

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

★★★★★★★★



NGUYỄN THỊ TRƯỜNG

**KHẢO SÁT TỈ LỆ NHIỄM *Staphylococcus aureus*
VÀ *Escherichia coli* TRONG THỰC PHẨM TẠI
KHU VỰC CHỢ THỊ NGHỀ**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**KHẢO SÁT TỈ LỆ NHIỄM *Staphylococcus aureus*
VÀ *Escherichia coli* TRONG THỰC PHẨM TẠI
KHU VỰC CHỢ THỊ NGHỀ**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Giáo viên hướng dẫn
ThS. NGUYỄN TIẾN DŨNG**

**Sinh viên thực hiện
NGUYỄN THỊ TRƯỜNG
KHÓA: 2002 - 2006**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**INVESTIGATING THE INFECTED RATIO OF
Staphylococcus aureus AND *Escherichia coli*
IN THE FOOD AT THI NGHE MARKET**

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

Professor

Ms. NGUYEN TIEN DUNG

Student

NGUYEN THI TRUONG

COURSE: 2002 - 2006

HCMC, 9/2006

LỜI CẢM ƠN

Em xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban Giám Hiệu Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, cùng tất cả các quý thầy cô đã tận tâm dạy dỗ, truyền đạt những tri thức khoa học và kinh nghiệm quý báu cho em trong suốt quá trình rèn luyện học tập tại trường.

Đặc biệt em xin chân thành cảm ơn đến thầy Nguyễn Tiến Dũng đã tạo điều kiện tốt nhất, tận tình hướng dẫn và giúp đỡ em trong suốt thời gian thực tập tốt nghiệp và bước đầu nghiên cứu khoa học.

Em xin cảm ơn thầy Hồ Thanh Bá, cô Nguyễn Thị Huyền tại Phòng thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học Môi Trường, trường Đại học Nông Lâm cùng với gia đình và các bạn bè thân yêu của lớp Công Nghệ Sinh Học khóa 28 đã hết lòng quan tâm hỗ trợ, động viên tạo điều kiện thuận lợi cho em thực hiện tốt khóa luận này.

Một lần nữa em xin chân thành cảm ơn tất cả.

Tp. Hồ Chí Minh, tháng 9 năm 2006

Sinh viên

Nguyễn Thị Trường

TÓM TẮT

NGUYỄN THỊ TRƯỜNG, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 9/2006.

"KHẢO SÁT TỈ LỆ NHIỄM *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* TRONG THỰC PHẨM TẠI KHU VỰC CHỢ THỊ NGHÈ"

Giáo viên hướng dẫn:

Th.S NGUYỄN TIẾN DŨNG

S. aureus là vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, có hình cầu, gram dương, chúng thường được tìm thấy trên da, mũi, tóc hay lông của các loài động vật máu nóng. Các loại thực phẩm có chứa nhiều muối như jambon, kem tổng hợp, nước súp và các loại thủy sản, thực phẩm đóng hộp thường hay nhiễm loài vi sinh vật này.

E. coli là vi sinh vật hiếu khí tùy ý, hiện diện trong đường ruột của người và các loài động vật máu nóng. Hầu hết các dòng *E. coli* không gây hại và đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định sinh lý đường ruột.

Nghiên cứu này nhằm xác định tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong thực phẩm đang lưu hành trên thị trường. Từ đó tìm ra biện pháp để hạn chế mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong thực phẩm.

Nghiên cứu này đã có những kết quả đạt được như sau:

- Trong tổng số 18 mẫu được khảo sát, số mẫu phát hiện tỉ lệ nhiễm *S. aureus* chiếm 15/18 tương ứng 83,33% và tỉ lệ nhiễm *E. coli* chiếm 10/18 tương ứng 55,56%.

- Trong số các nhóm thực phẩm được khảo sát thì tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc chiếm tỉ lệ cao nhất là 100%, trong nhóm cá và thủy sản thì *S. aureus* chiếm 88,89% còn *E. coli* chiếm tỉ lệ 66,67%, trong nhóm rau thì *S. aureus* chiếm 71,43% và *E. coli* chiếm 28,57%.

- Mật độ *S. aureus* và *E. coli* giảm hẳn qua các lần xử lý mẫu: rửa mẫu bằng nước máy, rửa mẫu bằng nước muối, rửa bằng nước Vegy. Hầu như ở những mẫu rau được rửa bằng nước Vegy là không có sự hiện diện của *S. aureus* và *E. coli*. Như vậy thực phẩm phải được xử lý và chế biến trong điều kiện vệ sinh sạch sẽ thì mới hạn chế được tình trạng ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi sinh vật.

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm ơn.....	iv
Tóm tắt.....	v
Mục lục	vi
Danh sách các chữ viết tắt	ix
Danh sách các hình	x
Danh sách các bảng	xi
Danh sách các biểu đồ	xii
1. MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích	2
1.3. Nội dung	2
1.3.1. Khảo sát tỉ lệ nhiễm <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong các loại thực phẩm đang lưu hành trên thị trường	2
1.3.2. Nghiên cứu quy trình chế biến thực phẩm trong gia đình	2
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Đại cương về <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i>	3
2.1.1. Đại cương về <i>S. aureus</i>	3
2.1.1.1. Đặc điểm hình thái	4
2.1.1.2. Đặc điểm nuôi cấy.....	4
2.1.1.3. Đặc điểm sinh hóa	5
2.1.1.4. Cấu trúc kháng nguyên và độc tố	5
2.1.1.5. Sức đề kháng của <i>S. aureus</i>	6
2.1.1.6. Biểu hiện triệu chứng bệnh	7
2.1.1.7. Điều kiện cần thiết để bộc phát bệnh	7
2.1.2. Đại cương về <i>E. coli</i>	7
2.1.2.1. Đặc điểm hình thái	7

2.1.2.2. Đặc điểm nuôi cấy	8
2.1.2.3. Đặc điểm sinh hóa	8
2.1.2.4. Cấu trúc kháng nguyên và độc tố	9
2.1.2.5. Sức đề kháng của <i>E. coli</i>	11
2.1.2.6. Triệu chứng ngộ độc.....	11
2.2. Phương pháp định lượng <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i>	11
2.2.1. Phương pháp đếm trực tiếp	11
2.2.1.1. Đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu	11
2.2.1.2. Đếm trực tiếp bằng buồng đếm Breed	12
2.2.1.3. Đếm trực tiếp bằng kính hiển vi huỳnh quang	12
2.2.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc	12
2.2.2.1. Pha loãng mẫu theo dãy thập phân.....	13
2.2.2.2. Tạo hộp trái hay hộp đổ.....	13
2.2.3. Phương pháp màng lọc	15
2.2.4. Phương pháp MPN.....	15
2.2.5. Phương pháp đo độ đục	15
3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIỀN HÀNH.....	17
3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện.....	17
3.1.1. Thời gian thực hiện.....	17
3.1.2. Địa điểm thực hiện.....	17
3.2. Vật liệu	17
3.2.1. Dụng cụ và thiết bị.....	17
3.2.1.1. Dụng cụ	17
3.2.1.2. Thiết bị	17
3.2.2. Hóa chất và môi trường	17
3.2.2.1. Hóa chất và thuốc thử.....	17
3.2.2.2. Môi trường.....	18
3.2.3. Vật liệu thí nghiệm.....	19
3.3. Phương pháp.....	19
3.3.1. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu	19
3.3.2. Phương pháp bảo quản chủng vi sinh vật	20
3.3.3. Định lượng <i>S. aureus</i> bằng phương pháp đếm khuẩn lạc	20

3.3.3.1. Nguyên tắc.....	20
3.3.3.2. Môi trường và hóa chất	20
3.3.3.3. Tiến hành.....	20
3.3.4. Định lượng <i>E. coli</i> bằng phương pháp đếm khuẩn lạc	23
3.3.4.1. Nguyên tắc.....	23
3.3.4.2. Môi trường và hóa chất	23
3.3.4.3. Quy trình cấy mẫu	23
3.3.5. Bố trí thí nghiệm.....	28
3.3.6. Phương pháp xử lý số liệu	28
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
4.1. Khảo sát tỉ lệ nhiễm <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm rau.....	29
4.2. Khảo sát xây dựng qui trình xử lý thực phẩm tại gia đình và bếp ăn tập thể	31
4.2.1. Mật độ <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm cá và thủy sản được rửa và không được rửa bằng nước máy	31
4.2.2. Mật độ <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm thịt gia súc được rửa và không được rửa	33
4.2.3. Mật độ <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm rau được rửa và không rửa.....	35
4.2.4. Xây dựng qui trình xử lý thực phẩm tại hộ gia đình.....	38
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	40
5.1. Kết luận	40
5.2. Đề nghị	40
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	41

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
BP	Baird Parker
SEA	Staphylococcus Enterotoxin A
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SEC	Staphylococcus Enterotoxin C
SED	Staphylococcus Enterotoxin D
SEE	Staphylococcus Enterotoxin E
SEF	Staphylococcus Enterotoxin F
EMB	Eosin Methylene Blue Lactose
EAggEC	Enteraggregative <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
LT	Heat Labile
ST	Heat Stable
MPN	Most Probable Number
SPW	Saline Peptone Water
TSA	Tryptic Soya Agar

DANH MỤC CÁC HÌNH

	TRANG
Hình 2.1 Hình dạng vi khuẩn <i>S. aureus</i>	4
Hình 2.2 Hình dạng vi khuẩn <i>E. coli</i>	8
Hình 2.3 Phương pháp pha loãng mẫu theo dãy thập phân	13
Hình 3.1 Hình dạng của khuẩn lạc <i>S. aureus</i> trên môi trường BP.....	21
Hình 3.2 Hình dạng của khuẩn lạc <i>E. coli</i> trên môi trường EMB	24
Hình 3.3 Thử nghiệm Indol	24
Hình 3.4 Thử nghiệm Methyl Red.....	25
Hình 3.5 Thử nghiệm Voges Proskauer.....	25
Hình 3.6 Thử nghiệm Citrate	26

DANH MỤC CÁC BẢNG

TRANG

Bảng 3.1 Các nhóm thực phẩm được sử dụng trong thí nghiệm	19
Bảng 3.2 Các nghiệm thức bố trí thí nghiệm xây dựng quy trình xử lý những mẫu thực phẩm	28
Bảng 4.1 Kết quả khảo sát tỉ lệ <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong các nhóm thực phẩm	29
Bảng 4.2 Kết quả định lượng <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm cá và thủy sản	31
Bảng 4.3 Kết quả định lượng <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm thịt gia súc.....	34
Bảng 4.4 Kết quả định lượng <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong nhóm rau	36

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

TRANG

Biểu đồ 4.1 Tỷ lệ nhiễm <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i> trong các nhóm thực phẩm.....	30
Biểu đồ 4.2 Số lượng <i>S. aureus</i> trong nhóm cá và thủy sản	32
Biểu đồ 4.3 Số lượng <i>E. coli</i> trong nhóm cá và thủy sản.....	33
Biểu đồ 4.4 Số lượng <i>S. aureus</i> trong nhóm thịt gia súc	34
Biểu đồ 4.5 Số lượng <i>E. coli</i> trong nhóm thịt gia súc.....	35
Biểu đồ 4.6 Số lượng <i>S. aureus</i> trong nhóm rau.....	37
Biểu đồ 4.7 Số lượng <i>E. coli</i> trong nhóm rau	38

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Nước và thực phẩm là nguồn nuôi sống con người nhưng cũng có thể gây ngộ độc hoặc gây bệnh cho con người do chúng có thể chứa các độc tố vi sinh vật, độc tố hóa học hoặc vi sinh vật gây bệnh. Trong những năm gần đây, ngộ độc thực phẩm được ghi nhận khá thường xuyên và đã trở thành mối quan tâm của toàn xã hội. Có nhiều nguyên nhân khác nhau có thể gây ra các vụ ngộ độc thực phẩm nhưng phần lớn các trường hợp là do vi sinh vật gây ra. Nguyên nhân các vụ ngộ độc thực phẩm là do có sự hiện diện một lượng lớn các vi sinh vật gây bệnh hay độc tố tiết ra bởi các vi sinh vật.

Theo dõi và tổng kết trong nhiều năm các nhà khoa học trên thế giới đều xác định nguyên nhân chủ yếu gây ngộ độc thực phẩm trong ăn uống là do nhiễm vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm, như vi khuẩn gây bệnh lao, sốt thương hàn và dịch tả... Ở Canada hàng năm có khoảng trên 2 triệu người bị ngộ độc do thức ăn, nếu tính trung bình theo dân số thì cứ 11 người có 1 người mắc bệnh. Ở Mỹ có khoảng 13 triệu người ngộ độc thức ăn trong năm và cứ 18 người có 1 người mắc bệnh do thực phẩm, trong đó 85% số ca ngộ độc thức ăn là do nguyên nhân vi sinh. [10]

An toàn thực phẩm hiện là mối quan tâm lớn của xã hội. Người tiêu dùng ngày nay hiểu biết về các nguyên nhân chính gây những cơn đại dịch do thực phẩm và đòi hỏi những nguồn cung cấp thực phẩm an toàn. Các nhà vi sinh vật thực phẩm có trách nhiệm phải nghiên cứu định lượng, phân lập, phát hiện, miêu tả, ngăn ngừa và kiểm soát các vi sinh vật gây bệnh thực phẩm, trong nước và trong cả môi trường.

Việc kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh trong thực phẩm cần được quan tâm nhiều hơn khi sản phẩm nước ta đang hòa nhập vào thị trường thế giới. Cùng trong mối quan tâm đến “Chất lượng, an toàn vệ sinh thực phẩm” hiện nay ở Việt Nam. Bộ môn Công Nghệ Sinh Học trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã đồng ý cho em thực hiện luận văn tốt nghiệp với đề tài “Khảo sát tỉ lệ nhiễm *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* trong thực phẩm tại khu vực chợ Thị Nghè” dưới sự hướng dẫn của thầy Nguyễn Tiến Dũng cùng với sự giúp đỡ tạo mọi điều kiện thuận lợi của phòng thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học Môi Trường, trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh

1.2. Mục đích

Nhằm khảo sát tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* nhiễm trong các nhóm thực phẩm như thịt gia súc, các loại cá, thủy sản và các loại rau. Đồng thời nghiên cứu đề xuất quy trình chế biến thực phẩm trong gia đình hợp vệ sinh nhằm ngăn chặn ngộ độc thực phẩm từ hộ gia đình hay các bếp ăn tập thể.

1.3. Nội dung

1.3.1. Khảo sát tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các loại thực phẩm đang lưu hành trên thị trường

1.3.2. Nghiên cứu quy trình chế biến thực phẩm trong gia đình

- Thực phẩm được rửa với nước sinh hoạt.
- Thực phẩm được rửa với nước muối.
- Thực phẩm được rửa với nước Vegy.

Đề tài có ý nghĩa đóng góp một phần vào việc giúp cho các nhà khoa học và các cơ quan quản lý thực phẩm đánh giá về vấn đề chất lượng thực phẩm trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh và nhìn nhận khách quan về mối nguy hiểm thật sự của *S. aureus* và *E. coli*.

Do thời gian và kinh phí thực hiện đề tài có hạn nên đây chỉ là những đánh giá khởi đầu tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* giúp ngăn ngừa một cách hiệu quả ngộ độc thực phẩm. Các kết quả thu được cũng là thành quả bước đầu tiếp cận với công tác nghiên cứu trong phòng thí nghiệm nên nội dung chắc chắn còn rất nhiều thiếu sót do đó khóa luận không thể tránh khỏi những khiếm khuyết. Rất mong nhận được sự nhận xét, đánh giá quý báu và sự đóng góp chân thành của quý thầy cô, các anh chị và các bạn để khóa luận được xúc tích hơn, hoàn thiện hơn.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Đại cương về *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*

2.1.1. Đại cương về *S. aureus*

S. aureus là vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, có hình cầu, gram dương, có phản ứng đông huyết tương dương tính do chúng tiết ra enzyme coagulase. Năm 1884, Rosenbach đã phân lập được *S. aureus* từ mụn mủ của người. Trong tự nhiên *S. aureus* thường được tìm thấy trên da, mũi, tóc hay lông của các loài động vật máu nóng. *S. aureus* sản sinh một số loại độc tố đường ruột enterotoxin bền nhiệt, không bị phân hủy ở 100°C trong 30 phút. Khi ăn phải thực phẩm có chứa các độc tố này, sau 4 – 6 giờ người bị ngộ độc có các triệu chứng bị tiêu chảy, nôn mửa kéo dài từ 6 – 8 giờ. Các loại thực phẩm có chứa nhiều muối như jambon, kem tổng hợp, nước súp và các loại thủy sản, thực phẩm đóng hộp thường hay nhiễm loài vi sinh vật này. Con đường lây nhiễm chủ yếu thông qua tiếp xúc từ nhà bếp, quá trình chế biến.

