

Thực trạng ô nhiễm vi sinh vật bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa

Lê Quốc Phong*, Nguyễn Thị Ngọc Duyên, Trần Thị Thùy Nga, Phùng Phương Lan Anh, Đoàn Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Tuyên, Nguyễn Bảo Triệu, Đỗ Thái Hùng

Viện Pasteur Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 28/07/2023; Ngày chấp nhận đăng: 28/08/2023)

Tóm tắt

Vòi chiết rót là nơi tiếp xúc cuối cùng của nước thành phẩm trước khi nước được đóng chai, đóng bình. Vì vậy, ô nhiễm vi sinh vật tại vị trí này có thể gây nhiễm chéo vào nước thành phẩm. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mô tả thực trạng ô nhiễm vi sinh bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa năm 2022. Tổng số 93 mẫu swab bề mặt bên trong vòi chiết rót tại 93 cơ sở được xét nghiệm chỉ số ATP (*Adenosine Triphosphate*), tổng số vi sinh vật hiếu khí (TPC), coliform, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococci fecal* và *Clostridia*. Kết quả phát hiện 72/93 (77,4%) mẫu có giá trị ATP cao hơn 300 RLU/cm². Giá trị ATP và TPC trung bình lần lượt là 3,1±0,8 log (RLU/cm²) và 3,5±1,2 log (CFU/cm²). Hai chỉ số ATP và TPC có mối liên quan tuyến tính với nhau, điều này cho thấy giá trị ATP bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm chủ yếu do vi sinh vật tạo thành. Ngoài ra, phát hiện 6/93 (6,5%) mẫu nhiễm coliform, trong đó gồm 3 chủng là *Enterobacter cloacae*, 2 chủng *Klebsiella pneumoniae* và 1 chủng *Enterobacter aerogenes*. Có 1/93 (1,1%) mẫu nhiễm *P. aeruginosa*. Tất cả 7 chủng vi khuẩn này đều có khả năng hình thành cấu trúc màng sinh học trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng công tác vệ sinh, khử nhiễm vòi chiết rót nước thành phẩm chưa được đảm bảo, từ đó làm gia tăng nguy cơ ô nhiễm vi sinh vật vào nước đóng bình thành phẩm.

Từ khóa: Vòi chiết rót, nước uống đóng bình, vệ sinh bề mặt, ô nhiễm vi sinh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước uống đóng chai nói chung và dạng đóng bình dung tích 19-21 lít hiện đang được sử dụng rất phổ biến tại các hộ gia đình, trường học, công sở. Vì vậy, việc ô nhiễm vi sinh vật gây bệnh trong sản phẩm nước uống trực tiếp này sẽ có ảnh hưởng lớn đến sức khỏe người tiêu dùng. Một số báo cáo ở Việt Nam cho thấy tỷ lệ nước uống đóng chai nhiễm khuẩn và không đạt yêu cầu vi sinh vật theo quy định tại QCVN 6-1:2010/BYT còn rất cao ở một số địa phương như Hưng Yên (33%), Bến Tre (36%), Đồng Tháp (23,3%), Lâm Đồng

