

## THE IMPACT OF PULSED LIGHT ON THE INACTIVATION OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* V583 IN TWO DIFFERENT GROWTH PHASES

Nguyen Bao Loc<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ngoc De<sup>2</sup>, Chau Minh Tan<sup>2</sup>, Nguyen Nhat Minh Phuong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Can Tho University

<sup>2</sup>Can Tho College of Economics and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<b>Received:</b> 04/11/2024	The aim of the study was to evaluate the impact of pulsed light on the inactivation of <i>Enterococcus faecalis</i> V583 in the exponential and stationary phases. The suspension of <i>Enterococcus faecalis</i> in these two phases was treated using pulsed light with the intensity of 0, 0.00002, 0.06, 0.2, 0.3, 0.5 and 0.6 J/cm <sup>2</sup> . The suspension was evaluated on the number of colonies, the impact on cell membranes and the recovery of microorganism. The results showed that <i>Enterococcus faecalis</i> in the exponential phase was more sensitive with pulsed light than the rest phase was. The inhibition of <i>Enterococcus faecalis</i> in the exponential and stationary phases needed the pulsed light intensity of 0.5 and 0.6 J/cm <sup>2</sup> respectively. The results also indicated that the cell membranes of microorganism in the stationary phase was impacted less than the one in the exponential phase. Therefore, the recovery of microorganism in the exponential phase was slowly than the one in the stationary phase.
<b>Revised:</b> 29/11/2024	
<b>Published:</b> 30/11/2024	

### KEYWORDS

*Enterococcus faecalis*

Cell membranes

Stationary phases

Exponential phase

Pulsed light

## TÁC DỤNG CỦA XUNG ÁNH SÁNG TRÊN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* V583 Ở HAI GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN KHÁC NHAU

Nguyễn Bảo Lộc<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Dế<sup>2</sup>, Châu Minh Tân<sup>2</sup>, Nguyễn Nhật Minh Phương<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ, <sup>2</sup>Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<b>Ngày nhận bài:</b> 04/11/2024	Mục đích của nghiên cứu là đánh giá tác động của xung ánh sáng đến khả năng bất hoạt vi khuẩn <i>Enterococcus faecalis</i> V583 ở 2 giai đoạn phát triển (pha tăng trưởng và pha ổn định). Huyền phù vi khuẩn <i>Enterococcus faecalis</i> ở 2 giai đoạn này được xử lý bằng xung ánh sáng với các cường độ năng lượng 0; 0,00002; 0,06; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6 J/cm <sup>2</sup> . Sau đó mẫu được đánh giá mật độ số vi khuẩn sống sót, mức độ tác động đến màng tế bào chất và khả năng phục hồi. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn <i>Enterococcus faecalis</i> ở pha tăng trưởng nhạy cảm với xung ánh sáng hơn so với pha ổn định. Để bất hoạt hoàn toàn vi khuẩn này ở pha tăng trưởng và pha ổn định thì cần nguồn năng lượng xử lý lần lượt là 0,5 J/cm <sup>2</sup> và 0,6 J/cm <sup>2</sup> . Về tác động của xung ánh sáng lên màng tế bào chất của vi khuẩn thì kết quả nghiên cứu cho thấy màng tế bào của vi khuẩn ở pha ổn định ít bị tác động hơn so với pha tăng trưởng. Về khả năng phục hồi, thì vi khuẩn <i>Enterococcus faecalis</i> ở pha tăng trưởng sẽ phục hồi chậm hơn.
<b>Ngày hoàn thiện:</b> 29/11/2024	
<b>Ngày đăng:</b> 30/11/2024	

### TỪ KHÓA

*Enterococcus faecalis*

Màng tế bào chất

Pha ổn định

Pha tăng trưởng

Xung ánh sáng

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11475>

\* Corresponding author. Email: nmmphuong@ctu.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Xung ánh sáng (Pulsed light, intense light pulse, intense pulsed light) là một trong những kỹ thuật xử lý không dùng nhiệt với khả năng xuyên thấu tương đối thấp, đã và đang được sử dụng rất nhiều trong việc khử nhiễm bề mặt trong các lĩnh vực như y tế, dụng cụ chế biến và cả lĩnh vực thực phẩm. Nguyên lý của phương pháp này là tích và phóng điện của tụ điện vào thiết bị phát sáng (đèn xenon) để phát ra ánh sáng trắng bao gồm ánh sáng hồng ngoại, ánh sáng khả kiến và ánh sáng tử ngoại (có bước sóng trong khoảng 200 nm – 1100 nm) với cường độ rất cao [1], [2]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, tác dụng tiêu diệt vi sinh vật của phương pháp này chủ yếu là do tia cực tím (200 nm – 400 nm) gây ra tác động phá hủy ADN của tế bào vi sinh vật [3], [4]. Bên cạnh đó, khi nghiên cứu cơ chế tác động của phương pháp này trên tế bào nấm men, Takeshita [3] cũng đã đề cập đến có một số cơ chế khác, ví dụ như màng tế bào chất bị ảnh hưởng và/hoặc bị phá vỡ và tăng kích thước không bào.

