NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG DIỆT NẤM MỐC *ASPERGILLUS FLAVUS* BẰNG PLASMA LẠNH Ở ÁP SUẤT KHÍ QUYỂN

Nguyễn Văn Hảo[1,2*], Nguyễn Trường Sơn[2], Trịnh Đình Khá[1], Nguyễn Xuân Hưởng[1], Phạm Tuấn Hưng[1], Vũ Xuân Hòa[1] và Đỗ Hoàng Tùng[2]

[1]*Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên*

[2]*Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

TÓM TẮT

Plasma lạnh ở áp suất khí quyển có thể khử trùng chống lại hầu hết các loại vi khuẩn và nấm mốc bởi vì các loại hoạt tính và ion, chẳng hạn như nguyên tử hydro, các ion, electron, tia tử ngoại và ozon... được phát ra trong quá trình phóng tia plasma. Vì vậy, đây được coi là một phương pháp tiệt trùng hiệu quả hơn các phương pháp thông thường như sấy khô, chiếu xạ tia gama, axitperacetic... Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả về việc sử dụng nguồn plasma DBD (Dielectric Barrier Discharge) ở áp suất khí quyển để tiêu diệt nấm mốc *Aspergillus flavus*. Kết quả cho thấy, thời gian diệt sạch bào tử nấm ở vùng tác dụng chỉ cần tối đa 100 giây. Do đó nguồn plasma DBD ở áp suất khí quyển có thể được sử dụng như một phương pháp hữu hiệu để diệt nấm mốc.

Từ khóa: *Khử nấm mốc, plasma lạnh, DBD, Aspergillus flavus, plasma ở áp suất khí quyển*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Plasma là khí bị ion hóa (một phần) chứa các điện tích tự do (electron và ion), các gốc tự do cũng như các phân tử và nguyên tử ở trạng thái kích thích [1], [2]. Plasma ở áp suất khí quyển đã được phát triển cho nhiều ứng dụng như mạch in, khắc lỗ [3], biến tính bề mặt các vật liệu polyme [4], làm sạch không khí [5] và khử trùng [6], [7], [8]. Ngày nay, các nghiên cứu về vô khuẩn bằng plasma ngày càng tăng.

Khử trùng là một quá trình vật lý và hóa học mà làm suy yếu hoặc loại bỏ các vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn và nấm mốc. Trong một thời gian dài, các nhà khoa học đã báo cáo rằng plasma có thể giết chết hay ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn hay nấm mốc. Thông thường, phương pháp khử trùng như nhiệt độ, dung dịch hóa học được sử dụng để khử trùng bề mặt của quả, hạt, các loại gia vị và thức ăn...thường tốn nhiều thời gian và gây tổn hại hoặc có dư lượng chất độc hại [9]. Van de Veen và cộng sự [10] đã báo cáo rằng tác động của plasma lạnh vào các bào tử nấm, vi khuẩn nhiều hơn so với các kỹ thuật thông thường như sấy nóng, hóa chất và xử lý UV.

Trong số 10.000 loại nấm mốc khác nhau được biết đến thì có khoảng 50 loại là có hại đối với gia súc, gia cầm và con người. Các loại nấm này sản sinh ra các độc tố được gọi chung là Mycotoxin [11]. Mycotoxin là chất độc sinh ra từ nấm mốc, được hình thành khi nấm chuyển hóa các chất dinh dưỡng có trong thức ăn và nguyên liệu. Sự hình thành nấm mốc và độc tố của chúng có thể bắt đầu từ khi cây còn ở trên đồng, lúc thu hoạch, trong khi bảo quản hoặc ngay cả trong quá trình chế biến thức ăn cho vật nuôi. Như vậy, không nơi nào trên thế giới có thể thoát khỏi nấm mốc và độc tố từ chúng, và tác hại của chúng là vô cùng to lớn đối với năng suất vật nuôi và sức khỏe con người.

