

## KHẢO SÁT CÁC ĐIỀU KIỆN HÌNH THÀNH NHA BÀO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

Đến tòa soạn: 13-03-2025

Đặng Thị Thùy Dương<sup>1</sup>, Lê Thị Thúy Hằng<sup>1</sup>, Ngô Thị Thảo<sup>1</sup>, Trần Quang Cảnh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

<sup>2</sup>Sở Y tế Hải Phòng

\* Email: thuyduong84hmtu@gmail.com

### SUMMARY

#### SURVEY of CONDITIONS for SPORE FORMATION of

#### *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

Biological indicators are considered the gold standard for sterilization process control, one of the criteria for evaluating autoclaves, and a measure that directly reflects the effectiveness of sterilization. In Vietnam, the use of biological indicators to proactively control the effectiveness of the sterilization process has not received due attention and has not been implemented regularly, especially in local medical facilities. Research on *Geobacillus stearothermophilus* bacteria that create biological indicators is still very limited. This study investigated 16 conditions for the spores formation of *G. stearothermophilus* ATCC 7953 from 4 culture mediums NA-CaKMgMn, NA-CaMn, YMMn, PCA; 2 pH conditions of 7.0 and 8.5; 2 incubation temperatures of 55°C and 61°C. The research results showed that at pH 8.5 and incubation temperature of 61°C, the rate and proportion of *G. stearothermophilus* ATCC 7953 spores formation were superior to those at pH 7.0 and 55°C. The four spore formation conditions NA-CaKMnMg/ 8.5/ 61°C, NA-CaMn/ 8.5/ 61°C, YMMn/ 7.0/ 61°C and YMMn/ 8.5/ 61°C had a spore formation rate of over 95% and a spore yield of over 10<sup>5</sup> cfu/mL. Of which, the condition YMMn/8.5/ 61°C had the fastest rate of *G. stearothermophilus* ATCC 7953 spores formation, reaching 90% after 4 days. The results of the research could be the premise for further research to create biological indicators that meet ISO standards.

**Keywords:** *Geobacillus stearothermophilus*, biological indicator, moist heat sterilization

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiệt trùng bằng nhiệt ẩm là một trong những phương pháp tiệt trùng được sử dụng phổ biến trong các cơ sở y tế, các phòng thí nghiệm, để tiệt trùng dụng cụ, vật liệu cấy ghép, môi trường nuôi cấy, ... Tuy nhiên, quá trình tiệt trùng có thể thất bại do 3 yếu tố chính gồm có 5% do chất lượng hơi nước kém, 10% lỗi thiết bị như loại bộ không khí không đầy đủ, thay đổi nhỏ về nhiệt độ trong buồng và hoặc trong các gói dụng cụ; còn lại 85% do lỗi của người sử dụng như đóng gói không đúng, thông số chu kỳ tiệt trùng không đúng, ... [1]. Vì vậy, việc kiểm soát hiệu quả quá

trình tiệt trùng nhiệt ẩm là cần thiết để sớm loại bỏ những dụng cụ, vật liệu không đạt vô khuẩn trước khi tiến hành phẫu thuật, cấy ghép hay nuôi cấy vi sinh, đồng thời sẽ làm giảm thiệt hại về kinh tế cũng như sức khỏe, tính mạng của bệnh nhân. Chỉ thị sinh học được xem là tiêu chuẩn vàng cho kiểm soát quá trình tiệt trùng, là một trong các tiêu chí thẩm định nồi hấp tiệt trùng, là thước đo phản ánh trực tiếp hiệu quả diệt khuẩn [2, 3]. Nguyên lý chung của chỉ thị sinh học là kiểm tra xem nha bào của các chủng vi khuẩn chịu nhiệt cao như: *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

*atrophaeus*, ... có bị tiêu diệt sau quá trình tiệt trùng hay không. Hiện nay, trên thị trường có 4 loại chỉ thị sinh học bao gồm thể bào tử, huyền phù bào tử, chỉ thị sinh học tự chứa (SCBI) và SCBI đọc nhanh phát hiện enzym alpha-glucosidase.