Có thể sử dụng công nghệ xung ánh sáng (Pulsed Light) để khử nhiễm thực phẩm, bao bì, nước và một số đối tượng khác có bề mặt nhẵn bóng và trong suốt [5], [4], với thời gian xử lý siêu ngắn của một tia phát xạ. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là có thể bị hạn chế bởi mức độ xuyên thấu và/hoặc hiệu ứng che khuất [4], [6], [7], việc này có thể làm thay đổi nhiều đặc điểm sinh lý của vi sinh vật khi bị chiếu xạ. Do đó, trong những trường hợp xử lý với cường độ thấp có thể được coi là một sự kích thích hoặc gây đột biến trên vi sinh vật mục tiêu và sẽ tạo ra những sự thay đổi nhất định trong quá trình tái phát triển và sinh tồn của vi sinh vật [8].

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) là một trong những loài vi khuẩn thuộc nhóm Coliforms có mặt tự nhiên và thường xuyên trong đường tiêu hóa của động vật máu nóng trong đó có con người và có vai trò như một nhóm vi sinh vật khởi xướng cho quá trình lên men và tiêu hóa thức ăn trong cơ thể. Sự hiện diện và phát triển mạnh mẽ của loài vi khuẩn này trong các môi trường như đất, cát, nước, thực vật và thực phẩm có thể được coi như một dạng ô nhiễm môi trường do chất thải từ phân động vật máu nóng [9]. Ngoài ra, các loại bệnh liên quan đến nhiễm trùng cơ hội, bao gồm viêm nội mạc, viêm màng não và vết thương, đường tiết niệu và nhiễm trùng máu cũng có liên quan đến loài vi khuẩn này [10], [11]. Nghiên cứu cho thấy 80% các trường hợp nhiễm trùng bệnh viện liên quan đến ruột cũng do chủng vi khuẩn này gây ra do khả năng sinh độc tố và sự phát triển quá mức của chúng trong môi trường [12]. Tuy không gây hại ở người khỏe mạnh có sức đề kháng tốt, nhưng với những bệnh nhân ở các đơn vị chăm sóc đặc biệt hay những người có sức đề kháng kém như bệnh nhân nhiễm HIV, người già yếu,... chủng cầu khuẩn này có thể trở nên nguy hiểm và gây bệnh cho họ [13].

Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm đánh giá tác động của xung ánh sáng lên chủng vi khuẩn *E. faecalis* V583 ở 2 giai đoạn phát triển khác nhau (giai đoạn tăng trưởng và giai đoạn ổn định). Xác định được mức độ năng lượng cần thiết để bất hoạt, cũng như các mức năng lượng có khả năng tác động đến quá trình phục hồi của chủng vi khuẩn này.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

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

*E. faecalis* V583 [14] được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ trong môi trường dinh dưỡng tổng hợp MCDE CAA Trp (Bảng 1) [15], [16]. Để xác định mật số vi khuẩn, thì huyền phù vi khuẩn đã nuôi cấy hoặc đã xử lý bằng xung ánh sáng được pha loãng trong dung dịch nước muối sinh lý 0,85% theo hệ số thập phân và được nuôi cấy bằng phương pháp trang đều trên bề mặt môi trường agar GM17 có bổ sung 0,5% dung dịch glucose [17]. Số đơn vị khuẩn lạc được hình thành (CFU) được đếm và tính sau 24 đến 48 giờ nuôi cấy trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C. Đối với các thí nghiệm theo dõi sự phục hồi của vi khuẩn, thì *E. faecalis* được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng tổng hợp MCDE Trp CAA đến OD<sub>580nm</sub> cuối cùng là  $0,8 \pm 0,05$ , tiếp theo được xử lý bằng xung ánh sáng với các cường độ năng lượng thay đổi lần lượt là  $2 \times 10^{-5}$ ; 0,06; 0,2; 0,3; 0,5 và 0,6 J.cm<sup>-2</sup>. Sau đó, các mẫu đã được xử lý và chưa xử lý (mẫu đối chứng) được cấy vào

môi trường dinh dưỡng mới MCDE CAA Trp với  $OD_{580nm}$  là 0,08 trong một bể chứa có 96 giếng nuôi cấy riêng biệt với sự hỗ trợ của của một đầu đọc trực tuyến tự động (SAFAS Xenius XML; SAFASmonaco, Monaco) thì sự phát triển của vi khuẩn được theo dõi trực tuyến mỗi 30 phút một lần, trong tổng thời gian 24 giờ nuôi cấy liên tục.

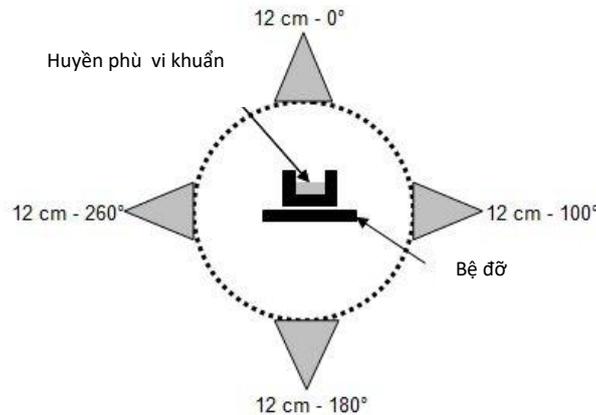
**Bảng 1.** Thành phần môi trường MCDE CAA Trp

