

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Ngọc Duyên

**ĐÁNH GIÁ THỰC TRẠNG KIỂM SOÁT NHIỄM KHUẨN
TẠI CÁC CƠ SỞ SẢN XUẤT NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI
TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH KHÁNH HÒA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Nha Trang - Năm 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Ngọc Duyên

**ĐÁNH GIÁ THỰC TRẠNG KIỂM SOÁT NHIỄM KHUẨN
TẠI CÁC CƠ SỞ SẢN XUẤT NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI
TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH KHÁNH HÒA**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Phan Thị Hoài Trinh

Nha Trang – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi cùng nhóm nghiên cứu dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi cùng nhóm nghiên cứu tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu trong đề tài đảm bảo trung thực và khách quan. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào khác. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Ngọc Duyên

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn đến quý thầy cô giáo tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, những người đã tận tình chỉ dạy, truyền đạt kiến thức cho tôi trong quá trình học tập, triển khai đề tài nghiên cứu và hoàn thành luận văn thạc sĩ.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến giáo viên hướng dẫn, TS. Phan Thị Hoài Trinh - Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, người đã trực tiếp định hướng nghiên cứu, hướng dẫn tôi thực hiện đề tài và hoàn thành luận văn thạc sĩ này.

Xin chân thành cảm ơn Đề tài ĐT-2021-30309-ĐL đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu và cho phép sử dụng số liệu cho luận văn này. Xin cảm ơn TS. Lê Quốc Phong – Viện Pasteur Nha Trang, chủ nhiệm đề tài ĐT-2021-30309-ĐL đã tham gia hướng dẫn, định hướng, giúp đỡ trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn này.

Xin trân trọng cảm ơn TS.BS. Đỗ Thái Hùng – Viện trưởng Viện Pasteur Nha Trang (IPN), ThS. Đào Thị Vân Khánh – Giám đốc Trung tâm ATTP khu vực miền Trung – IPN và các cán bộ Lab Vi sinh – Trung tâm ATTP khu vực miền Trung – IPN đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, người thân và bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Nha Trang, ngày tháng năm 2023

Nguyễn Thị Ngọc Duyên

MỤC LỤC

	Trang
MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	5
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	6
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	8
MỞ ĐẦU.....	9
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	11
1.1. TỔNG QUAN VỀ NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI.....	11
1.1.1. Khái niệm nước uống đóng chai.....	11
1.1.2. Tình hình sử dụng nước uống đóng chai trong và ngoài nước.....	11
1.1.2.1. Trên thế giới.....	11
1.1.2.2. Tại Việt Nam.....	13
1.1.3. Tình hình kiểm soát chất lượng nước uống đóng chai.....	13
1.1.4. Tình hình ngộ độc, dịch bệnh do liên quan đến nước uống.....	14
1.1.5. Quy trình sản xuất nước uống đóng chai.....	15
1.1.5.1. Nguồn nước nguyên liệu.....	15
1.1.5.2. Quy trình sản xuất nước uống đóng chai.....	16
1.2. THỰC TRẠNG Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI.....	19
1.2.1. Đặc điểm một số vi sinh vật thường gặp trong nước uống đóng chai.....	19
1.2.1.1. Coliform.....	19
1.2.1.2. Escherichia coli.....	19
1.2.1.3. Pseudomonas aeruginosa.....	20
1.2.1.4. Streptococci feacal.....	20
1.2.1.5. Bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite (Clostridia).....	21

1.2.1.6. Tổng số vi sinh vật dị dưỡng	21
1.2.2. Các nghiên cứu về thực trạng ô nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai	22
1.2.2.1. Thực trạng ô nhiễm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> trong NUĐC	22
1.2.2.2. Thực trạng ô nhiễm coliform và <i>Escherichia coli</i> trong NUĐC	23
1.2.2.3. Thực trạng ô nhiễm <i>Streptococci feacal</i> và <i>Clostridia</i> trong NUĐC	24
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	26
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	26
2.1.2. Môi trường, hóa chất, chủng chuẩn	26
2.1.2.1. Đối với chỉ tiêu Coliform và <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.2.2. Đối với chỉ tiêu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.1.2.3. Đối với chỉ tiêu <i>Streptococci feacal</i>	26
2.1.2.4. Đối với chỉ tiêu bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite	27
2.1.2.5. Đối với chỉ tiêu Heterotrophic Plate Count	27
2.1.3 Thiết bị, dụng cụ	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	27
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	27
2.2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu nghiên cứu.....	27
2.2.2.1 Cỡ mẫu.....	27
2.2.2.2. Phương pháp thu mẫu.....	28
2.2.3. Tóm tắt quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu	30
2.2.4. Các biến số nghiên cứu	31
2.2.5. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu vi sinh	31
2.2.5.1. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật.....	31
2.2.5.2. Kỹ thuật phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật.....	33

2.2.6. Căn cứ đánh giá.....	37
2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu.....	39
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	40
3.1. THỰC TRẠNG Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI DUNG TÍCH 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA NĂM 2022.....	40
3.1.1. Tỷ lệ nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.....	40
3.1.2. Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu về vi sinh theo địa điểm thu mẫu.....	40
3.1.3. Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu theo các chỉ tiêu vi sinh.....	43
3.1.4. Phân bố số lượng vi khuẩn của các loài được phát hiện trong nước uống đóng chai (19-21 lít).....	46
3.2. PHÂN TÍCH MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI DUNG TÍCH 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA NĂM 2022	48
3.2.1. Yếu tố nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai.....	49
3.2.1.1. <i>Tình trạng ô nhiễm vi sinh theo nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai tại Khánh Hòa năm 2022.....</i>	49
3.2.1.2. <i>Tình trạng ô nhiễm vi sinh nước nguồn tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai theo địa điểm lấy mẫu.....</i>	50
3.2.1.3. <i>Tình trạng ô nhiễm vi sinh nước nguồn theo nguyên nhân.....</i>	51
3.2.1.4. <i>Mối liên quan giữa nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm.....</i>	52
3.2.2. Yếu tố vệ sinh bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng	54
3.2.2.1. <i>Tình trạng nhiễm vi sinh bề mặt vỏ bình tái sử dụng.....</i>	54
3.2.2.2. <i>Tỷ lệ nhiễm vi sinh vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai ở Khánh Hòa năm 2022.....</i>	56

3.2.2.3. <i>Mối liên quan giữa phương pháp vệ sinh vỏ bình và chất lượng vỏ bình sau súc rửa</i>	58
3.2.2.4 <i>Mối liên quan giữa vệ sinh vỏ bình và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm</i>	59
3.2.3. <i>Yếu tố vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm</i>	61
3.2.3.1. <i>Thực trạng nhiễm vi sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm</i>	61
3.2.3.2. <i>Mối liên quan giữa vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai</i>	62
3.2.4. <i>Yếu tố vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm</i>	63
3.2.4.1. <i>Thực trạng nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm</i>	63
3.2.4.2. <i>Mối liên quan giữa ô nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm</i>	63
3.3. ĐỀ XUẤT MỘT SỐ BIỆN PHÁP HẠN CHẾ Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC LOẠI 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA	66
3.3.1. <i>Đối với quy trình súc rửa vỏ bình nước tái sử dụng</i>	66
3.3.2. <i>Đề xuất một số biện pháp khác</i>	67
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	69
KẾT LUẬN	69
KIẾN NGHỊ	70
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	71
TÀI LIỆU THAM KHẢO	72

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống)
ATP	Adenosine triphosphate (Phân tử mang năng lượng)
BYT	Bộ Y tế
CFU	Colony Forming Unit (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)
EPA	Environmental Protection Agency (Cơ quan Bảo vệ Môi trường Mỹ)
HPC	Heterotrophic Plate Counts (Vi sinh vật dị dưỡng)
NUĐC	Nước uống đóng chai
QCVN	Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia
RLU	Relative Light Unit (Đơn vị ánh sáng)
SMEWW	Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (Các phương pháp chuẩn xét nghiệm nước và nước thải)
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
UV	Ultra violet (Tia tử ngoại)
VSV	Vi sinh vật
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1 Tỷ lệ tăng trưởng kép hàng năm và khối lượng tiêu thụ nước đóng chai của 10 quốc gia dẫn đầu trên thế giới giai đoạn 2015-2020. ..	12
Bảng 2.1 Các chỉ tiêu và phương pháp phân tích	31
Bảng 2.2 Tóm tắt các bước chọn lọc và khẳng định <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Bảng 2.3 Quy định kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh trong nước sinh hoạt	37
Bảng 2.4 Quy định kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh trong NUĐC.	38
Bảng 3.1 Tỷ lệ nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai 19-21 lít	40
Bảng 3.2 Tỷ lệ mẫu NUĐC 19-21 lít không đạt yêu cầu vi sinh theo địa điểm thu mẫu	42
Bảng 3.3 Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu theo các chỉ tiêu vi sinh (n=93)	43
Bảng 3.4 Phân bố số lượng <i>P. aeruginosa</i> , coliform và HPC trong nước uống đóng chai nhiễm khuẩn	46
Bảng 3.5 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu vi sinh theo nguồn nước sử dụng	49
Bảng 3.6 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu vi sinh theo nguyên nhân	51
Bảng 3.7 Tỷ lệ mẫu NUĐC thành phẩm không đạt theo nguồn nước	53
Bảng 3.8 Mối liên quan giữa nguồn nước sản xuất và chất lượng nước uống đóng chai (n=93)	53
Bảng 3.9 Phân loại giá trị ATP mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa năm 2022	54
Bảng 3.10 Tỷ lệ nhiễm vi sinh vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa năm 2022	57

Bảng 3.11	Mối liên quan giữa phương pháp súc rửa vỏ bình và chất lượng vỏ bình sau khi súc rửa (n=93)	58
Bảng 3.12	Mối liên quan giữa vệ sinh vỏ bình và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm (n=93)	59
Bảng 3.13	Mối tương quan giữa nước uống đóng chai thành phẩm và vỏ bình sau công đoạn súc rửa theo chỉ tiêu coliform	59
Bảng 3.14	Mối tương quan giữa nước uống đóng chai thành phẩm và vỏ bình sau công đoạn súc rửa theo chỉ tiêu <i>P. aeruginosa</i>	60
Bảng 3.15	Tỷ lệ nhiễm vi sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm.....	61
Bảng 3.16	Mối liên quan giữa vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai (n=93).....	62
Bảng 3.17	Tỷ lệ nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm	63
Bảng 3.18	Mối liên quan giữa ô nhiễm vi sinh không khí và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm (n=93).....	64

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1 Quy trình sản xuất nước uống đóng chai/bình cơ bản.	18
Hình 2.1 Quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu.....	30
Hình 3.1 Vị trí các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.....	41
Hình 3.2 Hình ảnh khuẩn lạc các loài được phân lập trong NUĐC thành phẩm	45
Hình 3.3 Biểu đồ phân bố số lượng HPC, coliform và <i>P. aeruginosa</i> trong các mẫu NUĐC nhiễm khuẩn	47
Hình 3.4 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu về vi sinh theo địa điểm lấy mẫu.....	50
Hình 3.5 Phân bố số lượng HPC, coliform và <i>P. aeruginosa</i> trong các mẫu nước nguồn nhiễm khuẩn.....	52
Hình 3.6 Chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng trong vỏ bình trước và sau giai đoạn súc rửa	55
Hình 3.7 Tương quan giữa chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng trong vỏ bình trước và sau giai đoạn súc rửa.....	56

MỞ ĐẦU

Nước đóng vai trò rất quan trọng đối với mọi cơ thể sinh vật. Với con người, nước giúp cơ thể điều hòa thân nhiệt, duy trì chức năng não bộ, hỗ trợ tiêu hóa, bài tiết... Nước sạch giúp cải thiện cuộc sống, góp phần quan trọng trong việc hạn chế ngộ độc, dịch bệnh, đặc biệt là các bệnh về đường tiêu hóa như tiêu chảy, thương hàn, tả, lỵ ... Tuy nhiên, nhiều thông báo của Liên hợp quốc và Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cho thấy nguồn nước sạch trên thế giới ngày càng bị ô nhiễm và khan hiếm. Trước thực trạng trên, nước uống đóng chai (NUĐC) chính là sự lựa chọn phổ biến hiện nay của người tiêu dùng. Đây là sản phẩm rất tiện lợi, được sử dụng để uống trực tiếp, do đó nhu cầu sử dụng đối với sản phẩm này ngày càng gia tăng ở nhiều quốc gia trên thế giới. Tại Việt Nam, sản phẩm NUĐC cũng ngày càng được sử dụng phổ biến, đặc biệt ở các khu vực đông dân cư và những nơi đang phải đối mặt với các vấn đề ô nhiễm nước nghiêm trọng như: Hà Nội, Tp. Hồ Chí Minh ... Tại Khánh Hòa, sản phẩm NUĐC cũng được tiêu dùng rộng rãi trong cộng đồng, từ các nhà máy, xí nghiệp, trường học đến các văn phòng công sở và cả các hộ gia đình.

Bên cạnh sự gia tăng về nhu cầu sử dụng, chất lượng của sản phẩm này cũng là vấn đề được nhiều người tiêu dùng quan tâm. Tại Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu cho thấy thực trạng ô nhiễm VSV trong NUĐC khá phổ biến tại nhiều địa phương như Hà Nội, Hưng Yên, Quảng Trị, Ninh Thuận, Bến Tre, Đồng Tháp... Tại Khánh Hòa cũng đã có các thông báo phát hiện các loại vi khuẩn có khả năng gây bệnh như *Pseudomonas aeruginosa*, coliform, *Escherichia coli* ... trong sản phẩm này với tỷ lệ khá cao. Tuy nhiên đến thời điểm hiện tại, tại Việt Nam nói chung và Khánh Hòa nói riêng, có rất ít nghiên cứu phân tích sâu về thực trạng kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất NUĐC cũng như phân tích tổng thể các yếu tố có khả năng ảnh hưởng đến chất lượng NUĐC về mặt vi sinh. Đặc biệt, yếu tố vỏ bình tái sử dụng của sản phẩm NUĐC (19-21 lít) cũng là yếu tố có nguy cơ cao đối với việc ô nhiễm VSV trong sản phẩm này vì một số vi khuẩn có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), giúp chúng kết dính chặt chẽ với bề mặt tiếp xúc bên trong vỏ bình. Do đó, việc đánh giá thực trạng kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất NUĐC cũng như khảo sát các yếu tố liên quan đến sự ô nhiễm VSV trong sản

phẩm NUĐC để tìm ra nguyên nhân và biện pháp khắc phục là rất cần thiết. Xuất phát từ thực tiễn trên, đề tài: "**Đánh giá thực trạng kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa**" được thực hiện.

- Mục tiêu nghiên cứu:

(1) Đánh giá thực trạng ô nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai sản xuất tại Khánh Hòa.

(2) Xác định một số yếu tố liên quan đến ô nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai sản xuất tại Khánh Hòa.

- Nội dung nghiên cứu:

(1) Thực trạng nhiễm VSV trong NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

(2) Phân tích một số yếu tố liên quan đến ô nhiễm VSV trong NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

(3) Đề xuất một số biện pháp hạn chế ô nhiễm VSV trong NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa.

- Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của đề tài:

+ Ý nghĩa khoa học: Kết quả nghiên cứu cung cấp dữ liệu khoa học về thực trạng ô nhiễm VSV trong NUĐC loại 19-21 lít và các yếu tố liên quan đến ô nhiễm VSV trong sản phẩm này tại các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

+ Ý nghĩa thực tiễn: Kết quả nghiên cứu làm cơ sở cho các nhà quản lý trong việc quản lý, giám sát các sản phẩm NUĐC sản xuất tại Khánh Hòa. Đồng thời đề xuất các biện pháp giúp các cơ sở sản xuất khắc phục thực trạng ô nhiễm vi sinh khá phổ biến hiện nay trong NUĐC, đặc biệt là đối với sản phẩm NUĐC dung tích 19-21 lít.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI

1.1.1. Khái niệm nước uống đóng chai

“Nước uống đóng chai là các sản phẩm nước đóng chai được sử dụng để uống trực tiếp, có thể có chứa khoáng chất và carbon dioxide (CO₂) tự nhiên hoặc bổ sung nhưng không phải là nước khoáng thiên nhiên đóng chai và không chứa đường, các chất tạo ngọt, các chất tạo hương hoặc bất kỳ chất nào khác” [1].

1.1.2. Tình hình sử dụng nước uống đóng chai trong và ngoài nước

1.1.2.1. Trên thế giới

Nước là nhu cầu thiết yếu trong cuộc sống, mỗi người trưởng thành phải uống ít nhất 02 lít nước mỗi ngày để đảm bảo cho quá trình trao đổi chất trong cơ thể được diễn ra thuận lợi. Tuy nhiên, một báo cáo toàn cầu về tài nguyên nước do Liên hợp quốc công bố năm 2019 cho thấy có hơn 02 tỷ người trên thế giới không được tiếp cận với nước sạch và có khoảng 04 tỷ người phải đối diện với tình trạng khan hiếm nước nghiêm trọng ít nhất là một tháng trong năm [2]. Bên cạnh việc các nguồn nước sạch trên thế giới ngày càng khan hiếm, tình trạng ô nhiễm nguồn nước cũng ngày càng gia tăng [3]. Do đó nhằm đảm bảo an toàn cho sức khỏe, nhiều người tiêu dùng đã lựa chọn sử dụng sản phẩm NUĐC, dẫn đến thị trường NUĐC có sự gia tăng đáng kể ở nhiều quốc gia trên thế giới trong những năm gần đây [4]. Thị trường nước đóng chai phát triển đầu tiên là ở khu vực Tây Âu, sau đó lan rộng sang các khu vực khác trên toàn cầu. Đến năm 2012, châu Á lần đầu tiên vươn lên dẫn đầu thế giới về khối lượng tiêu thụ sản phẩm này. Từ năm 2013 đến nay, Trung Quốc là quốc gia luôn dẫn đầu thế giới về lượng tiêu thụ nước đóng chai [4]. Năm 2020, thế giới đã đạt mức tiêu thụ hơn 100 tỷ gallon (trong đó Trung Quốc chiếm 1/4 khối lượng), bình quân đầu người 45 gallon/năm. Ngoài Trung Quốc, Indonesia, Ấn Độ và Thái Lan cũng là các quốc gia có mức tiêu thụ nước đóng chai khá cao ở khu vực châu Á và được xếp trong nhóm 10 thị trường nước đóng chai hàng đầu thế giới [5]. Đặc biệt, giai đoạn từ 2015-2020, Ấn Độ là quốc gia có tốc độ tăng

trường cao nhất thế giới, với tỷ lệ tăng trưởng kép hàng năm (Compound Annual Growth rate - CAGR) là 6,9%, thứ hai là Trung Quốc 6,3% và thứ ba là Hoa Kỳ 5,4% (Bảng 1.1) [5].

Bảng 1.1 Tỷ lệ tăng trưởng kép hàng năm và khối lượng tiêu thụ nước đóng chai của 10 quốc gia dẫn đầu trên thế giới giai đoạn 2015-2020.

TT	Quốc gia	Khối lượng tiêu thụ (Triệu gallon)		Tỷ lệ tăng trưởng kép hàng năm (CAGR)
		2015	2020	
1.	Trung Quốc	20.506	27.780	6,3%
2.	Hoa kỳ	11.523	14.957	5,4%
3.	Mexico	8.081	9.959	4,3%
4.	Indonexia	6.815	8.514	4,6%
5.	Braxin	5.357	6.456	3,8%
6.	Ấn Độ	4.596	6.416	6,9%
7.	Thái Lan	3.624	3.959	1,8%
8.	Ý	3.302	3.475	1,0%
9.	Đức	2.970	2.747	-1,5%
10.	Pháp	2.079	2.238	1,5%
Tổng cộng (10 quốc gia)		68.856	86.503	4,7%
Các quốc gia khác		19.419	21.789	2,3%
Tổng cộng (trên thế giới)		88.276	108.292	4,2%

Nguồn: Global bottled water market 2020 [5].

1.1.2.2. Tại Việt Nam

Tại Việt Nam, nhu cầu sử dụng NUĐC cũng ngày càng gia tăng, đặc biệt ở các khu vực đông dân cư và những nơi đang phải đối mặt với các vấn đề ô nhiễm nước nghiêm trọng như: Hà Nội, Tp. Hồ Chí Minh ... [6]. Theo nghiên cứu gần đây của Công ty Tư vấn và Nghiên cứu thị trường toàn cầu Techsci Research, doanh thu nước đóng chai ở nước ta đạt 482,53 triệu USD vào năm 2019 và dự báo tốc độ tăng trưởng kép khoảng 13,49%, đạt 986,36 triệu USD vào năm 2025 [6]. Hiện nay, Thành phố Hồ Chí Minh là thị trường phát triển NUĐC mạnh nhất ở khu vực phía Nam (trên 500 cơ sở). Tại khu vực phía Bắc, lượng tiêu thụ NUĐC cao nhất là ở Hà Nội, với 380 cơ sở hoạt động vào năm 2021.

Tại Khánh Hòa, theo số liệu của Chi cục An toàn vệ sinh thực phẩm tỉnh cung cấp, số lượng cơ sở sản xuất NUĐC trên toàn tỉnh có sự gia tăng liên tục trong những năm gần đây, từ 53 cơ sở vào năm 2012 đã tăng lên 63 cơ sở vào năm 2016 và đạt xấp xỉ 100 cơ sở vào năm 2019 [7]. Đến năm 2022, mặc dù chịu ảnh hưởng lớn của dịch Covid-19, tuy nhiên số lượng cơ sở sản xuất NUĐC vẫn không giảm so với năm 2019, với 93 cơ sở đang hoạt động trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa. Qua đó cho thấy xu hướng sử dụng NUĐC ở Khánh Hòa cũng ngày càng gia tăng đáng kể.

1.1.3. Tình hình kiểm soát chất lượng nước uống đóng chai

Cùng với sự gia tăng trong việc tiêu thụ NUĐC, chất lượng của sản phẩm này cũng trở thành mối quan tâm lớn của người tiêu dùng. Việc đánh giá chất lượng NUĐC về mặt vi sinh nhằm bảo vệ người tiêu dùng tránh khỏi bệnh tật do tiêu thụ nước có chứa mầm bệnh đã được thực hiện trong nhiều năm qua. Tuy nhiên đến nay vấn đề này vẫn đang là một thách thức đối với các cơ quan chức năng vì có nhiều trường hợp nguồn nước dùng để phục vụ cho người tiêu dùng vẫn tồn tại số lượng lớn VSV gây ô nhiễm, gây mất an toàn vệ sinh thực phẩm cho người sử dụng [8],[7],[9]. Trước thực trạng trên đòi hỏi các cơ quan chức năng phải tiêu chuẩn hóa nghiêm ngặt cũng như quản lý, giám sát chặt chẽ đối với sản phẩm NUĐC nhằm hạn chế các vụ ngộ độc, dịch bệnh cho người tiêu dùng.