Trước đây người ta cho rằng, độc tố nấm mốc ở mỗi nơi có khác nhau do điều kiện địa lý của từng khu vực. Chẳng hạn như: độc tố *Aflatoxin* thì thường được tìm thấy ở khu vực nhiệt đới, trong khi đó thì độc tố *Zearalenon* thường tìm thấy ở xứ ôn đới. Nhưng ngày nay khi nguyên liệu thức ăn (khô dầu đậu nành, hạt hoặc bã bắp, dầu cọ...) được mua bán, chuyên chở từ khu vực này đến khu vực khác thì việc cộng hưởng của các loại *mycotoxin* là dễ xảy ra. Điều này là nỗi ám ảnh cho các nhà chăn nuôi và họ luôn tìm cách để loại trừ, vì họ biết sự có mặt độc tố trong thức ăn không những làm giảm giá trị dinh dưỡng của thức

* *Tel: 0989 348258, Email: haonv@tnus.edu.vn*

ăn mà còn sản sinh ra các độc tố gây bệnh cho vật nuôi. *Aflatoxin* là độc tố của nấm *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* - có nhiều ở hạt bắp, đậu phộng và một vài loại hạt khác có chứa dầu. Nó không chỉ là độc tố nấm mốc gây nhiễm độc, gây rối loạn chức năng, gây suy giảm miễn dịch, thoái hóa gan thận mà còn gây chết gia súc trong trường hợp nhiễm độc với hàm lượng lớn. *Aflatoxin* cũng được chứng minh là chất độc gây ung thư cho động vật thí nghiệm, do đó rất nguy hiểm đối với con người [12].

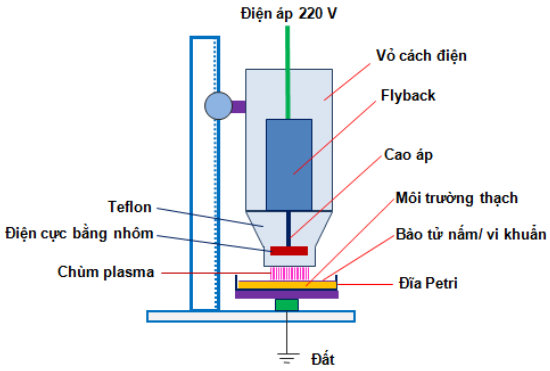
Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả của việc diệt nấm mốc *Aspergillus flavus (A. flavus*) thường nhiễm trong thức ăn chăn nuôi bằng plasma nhờ sử dụng nguồn plasma DBD ở áp suất khí quyển.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn plasma lạnh mà chúng tôi đã chế tạo cho thử nghiệm ức chế và tiêu diệt nấm mốc hoạt động dựa trên nguyên lý của sự phóng điện qua hàng rào điện môi (DBD- Dielectric Barrier Discharge) [6, 13, 14]. DBD gồm hai điện cực bằng nhôm có dạng hình trụ với đường kính 35 mm, được đặt trong lớp điện môi teflon có độ dày 2 mm. Điện cực thứ 2 là các vật liệu với điện dung cao hoặc được nối đất. Sự phóng điện kích thích xảy ra khi điện cực được cấp điện tiếp xúc với bề mặt điều trị ở một khoảng cách thích hợp (< 3 mm) tùy thuộc vào thời gian và độ phân cực của điện áp đặt vào. Một nguồn xung điện thế cao (~17 kV được đặt vào điện cực của DBD) được tạo ra nhờ một mạch tạo xung và dao động kết nối với một biến thế flyback. Mỗi xung kích thích khởi tạo một chuỗi xung điện cao áp và dao động tắt dần với tần số ~ 13 kHz. Nguồn plasma hoạt động ở điều kiện ổn định mà không cần thêm dòng khí [13, 14].

Chủng nấm mốc *Aspergillus flavus (A. flavus)* phân lập từ ngô bị mốc được nuôi cấy và lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.