Loại hợp chất	Nồng độ	Nguồn gốc
$KH_2PO_4$	20 mmol/L	Alfa Aesar GmbH&Co, Karlsruhe, Germany
$KHPO_4$	60 mmol/L	Germany
Ammonium citrat	2,47 mmol/L	Alfa Aesar GmbH&Co, Karlsruhe, Germany
Sodium acetate	7,35 mmol/L	Germany
Pyridoxal	9,8 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Nicotinic acid	8,1 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Thiamine	3 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
hydrochloride	2,7 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Riboflavin	4,2 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
DL-Pantothenic acid	72,9 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
salt	4,1 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
4-Aminobenzoic acid	2,1 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Biotin	0,7 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Folic acid	32 $\mu$ mol/L	Aldrich, St Louis, MO, USA
Vitamin B12	20,6 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Orotic acid	18,6 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Thymidine	12,2 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Inosine	20,7 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
dl-Thiothiic acid	984 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
Pyridoxamine	340 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
$MgCl_2$	25 $\mu$ mol/L	Alfa Aesar GmbH&Co
$CaCl_2$	17,4 $\mu$ mol/L	Acros Organics, Geel, Belgium
$FeCl_2$	10,5 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
$ZnSO_4$	0,4 $\mu$ mol/L	Sigma Aldrich
$CoCl_2$	165 $\mu$ mol/L	Acros Organics, Geel, Belgium
$CuSO_4$	74 mmol/L	Sigma Aldrich
$MnSO_4$	89,2 mmol/L	Sigma Aldrich
Adenine	65,7 mmol/L	Sigma Aldrich
Uracil	66,2 mmol/L	Sigma Aldrich
Xanthine	1,5%	Sigma Aldrich
Guanine	0,49 mmol/L	Sigma Aldrich
Casamino acids	0,5%	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France
Tryptophan		France
Glucose		Sigma Aldrich
		Merck, Darmstadt, Germany

(Nguồn: [15], [16])

## 2.2. Phương pháp xử lý xung ánh sáng

Thiết bị xử lý xung ánh sáng gồm có 1 bộ phận tích điện và 1 buồng xử lý được cung cấp bởi Claranor (Pháp), trong buồng xử lý có 4 đèn xenon dạng hình trụ (Hình 1) [16]. Với thiết bị này một loạt các xung ánh sáng có bước sóng từ 200 đến 1100 nm và thời gian của mỗi xung là 300  $\mu$ s có thể được tạo ra liên tục để phục vụ cho việc thay đổi cường độ năng lượng xử lý mẫu. Khi xử lý mẫu thì dùng 1 hộp thạch anh có kích thước 20x10x4 cm để chứa đựng huyền phù vi khuẩn và cường độ năng lượng được điều chỉnh từ  $2 \times 10^{-5}$  đến 0,6  $J \cdot cm^{-2}$  như mô tả chi tiết ở mục 2.1 [16]. 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.



**Hình 1.** Sơ đồ minh họa buồng xử lý xung ánh sáng (Claranor) [16]

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

Mẫu tế bào vi khuẩn *E. faecalis* V583 đã được xử lý bằng xung ánh sáng và mẫu đối chứng được ly tâm ở 10.000g, 4°C trong thời gian 10 phút. Dùng màng lọc cellulose-acetate 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore Whatman, Đức) để lọc lấy phần dịch lỏng và phần này được bảo quản trong đá vảy để ổn định nhiệt độ. Cho vào cuvet 400  $\mu\text{l}$  dịch lọc, 400  $\mu\text{l}$  nước cất và 200  $\mu\text{l}$  dịch thuốc thử Bradford 5X (kit Bio-rad Protein Assay, Biorad). Tất cả hỗn hợp được lắc nhẹ bằng tay và để yên 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, mẫu sẽ được đo quang ở bước sóng 595nm bằng thiết bị quang phổ (Helios Epsilon Spectrophotometer, Thermospectronic, Mỹ). Kết quả nồng độ protein trong dung dịch sẽ được tính bằng cách nội suy dựa vào đường chuẩn của albumin huyết thanh bò (BSA, Sigma) với nồng độ thay đổi từ 0 đến 8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  [18].

### 2.4. Phương pháp kiểm tra mật số vi khuẩn *Enterococcus faecalis*

Mật số vi khuẩn *E. faecalis* được kiểm tra bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. 1 ml mẫu huyền phù vi khuẩn trước và sau khi xử lý bằng xung ánh sáng ở các cường độ xử lý khác nhau được pha loãng trong 9 ml dung dịch nước muối sinh lý 0,85% theo hệ số thập phân. Tiếp theo, 0,1 mL các nồng độ pha loãng sẽ được cấy trang trên bề mặt môi trường dinh dưỡng aga GM17 có bổ sung 0,5% glucose. Đếm số khuẩn lạc hình thành (CFU) trên bề mặt môi trường dinh dưỡng sau khi các đĩa Petri được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 đến 48 giờ. Mẫu phân tích được thực hiện lặp lại ít nhất 3 lần.

