, 2003; Nicorescu *et al.*, 2013 cho thấy rằng khi xử lý tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật bằng xung ánh sáng thì tác động chính tạo nên hiệu quả tiêu diệt của phương pháp này là tạo ra những thay đổi hóa học trên ADN bởi phổ UV của xung ánh sáng. Thật vậy, Liu (2009) nhấn mạnh rằng tác dụng tiêu diệt vi sinh vật của xung ánh sáng là do tia UV xuyên qua màng tế bào, tấn công ADN, ARN và enzyme tạo ra những sự hư hỏng trong cấu tạo như đứt chuỗi và hình thành những sản phẩm phụ khác.

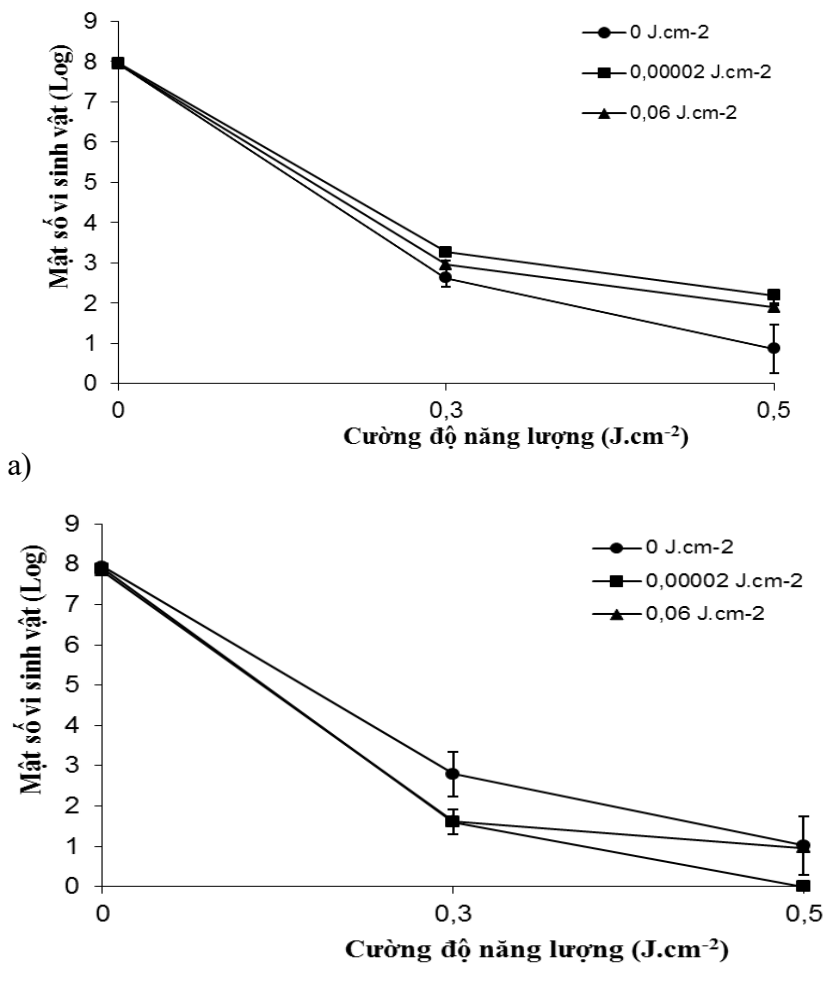


Hình 3: Ảnh hưởng của xung ánh sáng đến tính thấm của màng tế bào *B. subtilis* và *P. fluorescens*