Trên thế giới, WHO đã xây dựng "Hướng dẫn về chất lượng nước uống" (Guidelines for Drinking - water Quality) nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc xây dựng và phát triển các tiêu chuẩn và quy định về chất lượng nước uống cho các quốc gia trên toàn cầu. Hướng dẫn này đã được nhiều quốc gia sử dụng và cập nhật thường xuyên để đáp ứng phù hợp với các yêu cầu thực tiễn trong tình hình mới [10].

Tại Việt Nam, Bộ Y tế cũng đã xây dựng các bộ quy chuẩn để kiểm soát chất lượng nước uống, trong đó có Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 6-1:2010/BYT đối với nước khoáng thiên nhiên và NUĐC, nhằm đưa ra các yêu cầu đối với các chỉ tiêu vi sinh cũng như hóa lý trong sản phẩm này [1]. Tuy nhiên với các lý do khác nhau, nhiều cơ sở sản xuất NUĐC đã không chấp hành đúng theo quy định của các tiêu chuẩn quốc gia và quốc tế dẫn đến tình trạng nhiễm khuẩn trong NUĐC cũng khá phổ biến và điều đó đã được minh chứng qua các đợt kiểm tra, giám sát của các cơ quan quản lý cũng như các kết quả nghiên cứu chất lượng về mặt vi sinh trong NUĐC đã được thực hiện ở nhiều địa phương trong những năm qua.

1.1.4. Tình hình ngộ độc, dịch bệnh do liên quan đến nước uống

Nước là môi trường trung gian gây ra nhiều bệnh nguy hiểm cho con người, ngoài các tác nhân lý hóa, VSV cũng là nguồn lây bệnh phổ biến trong nước uống, gây ra các bệnh về đường tiêu hóa như tiêu chảy, tả, lỵ, thương hàn... [11].

Theo Tổ chức Y tế thế giới, ở các nước đang phát triển hiện có nhiều các ca bệnh và tử vong do liên quan đến nước uống, tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy cao ở trẻ em và trẻ sơ sinh cũng bắt nguồn từ việc sử dụng nước uống không đảm bảo vệ sinh [11]. Theo báo cáo của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC), từ năm 1971 đến 2006, tại Mỹ có 780 vụ dịch liên quan đến việc sử dụng nước uống bị ô nhiễm, gây ra 577.094 ca bệnh, trong đó có 93 trường hợp bị tử vong [12]. Vụ dịch bệnh lớn nhất trong lịch sử Hoa Kỳ xảy ra vào năm 1993 tại Milwaukee, Wisconsin. Nguyên nhân được xác định do nguồn nước ở nhà máy xử lý nước chính tại thành phố này bị nhiễm VSV với nồng độ cao, gây ra đợt bùng phát bệnh tiêu chảy cấp tính lan rộng trong cộng đồng dân cư ở Milwaukee, Wisconsin, với 403.000 trường hợp (25% dân số

của Milwaukee) bị tiêu chảy, mất nước, sốt và nôn ói, trong đó có 69 trường hợp tử vong [13]. Năm 1997, một đợt bùng phát vi khuẩn *Campylobacter jejuni* trong nước đóng chai đã được báo cáo tại Hy Lạp, gây ngộ độc cho 106 binh sĩ của lực lượng Vệ binh Quốc gia Quân đội Minnesota sau một cuộc tập trận tại Hy Lạp vào năm này [14].

Tại Việt Nam cũng đã có nhiều trường hợp ngộ độc nước uống được ghi nhận. Ngày 18/4/2006, 39 học sinh tại trường Tiểu học Quê Xuân - Thanh Xuân - Quận 12 - Tp. HCM bị ngộ độc do sử dụng nước uống bị ô nhiễm. Ngày 15/5/2014 xảy ra vụ ngộ độc nước uống tại Công ty giày Hong Fu Việt Nam ở Thanh Hóa, với hơn 400 công nhân bị ngộ độc với các triệu chứng như đau đầu, chóng mặt, buồn nôn. Hoặc vụ ngộ độc do sử dụng NUĐC không đảm bảo yêu cầu về vi sinh xảy ra tại hội trại tổ chức ở Nhà thiếu nhi tỉnh Khánh Hòa vào tháng 6/2014 (34 ca mắc) [15]. Gần đây là vụ NUĐC thương hiệu Việt Xưa sử dụng tại trường Tiểu học Chu Văn An – Hoàng Mai - Hà Nội được phát hiện nhiễm vi khuẩn *P. aeruginosa* gây xôn xao dư luận vào năm 2018.

Thực trạng trên cho thấy tình hình ngộ độc, dịch bệnh do sử dụng nước uống không đảm bảo vệ sinh xảy ra khá phổ biến trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Để hạn chế vấn đề này đòi hỏi các cơ quan chức năng phải tăng cường kiểm tra, đánh giá chất lượng các nguồn nước phục vụ cho người tiêu dùng, đồng thời thường xuyên thanh tra, kiểm tra các cơ sở sản xuất NUĐC, đảm bảo quy trình sản xuất không vi phạm an toàn vệ sinh thực phẩm, góp phần hạn chế dịch bệnh, nâng cao sức khỏe cho cộng đồng.

1.1.5. Quy trình sản xuất nước uống đóng chai

1.1.5.1. Nguồn nước nguyên liệu

Để sản xuất NUĐC, việc lựa chọn nguồn nước là một trong những bước chuẩn bị quan trọng đầu tiên. Tùy theo quy mô sản xuất mà các cơ sở sản xuất NUĐC có thể sử dụng các nguồn nước khác nhau như nước máy, nước ngầm [16],[7].

- Nước máy: là nước đã được xử lý sơ bộ qua hệ thống xử lý nước của địa phương trước khi được dẫn vào các hộ gia đình và các cơ sở kinh doanh. Đây là nguồn nước được sử dụng để sản xuất NUĐC khá phổ biến vì mức độ ô

nhiễm thấp và chi phí sản xuất không cao. Tuy nhiên hiện nay nhiều địa phương ở nước ta vẫn chưa có được nguồn nước này.

- Nước ngầm: là nước được khai thác từ các tầng nước ngầm dưới đất, trong các không gian rỗng của đất và các khe nứt của đá. Nước ngầm có thể chứa các loại khoáng chất khác nhau (sắt, canxi, mangan, magie, ...) phụ thuộc vào thành phần khoáng hóa và cấu trúc địa tầng mà mạch nước chảy qua. Tuy nhiên nguồn nước này có thể có mức ô nhiễm cao, do đó chi phí sản xuất sẽ tốn kém hơn so với nguồn nước máy [17].

1.1.5.2. Quy trình sản xuất nước uống đóng chai [18],[19]

Quy trình sản xuất NUĐC cơ bản bao gồm các giai đoạn chính như sau:

a. Giai đoạn lọc:

- Lọc thô: giúp loại bỏ tạp chất, các chất lơ lửng trong nước để chống nghẹt màng lọc cho các bước lọc tiếp theo;

- Lọc carbon: Lõi lọc carbon chứa than hoạt tính và carbon, giúp hấp thụ các mùi lạ và các loại hóa chất độc hại có trong nước;

- Lọc cation: Các ion mang điện tích như: Ca^{2+} và Mg^{2+} luôn tồn tại lơ lửng trong nước, khi điều kiện thuận lợi, các ion này kết hợp các ion trái dấu như HCO_3^- tạo thành các kết tủa trắng gây hỏng hóc đồ đạc hoặc gây ảnh hưởng cho sức khỏe con người (tạo sỏi thận). Dựa vào nguyên lý trao đổi ion, lọc cation giúp loại bỏ các ion Ca^{2+} và Mg^{2+} có trong nguồn nước.

- Lọc tinh: giúp loại bỏ tạp chất còn sót lại trong nước, có thể sử dụng màng thẩm thấu ngược (Màng lọc RO - Reverse Osmosis) hoặc màng lọc nano.

+ Màng lọc RO hoạt động trên nguyên lý sử dụng máy bơm cao áp để tăng áp suất và đẩy nước qua màng. Lượng áp suất cần thiết phụ thuộc vào nồng độ muối của nước cấp, nếu nồng độ muối cao thì càng cần nhiều áp suất để vượt qua áp suất thẩm thấu, đẩy các thành phần có trong nước chuyển động mạnh ra ngoài theo đường thải. Trong khi các phân tử nước có thể lọt qua màng lọc với kích thước nhỏ của màng RO (nhờ áp lực dư) thì các tạp chất hoặc vi khuẩn sẽ bị giữ lại trên màng lọc.

+ Màng lọc nano hoạt động dựa trên cơ chế chuyển động của các phân tử nước nhờ áp lực nén của máy cao áp tạo đẩy các tạp chất, kim loại nặng, ion ra đường thải, các phân tử nước đi qua các mắt lọc có kích cỡ 0,001 μm nhờ áp lực dư.

- Sau khi trải qua giai đoạn lọc sẽ thu được nước bán thành phẩm. Nước này được trữ trong bồn kín để chuẩn bị cho các bước lọc tiếp theo.

b. Tiệt khuẩn và lọc tinh

- Nước sau giai đoạn lọc thô vẫn có thể tiếp tục bị nhiễm vi khuẩn từ môi trường xung quanh, do đó nước cần phải tiếp tục trải qua bước tiệt khuẩn bằng tia UV. Thông thường, đèn UV được thiết kế bên trong đường ống dẫn nước chạy qua.

- Lọc tinh: sau khi được tiệt khuẩn bằng tia UV, nước tiếp tục được trải qua bước lọc tinh để loại bỏ vi khuẩn cũng như xác vi khuẩn còn sót lại trong nước.

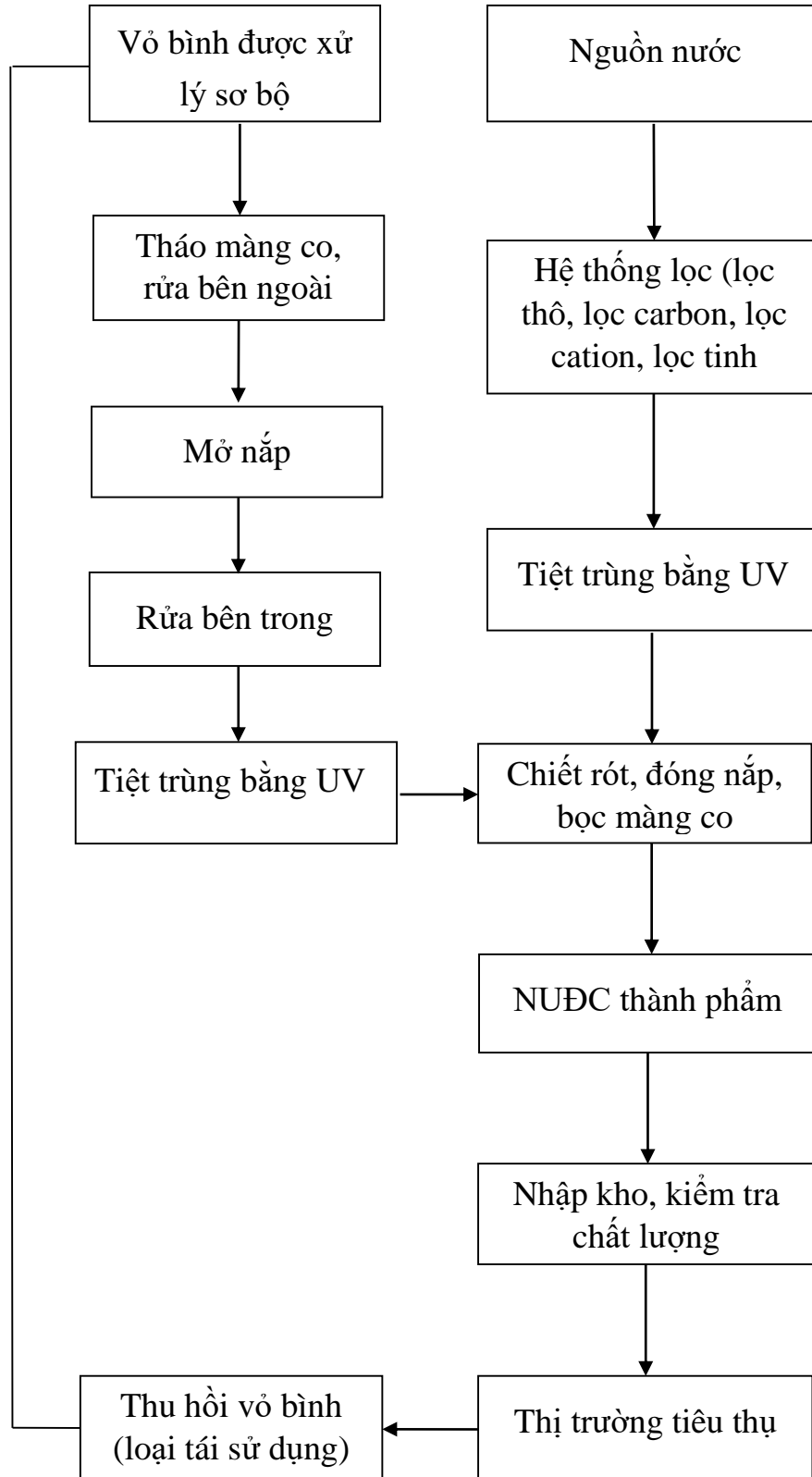
c. Giai đoạn chiết rót, đóng nắp và bảo quản

- Các chai/bình sử dụng để đựng nước thành phẩm phải được vệ sinh sạch sẽ và đảm bảo tiệt khuẩn trước khi đưa vào giai đoạn chiết rót.

- Sau công đoạn lọc tinh cuối cùng, nước sẽ được chiết rót vào vỏ chai/bình đã được rửa sạch và tiệt khuẩn. Sau đó, các chai/bình sẽ được đóng nắp, lồng nhãn và bọc màng co.

- NUĐC thành phẩm được chuyển vào kho tạm lưu trữ. Sau đó, bộ phận kiểm tra chất lượng sẽ tiến hành kiểm tra chất lượng sản phẩm.

- Sau khi kết quả kiểm tra đạt yêu cầu, sản phẩm sẽ được chuyển vào bảo quản trong kho để phân phối ra thị trường.



Hình 1.1 Quy trình sản xuất nước uống đóng chai/bình cơ bản [18],[19].

1.2. THỰC TRẠNG Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI

1.2.1. Đặc điểm một số vi sinh vật thường gặp trong nước uống đóng chai

Tại Việt Nam, căn cứ theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với nước khoáng thiên nhiên và NUĐC (QCVN 6-1:2010/BYT), để đánh giá chất lượng NUĐC về mặt vi sinh cần tiến hành kiểm tra 05 chỉ tiêu vi sinh: Coliform, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococci feacal* và Clostridia. Các loài này được xem là các VSV chỉ thị cho sự ô nhiễm vi sinh trong NUĐC, đồng thời có thể giúp dự đoán được nguồn lây nhiễm thông qua các đặc điểm, sự phân bố đặc trưng riêng của từng loài.

1.2.1.1. Coliform

Coliform là nhóm vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que, không sinh bào tử, sống trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý. Chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên, có nhiều trong ruột người và động vật. Khi nuôi cấy ở nhiệt độ 35-37°C chúng có khả năng lên men đường lactose, sinh axit và hơi [20]. Coliform được phân thành 02 nhóm là coliform và coliform phân (coliform chịu nhiệt), trong đó coliform phân bao gồm 03 loài là *Escherichia coli*, *Klebsiella* và *Enterobacter*. Coliform được xem là chỉ số đánh giá chất lượng về mặt vi sinh của nguồn nước vì sự xuất hiện của chúng cho thấy có nhiều loài vi khuẩn khác cùng tồn tại trong nguồn nước, đó là dấu hiệu cho thấy nguồn nước đã bị ô nhiễm [11].

1.2.1.2. *Escherichia coli*

E. coli thuộc nhóm coliform chịu nhiệt, có thể phân biệt vi khuẩn *E. coli* với các loại coliform khác bằng cách khẳng định khả năng lên men đường lactose, sinh indol từ tryptophan (ở 44° C ± 0,5° C) và màu sắc khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường chọn lọc [21]. Vi khuẩn *E. coli* bình thường sống trong ruột người và động vật máu nóng, chúng tồn tại với số lượng lớn trong phân, vì vậy sự có mặt của *E. coli* trong nguồn nước cho thấy nguồn nước đó có khả năng bị ô nhiễm phân [22]. Phần lớn các loài vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh và đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định sinh lý đường ruột, tuy nhiên, một số chủng như *E. coli* sinh độc tố Shiga (STEC), có thể gây ra bệnh truyền qua thực phẩm. *E. coli* O157:H7 là kiểu huyết thanh STEC quan trọng nhất liên

quan đến sức khỏe cộng đồng. Các chủng này có thể gây tiêu chảy, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não..., biểu hiện mức độ nặng, nhẹ phụ thuộc vào mức độ nhiễm, dòng gây nhiễm và khả năng đáp ứng của cơ thể từng người [23].

1.2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (trực khuẩn mủ xanh) là vi khuẩn Gram âm, hình que, không sinh bào tử, có khả năng di động nhờ tiên mao đơn cực. Chúng phát triển tối ưu ở nhiệt độ 37°C và có khả năng sản sinh ra các loại sắc tố như pyoverdinin (màu vàng lục), piocyanin (màu lam lục) và phát huỳnh quang dưới bức xạ UV (ở bước sóng 360 nm ± 20nm) [22]. Vi khuẩn này sống phổ biến trong môi trường đất, nước và ngay cả các môi trường có dinh dưỡng thấp như nước cất. Đặc biệt, chúng có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) với thành phần cấu tạo chủ yếu là các polysaccharide, DNA ngoại bào (extracellular DNA) và chuỗi polypeptid liên kết với nhau tạo thành cấu trúc màng vững chắc giúp cho loài vi khuẩn này có thể chống lại các yếu tố bất lợi cũng như tồn tại được trong môi trường sống khắc nghiệt [24]. Ngoài ra đây cũng là loài vi khuẩn kháng thuốc phổ biến và gây bệnh cơ hội trên người, nhất là đối với người già, trẻ em và những người có hệ miễn dịch bị suy giảm, gây ra hàng loạt các bệnh nhiễm trùng nguy hiểm như: viêm tủy xương, viêm phổi, nhiễm trùng đường tiết niệu, viêm nang lông và là tác nhân hàng đầu gây nhiễm trùng máu...[11].

1.2.1.4. *Streptococci feacal*

Streptococci feacal (liên cầu khuẩn) có nguồn gốc từ phân, là vi khuẩn Gram dương, tế bào có dạng hình cầu hay hình oval kéo dài, không di động, không sinh bào tử, hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, phát triển tối ưu ở nhiệt độ 37°C. Liên cầu phân tồn tại nhiều trong phân động vật tuy nhiên số lượng ít hơn so với coliform. Ngoài ra chúng có thể được tìm thấy trong ruột người và động vật, do đó sự hiện diện của chúng cũng được xem là một chỉ số ô nhiễm phân [22]. Trên môi trường Slanetz and Bartley, các khuẩn lạc *Streptococci feacal* giả định có màu nâu đỏ hoặc màu hồng do vi khuẩn khử hợp chất 2,4,5-triphenyltetrazolium clorua thành formazan (thuốc nhuộm màu đỏ). Các khuẩn lạc này được khẳng định trên môi trường thạch mật aesculin azid, với phản ứng

điền hình là khuẩn lạc được bao quanh bởi quầng màu đen hoặc màu nâu do thủy phân aesculin trong môi trường [25].

1.2.1.5. Bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite (*Clostridia*)

Clostridia là một nhóm vi khuẩn kỵ khí, Gram dương, có khả năng hình thành bào tử. Hầu hết các loài *Clostridia* không phát triển trong điều kiện hiếu khí, tuy nhiên bào tử của chúng có thể tồn tại thời gian dài trong điều kiện hiếu khí. Chúng phát triển và tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau như đất, trầm tích, thực vật mục nát, phân hữu cơ và đường ruột động vật [26].

Clostridia có thể lên men nhiều loại hợp chất hữu cơ tạo ra sản phẩm cuối cùng như axit butyric, axit axetic, butanol, acetone và một lượng lớn khí CO₂ và H₂. *Clostridia* cũng sản xuất nhiều loại enzyme ngoại bào, giúp phân giải các phân tử sinh học như protein, lipid, collagen, cellulose... góp phần quan trọng trong quá trình trao đổi chất trong hệ sinh thái. Một số ít loài *Clostridia* gây bệnh cho người như: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* và *Clostridium botulinum*. Các loài này đều có độc tính mạnh, gây ra các bệnh nguy hiểm như uốn ván (do *Clostridium tetani*), tiêu chảy (do *Clostridium difficile*), hoại thư sinh hơi (do *Clostridium perfringens*) và gây ngộ độc thực phẩm (do *Clostridium botulinum*) [26].

1.2.1.6. Tổng số vi sinh vật dị dưỡng

Tổng số vi sinh vật dị dưỡng (Heterotrophic Plate Count-HPC) là một trong những thông số đầu tiên được sử dụng để giám sát ngưỡng VSV trong nước uống. Sau công trình của Koch vào cuối những năm 1800, HPC được sử dụng để giám sát mức độ an toàn của nước uống thành phẩm. Tuy nhiên, trong thời gian gần đây, HPC đã trở thành một chỉ số về chất lượng nước nói chung trong các hệ thống cấp nước [11]. Các VSV dị dưỡng luôn tồn tại trong nước và màng sinh học, chúng thường hiện diện với số lượng lớn hơn vi khuẩn coliform trong hệ thống cấp và trữ nước. Vi sinh vật dị dưỡng đã được thông báo hình thành màng sinh học khá phổ biến trong các hệ thống xử lý nước, từ đó có thể dẫn đến ô nhiễm các loài vi khuẩn gây bệnh trong nước uống [27]. Nếu có sự gia tăng đột ngột về chỉ số HPC trong hệ thống cấp và trữ nước so với các thông số HPC đã kiểm tra trước đó thì cần phải tiến hành kiểm tra, đánh giá, tìm ra nguyên nhân để khắc phục kịp thời nhằm hạn chế sự gia tăng nhiễm

khuẩn trong hệ thống sản xuất. Trên thế giới, một số quốc gia như Mỹ sử dụng ngưỡng HPC tối đa không bắt buộc trong nước uống là 500 CFU/mL [27],[28]. Hiện tại ở nước ta không quy định kiểm tra đối với chỉ tiêu HPC trong NUĐC. Tuy nhiên sự hiện diện với số lượng lớn VSV dị dưỡng trong NUĐC cũng cho thấy hệ thống sản xuất có vấn đề. Do đó, việc đánh giá và giám sát thường xuyên chỉ tiêu HPC trong NUĐC là thật sự cần thiết để các cơ sở sản xuất có giải pháp xử lý kịp thời, giúp hạn chế việc nhiễm khuẩn trong hệ thống sản xuất NUĐC.