Ở Việt Nam, việc sử dụng chỉ thị sinh học để chủ động kiểm soát hiệu quả quá trình tiệt trùng chưa được quan tâm đúng mức, chưa thực hiện thường xuyên, đặc biệt ở các cơ sở y tế địa phương. Thuật ngữ chỉ thị sinh học mới được nhắc đến trong những năm gần đây. Có một số nguyên nhân lý giải cho thực trạng này như việc cập nhật kiến thức còn chậm, giá thành chỉ thị sinh học còn cao, chưa có loại chỉ thị sinh học nào được sản xuất trong nước, phải nhập hoàn toàn từ nước ngoài của các hãng như 3M, Crosstex (Mỹ) nên thiếu sự chủ động.

Nha bào của vi khuẩn *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*) có sức đề kháng cao với nhiệt ẩm, chịu được các điều kiện tiệt trùng như vi sóng, chất hóa học formaldehyde, hydro peroxide. Chính vì vậy, theo ISO 11138-1:2006, 11138-3:2006 quy định về yêu cầu của chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt trùng bằng nhiệt ẩm, vi sinh vật thử nghiệm phải là các nha bào của *G. stearothermophilus* [2, 3]. Sức đề kháng của nha bào *G. stearothermophilus* phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện hình thành nha bào như thành phần dinh dưỡng, sự có mặt của các ion vô cơ, pH và nhiệt độ ủ. Do vậy, nghiên cứu này tiến hành khảo sát các điều kiện hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953. Kết quả của nghiên cứu là tiền đề để thực hiện các nghiên cứu sâu hơn tiến tới tạo chỉ thị sinh học đáp ứng tiêu chuẩn ISO.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, mua của hãng Microbiologic/ Mỹ.

### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: từ tháng 1 đến tháng 6/ 2021

- Địa điểm: Labo xét nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm, Trường ĐH Kỹ thuật Y tế Hải Dương

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Tạo nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 [4,5]

Môi trường tạo nha bào thường là các môi trường có thành phần dinh dưỡng cơ bản và bổ sung một số ion vô cơ, nhiệt độ ủ 61°C tạo nha bào có sức đề kháng cao hơn ở 55°C [4], pH kiềm là yếu tố quan trọng nhất làm tăng khả năng chịu nhiệt của nha bào *G. stearothermophilus* [6]. Nghiên cứu đã lựa chọn 4 môi trường NA-CaKMgMn (Pepton 5g/ lít, Cao thịt 3g/ lít, MnSO<sub>4</sub> 0,2 g/ lít, MgSO<sub>4</sub> 0,12 g/ lít, CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/ lít, KCl 0,9 g/lít, agar 15 g/ lít), NA-CaMn (Pepton 5g/ lít, Cao thịt 3g/lít MnSO<sub>4</sub> 0,12 g/ lít, CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/ lít, agar 15 g/ lít), YMMn (Cao men 2g/ lít, Cao thịt 3 g/ lít, MnSO<sub>4</sub> 0,1 g/ lít, agar 15 g/ lít), PCA (Pepton 5 g/ lít, Cao men 2,5 g/ lít, Glucose 1 g/ lít, agar 15 g/ lít); 2 điều kiện ủ 55°C và 61°C; hai điều kiện pH 7,0 và 8,5 tạo ra 16 điều kiện để khảo sát hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 như ở Bảng 1. Thời gian ủ các môi trường đến 14 ngày.

Quy trình tạo nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 tham khảo theo nghiên cứu của Wells – Bennik và Guizelini [4,5].

**Bảng 1. Các điều kiện cho thử nghiệm tạo nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 [4,5,6]**

Điều kiện	Môi trường	pH	Nhiệt độ ủ
(1)	NA –CaKMnMg	7,0	55°C
(2)			61°C
(3)		8,5	55°C
(4)			61°C
(5)	NA –CaMn	7,0	55°C
(6)			61°C
(7)		8,5	55°C
(8)			61°C
(9)	YMMn	7,0	55°C
(10)			61°C
(11)		8,5	55°C
(12)			61°C
(13)	PCA	7,0	55°C
(14)			61°C
(15)		8,5	55°C
(16)			61°C

### 2.3.2. Xác định độ thuần khiết của nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953

Đánh giá độ thuần khiết của nha bào bằng phương pháp nhuộm nóng với xanh malachite oxalate 5% và fucsin kiềm. Cứ sau 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày lấy khuẩn lạc đi nhuộm kép để quan sát tỉ lệ chuyển đổi nha bào. Tỉ lệ nha bào lớn hơn 95% là đạt [2]