**3.2 khả năng thích nghi của *B. subtilis* và *P. fluorescens* với xung ánh sáng**

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Hình 4a và 4b. Trường hợp của *B. subtilis*, khi xử lý trực tiếp với cường độ năng lượng tiêu diệt 0,3 J.cm<sup>-2</sup> (không xử lý trước bằng cường độ năng lượng thích nghi), thì mức độ diệt khuẩn đạt được là 5,3 log. Nhưng khi tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thích nghi 2x10<sup>-5</sup> J.cm<sup>-2</sup> hoặc 0,06 J.cm<sup>-2</sup>, tiếp theo xử lý với cường độ năng lượng tiêu diệt, thì sẽ làm tăng khả năng sống sót của vi khuẩn này lần lượt là 0,6 và 0,4 log. Khi xử lý trực tiếp với cường độ năng lượng tiêu diệt 0,5 J.cm<sup>-2</sup>, thì mức độ tiêu diệt vi khuẩn *B. subtilis* đạt được 7 log. Ngược lại, khi tiền xử lý với cường độ năng lượng thích nghi (2x10<sup>-5</sup> hoặc 0,06 J.cm<sup>-2</sup>), thì làm cải

thiện đáng kể số lượng vi khuẩn sống sót. Thật vậy, khi tiền xử lý ở 2x10<sup>-5</sup> J.cm<sup>-2</sup> thì số lượng vi khuẩn sống sót tăng lên đến 1,5 log (Hình 4a) và khi tiền xử lý ở 0,06 J.cm<sup>-2</sup> thì số lượng vi khuẩn sống sót tăng lên đến 1,2 log. Tóm lại, khi tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thích nghi và tiếp theo là cường độ năng lượng tiêu diệt thì số vi khuẩn sống sót sau xử lý tăng lên từ 0,4 đến 1,5 log tùy thuộc vào cường độ năng lượng xử lý của xung ánh sáng. Kết quả này cho thấy khi tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thấp sẽ làm cho vi khuẩn chống chịu tốt hơn với cường độ năng lượng tiêu diệt tiếp theo. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Massier *et al.* (2012a; 2012b) các tác giả này nhận thấy có sự thích nghi đáng kể của vi khuẩn *E. faecalis* và *P. aeruginosa* khi tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thích nghi.



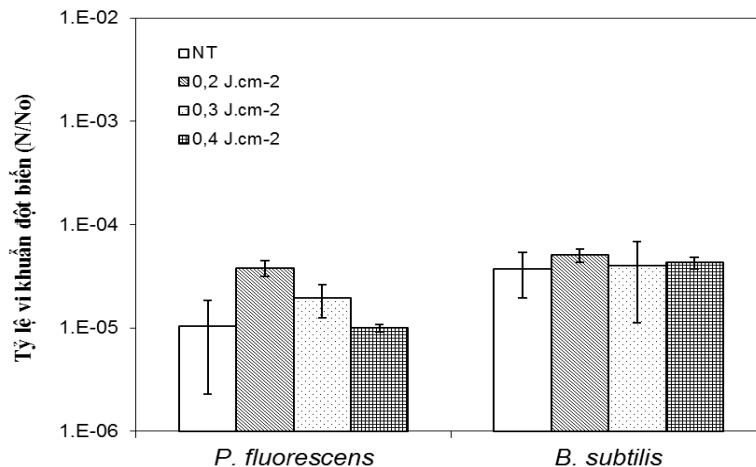
**Hình 4: Khả năng thích nghi của *B. subtilis* (a) và *P. fluorescens* (b) dưới tác dụng của xung ánh sáng**

Kế tiếp, khả năng đáp ứng của *P. fluorescens* với cường độ năng lượng thấp của xung ánh sáng được thực hiện (Hình 4b). Khi xử lý trực tiếp bằng cường độ năng lượng tiêu diệt 0,3 hoặc 0,5 J.cm<sup>-2</sup>, thì mật số vi khuẩn bị giảm xuống lần lượt là 4,5 và 6 log. Mặt khác, khi tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thích nghi thì số lượng vi khuẩn *P. fluorescens* sống sót không được cải thiện. Ngược lại, cách xử lý này còn làm giảm khả năng chống chịu của vi khuẩn với cường độ năng lượng tiêu diệt được xử lý sau đó (khoảng 1 log). Tóm lại, kết quả nghiên cứu này cho thấy mặc dù vi khuẩn *P. fluorescens* chống chịu với xung ánh sáng tốt hơn (Hình 1), nhưng khả năng thích nghi của loại vi khuẩn này với cường độ năng lượng xử lý thấp (tiền xử lý) lại kém hơn so với *B. subtilis*.