Một số dòng *S. aureus* có khả năng gây tan máu trên môi trường thạch máu, vòng tan máu phụ thuộc vào từng chủng nhưng chúng đều có vòng tan máu hẹp so với đường kính của khuẩn lạc. Hầu hết các vi sinh vật này đều sản sinh sắc tố vàng. Nhưng các sắc tố này ít thấy khi quá trình nuôi cấy còn non, sắc tố này thường thấy rõ sau 1 đến 2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Sắc tố được tạo ra nhiều hơn khi môi trường có hiện diện của lactose hay các nguồn carbohydrate khác mà vi sinh vật này có thể bẻ gãy và sử dụng chúng [12].

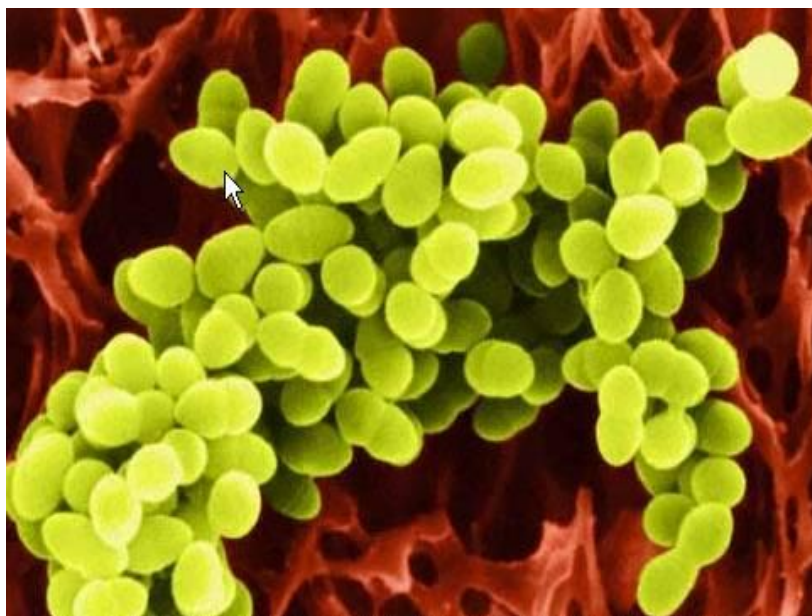
Hầu hết các dòng thuộc loài này có thể tổng hợp độc tố enterotoxin. Ngoài ra các loài *S. intermedius* và *S. hyicus* cũng có thể tạo enterotoxin, nhưng hai loài này có phản ứng coagulase âm tính. Độc tố được sản sinh chỉ khi vi sinh vật phát triển trong môi trường có nhiệt độ trên 15°C, độc tố được sản sinh nhiều nhất khi chúng phát triển trong nhiệt độ 35°C – 37°C [12].

Biện pháp cần thiết để ngăn *S. aureus* phát triển trong thực phẩm là trữ lạnh các sản phẩm chín hay giữ nóng các thực phẩm ăn nóng. *S. aureus* có khả năng chống chịu cao đối với những chất như tellurite, HgCl₂, neomycin, polymycin, sodium azide. Những chất trên được dùng làm tác nhân ức chế trong các môi trường nuôi cấy chọn lọc.

2.1.1.1. Đặc điểm hình thái của *S. aureus*

S. aureus thuộc giống *Staphylococcus*, bộ *Bacillales*, họ *Staphylococcaceae*. *S. aureus* là vi khuẩn có hình cầu, gram dương, tụ lại thành từng chùm, kích thước 0,8 – 1 μm , không di động, không hình thành bào tử, không tạo capsule [20].

Trên môi trường canh *S. aureus* có thể hình chuỗi ngắn, khi canh trường già hơn 24 giờ nó có thể bắt màu gram âm (J.Kirk Skeeles, 1991).



Hình 2.1 Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

2.1.1.2. Đặc điểm nuôi cấy

S. aureus mọc dễ trên nhiều loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn ở điều kiện hiếu khí và kỵ khí tùy nghi. Nhiệt độ thích hợp để *S. aureus* tiết ra sắc tố là ở 37°C nhưng ở nhiệt độ phòng (20 – 25°C) là tốt nhất.

- Trên môi trường thạch dinh dưỡng: *S. aureus* tạo khuẩn lạc tròn ướt, lồi, màu vàng.
- Trên môi trường Chapman agar: tạo khuẩn lạc vàng và môi trường chuyển từ hồng sang vàng.
- Trên môi trường Baird Parker (BP): tạo khuẩn lạc đen, quanh khóm có vòng sáng.
- Trên môi trường thạch máu: gây dung huyết, khuẩn lạc tròn nhẵn, đường kính 1-3 mm, hình thành sắc tố trắng đến hơi vàng (J.Kirk Skeeles, 1991).[13]
- Trên môi trường gelatin: gây tan chảy.

2.1.1.3. Đặc điểm sinh hóa

S. aureus lên men đường manitol, glucose, lactose, không lên men glycerin, cho phản ứng Indol âm tính, Methyl Red dương tính, Voges – Proskauer dương tính, chuyển Nitrate thành Nitrite, không sinh H₂S, catalase dương, coagulase dương [12].

2.1.1.4. Cấu trúc kháng nguyên và độc tố

• Cấu trúc kháng nguyên

Tế bào *S. aureus* là hỗn hợp của hơn 30 loại kháng nguyên. *S. aureus* có kháng nguyên O gồm chủ yếu 2 loại peptidoglycan và protein A

Peptidoglycan: bản chất là một polysaccharide của thành tế bào, có tác dụng giữ cho thành tế bào được chắc, đồng thời kích thích bạch cầu đơn nhân sản xuất interleukin 1 để lôi kéo các tiểu thực bào thực hiện quá trình thực bào. Chúng có hoạt tính như nội độc tố và hoạt hóa bổ thể.

Protein A cũng là thành phần của thành tế bào có tác dụng tham gia trong phản ứng kết hợp bổ thể.

Ngoài ra *S. aureus* còn có các kháng nguyên sau:

Teichoid acid: bản chất là những glycerol hay ribitol phosphate, liên kết với peptidoglycan và nó cũng có tính kháng nguyên. Kháng thể chống lại teichoid acid đã được tìm thấy ở bệnh nhân viêm nội tâm mạc do *S. aureus*.

Nang: chỉ có ở một số dòng *S. aureus* có tác dụng ngăn cản sự thực bào của bạch cầu trung tính.

• Độc tố và enzyme

Theo G.R. Carter (1991) [13], *S. aureus* có các độc tố và enzyme sau:

Độc tố ruột A–E: đây là những protein được cấu tạo từ những chuỗi polypeptide đơn giản. Có 5 nhóm huyết thanh học được đặt tên là SEA (Staphylococcus Enterotoxin A), SEB, SEC, SED và SEE. Nhóm thứ sáu: SEF không được xem là độc tố đường ruột và đặt tên lại là độc tố gây hội chứng shock toxin-1. Dựa vào kiểu kháng nguyên khác nhau, SEC lại được chia thành 3 loại SEC₁, SEC₂ và SEC₃. Những độc tố này đề kháng cao với nhiệt độ.

Độc tố gây dung huyết tế bào α , β , γ , δ : tất cả đều có kiểu kháng nguyên riêng biệt. Những tế bào hồng cầu của nhiều loài thú khác nhau sẽ có tính miễn cảm khác nhau đối với các độc tố này. Độc tố α và β gây dung huyết mạnh, trong đó độc tố α có

ái lực mạnh với hồng cầu thỏ, độc tố này gây co thắt cơ trơn, hoại tử da và gây chết. Độc tố β phân lớn ái lực với tế bào hồng cầu cừu. Độc tố γ bị ức chế bởi cholesterol, độc tố δ bị ức chế bởi những phospholipids. Cách tác động của các độc tố γ , δ và vai trò của chúng trong việc gây bệnh thì được biết đến nhiều.

Độc tố gây ra hội chứng shock: do những dòng vi khuẩn gây ra hội chứng shock độc tính cho người.

Coagulase: làm đông huyết tương, biến đổi prothrombin thành thrombin, fibrinogen thành fibrin. Vai trò của enzyme này đối với độc lực thì chưa được biết đến.

Lipase: gây rối loạn sự bảo vệ các acid béo trên da, những dòng có lipase dương tính thì có khuynh hướng gây ra những abscess trên da và dưới da.

Hyaluronidase: là một enzyme được biết đến như là “một yếu tố dẫn truyền”, nó làm phân hóa acid hyaluronic, tạo điều kiện cho vi khuẩn lan tràn trong mô bào.

Penicillinase: phá hủy vòng β -lactam của penicillin.

Leukocidin: phá hủy bạch cầu hạt và macrophage, nó được tạo thành bởi hai protein có tác động tương hỗ và rất nhạy cảm với nhiệt độ.

Staphylokinase: làm tan fibrin do biến đổi plasminogen thành plasmin bởi enzyme fibrinolytic.

Ngoài ra, *S. aureus* còn có những độc tố và enzyme khác như: collagenase, acid và alkine phosphatase, lysozyme, nuclease, lysotaphin pyrogenic exotoxin, fibrinolysin và elastase .v.v.

Độc tố gây tróc vảy: làm bong biểu bì, tạo nốt phỏng ngoài da.

Catalase: biến hydrogen peroxide thành nước và oxygen.

Protease: phá hủy protein.

2.1.1.5. Sức đề kháng của *S. aureus*

S. aureus đề kháng với sự khô hanh và đóng băng, acid phenic 3 – 5% diệt vi khuẩn này trong 3 – 5 phút, HgCl_2 0,1% diệt khuẩn trong 30 phút hay lâu hơn, formol 1% diệt khuẩn trong 1 giờ.

Một đặc tính kháng của *S. aureus* được sử dụng để phân lập vi khuẩn này là sức chịu đựng cao đối với NaCl 7,5% (J. Kirk Skeeles, 1991) [13]

2.1.1.6. Biểu hiện triệu chứng bệnh

Triệu chứng ngộ độc xuất hiện nhanh 1 – 6 giờ và kéo dài từ 2 – 12 giờ. Triệu

chứng ban đầu là bủn rủn tay chân, đau bụng quặn, chảy nước dãi, buồn nôn và ói mửa có máu và màng viêm, đau đầu, co cơ, toát mồ hôi. Triệu chứng cấp tính qua nhanh mặc dù biếng ăn và tiêu chảy kéo dài 1 – 2 ngày sau. Người già và trẻ em nhạy cảm hơn [11].

2.1.1.7. Điều kiện cần thiết để bộc phát bệnh

Các loại thực phẩm đun nấu không kỹ đều dễ gây tình trạng ngộ độc bởi vi sinh vật này. Các loại thực phẩm thường gặp là trứng, thịt heo, thịt gà, sữa và các sản phẩm của sữa. Các điều kiện cần thiết để ngộ độc bộc phát là: [11]

- Thực phẩm phải nhiễm độc tố của tụ cầu vàng.
- Thực phẩm phải là môi trường tốt cho vi khuẩn phát triển và sinh độc tố.
- Nhiệt độ phải thích hợp cho sự phát triển của tụ cầu và có thời gian cần thiết để sản sinh đủ lượng độc tố để gây bệnh.
- Thực phẩm đó được con người tiêu thụ.

Liều độc tố ruột type A gây bệnh là 1µg tinh khiết. Trong đó type B đòi hỏi liều rất lớn, khoảng 50µg.

2.1.2. Đại cương về *Escherichia coli*

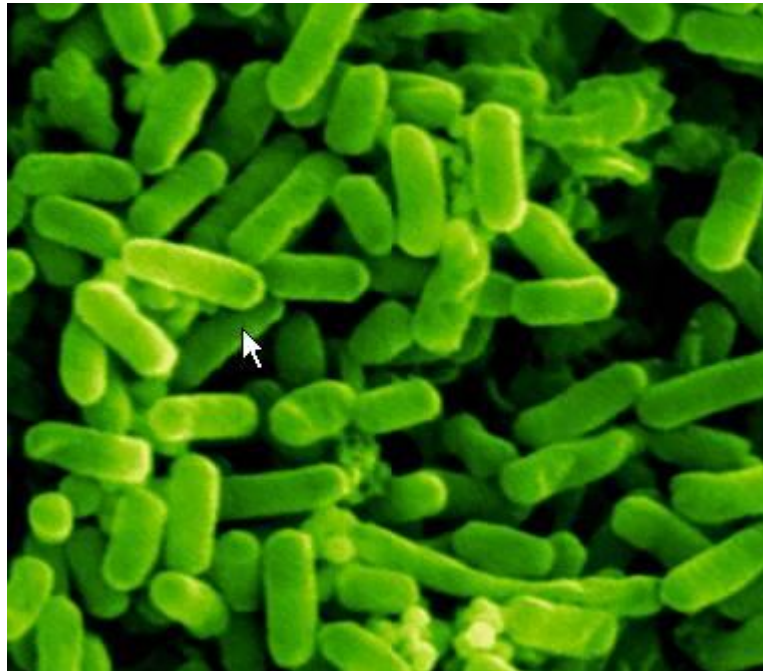
E. coli là vi sinh vật hiếu khí tùy ý, hiện diện trong đường ruột của người và các loài động vật máu nóng. Hầu hết các dòng *E. coli* không gây hại và đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định sinh lý đường ruột.

Các loài *E. coli* hiện diện rộng rãi trong môi trường bị ô nhiễm phân hay chất thải hữu cơ, phát triển và tồn tại rất lâu trong môi trường. Gần đây người ta còn chứng minh được rằng *E. coli* cũng hiện diện ở những vùng nước ấm, không bị ô nhiễm chất hữu cơ. Do sự phân bố rộng rãi trong tự nhiên nên *E. coli* dễ dàng nhiễm vào thực phẩm từ nguyên liệu hay thông qua nguồn nước trong quá trình sản xuất, chế biến. Các dòng *E. coli* gây bệnh gây ra các triệu chứng rối loạn đường tiêu hóa. Biểu hiện lâm sàng thay đổi từ nhẹ đến rất nặng, có thể gây chết người phụ thuộc vào mức độ nhiễm, dòng gây nhiễm và khả năng đáp ứng của từng người.

2.1.2.1. Đặc điểm hình thái

E. coli thuộc giống *Escherichia*, họ *Enterobacteriaceae*, loài *E. coli*. *E. coli* là trực khuẩn gram âm, có kích thước dài hay ngắn tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy. Kích thước trung bình từ 0,5x1 – 3 µm, hai đầu tròn, không bào tử, tạo giáp mô mỏng,

di động được nhờ có lông tơ quanh tế bào, trong bệnh phẩm có khi bắt màu lưỡng cực.[5]



Hình 2.2 Vi khuẩn *Escherichia coli*

2.1.2.2. Đặc điểm nuôi cấy

E. coli phát triển tốt trên các môi trường dinh dưỡng bình thường ở nhiệt độ từ 18 – 44°C hay thấp hơn. Trên môi trường thạch để tủ ấm 37°C trông khuẩn lạc thấp, lồi, mềm, không màu, đường kính 1 – 3 mm. Trên môi trường EMB khuẩn lạc có màu tím ánh kim, trên BGA môi trường chuyển màu vàng. Phần lớn, *E. coli* không mọc trên Wilson blair, vert malachite.

2.1.2.3. Đặc điểm sinh hóa

E. coli có khả năng lên men đường glucose, lactose, mantose, mannitol, xylose, glycerol, rhamnose, sorbitol và arabinose... Không lên men dextrin và inositol. Một vài dòng *E. coli* lên men chậm đường lactose hay không lên men. Phản ứng Indol dương tính, Methyl Red dương tính, Voges – Proskauer âm tính, không có khả năng sử dụng citrate như nguồn carbon duy nhất. Phát triển tốt trong môi trường citrate medium.

2.1.2.4. Cấu trúc kháng nguyên và độc tố

- **Cấu trúc kháng nguyên**

Vi khuẩn đường ruột *E. coli* có cấu trúc kháng nguyên phức tạp. Dựa vào tính chất kháng nguyên, người ta phân chia các vi khuẩn cùng loại thành các tuýp huyết

thanh (serotype) khác nhau (Bộ môn vi sinh, Khoa Y, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh, 1996)[2]:

- Kháng nguyên thân O (somatic antigen) là kháng nguyên của vách tế bào, cấu tạo bởi lipopolysaccharide, có trên 150 loại khác nhau. Đặc tính của kháng nguyên O là:

Chịu được nhiệt, không bị hủy khi đun nóng 100°C trong 2 giờ.

Kháng cồn, không bị hủy khi tiếp xúc với cồn 50%.

Bị hủy bởi formol 5%.

Rất độc, chỉ cần 0,05 mg đủ để giết chuột nhắt sau 24 giờ.

Khi kháng nguyên O gặp kháng huyết thanh tương ứng sẽ xảy ra phản ứng ngưng kết O. Kháng nguyên O giữ vai trò nhất định đối với khả năng gây bệnh của dòng vi khuẩn và có tính chất chuyên biệt cho từng loài vật chủ.

- Kháng nguyên lông H (flagellar antigen): có trên 50 loại khác nhau, cấu tạo bởi protein và có tính chất không chịu nhiệt, bị hủy bởi cồn 50% và các proteinase, không bị hủy bởi formol 5%. Khi kháng nguyên H gặp kháng thể tương ứng sẽ xảy ra hiện tượng ngưng kết H.