### 2.3.3. Xác định số lượng vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 có khả năng sống

Nha bào thu được từ mỗi điều kiện sẽ được cấy đếm để xác định số nha bào có khả năng sống sót. Mỗi điều kiện tiến hành cấy lặp lại 4 lần và lấy kết quả trung bình. Pha loãng nha bào theo nguyên tắc pha loãng bậc 10 bằng nước cất vô trùng, 6 nồng độ. Từ 2 nồng độ pha loãng cao nhất, hút 1mL/ nồng độ cấy đếm trên môi trường NA, bằng kỹ thuật cấy hộp đổ. Ủ các đĩa thạch ở 55°C/48h. Đếm số lượng khuẩn lạc trên mỗi đĩa. Tính số vi sinh vật sống trong mỗi ống. Số vi sinh vật có khả năng sống là số trung bình của 4 lần, biểu thị dưới dạng số mũ và phải  $\geq 1,0 \times 10^5$  là đạt [2].

### 2.3.4. Tiêu chí lựa chọn điều kiện hình thành nha bào [2]

- Tỉ lệ chuyển đổi nha bào phải đạt 95% trở lên sau 14 ngày ủ
- Sản lượng nha bào hay số lượng vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 có khả năng sống phải  $\geq 1,0 \times 10^5$  cfu/mL.

## 2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Nuôi cấy vi khuẩn: Sử dụng các môi trường thạch dinh dưỡng (NA – Nutrient agar code 1.05450.0500, Merk), TSB (code 1.05459.0500, Merck), NA bổ sung CaKMnMg, NA- CaMn, YMMn, PCA (code 1.05463.0500, Merck).
- Nhuộm nóng, soi đếm nha bào dưới kính hiển vi

## 2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Các yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ và năng suất hình thành nha bào được phân tích theo mô hình hồi quy tuyến tính.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Kết quả mức độ phát triển của vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 trong 16 điều kiện khảo sát

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát 16 điều kiện hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC7953 được tổ hợp từ 4 môi trường, 2 giá trị pH và 2

hiệu độ ủ. Kết quả cho thấy vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 đều phát triển tốt, mọc thành thảm dày trên mặt thạch ở tất cả 16 điều kiện (Bảng 2).

**Bảng 2. Mức độ phát triển vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC7953 trong 16 điều kiện khảo sát**

Môi trường	NA-CaKMnMg				NA-CaMn				YMMn				PCA			
pH môi trường	7,0		8,5		7,0		8,5		7,0		8,5		7,0		8,5	
Nhiệt độ ủ (°C)	55°	61°	55°	61°	55°	61°	55°	61°	55°	61°	55°	61°	55°	61°	55°	61°
Mức độ vi khuẩn phát triển	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Chú thích: (-) vi khuẩn không phát triển; (+) vi khuẩn có phát triển; (++) vi khuẩn phát triển tốt mọc thành thảm

### 3.2. Tỷ lệ hình thành nha bào của vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 trong 16 điều kiện khảo sát

**Bảng 3. Tốc độ hình thành nha bào của vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 trong 16 điều kiện khảo sát**

Môi trường	pH môi trường	Nhiệt độ ủ	Tỷ lệ hình thành nha bào		
			4 ngày	7 ngày	14 ngày
NA-CaKMnMg	7,0	55°C	20 %	22 %	25 %
		61°C	10 %	15 %	20 %
	8,5	55°C	10 %	15 %	20 %
		61°C	<b>50 %</b>	<b>90 %</b>	<b>95 %</b>
NA-CaMn	7,0	55°C	10 %	10 %	10 %
		61°C	10 %	12 %	15 %
	8,5	55°C	20 %	20 %	20 %
		61°C	<b>50 %</b>	<b>96 %</b>	<b>98 %</b>
YMMn	7,0	55°C	10 %	10 %	10 %
		61°C	<b>40 %</b>	<b>70 %</b>	<b>90 %</b>
	8,5	55°C	30 %	40 %	60 %
		61°C	<b>90 %</b>	<b>95 %</b>	<b>98 %</b>
PCA	7,0	55°C	1 %	1 %	1 %
		61°C	1 %	1%	1 %
	8,5	55°C	3 %	3 %	3 %
		61°C	<b>10 %</b>	<b>20 %</b>	<b>40 %</b>