### 3.3 Khả năng đột biến của *B. subtilis* và *P. fluorescens* dưới tác dụng của xung ánh sáng

Theo (Bintsis *et al.*, 2000; Gómez-López *et al.*, 2005, 2007; Takeshita *et al.*, 2003) phổ UV-C được xem như là yếu tố chính trong phương pháp tiêu diệt vi sinh vật bằng xung ánh sáng và phổ UV-C cũng được biết đến như một tác nhân gây đột biến. Theo định hướng trên, thí nghiệm tiếp theo được thực hiện nhằm đánh giá khả năng gây đột biến của xung ánh sáng trên *B. subtilis* and *P. fluorescens*.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Hình 5,



Hình 5: Tác dụng gây đột biến của xung ánh sáng trên *B. subtilis* và *P. fluorescens*

## 4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm hiểu tác động của xung ánh sáng đến hai loại vi khuẩn khác nhau (*B. subtilis* và *P. fluorescens*).

khi *P. fluorescens* được xử lý bằng xung ánh sáng với cường độ năng lượng 0,2 J.cm<sup>-2</sup>, thì số lượng tế bào kháng tetracycline tăng đáng kể so với mẫu không xử lý. Sự tăng khả năng sinh đột biến của *P. fluorescens* có thể được giải thích là do tác dụng của phổ UV đã dẫn đến sự thay đổi trong cấu trúc ADN và/hoặc làm hoạt hóa cơ chế sửa lỗi ADN trong tế bào vi sinh vật, nên làm tăng khả năng đột biến của tế bào (Gómez-López *et al.*, 2005, 2007; Takeshita *et al.*, 2003). Thật vậy, việc xử lý nhiều lần bằng xung ánh sáng với cường độ năng lượng thấp sẽ làm gia tăng sự thích nghi của vi sinh vật do sự hoạt động của hệ thống tự sửa lỗi ADN của vi sinh vật (Ewing, 1995, 1997; Rames *et al.*, 1997), điều đó dẫn đến sự đột biến và chọn lọc tự nhiên của vi sinh vật. Mặt khác, cường độ năng lượng 0,2 J.cm<sup>-2</sup> không làm gia tăng khả năng đột biến của vi khuẩn *B. subtilis*. Hơn thế nữa, khi xử lý với cường độ năng lượng 0,3 hoặc 0,4 J.cm<sup>-2</sup> thì cả 2 giống vi khuẩn đều không có sự gia tăng khả năng sinh đột biến. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Doudney & Young (1962), các tác giả này cho thấy khi xử lý UV với cường độ cao sẽ làm hạn chế khả năng sinh đột biến của vi khuẩn. Gần đây, nghiên cứu của Massier *et al.* (2012a) cho thấy khi xử lý với cường độ năng lượng thấp (0,2 J.cm<sup>-2</sup>) sẽ kích thích sự gia tăng đột biến của *P. aeruginosa*, trong khi xử lý với cường độ năng lượng 0,5 J.cm<sup>-2</sup> thì không làm tăng khả năng sinh đột biến của giống vi khuẩn này.

Kết quả nghiên cứu cho thấy *P. fluorescens* chống chịu với tác động của xung ánh sáng tốt hơn so với *B. subtilis*. Khi đánh giá tính nguyên vẹn của màng tế bào bằng phương pháp Bradford, kết quả cho thấy xung ánh sáng không ảnh hưởng đến tính