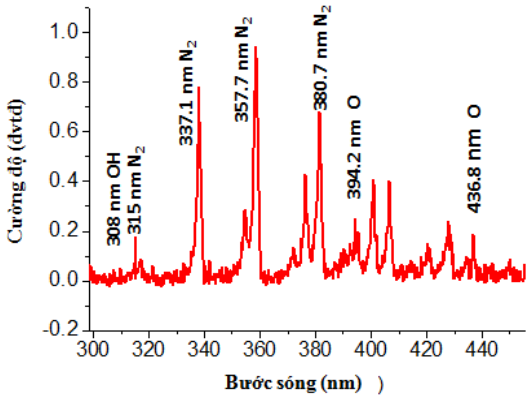
Chủng nấm mốc *A. flavus* được nuôi cấy trên môi trường PDA sau 3 ngày ở 30 °C thu bào tử bằng đệm PBS (phosphate buffer saline) tạo thành dịch huyền phù bào tử có nồng độ 10^6 bào tử/ml. 10^6 bào tử nấm được cấy trang đều trên đĩa petri (Φ 9 cm) chứa môi trường PDA dày 0,3 mm. Sau đó, các mẫu được xử lý bằng tia plasma trong thời gian khác nhau ở điều kiện nhiệt độ phòng. Các đĩa sau khi xử lý tia plasma được nuôi trong điều kiện 30 °C sau 72 h quan sát hiệu quả diệt bào tử nấm. Giản đồ thực nghiệm khử bào tử nấm bằng nguồn plasma DBD được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. *Giản đồ hệ khử bào tử nấm sử dụng plasma DBD*

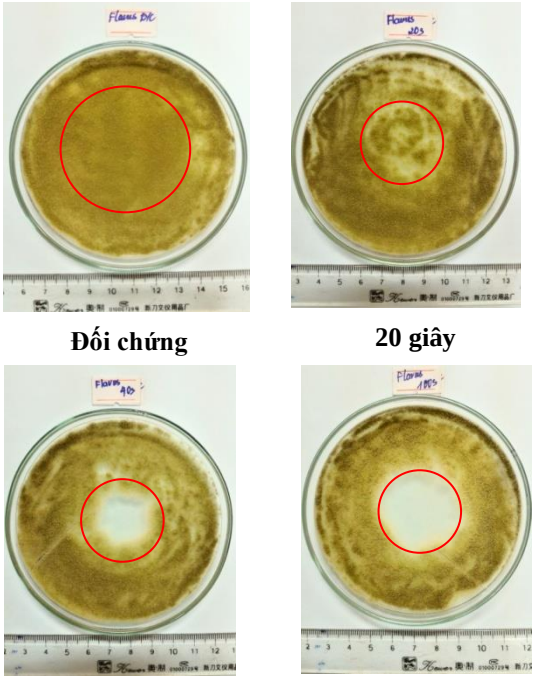
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phổ phát xạ quang OES đã được đo để xác định các thành phần phổ phát ra từ plasma DBD, chẳng hạn như các gốc tự do, ozôn và các bức xạ UV. Các vạch xuất hiện ở hai dải phổ ứng với các dịch chuyển mạnh của phân tử N_2 (315 nm, 337 nm, 357 nm và 380,7 nm), gốc OH (308 nm) và nguyên tử Oxy (394,2 nm và 436,8 nm) (Hình 2).



Hình 2. *Phổ phát xạ quang OES của plasma DBD trong không khí*

Theo nguyên lý vật lý, plasma DBD được phóng ra ở áp suất khí quyển là an toàn, do đó chúng ta có thể ứng dụng trực tiếp nguồn plasma này lên các mô sống của con người hay động vật với nhiều loại điều trị khác nhau trong y tế, thẩm mỹ hay trong nông nghiệp, môi trường… [15-17].



Hình 3. *Kết quả diệt bào tử nấm A. flavus (nồng độ 10^6 bào tử/ml) ở các thời gian xử lý khác nhau.*

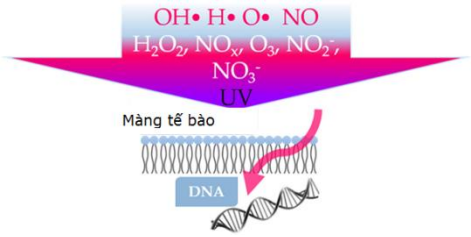
Để kiểm tra khả năng ức chế và tiêu diệt nấm mốc của nguồn plasma DBD mà chúng tôi đã chế tạo, chúng tôi đã sử dụng bào tử nấm *A. flavus*. Hình 3 là kết quả thu được khi xử lý bào tử nấm *A. flavus* bằng chùm plasma phóng ra từ thiết bị DBD plasma theo thời gian.