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 4 loại môi trường thì môi trường PCA có tỷ lệ hình thành nha bào chậm nhất, 3 môi trường NA-CaKMnMg, NA-CaMn, YMMn có tỷ lệ hình thành nha bào tương đương nhau. Đặc biệt ở điều kiện YMMn/8,5/61°C có tốc độ hình thành nha bào nhanh nhất, chỉ sau 4 ngày ủ đã có tỷ lệ hình thành nha bào đạt tới 90%. Có sự

khác biệt lớn về điều kiện pH và hiệu độ ủ, ở điều kiện 8,5/ 61°C vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 có tốc độ và tỷ lệ hình thành nha bào vượt trội so với điều kiện 7,0/ 55°C (Bảng 3 và Hình 1). Kết quả phân tích hồi quy cho thấy  $R^2 = 0,764$  tức 76,4% tốc độ hình thành nha bào của *G. stearothermophilus* ATCC 7953 phụ thuộc các yếu tố môi trường nuôi cấy, pH, và hiệu độ ủ có ý nghĩa

thống kê với giá trị  $p = 0,006$ . Trong đó pH và nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt với  $p$  lần lượt là 0,014 và 0,006.

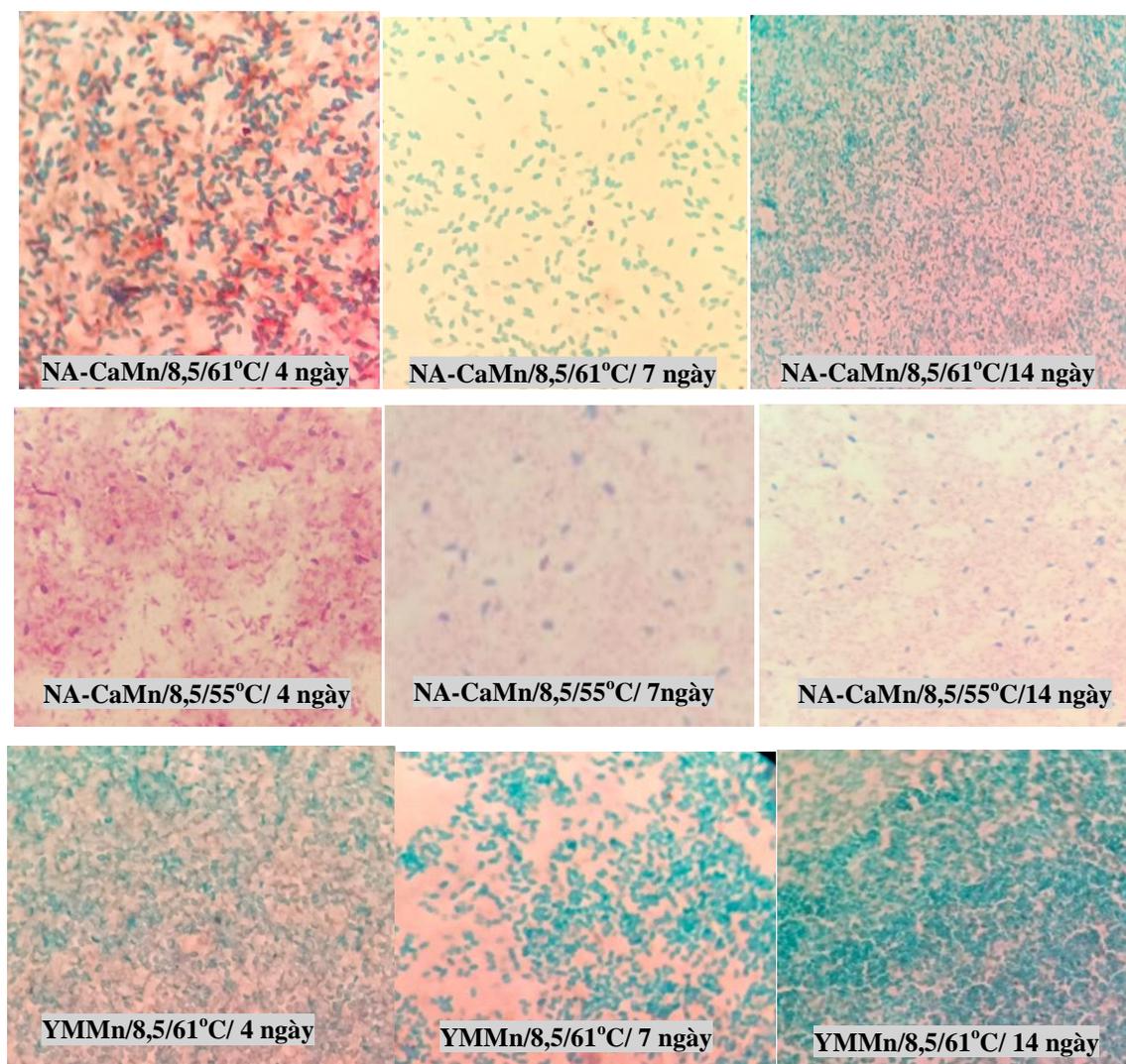
### 3.3. Sản lượng nha bào *G. stearotherophilus* ATCC 7953 thu được trong 16 điều kiện khảo sát