*Điện thoại: 0935378301 Email: lequocphongipn@gmail.com

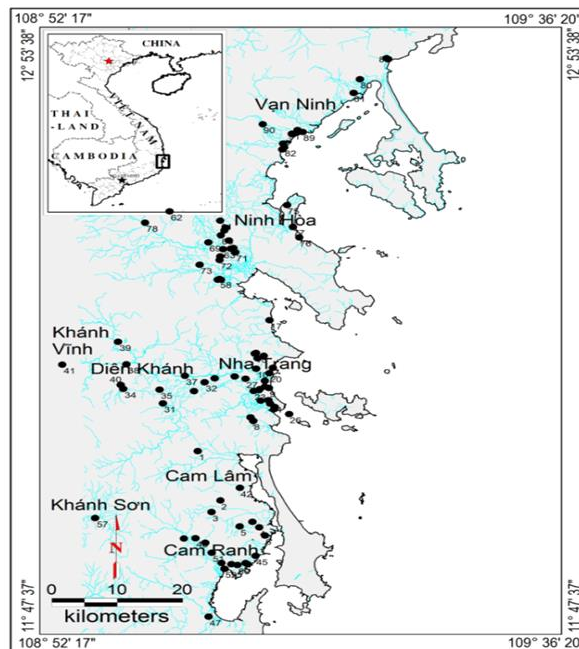
(60%), Đắk Nông (56,5%), Đắk Lắk (52,7%), Kon Tum (45,7%) và Gia Lai (38,3%) [1-4]. Nghiên cứu gần đây của Nguyễn Thị Ngọc Duyên (2019) tại một số tỉnh Nam Trung Bộ cho thấy tỷ lệ nước uống đóng bình lưu hành trên thị trường không đạt vi sinh khá cao, cụ thể như Bình Thuận (52%), Phú Yên (56%), Ninh Thuận (66%) và Khánh Hòa (68%) [5]. Nước uống đóng bình thành phẩm có thể ô nhiễm vi sinh vật từ nhiều nguyên nhân khác nhau trong các công đoạn của quá trình sản xuất [6]. Đặc biệt, công tác vệ sinh các bề mặt tiếp xúc trực tiếp với nước thành phẩm như vỏ bình tái sử dụng, các bể chứa nước thành phẩm và vòi chiết rót nước thành phẩm có vai trò rất quan trọng. Tại Việt Nam, chưa có bất kỳ khảo sát nào đánh giá tình trạng vệ sinh của vòi chiết rót nước thành phẩm - nơi tiếp xúc cuối cùng của nước thành phẩm trước khi nước được đóng bình để đưa ra thị trường tiêu thụ. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định tình trạng ô nhiễm vi sinh vật ở bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa năm 2022.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Vòi chiết rót nước thành phẩm tại toàn bộ 93 cơ sở sản xuất trên địa bàn 08 huyện/thị xã/thành phố thuộc tỉnh Khánh Hòa gồm Nha Trang (25 cơ sở), Ninh Hòa (22 cơ sở), Cam Ranh (15 cơ sở), Vạn Ninh (13 cơ sở), Diên Khánh (10 cơ sở), Cam Lâm (6 cơ sở), Khánh Sơn (1 cơ sở) và Khánh Vĩnh (1 cơ sở). Phân bố vị trí các điểm nghiên cứu theo tọa độ của cơ sở sản xuất nước uống đóng bình được trình bày ở Hình 1.

Thời gian thực hiện từ tháng 3 đến tháng 9 năm 2022.



Hình 1. Địa điểm thu mẫu tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa

2.2. Hóa chất, chủng chuẩn

Hóa chất, môi trường nuôi cấy:

Môi trường nuôi cấy chính do hãng Merck (Đức) cung cấp gồm Plate count agar, Violet Red Bile Lactose agar, Tryptone Bile X-glucuronide agar, Cetrimide agar, SLANETZ and BARTLEY agar và Tryptose Sulfite Cycloserine agar, tương ứng cho các chỉ tiêu TPC, coliform, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococci faecal* và *Clostridia*.

Sinh phẩm xét nghiệm chỉ tiêu ATP: que thử ATP bề mặt nhãn hiệu 3M™ Clean-Trace™ ATP surface test, hãng 3M, Mỹ.

Định danh đến loài các vi khuẩn thuộc nhóm coliform bằng bộ kit API20E (Biomerieux – Pháp)