- Kháng nguyên giáp mô K (capsular antigen): có hơn 100 loại khác nhau và nằm ngoài kháng nguyên O. Kháng nguyên K là polysaccharide hay là protein. Nếu kháng nguyên K che phủ hoàn toàn thân vi khuẩn thì sẽ ngăn cản phản ứng ngưng kết O. Kháng nguyên giáp mô K (capsular antigen) giúp *E. coli* bám vào tế bào biểu mô trước khi xâm lấn đường tiêu hóa hay đường tiết niệu.

- Kháng nguyên tiêm mao F (fimbrial antigen): có dạng hình sợi, dài khoảng 4 μm , thẳng hay xoắn, đường kính 2,1 – 7 nm, giúp vi khuẩn bám vào tế bào niêm mạc ruột nên rất quan trọng trong khả năng gây bệnh của vi khuẩn.

Hiện nay có hơn 700 tuýp huyết thanh của *E. coli* từ sự tổ hợp các nhóm kháng nguyên O, H, K, F. Dựa vào đó, người ta có thể định danh vi khuẩn.

• **Độc tố đường ruột**

Độc tố của *E. coli*: loại có giáp mô gây độc mạnh hơn loại không có giáp mô.

Độc tố gồm có hai loại: nội độc tố và ngoại độc tố. Nội độc tố gây tiêu chảy, ngoại độc tố gây tan huyết, phù thũng...

Ngoại độc tố gồm hai loại: loại chịu nhiệt ST và loại không chịu nhiệt LT. Dựa vào hội chứng bệnh và tính chất gây bệnh của *E. coli*, người ta chia chúng thành 5

nhóm: [12]

- EAEC (enteroaggregative *E. coli*): *E. coli* kết tập ở ruột.
- EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*): *E. coli* gây xuất huyết ở ruột.
- EIEC (enteroinvasive *E. coli*): *E. coli* xâm lấn niêm mạc ruột.
- EPEC (enteropathogenic *E. coli*): *E. coli* gây bệnh đường ruột.
- ETEC (enterotoxigenic *E. coli*): *E. coli* sinh độc tố ruột.

Nhóm EAEC có liên quan đến EPEC, chúng có các khuẩn mao (fimbriae). Đó là yếu tố gây kết tập *E. coli* lại với nhau nhờ protein đặc hiệu ở màng ngoài tế bào. Vài dòng EAEC sản sinh độc tố ruột chịu nhiệt. EAEC chủ yếu gây tiêu chảy cho trẻ em. Đáng chú ý là O3:H2, O4:H7 và O44 [11].

Nhóm EHEC: nhu cầu dinh dưỡng của nhóm này không giống như các nhóm khác. Chúng có 16 kiểu huyết thanh, 4 kiểu huyết thanh không sinh trưởng ở 5°C, 12 kiểu huyết thanh không sinh trưởng ở 8°C. Độc tố sản sinh trong môi trường nuôi cấy từ 21 đến 37°C. Không giống với hầu hết các kiểu huyết thanh *E. coli* khác, kiểu O157H7 không sinh trưởng ở 44,5°C, sinh trưởng tối đa ở khoảng 42°C. *E. coli* O157H7 sinh độc tố trong môi trường pH khoảng 3,7 – 3,9, chúng không sinh trưởng ở 8,5% NaCl. Dòng *E. coli* O157 sản sinh verotoxin, người tiêu thụ ăn phải thức ăn nhiễm từ 20 – 100 vi khuẩn thuộc kiểu huyết thanh này sẽ bị đau bụng quặn, viêm đại tràng với hội chứng kiết giống hệt như bệnh lý trực khuẩn, tiêu phân có máu. Có thể sốt hay không sốt. Bệnh có thể diễn biến nặng, gây ra xuất huyết nội nghiêm trọng ở não, phổi, thận và có thể gây suy thận dẫn đến tử vong.

Nhóm ETEC không sản sinh độc tố ruột như ETEC nhưng chúng nhân lên nhanh chóng ở biểu mô ruột và xâm lấn mạnh mẽ đến các vùng kế cận. Chúng tấn công ở đoạn kết tràng, xâm nhập vào máu hay không xâm nhập. Người già và trẻ em rất nhạy cảm. Thời gian ủ bệnh khoảng 2 – 48 giờ, trung bình 12 giờ.

Nhóm EPEC gây ra tiêu chảy nhưng chúng không sản sinh độc tố ruột. Chúng có yếu tố kết dính nên bám vào màng nhầy ruột và phá hủy các vi nhung mao ruột.

Nhóm ETEC gồm những dòng mang yếu tố bám và xâm chiếm niêm mạc ruột non (CFAs: fimbrial colonization factor antigens). Có 4 kiểu huyết thanh CFA ký hiệu lần lượt là: I, II, III và IV. Chúng gây tiêu chảy trên người lớn lẫn trẻ em. Chúng tiết các loại độc tố ruột kém chịu nhiệt LT (Heat Labile) và chịu nhiệt ST (Heat Stable). ST có 2 loại: ST-I và ST-II.

2.1.2.5. Sức đề kháng của *E. coli*

E. coli bị diệt ở 60°C từ 15 – 30 phút, nhiệt độ lạnh chịu được 2 giờ. Trong điều kiện tự nhiên, *E. coli* sống được một vài tuần đến một vài tháng. Formol, acid fenic, HgCl₂ diệt vi khuẩn trong 5 phút. Hấp autoclave 121°C trong 15 phút thì diệt được *E. coli* [5,7].

2.1.2.6. Triệu chứng ngộ độc

Thời gian ủ bệnh từ 2 – 20 giờ, người trúng độc đau bụng dữ dội, ít nôn mửa, đi phân lỏng khoảng 1 – 15 lần trong ngày. Thân nhiệt bình thường hay tăng nhẹ. Trường hợp nặng thì sốt cao, mệt mỏi, tay chân co quắp, đổ mồ hôi, thời gian khỏi bệnh tương đối dài [5,7].

2.2. Phương pháp định lượng *S. aureus* và *E. coli*

2.2.1. Phương pháp đếm trực tiếp

Quy trình đếm trực tiếp cho phép xác định nhanh chóng mật độ vi sinh vật trong mẫu, nhưng phương pháp này có một số nhược điểm là không phân biệt được giữa tế bào sống và tế bào chết, dễ nhầm lẫn tế bào vi sinh vật với các hạt vật thể khác trong mẫu, khó đạt được độ chính xác cao, không thích hợp cho huyền phù vi sinh vật có mật độ thấp.

2.2.1.1. Đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu

Buồng đếm hồng cầu thường là một phiến kính dày 2 – 3 mm có một vùng đĩa đếm nằm giữa phiến kính và được bao quanh bởi một rãnh. Đĩa đếm thấp hơn bề mặt của phiến kính khoảng 1/10 mm, có hình tròn, vì thế khi được phủ lên bằng một lá kính thì độ sâu của đĩa đếm sẽ đồng đều nhau. Vùng đĩa đếm có diện tích 1 mm² và được chia thành 25 ô vuông lớn có diện tích mỗi ô là 1/25 mm² và 400 ô vuông nhỏ hơn, mỗi ô có diện tích 1/400 mm².

Khi thực hiện quan sát và đếm vi sinh vật, cho thêm vài giọt formalin vào trong mẫu, trộn đều. Pha loãng mẫu cần đếm sao cho trong mỗi ô nhỏ của buồng đếm có khoảng 5 – 10 tế bào vi sinh vật. Đặt một giọt mẫu được pha loãng vào vùng đếm trên buồng đếm, đậy bằng lá kính. Chính kính hiển vi với vật kính X40, tìm mạng ô đếm ở khu vực buồng đếm. Chính thị trường sao cho một thị trường chứa trọn một ô lớn. Đếm số tế bào hiện diện trong một ô lớn. Sau đó chính thị trường tìm một ô lớn khác. Đếm số tế bào của ít nhất 5 ô lớn. Lấy trị số trung bình.

2.2.1.2. Đếm trực tiếp bằng buồng đếm Breed

Buồng đếm này rất hữu ích trong việc đếm tổng số vi sinh vật bằng phương pháp đếm trực tiếp. Buồng đếm Breed có một vùng diện tích 1 cm² được đánh dấu. Dùng bơm tiêm hay que cấy vòng cho khoảng 0,01 ml mẫu cần đếm vào trong vùng này, sấy khô bằng ngọn lửa sau đó nhuộm với methyl blue. Khi đếm, cho dầu nhúng lên diện tích vùng cần đếm.

2.2.1.3. Đếm trực tiếp bằng kính hiển vi huỳnh quang

Số đếm nhận được từ phương pháp này luôn cho kết quả cao khoảng gấp đôi so với kết quả nhận được bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Giá trị của số đếm trực tiếp bằng phương pháp phát huỳnh quang trên kính hiển vi tương đương với số lượng vi sinh vật thật sự có trong mẫu. Số đếm này thường phản ánh đúng với sinh khối, vì thế thường được dùng để ước lượng sinh khối vi sinh vật có trong mẫu.

2.2.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc

Khác với phương pháp đếm trực tiếp, phương pháp đếm khuẩn lạc cho phép xác định số lượng tế bào vi sinh vật còn sống hiện diện trong mẫu. Tế bào sống là tế bào có khả năng phân chia tạo thành khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc. Do vậy phương pháp này có tên gọi là phương pháp đếm khuẩn lạc hay đếm đĩa. Phương pháp này có đặc điểm là cho phép định lượng chọn lọc vi sinh vật tùy môi trường và điều kiện nuôi cấy. Phương pháp đếm khuẩn lạc có thể được thực hiện bằng kỹ thuật hộp trái hay hộp đổ với các thiết bị hỗ trợ để đọc kết quả. Phương pháp này cần thực hiện pha loãng mẫu thành nhiều độ pha loãng bậc 10 liên tiếp sao cho có độ pha loãng với mật độ tế bào thích hợp để xuất hiện các khuẩn lạc riêng lẻ trên bề mặt thạch với số lượng đủ lớn để hạn chế sai số khi đếm và tính toán.

Ngoài ra, do có khả năng nhiều tế bào hình thành chung một khuẩn lạc nên số đếm khuẩn lạc không nhất thiết trùng lặp với số tế bào ban đầu được đưa lên môi trường nên kết quả đếm và mật độ tế bào thường được trình bày bằng số đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU/ml thay vì số tế bào/ml.

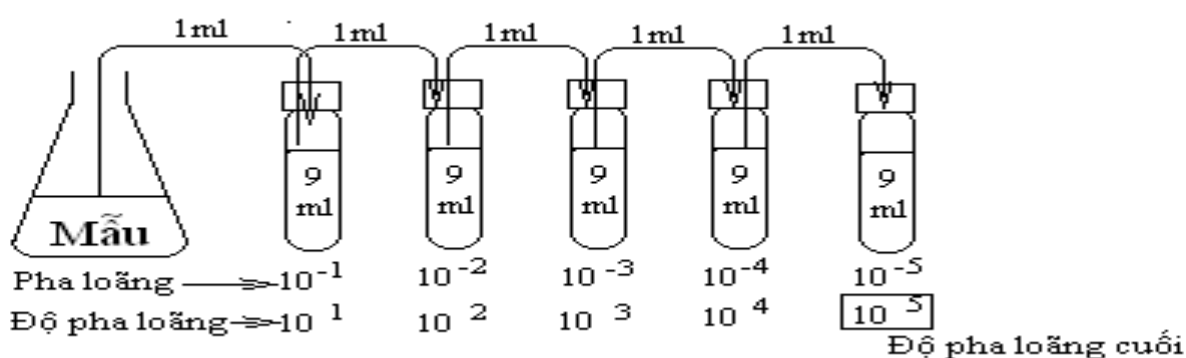
Mặc dù vẫn có một số nhược điểm nhưng phương pháp đếm khuẩn lạc vẫn là phương pháp tốt nhất để xác định mật độ tế bào sống. Ngoài ra, phương pháp này còn có ưu điểm là độ nhạy cao, cho phép định lượng vi sinh vật ở mật độ thấp trong mẫu. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm vi sinh vật trong nước,

thực phẩm, bệnh phẩm.

Sau đây là quy trình thao tác xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc:

2.2.2.1. Pha loãng mẫu theo dãy thập phân

Mẫu được pha loãng tuần tự thành dãy các nồng độ thập phân 1/10, 1/100, 1/1000... Mỗi bậc pha loãng là 1/10 được thực hiện bằng cách dùng 1 ml mẫu thêm vào 9 ml dung dịch pha loãng. Sau khi lắc kỹ sẽ được độ pha loãng 1/10. Có thể tiến hành bằng các thể tích khác, ví dụ 0,5 ml + 4,5 ml trong ống nghiệm hoặc 0,1 ml + 0,9 ml trong ống Eppendorf. Thông thường cần thực hiện dãy nhiều nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp để được nồng độ pha loãng thích hợp.



Hình 2.3: Phương pháp pha loãng mẫu theo dãy thập phân

2.2.2.2. Tạo hộp trải hay hộp đổ

• Tạo hộp trải

Đây là phương pháp thay thế cho phương pháp đổ đĩa để phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm, nhất là các chỉ tiêu vi sinh vật nhạy cảm với nhiệt độ như *Pseudomonas*, các vi sinh vật này sẽ bị suy yếu khi tiếp xúc với nhiệt độ của môi trường agar ở trạng thái lỏng. Phương pháp này cũng được dùng để phân tích các chỉ tiêu mà các dòng nhận được phải cấy chuyển ở các bước tiếp theo.

Dùng pipette cấy 0,1 ml hay một thể tích phù hợp lên bề mặt đĩa môi trường đã được làm khô và trải đều bằng que cấy trang để dàn đều mẫu trên khắp bề mặt môi trường. Ủ các đĩa đã cấy ở điều kiện nhiệt độ và thời gian xác định tùy theo từng chỉ tiêu phân tích, đếm các khuẩn lạc đặc trưng hay tất cả các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa.

• Tạo hộp đổ

Các môi trường agar được đun chảy trong các chai hay trong các ống nghiệm có thể tích phù hợp. Được làm mát trong các bể điều nhiệt ở 45°C.

Hút 1 ml mẫu dung dịch pha loãng cho vào trong đĩa petri vô trùng. Mỗi độ pha loãng thường được cấy vào hai đĩa petri hay nhiều hơn. Sử dụng các pipette sạch cho mỗi độ pha loãng. Chỉ chọn cấy vào đĩa petri những độ pha loãng có mật độ vi sinh vật phù hợp. Đổ vào mỗi đĩa đã cấy 10 – 15 ml môi trường đã được đun chảy và làm nguội, lắc đĩa ngược theo chiều kim đồng hồ khoảng 5 – 6 lần, đặt đĩa lên mặt phẳng ngang và đợi cho đến khi môi trường trong đĩa đông đặc. Lật ngược đĩa và ủ trong điều kiện nhiệt độ và thời gian xác định.

- **Tính kết quả**

Mật độ tế bào vi sinh vật trong mẫu ban đầu tính từ số liệu của độ pha loãng D_1 được tính theo công thức là:

$$M_i \text{ (CFU/ml)} = A_i \times D_i/V$$

Với A_i là số khuẩn lạc trung bình /đĩa, D_i là độ pha loãng và V là dung tích huyền phù tế bào cho vào mỗi đĩa (ml).

Mật độ tế bào trung bình M_1 trong mẫu ban đầu là trung bình cộng của M_i ở các nồng độ pha loãng khác nhau.

Công thức nêu trên được áp dụng khi cả hai đĩa của cùng một độ pha loãng cho số khuẩn lạc thích hợp. Như vậy, khi chỉ có 1 độ pha loãng có cặp đĩa cho số lượng khuẩn lạc thích hợp: 25 – 250 khuẩn lạc/đĩa thì M_1 chính là mật độ của vi sinh vật trong mẫu. Nếu có hai hoặc nhiều độ pha loãng mà mỗi độ pha loãng đều có cặp đĩa cho số lượng khuẩn lạc thích hợp, mật độ vi sinh trong mẫu là trung bình cộng của các M_i . Nếu không trường hợp nào tất cả các độ pha loãng có cả 2 đĩa cho số khuẩn lạc thích hợp thì có thể đếm và tính kết quả theo hướng dẫn của FDA như sau:

- 1 độ pha loãng có 2 đĩa dưới 25 khuẩn lạc: tính mật độ như công thức nêu trên, đánh dấu trên kết quả để biết đây là kết quả ước định tính từ những đĩa nằm ngoài 25 – 250.

- 1 độ pha loãng có 2 đĩa trên 250 khuẩn lạc: thực hiện tương tự như trường hợp nêu trên.

- 1 độ pha loãng có 1 đĩa có số khuẩn lạc thích hợp và 1 đĩa ngoài 25 – 250: sử dụng số khuẩn lạc của cả 2 đĩa và tính theo công thức bình thường.