### 2.5. Đánh giá sự phục hồi của vi khuẩn *Enterococcus faecalis*

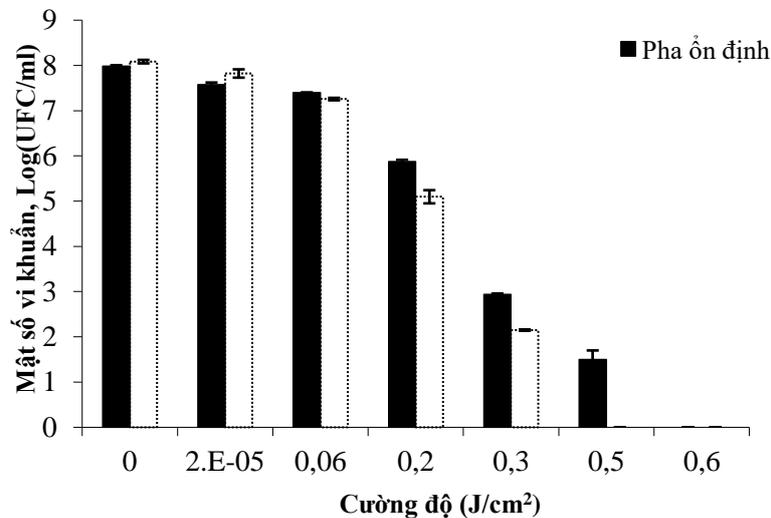
Khả năng phục hồi của vi khuẩn *E. faecalis* V583 được đánh giá thông qua sự phát triển của vi khuẩn này trong môi trường dinh dưỡng MCDE Trp CAA ở nhiệt độ 37°C và được theo dõi trực tuyến bằng cách đo độ đục của dung dịch ở bước sóng 580 nm với sự trợ giúp của máy đo quang phổ (Thermo Spectronic™, Helios  $\epsilon$ ). Song song đó, các mẫu ở độ đục khác nhau cũng được đếm mật số vi khuẩn trực tiếp trên môi trường aga GM17 có bổ sung 0,5% glucose, nhằm thiết lập được mối quan hệ giữa độ đục và mật số của vi khuẩn, giúp cho việc nội suy mật số vi khuẩn từ kết quả đo độ đục khi cần thiết.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Hiệu quả xử lý huyền phù vi khuẩn *Enterococcus faecalis* của xung ánh sáng

Xung ánh sáng được biết đến là một phương pháp diệt khuẩn không sử dụng nhiệt cùng với khả năng xuyên thấu kém, tuy nhiên với dung dịch lỏng thì hiệu quả xử lý của phương pháp này tăng lên và hiệu quả càng tăng cao khi độ trong của dung dịch càng tăng. Huyền phù vi khuẩn *E.*

*faecalis* được xử lý bằng xung ánh sáng ở các mức năng lượng từ 0 – 0,6 J/cm<sup>2</sup> sẽ cho thấy tác dụng bất hoạt vi khuẩn của phương pháp này. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 2.