Trong 16 điều kiện khảo sát, 4 điều kiện cho sản lượng nha bào cao nhất trên  $10^6$  cfu/mL là NA-CaKMnMg/ 8,5/ 61°C; NA-CaMn/ 8,5/ 61°C; YMMn/ 7,0/ 61°C; YMMn/ 8,5/ 61°C; môi trường PCA cho sản lượng nha bào thấp nhất. Về thành phần dinh dưỡng, môi trường PCA (pepton 5g/lít, cao nấm men 2,5 g/lít, glucose 1g/lít) có điểm khác biệt lớn nhất với 3 môi trường còn lại là có đường glucose và không có ion kim loại. Verma N và cộng sự ghi nhận tác dụng của cao men, peptone và glucose làm tăng sản lượng nha bào của *B. megaterium* [7]. Hiệu quả tác dụng của ba thành phần này không được

ghi nhận trong nghiên cứu này, sự có mặt glucose không thúc đẩy quá trình hình thành nha bào của *G. stearotherophilus*. Wells-Bennik và cộng sự cũng báo cáo không thu được nha bào *G. stearotherophilus* chủng 4161 ở môi trường PCA [4]. Trong 3 môi trường NA-CaKMnMg, NA-CaMn, YMMn, môi trường YMMn có hàm lượng dinh dưỡng thấp nhất nhưng lại cho tốc độ hình thành nha bào nhanh nhất, chỉ sau 4 ngày đã đạt tỉ lệ nha bào 90%. Điều này cho thấy môi trường nhiều dinh dưỡng làm chậm quá trình hình thành nha bào *G. stearotherophilus* ATCC 7953. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kiến thức y văn, một số vi khuẩn có khả năng chuyển sang dạng nha bào khi gặp điều kiện bất lợi về dinh dưỡng, khắc nghiệt của môi trường.

**Bảng 4. Sản lượng nha bào *G. stearotherophilus* ATCC 7953 thu được trong 16 điều kiện khảo sát**

Môi trường	pH môi trường	Nhiệt độ ủ	Sản lượng nha bào (cfu/mL)
NA-CaKMnMg	7,0	55°C	$4,8 \times 10^2$
		61°C	$3,6 \times 10^2$
	8,5	55°C	$3,7 \times 10^3$
		61°C	$5,3 \times 10^6$
NA-CaMn	7,0	55°C	$1,1 \times 10^2$
		61°C	$2,6 \times 10^3$
	8,5	55°C	$5,0 \times 10^2$
		61°C	$7,0 \times 10^6$
YMMn	7,0	55°C	$1,5 \times 10^2$
		61°C	$2,2 \times 10^6$
	8,5	55°C	$3,9 \times 10^4$
		61°C	$6,8 \times 10^6$
PCA	7,0	55°C	10
		61°C	15
	8,5	55°C	63
		61°C	$5,2 \times 10^3$



**Hình 1.** Nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 được nhuộm nóng với malachite oxalate sau 4, 7 và 14 ngày ủ ở một số điều kiện

Chú thích: Nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 bắt màu xanh của malachite oxalate, tế bào sinh dưỡng bắt màu hồng của fuchsin kiềm

Như vậy, chỉ có 4 điều kiện hình thành nha bào NA-CaKMnMg/ 8,5/ 61°C, NA-CaMn/ 8,5/61°C, YMMn/ 7,0/ 61°C, YMMn/ 8,5/ 61°C có tỉ lệ hình thành nha bào  $\geq 95\%$  và sản lượng nha bào trên  $10^5$  cfu/mL đủ điều kiện tiến hành thử nghiệm tiếp theo theo yêu cầu của chất chỉ thị sinh học. Kết quả phân tích mô hình hồi quy cho thấy Hệ số xác định  $R^2 = 0,839$ , tức 83,9% sản lượng nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 phụ thuộc các yếu tố môi trường nuôi cấy, pH

và nhiệt độ ủ có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,001$ . Trong đó yếu tố pH và nhiệt độ ủ có ảnh hưởng rõ rệt với giá trị p lần lượt là 0,003 và 0,002. Môi trường PCA có sản lượng nha bào thấp nhất, không phải là môi trường thuận lợi cho hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 với  $p = 0,02$