- 2 độ pha loãng đếm được trong đó 1 độ pha loãng có cặp đĩa trong ngưỡng và độ pha loãng kia có 1 đĩa trong và 1 đĩa ngoài ngưỡng: sử dụng số liệu của cả 4 đĩa để tính mật độ theo công thức bình thường.

- 2 độ pha loãng đếm được mỗi độ pha loãng có 1 đĩa trong và 1 đĩa ngoài ngưỡng: sử dụng số liệu của cả 4 đĩa để tính mật độ theo công thức bình thường.

2.2.3. Phương pháp màng lọc

Phương pháp này thường được dùng để định lượng vi sinh vật chỉ thị trong mẫu nước khi tiến hành các thử nghiệm môi trường nơi có mật độ vi sinh vật tương đối thấp. Phương pháp này là sự kết hợp của phương pháp lọc vô trùng và phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa petri. Màng lọc có kích thước lỗ là 0,45 μm hoặc 0,2 μm được chế tạo từ các nguyên liệu là sợi thủy tinh siêu mảnh, sợi polypropylene, thường được cung cấp trong trạng thái vô trùng.

2.2.4. Phương pháp MPN (Most Probable Number)

Phương pháp MPN còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ. Đây là phương pháp dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo số lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất hiện diện trong một đơn vị thể tích mẫu. Đây là phương pháp định lượng dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được lặp lại ở một số độ pha loãng khác nhau. Thông thường, việc định lượng này được thực hiện lặp lại 3 lần ở 3 độ pha loãng bậc 10 liên tiếp, tổng cộng $3 \times 3 = 9$ ống nghiệm.

2.2.5. Phương pháp đo độ đục

Ngoài các phương pháp nêu trên, mật độ vi sinh vật có thể được xác định một cách gián tiếp thông qua đo độ đục. Khi một pha lỏng có chứa nhiều phần tử không tan thì sẽ hình thành một hệ huyền phù và có độ đục bởi các phần tử hiện diện trong môi trường lỏng cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỷ lệ với mật độ tế bào. Do vậy có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua đo độ đục bằng máy so màu ở các bước sóng từ 550 – 610 nm.

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

3.1.1. Thời gian thực hiện

Thời gian thực hiện đề tài từ 01/03/2005 đến 01/07/2005.

3.1.2. Địa điểm thực hiện

Nơi lấy mẫu: Mẫu được lấy tại chợ Thị Nghè

Nơi tiến hành phân tích thí nghiệm: Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học Môi trường tại Trung tâm Phân tích Hóa sinh, Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh.

3.2. Vật liệu

3.2.1. Dụng cụ và thiết bị

3.2.1.1. Dụng cụ

Bình tam giác, cốc, ống đong hình trụ 50, 100, 500 ml, pipetman, ống nghiệm, hộp đĩa petri, que cấy vòng, đèn cồn, bao PE vô trùng, kéo cắt, pince kim loại, khay kim loại, bơm hút chân không.

3.2.1.2. Thiết bị

Cân phân tích, máy đo pH, máy đập mẫu, kính hiển vi, nồi hấp autoclave, tủ sấy, tủ cấy an toàn sinh học, tủ ấm 37°C, bể điều nhiệt, tủ lạnh.

3.2.2. Hóa chất và môi trường

3.2.2.1. Hóa chất và thuốc thử

- Bacto Egg Yolk tellurite emulsion.
- Huyết tương.
- Thuốc thử Kovac's gồm các thành phần sau: p-dimethylaminobenzaldehyde (p-DMABA) 10 g/l, isoamyl alcohol 150 g/l, HCl đậm đặc 50 ml/l. Hòa tan p-DMABA trong dung môi, bổ sung và khuấy từng phần nhỏ HCl cho đến khi đủ lượng. Thuốc thử được chứa trong chai màu tối tránh ánh sáng ở 4°C. Có thể thay thế isoamyl alcohol bằng amyl alcohol hoặc butanol.

- Thuốc thử Methyl red gồm: Methyl red 0,1 g, ethanol 95% 300 ml, nước cất (đủ) 500 ml. Hòa tan đỏ methyl vào 300 ml ethanol. Thêm nước cất vào cho đủ thể tích 500 ml.

- Dung dịch α – naphthol gồm: α – naphthol 1 g/l, 5N acetic acid 200 ml/l. Chuẩn bị acid acetic 5N bằng cách cho 28,75 ml acid glacial acetic vào 71,25 ml nước cất vô trùng. Trữ dung dịch này trong chai thủy tinh màu tối.

- KOH 40%
- Cồn 70°, cồn 96° và nước cất.

3.2.2.2. Môi trường

Dung dịch Saline Peptone Water (SPW): peptone 1 g/l, NaCl 8,5 g/l, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút, pH sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$.

Môi trường thạch Baird Parker Agar gồm các thành phần sau: trypton 10 g/l, cao thịt 5 g/l, cao nấm men 1 g/l, sodium pyruvate 10 g/l, glycine 12 g/l, lithium chloride.6H₂O 5 g/l, agar 20 g/l. Hấp ở 121°C trong 15 phút, pH cuối là $7,0 \pm 0,2$. Nếu muốn sử dụng ngay, giữ môi trường nóng chảy ở 48 – 50°C trước khi thêm Bacto EY tellurite enrichment. Ngược lại, giữ môi trường rắn ở $4 \pm 1^\circ\text{C}$ cho đến 1 tháng. Làm nóng chảy trước khi sử dụng. Môi trường hoàn chỉnh: thêm một cách vô trùng 5 ml Bacto EY tellurite emulsion được làm ấm ở 45 – 50°C vào 95 ml môi trường cơ bản được làm nóng chảy. Trộn đều và đổ 15 – 18 ml vào trong các hộp Petri 15 x 100 mm vô trùng. Môi trường phải đục, làm khô đĩa trước khi sử dụng. Có thể giữ các đĩa đã được chuẩn bị ở 20 – 25°C cho đến 5 ngày.

Môi trường Eosin Methylene Blue Lactose agar (EMB): là môi trường dùng để phân lập *E. coli*. Thành phần EMB gồm: pepton 10 g/l, lactose 5 g/l, sucrose 5 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, Eosin 0,4 g/l, methyl blue 0,065 g/l, Agar 13,5 g/l. Đun nóng để hòa tan agar trong cốc bercher, phân phối vào các đĩa petri khoảng 10 ml. Hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút, pH sau khi khử trùng là 7,2.

Môi trường Tryptic Soya Agar (TSA): được sử dụng để bảo quản và phục hồi giống vi sinh vật trong quá trình thí nghiệm. Thành phần TSA gồm: tryptone 15 g/l, peptone đậu nành 5 g/l, agar 15 g/l. Đun nóng để hòa tan agar trong cốc bercher, phân phối vào các ống nghiệm khoảng 5 – 7 ml. Hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút, pH sau khi khử trùng là 7,3. Sau đó để nguội khoảng 50 – 60°C rồi để thạch nguội.

Môi trường canh Trypton gồm: peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l.

Môi trường MR–VP Broth:

- Môi trường 1 gồm các thành phần sau: Buffered peptone water (Difco hoặc

BBL) 7 g, glucose 5 g, K_2HPO_4 5 g, 1 lít nước cất.

- Môi trường 2 gồm các thành phần sau: Casein Pancreatic Digest 3,5 g, peptic digest of animal tissue 3,5 g, dextrose 5 g, potassium phosphate 5 g, 1 lít nước cất.

Hòa tan các thành phần trong nước, làm nóng nhẹ nếu cần. Phân phối 10ml vào các ống nghiệm 16 x 150 mm và hấp vô trùng ở 118 – 121°C trong 15 phút. pH cuối $6,9 \pm 0,2$.

Môi trường Simmons Citrate Agar gồm các thành phần sau: sodium citrate 2 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 1 g, $NH_4H_2PO_4$ 1 g, $MgSO_4$ 0,2 g, bromothymol blue 0,08 g, agar 15 g, 1 lít nước cất. Đun nóng nhẹ và thỉnh thoảng lắc. Đun sôi 1 – 2 phút cho đến khi hòa tan. Phân phối vào 1/3 ống nghiệm có nắp 13 x 100 hoặc 16 x 150 mm. Hấp ở 121°C trong 15 phút. Đặt nghiêng ống nghiệm. pH cuối $6,8 \pm 0,2$.

3.2.3. Vật liệu thí nghiệm

Mẫu thực phẩm sử dụng trong thí nghiệm bao gồm các loại thực phẩm tươi sống được thu từ chợ Thị Nghè. Các mẫu được thu đại diện cho 3 nhóm thực phẩm: thịt gia súc, thủy hải sản và rau được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1 Các nhóm thực phẩm được sử dụng trong thí nghiệm

Nhóm mẫu thực phẩm	Số lượng	Loại mẫu
Thịt gia súc	2	Thịt heo, thịt bò
Cá	9	Các loại cá, mực, tôm, ...
Rau	7	Các loại rau ăn sống và rau nấu canh như: rau xà lách, cải caron, bắp cải, rau đắng, rau muống, cải ngọt, cải bó xôi.

3.3. Phương pháp

3.3.1. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu được thu tại chợ và được chứa trong bao nylon hoặc hộp nhựa sạch, phải bảo quản mẫu bằng nước đá cho tới khi vận chuyển đến phòng thí nghiệm để phân tích. Nếu chưa phân tích, mẫu được bảo quản trong tủ lạnh ở 4 - 5°C trong 24 – 36 giờ, riêng đối với mẫu rau được bảo quản ở ngăn mát.

3.3.2. Phương pháp bảo quản chủng vi sinh vật

Các chủng *S. aureus* và *E. coli* phân lập được từ thực phẩm được bảo quản trong các ống nghiệm thạch nghiêng TSA để dùng trong các bước thử nghiệm sinh hóa và phản ứng đông huyết tương. Từ các ống thạch nghiêng TSA ở giai đoạn phục hồi, lấy một ít sinh khối bằng que cấy vòng cấy chuyển sang các ống nghiệm thạch nghiêng TSA mới để nhân giống và bảo quản giống, ủ ở 37°C qua đêm. Bảo quản các ống vi khuẩn giống này trong tủ lạnh ở 3 – 4°C đến khi sử dụng tiếp vào các thí nghiệm. Thời gian bảo quản từ 1 – 2 tháng. Hết hạn bảo quản, các chủng được hoạt hóa và cấy chuyển như trên. Mỗi ống chủng phải có ghi các thông tin như: tên, ký hiệu mẫu, ký hiệu chủng, ngày, số lần cấy chuyển.

3.3.3. Định lượng *S. aureus* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

3.3.3.1. Nguyên tắc

Cấy trang một lượng mẫu xác định trên bề mặt môi trường thạch chọn lọc. Sau khi ủ, đếm số khuẩn lạc có những đặc điểm đặc trưng và không đặc trưng của *S. aureus*. Xác nhận các khuẩn lạc đã đếm bằng phản ứng coagulase và các phản ứng đặc trưng khác. Kết quả được xác định bằng số lượng khuẩn lạc đã đếm, thể tích cấy, độ pha loãng và hệ số xác nhận.

3.3.3.2. Môi trường và hóa chất

- Môi trường thạch Baird Parker Agar (BPA)
- Tryptone soya agar (TSA)
- Huyết tương

3.3.3.3. Tiến hành

• Xử lý và pha loãng mẫu

Cân $10 \pm 0,1$ g mẫu trong túi vô trùng, thêm 90 ml dung dịch pha loãng, đồng nhất bằng máy đập mẫu khoảng 30 giây. Chuẩn bị dãy pha loãng thích hợp tùy theo mức nhiễm của từng loại mẫu sao cho khi cấy một thể tích xác định lên đĩa BP sau khi ủ có khoảng 10 – 100 khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa.

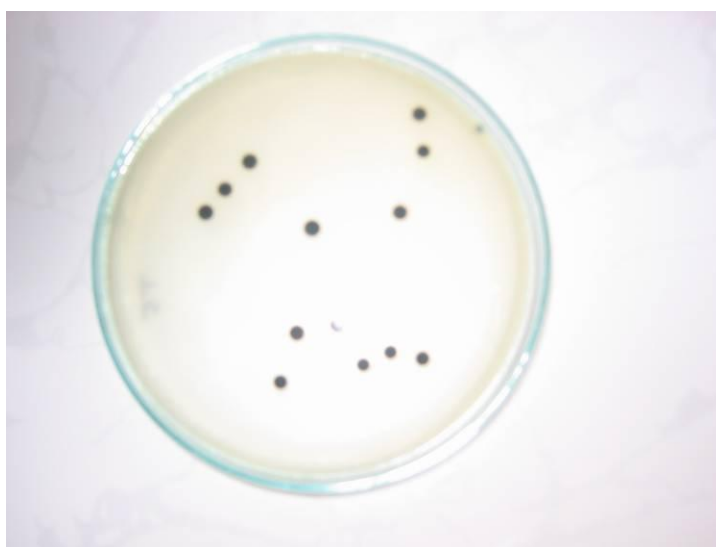
• Cấy mẫu

Cấy 0,1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng vào đĩa môi trường Baird Parker agar, nếu mật độ *S. aureus* trong mẫu thấp có thể cấy 1 ml dung dịch pha loãng phân

phối vào 3 đĩa môi trường BP, dùng que cấy tam giác trang đều trên bề mặt cho đến khi khô mặt. Lật ngược đĩa, ủ ở $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 – 48 giờ.

- **Đọc kết quả**

Sau 24 giờ trên môi trường Baird Paker agar, khuẩn lạc *S. aureus* có đường kính 0,5 – 1 mm, lồi, đen bóng có vòng sáng rộng khoảng 1 – 2 mm bao quanh. Đánh dấu trên mặt đáy của đĩa các khuẩn lạc có đặc điểm như trên và tiếp tục ủ đến 48 giờ. Sau 48 giờ khuẩn lạc *S. aureus* có đường kính khoảng 1 – 1,5 mm, màu đen bóng, lồi, có vòng trắng đục hẹp và có vòng sáng rộng khoảng 2 – 4 mm bao quanh. Có một số dòng *S. aureus* cho khuẩn lạc không đặc trưng. Cần đếm và đánh dấu hai khuẩn lạc.



Hình 3.1: Hình dạng của khuẩn lạc *S. aureus* trên môi trường BP

- **Khả năng định**

Trên môi trường BP: cấy 3 khuẩn lạc đặc trưng và 3 khuẩn lạc không đặc trưng từ môi trường BP vào môi trường TSA, ủ ở $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ, cấy vi khuẩn từ môi trường TSA vào các ống nghiệm chứa huyết tương đã rải đông, ủ ở $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. theo dõi kết quả phản ứng đông huyết tương sau các khoảng thời gian 2, 4, 6, 8 và 24 giờ. Tính tỉ lệ khả năng định trên các khuẩn lạc đặc trưng và không đặc trưng. Thực hiện tương tự với các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch máu .

Kết quả phản ứng :

- Dương tính: có khối đông huyết tương hình thành. Mọi mức độ đông kết đều được coi là dương tính.

- Âm tính: không có khối đông, hỗn dịch vẫn đồng nhất như ống không cấy. Ngoài *S. aureus*, chỉ có *S. intermedius* và một số ít *S. hyicus* cho phản ứng đông huyết

tương đương tính.

- **Tính kết quả**

Số lượng *S. aureus* được tính như sau:

$$\text{Số CFU } S. aureus = \frac{N}{nVf} R$$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc *S. aureus* đã đếm

V: thể tích mẫu cấy vào đĩa

n: số lượng đĩa cấy cho một mẫu

f: độ pha loãng của mẫu

R: tỉ lệ xác nhận của *S. aureus*

Quy trình định lượng *S. aureus*

Cấy 0,1 ml dung dịch mẫu đã pha loãng (10^{-1}) lên bề mặt 2 đĩa môi trường Baird Parker Agar, trang đều bằng que tam giác.

Đếm số khuẩn lạc đặc trưng (N)
Chuyển 3 khuẩn lạc đã đếm sang môi trường TSA
Ủ ở $37 \pm 0,5$ qua đêm

Cấy chuyển vào ống chứa 0,2 ml huyết tương.
Ủ ở $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ và theo dõi sau 2, 4, 6, 8 giờ.
Nếu không có biểu hiện ngưng kết sẽ ủ tiếp đến 24 giờ.
Xác định tỷ lệ dương tính R

Kết quả: Số *S. aureus* (S cfu/g)
$$\text{Số CFU } S. aureus = \frac{N}{nVf} R$$

3.3.4. Định lượng *E. coli* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

3.3.4.1. Nguyên tắc

Cấy 1 thể tích xác định các nồng độ pha loãng thích hợp lên môi trường chọn lọc. Sau khi ủ ở 37°C trong khoảng thời gian 24 giờ, đếm các khuẩn lạc có hình dạng đặc trưng của *E. coli*. Xác nhận các khuẩn lạc đã đếm bằng các phản ứng sinh hóa. *E. coli* có các phản ứng sinh hóa đặc trưng như sau: Indol dương tính, Methyl Red dương tính, Voges Proskauer âm tính và Citrat âm tính.