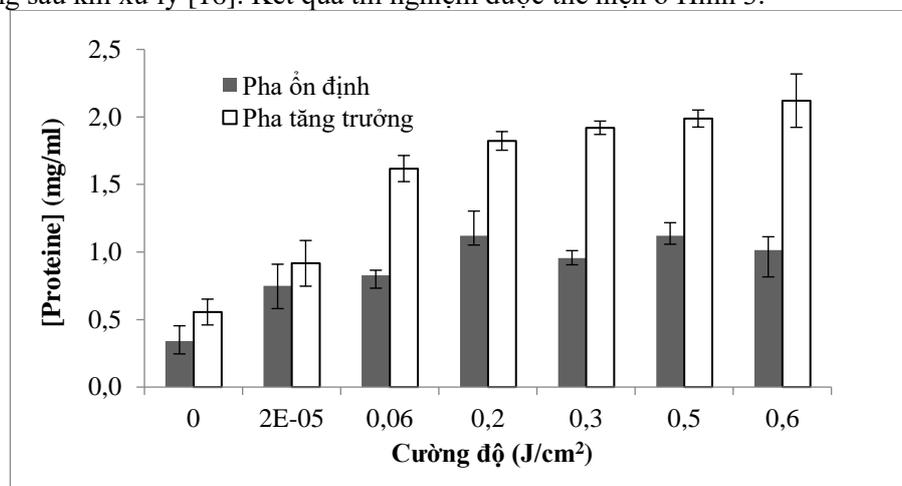


Hình 2. Hiệu quả bất hoạt vi khuẩn *E. faecalis* bằng xung ánh sáng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, xung ánh sáng có khả năng cao trong việc tiêu diệt vi khuẩn *E. faecalis* ở dạng huyền phù, cụ thể chỉ cần mức năng lượng khoảng 0,6 J/cm<sup>2</sup> cũng đã đủ để tiêu diệt hoàn toàn vi khuẩn này trong huyền phù với mật độ 10<sup>8</sup> CFU/ml. Khi tế bào vi sinh vật tiếp xúc với một nguồn năng lượng đủ lớn của xung ánh sáng thì sẽ tạo ra nhiều biến đổi bên trong tế bào, đặc biệt là biến đổi quang hóa gây ảnh hưởng đến cấu trúc DNA (tạo liên kết nhị hợp, đứt gãy DNA) là nguyên nhân chính dẫn đến bất hoạt tế bào vi sinh vật [6], [8], bên cạnh đó các biến đổi quang nhiệt và vật lý cũng có thể là nguyên nhân kết hợp để gây chết tế bào [3], [16]. Hay Cai và cộng sự [19] nhận thấy rằng PL tác động lên tế bào vi sinh vật tạo ra các gốc oxy hóa hoạt động (ROS) cũng góp phần làm bất hoạt tế bào. Ngoài ra, một vấn đề rất chú ý trong kết quả này là hiệu quả bất hoạt vi khuẩn của xung ánh sáng còn phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của vi khuẩn đang nghiên cứu. Cụ thể là huyền phù vi khuẩn này ở giai đoạn tăng trưởng nhạy cảm với phương pháp xử lý hơn so với huyền phù vi khuẩn này ở giai đoạn ổn định. Thật vậy, khi xử lý xung ánh sáng với huyền phù vi khuẩn *E. faecalis* ở giai đoạn tăng trưởng thì chỉ cần nguồn năng lượng 0,5 J/cm<sup>2</sup> là đủ để tiêu diệt hoàn toàn 8 log CFU của vi khuẩn, tuy nhiên để tiêu diệt một số lượng vi khuẩn *E. faecalis* giống như thế nhưng ở giai đoạn ổn định thì phải cần đến nguồn năng lượng 0,6 J/cm<sup>2</sup>. Kết quả nghiên cứu như trên cũng đã được công bố bởi nhiều tác giả. Theo nghiên cứu của Cai và cộng sự [19] trên *Alicyclobacillus acidoterrestris*, một loại vi khuẩn ưa acid chịu nhiệt, kết quả cho thấy khi cấy loại vi khuẩn này vào dịch nước ép táo có nồng độ chất khô hòa tan trong khoảng (8-20°Brix) với mật số 10<sup>5</sup> CFU/ml và xử lý bằng xung ánh sáng, để bất hoạt hoàn toàn mẫu vi khuẩn này ở pha tăng trưởng thì cần nguồn năng lượng 20,25 – 47,25 J/cm<sup>2</sup> (phụ thuộc vào nồng độ chất khô hòa tan trong dịch nước ép táo). Đối với loại vi khuẩn này ở pha ổn định, thì phải cần nguồn năng lượng tới 54,00 J/cm<sup>2</sup>. Hay nghiên cứu của Agrawal và cộng sự [20] cho thấy mẫu vi khuẩn *E. Coli* ở pha ổn định có khả năng hạn chế sự tấn công của peptides kháng khuẩn cao hơn nhiều so với mẫu vi khuẩn *E. Coli* ở giữa pha tăng trưởng. Thật vậy, để peptides kháng khuẩn có thể thâm thấu vào màng nguyên sinh chất của vi khuẩn *E. Coli* ở pha ổn định thì cần nồng độ cao gấp 10 lần so với vi khuẩn *E. Coli* ở giữa pha tăng trưởng, ngoài ra quá trình thâm thấu này cũng diễn ra rất chậm khi xử lý vi khuẩn *E. Coli* ở pha ổn định [20]. Một dạng xử lý khác khi tác động lên vi sinh vật cũng cho thấy các mẫu vi sinh vật ở pha ổn định có khả năng chịu đựng tốt hơn rất nhiều so với các mẫu vi sinh vật được nuôi cấy ở pha tăng trưởng. Khi nghiên cứu tác động của áp suất cao tạo nên stress oxy hóa nội bào để bất hoạt vi

khuẩn *E. coli*, Aertsen và cộng sự [21] nhận thấy rằng để bất hoạt mẫu vi khuẩn *E. coli* MG1655 ở pha ổn định thì áp suất sử dụng ít nhất phải lên tới 400 Mpa. Trong khi đối với mẫu vi khuẩn này ở pha tăng trưởng thì chỉ cần áp suất khoảng 150 Mpa là đã bắt đầu bất hoạt chúng, đồng thời nếu số lượng tế bào càng giảm thì áp suất đòi hỏi để bất hoạt chúng cũng giảm theo. Ở một nghiên cứu khác Gao và cộng sự [22] đã cho thấy huyền phù vi khuẩn *Enterococcus aerogenes* ở pha tăng trưởng nhạy cảm hơn nhiều với sóng siêu âm so với huyền phù của vi khuẩn này ở pha ổn định. Ở các giai đoạn phát triển khác nhau của vi khuẩn, khả năng chống chịu với điều kiện bên ngoài sẽ khác nhau. Đặc biệt là khi so sánh giai đoạn ổn định và giai đoạn phát triển của vi khuẩn. Ở giai đoạn phát triển, vi khuẩn trao đổi chất mạnh, sinh sản nhanh, do đó chúng rất nhạy cảm với các điều kiện bên ngoài môi trường [16], [19].

Một trong những nghiên cứu giúp giải thích cho cơ chế tác động của các phương pháp bất hoạt vi sinh vật trong đó có xung ánh sáng là phân tích ảnh hưởng của phương pháp xử lý đến màng tế bào của vi sinh vật bằng cách đo hàm lượng protein màng tế bào chất đã được trích ly ra môi trường sau khi xử lý [16]. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 3.