Nghiên cứu này cho thấy hiệu quả hình thành nha bào vượt trội khi ở đồng thời 2 điều kiện pH kiềm 8,5 và nhiệt độ ủ 61°C. Theo y văn, nha bào của các loài *Bacillus*

chỉ được hình thành trong giới hạn điều kiện sinh trưởng về khoảng pH, nhiệt độ, hoạt độ nước phù hợp của vi khuẩn đó. Sản lượng nha bào cao nhất khi ở nhiệt độ, pH, hoạt độ nước tối ưu và có xu hướng kéo dài quá trình hình thành nha bào, giảm sản lượng khi ở các điều kiện nằm ngoài giá trị tối ưu [8]. Khi nghiên cứu điều kiện hình thành nha bào *B. subtilis* ATCC 31324, Nguyen Thi Hue Minh và cộng sự nhận thấy thời gian sinh trưởng và hình thành nha bào là 3 ngày ở 37°C, pH 8,0 và hoạt độ nước cao, tăng lên 10 ngày ở 45°C và 14 ngày ở 19°C, 20 ngày ở pH 6,0 hoặc 10,0 và 17 ngày ở hoạt độ nước 0,95 [9]. Với vi khuẩn *G. stearothermophilus* sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 37°C – 70°C, tối ưu từ 55°C – 65°C, pH từ 6,0 – 8,5, tối ưu là 6,2 – 7,5 [4]. Khi nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến sức đề kháng của nha bào *G. stearothermophilus*, Wells-Bennik và cộng sự nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về sản lượng nha bào khi ủ giữa hai nhiệt độ 55°C và 61°C [4], Guizelini, B. P và cộng sự cũng nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về sản lượng nha bào giữa pH 7,0 và 8,5 nhưng ở pH 8,5 nha bào có sức đề kháng nhiệt ẩm cao hơn so với pH 7,0 [5]. Ở nghiên cứu này không tiến hành khảo sát hình thành nha bào chủng vi khuẩn *G. stearothermophilus* ATCC 7953 trong từng điều kiện riêng rẽ pH và nhiệt độ ủ mà đồng thời cả 2 điều kiện, kết quả cho thấy hiệu quả hình thành nha bào vượt trội ở điều kiện pH 8,5/ 61°C so với các điều kiện còn lại pH 7,0/ 61°C; pH 7,0/ 55°C; pH 8,5/ 55°C (Bảng 3, 4). Độ pH của môi trường nuôi cấy là một yếu tố cực kỳ quan trọng, ảnh hưởng đáng kể đến cả sự hình thành nha bào và khả năng chịu nhiệt của nha bào. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến quá trình hình thành nha bào *B. stearothermophilus*, S. Yazdany nhận thấy khi *B.*