Chủng chuẩn: Các chủng chuẩn *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 và *Clostridium perfringens* ATCC 13124 được sử dụng làm đối chứng dương trong quá trình xét nghiệm.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm thực hiện theo hướng dẫn lấy mẫu bề mặt tiếp xúc thực phẩm TCVN 8129:2019. Cụ thể, chọn đại diện một vòi chiết rót ở mỗi cơ sở sản xuất. Dùng thước dây xác định vùng diện tích lấy mẫu 10 cm² ở mặt trong vòi chiết rót, sử dụng que ATP để lấy mẫu vùng diện tích đã xác định, phân tích kết quả tại hiện trường bằng thiết bị 3M Clean-Trace Luminometer (Hãng 3M, Mỹ). Kết quả được chia 10 và biểu thị trên 1 cm². Tương tự, xác định diện tích 10 cm² ở nửa đối diện của vòi chiết rót đã lấy mẫu ATP, tiến hành lấy mẫu bề mặt bằng que 3M™ Quick Swab (Hãng 3M, Mỹ) để phân tích các chỉ tiêu vi sinh gồm TPC, coliform, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* và *Str. faecal* và *Clostridia*. Mẫu được bảo quản lạnh và chuyển về Viện Pasteur Nha Trang. Mẫu được pha loãng 10 lần bằng dung dịch đệm Buffered Peptone Water (BPW) trước khi xét nghiệm các chỉ tiêu vi sinh. Đối với các chỉ tiêu sử dụng phương pháp màng lọc, mẫu được tiếp tục pha loãng trong 100 mL nước cất vô trùng trước khi lọc mẫu. Kết quả được biểu thị trên 1 cm².

2.4.2. Phương pháp phân tích và đánh giá kết quả

Phân tích chỉ số ATP theo AOAC Performance Tested No. 041901; các chỉ tiêu TPC, coliform, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Str. faecal* và *Clostridia* tham khảo các phương pháp tiêu chuẩn tương ứng là ISO 4833-1:2013, ISO 4832:2006, ISO 16649-2:2001, ISO 16266:2006, ISO 7899-2:2000 và ISO 6461-2:1986. Mẫu được phân tích lặp lại số đĩa đếm theo yêu cầu của phương pháp thử tương ứng và phù hợp TCVN 6404:2016 và ISO 8199:2018. Các chủng vi khuẩn coliform sẽ được định danh đến loài bằng bộ kit API20E.

Các chủng vi khuẩn coliform và *P. aeruginosa* phân lập được sẽ tiến hành thử nghiệm khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) theo phương pháp được mô tả bởi Seno Y. & cộng sự (2005) [7]. Cụ thể, các chủng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trong môi trường tryptic soy broth có bổ sung 0,25% glucose (TSBG) ở 37 °C trong 24 giờ. Dịch cấy được pha loãng trong TSBG theo tỷ lệ 1:100. Chuyển 200 µL dịch khuẩn đã pha loãng vào đĩa 96 giếng đáy phẳng. Sau khi ủ ở 37 °C/24 giờ, tiến hành rửa 3 lần mỗi giếng bằng 300 µL dung dịch phosphate buffer saline (PBS, pH 7,0) vô trùng. Để khô ở nhiệt độ phòng và nhuộm bằng crystal violet (2%). Rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng để tẩy nhuộm. Bổ sung 300 µL dung dịch ethanol: acetic acid (95:5 v/v) vào mỗi giếng, sau đó chuyển 100 µL sang đĩa 96 giếng mới và đo giá trị OD ở bước sóng 570 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chủng sinh biofilm *E. coli* O42 được sử dụng làm đối chứng dương và chủng *E. coli* C600 được sử dụng làm đối chứng âm [8]. Khả năng hình thành màng sinh học được phân loại theo 3 mức: sinh biofilm mạnh ($OD_{570} \geq 0,5$), sinh biofilm trung bình ($0,2 \leq OD_{570} < 0,5$), sinh biofilm yếu hoặc không sinh biofilm ($OD_{570} < 0,2$) [9].

2.4.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và R. Xác định mối liên quan giữa ATP và TPC được thực hiện bằng phân tích tương quan Pearson. Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tình trạng vệ sinh bề mặt và ô nhiễm vi sinh bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa năm 2022

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 được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. 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 (n=93)