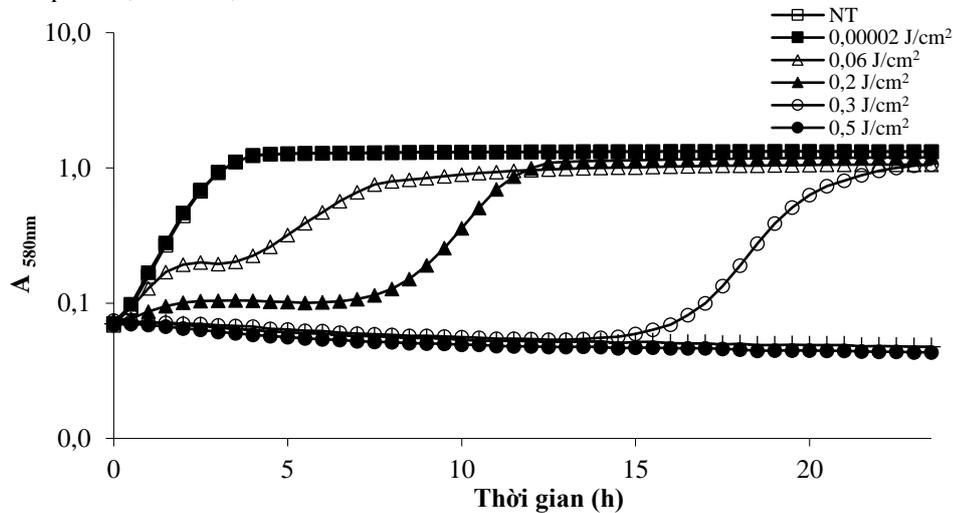
**Hình 3.** Hàm lượng protein trích ly ra môi trường sau khi xử lý *E. faecalis* bằng xung ánh sáng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng protein màng tế bào chất của vi khuẩn bị trích ly ra môi trường tăng đáng kể theo cường độ năng lượng của xung ánh sáng (Hình 3). Đồng thời, một chỉ báo quan trọng được chú ý ở đây là màng tế bào chất của vi khuẩn *E. faecalis* ở pha tăng trưởng bị ảnh hưởng mạnh hơn nhiều so với màng tế bào chất của vi khuẩn *E. faecalis* ở pha ổn định (Hình 3). Thật vậy, kết quả cho thấy loại vi khuẩn này ở pha tăng trưởng nhạy cảm hơn (dễ bị tiêu diệt hơn) với xung ánh sáng so với chúng khi được phân tích ở pha ổn định (Hình 2). Các công bố trước đây cho thấy khi đánh giá tác động đến màng tế bào chất của vi khuẩn *Alicyclobacillus acidoterrestris* bằng cách theo dõi lượng protein trích ly ra môi trường sau khi xử lý bằng xung ánh sáng thì cho thấy cả hai trạng thái của vi khuẩn (pha ổn định và pha tăng trưởng) đều bị ảnh hưởng bởi xung ánh sáng và vi khuẩn ở pha tăng trưởng bị tác động mạnh hơn vi khuẩn ở pha ổn định [19]. Kết quả tương tự cũng đã được Pagan và Mackey [23] nghiên cứu trên chủng *E. coli* ở 2 giai đoạn phát triển (pha tăng trưởng và pha ổn định) bằng việc xử lý với áp suất cao và nhiệt. Kết quả cho thấy màng tế bào của vi khuẩn này ở pha ổn định ít bị tổn thương hơn và đòi hỏi một áp suất và nhiệt độ cao hơn để bất hoạt chúng.

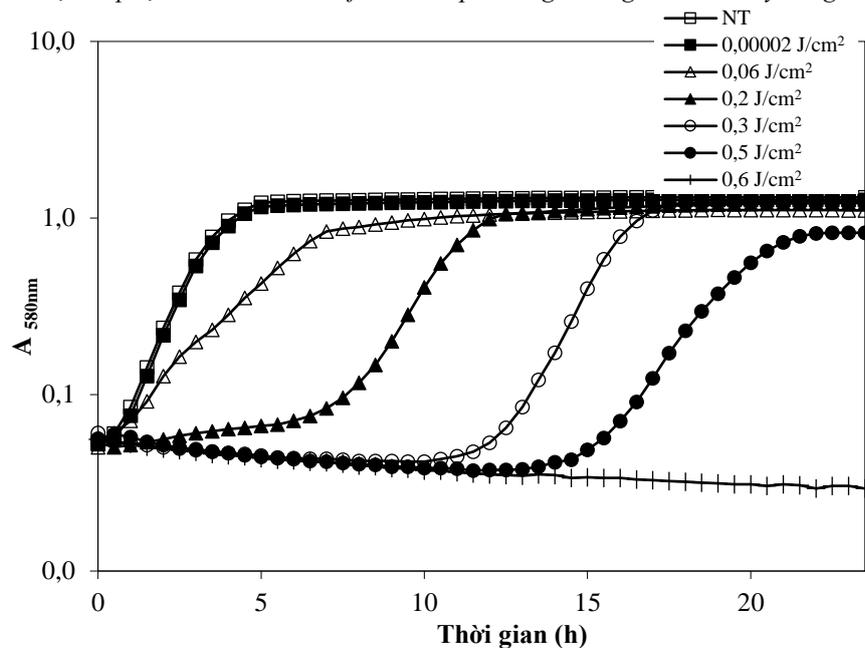
### 3.2. Sự phục hồi của *Enterococcus faecalis* sau khi xử lý bằng xung ánh sáng

Khi xử lý huyền phù vi sinh vật bằng xung ánh sáng với các cường độ khác nhau, thì khả năng tác động và/hoặc tiêu diệt đến vi sinh vật trong huyền phù sẽ khác nhau (Hình 2). Vì vậy nghiên cứu sẽ thực hiện bước tiếp theo là sau khi xử lý các loại huyền phù của vi khuẩn *E. faecalis* ở 2

pha khác nhau, rồi sau đó sẽ đem đi nuôi cấy lại và theo dõi khả năng hồi phục của chúng theo thời gian. Kết quả được thể hiện ở Hình 4 và Hình 5.