3.3.4.2. Môi trường và hóa chất

- Tryptone soya agar (TSA)
- Eosine methyl blue (EMB)
- Tryptone broth
- Thuốc thử Kovac's
- MR – VP broth
- Thuốc thử Methyl Red
- KOH 40% và α – naphthol 5%
- Simmon citrate

3.3.4.3. Quy trình cấy mẫu.

• Xử lý và pha loãng mẫu

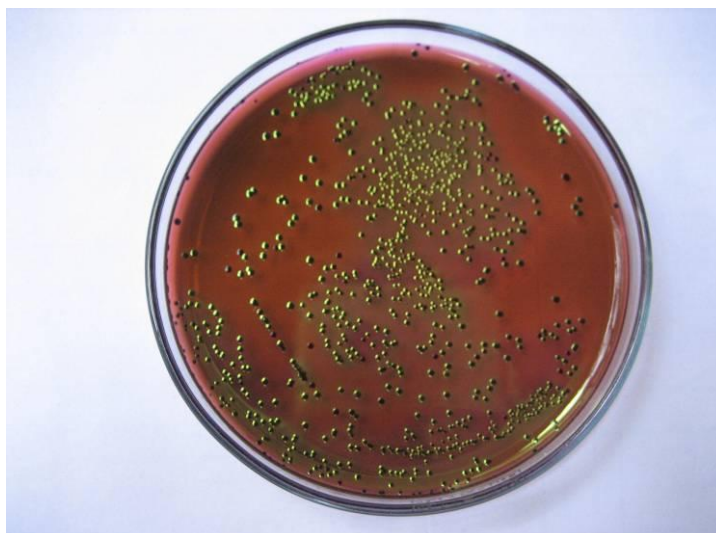
Cân $10 \pm 0,1$ g mẫu trong túi vô trùng, thêm 90 ml dung dịch pha loãng, đồng nhất bằng máy đập mẫu khoảng 30 giây. Chuẩn bị dãy pha loãng thích hợp tùy theo mức nhiễm của từng loại mẫu sao cho khi cấy một thể tích xác định lên đĩa EMB sau khi ủ có khoảng 10 – 100 khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa.

• Cấy mẫu

Cấy 0,1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng vào đĩa môi trường EMB, nếu mật độ *E. coli* trong mẫu thấp có thể cấy 1 ml dung dịch pha loãng phân phối vào 3 đĩa môi trường EMB, dùng que cấy tam giác trang đều trên bề mặt cho đến khi khô mặt. Lật ngược đĩa, ủ ở $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 giờ.

• Đọc kết quả

Chọn các đĩa có từ 10 – 100 khuẩn lạc, đối với những đĩa có số khuẩn lạc nhiều thì kích thước các khuẩn lạc thường nhỏ và không rõ. Đếm những khuẩn lạc dẹt, có ánh kim tím trên mặt, đường kính khoảng 1 mm.

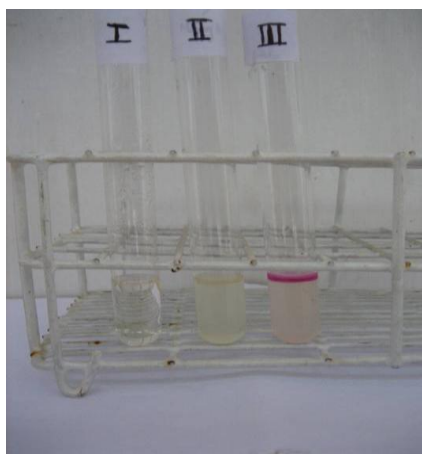


Hình 3.2 Hình dạng của khuẩn lạc *E. coli* trên môi trường EMB

- **Giai đoạn xác định**

Chọn 3 khuẩn lạc đặc trưng cấy chuyển sang môi trường TSA, ủ ở $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ, cấy vi khuẩn từ môi trường TSA vào các môi trường sau: canh thang tryptone, canh thang MRVP, simmon citrate. Ủ các môi trường trên ở $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 24 giờ. Thử phản ứng Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, citrate.

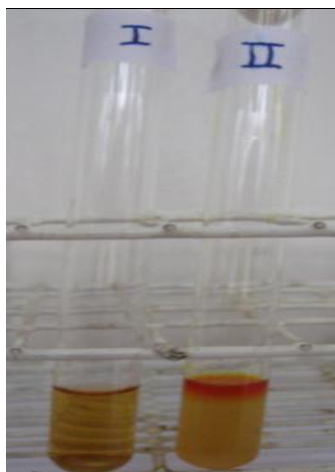
- Thử nghiệm Indol: nhỏ vài giọt thuốc thử Kovac's vào canh khuẩn trong môi trường canh tryptone. Phản ứng dương tính khi có vòng đỏ xuất hiện trên bề mặt, phản ứng âm tính khi không có vòng đỏ trên:



Hình 3.3: Thử nghiệm Indol

I: Môi trường Canh Tryptone trước khi nuôi cấy, **II:** Phản ứng Indol âm tính, **III:** Phản ứng Indol dương tính

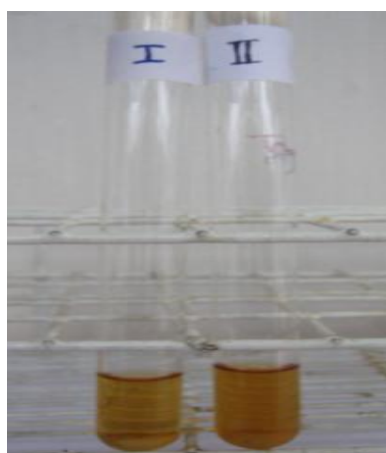
- Thử nghiệm Methyl Red: nhỏ vài giọt thuốc thử Methyl Red vào canh khuẩn trong môi trường MRVP, lắc đều. Phản ứng dương tính khi canh khuẩn chuyển sang màu đỏ, phản ứng âm tính khi canh khuẩn không chuyển màu.



Hình 3.4: Thử nghiệm Methyl Red

I: Môi trường MRVP trước khi nuôi cấy, **II:** Phản ứng MR dương tính

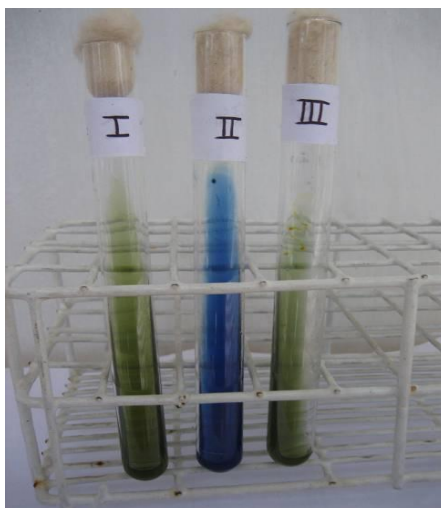
- Thử nghiệm Voges Proskauer: cho 0,2 – 0,3 ml KOH 40% vào canh khuẩn MRVP, lắc mạnh sau đó cho 0,2 ml thuốc thử α – naphthol 5%, lắc mạnh. Quan sát trong 1 giờ. Phản ứng dương tính khi canh khuẩn chuyển sang màu đỏ, phản ứng âm tính khi canh khuẩn không chuyển màu.



Hình 3.5: Thử nghiệm Voges Proskauer

I: Môi trường MRVP trước khi nuôi cấy, **II:** Phản ứng VP âm tính

- Thử nghiệm citrate: quan sát trên môi trường simmon citrate, phản ứng dương tính khi trên môi trường có xuất hiện sinh khối và chuyển sang màu xanh da trời. Phản ứng âm tính khi trên môi trường không có sinh khối và không chuyển màu.



Hình 3.6: Thử nghiệm Citrate

I: Môi trường Simmon Citrate trước khi nuôi cấy, **II:** Phản ứng citrate dương tính, **III:** Phản ứng Citrate âm tính

Tỷ lệ xác nhận số lượng khuẩn lạc thử nghiệm cho kết quả đúng là *E. coli* bằng tỉ số giữa số lượng khuẩn lạc xác nhận ban đầu và số lượng khuẩn lạc cho kết quả là *E. coli*.

Số lượng *E. coli* được tính như sau:

$$\text{Số CFU } E. coli = \frac{N}{nVf} R$$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc *E. coli* đã đếm

V: thể tích mẫu cấy vào đĩa

n: số lượng đĩa cấy cho một mẫu

f: độ pha loãng của mẫu

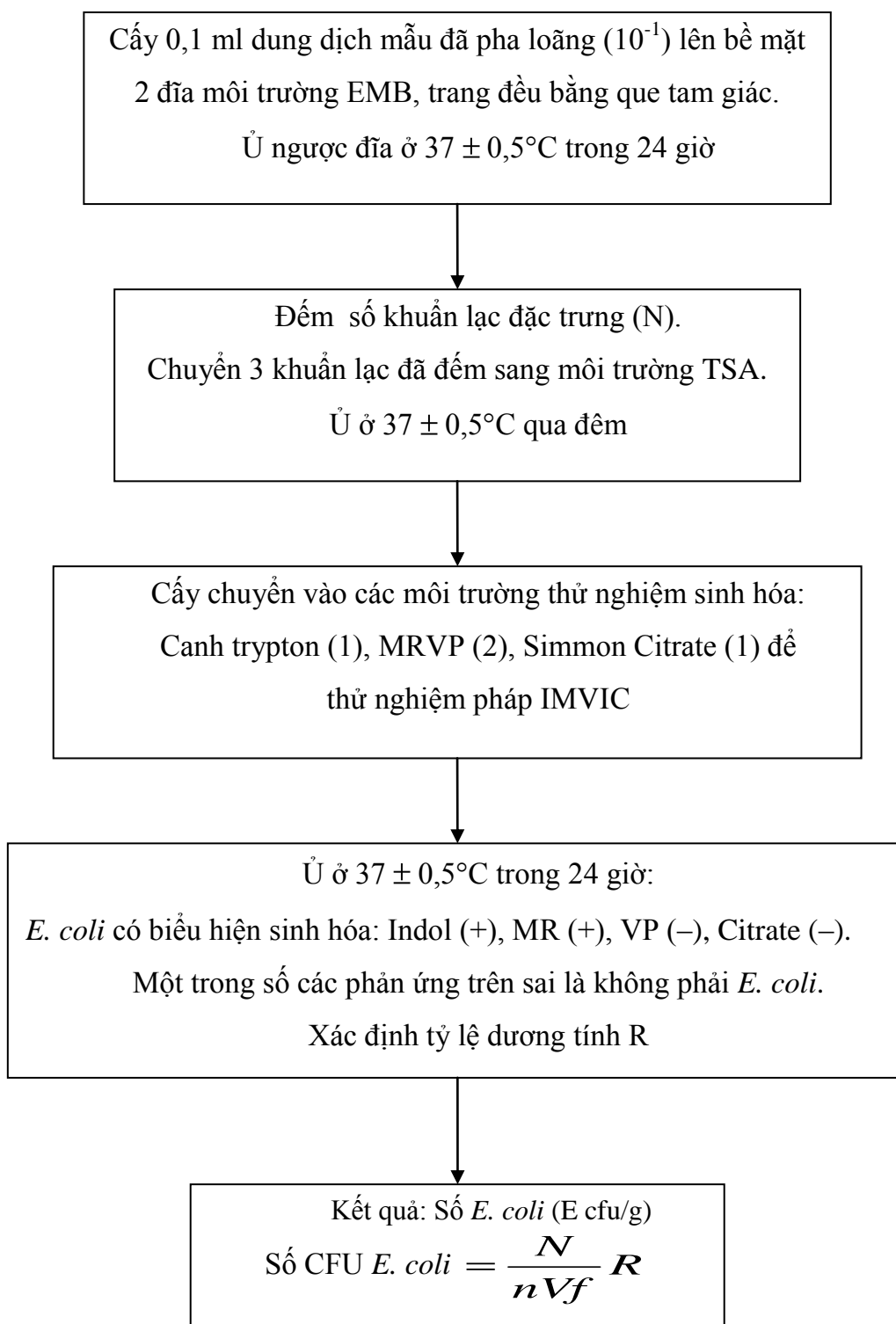
R: tỉ lệ xác nhận của *E. coli*

Có thể tính số lượng *E. coli* giả định bằng cách tính tỉ lệ số lượng khuẩn lạc cho phản ứng Indol dương tính, công thức tính tương tự như trên.

- **Báo cáo kết quả**

Kết quả *E. coli* được thể hiện bằng số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc *E. coli* trong 1 g hay 1 ml mẫu.

Quy trình định lượng *E. coli*



3.3.5. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu đa yếu tố, mỗi mẫu lặp lại 3 lần trong từng thời điểm khác nhau. Đối với mẫu thuộc nhóm thịt, nhóm cá và thủy sản thì gồm 2 yếu tố:

- Yếu tố thứ 1: không rửa mẫu.
- Yếu tố thứ 2: mẫu lấy về được rửa bằng 2 lần nước máy.

Đối với mẫu thuộc nhóm rau thì gồm 4 yếu tố:

- Yếu tố thứ 1: Không rửa mẫu.
- Yếu tố thứ 2: Rửa mẫu qua 3 lần nước máy.
- Yếu tố thứ 3: Rửa mẫu qua 1 lần nước muối, ngâm mẫu 5 phút. Sau đó rửa lại với 3 lần nước máy.
- Yếu tố thứ 4: Rửa mẫu bằng nước rửa rau Vegy: hòa 1 nắp Vegy vào 2 lít nước, cho mẫu vào ngâm 3 phút, sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước máy 3 lần.

Bảng 3.2: Các nghiệm thức bố trí thí nghiệm xây dựng qui trình xử lý những mẫu thực phẩm

Số lần lặp lại	Không rửa mẫu	Rửa bằng nước máy	Rửa bằng nước muối	Rửa bằng nước rửa Vegy
1	T0	T1	T2	T3
2	T0	T1	T2	T3
3	T0	T1	T2	T3

3.3.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và phần mềm Statgraphics.

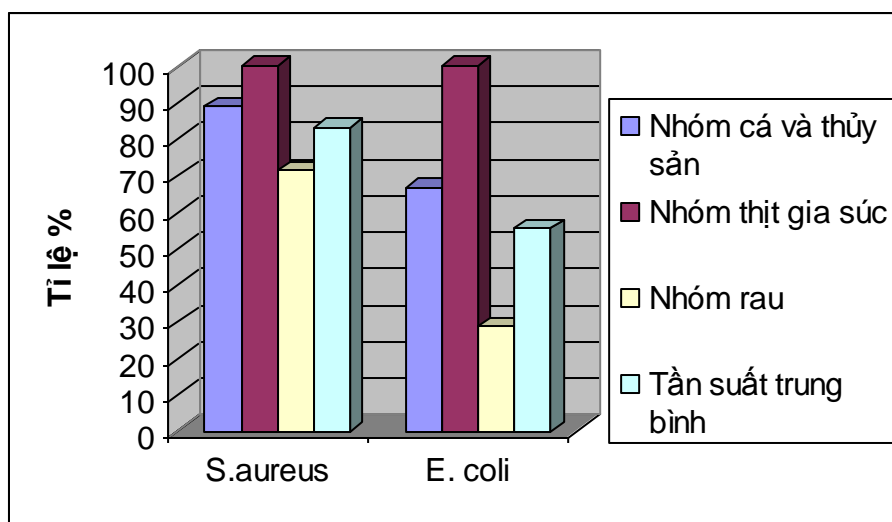
PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khảo sát tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các nhóm thực phẩm đang lưu hành trên thị trường

Mục đích của khảo sát này là nhằm đánh giá tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các loại thực phẩm đang lưu hành trên các chợ trên khu vực thành phố Hồ Chí Minh. Khảo sát được tiến hành trên 18 mẫu thuộc 3 nhóm thực phẩm khác nhau: 9 mẫu thuộc nhóm cá và thủy sản, 2 mẫu thuộc nhóm thịt gia súc và 7 mẫu thuộc nhóm rau. Tất cả các mẫu thực phẩm được thu tại chợ Thị Nghè, Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu được phân tích bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống. Kết quả khảo sát được thể hiện trên bảng 4.1 và biểu đồ 4.1.

Bảng 4.1: Kết quả khảo sát tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các nhóm thực phẩm

Nhóm mẫu	Tổng số mẫu	Tỉ lệ mẫu không đạt vì <i>S. aureus</i> (%)	Tỉ lệ mẫu không đạt vì <i>E. coli</i> (%)
Tiêu chuẩn cho phép		<10 CFU/g	Không phát hiện
Nhóm cá và thủy sản	9	88,89	66,67
Nhóm thịt gia súc	2	100	100
Nhóm rau	7	71,43	28,57
Tần suất hiện diện trung bình		83,33	55,56



Biểu đồ 4.1: Tỷ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các nhóm thực phẩm

Kết quả trên Bảng 4.1 và Biểu đồ 4.1 cho thấy, trong tổng số 18 mẫu thực phẩm được phân tích bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống có 15 mẫu được khẳng định là nhiễm *S. aureus*, tần suất hiện diện chiếm 83,33% (15/18) và có 3 mẫu không nhiễm *S. aureus*, chiếm 16,67% (3/18). Kết quả này cho thấy các loại thực phẩm được bày bán tại các chợ trong khu vực Thành phố Hồ Chí Minh có tỷ lệ nhiễm *S. aureus* khá cao. Điều này khuyến cáo các nhà quản lý thực phẩm cần có những biện pháp tăng cường giám sát vệ sinh thực phẩm đang lưu hành trên thị trường, nhằm đảm bảo an toàn cho sức khỏe cộng đồng.