Kết quả hình 3 cho thấy, bào tử nấm *A. flavus* hầu như chưa bị tiêu diệt ở thời gian 20 s xử lý. Bào tử nấm *A. flavus* bắt đầu bị diệt một phần sau 40 s xử lý (vùng ở giữa) và chỉ bị tiêu diệt hoàn hoàn chỉ sau 100 s trong vùng khảo sát (vòng tròn màu đỏ là vùng tác dụng của chùm plasma với đường kính 3,5 cm). Kết quả cũng chỉ ra, khi tăng thời gian tác dụng lên thì vùng tác dụng càng rộng ra và bào tử nấm càng bị tiêu diệt nhiều hơn (Hình 4). Như vậy, có thể thấy thời gian diệt hoàn toàn bào tử nấm thử nghiệm *A. flavus* trong vùng tác dụng đều rất ngắn (chỉ khoảng 100 s).

Hình 4. *Kết quả diệt bào tử nấm A. flavus (nồng độ 10^6 bào tử/ml) ở thời gian xử lý 120 giây*

Các kết quả thu được ở trên có thể được giải thích thông qua đặc trưng phổ quang phát xạ của chùm plasma DBD. Từ phổ quang phát xạ của plasma DBD trong khí quyển cho thấy sự xuất hiện của các gốc tự do và các bức xạ UV.

Các gốc tự do có thể phản ứng với nhau, và với không khí xung quanh, hơi nước hoặc thậm chí cả chất lỏng, nơi chúng tạo ra các phân tử thứ cấp trên cơ sở oxy và nitơ như H_2O_2, NO_x, O_3, NO_2, NO_3... Sau sự tương tác với tế bào sống, các thành phần hoạt tính này phản ứng với màng tế bào, và sau đó có thể xâm nhập vào tế bào và gây tổn hại cho các yếu tố liên bào, chẳng hạn như các bào quan và phân tử sinh học như DNA, RNA và protein (Hình 5) [18]. Do đó, các vi khuẩn cũng như chủng nấm mốc có thể bị phá hủy ADN do tác động của các hoạt tính này. Thuộc tính kháng khuẩn của plasma DBD là một tác dụng hiệp đồng từ tất cả các loại hoạt tính [13], [14].



Hình 5. *Cơ chế diệt phân tử sinh học.*

KẾT LUẬN

Plasma lạnh ở áp suất khí quyển có thể được sử dụng như một công cụ hiệu quả cho việc diệt nấm mốc nhiễm trong nông sản và thức ăn chăn nuôi. Hiệu quả của việc khử trùng bằng plasma tăng lên cùng với thời gian xử lý. Thời gian điều trị tối thiểu khoảng 100 s là cần thiết để đạt được khử trùng đạt yêu cầu đối với chủng nấm được khảo sát là *A. flavus.* Thuộc tính kháng khuẩn của plasma DBD là một tác dụng hiệp đồng từ tất cả các loại hoạt tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. I. Langmuir (1928), "Oscillations in Ionized Gases". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 14 627

2. Q. Z. Luo, N. Angelo, R.L. Merlino (1998), "Shock formation in a negative ion plasma". *Dept of phys & Astron Retrieved* 20

3. E.S. Leeet al. (2003), "Multi-jet atmospheric glow plasma cleaning of ablation debris from micro-via drilling process", *Surf. Coat. Technol.*, 171, pp. 307–311.

4. N.-Y. Cui, N.M.D. Brown (2002), "Modification of the surface propertiesof a polypropylene film using an air dielectric barrierdischarge plasma", *Appl. Surf. Sci*. 189, pp.31–38.