**Hình 4.** Sự hồi phục của vi khuẩn *E. faecalis* ở pha tăng trưởng sau khi xử lý xung ánh sáng



**Hình 5.** Sự hồi phục của vi khuẩn *E. faecalis* ở pha ổn định sau khi xử lý xung ánh sáng

Kết quả nghiên cứu ở Hình 4 và Hình 5 cho thấy ở mức năng lượng xử lý thấp, thì vi khuẩn chỉ bị bất hoạt một phần hoặc không bị bất hoạt, nên khi được nuôi cấy lại trong môi trường dinh dưỡng mới thì chúng sẽ lại tiếp tục phát triển (khả năng hồi phục nhanh). Kết quả cũng cho thấy khi xử lý ở mức năng lượng càng thấp thì khi nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng mới chúng phát triển càng nhanh. Cụ thể, ở cường độ năng lượng xử lý 0,00002 J/cm<sup>2</sup> và 0,06 J/cm<sup>2</sup> thì khi nuôi cấy lại, pha tăng trưởng đến rất nhanh, còn ở cường độ năng lượng xử lý 0,2 J/cm<sup>2</sup> và 0,3 J/cm<sup>2</sup> thì pha tăng trưởng chỉ đến sau 5 đến 15 giờ nuôi cấy. Kết quả phân tích proteomic của Masier và cộng sự [16] cho thấy khi xử lý vi khuẩn *E. faecalis* bằng xung ánh sáng với năng lượng thấp thì sẽ hình thành nhiều loại protein mới trong tế bào (enolase EF1961, triosephosphate isomerase EF1962, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EF1964, 6-phosphofructokinase

EF1045 và ornithine carbamoyltransferase EF0105) để đáp ứng với tác động của xung ánh sáng, trong khi xử lý với nguồn năng lượng cao, thì hiện tượng này không xảy ra [16]. Bên anh đó, nghiên cứu của Hwang và cộng sự [24] cho thấy khi vi khuẩn tiếp xúc với xung ánh sáng có mức năng lượng thấp thì sẽ kích thích quá trình đột biến của tế bào, giúp cho tế bào vi khuẩn chống chịu tốt hơn với các xử lý tiếp theo. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu ở Hình 4 và Hình 5 cũng cho thấy vi khuẩn *E. faecalis* ở pha tăng trưởng nhạy cảm hơn với xung ánh sáng so với vi khuẩn này ở pha ổn định. Thật vậy, khi so sánh khả năng hồi phục của loại vi khuẩn này sau khi xử lý ở cường độ  $0,3 \text{ J/cm}^2$ , thì kết quả cho thấy giai đoạn tăng trưởng chỉ đến sau 15 giờ nuôi cấy đối với huyền phù vi khuẩn ở giai đoạn tăng trưởng đã được xử lý bằng xung ánh sáng (Hình 4). Còn đối với loại vi khuẩn này ở giai đoạn ổn định, thì sau khi xử lý bằng xung ánh sáng và nuôi cấy lại trong môi trường dinh dưỡng mới, giai đoạn tăng trưởng sẽ đến sau khoảng 10 giờ nuôi cấy (Hình 5). Thêm nữa, khi xử lý ở cường độ năng lượng cao hơn thì huyền phù vi khuẩn ở giai đoạn tăng trưởng sẽ bị bất hoạt hoàn toàn ở cường độ xử lý  $0,5 \text{ J/cm}^2$  (Hình 2, Hình 4), còn đối với huyền phù vi khuẩn ở giai đoạn ổn định thì cần tới nguồn năng lượng  $0,6 \text{ J/cm}^2$  mới đủ bất hoạt hoàn toàn (Hình 2, Hình 5). Các nghiên cứu công bố trước đó cũng cho thấy kết quả tương tự. Kết quả nghiên cứu của Hwang và cộng sự [24] cho thấy hiệu quả khử khuẩn của xung ánh sáng phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, trong đó có những yếu tố liên quan đến đối tượng cần xử lý. Theo các tác giả này thì khi xử lý *E. coli* ATCC 25922 bằng xung ánh sáng thì hiệu quả của phương pháp này phụ thuộc nhiều vào mật số vi khuẩn ban đầu, trạng thái của vi khuẩn khi xử lý (bào tử, tế bào sinh dưỡng ở pha ổn định hay tế bào sinh dưỡng ở pha tăng trưởng). Khi ở pha tăng trưởng thì vi khuẩn nhạy cảm hơn, chỉ cần nguồn năng lượng  $0,51 \text{ J/cm}^2$  đã đủ để bất hoạt hoàn toàn. Còn đối với vi khuẩn ở pha ổn định thì cần nguồn năng lượng  $0,67 \text{ J/cm}^2$  để bất hoạt hoàn toàn chúng khi xử lý ở cùng một nồng độ vi khuẩn ban đầu [24].