1.2.2. Các nghiên cứu về thực trạng ô nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai

Hiện nay, sản phẩm NUĐC đã trở thành loại hàng hóa thiết yếu được sử dụng phổ biến trong cộng đồng. Đó đó trên thị trường ngày càng có rất nhiều sản phẩm NUĐC được sản xuất và lưu hành. Tuy nhiên, đã có nhiều thông báo cho thấy các sản phẩm NUĐC cũng thường xuyên được phát hiện nhiễm các vi khuẩn như *P. aeruginosa*, Coliform, *E. coli* ... vượt quá giới hạn mà WHO khuyến cáo, gây ra các vụ ngộ độc ở một số quốc gia trên thế giới [14],[11]. Trước tình hình đó, các nghiên cứu về chất lượng của sản phẩm NUĐC về mặt vi sinh đã được thực hiện ở nhiều nơi trên thế giới cũng như tại Việt Nam.

1.2.2.1. Thực trạng ô nhiễm Pseudomonas aeruginosa trong NUĐC

a. Trên thế giới:

Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *P. aeruginosa* thường được phát hiện với tỷ lệ nhiễm khá cao như nghiên cứu của Merfat và cộng sự (2015) trên 49 mẫu NUĐC thu thập tại các trường học ở Ajman, UAE cho thấy có 38,8% mẫu NUĐC nhiễm loài vi khuẩn này [29]. Đánh giá chất lượng của 120 mẫu NUĐC tại Tehran, Iran năm 2013, Kouchesfahani và cộng sự (2015) đã phát hiện có 36,7% mẫu NUĐC không đạt đối với *P. aeruginosa* [30]. Một khảo sát gần đây của Bikram và cộng sự (2021) trên 100 mẫu NUĐC tại khu vực Kathmandu, Nepal năm 2020 cũng cho thấy có 23% mẫu NUĐC ô nhiễm chỉ tiêu này [31].

b. Tại Việt Nam:

Cũng giống như nhiều quốc gia khác trên thế giới, tình trạng ô nhiễm *P. aeruginosa* trong NUĐC ở nước ta cũng khá phổ biến. Nhiều nghiên cứu đã phát hiện tỷ lệ nhiễm của *P. aeruginosa* thường cao hơn so với các vi khuẩn khác trong sản phẩm NUĐC, đặc biệt là sản phẩm NUĐC (19-21 lít) như nghiên cứu của Phạm Thị Oanh Oanh (2019) tại Hà Nội thông báo có 78% mẫu NUĐC loại 19,5 lít thu thập tại quận Thanh Xuân, Hà Nội không đạt yêu cầu đối với chỉ tiêu này [32]. Nghiên cứu của Đỗ Mạnh Hùng và cộng sự (2016) trên 36 mẫu nước uống đóng bình tại Hưng Yên cũng cho thấy tỷ lệ nhiễm *P. aeruginosa* là 25% [8]. Hoặc thông báo của Trần Mai Thị Huyền Trân (2019) cũng cho thấy có tới 56,4% mẫu nước uống đóng bình sản xuất tại Ninh Thuận năm 2018 nhiễm *P. aeruginosa* [9].

Tại Khánh Hòa, cũng đã có các thông báo cho thấy mức độ ô nhiễm *P. aeruginosa* trong sản phẩm NUĐC khá cao như nghiên cứu của Võ Thị Kim Hạnh (2016) thông báo có 39,68% mẫu NUĐC không đạt yêu cầu đối với loài vi khuẩn này [7]. Khảo sát của Viện Pasteur Nha Trang (2020) cũng phát hiện có tới 62% mẫu NUĐC (19-21 lít) thu thập trên thị trường tỉnh Khánh Hòa năm 2019 không đạt chỉ tiêu *P. aeruginosa* [33].

1.2.2.2. Thực trạng ô nhiễm coliform và Escherichia coli trong NUĐC

a. Trên thế giới:

Nhiều công trình nghiên cứu trước đây cho thấy, trong sản phẩm NUĐC ngoài *P. aeruginosa*, coliform và *E. coli* cũng là các loại vi khuẩn tồn tại phổ biến trong sản phẩm này như nghiên cứu của Kassenga và cộng sự (2009) trên 130 mẫu NUĐC ở Dar es Salaam, Tanzania cho thấy có 26,2% mẫu NUĐC nhiễm coliform tổng số và 3,6% mẫu nhiễm *E. coli* [34]. Khảo sát của Ahmed và cộng sự (2013) trên 46 mẫu NUĐC thu thập tại các cửa hàng bán lẻ ở Dhanmondi, Gulshan, Mirpur, Puran Dhaka và Uttara tại Bangladesh cho thấy có 54,3% mẫu nhiễm coliform tổng số và 41,3% mẫu nhiễm *E. coli* [35]. Hoặc nghiên cứu của Gangil và cộng sự (2013) trên 20 mẫu NUĐC thu thập tại Jaipur, Ấn Độ năm 2012 cũng cho thấy có 45% mẫu không đạt coliform và 20% mẫu không đạt *E. coli* [36].

b. Tại Việt Nam

Trong sản phẩm NUĐC ở nước ta, coliform cũng là loại vi khuẩn thường xuyên được phát hiện, đặc biệt đối với NUĐC loại 19-21 lít, còn vi khuẩn *E. coli* thường có tỷ lệ nhiễm thấp. Đã có nhiều nghiên cứu thông báo về thực trạng ô nhiễm 02 chỉ tiêu này trong NUĐC ở một số địa phương như nghiên cứu của Cao Thanh Diễm Thúy và cộng sự (2016) tại Bến Tre phát hiện có 18,2% mẫu NUĐC nhiễm coliform và 3% mẫu nhiễm *E. coli* [16]. Thông báo của Trần Mai Thị Huyền Trân và cộng sự (2019) tại Ninh Thuận cũng cho thấy có 15,4% mẫu NUĐC (19-21 lít) không đạt chỉ tiêu coliform và 2,6% không đạt chỉ tiêu *E. coli* [9]. Hoặc nghiên cứu của Nguyễn Vũ Thuận và cộng sự (2019) cũng cho thấy NUĐC sản xuất tại khu vực Tây Nguyên năm 2018 nhiễm coliform và *E. coli* với tỷ lệ lần lượt là 11,8% và 4,9% [37].

Tại Khánh Hòa, các nghiên cứu gần đây cũng phát hiện 02 loại vi khuẩn này trong sản phẩm NUĐC như nghiên cứu của Võ Thị Kim Hạnh và cộng sự (2016) cho thấy có 15,87% mẫu NUĐC nhiễm coliform và 3,17% nhiễm *E. coli* [7]. Hoặc thông báo của Viện Pasteur Nha Trang (2020) cũng cho thấy tỷ lệ nhiễm coliform và *E. coli* trong sản phẩm NUĐC (19-21 lít) lần lượt là 13,5% và 2% [33].

1.2.2.3. Thực trạng ô nhiễm *Streptococci faecal* và *Clostridia* trong NUĐC

Trên thế giới cũng như tại Việt Nam, *S. faecal* và *Clostridia* là 02 loại vi khuẩn ít được phát hiện trong sản phẩm NUĐC. Đa số các kết quả phân tích chủ yếu phát hiện *P. aeruginosa*, coliform và *E. coli*. Chỉ một số ít nghiên cứu ở nước ta đã phát hiện các loại vi khuẩn này với tỷ lệ nhiễm thấp như nghiên cứu của Nguyễn Vũ Thuận và cộng sự (2019) tại khu vực Tây Nguyên thông báo có 4,6 % mẫu NUĐC nhiễm *Clostridia* [37]. Tại Khánh Hòa, khảo sát của Nguyễn Duy Long và cộng sự (2014) phát hiện có 3,8% mẫu nhiễm *S. faecal* và 1,9% nhiễm *Clostridia* trong sản phẩm NUĐC [38]. Thông báo của Võ Thị Kim Hạnh (2016) phát hiện 11,11% mẫu NUĐC nhiễm *Streptococcus* phân 11,11% [7].

Qua các kết quả nghiên cứu trên cho thấy thực trạng ô nhiễm VSV trong sản phẩm NUĐC ở nước ta nói chung và Khánh Hòa nói riêng khá phổ biến, đặc biệt đối với sự ô nhiễm 02 loại vi khuẩn *P. aeruginosa* và coliform. Để tìm

hiều nguyên nhân gây ra tình trạng trên, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá thực trạng ô nhiễm VSV trong NUĐC sản xuất tại Khánh Hòa và các yếu tố có khả năng tác động gây ra sự ô nhiễm này, từ đó có cơ sở để đề xuất các biện pháp phù hợp giúp các cơ sở sản xuất khắc phục thực trạng nhiễm khuẩn khá phổ biến hiện nay trong sản phẩm NUĐC sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

Tại Khánh Hòa, trước đây cũng đã có các nghiên cứu khảo sát về điều kiện an toàn thực phẩm tại các cơ sở sản xuất NUĐC, tuy nhiên để đánh giá tình hình kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất thì cần phải tìm hiểu, đánh giá thêm một số yếu tố liên quan có khả năng gây nhiễm khuẩn trong NUĐC như: nguồn nước nguyên liệu; vòi chiết rót nước thành phẩm; không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm; đặc biệt là quy trình súc rửa, khử nhiễm vỏ bình tái sử dụng. Bởi vì một số vi khuẩn có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), đây là một lớp chất nền bao gồm các VSV sống và tế bào VSV chết gắn kết chặt chẽ với nhau trong lớp chất ngoại bào cao phân tử (gồm DNA, protein, polysaccharide ngoại bào) giúp tế bào vi khuẩn kết dính chặt chẽ với bề mặt tiếp xúc [39],[40]. Do đó, nếu quy trình vệ sinh, khử nhiễm vỏ bình không đảm bảo thì rất khó loại bỏ hết vi khuẩn bám dính bên trong vỏ bình, và cứ thế chúng tiếp tục tồn tại, phát triển trong những bình nước chuyển đến tay người tiêu dùng. Vì vậy cần kết hợp đánh giá tổng thể các yếu tố có khả năng ảnh hưởng đến chất lượng NUĐC đã nêu trên.

Trong nghiên cứu này, ngoài các chỉ tiêu được quy định theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước khoáng thiên nhiên và nước uống đóng chai (QCVN 6-1:2010/BYT), chỉ tiêu VSV dị dưỡng (HPC) cũng được đưa vào phân tích để đánh giá mức độ nhiễm khuẩn tổng thể đối với sản phẩm này. Bên cạnh đó, chỉ tiêu ATP (vệ sinh bề mặt hoặc độ sạch bề mặt) cũng được đưa vào phân tích để đánh giá vệ sinh bề mặt tại vòi chiết rót nước thành phẩm và bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng. Trên cơ sở xác định các yếu tố liên quan có khả năng gây ô nhiễm VSV trong NUĐC loại 19-21 lít, nghiên cứu sẽ đề xuất các biện pháp phù hợp nhằm hạn chế thực trạng nhiễm khuẩn trong sản phẩm này, góp phần đảm bảo an toàn thực phẩm đối với sản phẩm NUĐC sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu NUĐC dung tích 19-21 lít;
- Mẫu nước nguồn đầu vào;
- Mẫu vỏ bình tái sử dụng;
- Mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm;
- Mẫu không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm.

2.1.2. Môi trường, hóa chất, chủng chuẩn

2.1.2.1. Đối với chỉ tiêu Coliform và *Escherichia coli*

- Thạch Chromogenic Coliform Agar (CCA)
- Thạch dinh dưỡng (Nutrient agar)
- Test oxidase
- Chủng *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

2.1.2.2. Đối với chỉ tiêu *Pseudomonas aeruginosa*

- Thạch *Pseudomonas* CN agar
- Thạch dinh dưỡng (Nutrient agar)
- Thạch King's B agar
- Test oxidase
- Canh thang acetamide
- Thuốc thử Nessler
- Chủng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.1.2.3. Đối với chỉ tiêu *Streptococci faecal*

- Thạch Slanetz & Barley
- Thạch Aesculin azid
- Chủng *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

2.1.2.4. Đối với chỉ tiêu bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite

- Thạch Iron sulfite agar
- Chủng *Clostridium perfringens* ATCC 13124

2.1.2.5. Đối với chỉ tiêu Heterotrophic Plate Count

- Thạch Plate count agar (PCA)
- Thạch phủ (agar-agar)
- Dung dịch pha loãng Buffered Peptone Water (BPW)

2.1.2.6. Đối với chỉ số ATP

Sử dụng que thử ATP bề mặt (nhãn hiệu 3M™ Clean-Trace™ ATP surface test, hãng 3M, Mỹ).

2.1.3 Thiết bị, dụng cụ

- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Buồng đọc UV có bước sóng 365 nm
- Bếp cách thủy có khả năng duy trì nhiệt độ ở $46 \pm 1^\circ\text{C}$
- Tủ ấm có khả năng duy trì nhiệt độ ở $30 \pm 1^\circ\text{C}$
- Tủ ấm có khả năng duy trì nhiệt độ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Tủ ấm có khả năng duy trì nhiệt độ ở $44 \pm 1^\circ\text{C}$
- Tủ ấm có khả năng duy trì nhiệt độ ở $46 \pm 1^\circ\text{C}$
- Thiết bị 3M Clean-Trace Luminometer (Hãng 3M, Mỹ) đo chỉ số ATP
- Bộ phễu lọc nước
- Màng lọc vi sinh (kích thước lỗ màng 0,2 μm và 0,45 μm)
- Bình tam giác/duran/bình cầu dung tích 500 mL, ống đong, que cấy
- Ống nghiệm, đĩa petri đường kính 90 mm và 60 mm, pipet 1 mL.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu nghiên cứu

2.2.2.1 Cỡ mẫu

Cỡ mẫu toàn bộ (93 cơ sở sản xuất NUĐC).

Tỉnh Khánh Hòa bao gồm: 2 thành phố (Nha Trang và Cam Ranh), 1 thị xã Ninh Hòa và 6 huyện (Vạn Ninh, Diên Khánh, Cam Lâm, Khánh Sơn, Khánh Vĩnh và Trường Sa).

Căn cứ danh sách các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa do Chi cục An toàn vệ sinh thực phẩm – Sở Y tế tỉnh Khánh Hòa cung cấp, tác giả đã tiến hành liên hệ, xác minh. Kết quả cho thấy, đến thời điểm tháng 12/2021 có 93 cơ sở đang hoạt động trên toàn tỉnh Khánh Hòa.

Để có được dữ liệu nghiên cứu tổng thể về thực trạng kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa, nghiên cứu sử dụng phương pháp chọn mẫu toàn bộ 93 cơ sở tại tất cả 8 huyện/thị/thành phố (ngoại trừ huyện đảo Trường Sa).

2.2.2.2. Phương pháp thu mẫu

Mỗi cơ sở sản xuất NUĐC sẽ được đến khảo sát và thu mẫu một lần đối với tất cả các loại mẫu: NUĐC (19-21 lít); nước nguồn đầu vào; vỏ bình tái sử dụng; mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm và mẫu không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm.

a. Đối với mẫu nước uống đóng chai thành phẩm

Thực hiện theo TCVN 8880:2011 (Chất lượng nước – Lấy mẫu để phân tích vi sinh vật). Tại mỗi cơ sở, chọn ngẫu nhiên một đơn vị mẫu NUĐC loại 19-21 lít còn nguyên bao gói, còn hạn sử dụng trong cùng một lô hàng sản xuất. Một đơn vị mẫu gồm 03 bình (19-21 lít) cùng ngày sản xuất và hạn sử dụng. Các bình NUĐC (19-21 lít) của cùng một đơn vị mẫu sẽ được trộn thành một mẫu đồng nhất trước khi phân tích. Việc chọn 3 bình/đơn vị mẫu nhằm tăng tính đại diện của kết quả phân tích đối với lô sản phẩm NUĐC (19-21 lít) thành phẩm.

b. Đối với mẫu nước nguồn đầu vào

- Thực hiện theo TCVN 8880:2011. Tại mỗi cơ sở sản xuất, sử dụng chai vô trùng lấy 01 đơn vị mẫu nước nguồn đầu vào để sản xuất NUĐC (Mẫu lấy ở nguồn nước trước khi vào hệ thống lọc của quy trình sản xuất). Mỗi đơn vị mẫu gồm 3 chai 1,5 lít. Các chai nước nguồn của cùng 01 đơn vị mẫu sẽ được

trộn thành một mẫu đồng nhất trước khi phân tích. Mẫu được bảo quản lạnh trên đường vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích.

c. Đối với mẫu vỏ bình đựng nước tái sử dụng

Thực hiện theo hướng dẫn tại TCVN 8129:2019 (Hướng dẫn lấy mẫu bề mặt phân tích vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm). Tại mỗi cơ sở sản xuất NUĐC, chọn 01 đơn vị mẫu trước giai đoạn súc rửa và 01 đơn vị mẫu sau giai đoạn súc rửa. Mỗi đơn vị mẫu lấy ngẫu nhiên 03 vỏ bình. Kết quả phân tích là số trung bình từ 3 vỏ bình.

Lấy mẫu phân tích chỉ số ATP: Sử dụng thước dây xác định vị trí bề mặt lấy mẫu bên trong vỏ bình có kích thước 100 cm²/vỏ bình (10 cm x 10 cm). Sử dụng que thử ATP bề mặt (nhãn hiệu 3MTM Clean-TraceTM ATP surface test, hãng 3M, Mỹ) ria quanh vùng diện tích 100 cm² đã xác định trên mỗi vỏ bình, thực hiện trên 03 vỏ bình/đơn vị mẫu. Mẫu được phân tích tại hiện trường. Kết quả đo là số trung bình từ 3 vỏ bình.

Lấy mẫu phân tích VSV: Xác định vị trí bề mặt lấy mẫu bên trong vỏ bình có tổng kích thước khoảng 1000 cm² (sử dụng thước dây chọn vị trí lấy mẫu ở mỗi vỏ bình với kích thước 12 cm x 28 cm = 336 cm²/vỏ bình x 3 vỏ bình = 1008 cm²). Sử dụng que lấy mẫu bọt biển nhãn hiệu 3MTM Sponge-Stick SSL100 (Hãng 3M, Mỹ) để lấy mẫu bề mặt đã chọn. Mẫu được bảo quản lạnh trên đường vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích. Mẫu được pha loãng 10 lần trước khi thực hiện xét nghiệm. Kết quả phân tích được biểu thị trên 100 cm².

d. Đối với mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm

Thực hiện theo hướng dẫn tại TCVN 8129:2019 (Hướng dẫn lấy mẫu bề mặt phân tích vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm), cụ thể như sau:

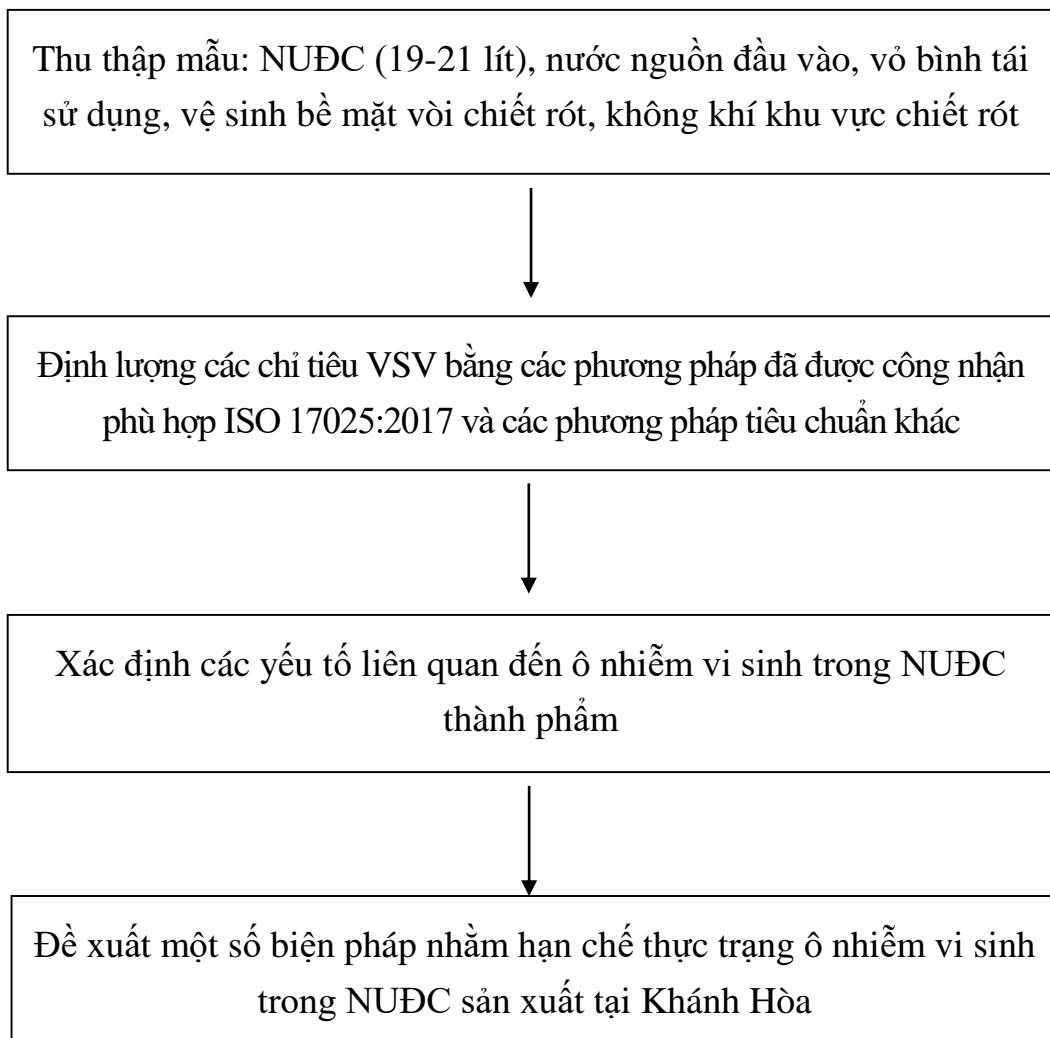
Lấy mẫu phân tích chỉ số ATP: Tại mỗi cơ sở, dùng thước dây đo xác định đường kính bên trong vòi chiết rót và chiều cao từ miệng vòi trở lên để xác định diện tích lấy mẫu với kích thước 10 cm². Sau đó sử dụng que thử ATP bề mặt (nhãn hiệu 3MTM Clean-TraceTM ATP surface test, hãng 3M, Mỹ) ria toàn bộ vùng diện tích đã xác định ở bề mặt bên trong vòi chiết rót. Mẫu được phân tích tại hiện trường. Kết quả phân tích được biểu thị trên 10 cm².

