

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

★★★★★★★★



ĐOÀN NGỌC TUẤN

**KHẢO SÁT TÌNH HÌNH NHIỄM *E. coli* VÀ
Coliforms TRONG NƯỚC UỐNG, NƯỚC CÓ
GAS, NƯỚC CÓ CÒN TRÊN ĐỊA BÀN QUẬN
THỦ ĐỨC**

**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 TÌNH HÌNH NHIỄM *E. coli* VÀ
Coliforms TRONG NƯỚC UỐNG, NƯỚC CÓ
GAS, NƯỚC CÓ CỒN TRÊN ĐỊA BÀN QUẬN
THỦ ĐỨC**

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

**Giáo viên hướng dẫn
Th.S NGUYỄN TIẾN DŨNG**

**Sinh viên thực hiện
ĐOÀN NGỌC TUẤN
KHÓA: 2002-2006**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

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

★★★★★★★

**INVESTIGATING THE INFECTION
RATE OF *E. coli* AND *Coliforms* IN BOTTLED
WATER, SOFT WATER AND BEER
IN THU DUC DISTRICT**

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

**Professor
Ms. NGUYEN TIEN DUNG**

**Student
DOAN NGOC TUAN
TERM: 2002 - 2006**

HCMC, 09/2006

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 8 năm 2006

Sinh viên

Đoàn Ngọc Tuấn

TÓM TẮT

ĐOÀN NGỌC TUẤN, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006.

“KHẢO SÁT TÌNH HÌNH NHIỄM *E. coli* VÀ *Coliforms* TRONG NƯỚC UỐNG, NƯỚC CÓ GAS, NƯỚC CÓ CỒN TRÊN ĐỊA BÀN QUẬN THỦ ĐỨC”.

Giáo viên hướng dẫn:

Th.S NGUYỄN TIẾN DŨNG

Ngày nay, khi cuộc sống con người ngày càng được nâng cao thì điều mà họ quan tâm là vệ sinh ăn uống. Hàng năm có hàng trăm ca ngộ độc thực phẩm phải nhập viện, gây hậu quả nghiêm trọng đến sức khỏe của cộng đồng. Điều này không chỉ phổ biến ở Việt Nam mà ngay cả các nước khác trên thế giới cũng vậy. Một trong những nguyên nhân gây ra tình trạng này là sự hiện diện quá mức cho phép các vi sinh vật gây hại trong thực phẩm. Để có các biện pháp phòng tránh, ngăn chặn và làm giảm bớt số ca ngộ độc thực phẩm. Chúng tôi tiến hành khảo sát sự hiện diện của *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước uống đang lưu hành trên thị trường. Mục tiêu là xác định và đánh giá giới hạn định lượng và mật độ nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước uống.

Những kết quả đạt được:

- Có sự khác biệt giữa giới hạn định lượng của *Coliforms* và *E. coli* trong các nhóm nước uống, nước ngọt có gas và nước có cồn. Đồng thời cũng xác định được giới hạn định lượng trong từng loại nước uống này.
- Trong 45 mẫu khảo sát, thì tỷ lệ nhiễm *Coliforms* và *E. coli* vượt quá chỉ tiêu cho phép trong các mẫu nước không đóng chai là 100%, các mẫu nước đóng chai là 0%.
- Có sự khác biệt rất lớn về mật độ ô nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước giải khác đóng chai và không đóng chai. Ngoài ra cũng cho thấy không có sự khác biệt giữa các loại nước trong cùng một nhóm.

MỤC LỤC

TRANG

Trang tựa	
Lời cảm tạ	iv
Tóm tắt.....	v
Mục lục	vi
Danh sách các chữ viết tắt	viii
Danh sách các hình	ix
Danh sách các bảng	x
1. MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục đích	1
1.3. Nội dung thực hiện.....	2
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1. Hệ vi sinh vật trong nước.....	3
2.2. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong nước	4
2.2.1. Nước dùng cho mục đích sinh hoạt, sản xuất.....	4
2.2.2. Nước uống	5
2.3. Sơ lược về <i>Coliforms</i>	6
2.4. Sơ lược về <i>E. coli</i>	8
2.4.1. Đại cương	8
2.4.2. Tính chất vi sinh học	9
2.4.3. Đặc điểm nuôi cấy	9
2.4.4. Đặc tính sinh hoá.....	10
2.4.5. Sức đề kháng	10
2.4.6. Kháng nguyên.....	10
2.4.7. Độc tố	11
2.4.8. Tình hình nhiễm	11
2.5. Phương pháp định lượng vi sinh vật MPN (Most probable number)	13
2.5.1. Khái niệm	13

2.5.2. Cách tiến hành	13
2.5.3. Cách lập chỉ số MPN.....	14
2.5.4. Cách tính kết quả.....	15
3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH	16
3.1. Thời gian và địa điểm	16
3.1.1. Thời gian.....	16
3.1.2. Địa điểm	16
3.2. Vật liệu.....	16
3.2.1. Dụng cụ và thiết bị	16
3.2.2. Hoá chất và môi trường	17
3.2.3. Vật liệu thí nghiệm.....	18
3.3. Phương pháp thực hiện	18
3.3.1. Bố trí thí nghiệm.....	18
3.3.2. Cách lấy mẫu	19
3.3.3. Chọn mẫu âm và tìm giới hạn phát hiện.....	19
3.3.4. Định lượng <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong nước.....	19
3.3.5. Phương pháp định lượng <i>E. coli</i> trong dịch pha loãng bằng phương pháp đếm khuẩn lạc	21
3.3.6. Xử lý số liệu	21
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
4.1. Khảo sát giới hạn định lượng <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong các loại nước bằng phương pháp MPN.....	25
4.2. Khảo sát mật độ <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong các loại nước giải khát	27
4.3. Đánh giá tình hình nhiễm <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong nước giải khát.....	30
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	31
5.1. Kết luận.....	31
5.2. Đề nghị.....	31
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	32
7. PHỤ LỤC	34

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

1. BGA :	Brilliant green agar
2. BGBL :	Brilliant Green Lactose Bile Salt
3. CFU :	Colony Forming Unit
4. EMB:	Eosin Methylene Blue
5. <i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
6. LT:	Heat Labile
7. ST:	Heat stable
8. MR-VP:	Methyl Red- Voges Proskauer
9. MPN:	Most Probable Number
10. MCK:	MacConKey
11. KIA:	Kligler Iron agar
12. IMViC:	Indol, Methyl red, Voges proskauer, Citrate
13. SPW:	Saline Peptone Water
14. TSA:	Tryptone Soya agar
15. TCVN:	Tiêu chuẩn Việt Nam

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ

	TRANG
Hình 2.1: Hình dạng vi khuẩn <i>E. coli</i>	9
Hình 2.2: Vị trí của các kháng nguyên của <i>E. coli</i>	11
Sơ đồ 3.1: Quy trình định lượng <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i>	22
Hình 3.1: Biểu hiện của <i>E. coli</i> trên môi trường canh BGBL	23
Hình 3.2: Khuẩn lạc <i>E. coli</i> trên môi trường EMB	23
Hình 3.3: Biểu hiện sinh hóa của <i>E. coli</i>	24
Biểu đồ 4.1: Biểu đồ so sánh độ thu hồi của 3 nhóm nước	26
Biểu đồ 4.2: Biểu đồ so sánh <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong các mẫu nước giải khát	28

DANH SÁCH CÁC BẢNG

	TRANG
Bảng 2.1: Biểu hiện sinh hoá các giống của <i>Coliforms</i>	7
Bảng 2.2: Thí dụ lựa chọn các kết quả dương tính đối với việc tính toán MPN.....	15
Bảng 3.1: Biểu hiện sinh hoá của <i>E. coli</i>	20
Bảng 4.1: Kết quả khảo sát giới hạn định lượng <i>Coliforms</i> và <i>E. coli</i> trong các nhóm nước	25
Bảng 4.2: Kết quả khảo sát mật độ <i>Coliforms</i> và <i>E.coli</i> trong các loại nước giải khát.....	27

Phần 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Kiểm soát chất lượng vệ sinh và an toàn thực phẩm luôn là mối quan tâm của mọi xã hội, mọi thời đại, đặc biệt là hiện nay, khi chất lượng cuộc sống của con người ngày càng cao, chất lượng môi trường sinh quyển ngày càng thấp, nghĩa là hiểm họa từ các tác nhân lý, hoá và nhất là sinh học từ môi trường vào thực phẩm đang trở nên ngày một lớn hơn. Trong xu thế hội nhập hiện nay, các xí nghiệp chế biến thực phẩm nếu muốn sản phẩm của mình đủ sức cạnh tranh không chỉ trên thị trường nội địa mà cả trên các thị trường nhập khẩu lớn với yêu cầu vệ sinh ngày càng một khắc khe. Do vậy buộc các nhà sản xuất phải có những quy trình kiểm tra vệ sinh thật khắc khe để đạt được các tiêu chuẩn quốc tế, một trong những chỉ tiêu mà họ phải quan đến đó là số lượng *Coliforms* và *E. coli* trong các loại sản phẩm của mình.

E. coli và *Coliforms* là những vi khuẩn phổ biến trong đường tiêu hoá của con người và động vật. Hầu hết chúng tồn tại một cách tự nhiên và không gây hại cho con người. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, nhất là khi sinh lý cơ thể thay đổi, stress...thì một số dòng *E. coli* mang gen gây độc có thể gây bệnh trên người và một số loài động vật. *Coliforms* là một chỉ tiêu thông dụng được dùng để đánh giá mức an toàn vệ sinh trong thực phẩm. Sự hiện diện một số lượng nhất định *Coliforms* và *E. coli* trong thực phẩm là đánh giá thực phẩm đó không an toàn cho người sử dụng.

Nhằm mục đích đánh giá mức độ an toàn vệ sinh của một số loại thực phẩm uống trên thị trường, dưới sự đồng ý của Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm và dưới sự hướng dẫn của Th.s Nguyễn Tiên Dũng, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“KHẢO SÁT TÌNH HÌNH NHIỄM *E. coli* VÀ *Coliforms* TRONG NƯỚC UỐNG, NƯỚC CÓ GAS, NƯỚC CÓ CÒN TRÊN ĐỊA BÀN QUẬN THỦ ĐỨC”**.

1.2. Mục đích

Khảo sát tỉ lệ nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống, nước giải khát có gas, nước uống có cồn đang lưu hành trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh. Đề tài cũng nhằm góp phần đánh giá tình hình an toàn vệ sinh của những loại nước uống đang lưu hành trên thị trường để các cơ quan chức năng có cơ sở đánh giá hiện trạng

an toàn vệ sinh thực phẩm trên các thành phố lớn như TP HCM.

1.3. Nội dung thực hiện

1.3.1. Khảo sát giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong nước bằng phương pháp MPN theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN).

- Xác định giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống.
- Xác định giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong nước ngọt có gas.
- Xác định giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống có cồn.

1.3.2. Khảo sát mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước giải khát

- Mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống đóng chai.
- Mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống đá.
- Mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong nước ngọt có gas.
- Mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống có cồn.

1.3.3. Đánh giá tình hình nhiễm bẩn trong các loại nước giải khát

Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Hệ vi sinh vật trong nước

Phần lớn vi sinh vật xâm nhập vào nước là từ đất trong thời gian mưa hoặc từ bụi trong không khí rơi xuống. Ngoài ra nước còn nhiễm bẩn do các chất thải công nghiệp, chế biến nông phẩm, chất thải sinh hoạt cùng phân gia súc và từ nguồn nước tưới tiêu nông nghiệp.

Số lượng và số loài vi sinh trong nước phụ thuộc vào nhiều yếu tố, nhất là số lượng chất hữu cơ trong nước, các hoá chất độc, tia tử ngoại, pH môi trường, những yếu tố có tính chất quyết định đến sự tăng khối lượng vi sinh vật như các chất dinh dưỡng. Nước càng bẩn, càng nhiều chất hữu cơ, sự phát triển của vi sinh vật trong nước càng nhanh. Trong nước có nhiều loại vi sinh vật: vi khuẩn, nấm men, xoắn thể, nhưng chủ yếu vẫn là vi khuẩn. Nói chung trong nước số vi khuẩn không bào tử chiếm ưu thế gần 87%.

Nước sông luôn thay đổi theo dòng chảy. Vì thế, hệ vi sinh vật và số lượng vi sinh vật luôn thay đổi. Ở vùng gần thành phố nước sông có số lượng vi khuẩn lớn, còn ở xa thành phố thì số lượng của chúng giảm nhanh. Trong nước sông chảy qua vùng dân cư đông đúc hoặc các xí nghiệp thì có hàng trăm đến hàng triệu vi khuẩn trong 1 cm³.

Nước biển có số lượng vi sinh vật nhỏ hơn nước ao hồ và nước sông. Số vi khuẩn ở gần bờ thường nhiều hơn ở xa bờ. Mặc dù nồng độ muối trong nước biển khá cao nhưng số vi khuẩn cũng không phải ít. Thường trong 1 lít nước biển thay đổi từ 35 đến vài nghìn vi khuẩn.

Nước mưa, tuyết vá băng có rất ít vi khuẩn. Số lượng vi sinh vật thay đổi tùy theo mùa tuyết rơi trên các vùng khác nhau của trái đất.

Nước mạch, nước ngầm có số lượng vi sinh vật tương đối ít. Bởi vì đã thấm qua đất làm màng lọc rất tốt, nên hầu hết vi khuẩn bị giữ lại qua màng lọc thiên nhiên đó. Thành phần hệ vi sinh vật của nước ngầm phụ thuộc vào chính độ sâu của lớp nước dưới độ sâu tầng đất.

Số lượng vi khuẩn trong nước phụ thuộc trực tiếp vào nguồn nước cung cấp. Nếu lấy từ nguồn nước ngầm thì rất ít vi khuẩn, nếu lấy nước từ nguồn nước sông,

hồ...thì dù qua hệ thống lọc cũng còn sót lại một số vi khuẩn đáng kể.

Khi dùng nước để sản xuất nước uống và sản xuất thực phẩm nếu trong 1ml nước chứa số vi khuẩn nhỏ hơn 100 là nước tốt, 100 – 500 vi khuẩn dùng tạm được, trên 500 vi khuẩn thì hoàn toàn không dùng được [4].

Các chỉ tiêu đánh giá nguồn nước

- Chỉ tiêu về cảm quan: màu sắc, mùi vị, trạng thái.
- Chỉ tiêu lý hóa.
- Chỉ tiêu vi sinh vật và các chỉ tiêu đặc thù khác.

Các tác nhân gây ô nhiễm nguồn nước

- Tác nhân sinh học: vi sinh vật
- Tác nhân hoá học: kim loại nặng, chất phụ gia ngoài danh mục cho phép của Bộ Y tế hoặc trong danh mục nhưng sử dụng quá giới hạn qui định.
- Tác nhân vật lý: thủy sinh, các tạp chất

2.2. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong nước

2.2.1. Nước dùng cho mục đích sinh hoạt, sản xuất

Theo TCVN 5942 – 1995 qui định hai mức sau:

- Loại A dùng làm nguồn cấp nước sinh hoạt nhưng phải qua quá trình xử lý, giới hạn tối đa số *Coliform* cho phép là 5000 MPN/100ml [3].
- Loại B dùng cho các mục đích khác, giới hạn tối đa số *Coliform* cho phép là 10 000 MPN/100ml [3].

Đối với nước ngầm, tiêu chuẩn chất lượng về vi sinh vật theo TCVN 5944 – 1995 được quy định là *Coliform* không quá 3 MPN/100ml, không cho phép có *Coliform* phân.

2.2.2. Nước uống

Theo TCVN 6096 – 1995, TCVN 5042 – 1994 quy định về vi sinh vật của các dạng nước này như sau [3]:

- Nước uống đóng chai

Chỉ tiêu	Mức tối đa cho phép
<i>Coliform</i> (MPN/100ml)	0
<i>Coliform</i> phân (MPN/100ml)	0
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	0
<i>Clostridium</i> khử sulphate (CFU/100ml)	0
<i>Streptococci</i> phân (CFU/100ml)	0

- Nước giải khát không cồn

Chỉ tiêu	Mức tối đa cho phép	
	Không đóng chai	Đóng chai
Tổng vi sinh vật hiếu khí (CFU/ml)	5×10^4	10^2
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	3	0
<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/100ml)	0	0
<i>Leuconostoc</i>	0	0
Nấm men – nấm mốc, (CFU/ml)	10^3	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0

• Nước giải khát có cồn

Chỉ tiêu	Mức tối đa cho phép	
	Không đóng chai	Đóng chai
Tổng vi sinh vật hiếu khí (CFU/ml)	10^3	10^2
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	0	0
<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/100ml)	0	0
Vi khuẩn gây đục (quan sát bằng mắt)	0	0
Nấm men – nấm mốc, (CFU/ml)	10^2	0
<i>S. aureus</i> / vi khuẩn gây bệnh đường ruột	0	0

Ngoài ra, theo TCVN 5943 – 1995 quy định nước biển ven bờ dùng cho tắm, nuôi thủy sản có *Coliform* không quá 1000MPN/100ml [3].

2.3. Sơ lược về *Coliforms*

Coliforms được xem là những vi sinh vật chỉ thị an toàn vệ sinh, bởi vì số lượng của chúng hiện diện trong mẫu chỉ thị khả năng có sự hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác trong thực phẩm. Các nhà nghiên cứu cho rằng số lượng *Coliforms* trong thực phẩm càng cao thì khả năng hiện diện các vi sinh vật gây bệnh khác cũng rất lớn. Tuy vậy mối liên hệ giữa số lượng vi sinh vật chỉ thị và vi sinh vật gây bệnh còn đang được tranh cãi về cơ sở khoa học, cho đến nay mối liên hệ này vẫn không được sự thống nhất trong các hội đồng khoa học [2].

Coliforms là nhóm những trực khuẩn đường ruột gram âm không sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy nghi, có khả năng sinh acid, sinh hơi do lên men lactose ở 37°C trong vòng 24 giờ [6, 7].

Coliforms chịu nhiệt là những *Coliforms* có khả năng lên men lactose sinh hơi trong khoảng 24 giờ khi được ủ ở 44°C trong môi trường canh EC. *Coliforms* phân

(*Faecal Coliforms* hay *E. coli* giả định) là *Coliforms* chịu nhiệt có khả năng sinh indole khi được ủ khoảng 24 giờ ở 44,5°C trong canh Trypton. *Coliforms* phân là một thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột ở người và các động vật máu nóng khác và được sử dụng để chỉ thị mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản, vận chuyển, thực phẩm, nước uống cũng như để chỉ thị sự ô nhiễm phân trong mẫu môi trường. Trên thực tế kiểm nghiệm *Coliforms* phân được quan tâm nhiều hơn, đặc biệt là *E. coli* là loài được quan tâm nhiều nhất về vệ sinh an toàn thực phẩm.

Nhóm *Coliforms* gồm 4 giống đó là *Escherichia* với một loài duy nhất là *E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* (gồm 2 loài *E. aerobacter* và *E. cloacae*). Tính chất sinh hoá đặc trưng của nhóm này được thể hiện qua các thử nghiệm IMViC [6, 7].

Bảng 2.1 Biểu hiện sinh hoá các giống của *Coliforms*

Phản ứng	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrat
<i>Escherichia</i>	+(-)	+	-	-
<i>Citrobacter</i>	-(+)	+	-	+
<i>Klebsiella</i>	-(+)	-	+	+
<i>Enterobacter</i>	-(+)	-	+	+

Ghi chú: + phản ứng dương tính, - phản ứng âm tính, +(-): đa số là phản ứng dương tính và -(+): đa số là phản ứng âm tính.

Coliforms phát triển tốt trên nhiều loại môi trường, nhiều loại thực phẩm. Có những nghiên cứu cho thấy chúng có thể phát triển ở nhiệt độ thấp đến - 2°C và cao đến 50°C. Trong thực phẩm chúng phát triển yếu và rất chậm ở 5°C tuy cũng có tài liệu ghi nhận sự phát triển của chúng ở 3 – 6°C [7].

Nguưỡng pH để *Coliforms* có thể phát triển là 4,4 – 9. *E. coli* có thể phát triển trên môi trường tối thiểu chỉ chứa một nguồn carbon hữu cơ duy nhất (chẳng hạn glucose) và một nguồn nitơ duy nhất như (NH₄)₂SO₄ cùng vài loại khoáng khác.

Chúng phát triển tốt trên môi trường thạch thường, cho những khuẩn lạc thấy được sau 12 – 16 giờ ở 37°C, phát triển tốt ở rất nhiều loại thực phẩm trong điều kiện thích hợp.

Coliforms gồm 2 nhóm:

- *Coliforms* có nguồn gốc từ phân phát triển nhanh, khoảng 16 giờ, trong

môi trường dinh dưỡng ở 44⁰C, không mọc ở 4⁰C trong 30 ngày. Là loại vi khuẩn ưa nhiệt, nhiệt độ thích hợp nhất là 41⁰C.

- *Coliforms* không có nguồn gốc từ phân, chúng có nguồn gốc thủy sinh hay từ đất, mọc nhanh ở 4⁰C trong 3 – 4 ngày và 10⁰C trong 1 ngày. Không mọc ở 41⁰C, ở 44⁰C ức chế hoàn toàn sự phát triển của tất cả các *Coliforms* không có nguồn gốc từ phân.

2.4. Sơ lược về *E. coli*

2.4.1. Đại cương

Vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) thuộc [11]:

Lớp: *Schizomycetes*

Bộ: *Eubacteriales*

Họ: *Enterobacteriaceae*

Tộc 1: *Escherichiae*

Giống: *Escherichia*

Loài: *Escherichia coli*

Escherichia coli còn có tên là *Bacterium coli* Commue được ông Escherich phát hiện năm 1885 trong trường hợp tiêu chảy ở trẻ em [16].



Hình 2.1 Vi khuẩn *Escherichia coli* [19]

Theo P. J. Quinn và cs (1994), *E. coli* có nhiều trong ruột của động vật ăn thịt, ăn tạp hơn là động vật ăn cỏ, sống vài tuần đến vài tháng trong bụi, phân, nước, ngoài tự nhiên. Hầu hết chúng không gây hại cho người và động vật, giúp ổn định sinh lý đường ruột. Tuy nhiên cho đến nay đã phát hiện được 5 dòng có khả năng gây hại cho người và động vật là [8]:

- EAEC (*Enteraggative E. coli*), *E. coli* kết tập ở ruột.
- EHEC (*Enterohemorrhagic E. coli*), *E. coli* gây xuất huyết ở ruột.
- EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), *E. coli* gây bệnh đường ruột.
- ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), *E. coli* sinh độc tố ruột.
- EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), *E. coli* xâm lấn niêm mạc ruột.

2.4.2. Tính chất vi sinh học

E. coli là trực khuẩn hình gậy ngắn, gram âm bắt màu hồng, kích thước dài hay ngắn tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy trung bình $2 - 3\mu\text{m} \times 0,5\mu\text{m}$, hai đầu tròn, có lông quanh tế bào, đứng riêng lẻ, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn, di động không hình thành nha bào. Trong bệnh phẩm có khi bắt màu lưỡng cực hai đầu.

2.4.3. Đặc điểm nuôi cấy

E. coli là vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, nhiệt độ phát triển thích hợp là 37°C , pH = 7,4. Mọc tốt trên môi trường dinh dưỡng thông thường chịu được nhiệt độ biến thiên từ $4 - 45^{\circ}\text{C}$.

- Môi trường thạch dinh dưỡng tạo khuẩn lạc tròn ướt, màu trắng đục hơi lồi dẹt lâu có dạng khô rìa hơi nhăn.

- Trên thạch máu có chủng dung huyết α hoặc β .

- Trên thạch gelatin không tan chảy.

- Môi trường canh dinh dưỡng: làm đục đều môi trường, sau lắng xuống đáy, có màu tro nhạt đôi khi có màu xám, có mùi trứng thối.

- Trên môi trường chuyên biệt.

- Môi trường Eosin mythylen blue (EMB) tạo khuẩn lạc tím ánh kim.

- Môi trường MacConkey (MCK) tạo khóm đỏ hồng.

- Môi trường Kligler iron agar (KIA) lên men đường glucose và lactose (vàng / vàng), sinh gas, không sinh H_2S .

- Môi trường Brilliant green agar (BGA) tạo khuẩn lạc xanh lá mạ [11,13].

2.4.4. Đặc tính sinh hoá

E. coli lên men sinh hơi đường glucose, manitol, lactose, galactose nhưng không sinh hơi đường maltose, arabinose. *E. coli* không lên men dextrin, glycogen, inositol, salisin, ít khi lên men inulin, pectin.

E. coli không sinh H₂S, không tan chảy gellatin, không phân hủy đạm, hoàn nguyên Nitrate thành Nitrite [17].

Để phân biệt *E. coli* với vi khuẩn đường ruột khác, người ta thường sử dụng thử nghiệm IMViC. *E. coli* cho kết quả IMViC là: ++-- hay -+++ [14].

2.4.5. Sức đề kháng

E. coli bị diệt ở 55°C trong 1 giờ, 60°C trong 15 - 30 phút, các chất sát trùng như acid phenic, formol có thể bị diệt trong 5 phút. Đề kháng với sự sấy khô, 95% *E. coli* bị diệt ở nhiệt độ đông lạnh trong 2 giờ.

2.4.6. 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 [1].

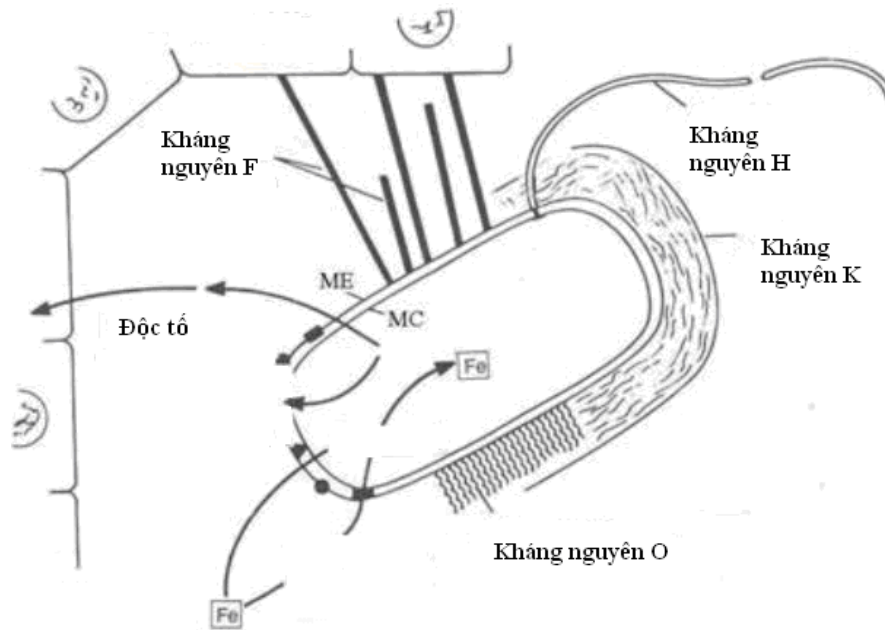
Kháng nguyên O (somatic antigen) là kháng nguyên chịu nhiệt, không bị hủy khi đun nóng 100°C trong 2 giờ, kháng còn không bị hủy khi tiếp xúc với cồn 50%, bị hủy bởi formol 5%, rất độc chỉ cần 0,05mg đủ để giết chuột nhắt sau 24 giờ. Được phân bố trong vách tế bào, bao gồm hỗn hợp lipid-polysaccharid-protein. Lipid xác định độc tính colitoxin, polysaccharid xác định tính đặc thù của huyết thanh và protein mang tính kháng nguyên. Kháng nguyên O được chia làm 4 nhóm chính: O_I, O_{II}, O_{III}, O_{IV}, với trên 150 loại khác nhau, nó bám vào nhung mao ruột làm giảm sự hấp thụ.

Kháng nguyên K (capsular antigen) có bản chất là polysaccharid hay protein, chịu nhiệt kém (dễ bị phá hủy ở 100°C trong 1 giờ). Có hơn 100 loại khác nhau và nằm ngoài kháng nguyên O. 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 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 F (fimbrial antigen) có dạng hình sợi, dài khoảng $4\mu\text{m}$, thẳng hay xoắn, đường kính $2,1 - 7\text{nm}$, 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.



Hình 2.2 Vị trí các loại kháng nguyên trên *E. coli* [21]

2.4.7. Độc tố

E. coli sinh ra các độc tố sau

Nội độc tố: gồm 2 loại

- Enterotoxin LT: không bền với nhiệt độ, trọng lượng phân tử 91,5 KDa, chia làm 2 phần LTa và LTb, mang tính kháng nguyên. LT gây hoạt hoá adenylylase trong tế bào biểu mô ruột, làm tăng lượng AMP vòng do đó kích thích bài tiết CT và Bicarbonate, ức chế tái hấp thụ Na^+ , hậu quả cuối cùng là tiêu chảy mất nước.

- Enterotoxin ST: bền với nhiệt gồm STa và STb không có tính kháng nguyên. ST hoạt hoá guanylylase làm tăng GMP vòng dẫn đến kích thích bài tiết nước muối gây tiêu chảy.

Ngoại độc tố: trọng lượng phân tử 70 KDa, mang tính kháng nguyên.

2.4.8. Tình hình nhiễm

Các ổ dịch trên gia súc và người gây ra bởi các kiểu huyết thanh O157:H7, đã được phát hiện lần đầu tiên ở Mỹ vào năm 1982. Sau đó được ghi nhận ở một số nơi như: Bắc Mỹ, Châu Âu, Nam Phi, Nam Mỹ, Nhật, Úc... Đặc biệt là ở Nhật vào năm

1996 làm 10 ca tử vong và hơn 8000 ca bệnh.

Ở các nước phát triển, có thể do sự hạn chế về trang thiết bị kỹ thuật trong chẩn đoán nên người ta chưa điều tra xác định được tầm quan trọng của bệnh. Các vụ dịch lớn làm một số người chết do ăn bánh mì kẹp thịt nấu chưa chín, do uống sữa chưa được khử trùng, có khi do uống rượu táo được chế biến từ táo bị nhiễm phân bò. Ở Châu Âu và Bắc Mỹ dịch thường xảy ra vào mùa hè, có thể do nhiều yếu tố như sự gia tăng tiêu thụ nước, sự nhiễm khuẩn cao hơn trong thịt bò.

2.4.8.1. Đặc điểm gây bệnh

Chúng tiết ra các độc tố tế bào (cytotoxin), các dòng vi khuẩn này có một plasmid có thể giúp chúng bám dính vào màng nhày của ruột, gây tiêu chảy không có máu hoặc có máu và các hội chứng khác ở người [10].

2.4.8.2. Cơ chế gây bệnh

Cơ chế gây bệnh đường ruột của vi khuẩn *E. coli* cũng có một số điểm giống vi khuẩn *Salmonella* và họ vi khuẩn đường ruột (*Enterobacteriaceae*). Để gây bệnh trước hết vi khuẩn phải bám dính vào tế bào nhung mao ruột bằng các nhân tố xâm nhập, vi khuẩn bám dính vào lớp tế bào biểu mô của thành ruột. Ở đây, chúng phát triển và nhân lên làm phá huỷ các lớp tế bào biểu mô gây viêm ruột. Đồng thời sản sinh độc tố đường ruột enterotoxin gồm yếu tố chịu nhiệt (ST) làm tăng tính thấm xuất của tế bào thành ruột và phá huỷ tế bào, yếu tố không chịu nhiệt (LT) sẽ tác động vào quá trình trao đổi muối, nước làm rối loạn chu trình này. Nước từ cơ thể chảy vào ống ruột làm căng ruột, cùng với khí do lên men ở ruột gây nên một tác động cơ học làm nhu động ruột đẩy nước và thức ăn gây nên hiện tượng tiêu chảy. Sau khi đã phát triển ở thành ruột, chúng vào hệ bạch huyết, đến hệ tuần hoàn gây nhiễm trùng máu, chúng chống lại hiện tượng thực bào, gây dung huyết làm cho cơ thể thiếu máu. Từ hệ thống tuần hoàn chúng theo các vi quản đến các tổ chức, cơ quan, ở đây chúng lại phát triển nhân lên lần thứ hai. Chúng phá huỷ tế bào tổ chức gây viêm và sản sinh ra độc tố toxogenic và verotoxin phá huỷ tế bào tổ chức gây tụ huyết và xuất huyết [9].