Các kết quả trên cũng cho thấy nếu tính chung trong tất cả các mẫu thực phẩm khảo sát thì tần suất hiện diện của *E. coli* chiếm 55,56% (10/18) và có 8 mẫu không nhiễm *E. coli* chiếm 44,44% (8/18). Tỷ lệ này thấp hơn so với kết quả khảo sát đầu năm 2003 của Cục Quản lý Thực phẩm Trung ương tiến hành khảo sát trên các loại mẫu thực phẩm từ sản phẩm chăn nuôi như thịt heo, thịt bò lấy tại các chợ ở Hà Nội thì 100% nhiễm *E. coli*, đồng thời cũng thấp hơn so với kết quả kiểm tra xét nghiệm 94 mẫu thịt tươi trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh do Chi Cục Thú y thực hiện và cho biết tỷ lệ nhiễm *E. coli* chiếm 72%. [21]

Nếu xét riêng về tỷ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong từng nhóm thực phẩm khác nhau thì nhóm thịt gia súc, nhóm cá và thủy sản có tỷ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* cao nhất là 100%, trong khi đó ở nhóm rau tỷ lệ nhiễm *S. aureus* là 71,43%

(5/7) và tỉ lệ nhiễm *E. coli* là 28,57% (2/7). Các tỉ lệ này cho thấy rằng: tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm rau thấp hơn nhiều so với nhóm cá và thủy sản, và nhóm thịt gia súc. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu cho rằng *S. aureus* và *E. coli* phân bố chủ yếu ở các động vật máu nóng.

Với kết quả phân tích nhận được nêu trên, có thể kết luận rằng: tình hình nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong các thực phẩm tại chợ Thị Nghè, Thành phố Hồ Chí Minh rất đáng quan tâm. Tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* có khả năng gây bệnh vẫn chiếm một tỉ lệ khá cao trong tổng số mẫu phân tích.

4.2. Khảo sát xây dựng quy trình xử lý thực phẩm tại gia đình và bếp ăn tập thể

4.2.1. Mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm cá và thủy sản được rửa và không được rửa bằng nước máy

Khảo sát được tiến hành trên 9 mẫu thuộc nhóm cá và thủy sản. Mỗi mẫu sau khi thu tại chợ về phòng thí nghiệm được trích để định lượng *S. aureus* và *E. coli*. Phần còn lại được xử lý theo từng nghiệm thức như phần 3.3.5. Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong từng nghiệm thức sau khi xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics được thể hiện ở bảng 4.2

Bảng 4.2: Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm cá và thủy sản

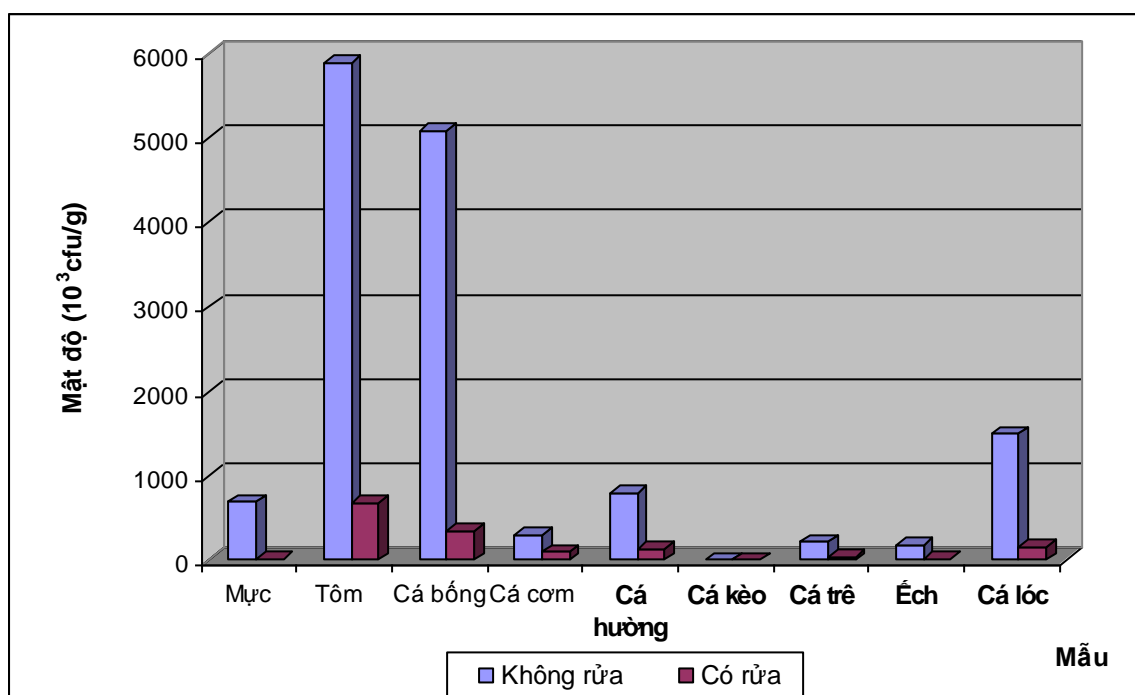
Mẫu	Nghiệm thức	<i>E. coli</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	<i>S. aureus</i> ($\times 10^3$ CFU/g)
Mực	T0	42,23 ^e	688 ^{bc}
	T1	2,55 ^{ab}	20,33 ^a
Tôm	T0	54,43 ^f	5890 ^f
	T1	3,22 ^{ab}	678 ^{bc}
Cá bống	T0	25,56 ^d	5086,67 ^e
	T1	2,89 ^{ab}	342,33 ^{abc}
Cá cơm	T0	13,33 ^c	293 ^{abc}
	T1	2,44 ^{ab}	95,43 ^{ab}
Cá hường	T0	1,55 ^{ab}	799 ^c
	T1	0,143 ^{ab}	136,67 ^{ab}
Cá kèo	T0	4 ^b	0 ^a
	T1	0,55 ^{ab}	0 ^a
Cá trê	T0	0 ^a	217,67 ^{abc}
	T1	0 ^a	34,66 ^a
Ếch	T0	0 ^a	174,33 ^{abc}
	T1	0 ^a	9,22 ^a

Cá lóc	T0	0 ^a	1490 ^d
	T1	0 ^a	162,33 ^{ab}

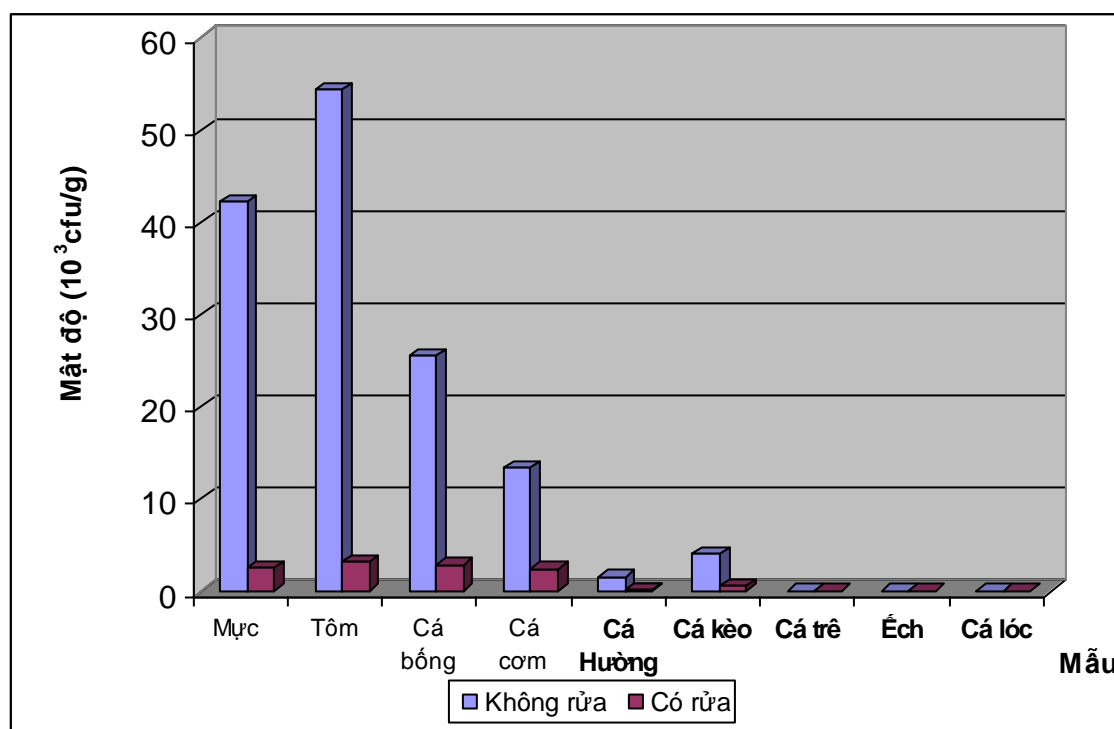
Ghi chú : Các số trung bình có các chữ cái khác nhau theo cột dọc thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê ở mức $P < 0,05$, T0: không rửa mẫu, T1: rửa mẫu

Kết quả sau khi xử lý thống kê được trình bày trên bảng 4.2 cho thấy mật độ *E. coli* và *S. aureus* giữa các mẫu trong nhóm, các nghiệm thức trong cùng một mẫu và giữa các mẫu với nhau thì đều thể hiện sự khác biệt về mật thống kê ở mức ($P < 0,05$) (phụ lục B.1.1, B.1.4, B.2.1, B.2.4).

Theo như kết quả thể hiện trên biểu đồ 4.2 và 4.3 cho thấy trước khi rửa các mẫu như mực, tôm, cá bóng, cá lóc có mật độ nhiễm các vi sinh vật *E. coli* và *S. aureus* khá cao so với các loại mẫu khác trong nhóm. Sự nhiễm bẩn các vi sinh vật này cao nhất là các loại mẫu tôm. Kết quả phân tích này cũng phù hợp với thực tế là các loại mẫu này có kích thước nhỏ, thiết diện tiếp xúc lớn nên khả năng nhiễm bẩn cũng cao hơn. Ngược lại, các loại mẫu có kích thước thiết diện lớn như cá lóc, cá trê, cá kèo tươi thì khả năng nhiễm bẩn trong quá trình vận chuyển và bày bán tại chợ cũng giảm đi. Đồng thời các loại thủy hải sản tươi sống, còn chất nhớt tự nhiên bảo vệ thì khả năng nhiễm bẩn các vi sinh vật cũng giảm đi.



Biểu đồ 4.2: Mật độ *S. aureus* trong nhóm cá và thủy sản



Biểu đồ 4.3: Mật độ *E. coli* trong nhóm cá và thủy sản

Sau khi rửa bằng 2 lần nước máy thì mật độ *S. aureus* và *E. coli* ở tất cả các mẫu giảm đi rõ rệt. Mật độ *E. coli* trong tôm giảm 17 lần, trong mực giảm 16,56 lần, trong cá bóng giảm 8,84 lần ... Thậm chí các loại mẫu như cá hường, cá trê mật độ các vi sinh vật này giảm đến $<10^3$ CFU/g. Nhìn chung các mẫu thủy sản sau khi xử lý bằng cách rửa với nước máy, mật độ *E. coli* trung bình còn lại khoảng 2.10^3 CFU/g, mật độ *S. aureus* trung bình còn khoảng 164.10^3 CFU/g. Tuy nhiên so với tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm của Bộ Y Tế cho phép, mật độ các vi sinh vật này trong các loại thực phẩm “sẵn sàng chế biến” là phải <10 CFU/g thì quy trình xử lý bằng nước sạch như trên vẫn chưa đạt yêu cầu.

Như vậy biện pháp để làm giảm mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong cá và thủy sản là khi mua cá về thì phải rửa sạch ngay và ướp lạnh, bởi cá còn sống hay mới chết thì trong thịt không có vi khuẩn. Nhưng nếu cá mua về không được làm sạch và ướp lạnh ngay thì vi khuẩn từ mang, vây và ruột sẽ nhanh chóng xâm nhập vào thịt cá.

4.2.2. Mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc được rửa và không rửa

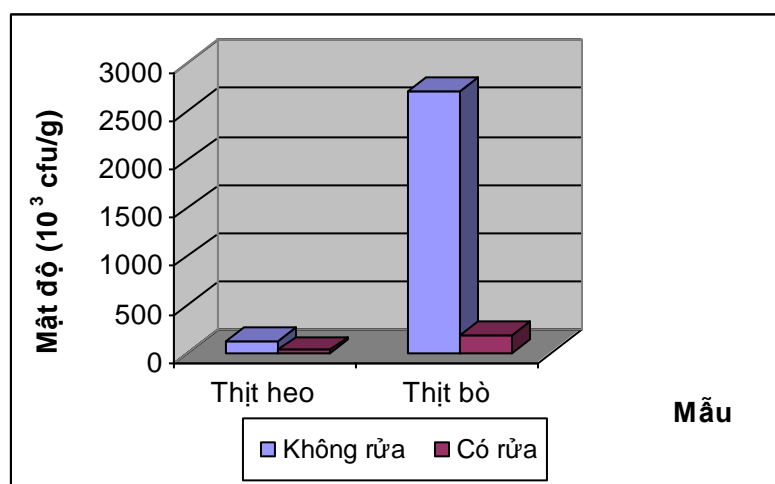
So với các loại thủy sản, thịt gia súc là loại thức ăn dễ bảo quản, dễ chế biến dưới nhiều dạng món ăn ngon. Vì vậy, thịt là thức ăn thường gặp trong bữa ăn hàng

ngày của nhiều người. Tuy nhiên, mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong thịt cũng khá cao, nhận định này được thể hiện qua bảng 4.3.

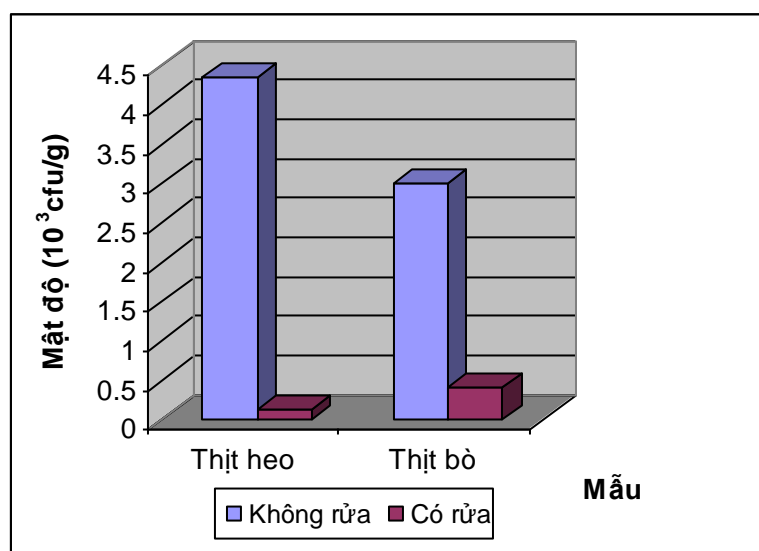
Bảng 4.3: Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc

Mẫu	Nghiệm thức	<i>E. coli</i> (10^3 CFU/g)	<i>S. aureus</i> (10^3 CFU/g)
Thịt heo	T0	4,33 ^b	124,56 ^{ab}
	T1	0,13 ^a	25,43 ^a
Thịt bò	T0	3 ^b	2723,33 ^c
	T1	0,42 ^a	180 ^b
Tiêu chuẩn cho phép		0 CFU/g	0 CFU/g

Ghi chú : Các số trung bình có các chữ cái khác nhau theo cột dọc thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê ở mức $P < 0,05$, T0: không rửa mẫu, T1: rửa mẫu



Biểu đồ 4.4: Mật độ *S. aureus* trong nhóm thịt gia súc



Biểu đồ 4.5: Mật độ *E. coli* trong nhóm thịt gia súc

Qua Bảng 4.3, các Biểu đồ 4.4, 4.5 cho thấy mật độ *E. coli* và *S. aureus* trước khi rửa và sau khi rửa có sự chênh lệch đáng chú ý. Mật độ trước khi rửa cao gấp 5 lần sau khi rửa. Sau khi rửa, mật độ *E. coli* trung bình còn lại trong mẫu là $2,8 \times 10^2$ CFU/g, mật *S. aureus* trung bình là 10×10^4 CFU/g. Theo tiêu chuẩn qui định của Bộ Y tế mật độ cho phép của của các vi sinh vật trước khi đun nấu là <10 CFU/g thì qui trình này vẫn chưa đạt yêu cầu về an toàn vệ sinh thực phẩm.