thấm của màng tế bào *B. subtilis* và ảnh hưởng ít đến màng tế bào *P. fluorescens*. Liên quan đến khả năng thích nghi của hai giống vi khuẩn này, tiền xử lý bằng cường độ năng lượng thấp ( $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$ ) làm tăng khả năng thích nghi của vi khuẩn *B. subtilis* với cường độ năng lượng tiêu diệt xử lý tiếp theo. Ngược lại, *P. fluorescens* không thể hiện khả năng này và hơn nữa, tiền xử lý với cường độ năng lượng thấp còn làm giảm mức độ sống sót (khoảng 1 log) của vi khuẩn này với bước xử lý tiếp theo (cường độ năng lượng tiêu diệt). Cường độ xử lý  $0,2 \text{ J.cm}^{-2}$  làm gia tăng đáng kể khả năng đột biến của vi khuẩn *P. fluorescens* so với mẫu đối chứng. Trong khi khả năng này không được thể hiện ở vi khuẩn *B. subtilis*.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tác dụng diệt khuẩn mạnh mẽ của xung ánh sáng trên huyền phù vi sinh vật. Tuy nhiên, mức độ đáp ứng của từng loại vi sinh vật với phương pháp này không giống nhau.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alcántara-Díaz, D., Breña-Valle, M., & Serment-Guerrero, J. (2004). Divergent adaptation of *Escherichia coli* to cyclic ultraviolet light exposures. *Mutagenesis*, 19, 349–354.
- Beit-Halachmy, I., & Mannheim, C. H. (1992). Is modified atmosphere packaging beneficial for fresh mushrooms? *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 25, 426–432.
- Bialka, K. L., & 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.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – A critical review. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80, 637–645.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Doudney, C. O., & Young, C. S. (1962). Ultraviolet light induced mutation and deoxyribonucleic acid replication in bacteria. *Genetics*, 47, 1125–1138.
- 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.
- Ewing, D. (1995). The directed evolution of radiation resistance in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 549–553.
- Ewing, D. (1997). Production of radiation-resistant *E. coli* strains by daily X-irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 71, 253–258.
- Giese, N., & 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.
- 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.
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007) Pulsed light for food decontamination: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 464–473.
- Huffman, D. E., Slifko, T. R., Salisbury, K. & Rose, J. B. (2000). Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Research*, 34, 2491–2498.
- 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.
- 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.
- Liu, Y. (2009). A study of bacterial adaptation to ultraviolet light in ultrapure water systems (pp.21). PhD thesis (in English). The University of Arizona, USA.
- Marquenie, D., Michiels, C.W., Van Impe, J.F., Schrevels, E. & Nicolai, B.N. (2003) Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 455–461.



- Massier, S., Rincé, A., Maillot, O., Feuilleley, M. G. J., Orange, N. & Chevalier, S. (2012a). Adaptation *Pseudomonas aeruginosa* to a pulsed light induced stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 502–511.
- Massier, S., Bouffartigues, E., Rincé, A., Maillot, O., Feuilleley, M. G. J., Orange, N. & Chevalier, S. (2012b). Effects of a pulsed light-induced stress on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 186–195.
- Nicorescu, I., Nguyen, B., Morreau-Ferret, M., Agoulon, A., Chevalier, S. & Orange, N. (2013). Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices. *Food Control Journal*, 31, 151–157.
- Ozer, N. P., & Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 354–360.
- Rames, J., Chaloupecky, V., Sojkova, N., & Bencko, V. (1997). An attempt to demonstrate the increased resistance of selected bacterial strains during repeated exposure to UV radiation at 254 nm. *Central European Journal of Public Health*, 5, 30–31.
- Rowan, N. J., S. J. MacGregor, J. G. Anderson, R. A. Fouracre, L. McIlvaney, & O. Farish. (1999). Pulsed-light inactivation of food related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1312–1315.
- Sonenshein, A. L. (2003). Killing of *Bacillus* spores by high-intensity ultra violet light. In *Sterilization and decontamination using high energy light*. Xenon Corporation, Woburn, Mass. pp. 15–19.
- Sauer, A., & 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.
- 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.
- Tyrer, H. (1998). The effect of storage temperature on the measured and predicted shelf-life of chilled prepared meals. PhD thesis, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK.
- Uesugi, A. R., & 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.
- Wang, T., S. J. MacGregor, J. G. Anderson, & G. A. Woolsey. (2005). Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research*, 39, 2921–2925.
- Wekhof, A. (2000). Desinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 264–276.
- Woodling, S. E., & C. I. Moraru. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection*, 70, 909–916.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I. et al. (2003). Comparison of sublethal injury Induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66, 31–37.