Lấy mẫu phân tích vi sinh: việc xác định diện tích lấy mẫu được thực hiện tương tự như việc lấy mẫu phân tích chỉ số ATP. Sử dụng que lấy mẫu bề mặt (hãng 3M, Mỹ) rìa toàn bộ vùng diện tích đã xác định. Mẫu được bảo quản lạnh trên đường vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích. Kết quả phân tích được biểu thị trên 10 cm².

e. Đối với mẫu không khí

Sử dụng máy hút không khí MAS -100 NT (của Đức) để hút 01 đơn vị thể tích không khí (50 lít) tại khu vực chiết rót nước thành phẩm vào đĩa thạch đặt bên trong máy. Kết quả phân tích được quy đổi và biểu thị trên m³.

2.2.3. Tóm tắt quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu



Hình 2. 1 Quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu

2.2.4. Các biến số nghiên cứu

- Tỷ lệ nhiễm *P. aeruginosa*, coliform, *E. coli*, *S. feacal*, Clostridia trong NUĐC thành phẩm, nước nguồn và vỏ bình tái sử dụng.

- Tỷ lệ nhiễm tổng số VSV dị dưỡng phân lập từ NUĐC thành phẩm, nước nguồn, vỏ bình đựng nước tái sử dụng, bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm.

- Chỉ số ATP bề mặt vỏ bình đựng nước tái sử dụng và bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm.

2.2.5. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu vi sinh

2.2.5.1. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật

Tất cả mẫu thu thập được phân tích tại Viện Pasteur Nha Trang, sử dụng các phương pháp được công nhận phù hợp ISO/IEC 17025:2017 và một số phương pháp tiêu chuẩn khác.

Ngoài các chỉ tiêu vi sinh quy định tại QCVN 6-1:2010/BYT đối với NUĐC và QCVN 01-1:2018/BYT đối với nước nguồn dùng để sản xuất NUĐC, nghiên cứu cũng xét nghiệm mở rộng chỉ tiêu HPC để đánh giá mức độ ô nhiễm VSV tổng thể trong sản phẩm NUĐC và nước nguồn dùng để sản xuất NUĐC. Đồng thời chỉ số ATP (vệ sinh bề mặt hoặc độ sạch bề mặt) cũng được thực hiện để đánh giá độ sạch bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm và bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng.

Bảng 2.1 Các chỉ tiêu và phương pháp phân tích

TT	Loại mẫu	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích
1.	Nước uống đóng chai thành phẩm	HPC	SMEWW 9215.2017
		Coliform	TCVN 6187-1:2019
		<i>Escherichia coli</i>	TCVN 6187-1:2019
		<i>P. aeruginosa</i>	TCVN 8881:2011
		<i>Streptococci feacal</i>	TCVN 6189-2:2009

		Clostridia	TCVN 6191-2:1996
2.	Nước nguồn đầu vào	HPC	SMEWW 9215.2017
		Coliform	TCVN 6187-1:2019
		<i>Escherichia coli</i>	TCVN 6187-1:2019
		<i>P. aeruginosa</i>	TCVN 8881:2011
		<i>Streptococci feacal</i>	TCVN 6189-2:2009
		Clostridia	TCVN 6191-2:1996
3.	Vỏ bình đựng nước tái sử dụng	HPC	TCVN 4884-1:2015
		Coliform	TCVN 6848:2007
		<i>Escherichia coli</i>	TCVN 7924-2:2008
		<i>P. aeruginosa</i>	TCVN 8881:2011
		<i>Streptococci feacal</i>	TCVN 6189-2:2009
		Clostridia	TCVN 6191-2:1996
		ATP	AOAC Performance Tested No.041901
4.	Vệ sinh bề mặt tại vòi chiết rót nước thành phẩm	HPC	TCVN 4884-1:2015
		Coliform	TCVN 6848:2007
		<i>P. aeruginosa</i>	TCVN 8881:2011
		ATP	AOAC Performance Tested No. 041901
5.	Không khí khu vực chiết rót	HPC	QT.VS 10-19 (Ref.QTXN VSV Y học – BYT)

2.2.5.2. Kỹ thuật phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật

a) Kỹ thuật phân lập và định lượng coliform và *E. coli* (theo ISO 9308-1:2014)

- Tiến hành thử nghiệm: Mẫu được lọc trong điều kiện vô trùng (250mL/lần lọc). Gấp màng lọc đặt lên đĩa môi trường CCA đã chuẩn bị, để ngửa đĩa thạch cho màng lọc tiếp xúc hoàn toàn với môi trường nuôi cấy từ 3-5 phút. Sau đó úp đĩa thạch và đem ủ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$.

- Đọc kết quả:

+ Đếm tất cả các khuẩn lạc có màu hồng và màu đỏ (phản ứng dương tính với β -galactosidase), xem như là coliform giả định và không phải là *E. coli*;

+ Đếm tất cả khuẩn lạc có màu xanh đậm và màu tím (phản ứng dương tính với β -galactosidase và β -glucuronidase), xem như là *E. coli* giả định;

+ Thử kháng định: test oxidase đối với các khuẩn lạc hồng/đỏ và xanh đậm/tím (test ít nhất 10 khuẩn lạc, nếu số khuẩn lạc ít hơn thì test tất cả): Các khuẩn lạc màu hồng/đỏ và xanh/tím có kết quả âm tính với oxidase được kháng định là coliform. Các khuẩn lạc màu xanh đậm/tím có kết quả âm tính với oxidase được kháng định là *E. coli*.

- Biểu thị kết quả: Biểu thị kết quả tất cả các khuẩn lạc được kháng định là coliform và *E. coli* (theo ISO 8199:2018).

b) Kỹ thuật phân lập chỉ tiêu coliform (theo TCVN 6848:2007)

- Tiến hành thử nghiệm:

+ Dùng pipet vô trùng hút 1 mL mẫu thử (nồng độ 10^{-1}) cho vào đĩa petri vô trùng (2 đĩa/nồng độ). Lặp lại trình tự này với các nồng độ pha loãng tiếp theo (10^{-2} , 10^{-3} ...). Sử dụng pipet vô trùng mới đối với mỗi nồng độ pha loãng khác nhau;

+ Rót vào mỗi đĩa petri khoảng 15 mL môi trường Violet Red Bile agar (nhiệt độ 45°C - 50°C). Trộn đều dịch cấy với môi trường nuôi cấy bằng cách xoay đĩa petri nhiều lần, đặt các đĩa petri trên bề mặt nằm ngang chờ môi trường đông đặc lại;

+ Sau khi môi trường trong đĩa petri đông đặc hoàn toàn, tiến hành rót khoảng 4 mL Violet Red Bile agar phủ lên trên bề mặt môi trường đã cấy mẫu,

để yên cho đến khi lớp môi trường phủ bên trên đông đặc hoàn toàn, úp ngược các đĩa và đem ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24h-48h.

- Đọc kết quả:

+ Đếm tất cả khuẩn lạc điển hình (có màu đỏ tía) trên môi trường Violet Red Bile agar.

+ Test khẳng định: cấy ít nhất 5 khuẩn lạc điển hình (nếu số lượng khuẩn lạc mọc ít hơn 5 thì tiến hành cấy hết các khuẩn lạc) vào các ống canh thang Brilliant Green Bile, đem ủ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24h-48h. Sau thời gian ủ, kiểm tra các ống Brilliant Green Bile Broth: nếu ống môi trường đục và sinh hơi (lên men đường lactose) thì khẳng định khuẩn lạc đã cấy là coliform, ngược lại các ống môi trường không đục và không sinh hơi (không lên men lactose) thì khuẩn lạc đã cấy không phải coliform.

- Biểu thị kết quả: Biểu thị kết quả tất cả khuẩn lạc được khẳng định là coliform (theo TCVN 6404:2016).

c) Kỹ thuật phân lập và định lượng E. coli (theo TCVN 7924-2:2008)

- Tiến hành thử nghiệm:

+ Dùng pipet vô trùng hút 1 mL mẫu thử (nồng độ 10^{-1}) cho vào đĩa petri vô trùng (2 đĩa/nồng độ). Lặp lại trình tự này với các nồng độ pha loãng tiếp theo (10^{-2} , 10^{-3} ...). Sử dụng pipet vô trùng mới đối với mỗi nồng độ pha loãng khác nhau;

+ Rót khoảng 15 mL môi trường Chromocult TBX agar (nhiệt độ 45°C - 50°C). Trộn đều dịch cấy với môi trường nuôi cấy bằng cách xoay đĩa petri nhiều lần, đặt các đĩa petri trên bề mặt nằm ngang chờ môi trường đông đặc lại, sau đó úp các đĩa và đem ủ ở $44,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24h-48h.

- Đọc kết quả: Khuẩn lạc *E. coli* có màu xanh lam điển hình trên môi trường Chromocult TBX agar.

- Biểu thị kết quả: Biểu thị kết quả tất cả khuẩn lạc có màu xanh lam trên môi trường Chromocult TBX agar (theo TCVN 6404:2016).

d) Kỹ thuật phân lập và định lượng Pseudomonas aeruginosa (theo TCVN 8881:2011)

- Tiến hành thử nghiệm: Mẫu được lọc trong điều kiện vô trùng (250mL/lần lọc). Gấp màng lọc đặt lên đĩa môi trường *Pseudomonas* CN đã chuẩn bị, để ngửa đĩa thạch cho màng lọc tiếp xúc hoàn toàn với môi trường nuôi cấy từ 3-5 phút, sau đó úp đĩa thạch, ủ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}/24-48\text{h}$.

- Đọc kết quả:

+ Đếm tất cả các khuẩn lạc màu xanh lam và phát quang dưới đèn UV ở bước sóng 360 ± 20 nm và khẳng định là vi khuẩn *P. aeruginosa*;

+ Đối với các khuẩn lạc không có màu xanh lam nhưng phát quang dưới tia cực tím ở bước sóng 360 ± 20 nm: đếm số lượng và tiến hành khẳng định với canh thang acetamide;

+ Đối với các khuẩn lạc có màu nâu đỏ và không phát quang: đếm số lượng và tiến hành khẳng định với phản ứng oxidase, canh thang acetamide và môi trường King' B đối với các khuẩn lạc này (Bảng 2.3).

- Biểu thị kết quả: Đếm và biểu thị kết quả tất cả các khuẩn lạc được khẳng định là vi khuẩn *P. aeruginosa* (theo ISO 8199:2018).

Bảng 2.2 Tóm tắt các bước chọn lọc và khẳng định *Pseudomonas aeruginosa*

Mô tả khuẩn lạc trên <i>Pseudomonas</i> CN agar	Thử khả năng sinh NH_3 từ canh thang acetamide	Thử oxidase	Thử phát quang trên King's B	Khẳng định <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Màu xanh lam	NT	NT	NT	Có
Phát quang (không có màu xanh lam)	+	NT	NT	Có
Màu nâu đỏ	+	+	+	Có
Những loại khác	NT	NT	NT	Không
<i>Ghi chú: NT – không cần test</i>				

e) *Kỹ thuật phân lập và định lượng Streptococci faecal*

- Tiến hành thử nghiệm: Mẫu được lọc trong điều kiện vô trùng (250mL/lần lọc). Gấp màng lọc đặt lên đĩa môi trường Slanetz and Bartley agar đã chuẩn bị, để ngửa đĩa thạch cho màng lọc tiếp xúc hoàn toàn với môi trường nuôi cấy từ 3-5 phút, úp ngược đĩa thạch, ủ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}/24-48\text{h}$;

- Đọc kết quả:

+ Các khuẩn lạc màu nâu đỏ hoặc hồng từ trung tâm được xem là khuẩn lạc điển hình.

+ Test khẳng định: Chuyển màng lọc có các khuẩn lạc điển hình sang đĩa thạch mật aesculin-azid, đem ủ ở $44^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}/2\text{h}$. Sau khi ủ, nếu khuẩn lạc chuyển sang màu đen trên môi trường thạch mật aesculin-azid (do khuẩn đường ruột thủy phân aesculin tạo sản phẩm cuối cùng là 6,7- dihydroxycoumarin kết hợp với ion sắt (III) tạo hợp chất màu nâu vàng tới đen, khuếch tán vào môi trường) thì khẳng định là *Streptococci faecal*.

- Biểu thị kết quả: Đếm và biểu thị kết quả tất cả khuẩn lạc khẳng định là *Streptococci faecal* (theo ISO 8199:2018).

g) *Kỹ thuật phân lập và định lượng bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite - Clostridia (theo TCVN 6191-2:1996)*

- Tiến hành thử nghiệm:

+ Đun nóng 50 mL mẫu ở $75^\circ\text{C}/15$ phút để tiêu diệt các vi khuẩn dị dưỡng khác;

+ Mẫu được lọc trong điều kiện vô trùng (50ml/lần lọc). Gấp màng lọc đặt lên đĩa môi trường sắt sulfit agar đã chuẩn bị. Để ngửa đĩa thạch cho màng lọc tiếp xúc hoàn toàn với môi trường nuôi cấy từ 3-5 phút, úp đĩa và đem ủ kỵ khí ở $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/20 \pm 4\text{h}$.

- Đọc kết quả: Đếm tất cả các khuẩn lạc màu đen trên môi trường thạch sắt sulfit.

- *Biểu thị kết quả:* Biểu thị kết quả tất cả các khuẩn lạc có màu đen trên môi trường sắt sulfit (theo ISO 8199:2018).

h. *Kỹ thuật định lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng (HPC)*

- Tiến hành thử nghiệm:

+ Dùng pipet vô trùng hút 1 mL mẫu thử (nồng độ 10^{-1}) cho vào đĩa petri vô trùng (2 đĩa/nồng độ). Lặp lại trình tự này với các nồng độ pha loãng tiếp

theo (10^{-2} , 10^{-3} ...). Sử dụng pipet vô trùng mới đối với mỗi nồng độ pha loãng khác nhau;

+ Rót vào mỗi đĩa petri khoảng 15 mL môi trường thạch PCA (nhiệt độ 45°C - 50°C), trộn đều dịch cấy với môi trường nuôi cấy bằng cách xoay đĩa petri nhiều lần, đặt các đĩa petri trên bề mặt nằm ngang chờ môi trường đông đặc lại;

+ Sau khi môi trường trong đĩa petri đông đặc hoàn toàn, rót khoảng 4 mL thạch (agar-agar) phủ lên trên bề mặt môi trường đã cấy mẫu, để đông đặc như mô tả ở trên. Sau khi lớp môi trường phủ đã đông đặc hoàn toàn, úp đĩa thạch và đem ủ ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $72\text{h} \pm 3\text{h}$.

- Đọc kết quả: Đếm tất cả khuẩn lạc mọc trong đĩa thạch sau khi nuôi cấy.

- Biểu thị kết quả: Biểu thị kết quả tất cả khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch sau khi nuôi cấy (theo TCVN 6404:2016).

2.2.6. Căn cứ đánh giá

2.2.6.1. Đối với nước nguồn dùng để sản xuất nước uống đóng chai

Đối với nguồn nước dùng để sản xuất NUĐC, căn cứ theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước sạch sử dụng cho mục đích sinh hoạt (QCVN 01-1:2018/BYT). Giới hạn các chỉ tiêu vi sinh vật được thể hiện cụ thể trong Bảng 2.4.

Bảng 2.3 Quy định kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh trong nước sinh hoạt [41].

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Giới hạn cho phép
1	<i>Coliform</i>	CFU/100 mL	<3
2	<i>Escherichia coli</i>	CFU/100 mL	<1
3	<i>P. aeruginosa</i>	CFU/100 mL	<1

2.2.6.2. Đối với nước uống đóng chai

Căn cứ theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với nước khoáng thiên nhiên và nước uống đóng chai (QCVN 6-1:2010/BYT) do Bộ Y tế quy định, giới hạn

cho phép đối với các chỉ tiêu vi sinh trong sản phẩm này được thể hiện cụ thể trong Bảng 2.4.

Bảng 2.4 Quy định kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh trong NUĐC [1].

Kiểm tra lần đầu			Kiểm tra lần thứ hai			
Chỉ tiêu	Lượng mẫu	Yêu cầu	Giới hạn tối đa cho phép			
			n	c	m	M
1. <i>E. coli</i> hoặc coliform chịu nhiệt	1 x 250ml	Không phát hiện được trong bất kỳ mẫu nào				
2. Coliform tổng số	1 x 250ml	- Nếu số vi khuẩn (bào tử) ≥ 1 và ≤ 2 thì tiến hành kiểm tra lần thứ hai - Nếu số vi khuẩn (bào tử) > 2 thì loại bỏ (không đạt)	4	1	0	2
3. <i>Streptococci fecal</i>	1 x 250ml		4	1	0	2
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 250ml		4	1	0	2
5. Bào tử vi khuẩn kị khí khử sulfit (Clostridia)	1 x 50ml		4	1	0	2

- Chỉ tiêu HPC: Giới hạn 500 CFU/mL được áp dụng theo khuyến cáo của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Mỹ (EPA - *Environmental Protection Agency* – United States) [42].

2.2.6.3. Đối với vỏ bình tái sử dụng

Ở nước ta hiện tại vẫn chưa có quy định mức giới hạn các chỉ tiêu vi sinh đối với vỏ chai/bình đựng nước uống đóng chai. Do đó, trong phạm vi đề tài, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá mức độ ô nhiễm vi sinh bề mặt vỏ bình tái sử dụng căn cứ vào giới hạn vi sinh quy định đối với mẫu NUĐC theo QCVN 6-1:2010/BYT.

2.2.6.4. Tiêu chí đánh giá vi sinh không khí

Hiện nay ở nước ta vẫn chưa có tiêu chuẩn quy định về số lượng VSV trong không khí, tuy nhiên, tài liệu hướng dẫn “Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh nước và không khí” của Bộ Y tế (2012) đã giới thiệu các ngưỡng đánh giá đối với VSV trong không khí căn cứ vào một số tài liệu quốc tế, cụ thể như sau: Không khí ở mức sạch (HPC <1500 CFU/m³); Không khí ở mức cảnh báo (HPC:1500-2500 CFU/m³); Không khí ở mức bẩn (HPC >2500 CFU/m³) [43].

2.2.6.5. Tiêu chí đánh giá chỉ số ATP

Theo Etter & cộng sự (2017), giá trị ATP ở bề mặt tiếp xúc với thực phẩm được phân loại theo các mức như sau: Đạt (< 150 RLU/100 cm²); Cảnh báo (150-299 RLU/100 cm²); Không đạt (\geq 300 RLU/100 cm²) [44].

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm Epidata 3.1 để nhập liệu; phần mềm SPSS 26 và R 4.1.2 để xử lý, phân tích số liệu.
- Phân tích thống kê so sánh sự khác biệt giữa các tỷ lệ sử dụng Chi - square test hoặc Fisher's exact test.
- Xác định mối tương quan bằng phân tích tương quan Pearson.
- Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. THỰC TRẠNG Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI DUNG TÍCH 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA NĂM 2022

3.1.1. Tỷ lệ nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022

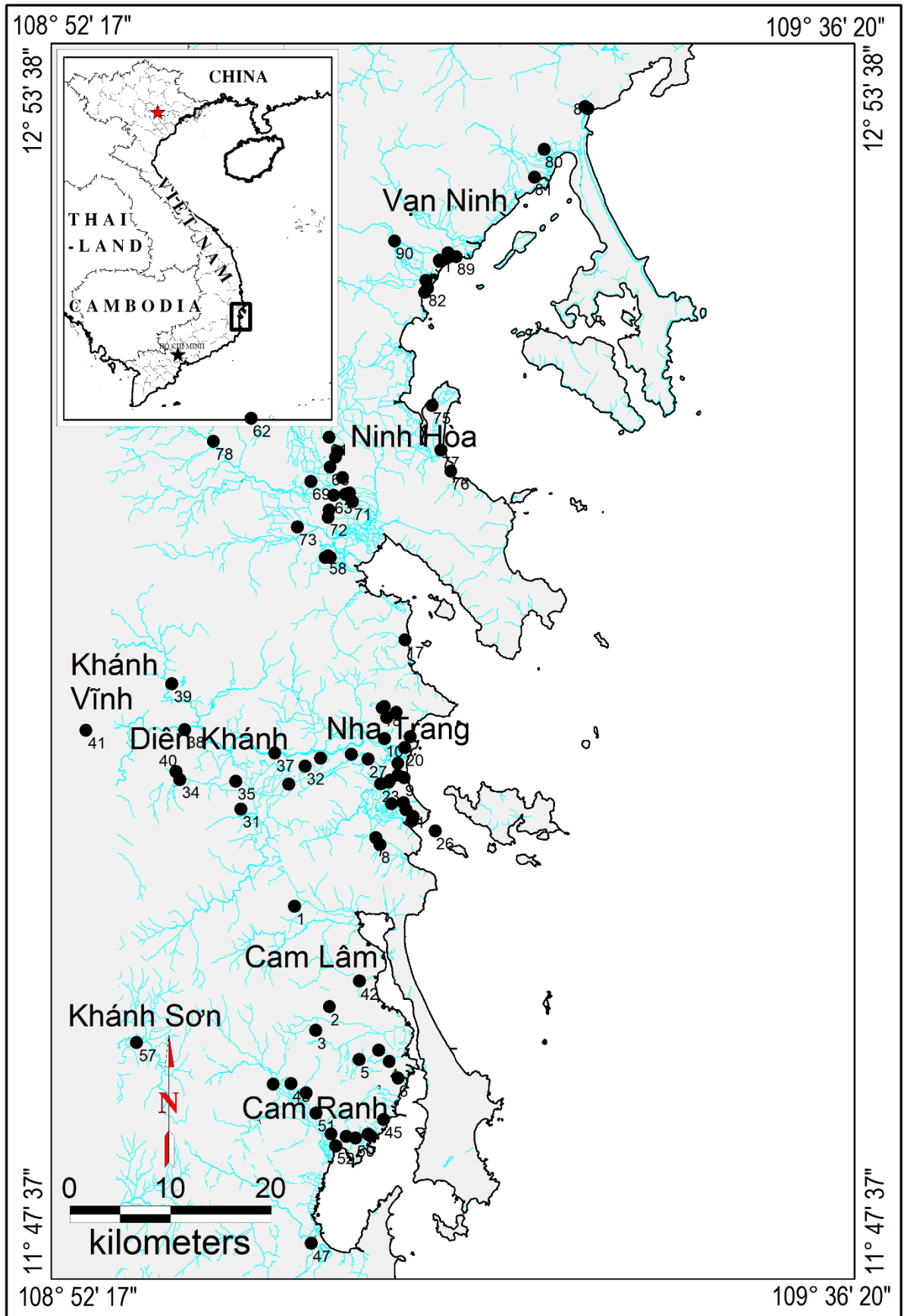
Bảng 3.1 Tỷ lệ nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai 19-21 lít

Tổng số mẫu	Mẫu đạt		Mẫu không đạt	
	Tần số	Tỷ lệ (%)	Tần số	Tỷ lệ (%)
93	25	26,9	68	73,1

Kết quả phân tích ở Bảng 3.1 cho thấy, trong tổng số 93 mẫu NUĐC (19-21 lít) được thu thập, có tới 73,1% (68/93) mẫu không đạt chuẩn vi sinh theo quy định của QCVN 6-1:2010/BYT. Qua đó cho thấy mức độ ô nhiễm VSV trong sản phẩm NUĐC loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022 khá cao. Kết quả này cũng tương đồng so với kết quả khảo sát gần đây của Viện Pasteur Nha Trang trên 50 mẫu NUĐC dung tích 19-21 lít thu thập trên thị trường tỉnh Khánh Hòa năm 2019 (68%) [33]. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm vi sinh trong nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của Võ Thị Kim Hạnh (2016) tại Khánh Hòa (42,86%) [7]. Theo tác giả, điều này cũng khá hợp lý vì đối tượng mẫu nghiên cứu của tác giả Võ Thị Kim Hạnh bao gồm nhiều loại quy cách đóng chai (cả đóng bình và đóng chai), mà không chỉ tập trung vào đối tượng NUĐC dung tích lớn (19-21L), trong khi các loại bình có dung tích lớn mới là nhóm có khả năng nhiễm khuẩn cao hơn so với các nhóm NUĐC có dung tích nhỏ vì các vỏ bình đựng nước thường được tái sử dụng nhiều lần.