Để đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm thì khi mua thịt phải chọn loại tươi, được giết mổ, vận chuyển và bảo quản hợp vệ sinh, sau khi mua về phải rửa sạch và bảo quản hợp vệ sinh. Thịt là nguyên nhân gây ngộ độc chiếm 68% ở Anh và 88% ở Pháp, theo Chi Cục Thú y thì kết quả xét nghiệm 299 mẫu thịt tươi tại các chợ trong năm 2003 đã phát hiện có đến 86,6% mẫu bị nhiễm *E. coli*, 22,41% mẫu bị nhiễm *S. aureus*. Điều này cho thấy tình trạng bị ngộ độc thực phẩm từ thịt là điều đáng lo ngại. [19].

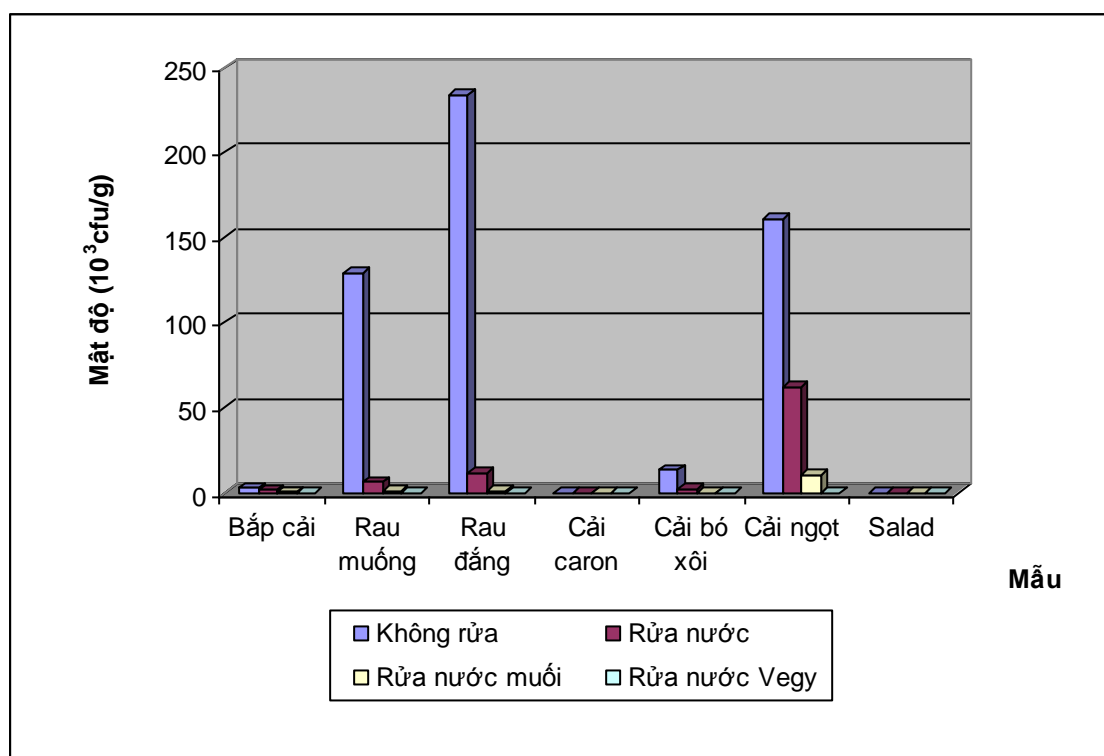
4.2.3. Mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm rau trước và sau khi xử lý với các loại nước rửa

Thức ăn thực vật ít khi là nguyên nhân gây ngộ độc thức ăn. Tuy nhiên, rau có thể nhiễm các vi khuẩn gây bệnh và trứng giun sán do tưới rau bằng phân tươi hay nước bẩn. Hơn thế nữa, rau thường được sử dụng tươi sống, không qua đun nấu hay đun nấu nhẹ trước khi sử dụng. Do vậy, mẫu rau khi mua về được tiến hành khảo sát qua 4 nghiệm thức: không rửa mẫu, rửa mẫu bằng nước máy, rửa mẫu bằng nước muối, rửa mẫu bằng nước rửa rau Vegy. Kết quả khảo sát được trình bày trên bảng 4.4.

Bảng 4.4: Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm rau

Mẫu	Nghiệm thức	<i>E. coli</i> (10 ³ CFU/g)	<i>S. aureus</i> (10 ³ CFU/g)
Bắp cải	T0	4,89 ^c	2,69 ^a
	T1	0,37 ^a	1,67 ^a
	T2	0 ^a	0,44 ^a
	T3	0 ^a	0,12 ^a
Rau muống	T0	0 ^a	129 ^b
	T1	0 ^a	6,33 ^a
	T2	0 ^a	1,11 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Rau đắng	T0	1,89 ^b	233,66 ^d
	T1	0,21 ^a	11,66 ^a
	T2	0 ^a	1,21 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Cải caron	T0	0 ^a	0 ^a
	T1	0 ^a	0 ^a
	T2	0 ^a	0 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Cải bó xôi	T0	0 ^a	13,1 ^a
	T1	0 ^a	2,24 ^a
	T2	0 ^a	0,12 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Cải ngọt	T0	0 ^a	161 ^c
	T1	0 ^a	62 ^b
	T2	0 ^a	10,67 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Salad	T0	0 ^a	0 ^a
	T1	0 ^a	0 ^a
	T2	0 ^a	0 ^a
	T3	0 ^a	0 ^a
Tiêu chuẩn cho phép		0 CFU/g	0 CFU/g

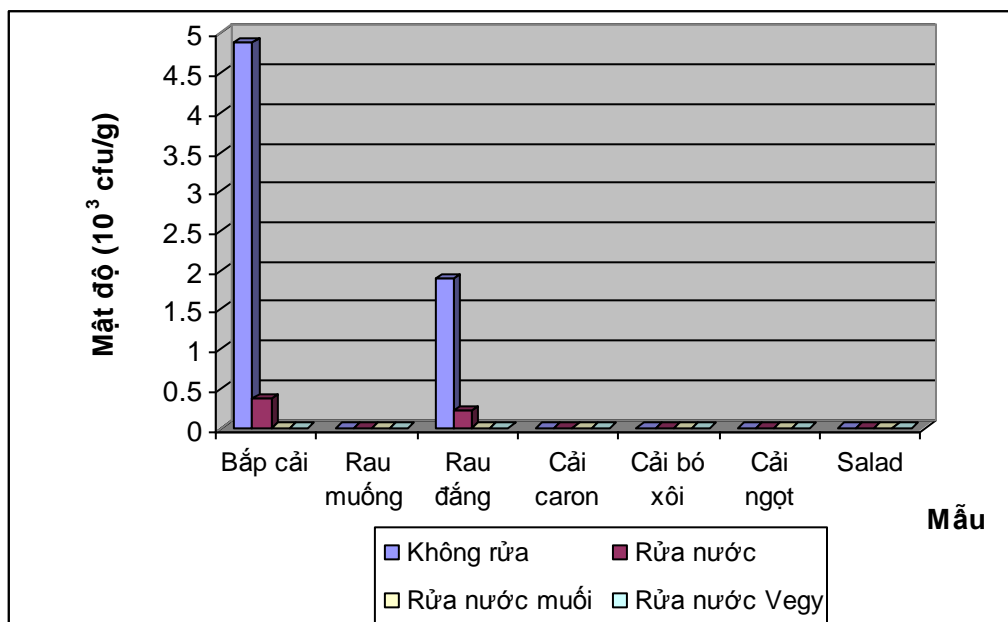
Ghi chú : Các số trung bình có các chữ cái khác nhau theo cột dọc thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê ở mức P<0,05, T0: không rửa mẫu, T1: rửa mẫu bằng nước sinh hoạt, T2: rửa mẫu bằng nước muối, T3: rửa mẫu bằng nước Vegy



Biểu đồ 4.6: Mật độ *S. aureus* trong nhóm rau

Qua bảng ANOVA cho thấy giữa các nghiệm thức có sự khác biệt về mật thống kê ở mức ($P < 0,05$) (phụ lục B.6.1). Cũng theo kết quả khảo sát thì mật độ nhiễm của *E. coli* và *S. aureus* trong nhóm rau tương đối thấp hơn so với nhóm thịt và nhóm hải sản. Trong đó thì mẫu salad và cải caron không có sự hiện diện của *S. aureus*. Riêng mẫu rau đắng, rau muống và cải ngọt thì có mật độ *S. aureus* cao. Nguyên nhân là do các loại rau này được trồng trong điều kiện dễ bị nhiễm vi sinh vật.

Sau khi xử lý mật độ *S. aureus* lần lượt giảm qua các lần rửa bằng nước máy, rửa bằng nước muối, rửa bằng nước Vegy. Như vậy, để hạn chế *S. aureus* trong rau thì nên rửa rau bằng nước Vegy là tốt nhất. Tuy nhiên, rửa rau bằng nước muối cũng là biện pháp để làm giảm mật độ *S. aureus*. Cả hai biện pháp trên phù hợp với các loại rau ăn tươi sống như: salad, rau thơm, cải caron... Tuy nhiên để đạt tiêu chuẩn an toàn vệ sinh qui định, các loại rau trước khi sử dụng phải được rửa với nước Vegy.



Biểu đồ 4.7: Mật độ *E. coli* trong nhóm rau

Kết quả thể hiện trên biểu đồ 4.7 cho thấy sự hiện diện của *E. coli* trong rau rất ít, chỉ hiện diện ở mẫu bắp cải và rau đắng, còn ở những mẫu còn lại thì không có sự hiện diện của *E. coli*. Sau khi xử lý mật độ *E. coli* trong các mẫu nhiễm cũng giảm đi đáng kể, đặc biệt khi xử lý bằng nước muối và nước Vegy thì *E. coli* bị tiêu diệt hoàn toàn.

4.2.4. Xây dựng quy trình xử lý thực phẩm tại hộ gia đình

Qua kết quả khảo sát nhận được nêu trên, có thể kết luận rằng mật độ *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc, nhóm cá và thủy sản cao hơn so với nhóm rau. Đồng thời mật độ *S. aureus* và *E. coli* giảm dần qua các lần xử lý với các loại nước. Như vậy để bảo vệ sức khỏe cho gia đình thì nên thực hiện quy trình chế biến như sau:

- Chọn các thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm:

Đối với cá: chọn cá còn sống hay vừa mới chết nhưng vẫn đạt các tiêu chuẩn cá tươi: Thân cá co cứng, khi để cá lên bàn tay thân cá không thõng xuống, mắt trong suốt, giác mạc đàn hồi, miệng ngậm cứng, mang màu đỏ tươi, dán chặt xuống hoa khế, vây tươi óng ánh, dính chặt vào thân, bụng bình thường, hậu môn thụt sâu và màu trắng nhạt, thịt rắn chắc, dính chặt vào xương sống.

Đối với thịt: chọn thịt tươi, màng ngoài khô, không bị nhớt, khối thịt rắn chắc, mùi và màu sắc bình thường. Mỡ lợn màu trắng, bì không có những lấm chấm xuất huyết màu đỏ tím, tủy xương trong, bám chặt vào thành ống xương và không có mùi

ôi. Cần chú ý kiểm tra phần thịt nạc không được có ấu trùng sán màu trắng nhỏ bằng hạt gạo.

Đối với rau: chọn các loại rau quả tươi, không bị dập nát, không có màu sắc và mùi vị lạ.

- Chuẩn bị thực phẩm sạch sẽ và nấu chín kỹ:

Thịt cá dễ bị ô nhiễm bởi vi sinh vật gây bệnh nên sau khi mua về phải rửa kỹ với nước sạch 2-3 lần, phải nấu chín kỹ, hạn chế ăn gỏi cá hay cá nấu chưa chín.

Rau phải rửa thật kỹ dưới vòi nước chảy hay thay nước rửa 3 – 4 lần. Đối với rau ăn sống thì nên rửa bằng nước muối: ngâm trong nước muối 5 phút, sau đó rửa lại 3 – 4 lần nước máy. Tuy nhiên để đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm thì nên rửa bằng nước Vegy là tốt nhất

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ các kết quả khảo sát trên cho phép rút ra các kết luận như sau:

- Trong tổng số 18 mẫu được khảo sát, số mẫu phát hiện tỉ lệ nhiễm *S. aureus* chiếm 15/18 tương ứng 83,33% và tỉ lệ nhiễm *E. coli* chiếm 10/18 tương ứng 55,56%.
- Trong số các nhóm thực phẩm được khảo sát thì tỉ lệ nhiễm *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc chiếm tỉ lệ cao nhất là 100%, trong nhóm cá và thủy sản thì *S. aureus* chiếm 88,89% còn *E. coli* chiếm tỉ lệ 66,67%, trong nhóm rau thì *S. aureus* chiếm 71,43% và *E. coli* chiếm 28,57%.
- Mật độ *S. aureus* và *E. coli* giảm hẳn qua các lần xử lý mẫu: rửa mẫu bằng nước máy, rửa mẫu bằng nước muối, rửa bằng nước Vegy. Hầu như ở những mẫu rau được rửa bằng nước Vegy là không có sự hiện diện của *S. aureus* và *E. coli*. Như vậy thực phẩm phải được xử lý và chế biến trong điều kiện vệ sinh sạch sẽ thì mới hạn chế được tình trạng ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi sinh vật.
- Xây dựng được qui trình xử lý thực phẩm tại hộ gia đình để giảm thiểu sự nhiễm *E. coli* và *S. aureus* trong thực phẩm.

5.2. Đề nghị

Do giới hạn về thời gian và điều kiện thí nghiệm nên chưa hoàn chỉnh một số vấn đề trong nghiên cứu này. Nếu đề tài được tiếp tục, chúng tôi có các đề xuất sau:

- Tiến hành xét nghiệm với số lượng mẫu đủ lớn và trên nhiều đối tượng mẫu trong phạm vi địa bàn rộng, đặc biệt trên loại mẫu gia cầm và các sản phẩm của chúng để có sự đánh giá tổng quát về tỉ lệ *S. aureus* và *E. coli* trong thực phẩm.
- Nghiên cứu sự tác động đến các vi sinh vật gây bệnh khác như *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*... khi xử lý bằng các qui trình trên.
- Phổ biến rộng rãi các qui trình xử lý thực phẩm để đạt tiêu chuẩn an toàn trên các phương tiện thông tin đại chúng nhằm giảm thiểu nguy cơ ngộ độc thực phẩm trong cộng đồng.

PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bộ thủy sản và Danida, dự án cải thiện chất lượng và xuất khẩu thủy sản (Seaqip), 2004. *Sổ tay kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm thủy sản*. Nhà xuất bản Nông nghiệp – Hà Nội.
2. Bộ môn vi sinh – Khoa Y – Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, 1996. *Vi khuẩn học*.
3. Phạm Thanh Hoàng, 2002. *Khảo sát tình hình vấy nhiễm vi sinh vật trên quây thịt heo tại chợ An Lạc có nguồn gốc từ các tỉnh và một số lò giết mổ ở Thành phố Hồ Chí Minh*. Luận văn tốt nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
4. Vương Thị Việt Hoa, 2003. *Giáo trình thực tập vi sinh thực phẩm*. Tủ sách trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
5. Cao Thanh Chí Trung, 2000. *Khảo sát sự hiện diện của vi khuẩn E.coli, Staphylococcus aureus, Salmonella trong môi trường chăn nuôi gà công nghiệp*. Luận văn tốt nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
6. Lương Đức Phẩm, 2002. *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. Nhà xuất bản Nông nghiệp – Hà Nội.
7. Nguyễn Văn Hạng, 1998. *Bước đầu khảo sát tỉ lệ nhiễm E.coli trên gia cầm ở An Giang*. Luận văn tốt nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
8. Nguyễn Vĩnh Phước, 1978. *Vi sinh vật học thú y, tập 3*. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp – Hà Nội.

9. Trần Linh Thước, 2002. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo dục.
10. Nguyễn Phùng Tiến, Bùi Minh Đức và Nguyễn Văn Dịp, 2003. *Vi sinh vật thực phẩm - Kỹ thuật kiểm tra và chỉ tiêu đánh giá chất lượng an toàn thực phẩm*. Nhà xuất bản y học – Hà Nội.
11. Nguyễn Ngọc Tuân, 2002. *Vệ sinh thit*. Nhà xuất bản Nông nghiệp – Thành phố Hồ Chí Minh.
12. Nguyễn Tiến Dũng, 2004. *Bài giảng môn Kiểm Nghiệm Chất Lượng Thực Phẩm*.

TIẾNG ANH

13. G. R. Carter và cs, 1991. *Essentials of veterinary bacteriology & Mycology*. Fourth edition.
14. Gross J. R and Rowe B., 1985. Serotyping of Escherichia coli. The Virulence of Escherichia coli (M. Sussman). Academic Press, London, England. P345 – 356.