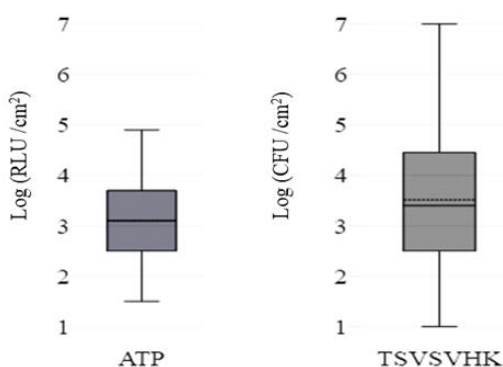
Phân loại ATP [#]	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Đạt (< 150 RLU/cm ²)	12	12,9
Cảnh báo (150-299 RLU/cm ²)	9	9,7
Không đạt (≥ 300 RLU/cm ²)	72	77,4

[#]Theo Etter & cộng sự (2017) [10] và hướng dẫn của nhà sản xuất [11]; RLU (Relative Light Unit): Đơn vị ánh sáng tương đối.

Chỉ số ATP (A) và TPC (B) bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm được trình bày tại Hình 2.

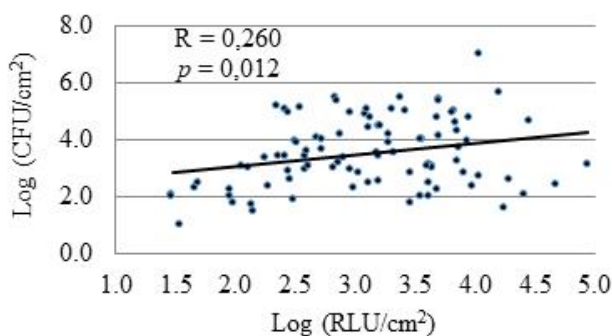
Adenosine Triphosphate (ATP) là một chất chỉ thị sinh học hiện diện trong tất cả các sinh vật sống bao gồm cả vi khuẩn và được sử dụng khá phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm như là chỉ số giám sát nhanh nguồn ô nhiễm bề mặt tiếp xúc trực tiếp thực phẩm

và đồ uống [12]. Theo khuyến cáo của nhà sản xuất thiết bị 3M Clean-Trace Luminometer (Hãng 3M, Mỹ) và tác giả Etter & cộng sự (2017), khi bề mặt tiếp xúc thực phẩm có giá trị ATP cao hơn ngưỡng giới hạn 300 RLU được xem là bị nhiễm bẩn hữu cơ và có thể chứa các vi sinh vật [10, 11]. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy 72/93 (77,4%) mẫu bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm có chỉ số ATP từ 300 RLU/cm² trở lên và được xếp vào mức không đạt yêu cầu. Chỉ số ATP trung bình bề mặt bên trong các vòi chiết rót ở mức khá cao là 3,1±0,8 log (RLU/cm²) (Hình 2A). Ngoài ra, kết quả định lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí cho thấy giá trị trung bình ở mức 3,5±1,2 log (CFU/cm²) (Hình 2B). Tuy nhiên, RLU là đơn vị sử dụng cho các phép đo quang và chưa phải là đơn vị được tiêu chuẩn hóa, do đó ngưỡng RLU thường chỉ áp dụng cho một loại máy đo cụ thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất.



Hình 2. Chỉ số ATP (A) và TPC (B) bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm

Tương quan giữa chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm được trình bày ở Hình 3.



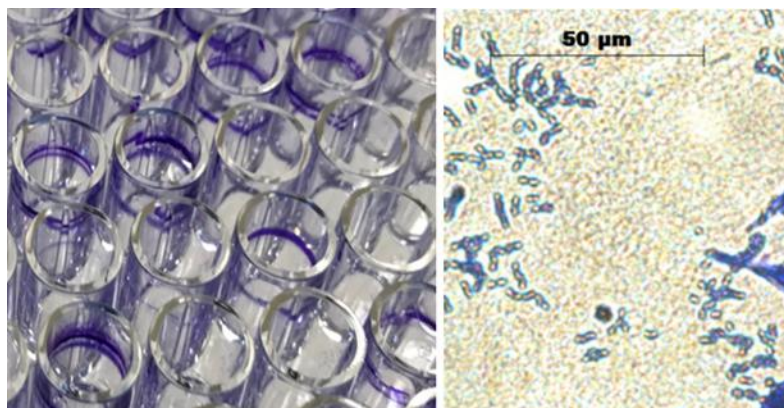
Hình 3. Tương quan giữa chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm

Kết quả Hình 3 cho thấy chỉ số ATP và số lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí có tương quan tuyến tính với nhau ($R = 0,26; p < 0,05$), điều này cho thấy rằng giá trị ATP bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm chủ yếu do vi sinh vật tạo thành. Thông thường, sau một thời gian sử dụng hệ thống đường ống dẫn nước đến vòi chiết rót có thể sẽ bị bám dính các cấu trúc hữu cơ gọi là màng sinh học, đây là một lớp chất nền bao gồm các vi sinh vật

sống, các tế bào vi sinh vật chết, các vật chất vô cơ và hữu cơ dính vào nhau và thường bám dính vào một bề mặt tiếp xúc [13, 14]. Màng sinh học là một trong những thách thức lớn có thể ảnh hưởng đến mùi vị của nước, còn là nguồn chứa các vi khuẩn từ đó có thể làm ô nhiễm nước, trong đó có thể có những loài vi khuẩn gây bệnh [15]. Từ kết quả nghiên cứu này cho thấy phần lớn vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa chưa đảm bảo vệ sinh và chứa nhiều vi sinh vật hiếu khí. Nguy cơ nhiễm chéo những vi sinh vật vào nước thành phẩm là hoàn toàn có thể xảy ra. Thực tế khảo sát cũng cho thấy rằng phần lớn các cơ sở nước uống đóng bình tại Khánh Hòa chỉ thực hiện vệ sinh bề mặt bên ngoài vòi chiết rót mà không thực hiện bất kỳ việc vệ sinh định kỳ bề mặt sâu bên trong của vòi chiết rót nước thành phẩm, theo thời gian dẫn đến tình trạng kém vệ sinh của bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy vòi chiết rót tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa là một trong những nguồn lưu giữ vi sinh vật và có khả năng nhiễm chéo vào nước thành phẩm, bởi đây là vị trí tiếp xúc cuối cùng trước khi nước đường phân phối vào các bình chứa để chuyển ra thị trường tiêu thụ. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy rằng ATP có thể được sử dụng làm chỉ số giám sát nhanh ô nhiễm vi sinh vật bề mặt tiếp xúc với nước như bề mặt các vỏ bình chứa nước tái sử dụng, vòi chiết rót các bể chứa nước thành phẩm...

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm vi sinh bề mặt vòi chiết rót nước thành phẩm

TT	Chỉ tiêu	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ (%)
1	Coliform	6	6,5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2,2
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3,2
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1,1
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,1
3	<i>Escherichia coli</i>	0	0
4	<i>Streptococci feacal</i>	0	0
5	<i>Clostridia</i>	0	0



Hình 4. Vi khuẩn coliform và *P. aeruginosa* hình thành màng sinh học trên đĩa microtiter (A) và vi khuẩn *E. cloacae* bám dính ở đáy đĩa microtiter (B) (Nhuộm crystal violet).