3.1.2. Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu về vi sinh theo địa điểm thu mẫu

Tại Khánh Hòa, các cơ sở sản xuất NUĐC tập trung chủ yếu ở Nha Trang (25/93, 26,9%), Ninh Hòa (22/93, 23,7%), Cam Ranh (15/93, 16,1%), Vạn Ninh (13/93, 14%), Diên Khánh (10/93, 10,8%), một số ít tại Cam Lâm (6/93, 6,5%), Khánh Sơn (1/93, 1,1%) và Khánh Vĩnh (1/93, 1,1%) (Hình 3.1).



Hình 3. 1 Vị trí các cơ sở sản xuất NUDC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

Bảng 3.2 Tỷ lệ mẫu NUĐC 19-21 lít không đạt yêu cầu vi sinh theo địa điểm thu mẫu

Địa phương	Tổng số mẫu/ địa phương	Mẫu không đạt		
		Tần số	(%)	<i>p</i> *
Khánh Sơn	1	1	100	0,05554
Khánh Vĩnh	1	1	100	
Vạn Ninh	13	11	84,6	
Ninh Hòa	22	18	81,8	
Nha Trang	25	20	80,0	
Diên Khánh	10	7	70,0	
Cam Ranh	15	9	60,0	
Cam Lâm	6	1	16,7	
Tổng số mẫu	93	68	73,1	

* Fisher's exact test.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 02 mẫu NUĐC tại Khánh Sơn và Khánh Vĩnh đều không đạt yêu cầu về vi sinh (100%). Tại Vạn Ninh, tỷ lệ mẫu NUĐC không đạt là 84,6%, cao hơn so với Ninh Hòa (81,8%), Nha Trang (80%), Diên Khánh (70%), Cam Ranh (60%) và Cam Lâm (16,7%) (Bảng 3.2).

Kết quả khảo sát cho thấy tại Khánh Sơn và Khánh Vĩnh, mỗi khu vực chỉ có 01 cơ sở sản xuất NUĐC, do đó người dân nơi đây không có sự lựa chọn khi sử dụng sản phẩm này. Mặt khác, với tình trạng nguồn nước ngày càng bị ô nhiễm nghiêm trọng, nhiều người tiêu dùng tin tưởng rằng việc sử dụng NUĐC sẽ an toàn hơn cho sức khỏe của họ vì sản phẩm này đã được xử lý, lọc, tiệt khuẩn qua nhiều công đoạn khác nhau. Do đó, nhằm đảm bảo sức khỏe cho người tiêu dùng ở các khu vực này, các cơ sở sản xuất NUĐC ở cả 02 khu vực Khánh Sơn và Khánh Vĩnh cần phải tìm ra nguyên nhân và biện pháp phù hợp để khắc phục tình trạng ô nhiễm vi sinh trong sản phẩm NUĐC (19-21 lít) hiện nay. Ở các khu vực còn lại, chỉ có Cam Lâm có tỷ lệ mẫu NUĐC không đạt yêu cầu về vi sinh là thấp nhất (16,7%, 1/6), các khu vực còn lại (Vạn Ninh,

Ninh Hòa, Nha Trang, Diên Khánh, Cam Ranh) đều có tỷ lệ mẫu NUĐC không đạt yêu cầu khá cao (trên 50% tổng số mẫu) (Bảng 3.2).

3.1.3. Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu theo các chỉ tiêu vi sinh

Bảng 3.3 Tỷ lệ mẫu nước uống đóng chai không đạt yêu cầu theo các chỉ tiêu vi sinh (n=93)

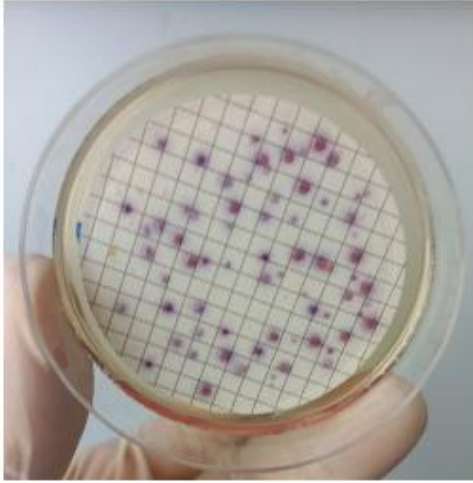
Chỉ tiêu	Mẫu không đạt	
	Tần số	Tỷ lệ (%)
<i>P. aeruginosa</i> *	64	68,8
Coliform*	43	46,2
<i>S. feacal</i> *	2	2,2
Clostridia*	2	2,2
<i>E. coli</i> *	1	1,1
HPC**	66	71,0

*Theo giới hạn quy định tại QCVN 6-1:2010/BYT [1]. **Theo giới hạn khuyến cáo của EPA Mỹ [42].

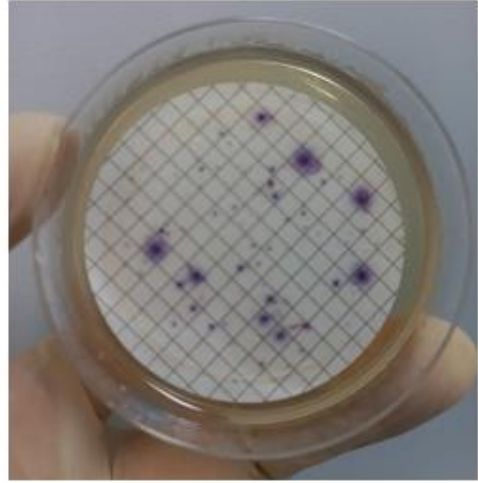
Theo QCVN 6-1:2010/BYT, giới hạn cho phép đối với các chỉ tiêu vi sinh trong NUĐC là “Không phát hiện” [1]. Tuy nhiên kết quả phân tích cho thấy có 02 loài được phát hiện với tỷ lệ nhiễm khá cao là *P. aeruginosa* 68,8% (64/93) và coliform 46,2 % (43/93). Các vi khuẩn còn lại được phát hiện với tỷ lệ thấp như: *S. feacal* và Clostridia cùng nhiễm 2,2% (2/93), *E. coli* nhiễm 1,1% (1/93) (Bảng 3.3). Trong 43 chủng coliform được phát hiện, nghiên cứu đã định danh và phát hiện có 18,6% (8/43) chủng là *Klebsiella pneumoniae*. Đây cũng là loài thường gây ra các bệnh nguy hiểm ở người như viêm phổi, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng huyết... Ngoài ra các loài *K. pneumoniae*, *E. coli* và *P. aeruginosa* còn có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh [45], do đó sự tồn tại của các loài này trong NUĐC (19-21 lít) cũng tiềm ẩn nhiều nguy cơ gây bệnh cho người tiêu dùng.

Nhiều nghiên cứu trước đây cũng cho thấy tỷ lệ nhiễm *P. aeruginosa* thường cao hơn so với các loài vi khuẩn khác trong NUĐC như nghiên cứu của Cao Thanh Diễm Thúy (2016) cho thấy trong 66 mẫu NUĐC sản xuất tại Bến Tre năm 2016 có 36,4% nhiễm *P. aeruginosa*, 18,2% nhiễm coliform và 3% nhiễm *E. coli* [16]. Thông báo của Nguyễn Vũ Thuận (2019) phát hiện có 41,5% *P. aeruginosa*, 11,8% coliform tổng số, 4,6% Clostridia, 4,9% *E. coli* và 1,3% *S. feacal* trong 390 mẫu NUĐC thu thập ở khu vực 5 tỉnh Tây Nguyên năm 2018 [37]. Tại Hà Nội, nghiên cứu của Phạm Thị Oanh Oanh (2019) cho thấy có 78% (39/50) mẫu NUĐC dung tích 19,5 lít tại quận Thanh Xuân năm 2019 nhiễm *P. aeruginosa* [32]. Trần Mai Thị Huyền Trân (2019) cũng đã phát hiện có 56,4% *P. aeruginosa*, 15,4% coliform và 2,6% *E. coli* trong 39 mẫu nước uống đóng bình sản xuất tại Ninh Thuận năm 2018 [9]. Tại Khánh Hòa thông báo của Võ Thị Kim Hạnh (2016) cũng cho thấy NUĐC sản xuất tại khu vực này nhiễm 39,68% *P. aeruginosa*, 15,87% coliform, 11,11% *Streptococcus* phân và 3,17% *E. coli* [7].

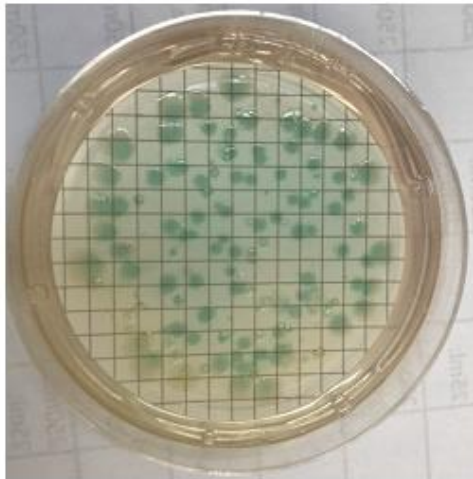
Kết quả phân tích cũng cho thấy tỷ lệ không đạt đối với tổng số VSV dị dưỡng (HPC) trong NUĐC (19-21 lít) khá cao (71%, 66/93). Hiện tại ở nước ta vẫn chưa yêu cầu kiểm tra chỉ tiêu này đối với sản phẩm NUĐC, tuy nhiên theo khuyến cáo của EPA, HPC trong nước uống nên thấp hơn 500 CFU/mL [42]. Khi số lượng HPC trong nước uống cao hơn ngưỡng này đồng nghĩa với việc chất lượng nước nói chung giảm vì sự gia tăng số lượng vi khuẩn dị dưỡng trong nước cho thấy mức độ hình thành màng sinh học cũng cao hơn [46]. Nghiên cứu của Bikram Gautam (2021) cho thấy có mối liên quan chặt chẽ giữa tổng số vi khuẩn dị dưỡng và chỉ tiêu coliform trong nước đóng chai (với hệ số tương quan $r = 1,00$) [31]. Do đó việc phát hiện tỷ lệ nhiễm HPC cũng như *P. aeruginosa* và coliform không đạt khá cao trong NUĐC 19-21 lít ở nghiên cứu này cho thấy các cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa cần có sự đánh giá tổng thể để tìm ra nguyên nhân và giải pháp khắc phục nhằm hạn chế tình trạng ô nhiễm vi sinh trong sản phẩm này.



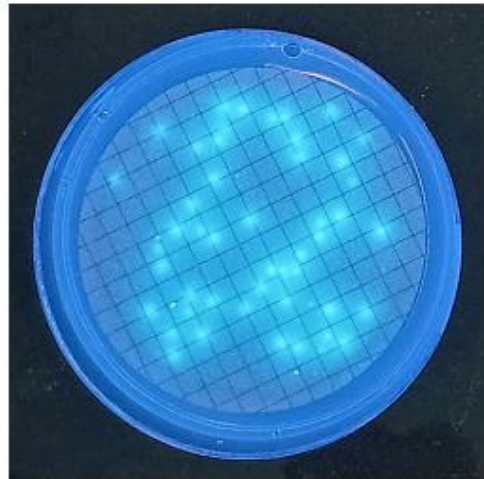
Khuẩn lạc coliform trên thạch CCA



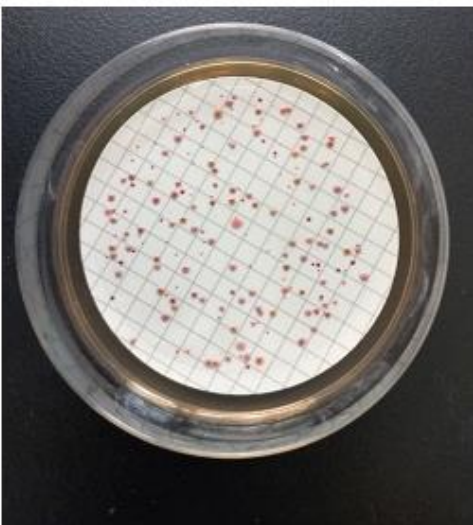
Khuẩn lạc E. coli trên thạch CCA



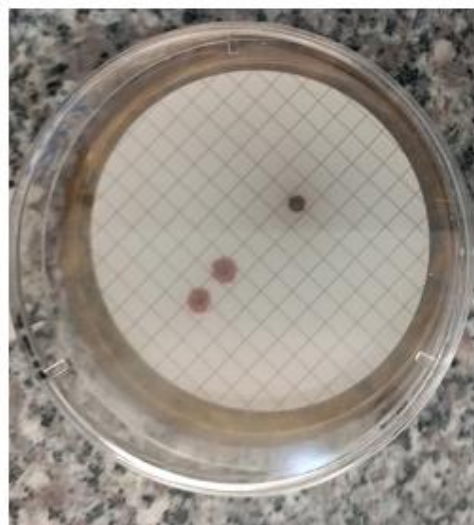
Khuẩn lạc P. aeruginosa trên PCN



Khuẩn lạc P. aeruginosa soi UV



Khuẩn lạc S. fecal trên thạch S&B



Khuẩn lạc Clostridia trên thạch ISA

Hình 3.2 Hình ảnh khuẩn lạc các loài được phân lập trong NUĐC thành phẩm

3.1.4. Phân bố số lượng vi khuẩn của các loài được phát hiện trong nước uống đóng chai (19-21 lít)

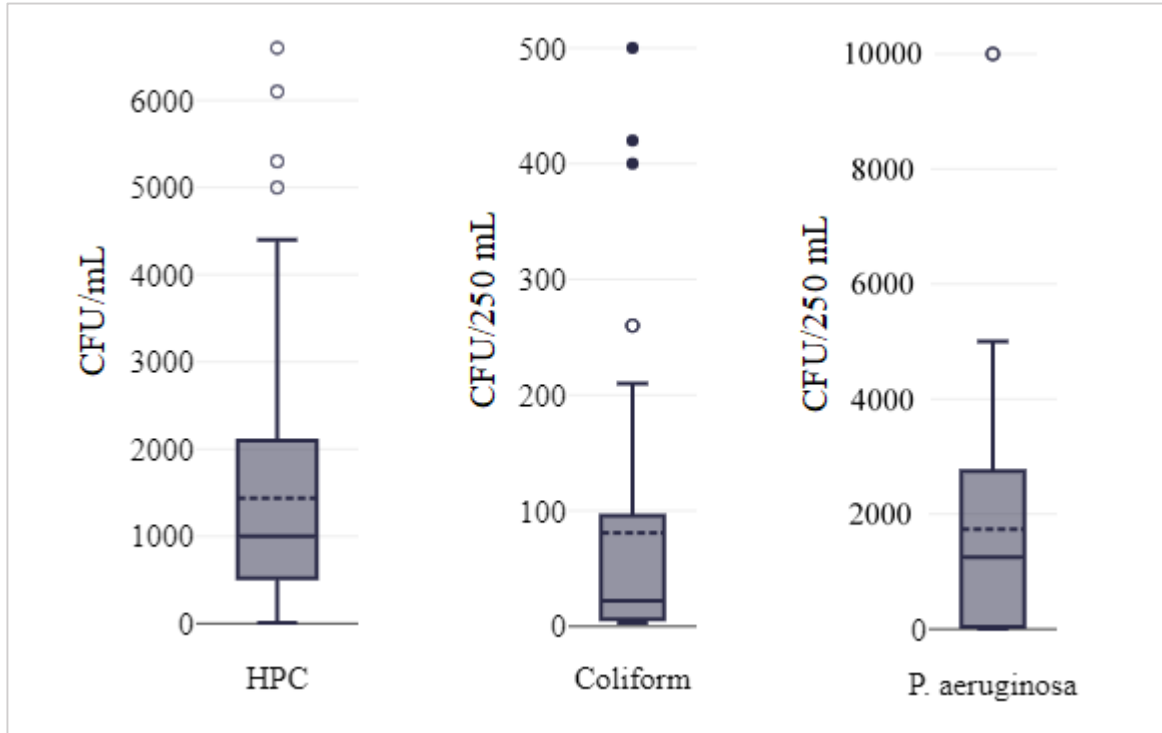
Trong các loại vi khuẩn được phát hiện trong NUĐC (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022, *E. coli*, *S. feacal* và Clostridia có số lượng nhiễm rất thấp, chỉ có một mẫu nhiễm *E. coli* với số lượng 3 CFU/250 mL, 02 mẫu nhiễm *S. feacal* với số lượng 1-3 CFU/250 mL và 02 mẫu nhiễm Clostridia với số lượng cũng chỉ từ 1-2 CFU/50 mL. Bình thường vi khuẩn *E. coli* sống trong đường ruột người và động vật máu nóng, chúng tồn tại với số lượng lớn trong phân. Tương tự, vi khuẩn *S. feacal* cũng có nhiều trong đường ruột của động vật máu nóng và ngay cả trong ruột người, do đó sự có mặt của *E. coli* và *S. feacal* trong nước uống cho thấy nguồn nước đó có khả năng bị ô nhiễm phân. Tuy nhiên tỷ lệ và số lượng nhiễm của chúng không cao, vì vậy ít có khả năng sự tồn tại của chúng bắt nguồn từ nguồn nước dùng để sản xuất hay hệ thống lọc nước không đảm bảo mà có thể do thao tác thực hành của nhân viên tham gia sản xuất hoặc việc vệ sinh vỏ bình đựng nước chưa đạt yêu cầu. Tương tự, tỷ lệ nhiễm Clostridia cũng khá thấp, do đó khả năng ô nhiễm loài này cũng có thể xuất phát từ quá trình thao tác của nhân viên.

Bảng 3.4 Phân bố số lượng *P. aeruginosa*, coliform và HPC trong nước uống đóng chai nhiễm khuẩn

Giá trị thống kê	<i>P. aeruginosa</i> (CFU/250 mL)	Coliform (CFU/250 mL)	HPC (CFU/mL)
Giá trị lớn nhất	$1,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	$6,6 \times 10^3$
Giá trị nhỏ nhất	3	3	7
Trung bình	$1,7 \times 10^3$	$8,1 \times 10^1$	$1,4 \times 10^3$
Độ lệch chuẩn	$2,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$

Kết quả phân tích ở Bảng 3.4 cho thấy các loài còn lại được phát hiện với số lượng phân bố khá cao trong NUĐC 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022 là *P. aeruginosa* và coliform, với số lượng trung bình lần lượt là

$1,7 \times 10^3$ CFU/250 mL và $8,1 \times 10^1$ CFU/250 mL. Trong đó coliform nhiễm với số lượng cao nhất là $5,0 \times 10^2$ CFU/250 mL và *P. aeruginosa* nhiễm với số lượng tới $1,0 \times 10^4$ CFU/250 mL (Hình 3.3).



Hình 3.3 Biểu đồ phân bố số lượng HPC, coliform và *P. aeruginosa* trong các mẫu NUĐC nhiễm khuẩn

Vi khuẩn *P. aeruginosa* là loài gây bệnh cơ hội và thường kháng với nhiều loại kháng sinh, trong đó có những kháng sinh quan trọng trong điều trị như carbapenem [45]. Do đó, việc tiêu thụ NUĐC cũng có nguy cơ gây bệnh nếu người tiêu dùng thường xuyên sử dụng phải các sản phẩm NUĐC nhiễm số lượng lớn *P. aeruginosa*.