#### 4. Kết luận

Việc đánh giá hiệu quả bất hoạt vi sinh vật hay giải thích cơ chế tác động của các phương pháp xử lý đến vi sinh vật là một việc làm cần thiết. Kết quả nghiên cứu này cho thấy xung ánh sáng có tác động mạnh mẽ lên huyền phù vi khuẩn mục tiêu đã sử dụng. Đồng thời, trạng thái vi khuẩn khác nhau cũng ảnh hưởng đến hiệu quả bất hoạt của xung ánh sáng. Cụ thể, để bất hoạt hoàn toàn huyền phù vi khuẩn *E. faecalis* ở pha tăng trưởng thì cần nguồn năng lượng xử lý là  $0,5 \text{ J/cm}^2$ , trong khi với huyền phù vi khuẩn này ở pha ổn định thì cần tới nguồn năng lượng là  $0,6 \text{ J/cm}^2$  mới đủ để tiêu diệt hoàn toàn chúng. Bên cạnh đó, xét về mức độ ảnh hưởng tới màng tế bào chất khi xử lý xung ánh sáng thì kết quả cho thấy màng tế bào chất của vi khuẩn ở pha tăng trưởng bị ảnh hưởng mạnh mẽ hơn so với vi khuẩn này ở pha ổn định. Cụ thể là protein tế bào chất của vi khuẩn ở pha tăng trưởng bị thoát ra môi trường nhiều hơn đáng kể so với vi khuẩn ở pha ổn định sau khi xử lý bằng xung ánh sáng. Bên cạnh đó, dưới tác động với nguồn năng lượng thấp của xung ánh sáng, thì vi khuẩn mục tiêu ở pha ổn định có khả năng hồi phục nhanh hơn vi khuẩn này ở pha tăng trưởng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Wekhof, "Desinfection with flash lamps," *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 54, pp. 264-276, 2000.
- [2] F. Schottroff, A. Frohling, M. Zunabovic-Pichler, A. Krottenthaler, O. Schluter, and H. Jager, "Sublethal injury and viable but non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, pp. 1-19, 2018.
- [3] K. Takeshita, J. Shibato, T. Sameshima, S. Fukunaga, S. Isobe, K. Arihara, and M. Itoh, "Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, pp. 151-158, 2003.
- [4] V. M. Gomez-Lopez, P. Ragaert, J. Debevere, and F. Devkghere, "Pulsed light for food decontamination: a review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 18, pp. 464-473, 2007.

- [5] N. Elmasser, S. Guillou, F. Leroi, N. Orange, A. Bakhrouf, and M. Federighi, "Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review," *Canadian Journal Microbiolog*, vol. 53, pp. 813-821, 2007.
- [6] D. Marquenie, C. W. Michiels, J. F. V. Impe, E. Schrevels, and B. N. Nicolai, "Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 28, pp. 455-461, 2003.
- [7] E. Y. Wuytack, L. D. T. Phuong, A. Aertsen *et al.*, "Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by heat and by different nonthermal treatments," *Journal of Food Protection*, vol. 66, pp. 31-37, 2003.
- [8] B. L. Nguyen and I. Nicorescu, "Adaptation and mutation ability of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* vegetative cells under the effect of a pulsed light stress," *CTU Journal of Science*, vol. 41, pp. 21-29, 2015.
- [9] J. O. Mundt, "Enterococci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*," *Williams and Wilkins Baltimore*, vol. 2, pp. 1063-1065, 1986.
- [10] H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond, "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 39, pp. 309-317, 2004.
- [11] B. E. Murray and G. M. Weinstock, "Enterococci: new aspects of an old organism," *Proceeding of the Association of American Physicians*, vol. 111, pp. 328-334, 1999.
- [12] L. E. Hancock and M. S. Gilmore, "Pathogenicity of enterococci. In *Gram-Positive Pathogens* ed. Fischetti," *American Society for Microbiology*, vol. 25, pp. 251-258, 2006.
- [13] J. C. Ogier and P. Serror, "Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, pp. 291-301, 2008.
- [14] D. F. Sahn, J. Kissinger, M. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday, and B. Clarke, "In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 33, pp. 1599-1591, 1989.
- [15] F. Reffuveille, P. Serror, S. Chevalier, A. Budin-Verneuil, R. Ladjouzi, B. Bernay, Y. Auffray, and A. Rince, "The prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) of *Enterococcus faecalis* contributes to virulence," *Microbiology*, vol. 158, pp. 816-825, 2011.
- [16] S. Massier, A. Rince, O. Maillot, M. G. Feuilloley, N. Orange, and S. Chevalier, "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a pulsed light-induced stress," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, pp. 502-511, 2012.
- [17] B. E. Terzaghi and W. E. Sandine, "Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages," *Applied Microbiology*, vol. 29, pp. 807-813, 1975.
- [18] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [19] R. Cai, Y. Ma, Z. Wang, Y. Yuan, H. Guo, Q. Sheng, and T. Yue, "Inactivation activity and mechanism of pulsed light against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores in concentrated apple juice," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 413, pp. 1-12, 2024.
- [20] A. Agrawal, N. Rangarajan, and J. C. Weisshaar, "Resistance of early stationary phase *E. coli* to membrane permeabilization by the antimicrobial peptide Cecropin A," *BBA – Biomembranes*, vol. 1861, no. 10, pp. 1-10, 2019.
- [21] A. Aertsen, P. D. Spiegeleer, K. Vanoirbeek, M. Lavilla, and C. W. Michiels, "Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 5, pp. 2226-2231, 2005.
- [22] S. Gao, G. D. Lewis, M. Ashokkumar, and Y. Hemar, "Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 21, pp. 446-453, 2014.
- [23] R. Pagan and P. Mackey, "Relationship between Membrane Damage and Cell Death in Pressure-Treated *Escherichia coli* Cells: Differences between Exponential- and Stationary-Phase Cells and Variation among Strains," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 7, pp. 2829-2834., 2000.
- [24] H. J. Hwang, B. W. Park and M. S. Chung, "Comparison of microbial reduction effect of intense pulsed light according to growth stage and population density of *Escherichia coli* ATCC 25922 using a double Weibull model," *Food Research International*, vol. 164, pp. 1-8, 2023.