Kết quả khảo sát sự có mặt của các chỉ tiêu vi sinh vật quy định trong nước uống đóng chai theo QCVN 6-1:2010/BYT trong vòi chiết rót nước thành phẩm cho thấy không phát hiện các vi khuẩn *E. coli*, *Streptococci feacal* và bào tử kỵ khí khử sulfite (*Clostridia*) trong 93 mẫu nghiên cứu. Tuy nhiên, có 6/93 (6,5%) vòi chiết rót nhiễm vi khuẩn thuộc nhóm coliform với số lượng trung bình $1,2 \times 10^1$ CFU/cm² và có 1/93 (1,1%) cơ sở có vòi chiết rót nhiễm *P. aeruginosa* với số lượng 7 CFU/cm². Trong số 6 mẫu nhiễm coliform, kết quả định danh bằng bộ kit API20E cho thấy có 3 mẫu là loài *E. cloacae*, 2 mẫu là *K. pneumoniae* và 1 mẫu là *E. aerogenes*. Kết quả thử nghiệm khả năng hình thành màng sinh học cho thấy cả 07 chủng vi khuẩn gồm *E. cloacae* (n=3), *K. pneumoniae* (n=2), *E. aerogenes* (n=1) và *P. aeruginosa* (n=1) đều có khả năng hình thành màng sinh học và bám dính lên bề mặt đĩa microtiter (Hình 4). Điều này cho thấy rằng các vi khuẩn có thể bám dính bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm thông qua hình thành cấu trúc màng sinh học. Trong một khảo sát thực trạng nhiễm vi sinh vật của NUĐC tại các cơ sở sản xuất ở Khánh Hòa năm 2015, nhóm tác giả Hạnh & cộng sự đã thông báo tỷ lệ mẫu nhiễm coliform là 15,9% (10/63) và *P. aeruginosa* là 39,7% (25/63) [16]. Tương tự, Nguyễn Thị Ngọc Duyên (2019) cũng báo cáo nước uống đóng bình sản xuất và lưu hành trên thị trường Khánh Hòa nhiễm coliform là 12% (6/50) và *P. aeruginosa* là 63% (31/50) [5]. Có nhiều nguyên nhân có thể góp phần vào sự ô nhiễm vi sinh vật trong nước thành phẩm trong suốt quy trình sản xuất như chất lượng nguồn nước dùng để sản xuất, hệ thống lọc, việc vệ sinh vỏ bình tái sử dụng [6]. Ngoài ra, từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể thấy rằng bề mặt bên trong vòi chiết rót cũng có thể là nguồn lưu giữ những vi khuẩn như coliform và *P. aeruginosa* và những vi khuẩn này có thể phát tán và xâm nhập vào nước đóng bình thành phẩm. Đây là công bố đầu tiên phát hiện coliform và *P. aeruginosa* bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Việt Nam nói chung và Khánh Hòa nói riêng.

4. KẾT LUẬN

Phát hiện ô nhiễm vi sinh vật bề mặt bên trong vòi chiết rót nước thành phẩm tại các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình ở Khánh Hòa, với ATP và TPC trung bình là $3,1 \pm 0,8$ log (RLU/cm²) và $3,5 \pm 1,2$ log (CFU/cm²). Ngoài ra, phát hiện 6,5% vòi chiết rót nhiễm coliform và 1,1% nhiễm *P. aeruginosa*. Đây là một trong những mối nguy gây ô nhiễm vi sinh vật vào nước đóng bình thành phẩm. Vì vậy, các cơ sở sản xuất nước uống đóng bình cần kiểm soát chặt chẽ quy trình vệ sinh, khử nhiễm định kỳ vòi chiết rót nhằm hạn chế ô nhiễm vi sinh vật vào nước đóng bình thành phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài ĐT-2021-30309-ĐL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N. V. Thuan, P. V. Doanh, N. T. T. Huyen, "Bacteriological assessment of bottled drinking water in 5 provinces of central highland, Vietnam," *Vietnam journal of food control*, vol 3-2019, pp. 86-89, 2019.
- [2]. L. T. Toan, L. Q. Toan, N. Q. Dung, "Current status of microbial contamination of bottled drinking water and some related factors in Dong Thap in 2016," *Journal of community Medicine*, Vol 35, pp. 75-78, 2016.
- [3]. T. M. Phuong, L. T. T. Ha, V. D. Thiem, V. H. Ha, "The status of microbial contamination in bottled water in the production facilities in Hung Yen province in 2018," *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, no 2, vol 29, pp. 87-94, 2019.
- [4]. C. T. D. Thuy, "Rate of microbial contamination of bottled drinking water and some factors related to food safety and hygiene conditions at bottled drinking water facilities in Ben Tre province in 2016," *Proceedings of the 8th Food Safety Science Conference, Vietnam Food Administration - Ministry of Health*, pp. 361-367, 2016.
- [5]. N. T. N. Duyen, "Survey on the status of microbiological contamination in bottled drinking water in some South Central provinces in 2019," *Research - Pasteur Institute in Nha Trang*, 2019.
- [6]. N. T. N. Duyen, L. Q. Phong, T. T. T. Nga, D. T. V. Khanh, P. T. H. Trinh, D. T. Hung, "The status of microbiological contamination of water using to produce bottled drinking water in Khanh Hoa province in 2022," *Vietnam Journal of Food Control*, vol. 6, no. 1, pp. 100-106, 2023.
- [7]. Y. Seno, R. Kariyama, R. Mitsuhata, K. Monden, and H. Kumon, "Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract," *Acta Medica Okayama*, vol. 59, no. 3, pp. 79-87, 2005.
- [8]. L. Q. Phong, "Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw foods and children with diarrhea in Khanh Hoa province, Vietnam," Doctor of Philosophy, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan, 2022.
- [9]. A. Shivaee, B. Sadeghi Kalani, M. Talebi, and D. Darban-Sarokhalil, "Does biofilm formation have different pathways in *Staphylococcus aureus*?", *Iran J Basic Med Sci*, vol. 22, no. 10, pp. 1147-1152, 2019.
- [10]. A. J. Etter *et al.*, "Enhanced sanitation standard operating procedures have limited impact on *Listeria monocytogenes* prevalence in retail delis," *Journal of food protection*, vol. 80, no. 11, pp. 1903-1912, 2017.
- [11]. 3M-FoodSafety, "Setting Pass/Fail Limits for the 3M™ Clean-Trace™ Hygiene Monitoring and Management System," *TB Number: TB.632162.01*, pp. 1-8, 2019.
- [12]. J.-M. Hawronskyj and J. Holah, "ATP: A universal hygiene monitor," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 79-84, 1997.
- [13]. H. C. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 9, pp. 623-633, 2010.