Tỷ lệ và số lượng *P. aeruginosa* và coliform trong NUĐC được phát hiện ở nghiên cứu này là khá cao. Qua đó cho thấy có nhiều nguyên nhân có thể gây ra sự ô nhiễm này như nguồn nước sản xuất, hệ thống lọc nước, thao tác thực hành của nhân viên tham gia sản xuất. Đặc biệt là yếu tố vệ sinh vỏ bình tái sử dụng, bởi vì *P. aeruginosa* và coliform là các loài vi khuẩn có khả năng bám dính tốt nhờ hình thành màng sinh học (biofilm), do đó nếu quá trình súc rửa vỏ bình không đảm bảo sẽ không loại sạch được lượng vi khuẩn còn bám dính

trên thành bình qua các lần tái sử dụng vỏ bình [24]. Điều này cũng đã được tác giả Đỗ Mạnh Hùng (2016) thông báo khi nghiên cứu về mối liên quan giữa việc ô nhiễm VSV trong NUĐC với việc tái sử dụng vỏ bình tại Hưng Yên. Khảo sát của tác giả cho thấy tỷ lệ cơ sở sản xuất NUĐC có mẫu nước đóng bình nhiễm vi sinh tăng dần theo số lần tái sử dụng nắp bình và những bình tái sử dụng nhiều lần có nguy cơ nhiễm vi sinh vật rất cao [8]. Ngoài ra, đối với vi khuẩn *P. aeruginosa*, các cơ sở sản xuất NUĐC cũng cần chú ý đến thời gian tiệt khuẩn bằng tia UV, bởi vì *P. aeruginosa* có khả năng chịu được bức xạ của tia UV lâu hơn so với nhiều loài vi khuẩn khác và điều này cũng đã được Roy L. Wolfe & cộng sự (1990) chứng minh [47].

Ngoài các chỉ tiêu trên, kết quả phân tích cũng cho thấy tổng số VSV dị dưỡng (HPC) được phát hiện trong NUĐC với số lượng khá cao (trung bình $1,4 \times 10^3$ CFU/mL) (Bảng 3.4). Trong khi nghiên cứu của Rygala và cộng sự (2020) cho thấy VSV dị dưỡng có khả năng bám dính tốt vào bề mặt bên trong đường ống dẫn nước và hình thành màng sinh học trong các hệ thống xử lý nước, từ đó có thể dẫn đến việc ô nhiễm VSV và các vi khuẩn gây bệnh cơ hội trong nước uống [27]. Do đó, HPC cũng là một chỉ số cần thiết để đánh giá chất lượng NUĐC về mặt vi sinh và chỉ số HPC cao trong NUĐC cho thấy chất lượng của sản phẩm này không đảm bảo yêu cầu về vi sinh.

Việc xác định loài vi khuẩn cũng như mức độ ô nhiễm của chúng trong NUĐC là cơ sở cho các cơ sở sản xuất NUĐC trong việc tìm hiểu, xác định nguồn gây ô nhiễm cho sản phẩm này. Do đó, các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa cần tiến hành đánh giá tổng thể các yếu tố có khả năng liên quan đến sự ô nhiễm VSV trong sản phẩm NUĐC, đặc biệt là NUĐC loại 19-21 lít, để tìm ra nguyên nhân và biện pháp khắc phục nhằm hạn chế thực trạng nhiễm khuẩn khá phổ biến hiện nay trong sản phẩm NUĐC (19-21 lít) sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

3.2. PHÂN TÍCH MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NƯỚC UỐNG ĐÓNG CHAI DUNG TÍCH 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA NĂM 2022

Nhằm xác định nguyên nhân gây ra tình trạng nhiễm khuẩn trong sản phẩm NUĐC (19 - 21 lít) sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa, trong khuôn

khô đề tài, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát một số yếu tố có khả năng liên quan đến ô nhiễm VSV trong NUĐC (19-21 lít) như: nguồn nước nguyên liệu, vệ sinh vỏ bình tái sử dụng, vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm và không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm.

3.2.1. Yếu tố nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai

3.2.1.1. Tình trạng ô nhiễm vi sinh theo nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai tại Khánh Hòa năm 2022

Trong tổng số 93 cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa năm 2022, có 79 cơ sở (84,9%) sử dụng nước máy, 12 cơ sở (12,9%) sử dụng nước giếng (bao gồm cả nước giếng khoan) và 2 cơ sở (2,2%) sử dụng nguồn nước trực tiếp từ suối tự nhiên để sản xuất NUĐC. Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ cơ sở có mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu vi sinh theo quy định tại QCVN 01-1:2018/BYT là 20,4% (19/93) (Bảng 3.5).

Bảng 3.5 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu vi sinh theo nguồn nước sử dụng

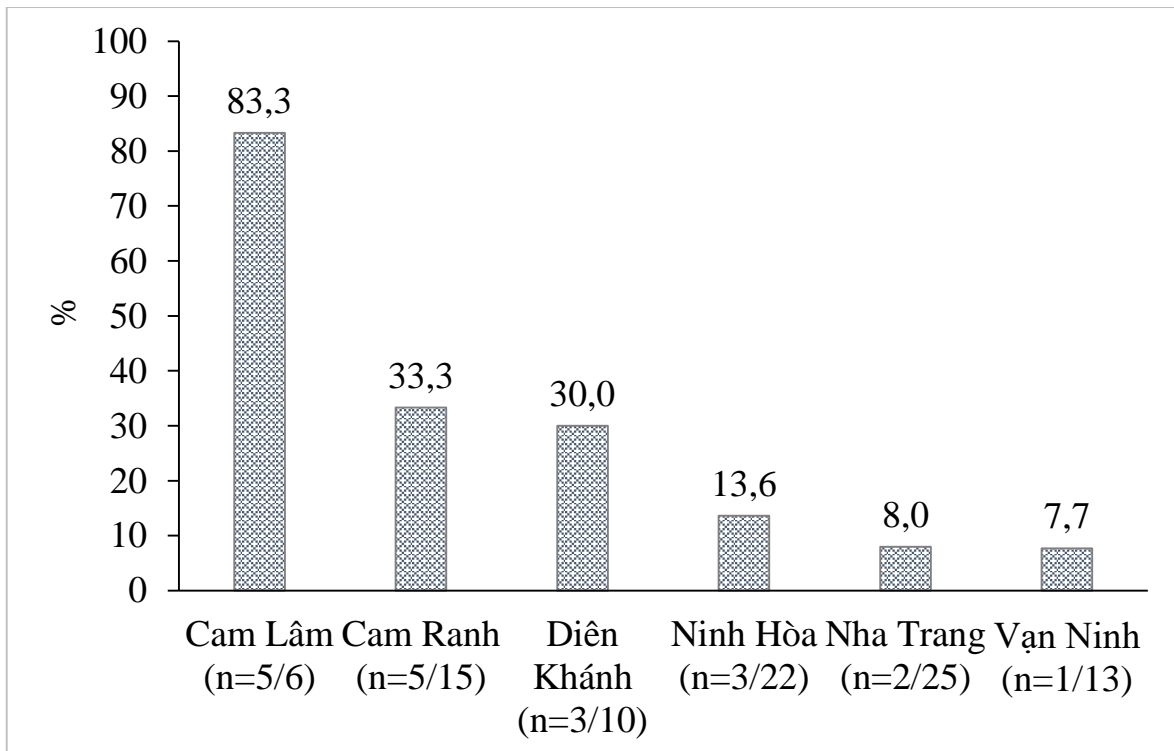
Nguồn nước nguyên liệu	Mẫu không đạt		p^*
	Tần số	Tỷ lệ (%)	
Nước máy (n=79)	13	16,5	
Nước giếng (n=12)	4	33,3	0,0145
Nước suối tự nhiên (n=2)	2	100	
Tổng (n=93)	19	20,4	

* Fisher's exact test.

Kết quả ở nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả của Trần Minh Phương & cộng sự (2019) tại Hưng Yên (38,5% mẫu nước nguồn nhiễm VSV) [48]. Trong các mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu, tỷ lệ mẫu nước suối tự nhiên là 100% (2/2), nước giếng là 33,3% (4/12) cao hơn so với nước máy, 16,5% (13/79), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Bảng 3.5). Điều này cũng

hợp lý vì nước máy là nguồn nước đã được xử lý, lọc thô qua hệ thống lọc nước tập trung của địa phương do đó tỷ lệ nhiễm khuẩn trong nước máy thấp hơn so với nguồn nước suối tự nhiên hoặc nước giếng, là các nguồn nước chưa được xử lý ban đầu.

3.2.1.2. Tình trạng ô nhiễm vi sinh nước nguồn tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai theo địa điểm lấy mẫu



Hình 3.4 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu về vi sinh theo địa điểm lấy mẫu

Phân tích tỷ lệ mẫu không đạt theo địa điểm thu mẫu cho thấy, tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu về vi sinh ở Cam Lâm (83,3%, 5/6) cao hơn so với Cam Ranh (33,3%, 5/15), Diên Khánh (30%, 3/10), Ninh Hòa (13,6%, 3/22), Nha Trang (8%, 2/25) và Vạn Ninh (7,7%, 1/13) (Hình 3.4). Riêng 02 mẫu nước nguồn tại khu vực Khánh Sơn và Khánh Vĩnh đều đạt yêu cầu về vi sinh và nguồn nước được sử dụng ở cả 02 cơ sở này đều là nguồn nước máy từ trạm cấp nước của địa phương.

3.2.1.3. Tình trạng ô nhiễm vi sinh nước nguồn theo nguyên nhân

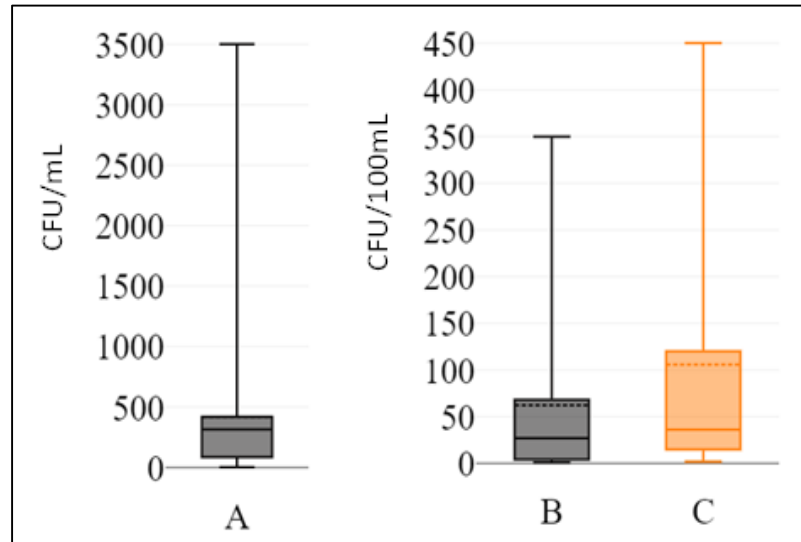
Bảng 3.6 Tỷ lệ mẫu nước nguồn không đạt yêu cầu vi sinh theo nguyên nhân

Chỉ tiêu vi sinh	Số mẫu không đạt (%)				<i>p</i> *
	Nước máy (n=79)	Nước giếng (n=12)	Nước suối tự nhiên (n=2)	Tổng cộng (n=93)	
Coliform**	10 (12,7)	3 (25,0)	2 (100)	15 (16,1)	0,012
<i>E. coli</i> **	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50)	1 (1,1)	-
<i>P. aeruginosa</i> **	9 (11,4)	3 (25,0)	2 (100)	14 (15,1)	0,009
HPC#	7 (8,9)	1 (8,3)	0 (0,0)	8 (8,6)	1,000

*Fisher's exact test. **Theo giới hạn quy định tại QCVN 01-1:2018/BYT [41].

#Theo giới hạn khuyến cáo của EPA Mỹ [42].

Theo QCVN 01-1:2018/BYT, giới hạn cho phép đối với các chỉ tiêu VSV trong nước sạch sử dụng cho mục đích sinh hoạt: coliform < 3 CFU/100mL; *E. coli* và *P. aeruginosa* là < 1 CFU/100mL. Kết quả phân tích cho thấy có 15/93 (16,1%) mẫu không đạt coliform, 14/93 (15,1%) mẫu không đạt *P. aeruginosa*, chỉ có 1 mẫu không đạt *E. coli* (chiếm 1,1%). Tỷ lệ không đạt coliform của mẫu nước suối tự nhiên (100%) và nước giếng (25%) cao hơn so với nước máy (12,7%). Tương tự, tỷ lệ không đạt *P. aeruginosa* ở nước suối tự nhiên (100%) và nước giếng (25%) cũng cao hơn so với nước máy (11,4%) (Bảng 3.6). *E. coli* chỉ được phát hiện duy nhất ở 01 mẫu nước suối tự nhiên với số lượng 7 CFU/100mL (chiếm 7,1%). Một số nghiên cứu trước đây cũng đã thông báo phát hiện ô nhiễm coliform và *E. coli* trong nước sinh hoạt như thông báo của Hương và cộng sự (2016), có 27% mẫu nước ăn uống, sinh hoạt tại Đồng Nai năm 2011 nhiễm coliform [49]. Hoặc thông báo của Doãn Ngọc Hải (2015) cũng đã thông báo có 56,2% mẫu nước máy tại Hà Nội năm 2014 nhiễm coliform [50]. Tương tự, việc ô nhiễm coliform và *E. coli* cũng đã được Phùng Thị Xuân Bình (2019) báo cáo có trong mẫu nước giếng tại Hà Nội năm 2019 [51].



Hình 3.5 Phân bố số lượng HPC (A), coliform (B) và *P. aeruginosa* (C) trong các mẫu nước nguồn nhiễm khuẩn

Phân bố số lượng vi khuẩn coliform, *P. aeruginosa* và HPC trong các mẫu nước nguồn trung bình lần lượt là $6,2 \times 10^1$ CFU/100mL, $1,1 \times 10^2$ CFU/100mL và $4,2 \times 10^2$ CFU/mL (Hình 3.5). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có 8/93 mẫu (8,6%) có chỉ tiêu HPC cao hơn ngưỡng giới hạn khuyến cáo (500 CFU/mL) của EPA đối với nước uống. Qua đó cho thấy nguồn nước dùng để sản xuất NUĐC tại các cơ sở sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa năm 2022 vẫn chưa đảm bảo về mặt vi sinh và đây cũng có thể là một trong các nguy cơ dẫn đến việc ô nhiễm các loài như *P. aeruginosa* và các vi khuẩn thuộc nhóm coliform trong NUĐC thành phẩm sản xuất tại Khánh Hòa.

3.2.1.4. Mối liên quan giữa nguồn nước sử dụng để sản xuất nước uống đóng chai và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong tổng số 68 mẫu NUĐC thành phẩm không đạt yêu cầu về vi sinh, có 2/2 (100%) mẫu sản xuất từ nguồn nước suối tự nhiên, 59/79 (74,7%) mẫu sản xuất từ nguồn nước máy và 7/12 (58,3%) mẫu sản xuất từ nguồn nước giếng. Sự khác biệt giữa các tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê ($\rho > 0,05$) (Bảng 3.7).

Bảng 3.7 Tỷ lệ mẫu NUĐC thành phẩm không đạt theo nguồn nước

Nguồn nước	Mẫu nước uống đóng chai thành phẩm không đạt		p^*
	Tần số	Tỷ lệ (%)	
Nước máy (n=79)	59	74,7	
Nước giếng (n=12)	7	58,3	0,3444
Nước suối tự nhiên (n=2)	2	100	
Tổng (n=93)	68	73,1	

*Fisher's exact test.

Phân tích mối liên quan giữa chất lượng NUĐC (19-21 lít) thành phẩm và nguồn nước đầu vào cho thấy, mặc dù nguồn nước đầu vào tại một số cơ sở sản xuất NUĐC vẫn chưa đảm bảo về vi sinh, tuy nhiên kết quả phân tích ở Bảng 3.8 cho thấy không có mối liên quan giữa nguồn nước đầu vào và chất lượng NUĐC thành phẩm ($\rho > 0,05$). Điều này cho thấy hệ thống xử lý, lọc nước tại các cơ sở cũng đã góp phần quan trọng trong việc loại bỏ vi khuẩn có trong nguồn nước đầu vào. Đồng thời cho thấy nguồn nước đầu vào không phải là yếu tố liên quan đến việc ô nhiễm vi sinh trong NUĐC (19-21 lít) thành phẩm sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

Bảng 3.8 Mối liên quan giữa nguồn nước sản xuất và chất lượng nước uống đóng chai (n=93)

Nguồn nước	Chất lượng nước uống đóng chai		ρ
	Đạt	Không đạt	
Đạt	17 (23,0)	57 (77,0)	0,093
Không đạt	8 (42,1)	11 (57,9)	

3.2.2. Yếu tố vệ sinh bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng

3.2.2.1. Tình trạng nhiễm vi sinh bề mặt vỏ bình tái sử dụng

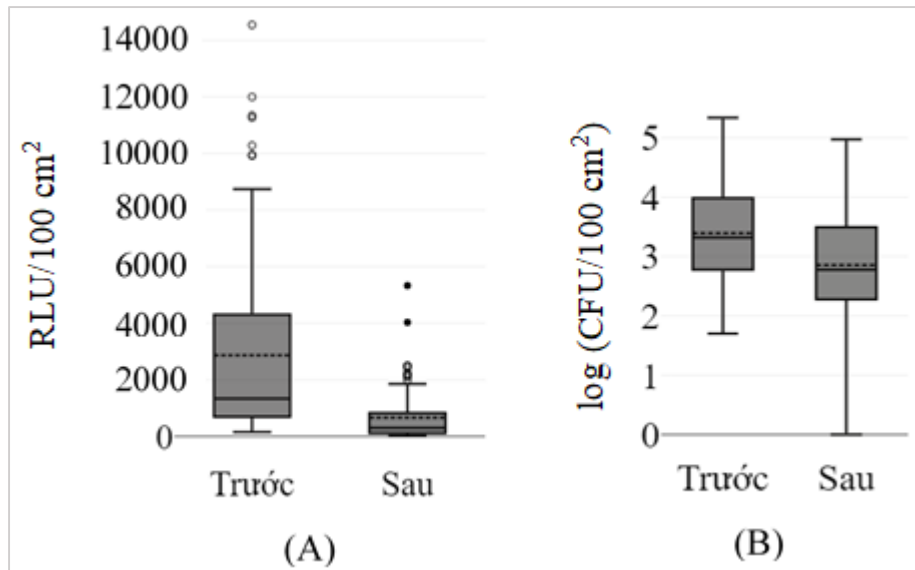
Bảng 3.9 Phân loại giá trị ATP mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa năm 2022

Phân loại ATP [#]	Số mẫu (%)		p*
	Vỏ bình trước giai đoạn súc rửa (n=93)	Vỏ bình sau giai đoạn súc rửa (n=93)	
Đạt (< 150 RLU/100 cm ²)	0 (0)	32 (34,4)	
Cảnh báo (150-299 RLU/100 cm ²)	4 (4,3)	15 (16,1)	<0,001
Không đạt (≥ 300 RLU/100 cm ²)	89 (95,7)	46 (49,5)	

[#]Theo Etter & cs (2017) [44]; *Fisher's exact test; RLU (Relative Light Unit): Đơn vị ánh sáng.

Kết quả ở Bảng 3.9 cho thấy 89/93 (95,7%) mẫu bề mặt bên trong vỏ bình trước súc rửa có chỉ số ATP ở mức không đạt, 4/93 (4,3%) mẫu ở mức cảnh báo và không có mẫu nào ở mức đạt.

Đối với các vỏ bình sau súc rửa, có 46/93 (49,5%) mẫu bề mặt bên trong vỏ bình không đạt chỉ số ATP, 16,1% mẫu ở mức cảnh báo và 34,4% mẫu ở mức đạt. Chỉ số ATP trung bình mẫu bề mặt bên trong vỏ bình sau giai đoạn súc rửa là 663 RLU/100 cm², giảm 4,3 lần so với trước súc rửa 2866 RLU/100 cm² (Hình 3.6A). Tương tự, số lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng trung bình mẫu bề mặt bên trong vỏ bình sau súc rửa là 2,86 log (CFU/100 cm²), giảm 3,4 lần so với trước súc rửa 3,39 log (CFU/100 cm²) (Hình 3.6B).

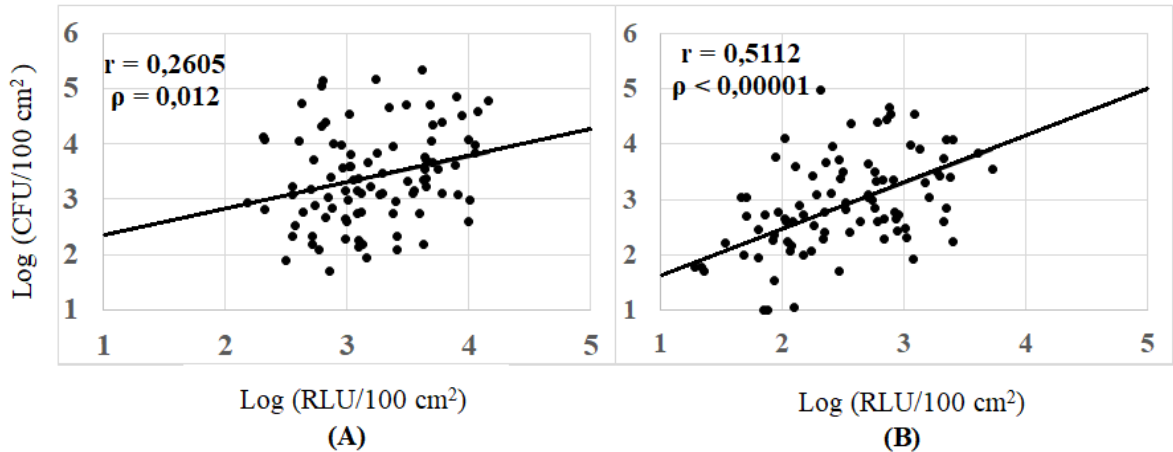


Hình 3.6 Chỉ số ATP (A) và số lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng (B) trong vỏ bình trước và sau giai đoạn súc rửa

ATP là một chất chỉ thị sinh học được tìm thấy trong chu trình chuyển hóa năng lượng của tế bào và hiện diện trong tất cả các sinh vật sống bao gồm cả vi khuẩn. Vì vậy, ATP được sử dụng làm chỉ số giám sát nhanh nguồn ô nhiễm bề mặt phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm [52].

Theo nghiên cứu của Etter & cộng sự (2017), giá trị ATP vượt ngưỡng giới hạn 300 RLU/100 cm² cho thấy bề mặt tiếp xúc thực phẩm bị nhiễm bẩn và có thể chứa các vi sinh vật [44]. Trong nghiên cứu này, hầu hết các mẫu vỏ bình trước súc rửa (95,7%) đều có giá trị ATP vượt ngưỡng 300 RLU/100 cm². Sau quá trình súc rửa, tỷ lệ vỏ bình có chỉ số ATP không đạt đã giảm đáng kể so với trước súc rửa ($p < 0,05$), tuy nhiên tỷ lệ các mẫu có chỉ số ATP ≥ 300 RLU/100 cm² vẫn còn ở mức khá cao (49,5%).