5. H.-S. Ahn et al. (2003), "Ozone generation characteristics by superimposed discharge in oxygen-fed ozonizer", *Jpn. J. Appl. Phys*. 42, pp. 6578–6583.

6. Navya Mastanaiah, Judith A. Johnson, Subrata Roy (2013), "Effect of Dielectric and Liquid on Plasma Sterilization Using Dielectric Barrier Discharge Plasma", *PLOS ONE*, Volume 8, Issue 8, e70840.

7. F. Sohbatzadeh et al. (2016), "Inactivation of Aspergillus flavus spores in a sealed package by cold plasma streamers", *Journal of Theoretical and Applied Physics*, Vol.10, Issue 2, pp. 99–106.

8. M. Laroussi, G.S. Sayler, B.B. Glascock (1999), "Images of biological samples undergoing sterilization by a glow dischargeat atmospheric pressure", *IEEE Trans. Plasma Sci*. 27, pp. 34–35.

9. P. Muranyi, J. Wunderlich, M. Heise (2007), "Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge". *J. Appl. Microbiol*. 103, pp. 1535.

10. H. B. Van de Veen, H. Xie, E. Esveld et al. (2014), "Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing", *Food Microbiol*..

11. Agrios, George N. Plant Pathology: Fifth Edition (2005). *Elsevier Academic Press*. p. 922

12. Kew MC (2013), "Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma", *J. Gastrointestin Liver Dis. Sep.*; 22 (3), pp. 305-310.

13. Nguyễn Trường Sơn, Nguyễn Văn Hảo và cs. (2016), "Khử bào tử nấm bằng phương pháp sử dụng Floating electrode dielectric barrier discharge", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, Số 10, Tập 155, tr. 31-34

14. Nguyen Truong Son, Nguyen Van Hao, Trinh Dinh Kha et al. (2016), "Floating electrode dielectric barrier discharge for dermatology application", *Advances in Applied and Engineering Physics IV*, pp.525-530.

15. Juri Lee et al. (2017), "Use of Atmospheric Pressure Cold Plasma for Meat Industry", *Korean J. Food Sci. An*. 37(4), pp. 477-485.

16. Shashi K. et al. (2018), "Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review", *Foods*, 7, 4 pp. 1-21

17. Hertwiga et al. (2018), "Cold atmospheric pressure plasma and low energy electron beam as alternative nonthermal decontamination technologies for dry food surfaces: A review". *Trends in Food Science & Technology* 77, pp. 131–142

18. Nataša Hojnik et al. (2017), "Mycotoxin Decontamination of Food: Cold Atmospheric Pressure Plasma versus "Classic" Decontamination". *Toxins* 9, pp. 151.

SUMMARY

INACTIVATION OF ASPERGILLUS FLAVUS SPORES BY ATMOSPHERIC PRESSURE COLD PLASMA SOURCE

Nguyen Van Hao[1,2*], Nguyen Truong Son[2], Trinh Dinh Kha[1], Nguyen Xuan Huong[1], Pham Tuan Hung[1], Vu Xuan Hoa[1], and Do Hoang Tung[2]

[1]*University of Science - TNU,*

[3] *Institute of Physics -Vietnam Academy of Science and Technology*

Atmospheric pressure cold (APC) plasma can sterilize against almost all kinds of bacteria and spores because many ions and reactive species, such as oxygen atoms, electrons, UV and ozone, etc., are generated during APC plasma. So this method has been proven to be more effective in sterilization than other conventional methods such as drying, gamma ray irradiation, peracetic acid... In this work, we present the results on applying DBD (Dielectric Barrier Discharge) plasma source for fungal *Aspergillus flavus* spore extermination in livestock feed. Experimental results showed that DBD treatment during 100 s *Aspergillusflavus*has completely eliminated in the effective area.

Keywords: *Fungal sterilization, Cold plasma, DBD, Aspergillusflavus, Atmospheric pressure cold plasma*

Ngày nhận bài: 19/6/2018; Ngày phản biện: 25/7/2018; Ngày duyệt đăng: 31/8/2018

[*] *Tel: 0989 348258, Email: haonv@tnus.edu.vn*