- [14]. S. L. Percival, J. T. Walker, and P. R. Hunter, *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. CRC press, 2000.
- [15]. S. Liu, C. Gunawan, N. Barraud, S. A. Rice, E. J. Harry, and R. Amal, "Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems," *Environmental Science and Technology*, vol. 50, no. 17, pp. 8954-76, 2016.
- [16]. V. T. K. Hanh, M. T. T. Nga, "Research on the current status of microbial contamination of bottled drinking water at production facilities in Khanh Hoa province," *Vietnam Economic News*, no. 10, pp. 82-91, 2021.

Microbiological contamination of the inner surface of finished water filling taps at bottled drinking water producers in Khanh Hoa province

Le Quoc Phong, Nguyen Thi Ngoc Duyen, Tran Thi Thuy Nga, Phung Phuong Lan Anh, Doan Thi Thanh Thuy, Nguyen Van Tuyen, Nguyen Bao Trieu, Do Thai Hung

Pasteur Institute in Nha Trang, Khanh Hoa, Vietnam

Abstract

The finished water filling tap is the final contact point of filtered drinking water before bottling. Therefore, microbial contamination at this site may result in cross-contamination into the finished water in the bottle. This study was conducted to evaluate microbiological contamination on the inner surface of the finished water filling tap at the bottled drinking water producers in Khanh Hoa in 2022. A total of 93 swab samples of the inside surface of the tap at 93 producers were subjected to a test for ATP (Adenosine Triphosphate), total plate count (TPC), coliform, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococci fecal*, and *Clostridia*. There were 72/93 (77.4%) samples with ATP values higher than 300 RLU/cm². The geometric mean of ATP and TPC were 3.1±0.8 log (RLU/cm²) and 3.5±1.2 log (CFU/cm²), respectively. The ATP and TPC were linear correlated, indicating that the surface ATP value inside the finished water filling tap was mainly formed by microorganisms. In addition, 6/93 (6.5%) samples were found to be positive for coliform, including 3 strains of *Enterobacter cloacae*, 2 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 1 strain of *Enterobacter aerogenes*. Moreover, 1/93 (1.1%) samples were infected with *P. aeruginosa*. All 7 strains of these bacteria were biofilm producers under laboratory conditions. Our results demonstrated that the cleaning and decontamination of finished water filling taps were not properly processed, thereby increasing the risk of microbial contamination into finished bottled water.

Keywords: *Filling tap, bottled drinking water, surface cleaning, microbiological contamination.*