TÀI LIỆU TỪ MẠNG INTERNET

15. <http://www.cimsi.org.vn/sach/dinhduong&attp/chuong7.htm>.
16. <http://www.medinet.hochiminhcity.gov.vn/VSATTP/qddanhmuc/gioihanonhiem.asp>.
17. http://www.ratsteachmicro.com/assets/staphylococci/virulence_factor.
18. <http://www.safefood.net.au/content.cfm?sid=470>.
19. <http://www.nea.gov.vn/nIndex.asp?ID=19470>.
20. http://en.wikipedia.org/wiki/staphylococcus_aureus.
21. <http://vfa.gov.vn/Docs/bai915.doc>.
22. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.
23. http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig12_3.jpg.
24. <http://www.moh.gov.vn/homebyt/vn/portal/InfoDetail.jsp?area=210&cat=1588&ID=1791>

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC A: Số liệu thô

Bảng A.1 Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm cá và thủy sản

Mẫu	Số lượng <i>S. aureus</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)		Số lượng <i>E. coli</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)	
	Không rửa mẫu	Rửa mẫu	Không rửa mẫu	Rửa mẫu
Mực (1)	688	20,33	42,23	2,55
Tôm (2)	5890	678	54,43	3,22
Cá bống (3)	5086,67	342,33	25,56	2,89
Cá com (4)	293	95,43	13,33	2,44
Cá hường (5)	799	136,67	1,55	0,143
Cá kèo (6)	0	0	4	0,55
Cá trê (7)	217,67	34,66	0	0
Ếch (8)	174,33	9,22	0	0
Cá lóc (9)	1490	162,33	0	0

Bảng A.2 Kết quả định lượng *S. aureus* và *E. coli* trong nhóm thịt gia súc

Mẫu	Số lượng <i>S. aureus</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)		Số lượng <i>E. coli</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)	
	Không rửa mẫu	Rửa mẫu	Không rửa mẫu	Rửa mẫu
Thịt heo (1)	124,56	25,43	4,33	0,13
Thịt bò (2)	2723,33	180	3	0,42

Bảng A.3 Kết quả định lượng *S. aureus* trong nhóm rau

Mẫu	Số lượng <i>S. aureus</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)			
	Không rửa mẫu	Rửa mẫu bằng nước máy	Rửa mẫu với nước muối	Rửa mẫu với nước Vegy
Bắp cải (1)	2,69	1,67	0,44	0,12
Rau muống (2)	129	6,33	1,11	0
Rau đắng (3)	233,66	11,66	1,21	0
Cải caron (4)	0	0	0	0
Cải bó xôi (5)	13,1	2,24	0,12	0
Cải ngọt (6)	161	62	10,67	0
Salad (7)	0	0	0	0

Bảng A.4 Kết quả định lượng *E. coli* trong nhóm rau

Mẫu	Số lượng <i>E. coli</i> trung bình qua 3 đợt thí nghiệm (10^3 CFU/g)			
	Không rửa mẫu	Rửa mẫu bằng nước máy	Rửa mẫu với nước muối	Rửa mẫu với nước Vegy
Bắp cải (1)	4,89	0,37	0	0
Rau muống (2)	0	0	0	0
Rau đắng (3)	1,89	0,21	0	0
Cải caron (4)	0	0	0	0
Cải bó xôi (5)	0	0	0	0
Cải ngọt (6)	0	0	0	0
Salad (7)	0	0	0	0

PHỤ LỤC B: Kết quả xử lý số liệu

B.1 Các bảng phân tích số lượng *E. coli* trong nhóm cá và thủy sản

B.1.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM1.E_coli - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM1.Dot	12.1540	2	6.0770	1.037	.3773
B:NHOM1.Mau	5720.7362	8	715.0920	121.993	.0000
C:NHOM1.NT	2787.1334	1	2787.1334	475.479	.0000
INTERACTIONS					
AB	84.3989	16	5.27493	.900	.5822
AC	16.7019	2	8.35096	1.425	.2695
BC	4478.3669	8	559.79586	95.500	.0000
RESIDUAL	93.787785	16	5.8617366		
TOTAL (CORRECTED)	13193.279	53			

0 missing values have been excluded.
All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.1.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu

Multiple range analysis for NHOM1.E_coli by NHOM1.Mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
7	6	.000000	X
8	6	.000000	X
9	6	.000000	X
5	6	.850000	X
6	6	2.276667	X
4	6	7.888333	X
3	6	14.228333	X
1	6	22.393333	X
2	6	28.828333	X

B.1.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM1.E_coli by NHOM1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T1	27	1.311852	X
T0	27	15.680370	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	14.3685		1.39724 *

- denotes a statistically significant difference.

B.1.4 Bảng ANOVA khảo sát ảnh hưởng của các nghiệm thức đến mẫu cá và thủy sản

One-Way Analysis of Variance

Data: NTMNH01.E_coli

Level codes: NTMNH01.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	12986.236	17	763.89626	132.824	.0000
Within groups	207.043	36	5.75119		
Total (corrected)	13193.279	53			

0 missing value(s) have been excluded.

B.1.5 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu cá và thủy sản được xử lý với từng nghiệm thức

Multiple range analysis for NTMNH01.E_coli by NTMNH01.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
m7T0	3	.000000	X
m7T1	3	.000000	X
m8T0	3	.000000	X
m8T1	3	.000000	X
m9T0	3	.000000	X
m9T1	3	.000000	X
m5T1	3	.143333	XX
m6T1	3	.553333	XX
m5T0	3	1.556667	XX
m4T1	3	2.443333	XX
m1T1	3	2.553333	XX
m3T1	3	2.890000	XX
m2T1	3	3.223333	XX
m6T0	3	4.000000	X
m4T0	3	13.333333	X

• denotes a statistically significant difference.

B.2 Các bảng phân tích số lượng *S. aureus* trong nhóm cá và thủy sản

B.2.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM1.S_aureus - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM1.Dot	363403	2	181702	1.308	.2979
B:NHOM1.Mau	72156010	8	9019501	64.909	.0000
C:NHOM1.NT	28862848	1	28862848	207.713	.0000
INTERACTIONS					
AB	2320236	16	145014.8	1.044	.4665
AC	395084	2	197541.9	1.422	.2702
BC	49768035	8	6221004.3	44.770	.0000
RESIDUAL	2223282.7	16	138955.17		
TOTAL (CORRECTED)	1.5609E0008	53			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.2.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu cá và thủy sản

Multiple range analysis for NHOM1.S_aureus by NHOM1.Mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
6	6	.0000	X
8	6	91.7783	XX
7	6	126.1667	XX
4	6	194.2167	XX
1	6	354.1667	XX
5	6	467.8333	XX
9	6	826.1667	X
3	6	2714.5000	X
2	6	3284.0000	X

B.2.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM1.S_aureus by NHOM1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T1	27	164.3322	X
T0	27	1626.5185	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	1462.19		215.127 *

* denotes a statistically significant difference.

B.2.4 Bảng ANOVA khảo sát ảnh hưởng của các nghiệm thức đến mẫu cá và thủy sản

One-Way Analysis of Variance

Data: NTMNH01.S_aureus

Level codes: NTMNH01.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1.5079E0008	17	8869817.3	60.225	.0000
Within groups	5.3020E0006	36	147277.9		
Total (corrected)	1.5609E0008	53			

0 missing value(s) have been excluded.

B.2.5 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu cá và thủy sản với từng nghiệm thức

Multiple range analysis for NTMNH01.S_aureus by NTMNH01.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

m6T0	3	.0000	X
m6T1	3	.0000	X
m8T1	3	9.2233	X
m1T1	3	20.3333	X
m7T1	3	34.6667	X
m4T1	3	95.4333	XX
m5T1	3	136.6667	XX
m9T1	3	162.3333	XX
m8T0	3	174.3333	XXX
m7T0	3	217.6667	XXX
m4T0	3	293.0000	XXX
m3T1	3	342.3333	XXX
m2T1	3	678.0000	XX
m1T0	3	688.0000	XX
m5T0	3	799.0000	X

* denotes a statistically significant difference

B.3 Các bảng phân tích số lượng *E. coli* trong nhóm thịt gia súc

B.3.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM2T1.E__coli - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM2T1.DOT	1.171926	2	.585963	1.214	.4517
B:NHOM2T1.MAU	.817974	1	.817974	1.694	.3228
C:NHOM2T1.KR_R	34.452574	1	34.452574	71.360	.0137
INTERACTIONS					
AB	1.1437032	2	.5718516	1.184	.4578
AC	1.1507032	2	.5753516	1.192	.4563
BC	1.9739741	1	1.9739741	4.089	.1805
RESIDUAL	.9655932	2	.4827966		
TOTAL (CORRECTED)	41.676448	11			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.3.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu thịt gia súc

Multiple range analysis for NHOM2T1.E__coli by NHOM2T1.MAU

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	6	1.7111667	X
1	6	2.2333333	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	0.52217		1.72607

* denotes a statistically significant difference

B.3.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM2T1.E__coli by NHOM2T1.KR_R

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T1	6	.2778333	X
T0	6	3.6666667	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	3.38883		1.72607 *

* denotes a statistically significant difference.

B.4 Các bảng phân tích số lượng *S. aureus* trong nhóm thịt gia súc

B.4.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM2T1.S_aureus - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM2T1.DOT	10758.3	2	5379.1	.720	.5813
B:NHOM2T1.MAU	5685633.3	1	5685633.3	761.228	.0013
C:NHOM2T1.KR_R	5236972.6	1	5236972.6	701.158	.0014
INTERACTIONS					
AB	20754.2	2	10377.1	1.389	.4185
AC	6230.8	2	3115.4	.417	.7057
BC	4480585.2	1	4480585.2	599.888	.0017
RESIDUAL	14938.065	2	7469.0325		
TOTAL (CORRECTED)	15455872	11			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.4.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu thịt gia súc

Multiple range analysis for NHOM2T1.S_aureus by NHOM2T1.MAU

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	6	75.0000	X
2	6	1451.6667	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	-1376.67		214.688 *

* denotes a statistically significant difference.

B.4.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM2T1.S_aureus by NHOM2T1.KR_R

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T1	6	102.7167	X
T0	6	1423.9500	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	1321.23		214.688 *

* denotes a statistically significant difference

B.4.4 Bảng ANOVA khảo sát ảnh hưởng của các nghiệm thức đến mẫu thịt gia súc

One-Way Analysis of Variance

Data: NTMNHOM2.S_aureus

Level codes: NTMNHOM2.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	15403191	3	5134397.0	779.691	.0000
Within groups	52681	8	6585.2		
Total (corrected)	15455872	11			

0 missing value(s) have been excluded.

B.4.5 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu thịt gia súc với từng nghiệm thức

Multiple range analysis for NTMNHOM2.S_aureus by NTMNHOM2.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
m1T1	3	25.4333	X
m1T0	3	124.5667	XX
m2T1	3	180.0000	X
m2T0	3	2723.3333	X

contrast	difference	+/-	limits
m1T0 - m1T1	99.1333		152.834
m1T0 - m2T0	-2598.77		152.834 *
m1T0 - m2T1	-55.4333		152.834
m1T1 - m2T0	-2697.90		152.834 *
m1T1 - m2T1	-154.567		152.834 *
m2T0 - m2T1	2543.33		152.834 *

* denotes a statistically significant difference.

B.5 Các bảng phân tích số lượng *E. coli* trong nhóm Rau

B.5.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM3RAU.E_coli - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM3RAU.dot	.357309	2	.1786545	1.290	.2878
B:NHOM3RAU.mau	18.290108	6	3.0483513	22.007	.0000
C:NHOM3RAU.NT	14.034919	3	4.6783063	33.774	.0000
INTERACTIONS					
AB	1.828454	12	.1523712	1.100	.3895
AC	.985973	6	.1643288	1.186	.3355
BC	44.870423	18	2.4928013	17.996	.0000
RESIDUAL	4.9865767	36	.1385160		
TOTAL (CORRECTED)	85.353763	83			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.5.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu rau

Multiple range analysis for NHOM3RAU.E_coli by NHOM3RAU.mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	12	.0000000	X
4	12	.0000000	X
5	12	.0000000	X
6	12	.0000000	X
7	12	.0000000	X
3	12	.5250000	X
1	12	1.3164167	X

B.5.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM3RAU.E_coli by NHOM3RAU.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T2	21	.0000000	X
T3	21	.0000000	X
T1	21	.0836667	X
T0	21	.9685714	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	0.88490		0.23299 *
T0 - T2	0.96857		0.23299 *
T0 - T3	0.96857		0.23299 *
T1 - T2	0.08367		0.23299
T1 - T3	0.08367		0.23299
T2 - T3	0.00000		0.23299

* denotes a statistically significant difference.

B.5.4 Bảng ANOVA khảo sát ảnh hưởng của các nghiệm thức đến mẫu rau

One-Way Analysis of Variance

Data: NTMNHOM3.E_coli

Level codes: NTMNHOM3.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance					
Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	77.195450	27	2.8590907	19.625	.0000
Within groups	8.158313	56	.1456842		
Total (corrected)	85.353763	83			

0 missing value(s) have been excluded.

B.5.5 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu rau với từng nghiệm thức

Multiple range analysis for NTMNHOM3.E_coli by NTMNHOM3.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
m1T2	3	.0000000	X
m1T3	3	.0000000	X
m2T0	3	.0000000	X
m2T1	3	.0000000	X
m2T2	3	.0000000	X
m2T3	3	.0000000	X
m3T2	3	.0000000	X
m3T3	3	.0000000	X
m4T0	3	.0000000	X
m4T1	3	.0000000	X
m4T2	3	.0000000	X
m4T3	3	.0000000	X
m5T0	3	.0000000	X
m5T1	3	.0000000	X
m5T2	3	.0000000	X
m5T3	3	.0000000	X
m6T0	3	.0000000	X
m6T1	3	.0000000	X
m6T2	3	.0000000	X
m6T3	3	.0000000	X
m7T0	3	.0000000	X
m7T1	3	.0000000	X
m7T2	3	.0000000	X
m7T3	3	.0000000	X
m3T1	3	.2100000	X
m1T1	3	.3756667	X
m3T0	3	1.8900000	X
m1T0	3	4.8900000	X

B.6 Các bảng phân tích số lượng *S. aureus* trong nhóm rau

B.6.1 Bảng ANOVA

Analysis of Variance for NHOM3RAU.S_aureus - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:NHOM3RAU.dot	246.906	2	123.453	.439	.6484
B:NHOM3RAU.mau	55490.627	6	9248.438	32.856	.0000
C:NHOM3RAU.NT	71240.501	3	23746.834	84.363	.0000
INTERACTIONS					
AB	3402.12	12	283.5099	1.007	.4625
AC	707.08	6	117.8467	.419	.8617
BC	112607.09	18	6255.9497	22.225	.0000
RESIDUAL	10133.458	36	281.48496		
TOTAL (CORRECTED)	253827.79	83			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

B.6.2 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu rau

Multiple range analysis for NHOM3RAU.S_aureus by NHOM3RAU.mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
4	12	.000000	X
7	12	.000000	X
1	12	1.233417	X
5	12	3.866417	X
2	12	23.633083	X
6	12	58.419167	X
3	12	61.635833	X

B.6.3 Trắc nghiệm LSD giữa các nghiệm thức

Multiple range analysis for NHOM3RAU.S_aureus by NHOM3RAU.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
T3	21	.017476	X
T2	21	1.937524	XX
T1	21	11.988571	X
T0	21	71.078095	X

contrast	difference	+/-	limits
T0 - T1	59.0895		10.5032 *
T0 - T2	69.1406		10.5032 *
T0 - T3	71.0606		10.5032 *
T1 - T2	10.0510		10.5032
T1 - T3	11.9711		10.5032 *
T2 - T3	1.92005		10.5032

* denotes a statistically significant difference.

B.6.4 Bảng ANOVA khảo sát ảnh hưởng của các nghiệm thức đến mẫu rau

One-Way Analysis of Variance

Data: NTMNHOM3.S_aureus

Level codes: NTMNHOM3.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	239338.22	27	8864.3786	34.259	.0000
Within groups	14489.56	56	258.7422		
Total (corrected)	253827.79	83			

0 missing value(s) have been excluded.

B.6.5 Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu rau với từng nghiệm thức

Multiple range analysis for NTMNHOM3.S_aureus by NTMNHOM3.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

m2T3	3	.00000	X
m3T3	3	.00000	X
m4T0	3	.00000	X
m4T1	3	.00000	X
m4T2	3	.00000	X
m4T3	3	.00000	X
m5T3	3	.00000	X
m6T3	3	.00000	X
m7T0	3	.00000	X
m7T1	3	.00000	X
m7T2	3	.00000	X
m7T3	3	.00000	X
m1T3	3	.12233	X
m5T2	3	.12233	X
m1T2	3	.44467	X
m2T2	3	1.10900	X
m3T2	3	1.21000	X
m1T1	3	1.67667	X
m5T1	3	2.24333	X
m1T0	3	2.69000	X
m2T1	3	6.33333	X
m6T2	3	10.67667	X
m3T1	3	11.66667	X
m5T0	3	13.10000	X
m6T1	3	62.00000	X
m2T0	3	87.09000	X
m6T0	3	161.00000	X
m3T0	3	233.66667	X