*stearothermophilus* được nuôi cấy trong môi trường có pH ban đầu là 7,0, độ pH của môi trường giảm xuống khoảng 5,5 và sau đó duy trì ở mức đó, dẫn đến việc rất ít nha bào được tạo ra. Giả thuyết được đưa ra là các enzyme của *B. stearothermophilus* sử dụng các axit hữu cơ trong quá trình sản xuất nha bào có thể không được cảm ứng hoặc bị bất hoạt ở giá trị pH thấp. Do đó, quá trình hình thành nha bào không thể diễn ra bình thường. Ngược lại, khi *B. stearothermophilus* được nuôi cấy trong môi trường có pH ban đầu điều chỉnh từ 7,7 đến 8,7 quá trình hình thành nha bào diễn ra mạnh mẽ (đạt khoảng  $1,9 \times 10^7$  đến  $2,4 \times 10^7$  nha bào/ml, với tỷ lệ hình thành nha bào tối đa khoảng 88%). Điều này cho thấy ở pH 7.7 đến 8,7, các enzyme này có thể được cảm ứng, hoạt hóa hoặc không bị bất hoạt, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hình thành nha bào [10]. Guizelini, B.P và cộng sự khi nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng chịu nhiệt của nha bào *G. stearothermophilus* đã nhận thấy độ pH kiềm có thể kết tủa các kim loại như sắt và đồng dưới dạng hydroxit, làm cho chúng không khả dụng đối với vi sinh vật trong quá trình hình thành nha bào. Điều này có thể bảo vệ nha bào khỏi bị tổn thương bởi nhiệt, tăng cường quá trình khoáng hóa trong quá trình hình thành nha bào, góp phần vào khả năng chịu nhiệt. Nha bào chứa hàm lượng ion canxi cao nhất có khả năng chịu nhiệt tốt nhất, tiếp theo là mangan và magiê. Khi được làm nóng ở độ pH kiềm (khoảng 8), nha bào có khả năng hấp thụ các khoáng chất này và phát triển thành các dạng chịu nhiệt tốt hơn. Ngược lại, nha bào tiếp xúc với pH axit và được làm nóng nhẹ (ở nhiệt độ khoảng 60°C) bị mất khoáng chất (như canxi, mangan, magiê, kali và natri), và khả năng chịu nhiệt giảm [5].

#### IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát 16 điều kiện hình thành nha bào được tạo ra từ 4 môi trường (NA-CaKMnMg, NA-CaMn, YMMn, PCA), 2 giá trị pH (7,0 và 8,5) và 2 nhiệt độ ủ (55°C, 61°C). Kết quả cho thấy tốc độ hình thành và sản lượng nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 phụ thuộc vào các yếu tố như thành phần dinh dưỡng, các ion vô cơ, pH môi trường và nhiệt độ ủ. Ở điều kiện pH 8,5 và nhiệt độ ủ 61°C cho thấy tốc độ và tỉ lệ hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 vượt trội so với pH 7,0 và 55°C. Bốn điều kiện hình thành nha bào NA-CaKMnMg/ 8,5/ 61°C, NA-CaMn/ 8,5/61°C, YMMn/ 7,0/ 61°C và YMMn/ 8,5/ 61°C có tỉ lệ hình thành nha bào trên 95% và sản lượng nha bào trên 10<sup>5</sup> cfu/mL. Trong đó, điều kiện YMMn/8,5/61°C có tốc độ hình thành nha bào *G. stearothermophilus* ATCC 7953 nhanh nhất, đạt tới 90% sau 4 ngày.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài cơ sở do Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương quản lý.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chandrapati, S. and M. Young, (2008) *To Kill or Not to Kill*. Managing infection Control, p. 80-92.
- Viện trang thiết bị và công trình y tế, (2013) TCVN 9855-1:2013/ ISO 11138-1:2006. Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe- Chất chỉ thị sinh học - phần 1: Yêu cầu chung. Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.
- Viện trang thiết bị và công trình y tế, (2013) TCVN 9855-3:2013. Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe - Chất chỉ thị sinh học. Phần 3: Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt trùng bằng nhiệt ẩm. Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành
- Wells-Bennik, M.H.J., et al., (2019) *Heat resistance of spores of 18 strains of Geobacillus stearothermophilus and impact of culturing conditions*. Int J Food Microbiol, 291: p. 161-172.
- Guizelini, B.P., et al., (2012) *Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of Geobacillus stearothermophilus used in the development of biological indicators for steam sterilization*. Arch Microbiol. 194(12): p. 991-9.
- Egan, K., et al., (2017) *Genome Sequence of Geobacillus stearothermophilus DSM 458, an Antimicrobial-Producing Thermophilic Bacterium, Isolated from a Sugar Beet Factory*. Genome Announc, 5(43).
- Verma N, et al., (2013) *Screening of different media for sporulation of Bacillus megaterium*. Int J Microbiol Res Rev, (1):068–73.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V.e. and Carlin, F.e.e. (2018) *Sporulation environment influences spore properties in Bacillus: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms*. FEMS Microbiology Reviews, 42: p. 614–626.
- Nguyen Thi Minh H, Durand A, Loison P, et al. (2011) *Effect of sporulation conditions on the resistance of Bacillus subtilis spores to heat and high pressure*. Microbiol Biotechnol, (90): p. 1409-17.
- Yazdany S., Lashkari K. B. (1975) *Effect of pH on Sporulation of Bacillus stearothermophilus*. Applied Microbiology, 30(1):1–3.