Kết quả phân tích cũng cho thấy ở các mẫu vỏ bình trước súc rửa, mối tương quan tuyến tính giữa 2 chỉ số ATP và tổng số vi sinh vật dị dưỡng ở mức yếu ($r = 0,2605$). Ngược lại, ở các mẫu vỏ bình sau súc rửa, 2 chỉ số này có mối tương quan mạnh ($r = 0,5112$) (Hình 3.6). Điều này cho thấy giá trị ATP bề mặt bên trong vỏ bình nước tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa chủ yếu do ô nhiễm vi khuẩn tạo thành.



Hình 3.7 Tương quan giữa chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật dị dưỡng trong vỏ bình trước (A) và sau (B) giai đoạn súc rửa

3.2.2.2. Tỷ lệ nhiễm vi sinh vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai ở Khánh Hòa năm 2022

Trong tổng số 93 mẫu vỏ bình trước khi súc rửa, có 60,2% (56/93) mẫu nhiễm ít nhất 01 chỉ tiêu vi sinh. Các chỉ tiêu được phát hiện bao gồm 04 loài: coliform (52,7%, 49/93), *P. aeruginosa* (25,8%, 24/93), *E. coli* (6,5%, 6/93) và *S. feacal* (2,2%, 2/93) (Bảng 3.10). Có 36,7% (18/93) mẫu nhiễm đồng thời cả coliform và *P. aeruginosa*. Đối với vỏ bình sau súc rửa, có 40,9% (38/93) mẫu được phát hiện nhiễm ít nhất 01 chỉ tiêu vi sinh. Các chỉ tiêu được phát hiện trong mẫu vỏ bình sau súc rửa bao gồm 03 loài: coliform (36,6%, 34/93), *P. aeruginosa* (14%, 13/93) và *E. coli* (3,2%, 3/93) (Bảng 3.10). Có 9,7% (9/93) mẫu nhiễm đồng thời 02 chỉ tiêu coliform và *P. aeruginosa*. Tỷ lệ nhiễm coliform ở vỏ bình trước súc rửa cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ nhiễm chỉ tiêu này ở vỏ bình sau súc rửa ($p < 0,05$). Không phát hiện thấy bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sulfite trong mẫu bề mặt vỏ bình cả trước và sau khi súc rửa (Bảng 3.10).

Kết quả phân tích cũng cho thấy, sau quá trình súc rửa vệ sinh vỏ bình, mặc dù tỷ lệ các mẫu vỏ bình nhiễm vi khuẩn coliform, *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. feacal* có giảm so với vỏ bình trước giai đoạn súc rửa, tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm vi sinh vẫn còn khá cao (40,9%). Kết quả này cũng tương ứng với kết quả nghiên cứu của Trần Minh Phượng & cs (2019) tại Hưng Yên (48,7% mẫu vỏ bình đã súc rửa nhiễm các chỉ tiêu vi sinh) [48].

Bảng 3.10 Tỷ lệ nhiễm vi sinh vỏ bình tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa năm 2022

Chỉ tiêu vi sinh	Số mẫu nhiễm (%)			<i>p</i> *
	Tổng số mẫu (n=186)	Vỏ bình trước giai đoạn súc rửa (n=93)	Vỏ bình sau giai đoạn súc rửa (n=93)	
Coliform	83 (44,6)	49 (52,7)	34 (36,6)	0,039
<i>E. coli</i>	9 (4,8)	6 (6,5)	3 (3,2)	0,497
<i>P. aeruginosa</i>	37 (19,9)	24 (25,8)	13 (14,0)	0,065
<i>Streptococci feacal</i>	2 (1,1)	2 (2,2)	0 (0,0)	-
<i>Clostridia</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-

* Fisher's exact test.

Sự có mặt của các vi khuẩn ở bề mặt bên trong vỏ bình sau súc rửa là mối nguy ô nhiễm vi sinh vật rất quan trọng đối với nước uống đóng bình thành phẩm. Điều này một phần lý giải vì sao sản phẩm NUĐC (19-21 lít) thành phẩm sản xuất và lưu thông trên thị trường tỉnh Khánh Hòa có tỷ lệ không đạt coliform và *P. aeruginosa* ở mức cao như thông báo của Nguyễn Thị Ngọc Duyên & cộng sự (2020) [33].

Việc phát hiện các VSV bên trong vỏ bình sau quá trình vệ sinh, súc rửa cũng đồng nghĩa với việc công tác vệ sinh xử lý vỏ bình tái sử dụng tại nhiều cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa đã không loại bỏ triệt để ô nhiễm VSV. Đây cũng có thể là một trong các nguyên nhân gây ra tình trạng nhiễm khuẩn khá phổ biến hiện nay trong sản phẩm NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

3.2.2.3. *Mối liên quan giữa phương pháp vệ sinh vỏ bình và chất lượng vỏ bình sau súc rửa*

Kết quả khảo sát cho thấy có 62,4% (58/93) cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa năm 2022 sử dụng phương pháp cọ rửa vật lý và nước sạch để súc rửa vỏ bình và 37,6% (35/93) cơ sở sử dụng phương pháp kết hợp cọ rửa vật lý, hóa chất và nước sạch để súc rửa vỏ bình (Bảng 3.11). Qua đó cho thấy các cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa cũng đã nhận thức được việc kết hợp các biện pháp khác nhau nhằm đảm bảo việc vệ sinh vỏ bình được sạch sẽ.

Bảng 3.11 *Mối liên quan giữa phương pháp súc rửa vỏ bình và chất lượng vỏ bình sau khi súc rửa (n=93)*

Chất lượng vỏ bình sau khi súc rửa	Phương pháp súc rửa vỏ bình				ρ^*
	Nước sạch - cọ rửa vật lý		Nước sạch – cọ rửa vật lý - hóa chất		
	Tần số	%	Tần số	%	
Đạt	39	67,2	16	45,7	0,05132
Không đạt	19	32,8	19	54,3	
Tổng cộng	58	100	35	100	

* *Fisher's exact test*

Tuy nhiên kết quả ở Bảng 3.11 cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các phương pháp súc rửa vỏ bình ($\rho > 0,05$). Qua đó cho thấy quy trình súc rửa vỏ bình ở các cơ sở sản xuất NUĐC có thể chưa được thực hiện đúng các bước hoặc thao tác của người trực tiếp súc rửa vỏ bình chưa đảm bảo yêu cầu. Bởi vì nếu việc cọ rửa vỏ bình không hợp lý, nhất là việc sử dụng các vật cứng để chà rửa bên trong bình sẽ dẫn đến việc hình thành các vết xước bên trong bình, làm nơi trú ngụ lý tưởng cho các vi khuẩn bám dính và hình thành màng sinh học trên thành bình. Hoặc việc sử dụng hóa chất để ngâm rửa bình nếu không đúng loại hóa chất hoặc không đảm bảo nồng độ, thời gian phù hợp theo khuyến cáo thì việc khử khuẩn cũng sẽ không đảm bảo. Do đó các cơ

sở sản xuất cần phải đánh giá lại quy trình súc rửa vỏ bình tái sử dụng tại cơ sở mình nhằm khắc phục tình trạng vệ sinh vỏ bình không đảm bảo yêu cầu, hạn chế việc lây nhiễm vi khuẩn từ vỏ bình sang NUĐC thành phẩm.

3.2.2.4 *Mối liên quan giữa vệ sinh vỏ bình và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm*

Bảng 3.12 *Mối liên quan giữa vệ sinh vỏ bình và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm (n=93)*

Vệ sinh vỏ bình	Chất lượng nước uống đóng chai		ρ
	Đạt	Không đạt	
Đạt	20 (36,4)	35 (63,6)	0,013
Không đạt	5 (13,2)	33 (86,8)	

Phân tích mối liên quan giữa việc vệ sinh vỏ bình tái sử dụng và chất lượng NUĐC thành phẩm cho thấy các mẫu NUĐC (19-21 lít) thu thập ở các cơ sở không đạt yêu cầu về vệ sinh vỏ bình có 86,8% không đạt về chất lượng NUĐC, cao hơn các cơ sở đạt yêu cầu về vệ sinh vỏ bình (63,6%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\rho < 0,05$) (Bảng 3.12). Điều này cho thấy yếu tố vỏ bình có mối liên quan đến chất lượng NUĐC thành phẩm loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa.

Bảng 3.13 *Mối tương quan giữa nước uống đóng chai thành phẩm và vỏ bình sau công đoạn súc rửa theo chỉ tiêu coliform*

Chỉ tiêu		Coliform (NUĐC)	Coliform (Vỏ bình)
Coliform (NUĐC)	r	1	0,326
	ρ		0,001
Coliform (Vỏ bình)	r	0,326	1
	ρ	0,001	

r: hệ số tương quan

Kết quả phân tích ở Bảng 3.13 cho thấy có mối tương quan giữa việc ô nhiễm coliform trong NUĐC (19-21 lít) thành phẩm và coliform trong vỏ bình tái sử dụng ($\rho < 0,05$, $r = 0,326$). Điều này cho thấy có mối liên quan khá chặt chẽ giữa ô nhiễm coliform trong vỏ bình tái sử dụng và coliform trong NUĐC loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

Bảng 3.14 Mối tương quan giữa nước uống đóng chai thành phẩm và vỏ bình sau công đoạn súc rửa theo chỉ tiêu *P. aeruginosa*

Chỉ tiêu		<i>P. aeruginosa</i> (NUĐC)	<i>P. aeruginosa</i> (Vỏ bình)
<i>P. aeruginosa</i> (NUĐC)	r	1	0,271
	ρ		0,009
<i>P. aeruginosa</i> (Vỏ bình)	r	0,271	1
	ρ	0,009	

r: hệ số tương quan

Tương tự, kết quả phân tích ở Bảng 3.14 cũng cho thấy có mối tương quan giữa việc ô nhiễm *P. aeruginosa* trong NUĐC (19-21 lít) và *P. aeruginosa* trong vỏ bình tái sử dụng ($\rho < 0,05$, $r = 0,271$). Trong khi coliform và *P. aeruginosa* là các loài có khả năng hình thành màng sinh học, giúp chúng bám dính tốt bên trong bề mặt vỏ bình. Do đó, nếu các vỏ bình tái sử dụng chỉ được súc rửa thông thường bằng nước sạch mà không sử dụng hóa chất tẩy rửa hoặc nếu có sử dụng hóa chất tẩy rửa nhưng không đúng loại hoặc nồng độ khuyến cáo thì khó có thể loại sạch được sự bám dính của các loài này bên trong vỏ bình. Kết quả này cũng phần nào lý giải được nguyên nhân vì sao tỷ lệ nhiễm coliform và *P. aeruginosa* thường khá cao trong sản phẩm NUĐC loại 19-21 lít ở nước ta nói chung và Khánh Hòa nói riêng.

Qua đó cho thấy việc vệ sinh vỏ bình không đảm bảo chính là một trong những yếu tố gây ô nhiễm VSV (đặc biệt là đối với 02 chỉ tiêu coliform và *P. aeruginosa*) trong NUĐC (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022. Kết quả này cũng phù hợp với thông báo của tác giả Đỗ Mạnh Hùng (2016) tại

Hung Yên khi khẳng định việc sử dụng vỏ bình tái sử dụng nhiều lần có nguy cơ gây nhiễm VSV rất cao trong sản phẩm nước uống đóng bình [8].

3.2.3. Yếu tố vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm

3.2.3.1. Thực trạng nhiễm vi sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm

Phân tích tỷ lệ nhiễm vi sinh bề mặt vòi chiết rót tại các cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa năm 2022 cho thấy, có 6,5% (6/93) cơ sở có tỷ lệ nhiễm coliform bên trong bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm với số lượng trung bình $1,2 \times 10^1$ CFU/10 cm² và chỉ có 01 mẫu (1,1%) nhiễm *P. aeruginosa* với số lượng 7 CFU/10 cm² (Bảng 3.15).

Bảng 3.15 Tỷ lệ nhiễm vi sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm

Chỉ tiêu	Số mẫu nhiễm	
	Tần số	Tỷ lệ (%)
Coliform	6	6,5
<i>P. aeruginosa</i>	1	1,1

Kết quả phân tích cũng cho thấy lượng tổng số VSV dị dưỡng (HPC) nhiễm ở bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa là khá cao (trung bình $1,4 \times 10^5$ CFU/10 cm²). Đồng thời, kết quả phân tích chỉ số ATP bề mặt vòi chiết rót cũng cho thấy có tới 77,4% (72/93) mẫu không đạt yêu cầu (trung bình $4,9 \times 10^3$ RLU/10 cm²). Qua đó cho thấy việc vệ sinh, khử khuẩn đường ống trong hệ thống sản xuất ở nhiều cơ sở sản xuất NUĐC tại Khánh Hòa vẫn chưa được đảm bảo. Trong khi đã có các nghiên cứu cho thấy có mối tương quan giữa sự gia tăng số lượng VSV dị dưỡng và mức độ hình thành màng sinh học trong hệ thống sản xuất [46]. Do đó, đối với các cơ sở nhiễm số lượng lớn VSV dị dưỡng bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm cũng cho thấy mức độ hình thành màng sinh học trong hệ thống sản xuất cũng khá cao và không đảm bảo cho quy trình sản xuất NUĐC.

3.2.3.2. *Mối liên quan giữa vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai*

Phân tích mối liên quan giữa vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và chất lượng NUĐC cho thấy các mẫu NUĐC thu thập ở các cơ sở không đạt về vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm có 66,7% không đạt về chất lượng NUĐC, thấp hơn ở các cơ sở đạt về vệ sinh bề mặt vòi chiết rót (73,6%), sự khác biệt giữa các tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê ($\rho > 0,05$) (Bảng 3.16).

Bảng 3.16 *Mối liên quan giữa vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai (n=93)*

Vệ sinh bề mặt vòi chiết rót	Chất lượng nước uống đóng chai		
	Đạt	Không đạt	ρ
Đạt	23 (26,4)	64 (73,6)	0,712
Không đạt	2 (33,3)	4 (66,7)	

Mặc dù kết quả kiểm tra vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất cho thấy ở một số cơ sở vẫn có nhiễm coliform và *P. aeruginosa* bên trong vòi chiết rót, tuy nhiên kết quả phân tích ở Bảng 3.15 cho thấy chưa phát hiện mối liên quan giữa yếu tố vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất với việc ô nhiễm vi sinh trong NUĐC thành phẩm loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022. Tuy nhiên, việc ô nhiễm số lượng lớn tổng số vi sinh vật dị dưỡng bên trong bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm cũng cho thấy hệ thống sản xuất nước tại một số cơ sở vẫn chưa đảm bảo yêu cầu. Do đó, các cơ sở sản xuất cần kiểm soát chặt chẽ quy trình vệ sinh thiết bị, đường ống, cũng như không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm tại cơ sở mình, thường xuyên kiểm tra, đánh giá hệ thống sản xuất nhằm xử lý kịp thời sự gia tăng đột biến của các loài vi khuẩn gây ảnh hưởng đến chất lượng NUĐC thành phẩm.

3.2.4. Yếu tố vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm

3.2.4.1. Thực trạng nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm

Hiện nay, ở nước ta vẫn chưa có tiêu chuẩn quy định về số lượng VSV trong không khí, tuy nhiên, tài liệu hướng dẫn “Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh nước và không khí” của Bộ Y tế (2012) đã giới thiệu các ngưỡng đánh giá đối với VSV trong không khí căn cứ vào một số tài liệu quốc tế. Theo tài liệu này, không khí trong nhà được đánh giá ở mức bản khi kết quả vi sinh không khí cao hơn 2500 CFU/m³ [43]. Kết quả phân tích cho thấy có 14% (13/93) cơ sở sản xuất NUĐC ở Khánh Hòa năm 2022 có không khí phòng chiết rót ở mức bản với số lượng trung bình $1,6 \times 10^3$ CFU/m³. Trong đó có 4/13 mẫu nhiễm tổng số nấm mốc với số lượng trung bình $1,1 \times 10^3$ CFU/m³ (Bảng 3.17). Việc ô nhiễm nấm mốc với số lượng cao trong không khí phòng chiết rót nước thành phẩm cũng là một trong các yếu tố nguy cơ gây ô nhiễm vào sản phẩm NUĐC trong quá trình chiết rót.

Bảng 3.17 Tỷ lệ nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm

Chỉ tiêu	Mẫu không đạt		
	Tần số	Tỷ lệ (%)	Số lượng trung bình (CFU/m ³)
HPC	13	14,0	$1,6 \times 10^3$
Tổng số nấm mốc	4	4,3	$1,1 \times 10^3$

3.2.4.2. Mối liên quan giữa ô nhiễm vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu NUĐC thu thập tại các cơ sở không đạt về vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm có 76,9% không đạt về chất lượng NUĐC, tỷ lệ này ở các cơ sở đạt về điều kiện vi sinh không khí là 72,5%, sự khác biệt giữa 02 tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 3.18). Qua đó cho thấy yếu tố vi sinh không khí khu vực chiết

rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất không có mối liên quan đến sự ô nhiễm vi sinh trong NUĐC thành phẩm sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

Bảng 3.18 Mối liên quan giữa ô nhiễm vi sinh không khí và chất lượng nước uống đóng chai thành phẩm ($n=93$)

Vi sinh không khí	Chất lượng nước uống đóng chai		
	Đạt	Không đạt	ρ
Đạt	22 (27,5)	58 (72,5)	0,178
Không đạt	3 (23,1)	10 (76,9)	

Mặc dù kết quả phân tích cho thấy không có sự liên quan giữa yếu tố vi sinh không khí khu vực chiết rót và chất lượng NUĐC thành phẩm, tuy nhiên, việc ô nhiễm lượng lớn nấm mốc (10^3 CFU/m³) trong không khí phòng chiết rót cũng đồng nghĩa với việc thực hành vệ sinh tại một số cơ sở chưa được đảm bảo. Trong khi các bào tử nấm mốc phát tán trong không khí rất dễ gây nhiễm vào bình nước trong quá trình chiết rót, đóng nắp, do đó có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng khi sử dụng phải các sản phẩm NUĐC bị ô nhiễm.

Kết quả phân tích ở các Bảng 3.8; 3.12; 3.16 và 3.18 cho thấy trong số các yếu tố phân tích như nguồn nước sản xuất, vệ sinh vỏ bình tái sử dụng, vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm thì việc vệ sinh vỏ bình tái sử dụng không đảm bảo có mối liên quan khá chặt chẽ với ô nhiễm VSV trong NUĐC loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022, đặc biệt là đối với 02 chỉ tiêu coliform và *P. aeruginosa*. Trong khuôn khổ đề tài này, một số yếu tố khác thuộc về cơ sở sản xuất như điều kiện cơ sở vật chất, trang thiết bị, dụng cụ sản xuất, kiến thức thái độ thực hành của người tham gia sản xuất, công tác kiểm tra giám sát của cơ quan quản lý an toàn thực phẩm ở địa phương... chưa được đưa vào phân tích mối liên quan. Do đó, vỏ bình tái sử dụng có thể là một trong những nguyên nhân quan trọng gây ô nhiễm vi sinh vật trong NUĐC thành phẩm loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022.

Mặc dù kết quả phân tích cho thấy không có mối liên quan của các yếu tố nước nguồn, vệ sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm và vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm đến chất lượng NUĐC (19-21 lít) thành phẩm, tuy nhiên kết quả nghiên cứu cũng cho thấy các yếu tố này vẫn chưa đảm bảo yêu cầu về vi sinh và đều có tỷ lệ không đạt nhất định: nước nguồn (20,4%), vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm (14%), bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm (6,5%). Trong khi đây cũng là các yếu tố cần phải được kiểm soát, đảm bảo yêu cầu về vi sinh trong quy trình sản xuất NUĐC, do đó các cơ sở cần có các biện pháp chặt chẽ hơn trong quy trình kiểm soát nhiễm khuẩn nhằm khắc phục tình trạng ô nhiễm vi sinh tại các vị trí này cũng như trong toàn bộ hệ thống sản xuất, góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm NUĐC sản xuất trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.

Việc phát hiện mối liên quan giữa ô nhiễm 02 chỉ tiêu coliform và *P. aeruginosa* trong NUĐC thành phẩm dung tích 19-21 lít với ô nhiễm 02 chỉ tiêu này ở bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng ($p < 0,05$) trong nghiên cứu này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc giúp các cơ sở sản xuất tìm ra nguyên nhân và biện pháp khắc phục. Vì đây là 02 loại vi khuẩn thường được phát hiện với tỷ lệ và số lượng khá cao trong NUĐC sản xuất ở nước ta nói chung và Khánh Hòa nói riêng. Ngoài ra, các loài này còn có khả năng hình thành màng sinh học, bám dính tốt bên trong vỏ bình, do đó nếu các cơ sở sản xuất chỉ sử dụng các biện pháp súc rửa thông thường thì không thể loại bỏ triệt để vi khuẩn khỏi vỏ bình và cứ thế chúng sẽ lây nhiễm sang nước thành phẩm đóng vào bình chuyển đến tay người tiêu dùng.

Kết quả nghiên cứu đã cung cấp dữ liệu khoa học về thực trạng ô nhiễm VSV trong NUĐC dung tích 19-21 lít và các yếu tố liên quan đến ô nhiễm VSV trong sản phẩm này tại các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa. Đồng thời làm cơ sở cho các nhà quản lý trong việc quản lý, giám sát các sản phẩm NUĐC và đề xuất các biện pháp giúp các cơ sở sản xuất tại Khánh Hòa khắc phục thực trạng ô nhiễm vi sinh khá phổ biến hiện nay trong NUĐC, đặc biệt là đối với sản phẩm NUĐC dung tích 19-21 lít.