2.4.8.3. Triệu chứng trúng độc

E. coli là vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy phổ biến nhất, đặc biệt là ở trẻ em. Đường lây nhiễm chủ yếu là qua đường tiêu hoá do sử dụng nguồn nước và ăn phải thức ăn bị ô nhiễm có chứa lượng lớn vi khuẩn *E. coli*.

Sau khi sử dụng thực phẩm bị nhiễm *E. coli* thì trong vòng 4 – 48 giờ sẽ có các triệu chứng như đau bụng, đi ngoài phân lỏng từ 5 – 15 lần/ngày có lẫn máu trong phân, đôi khi có buồn nôn. Nếu không được cấp cứu, xử trí kịp thời sẽ bị mất nước, điện giải, rối loạn thân nhiệt, hạ huyết áp và có thể tử vong.[9]

2.4.8.4. Phòng ngừa

E. coli gây bệnh theo phân ra ngoài và phát tán trong đất, nước, không khí. Ngoài ra, bệnh có thể lây truyền từ người sang người do tay bẩn, thực phẩm và nước uống bị nhiễm. Do đó, bệnh có thể gây thành dịch, đặc biệt ở nhà trẻ, khoa nhi của bệnh viện và người già.

Vì vậy phòng bệnh chủ yếu là tuân thủ nghiêm ngặt qui chế vệ sinh, chú ý xử lý phân và dụng cụ của bệnh nhân. Không nên ăn những loại thực phẩm không đảm bảo chất lượng, đặc biệt là sản phẩm từ thịt chưa nấu chín. Có thể xác định mật độ *E. coli* trong nước để xem nước có nhiễm bẩn hay không.

2.5. Phương pháp định lượng vi sinh vật MPN (Most probable number)

2.5.1. Khái niệm

MPN là phương pháp dùng để đánh giá mật độ vi sinh vật theo số có xác suất lớn nhất của lượng vi sinh vật có trong một đơn vị thể tích mẫu, với độ chính xác tương đối cao. Phương pháp này còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ, chúng dựa trên kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật cần định lượng trong một môi trường lỏng thích hợp với một số lần lặp lại nhất định. Pha loãng một số lần mẫu có chứa vi sinh vật, sau đó kiểm tra xem tới độ pha loãng nào còn phát hiện thấy sự có mặt của loại vi sinh vật cần kiểm tra. Dùng phương pháp thống kê toán học để tính ra số lượng gần đúng của từng nhóm vi sinh vật nhất định trong mẫu phân tích [3, 6, 7].

Phương pháp MPN có thể thực hiện theo 2 cách

- Với một nồng độ pha loãng
- Với vài nồng độ pha loãng

2.5.2. Cách tiến hành

Tùy theo tình trạng của mẫu mà ta sử dụng các độ pha loãng khác nhau, từ nồng độ nguyên, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} hay từ nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Phải chọn giới hạn thể nào để ở nồng độ thấp nhất luôn có mặt vi sinh vật, còn nồng độ cao nhất thì hoàn toàn không phát hiện thấy vi sinh vật.

Cho vào một số ống nghiệm xác định (có chứa sẵn loại môi trường thích hợp cho sự phát triển của dạng vi sinh vật cần định lượng) một thể tích chính xác dung dịch mẫu với các nồng độ pha loãng khác nhau (1/10, 1/100, 1/1000). Mỗi nồng độ pha loãng được lặp lại nhiều lần, thông thường phải cấy lặp lại từ 3 – 10 lần tại mỗi nồng độ pha loãng. Các độ pha loãng được tiến hành sao cho trong các lần lặp lại có một số lần cho dấu hiệu dương tính và một số lần cho dấu hiệu âm tính.

Sau khi ủ trong những điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp, dựa trên những tính chất biểu kiến như sinh hơi, đổi màu, chuyển đục..., xác định số ống nghiệm có vi sinh vật phát triển (ống dương tính) ở từng nồng độ pha loãng.

Lập một chỉ số gồm các ống nghiệm dương tính ở mỗi loại nồng độ pha loãng (theo thứ tự giảm dần của nồng độ). Tra chỉ số trên theo bảng MPN của MacCrady để xác định số có xác suất lớn nhất của lượng vi sinh vật trong một đơn vị thể tích.

2.5.3. Cách lập chỉ số MPN

- Trường hợp 1: Có ít nhất ba ống dương tính cho một độ pha loãng. Chọn độ pha loãng cao nhất (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) cho ba ống dương tính, cùng với hai độ pha loãng cao hơn kế tiếp (tức là độ pha loãng này có nồng độ mẫu là 1/10 và 1/100 của độ pha loãng thứ nhất đã được chọn) (xem Bảng 2.2, thí dụ 1).

Nếu các dịch pha loãng tiếp theo ngoài dịch pha loãng cao nhất cũng cho ba ống dương tính thì chọn tiếp ba độ pha loãng cao nhất trong cả dãy (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) (xem Bảng 2.2, thí dụ 2).

- Trường hợp 2: Không có độ pha loãng nào cho ba ống dương tính. Chọn ba độ pha loãng cao nhất trong dãy pha loãng (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất), trong số đó ít nhất thu được một kết quả dương tính (xem Bảng 2.2, thí dụ 3).

- Các trường hợp đặc biệt: Trong tất cả các trường hợp khi có nhiều hơn một trong ba độ pha loãng được chọn theo trường hợp 1 và 2 không cho ống dương tính, thì hãy chọn từ các độ pha loãng này độ pha loãng thấp nhất không cho các ống dương tính (tức là độ pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất) và hai độ pha loãng thấp hơn kế tiếp trong dãy pha loãng (tức là có nồng độ mẫu gấp 10 lần và 100 lần độ pha loãng thứ nhất đã chọn) (xem Bảng 2.2, thí dụ 4, 5), trừ khi các ống dương tính chỉ tìm thấy ở mức pha loãng đầu tiên được chuẩn bị từ mẫu thử trong trường hợp cuối cùng này

cần chọn ra ba độ pha loãng đầu tiên để tính MPN thậm chí loạt ống này bao gồm hai độ pha loãng không cho các ống dương tính nào [5, 12].

2.5.4. Cách tính kết quả

Số vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam của sản phẩm được tính bằng cách nhân chỉ số MPN với số đảo của độ pha loãng thấp nhất được chọn (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất).

Khi độ pha loãng thấp nhất được chọn tương ứng với các ống được chuẩn bị với môi trường nồng độ kép (tức là cấy với 10ml), thì trước hết hãy chia chỉ số MPN cho 10.

Bảng 2.2 Thí dụ lựa chọn các kết quả dương tính đối với việc tính toán MPN

Mẫu	Số ống dương tính nhận được từ 3 ống được ủ ấm đối với số mẫu được nuôi cấy trên ống (1)					
	Sản phẩm lỏng	10ml	1ml	10^{-1} ml	10^{-2} ml	10^{-3} ml
	Các sản phẩm ở dạng khác	1g	10^{-1} g	10^{-2} g	10^{-3} g	10^{-4} g
1		3	3	2	1	0
2		3	3	3	0	
3		2	2	1	1	0
4		3	3	0	0	0
5		2	2	0	1	0

Tô hợp tô đen là tô hợp được chọn.

Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. Thời gian và địa điểm

3.1.1. Thời gian

Thời gian thực hiện đề tài từ 20/02/2006 đến 30/07/2006

3.1.2. Địa điểm

Nơi lấy mẫu: Mẫu được lấy tại các quán nước giải khát trên địa bàn Quận Thủ Đức.

Nơi tiến hành phân tích thí nghiệm: Phòng thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học Môi Trường Tại Trung tâm phân tích Hoá 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 250ml, 1000ml
- Cốc đựng nước
- Pipetman
- Ống nghiệm, ống Durham
- Địa petri
- Que cấy vòng, que trang
- Đèn cồn
- Bao PE vô trùng

3.2.1.2. Thiết bị

- Cân phân tích
- Nồi hấp autoclave
- Tủ sấy
- Tủ cấy an toàn sinh học
- Tủ ấm 37°C
- Bể điều nhiệt
- Tủ lạnh

3.2.2. Hoá chất và môi trường

3.2.2.1. Hoá chất

- Thuốc thử Kovac's gồm: p – Dimethylaminobenzaldehyde (p-DMABA) 10g/l, isoamyl alcohol 150ml/l, HCl đậm đặc 50ml/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 4⁰C. Có thể thay thế isoamyl alcohol bằng amyl alcohol hoặc butanol.

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

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

- KOH 40%

- Cồn 70⁰, 96⁰ và nước cất

3.2.2.2. Môi trường

- Môi trường lỏng Brilliant Green Lactose Bile Salt (canh BGBL) được chuẩn bị trong các ống nghiệm chứa ống Durham úp ngược. Thành phần môi trường gồm: peptone 10g/l, lactose 10g/l, mật bò 20g/l, brilliant green 0,0133g/l. Trộn đều và hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút. Sau khi khử trùng pH cuối là 7,2 \pm 0,2 và chỉ sử dụng các ống nghiệm không có bọt khí bên trong ống Durham.

- Dung dịch Saline Peptone Water (SPW): là dịch pha loãng, chuẩn bị trong ống nghiệm, mỗi ống 9ml. Thành phần môi trường là peptone 1g/l, NaCl 8,5g/l, hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, pH sau khi khử trùng là 7,0 \pm 0,2.

- Môi trường Eosin Methylene Blue Lactose agar (EMB): là môi trường dùng để phân lập *E. coli*. Thành phần EMB gồm: pepton 10g/l, lactose 5g/l, sucrose 5g/l, K₂HPO₄ 2g/l, Eosin 0,4g/l, methylen blue 0,065g/l, Agar 13,5g/l. Đun sôi để hòa tan agar trong bình chứa, hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, phân phối vào các đĩa petri khoảng 10ml, pH sau khi khử trùng là 7,2.

- Môi trường Tryptic Soy Agar (TSA): được sử dụng để bảo quản và phục hồi giống vi sinh vật trong quá trình thí nghiệm. Thành phần TSA gồm: trypticase

peptone 15g/l, phytone peptone 5g/l, NaCl 5g, agar 15g/l. Đun nóng để hòa tan agar trong cốc bercher, phân phối vào các ống nghiệm khoảng 5 – 7ml. Hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, pH sau khi khử trùng là 7,3. Sau đó để nguội khoảng 50 – 60⁰C rồi để thạch nguội.

- Môi trường canh Trypton: là môi trường được sử dụng để thử nghiệm phản ứng indol. Thành phần môi trường gồm: peptone 10g/l, NaCl 5g/l, hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút.

- Môi trường MR–VP Broth: được sử dụng để thử nghiệm phản ứng Methyl red và Voges proskauer, có thể sử dụng một trong hai loại môi trường sau:

Môi trường 1 gồm các thành phần sau: Buffered peptone water (Difco hoặc BBL) 7g, glucose 5g, K₂HPO₄ 5g, 1lít nước cất.

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

Hòa tan các thành phần trong nước, làm nóng nhẹ nếu cần. Phân phối 10ml vào các ống nghiệm 16 x 150mm và hấp vô trùng ở 118 – 121⁰C trong 15 phút. pH sau khi khử trùng là 6,9 ± 0,2.

- Môi trường Simmons Citrate Agar được sử dụng để thử nghiệm phản ứng citrate. Thành phần gồm: sodium citrate 2g, NaCl 5g, K₂HPO₄ 1g, NH₄H₂PO₄ 1g, MgSO₄ 0,2g, bromothymol blue 0,08g, agar 15g, 1lít 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 100ml hoặc 16 x 150mm. Hấp ở 121⁰C trong 15 phút. Đặt nghiêng ống nghiệm, pH sau khi khử trùng 6,8 ± 0,2.

3.2.3. Vật liệu thí nghiệm

- Chủng *E. coli* được lấy từ Trung tâm chất lượng, An toàn vệ sinh và Thú y Thủy sản Vùng 4 Thành Phố Hồ Chí Minh

- Các loại nước đóng chai và không đóng chai: gồm 24 mẫu nước đóng chai và 18 mẫu nước không đóng chai.

3.3. Phương pháp thực hiện

3.3.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên. Các mẫu nước được lấy ở cùng một nơi và lặp lại ở những nơi khác nhau trên địa bàn Quận Thủ Đức.

3.3.2. Cách lấy mẫu

Thời gian lấy mẫu vào buổi sáng tại các quán nước trên địa bàn Quận Thủ Đức. Các loại nước đóng chai và không đóng chai được cho vào các bao nylon vô trùng, sau đó đem về phòng thí tiến hành phân tích.

3.3.3. Chọn mẫu âm và tìm giới hạn phát hiện

Lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ kép, dùng pipet vô trùng chuyển 10ml mẫu thử vào từng ống trên. Tiếp theo lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ đơn, dùng pipet vô trùng chuyển 1ml mẫu thử vào từng ống trên. Thực hiện tương tự với 3 ống tiếp theo, mỗi ống cấy vào 0,1ml mẫu. Ủ các ống đã cấy ở 37⁰C trong 24 – 48 giờ, chọn các mẫu không có ống dương tính làm mẫu âm (xem Hình 3.1).

Từ chủng *E. coli* trong ống nghiệm thạch nghiêng cấy sang môi trường canh Tryptone. Sau đó ủ ở 37⁰C trong 24 giờ, định lượng mật độ *E. coli* trong môi trường canh Trypton bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Pha loãng canh khuẩn trong môi trường SPW thành các dịch có mật độ *E. coli* khác. Gây nhiễm vào 100ml mẫu âm đã chọn để thành mẫu gây nhiễm *E. coli* với mật độ trong các khoảng: <10, 10 – 100, >100 khuẩn lạc/100ml mẫu.

Lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ kép, dùng pipet vô trùng chuyển 10ml dịch gây nhiễm vào từng ống. Tiếp theo lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ đơn, dùng pipet vô trùng chuyển 1ml dịch gây nhiễm vào từng ống. Thực hiện tương tự với dãy 3 ống cấy 0,1ml.

Ủ các ống đã cấy ở 37⁰C trong 24 – 48 giờ, đếm số dương tính ở mỗi dãy cấy, tra bảng chỉ số MPN/100ml với 3 ống 10ml, 3 ống 1ml, 3 ống 0,1ml để xác định mật độ *Coliforms* trong mẫu gây nhiễm. Tiếp theo từ các ống dương tính ta cấy ria sang môi trường EMB đây là môi trường chọn lọc của *E. coli* giúp ta dễ dàng nhận diện tế bào *E. coli* và ủ ở 37⁰C. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng cấy sang môi trường TSA để thử nghiệm IMViC. Căn cứ vào số ống có khuẩn lạc cho thử nghiệm IMViC dương tính ở mỗi dãy để tra bảng MPN/100ml để có mật độ của *E. coli* và tính độ thu hồi.

3.3.4. Định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong nước

Lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ kép, dùng pipet vô trùng chuyển 10ml dịch gây nhiễm vào từng ống. Tiếp theo lấy 3 ống môi trường BGBL nồng độ đơn,

dùng pipet vô trùng chuyên 1ml mẫu vào từng ống đây là môi trường tăng sinh của *Coliforms*. Thực hiện tương tự với dãy 3 ống cấy 0,1ml mẫu. Ủ ở 37°C trong 24 – 48 giờ, đếm số ống dương tính ở mỗi dãy cấy, tra bảng kết quả MPN/100ml với 3 ống 10ml, 3 ống 1ml, 3 ống 0,1ml để xác định trị số *Coliforms* trong mẫu.

Từ các ống dương tính, cấy ria sang môi trường thạch đĩa EMB ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng có dạng tròn, dẹt hình đĩa, có ánh kim tím (Hình 3.2) để cấy sang các môi trường canh Tryptone, canh MR-VP, môi trường thạch Simmon Citrate. Ủ các môi trường đã cấy ở 37°C trong 2 giờ, thử phản ứng Indol, Methyl Red, Voges Prokauer, Citrate. Từ các kết quả thử nghiệm IMViC để xác định số ống cho kết quả *E. coli* dương tính trong mỗi dãy. Tra bảng kết quả MPN/100ml với 3 ống 10ml, 3 ống 1ml, 3 ống 0,1ml để xác định trị số *E. coli* trong mẫu.

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 này.

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

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

Thử nghiệm Citrate: Quan sát trên môi trường Simmon citrate, phản ứng dương tính khi môi trường có xuất hiện sinh khối và chuyển sang màu xanh da trời. Phản ứng âm tính khi môi trường không có sinh khối và không có chuyển màu (Hình 3.3).

Bảng 3.1 Biểu hiện sinh hoá của *E. coli*

Môi trường	Phản ứng	Biểu hiện của môi trường
Canh Tryptone	+	Có vòng đỏ xuất hiện trên bề mặt
Thử nghiệm Methyl Red	+	Môi trường chuyển sang màu đỏ
Thử nghiệm Voges prokauer	-	Môi trường không chuyển màu

Simmon Citrate	-	Không có sinh khối và không chuyển màu
----------------	---	--

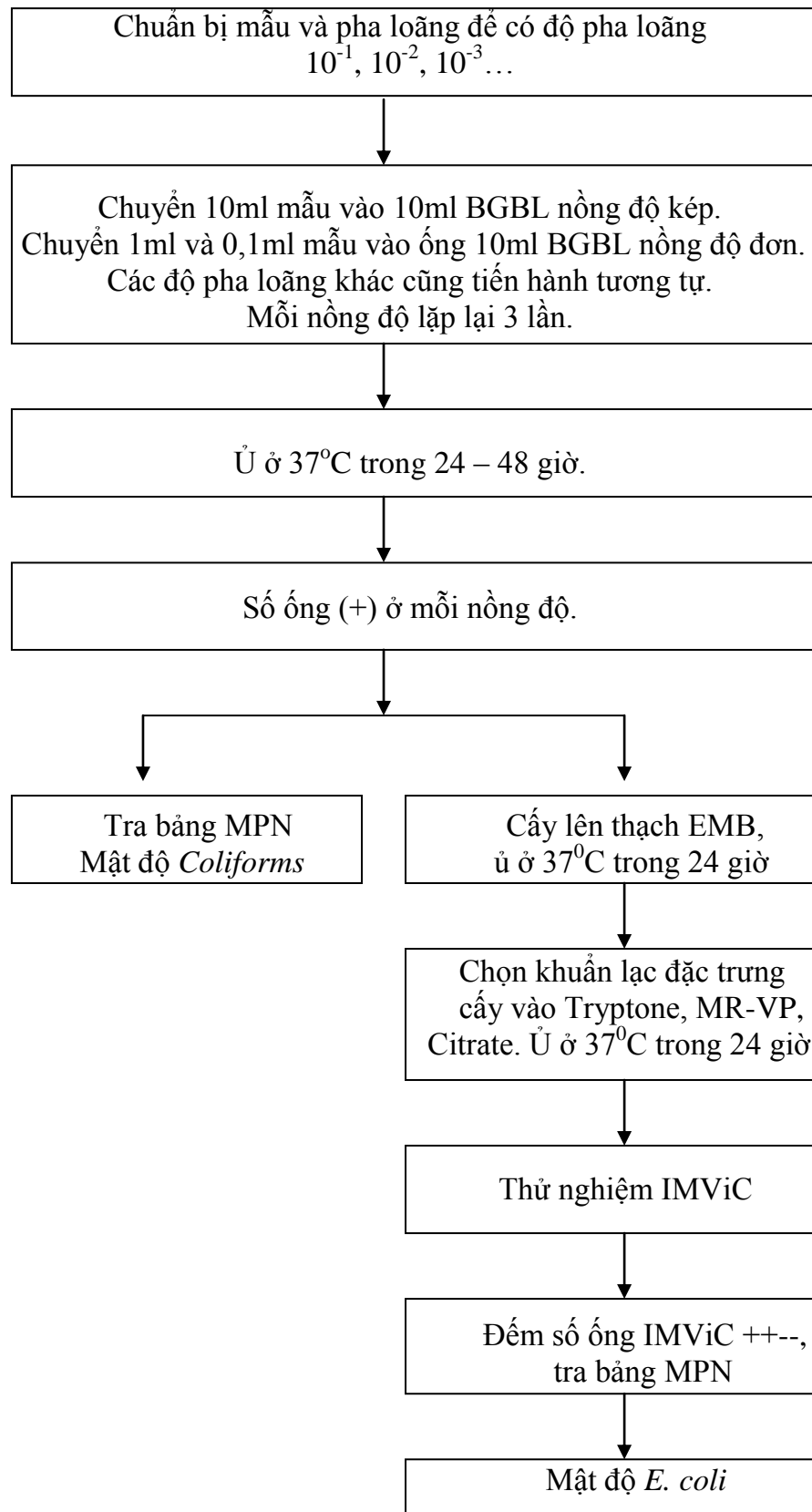
3.3.5. Phương pháp định lượng *E. coli* trong dịch pha loãng bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

Sau khi ủ các môi trường canh tryptone đã cấy *E. coli* trong 24 giờ, ta pha loãng canh khuẩn trong môi SPW ở các độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-7} . Bằng cách dùng pipet vô trùng hút 1ml canh khuẩn cho vào ống nghiệm vô trùng chứa 9ml môi trường SPW, dùng pipet trộn đều ta được dịch pha loãng ở nồng độ 10^{-1} . Sau đó hút 1ml dịch pha loãng này cho vào 9ml môi trường SPW ta được dịch pha loãng 10^{-2} . Thực hiện tương tự đến nồng độ 10^{-7} , tất cả quá trình trên đều thực hiện trong điều kiện vô trùng.

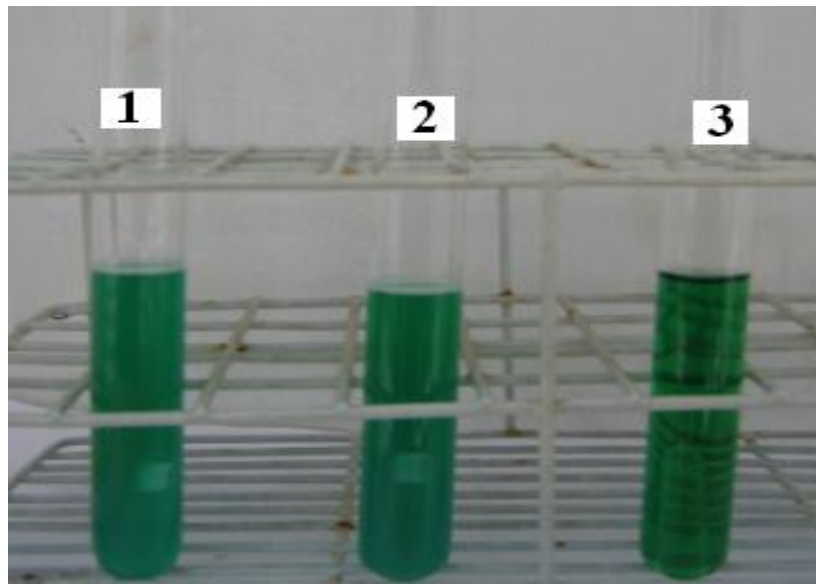
Tiếp theo dùng pipet hút 0,1ml dịch pha loãng ở các nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} cho vào đĩa petri chứa môi trường thạch EMB, dùng que trang trải đều cho đến khi khô mặt thạch. Lật ngược đĩa và đem đi ủ ở 37°C trong 24 giờ. Các dịch pha loãng được bảo quản lạnh ở 4°C , sau khi khuẩn lạc mọc đều ta đếm các khuẩn lạc đặc trưng của *E. coli* trên các đĩa và chọn 3 – 5 khuẩn lạc để khẳng định IMViC. Chọn các dịch pha loãng có mật độ thích hợp để gây nhiễm vào các mẫu âm.

3.3.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê *Statgraphics 7.0*

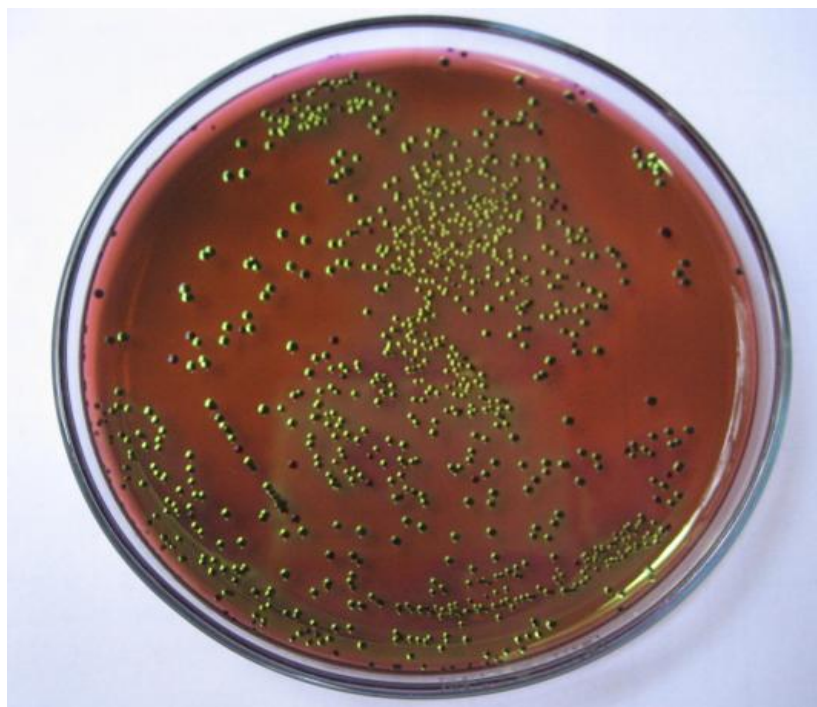


Sơ đồ 3.1 Quy trình định lượng *Coliforms* và *E. coli*

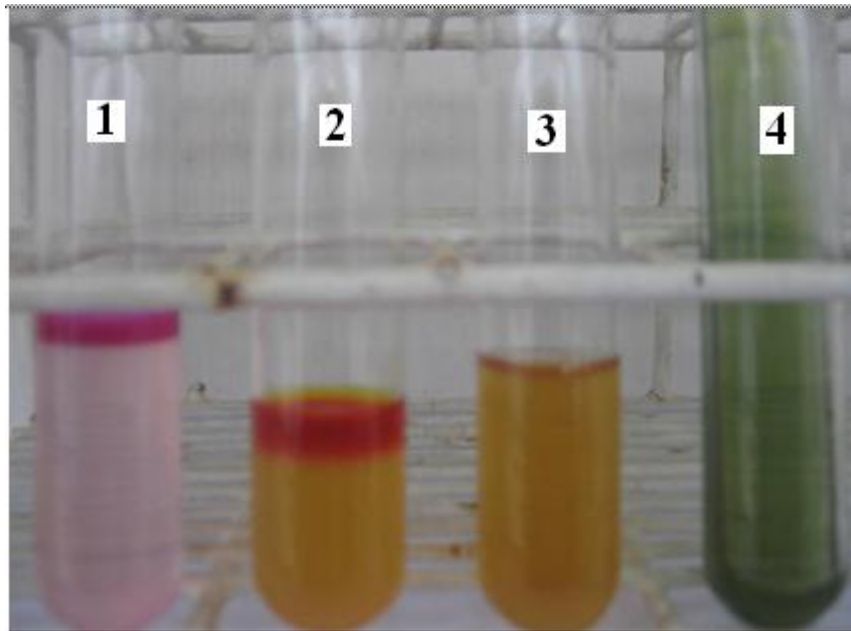


Hình 3.1 Biểu hiện của *E. coli* trên môi trường canh BGLB

1: Đối chứng dương, 2: Mẫu dương, 3: Đối chứng âm



Hình 3.2 Khuẩn lạc *E. coli* trên môi trường EMB



Hình 3.3 Biểu hiện sinh hóa của *E. coli*

1: Indol (+), 2: Methyl Red (+), 3: Voges Prokauer (-), 4: Citrate (-)

Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khảo sát giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước bằng phương pháp MPN

Thí nghiệm được tiến hành trên các mẫu âm, là mẫu không nhiễm *Coliforms*. Các mẫu được sử dụng trong thí nghiệm này thuộc các nhóm: nước uống tinh khiết đóng chai Lavie, nước ngọt có gas đóng chai Pepsi, nước giải khát có cồn bia Sài Gòn đỏ. Mẫu đã chọn được gây nhiễm *E. coli* với các mật độ: 0, 1-10, 10 – 100, > 100 CFU/100ml. Kết quả khảo sát được thể hiện trên Bảng 4.1.

Bảng 4.1 Kết quả khảo sát giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong các nhóm nước

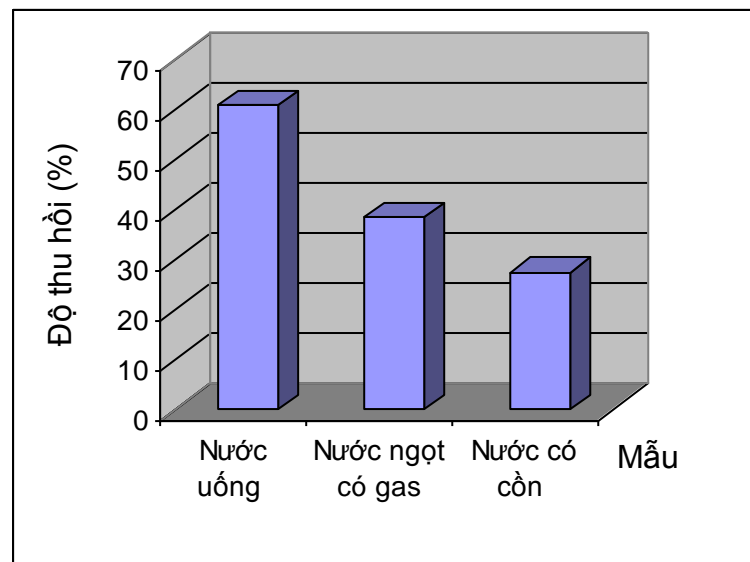
Mẫu	Mật độ gây nhiễm (CFU/100ml)	Mật độ phát hiện (MPN/100ml)	Độ thu hồi(%) trung bình
Nước uống Lavie	0	0	60,86 ^b
	6	3	
	21	9	
	56	39	
	105	64	
	296	240	
Nước ngọt có gas Pepsi	0	0	38,40 ^a
	6	0	
	21	0	
	56	28	
	105	64	
	296	240	
Nước có cồn bia Sài Gòn	0	0	27,49 ^a
	6	0	
	21	0	
	56	23	
	105	48	
	296	150	

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

Kết quả trình bày trên Bảng 4.1 cho thấy hầu hết mật độ phát hiện của các mẫu nước nói trên đều giảm so với mật độ gây nhiễm. Như ở mẫu nước uống Lavie khi gây nhiễm là 6 CFU/100ml thì phát hiện chỉ được 3 MPN/100ml, mật độ này giảm đi một nửa so với mật độ gây nhiễm. Nhưng khi gây nhiễm ở mật độ cao hơn như 56, 105, 296 CFU/100ml thì mật độ phát hiện càng tăng cụ thể lần lượt là 39, 64, 240 MPN/100ml.

Từ kết quả này cho thấy khi gây nhiễm ở mật độ càng cao thì khả năng phát hiện càng lớn. Còn ở mẫu nước ngọt có gas Pepsi thì sự chênh lệch giữa mật độ gây nhiễm và mật độ thu hồi cũng tương tự như ở mẫu nước uống Lavie cụ thể là khi gây nhiễm ở mật độ là 56, 105, 296 CFU/100ml thì mật độ phát hiện là 28, 64, 240 MPN/100ml giảm gần một nửa so với mật độ ban đầu. Nhưng khi gây nhiễm ở mật độ thấp thì mật độ phát hiện có thể là 0 MPN/100ml cụ thể là ở mật độ 6 hay 21 CFU/100ml. Nguyên do có thể là khi gây nhiễm ở mật độ cao thì sự phân bố vi khuẩn trong 100ml mẫu âm tương đối đồng đều hơn, còn khi gây nhiễm ở mật độ thấp thì sự phân bố có thể không đồng đều có nơi có có nơi không nên khi hút cũng sẽ có khi có có khi không.

Ở mẫu nước có cồn bia Sài Gòn thì mật độ phát hiện cũng tương tự như mẫu nước ngọt có gas khi gây nhiễm ở mật độ thấp. Nhưng khi gây nhiễm ở mật độ cao hơn như 56, 105, 296 CFU/100ml thì mật độ phát hiện giảm đi hơn một nửa cụ thể chỉ thu lại lần lượt là 23, 48, 150 MPN/100ml.



Biểu đồ 4.1: Biểu đồ so sánh độ thu hồi của 3 nhóm nước

Biểu đồ 4.1 và Bảng 4.1 cho thấy độ thu hồi giữa ba nhóm nước có sự khác biệt ($p < 0,05$) (xem Bảng 1B phụ lục). Ở nhóm nước uống là 60,86% cao gấp 1,5 lần so với nhóm nước ngọt có gas là 38,4%, còn so với nhóm nước có cồn thì tỷ lệ này còn cao hơn khoảng gấp 2,5 lần. Còn giữa nhóm nước có gas và nước có cồn thì không có sự khác biệt ($P < 0,05$) (xem Bảng 1B phụ lục), không có sự chênh lệch về giá trị. Nguyên nhân có thể là do các chất có trong mẫu nước làm ức chế phần nào sự tăng trưởng của các vi khuẩn.

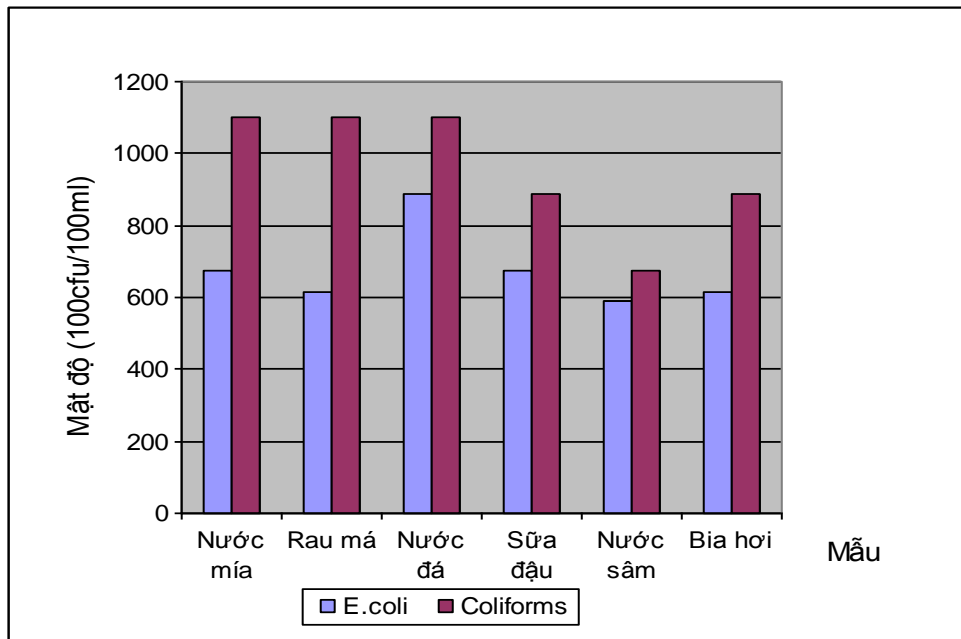
Kết quả cho thấy trong thực tế khi mẫu nước bị nhiễm ở mật độ thấp thì khả năng phát hiện cũng thấp. Do vậy song song với việc sử dụng các phương pháp truyền thống trong xét nghiệm cũng cần dùng các phương pháp hiện đại để thu được kết quả chính xác hơn.

4.2. Khảo sát mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước giải khát

Bảng 4.2. Kết quả khảo sát mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước giải khát

Mẫu	Số mẫu	Mật độ <i>Coliforms</i> (MPN/100ml)	Mật độ <i>E. coli</i> (MPN/100ml)
Nhóm không đóng chai			
Nước mía	3	1100 ^c	673,33 ^b
Nước rau má	3	1100 ^c	616,66 ^b
Nước đá	3	1100 ^c	886,66 ^b
Sữa đậu nành	3	886,66 ^{bc}	673,33 ^b
Nước sâm	3	673,33 ^b	590 ^b
Bia hơi	3	886,66 ^{bc}	616,66 ^b
Nhóm đóng chai			
Bia Sài Gòn	3	0 ^a	0 ^a
Lavie	3	0 ^a	0 ^a
Aquafina	3	0 ^a	0 ^a
South's	3	0 ^a	0 ^a
Pepsi	3	0 ^a	0 ^a
Xá xị	3	0 ^a	0 ^a
Mirinda	3	0 ^a	0 ^a
Cocacola	3	0 ^a	0 ^a
Tiêu chuẩn cho phép		0	0

Khảo sát được thực hiện trên 42 mẫu nước giải khát, trong đó có 9 mẫu nước suối và nước khoáng, 12 mẫu nước ngọt, 3 mẫu bia hơi, 3 mẫu bia đóng chai và thanh trùng, 3 mẫu nước đá, 12 mẫu nước giải khát từ các xe đẩy bán dọc đường. Tất cả các mẫu trên được phân tích đồng thời hai chỉ tiêu *Coliforms* và *E. coli* bằng phương pháp MPN/100ml. Kết quả khảo sát sau khi được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics được trình bày trên Bảng 4.2 và Biểu đồ 4.2.



Biểu đồ 4.2. Biểu đồ so sánh *Coliforms* và *E. coli* trong các mẫu nước giải khát

Kết quả trình bày trên Bảng 4.2 cho thấy giữa các mẫu nước giải khát trong nhóm nước giải khát không đóng chai không có sự khác biệt về mật độ nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong mẫu nước. Nhưng có sự khác biệt rất lớn với các mẫu nước đóng chai và tiêu chuẩn cho phép về phương diện thống kê ($P < 0,05$) (xem Bảng 3B và 5B phụ lục). Ta thấy hầu hết các mẫu nước đóng chai hay đóng lon được sản xuất bởi các công ty có tên tuổi trên thị trường đều đạt tiêu chuẩn cho phép của nước uống. Ngược lại 100% các loại nước uống giải khát không qua quá trình đóng chai, được bày bán dọc đường, thậm chí các loại bia hơi đều không đạt tiêu chuẩn cho phép về hai chỉ tiêu *E. coli* và *Coliforms*. Kết quả trên cho thấy các loại nước uống được bày bán dọc đường tại khu vực Thủ Đức như nước mía, nước rau má, sữa đậu nành, nước sâm ... có mật độ *Coliforms* và *E. coli* cao hơn mức cho phép từ 500 đến 1000 lần so với tiêu chuẩn cho phép.

Trên Biểu đồ 4.2 cũng cho thấy các loại nước giải khát có qua quá trình gia nhiệt như sữa đậu nành, nước sâm ... có mật độ *E. coli* và *Coliforms* thấp hơn so với trong trong các loại nước uống không qua gia nhiệt như nước mía, bia hơi, rau má, nhưng tỉ lệ chênh lệch này là không đáng kể và vượt quá cao so với mức cho phép. Kết quả này nói lên rằng sự nhiễm bẩn các vi sinh vật này vào trong nước uống có thể xảy ra trong quá trình vận chuyển, bảo quản hay từ các thiết bị chứa, phân phối.

Đặc biệt nguy hiểm hơn khi tiến hành phân tích trên 3 mẫu nước đá được lấy từ các quán giải khát thuộc khu vực quận Thủ Đức cũng cho kết quả *Coliforms* cao hơn 1100 lần, *E. coli* cao hơn khoảng 900 lần so với mức cho phép. Nước đá thường xuyên được sử dụng trong các hàng quán, cửa hàng nước giải khát và được sử dụng chung với các loại nước uống khác, một số lượng lớn người thường xuyên sử dụng loại nước này. Vì vậy khi nước đá nhiễm bẩn nặng nề như vậy sẽ làm nhiễm bẩn luôn các loại nước uống hợp vệ sinh khác, đồng thời gây mất vệ sinh cho một số lượng lớn người sử dụng.

Kết quả khảo sát của chúng tôi như trên có cao hơn kết quả khảo sát của Cục Thú y về tình hình ô nhiễm vi sinh vật trên một số loại nước giải khát bán lẻ (sữa đậu nành, nước rau má, sữa tươi, nước mía ...) tại các chợ trên địa bàn TP. Hồ Chí Minh từ 2002-2004 là 89% số mẫu không đạt yêu cầu về vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh và vi khuẩn gây bệnh.

Ngoài ra theo thống kê của Bộ Y tế thì nước đá sử dụng cho dịch vụ thức ăn đường phố có nhiễm *E. coli* là 35,6% ở các cơ sở nội thành và 64,7% ở các cơ sở ngoại thành. Qua đây ta thấy khả năng nhiễm vào các loại nước giải khát không đóng chai của *Coliforms* và *E. coli* là rất lớn như Biểu đồ 4.2.

Coliforms và *E. coli* là những chỉ tiêu vi sinh vật chỉ thị mức độ an toàn vệ sinh thực phẩm. Khi mật độ các vi sinh vật này cao, chứng tỏ trong các loại nước uống trên bị ô nhiễm hữu cơ rất nặng. Đồng thời song hành với những vi sinh vật này là những vi sinh vật đường ruột gây bệnh nguy hiểm như *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* ... Khi mật độ *E. coli*, *Coliforms* cao thì khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh trên trong các loại nước uống này cũng rất cao. Đây là một mối nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng của thành phố. Các cơ quan chức năng cần phải có những biện pháp cần thiết để hạn chế những loại nước giải khát không đạt tiêu chuẩn vệ sinh lưu hành trên thị trường để bảo vệ sức khỏe của mọi người dân.

4.3. Đánh giá tình hình nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong nước giải khát

Với kết quả thu được trong thí nghiệm trên ta thấy mức độ nhiễm *E. coli* và *Coliforms* trong các mẫu nước giải khát không đóng chai được bán lẻ trên địa bàn Thủ Đức rất cao so với tiêu chuẩn cho phép của Bộ Y tế.

Sở dĩ có được kết quả này là do nhiều nguyên nhân nhưng theo thống kê của Bộ Y tế có khoảng 49,1 – 91,6% các cơ sở không bảo đảm vệ sinh an toàn thực phẩm trong quá trình chế biến, 85,9 – 99,2% cơ sở vận chuyển, bảo quản không bảo đảm an toàn vệ sinh thực phẩm, 37 – 88% nơi bán hàng, trang thiết bị và dụng cụ chế biến không bảo đảm vệ sinh; 43,8 – 88% người kinh doanh, chế biến thực phẩm không chấp hành các quy định vệ sinh an toàn thực phẩm.

Đó là lý do khiến cho các loại nước giải khát bán tại các chợ bị ô nhiễm. Hệ quả nhãn tiền là mỗi năm lại có hàng trăm người phải vào viện cấp cứu vì ngộ độc. Theo thống kê giai đoạn 2001 – 2005 cho thấy đã có 988 vụ ngộ độc với 23190 người mắc và 263 người chết. Tất nhiên trên thực tế, những con số ngoài báo cáo sẽ còn cao hơn nhiều.

Ngược lại, so với các loại nước giải khát không đóng chai thì các loại nước giải khát đóng chai thì ưu việt hơn nhiều, không có sự xâm nhiễm của *E. coli* và *Coliforms* trong nước đạt tiêu chuẩn của Bộ Y tế. Nguyên nhân là do các Công ty này rất chú tâm đến vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm trong sản phẩm của mình, đây là yếu tố cạnh tranh nên đã đầu tư các thiết bị hiện đại để kiểm tra và xử lý sản phẩm của mình.

Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Những kết quả khảo sát như trên là bước đầu phản ánh tình hình ô nhiễm vi sinh vật trong các loại nước giải khát trên địa bàn TP. Hồ Chí Minh đã đến mức báo động. Từ kết quả đã nhận được cho phép chúng tôi rút ra kết luận như sau:

- Có sự khác biệt giữa giới hạn định lượng của *Coliforms* và *E. coli* trong các nhóm nước uống, nước ngọt có gas và nước có cồn. Đồng thời cũng xác định được giới hạn định lượng trong từng loại nước. Độ thu hồi của *Coliforms* và *E. coli* trong nước uống là 60,86%, trong nước ngọt là 38,40%, trong nước uống có cồn là 27,49%.

- Có sự khác biệt rất lớn về mật độ ô nhiễm *Coliforms* và *E. coli* trong các loại nước giải khát đóng chai và không đóng chai. Ngoài ra cũng cho thấy không có sự khác biệt giữa các loại nước trong cùng một nhóm.

- 100% các mẫu nước giải khát không đóng chai và nước đá lưu hành trên địa bàn quận Thủ Đức đều không đạt tiêu chuẩn an toàn vệ sinh. Mật độ *Coliforms* và *E. coli* trong các mẫu này đều cao hơn mức cho phép từ 500 đến 1100 lần.

- Kết quả này cho thấy tình hình mất an toàn vệ sinh trong các loại nước uống lưu hành tự do trên thị trường đang ở mức báo động cao.

5.2. Đề nghị

Nếu quá trình khảo sát này tiếp tục được thực hiện, chúng tôi đề nghị được tiến hành với các nội dung sau:

- Khảo sát trên phạm vi rộng lớn không chỉ các loại nước giải khát mà còn là nước sinh hoạt.

- Nghiên cứu xem các vi khuẩn xâm nhiễm vào nước có nguồn gốc từ đâu để kịp đưa ra các biện pháp khắc phục.

- Khảo sát sự nhiễm bẩn các loại vi sinh vật gây bệnh trong các loại nước giải khát

TÀI LIỆU THAM KHẢO

PHẦN TIẾNG VIỆT

1. Bộ môn vi sinh – khoa Y – Đại học Y Dược TP. HCM, 1996. *Vi khuẩn học*.
2. 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.
3. Mai Chí Cần, 2002. *Khảo sát sự hiện diện của vi khuẩn E .coli và Salmonella và Nấm phôi trên gà 1 ngày tuổi*. Luận văn tốt nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.
4. Nguyễn Tiến Dũng, 2004. Bài giảng” *Kiểm nghiệm chất lượng thực phẩm* “.
5. Vương Thị Việt Hoa, 2003. *Giáo trình thực tập vi sinh thực phẩm*. Tủ sách Đại học Nông Lâm TP. HCM.
6. Lê Đình Hùng, 1998. *Đại cương về phương pháp kiểm tra vi sinh vật thực phẩm*. Trung tâm Tiêu Chuẩn Đo Lường Chất Lượng khu vực III, TP. HCM.
7. Bùi Quý Huy, 2002. *Hướng dẫn phòng chống các bệnh do Vi khuẩn CHLaMyDa và RicKettSin từ động vật lây sang người*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp – Hà Nội.
8. Phạm Sỹ Lăng, Trương Văn Dung, 2002. *Một số bệnh mới do Vi khuẩn và Mycoplasma ở gia súc – gia cầm nhập nội và biện pháp phòng trị*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp – Hà Nội.
9. Lương Đức Phẩm, 2002. *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp – Hà Nội.
10. Trần Linh Thuớc, 2002. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
11. Cao Thanh Chính Trung, 2000. *Khảo sát sự hiện diện của 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 TP. HCM.
12. Nguyễn Ngọc Tuân, 2002. *Vệ sinh thit*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp – TP. HCM.
13. Tiêu chuẩn Việt Nam 4882 – 2001. Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về định lượng *Coliforms* - Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn hơn.

PHẦN TIẾNG NƯỚC NGOÀI

14. *Clinical Verterinary Microbiologin.*
15. FAO,1992. *Microbiological analysis in the food centrol laboratory*
16. P. J. Quinn và cs, 1994. *Clirical Verteriaary Microbiology.*
17. Sussman, 1985. *The Virulence of E. coli.*

PHẦN TRANG WEB

18. <http://www.about-E.coli.com>.
19. [http:// res2.agr.ca/lethbridge/emia/SEMproj/Ecoli_f.htm](http://res2.agr.ca/lethbridge/emia/SEMproj/Ecoli_f.htm)
20. [http:// vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html](http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html)
21. <http://www.lugo.usc.es/ecoli/E.coli2.html>

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC A

Bảng 1A Kết quả khảo sát giới hạn định lượng *Coliforms* và *E. coli* trong các nhóm nước

Mẫu	Mật độ gây nhiễm (CFU/100ml)	Mật độ phát hiện (MPN/100ml)	Độ thu hồi(%)
	0	0	0
Nước uống	6	3	50
Lavie	21	9	42,857
	56	39	69,642
	105	64	60,952
	296	240	81,081
	0	0	0
Nước ngọt có	6	0	0
gas Pepsi	21	0	0
	56	28	50
	105	64	60,952
	296	240	81,081
	0	0	0
Nước có cồn	6	0	0
bia Sài Gòn	21	0	0
	56	23	41,071
	105	48	45,714
	296	150	50,675

Bảng 2A Kết quả khảo sát mật độ *Coliforms* và *E.coli* trong các loại nước giải khát

Mật độ (CFU/100ml)						
Lần	Lần 1		Lần 2		Lần 3	
Mẫu	<i>E. coli</i>	<i>Coliforms</i>	<i>E. coli</i>	<i>Coliforms</i>	<i>E. coli</i>	<i>Coliforms</i>
Nước mía	460	1100	460	1100	1100	1100
Nước rau má	290	1100	460	1100	1100	1100
Nước đá	1100	1100	1100	1100	460	1100
Sữa đậu nành	460	460	1100	1100	460	1100
Nước sâm	1100	1100	460	460	210	460
Bia hơi	460	1100	1100	1100	290	460
Bia Sai Gòn	0	0	0	0	0	0
Lavie	0	0	0	0	0	0
Aquafina	0	0	0	0	0	0
South	0	0	0	0	0	0
Pepsi	0	0	0	0	0	0
Xáxi	0	0	0	0	0	0
Mirinda	0	0	0	0	0	0
Cocacola	0	0	0	0	0	0

PHỤ LỤC B

Bảng 1B Bảng phân tích ANOVA độ thu hồi của các loại nước

Analysis of Variance for DOTHUHOI.thuhoi - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:DOTHUHOI.dot	7716.2524	4	1929.0631	12.995	.0014
B:DOTHUHOI.mau	2895.1817	2	1447.5909	9.752	.0072
RESIDUAL	1187.5455	8	148.44318		
TOTAL (CORRECTED)	11798.980	14			

3 missing values have been excluded.

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

Bảng 2B Trắc nghiệm LSD về độ thu hồi của loại nước

Multiple range analysis for DOTHUHOI.thuhoi by DOTHUHOI.mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
m2	5	27.492000	X
m3	5	38.406600	X
m1	5	60.863600	X

contrast	difference	+/-	limits
m1 - m2	33.3716		17.7743 *
m1 - m3	22.4570		17.7743 *
m2 - m3	-10.9146		17.7743

• denotes a statistically significant difference.

Bảng 3B Bảng phân tích ANOVA chỉ số *Coliforms* trong các mẫu nước

Analysis of Variance for SOSANH1.Coliforms - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:SOSANH1.dot	78019.0	2	39009.52	1.368	.2722
B:SOSANH1.mau	9890590.5	13	760814.65	26.689	.0000
RESIDUAL	741180.95	26	28506.960		
TOTAL (CORRECTED)	10709790	41			

0 missing values have been excluded.

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

Bảng 4B Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu nước về chỉ số *Coliforms*

Multiple range analysis for SOSANH1.Coliforms by SOSANH1.mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

m7	3	.0000	X
m8	3	.0000	X
m9	3	.0000	X
m10	3	.0000	X
m11	3	.0000	X
m12	3	.0000	X
m13	3	.0000	X
m14	3	.0000	X
m5	3	673.3333	X
m4	3	886.6667	XX
m6	3	886.6667	XX
m1	3	1100.0000	X
m2	3	1100.0000	X
m3	3	1100.0000	X

* denotes a statistically significant difference.

Bảng 5B Bảng ANOVA phân tích chỉ số *E. coli* trong các mẫu nước

Analysis of Variance for SOSANH1.E__coli - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:SOSANH1.dot	139276.2	2	69638.10	.989	.3856
B:SOSANH1.mau	4878364.3	13	375258.79	5.328	.0001
RESIDUAL	1831057.1	26	70425.275		
TOTAL (CORRECTED)	6848697.6	41			

0 missing values have been excluded.

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

Bảng 6B Trắc nghiệm LSD giữa các mẫu nước về chỉ số *E. coli*

Multiple range analysis for SOSANH1.E__coli by SOSANH1.mau

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

m7	3	.00000	X
m8	3	.00000	X
m9	3	.00000	X
m10	3	.00000	X
m11	3	.00000	X
m12	3	.00000	X
m13	3	.00000	X
m14	3	.00000	X
m5	3	590.00000	X
m2	3	616.66667	X
m6	3	616.66667	X
m1	3	673.33333	X
m4	3	673.33333	X
m3	3	886.66667	X

* denotes a statistically significant difference.

Bảng 7B Bảng MPN

Table 1. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--