3.3. ĐỀ XUẤT MỘT SỐ BIỆN PHÁP HẠN CHẾ Ô NHIỄM VI SINH VẬT TRONG NUỚC LOẠI 19-21 LÍT SẢN XUẤT TẠI KHÁNH HÒA

3.3.1. Đối với quy trình súc rửa vỏ bình nước tái sử dụng

Kết quả nghiên cứu cho thấy ô nhiễm vi sinh trong NUỚC 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa có mối liên quan chặt chẽ đến vỏ bình tái sử dụng không đảm bảo yêu cầu vi sinh. Hiện tại, ở nước ta vẫn chưa có quy trình chuẩn đối với việc súc rửa vỏ bình nước tái sử dụng. Quy trình súc rửa vỏ bình tái sử dụng còn tùy thuộc vào công nghệ sử dụng là tự động, bán tự động hay thủ công. Tại Khánh Hòa chỉ có 02 cơ sở sản xuất NUỚC có quy trình súc rửa vỏ bình tự động, còn lại hầu hết các cơ sở súc rửa vỏ bình theo cách thủ công và một số ít cơ sở theo dạng bán tự động.

Căn cứ kết quả khảo sát thực tế tại các cơ sở sản xuất NUỚC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa, đồng thời căn cứ Tài liệu tập huấn kiến thức về an toàn thực phẩm cho người trực tiếp sản xuất, chế biến thực phẩm của Cục An toàn thực phẩm - Bộ Y tế (2013) [53], nghiên cứu đề xuất quy trình súc rửa vỏ bình tái sử dụng qua các bước sau:

Bước 1: Vệ sinh bên ngoài bình

- Sau khi thu vỏ bình về, tiến hành tháo nhãn, màng co trên thân bình (không mở nắp bình);

- Vệ sinh bên ngoài vỏ bình bằng dung dịch súc rửa phù hợp theo quy định của Bộ Y tế, sau đó rửa lại bằng nước sạch để hạn chế vấy bẩn từ ngoài vào bên trong bình.

Bước 2: Vệ sinh bên trong bình, kiểm tra nắp, vòi

- Sau khi vệ sinh sạch bên ngoài bình, tiến hành mở nắp, kiểm tra mùi và mức độ nhiễm bẩn bên trong bình. Để kiểm tra vỏ bình có bị sử dụng với mục đích khác bởi người tiêu dùng hay không, cơ sở sản xuất cần phải bọc lớp màng co hoặc nhãn niêm phong nắp bình để có dấu hiệu nhận biết khi bình đã bị mở nắp. Nếu vỏ bình không còn lớp bọc màng co nắp (hoặc nhãn niêm phong) thì khả năng nắp bình đã bị mở để sử dụng cho mục đích khác. Đối với những bình này cần phải kiểm tra kỹ mùi và mức độ nhiễm bẩn bên trong bình;

- Nếu trong bình có mùi lạ phải tiến hành xử lý, trường hợp không xử lý được mùi hoặc độ bẩn bên trong bình, cần phải loại bỏ các bình này để tránh gây nhiễm vào sản phẩm NUDC;

- Hạn chế tái sử dụng các vỏ bình đã cũ và bề mặt bên trong vỏ bình bị trầy xước, không trơn nhẵn;

- Kiểm tra, vệ sinh nắp và vòi: Loại bỏ các nắp cũ, xước. Hạn chế tái sử dụng nhiều lần đối với vòi, vì chúng có các khe nhỏ bên trong nên việc vệ sinh, khử nhiễm tại các vị trí này bị hạn chế, khó đảm bảo loại sạch bụi bẩn, vi khuẩn bên trong vòi;

- Rửa bên trong vỏ bình bằng dụng cụ cọ rửa phù hợp (ví dụ: máy rửa vỏ bình). Sau khi rửa xong, cần phải ngâm bình qua dung dịch hóa chất khử khuẩn được phép sử dụng theo quy định của Bộ Y tế với nồng độ, thời gian phù hợp (ví dụ: dung dịch chloramin B). Sau đó rửa vỏ bình bằng nước sạch và tráng lại bình bằng nước thành phẩm để đảm bảo loại bỏ sạch dung dịch hóa chất khử khuẩn bên trong bình.

Bước 3: hong khô vỏ bình

Kiểm tra bình, nắp, vòi xem có còn mùi lạ hay không. Sau đó chuyển bình vào khu vực hong khô, khử khuẩn. Bình được hong khô bằng cách úp ngược trên các giá treo để tránh bụi bẩn, vật lạ rơi vào trong bình.

Bước 4: Khử khuẩn vỏ bình

Sau khi vỏ bình đã được hong khô, tiến hành khử khuẩn vỏ bình (bằng tia UV, khí ozone hoặc bất kỳ công nghệ nào không làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm) để đảm bảo vỏ bình được khử khuẩn trước khi đưa vào công đoạn chiết rót nước thành phẩm.

Các vỏ bình sau khi súc rửa, khử khuẩn sạch sẽ, nên được sử dụng chiết rót, đóng nắp ngay trong ngày, tránh trường hợp để lâu, bụi bẩn trong môi trường bám lại vào vỏ bình gây tái nhiễm.

3.3.2. Đề xuất một số biện pháp khác

Kết quả khảo sát quy trình kiểm soát nhiễm khuẩn tại các cơ sở sản xuất NUDC còn cho thấy một số cơ sở chưa đạt yêu cầu đối với một số yếu tố như:

nguồn nước sản xuất, vệ sinh vòi chiết rót nước thành phẩm, vi sinh không khí khu vực chiết rót nước thành phẩm. Do đó, các cơ sở sản xuất NUĐC cần tuân thủ và thực hiện đầy đủ các điều kiện đảm bảo an toàn thực phẩm theo quy định cụ thể tại khoản 2 Điều 2 Nghị định 155/2018/NĐ-CP như sau:

1. Tuân thủ các quy định tại Điều 19, 20, 21, 22, 25, 26 và Điều 27 Luật an toàn thực phẩm và các yêu cầu cụ thể sau:

a) Quy trình sản xuất được bố trí theo nguyên tắc một chiều từ nguyên liệu đầu vào cho đến sản phẩm cuối cùng;

b) Tường, trần, nền nhà khu vực sản xuất, kho bảo quản sản phẩm không thấm nước, rạn nứt, ẩm mốc;

c) Trang thiết bị, dụng cụ tiếp xúc trực tiếp với thực phẩm dễ làm vệ sinh, không thôi nhiễm chất độc hại và không gây ô nhiễm đối với thực phẩm;

d) Trang bị ủng hoặc giày, dép để sử dụng riêng trong khu vực sản xuất;

đ) Bảo đảm không có côn trùng và động vật gây hại xâm nhập vào khu vực sản xuất và kho bảo quản sản phẩm; không sử dụng hoá chất diệt chuột, côn trùng và động vật gây hại trong khu vực sản xuất và kho bảo quản sản phẩm;

2. Người trực tiếp sản xuất phải được tập huấn kiến thức an toàn thực phẩm và được chủ cơ sở xác nhận và không bị mắc các bệnh tả, lỵ, thương hàn, viêm gan A, E, viêm da nhiễm trùng, lao phổi, tiêu chảy cấp khi đang sản xuất, kinh doanh thực phẩm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Thực trạng ô nhiễm vi sinh trong NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022

- Tình trạng ô nhiễm VSV trong NUĐC loại 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022 vẫn còn khá phổ biến, 73,1% (68/93) mẫu NUĐC (19-21 lít) không đạt yêu cầu vi sinh. Cụ thể, Khánh Sơn 100% (1/1), Khánh Vĩnh 100%, (1/1), Vạn Ninh 84,6% (11/13), Ninh Hòa 81,8% (18/22), Nha Trang 80%, (20/25), Diên Khánh 70% (7/10), Cam Ranh 60% (9/15) và Cam Lâm 16,7%, (1/6).

- Tỷ lệ mẫu NUĐC (19-21 lít) không đạt yêu cầu vi sinh do ô nhiễm các loại vi khuẩn sau: cao nhất là *P. aeruginosa* 68,8% (64/93), thấp hơn là coliform 46,2% (43/93), *S. feacal* 2,2% (2/93), Clostridia 2,2% (2/93) và *E. coli* 1,1%, (1/93).

- Phân bố số lượng vi khuẩn *P. aeruginosa* và coliform trong NUĐC (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa vượt xa giới hạn cho phép (Không phát hiện) theo quy định của QCVN 6-1:2010/BYT. Cụ thể, *P. aeruginosa* ($3 - 1,0 \times 10^4$ CFU/250 mL) và coliform ($3 - 5,0 \times 10^2$ CFU/250 mL). Các vi khuẩn khác được phát hiện với số lượng thấp như: *E. coli* (3 CFU/250 mL), *S. feacal* (1-3 CFU/250 mL) và Clostridia (1-2 CFU/50 mL).

2. Yếu tố liên quan đến ô nhiễm vi sinh vật trong NUĐC dung tích 19-21 lít sản xuất tại Khánh Hòa năm 2022

- Xác định được yếu tố vỏ bình tái sử dụng có mối liên quan khá chặt chẽ đến ô nhiễm VSV trong NUĐC (19-21 lít) sản xuất tại Khánh Hòa. Cụ thể, phát hiện vỏ bình sau súc rửa nhiễm coliform (36,6%), *P. aeruginosa* (14%) và *E. coli* (3,2%). Phát hiện có mối liên quan giữa ô nhiễm 02 chỉ tiêu coliform và *P. aeruginosa* trong NUĐC (19-21 lít) với ô nhiễm 02 chỉ tiêu này ở bề mặt bên trong vỏ bình tái sử dụng.

- Các yếu tố khác: Có 20,4% mẫu nước nguồn đầu vào, 6,5% mẫu vệ sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót và 14% mẫu không khí khu vực chiết rót

không đạt yêu cầu về vi sinh. Tuy nhiên, chưa phát hiện mối liên quan giữa các yếu tố này với ô nhiễm VSV trong NUĐC thành phẩm loại 19-21 lít.

KIẾN NGHỊ

1. Đối với các cơ sở sản xuất NUĐC

Cần đánh giá định kỳ (hàng quý) toàn bộ quy trình kiểm soát nhiễm khuẩn, đặc biệt là quy trình súc rửa đối với vỏ bình tái sử dụng. Ngoài ra, các cơ sở sản xuất cũng cần kiểm tra đột xuất 01 lần/tháng ở những công đoạn có nguy cơ cao về ô nhiễm VSV trong hệ thống sản xuất nhằm đánh giá ngẫu nhiên mức độ kiểm soát nhiễm khuẩn tại công đoạn này để phát hiện kịp thời và có hướng xử lý, khắc phục phù hợp.

2. Đối với cơ quan quản lý an toàn thực phẩm

- Tăng cường công tác kiểm tra, hậu kiểm các sản phẩm NUĐC dung tích 19-21 lít nhằm phát hiện kịp thời các cơ sở sản xuất NUĐC có sản phẩm không đạt chất lượng để có biện pháp chế tài phù hợp.

- Đẩy mạnh công tác truyền thông, tập huấn nhằm nâng cao nhận thức cho các chủ cơ sở và người trực tiếp tham gia sản xuất trong việc đảm bảo ATTP đối với sản phẩm NUĐC.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

TT	Tác giả	Tên kết quả công bố/đăng ký	Tên tạp chí/ Nơi công bố	Năm công bố
1	Nguyễn Thị Ngọc Duyên, Lê Quốc Phong, Trần Thị Thùy Nga, Đào Thị Vân Khánh, Phan Thị Hoài Trinh, Đỗ Thái Hùng	Thực trạng ô nhiễm vi sinh nguồn nước sản xuất nước uống đóng chai trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa năm 2022	Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm, 6(1), 100-106.	2023
2	Lê Quốc Phong, Trần Thị Thùy Nga, Nguyễn Thị Ngọc Duyên, Đào Thị Vân Khánh, Nguyễn Văn Tuyên, Võ Thị Kiều Oanh, Lê Hồng Quân, Đỗ Thái Hùng	Thực trạng ô nhiễm vi sinh bề mặt bên trong vỏ bình nước tái sử dụng tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai ở Khánh Hòa năm 2022	Hội nghị khoa học Y học dự phòng toàn quốc năm 2023, 176-177.	2023

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, 2010, *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với nước khoáng thiên nhiên đóng chai và nước uống đóng chai - QCVN 6-1/2010/BYT*, Hà Nội.
2. Uhlenbrook S., Connor R., 2019, *The United Nations world water development report 2019: Leaving no one behind*, United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, Paris.
3. World Health Organization, 2021, *A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality*, World Health Organization, Geneva.
4. Beverate M. C., 2019, *Beverage Marketing's 2018 Market Report Findings*, accessed 2 March 2022, from https://bottledwater.org/wp-content/uploads/2020/03/2018BottledWaterStats_pub2019.pdf.
5. Beverate M. C., 2021, *Bottled water 2020: U.S. and International Developments and Statistics*, accessed 2 March-2022, from https://bottledwater.org/wp-content/uploads/2021/07/2020BWstats_BMC_pub2021BWR.pdf.
6. Research T., 2020, *Vietnam bottled water market*, accessed 21 December-2022, from <https://www.techsciresearch.com/report/vietnam-bottled-water-market/3708.html>.
7. Võ Thị Kim Hạnh, 2016, *Nghiên cứu đánh giá thực trạng nhiễm vi sinh vật trên sản phẩm nước uống đóng chai tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng chai trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa và đề xuất giải pháp khắc phục*, Luận văn Thạc sĩ, Đại học Nha Trang, Khánh Hòa.
8. Đỗ Mạnh Hùng, 2016, *Thực trạng nhiễm vi sinh đối với nước uống đóng bình trên địa bàn tỉnh Hưng Yên trong năm 2016*, *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, 12(6), tr. 316-322.
9. Trần Mai Thị Huyền Trân, 2019, *Đánh giá thực trạng ô nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai trên địa bàn tỉnh Ninh Thuận năm 2018*, Đề tài cơ sở, Trung tâm Kiểm soát bệnh tật - Sở Y tế Ninh Thuận, Ninh Thuận.

10. World Health Organization, 2017, *Guidelines for drinking-water quality: first addendum to the fourth edition*, World Health Organization, Geneva.
11. World Health Organization, 2019, *Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals*, World Health Organization, Geneva.
12. Craun F., Brunkard M., Yoder S., Roberts A., Carpenter J., Wade T., Roy L., 2010, Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006, *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), pp. 507-528.
13. Mac Kenzie R., Hoxie J., Proctor E., Gradus S., Blair A., Peterson E., Rose B., 1994, A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, *New England journal of medicine*, 331(3), pp. 161-167.
14. Food Safety Authority of Ireland, 2009, *The consumption of bottled water containing certain bacteria or groups of bacteria and the implications for public health*, Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland, Ireland.
15. Chi cục An toàn vệ sinh thực phẩm - Sở Y tế Khánh Hòa, 2014, *Báo cáo tổng kết công tác an toàn thực phẩm tỉnh Khánh Hòa 6 tháng đầu năm 2014*.
16. Cao Thanh Diễm Thúy, 2016, Tỷ lệ nhiễm vi sinh vật nước uống đóng chai và một số yếu tố liên quan đến điều kiện bảo đảm an toàn vệ sinh thực phẩm tại cơ sở nước uống đóng chai tỉnh Bến Tre năm 2016, *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, 12(6), tr. 361-367.
17. Pointet T., 2022, The United Nations World Water Development Report 2022 on groundwater, a synthesis, *Hydroscience Journal*, 108(1), pp. 1-21.
18. Công ty Cổ phần TM Đại Chí, *Quy trình sản xuất nước uống đóng bình đóng chai*, truy cập ngày 28/2/2022 tại trang <https://maylocnuochcm.vn/quytrinh-san-xuat-nuoc-uong-dong-binh-dong-chai/>.
19. Công ty TNHH TM DV Kỹ thuật Trung Nam, *Quy trình hoạt động của dây chuyền sản xuất nước tinh khiết đóng bình*, truy cập ngày 28/2/2022, tại

trang <https://locnuoctrungnam.com/tin-tuc/quy-trinh-hoat-dong-cua-day-chuyen-san-xuat-nuoc-tinh-khiet-dong-binh-201.html>.

20. Bộ Y tế, 2013, *Quy trình xét nghiệm vi sinh vật y học*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, Hà Nội.
21. Vergine P., Salerno C., Barca E., Berardi G., Pollice A., 2017, Identification of the faecal indicator *Escherichia coli* in wastewater through the β -D-glucuronidase activity: comparison between two enumeration methods, membrane filtration with TBX agar, and Colilert®-18, *Journal of Water and Health*, 15(2), pp. 209-217.
22. Trần Linh Thuớc, 2006, *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Nhà xuất bản Giáo dục, Thành phố Hồ Chí Minh.
23. Girão M., Girao B., Irino K., Gomes T., 2006, Classifying *Escherichia coli*, *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), pp. 1297-1299.
24. Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El Jaziri M., 2015, The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms, *BioMed research international*, 2015, pp. 1-17.
25. Kenner A., Clark F., Kabler W., 1961, Fecal streptococci: Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters, *Applied microbiology*, 9(1), pp. 15-20.
26. Wells L., Wilkins D., 1996, *Clostridia: sporeforming anaerobic bacilli*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
27. Rygala A., Berlowska J., Kregiel D., 2020, Heterotrophic plate count for bottled water safety management, *Processes*, 8(6), pp. 739-749.
28. Dege N., 2011, *Technology of bottled water*, John Wiley & Sons.
29. Al Moosa E., Khan A., Alalami U., Hussain A., 2015, Microbiological quality of drinking water from water dispenser machines, *International Journal of Environmental Science and Development*, 6(9), pp. 710-713.
30. Kouchesfahani M., Alimohammadi M., Nodehi R., Aslani H., Rezaie S., Asadian S., 2015, *Pseudomonas aeruginosa* and heterotrophic bacteria

- count in bottled waters in Iran, *Iranian journal of public health*, 44(11), p. 1514.
31. Gautam B., 2021, Microbiological quality assessment (including antibiogram and threat assessment) of bottled water, *Food Science & Nutrition*, 9(4), pp. 1980-1988.
 32. Phạm Thị Oanh Oanh, 2019, *Đánh giá tình trạng nhiễm khuẩn Pseudomonas aeruginosa trong nước uống đóng bình loại 19,5L*, Luận văn Thạc sĩ, Học viện Khoa học & Công nghệ, Hà Nội.
 33. Nguyễn Thị Ngọc Duyên, 2020, *Thực trạng nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai tại một số tỉnh Nam Trung Bộ năm 2019*, Đề tài cơ sở, Viện Pasteur Nha Trang.
 34. Kassenga G., Mbuligwe S., 2009, Comparative assessment of physico-chemical quality of bottled and tap water in Dar es Salaam, Tanzania, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(2), pp. 209-217.
 35. Ahmed W., Yusuf R., Hasan I., Ashraf W., Goonetilleke A., Toze S., Gardner T., 2013, Fecal indicators and bacterial pathogens in bottled water from Dhaka, Bangladesh, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), pp. 97-103.
 36. Gangil R., Tripathi R., Patyal A., Dutta P., Mathur K., 2013, Bacteriological evaluation of packaged bottled water sold at Jaipur city and its public health significance, *Veterinary World*, 6(1), p. 27.
 37. Nguyễn Vũ Thuận, Phạm Văn Doanh, Nguyễn Thị Thu Hiền, 2019, Thực trạng ô nhiễm vi sinh trong nước uống đóng chai tại khu vực 5 tỉnh Tây Nguyên, *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, 2(3), tr. 86-89.
 38. Nguyễn Duy Long, Võ Thị Kiều Oanh, 2014, Đánh giá tình hình nhiễm vi sinh vật trong nước uống tại tỉnh Khánh Hòa năm 2011-2012, *Tạp chí Y học thực hành*, 933+934, tr. 203-205.
 39. Arcival L., Walker T., Hunter R., 2000, *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*, CRC Press.

40. Flemming H., Wingender J., 2010, The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), pp. 623-633.
41. Bộ Y tế, 2018, *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước sạch sử dụng cho mục đích sinh hoạt - QCVN 01-1:2018/BYT*, Hà Nội.
42. Environmental Protection Agency, 2023, *National Primary Drinking Water Regulations*, Environmental Protection Agency, United States.
43. Bộ Y tế., 2012, *Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh nước và không khí*, Nhà Xuất Bản Y học, Hà Nội.
44. Etter J., Hammons R., Roof S., Simmons C., Wu T., Cook W., Warchocki S., 2017, Enhanced sanitation standard operating procedures have limited impact on *Listeria monocytogenes* prevalence in retail delis, *Journal of food protection*, 80(11), pp. 1903-1912.
45. Centres for Disease Control Prevention, 2013, *Antibiotic resistance threats in the United States 2013*, United States Department of Health and Human Services, United States.
46. Bartram J., Cotruvo J., Exner M., Fricker C., Glasmacher A., 2003, *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety*, International Water Association, London.
47. Wolfe L., 1990, Ultraviolet disinfection of potable water, *Environmental Science Technology*, 24(6), pp. 768-773.
48. Trần Minh Phương, Lê Thị Thu Hà, Vũ Đình Thiêm, Vũ Hải Hà, 2019, Thực trạng nhiễm vi sinh vật trong nước uống đóng chai tại các cơ sở sản xuất trên địa bàn tỉnh Hưng Yên năm 2018, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 29(2), tr. 87-94.
49. Lê Thị Thanh Hương, Trần Khánh Long, Phùng Xuân Sơn, Nguyễn Thanh Hà, Lê Văn Chính, Nguyễn Thị Liên Hương, 2016, Thực trạng chất lượng nước sông Thị Vải và nước ăn uống, sinh hoạt của người dân tại 3 xã Long Phước, Phước Thái và Bình An, huyện Long Thành, tỉnh Đồng Nai năm 2011, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 11, tr. 171-180.

50. Doãn Ngọc Hải, Lê Thái Hà, Đỗ Phương Hiền, Đàm Thương Thương, Trần Thị Giáng Hương, 2015, Thực trạng chất lượng nước ăn uống, sinh hoạt tại các nhà máy, trạm cấp nước trên địa bàn thành phố Hà Nội năm 2014, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 4, tr. 184-189.
51. Phùng Thị Xuân Bình, Lê Thị Phương Quỳnh, Phạm Thị Mai Hương, 2019, Bước đầu khảo sát mật độ vi sinh vật trong nước sinh hoạt tại một số quận huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, 55, tr. 99-102.
52. Hawronskyj M., Holah J., 1997, ATP: A universal hygiene monitor, *Trends in Food Science & Technology*, 8(3), pp. 79-84.
53. Cục An toàn thực phẩm - Bộ Y tế, 2013, *Tài liệu tập huấn kiến thức về an toàn thực phẩm*, Cục An toàn thực phẩm - Bộ Y Tế, Hà Nội.

Phụ lục

Hình ảnh một số hoạt động của đề tài



Hoạt động khảo sát, thu thập thông tin và thu mẫu tại các cơ sở sản xuất NUĐC trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa.