

R

BKHVCNMT
PVCNMVBVMT

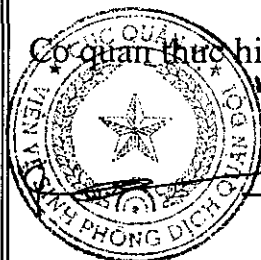
BKHVCNMT
PVCNMVBVMT

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ, MÔI TRƯỜNG
PHÂN VIỆN CÔNG NGHỆ MỚI VÀ BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG
(SỐ 8 LÁNG HẠ - HÀ NỘI)

Đề tài KC. 04 -10

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật Đề tài:

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÒNG CHỐNG Ô
NHIỄM BỞI CÁC VI SINH VẬT ĐỘC HẠI TRONG MÔI
TRƯỜNG ĐẤT, NƯỚC, KHÔNG KHÍ VÀ THỰC PHẨM**



Cơ quan thực hiện
VIỆN TRƯỞNG

Chủ nhiệm đề tài nhánh KC 04-10-10

Đại tá

TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH

TS. Đoàn Trọng Tuyên

Chủ nhiệm đề tài nhà nước KC 04-10

Cơ quan chủ trì



Đại tá. *Phạm Sơn Dương*

Hà nội / 2004

Bản quyền 2004 thuộc PVCNMVBVMT VÀ VIỆN VSPDQĐ

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng PVCNMVBVMT trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.

DANH SÁCH CÁN BỘ THAM GIA ĐỀ TÀI

TT	HỌ VÀ TÊN	HỌC HÀM, HỌC VỊ	ĐƠN VỊ CÔNG TÁC	CHỨC DANH
1	Nguyễn Minh Tiếp	Ths	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu
2	Vũ Văn Duyên	CN	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu
3	Nguyễn Ngọc Bảo	CN	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu
4	Nguyễn Thị Mai	CN	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu
5	Nguyễn Việt Sự	KTV	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu
6	Đào Xuân Tảo	KTV	Khoa vi sinh - Viện VSPDQĐ	Trợ lý nghiên cứu

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1. Tình hình nghiên cứu khử trùng, tẩy uế trong nước và ngoài nước.

1.1. Tình hình trên thế giới

Cuối thế kỷ 19, Semmelweis và Louis Pasteur đưa ra những khái niệm cơ bản đầu tiên về khử trùng, tẩy uế và xây dựng phương pháp khử trùng môi trường còn Surgeons đưa ra phương pháp khử trùng buồng bệnh trong bệnh viện chủ yếu là khử trùng vì sinh vật trong buồng bệnh, sàn nhà, tường, ngoài da bệnh nhân bằng các chất sát trùng hoặc xà phòng. Thời điểm này các trang thiết bị bảo hộ an toàn cá nhân, tránh lây nhiễm chéo cho người bệnh như: Trang phục bảo hộ, găng tay đã được sản xuất.

Năm 1880, khử trùng bằng phương pháp đun sôi đã được giới thiệu áp dụng cho khử trùng đồ vải ...

Năm 1876, đã phát hiện được vi khuẩn kháng lại nhiệt, năm 1886 Ernst Von Bergmann giới thiệu phương pháp khử trùng bằng hơi nước, dưới điều kiện áp suất mới có khả năng diệt vi khuẩn dạng sinh bào tử.

Phương pháp xông hơi hoá chất diệt côn trùng đã được thực hiện rất sớm đầu thế kỷ 20, năm 1940, Ethylene Oxide được công nhận là chất diệt khuẩn phổ biến sử dụng trong khử trùng bệnh viện và nhà máy.

Cùng với các phương pháp khử trùng, hoá chất đã được sử dụng, hiệu quả của các chất ăn mòn như carbolic acid đã được sử dụng phổ biến, và khả năng hạn chế của Mercuric chloride được thay thế bằng các chất hoá học khác. Năm 1963, hoá chất có tên Glutaraldehyde được giới thiệu, đây là chất hoá học đầu tiên được cơ quan bảo vệ môi trường cho phép áp dụng trong khử trùng.

Khử trùng, tẩy uế môi trường được chia ra thành các qui trình ở các mức độ khác nhau:

- + *Khử trùng mức độ cao*: Diệt toàn bộ vi khuẩn, virus, nấm. Qui trình này có thể áp dụng diệt cả bào tử, nếu thời gian đủ thời gian tiếp xúc và các điều kiện thích hợp khác.

- + *Khử trùng mức độ trung bình*: Diệt toàn bộ vi khuẩn, virus, nấm. Qui trình này không có khả năng diệt bào tử

- + *Khử trùng mức độ thấp*: Diệt vi khuẩn thể sinh dưỡng, nấm và khả năng diệt virus thấp.

Các qui trình khử trùng hiện nay đang được áp dụng trên thế giới: Trong các loại vi sinh vật gây bệnh thì loại sinh bào tử hầu hết là kháng lại các phương pháp khử trùng, bởi vì đặc tính có khả năng chịu đựng sự tác động của môi trường ngoại cảnh, thậm trí với các qui trình khử trùng bằng phương pháp lý hoặc hoá học cũng khó phá huỷ được toàn bộ vi sinh vật gây bệnh hoặc không gây bệnh, bao gồm cả thể bào tử.

Các thông số liên quan tới qui trình khử trùng:

1. Cấu trúc sinh học, của vi sinh vật gây ô nhiễm, nhiệt độ, chất hữu của môi trường
2. Sức chịu đựng của vi sinh vật, bao gồm các yếu tố như : khả năng nhạy cảm với nhiệt và hơi nước
3. Điều kiện dinh dưỡng, khả năng phát triển nhân nên của vi sinh vật
4. Các yếu tố ảnh hưởng tới qui trình thử nghiệm
 - + Nhiệt độ, độ ẩm, sự hydrat hoá.
 - + Thời gian khử trùng
 - + Nồng độ của vi sinh vật gây ô nhiễm và nồng độ chất khử trùng
 - + Đặc tính của phương pháp khử trùng

Các phương pháp khử trùng:

Lựa chọn phương pháp khử trùng phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc với chất khử trùng và lựa chọn chất khử trùng các tác nhân vi sinh vật phụ thuộc vào tính chất tự nhiên của môi trường. Thời gian cần thiết để diệt bào tử trên các vật liệu và môi trường ô nhiễm cần có qui trình phù hợp riêng biệt, mỗi phương pháp khử trùng, tẩy uế có những ưu điểm và nhược điểm. Phương pháp khử trùng hiện nay thường được áp dụng chủ yếu là phương pháp vật lý hoặc hoá học:

1. Phương pháp vật lý:

- + Hơi nước dưới điều kiện áp suất (Autoclave)
- + Nhiệt khô (Sấy khô ở nhiệt độ cao)
- + Sóng cực ngắn (Lò vi sóng)

2. Phương pháp hoá học:

- + Khí Ethylene Oxide
- + Xông hơi Formaldehyde vapor
- + Xông hơi Hydrogene peroxide
- + Khí OZone

+ Dung dịch Glutaraldehyde

+ Dung dịch peracetic

3. Bức xạ ion hoá (Vật lý)

1.2. Một số hiểu biết về sinh vật gây bệnh, độc hại, gây ô nhiễm môi trường.

Vi khuẩn nhỏ, cấu trúc tế bào tương đối hoàn chỉnh, hầu hết phát triển trong môi trường rắn hoặc lỏng giàu chất dinh dưỡng, dưới những điều kiện sống bất lợi, một vài loại vi khuẩn chuyển sang dạng bào tử có khả năng kháng lại lạnh, nhiệt, khô, chất hoá học và phóng xạ. Phần lớn Vi sinh vật trong tồn tại ngoài môi trường không phải là nguyên nhân gây bệnh cho người. Một số nhỏ những vi khuẩn là nguyên nhân gây bệnh cho người và động vật theo 2 cơ chế:

- *Xâm nhập vào tế bào vật chủ*
- *Gây bệnh bằng sản phẩm ngoại bào (Độc tố)*

Nhiều vi sinh vật như B.anthraxis ... có khả năng gây bệnh cao, do đó luôn được chú ý sử dụng như tác nhân trong chiến tranh sinh học vì:

- *Luôn giữ được độc lực trong quá trình phát triển*
- *Sinh bào tử để có khả năng tồn tại cao trong môi trường*
- *Có khả năng phát tán cao trong không khí*

Đặc điểm của các tác nhân chủ yếu gây dịch thường được sử dụng trong chiến tranh sinh học và tính chất gây bệnh :

Tác nhân sinh học/ bệnh	Trực khuẩn than (B. anthracis)	Phẩy khuẩn tả (V. cholerae)
Phương thức lây truyền chủ phổ biến	1. Bào tử tồn tại trong không khí, đất, nước, thực phẩm 2. Phá huỷ thực phẩm	1. gây ô nhiễm thực phẩm và nguồn nước 2.theo đường không khí
Lây truyền từ người sang người	Không (trừ thể da)	Hiếm
Thời gian ủ bệnh	1- 43 ngày	3-5 ngày
Thời gian bệnh	3-5 ngày biểu hiện rất nặng	Lớn hơn 7 ngày
Gây chết	- Thể da: tỷ lệ tử vong từ 5-20%	- Thấp (< 1%) nếu có điều

	- Thể phổi: sau khi xuất hiện các hội chứng bệnh nhân rất nặng, điều trị không hiệu quả	trị - cao (> 50%) nếu không điều trị	
Hội chứng lâm sàng và hậu quả	Giống cúm, viêm đường hô hấp trên, sốt và shock trong 3-4 ngày và chết	- Khởi phát đột ngột kèm theo nôn, ỉa chảy, mất nước, điện giải và chết	
Khả năng sử dụng như vũ khí sinh học	Rất nhiều nước, thường sử dụng như tác nhân khủng bố sinh học bằng đường hô hấp.	Không thuận lợi cho sự phát tán mầm bệnh theo đường không khí, thường sử dụng gây ô nhiễm nguồn nước, thực phẩm.	
Tác nhân sinh học/ bệnh	Vi khuẩn dịch hạch (Y.pestis)	Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Vi khuẩn lỵ (shigella)
Phương thức lây truyền chủ phổ biến	1.Nhiễm từ bọ chét (thể hạch và thể phổi) 2. Không khí (viêm phổi)	1. Tiếp xúc với người mang mầm bệnh 2. Tiếp xúc với vật liệu nhiễm mầm bệnh	1. Tiếp xúc với người mang mầm bệnh 2. Tiếp xúc với vật liệu nhiễm mầm bệnh
Lây truyền từ người sang người	Cao (Thể phổi)	cao	cao
Thời gian ủ bệnh	1-3 ngày	7-14 ngày	
Thời gian bệnh	1-6 ngày	Không biết	Không rõ
Gây chết	5%-10% thể da , nếu điều trị. 30-75% nếu không điều trị 95% thể phổi nếu	< 1% nếu điều trị tích cực. 10%-14% nếu không điều trị	< 1% nếu điều trị tích cực. 20%-30% nếu không điều trị

	không điều trị		
Hội chứng lâm sàng và hậu quả	Sung viêm hạch lympho vùng bẹn, nhiễm khuẩn huyết (viêm phổi cấp)	Sốt kéo dài , viêm tuyến bạch huyết, đào ban trên da, táo bón hoặc ỉa chảy	Sốt, tiêu chảy kéo dài, mất nước, điện giải , shock và chết
Khả năng sử dụng như vũ khí sinh học	Khả năng gây nhiễm cao đặc biệt thể phổi, thường được sử dụng như là tác nhân khủng bố sinh học	Không sử dụng lây nhiễm theo đường không khí, thường gây ô nhiễm thực phẩm và nguồn nước.	Dùng gây nhiễm thực phẩm , nguồn nước.

Trong lịch sử loài người phẩy khuẩn tả đã gây ra 7 vụ đại dịch lớn trên thế giới, vi khuẩn dịch hạch đã lan truyền khắp các châu lục và được mệnh danh là tác nhân gây ra cái chết đen, hay trực khuẩn than luôn được tàng trữ như một vũ khí sinh học nguy hiểm đặc biệt là vụ khủng bố tại Mỹ sau sự kiện ngày 11/9/ 2002. Trong chiến tranh sinh học các tác nhân được sử dụng gây ô nhiễm môi trường (đất, nước, không khí, thực phẩm), đây là môi trường sống thiết yếu đối với con người.

Cho đến nay không có qui trình thống nhất và ổn định thành chuẩn thức chung để có thể áp dụng ở mọi nơi, mọi lúc vì có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng hiệu quả của khử trùng tẩy uế như: số lượng vi khuẩn sử dụng trong thử nghiệm, nhiệt độ , độ ẩm, pH, tốc độ gió ... là các yếu tố quyết định tới khả năng bất hoạt vi sinh vật độc hại trong môi trường, chưa kể khử trùng bằng các chất hoá học thì mỗi loại hoá chất hoạt động theo cơ chế khác nhau, do đó mỗi loại môi trường lên cân nhắc về: liều lượng, thời gian khả năng tồn lưu của hoá chất trong môi trường sống có thể ảnh hưởng tới sức khoẻ con người lâu dài.

1.3.Tình hình nghiên cứu khử trùng, tẩy uế vi sinh vật độc hại ô nhiễm môi trường ở Việt nam.

Ở Việt nam có rất nhiều dịch nguy hiểm xảy ra, lây truyền qua 04 đường chính

- Đường hô hấp như : Dịch SARs, dịch cúm gà, dịch viêm màng não do mô não cầu ; Adeno virút, Rubella virút...
- lây truyền qua đường phân miệng (Tả, thương hàn, lỵ trực khuẩn, vi rút đường ruột)
- lây truyền qua đường máu: Virút viêm gan B,C ,D ,G, HIV
- Lây truyền qua động vật chân đốt như : Ký sinh trùng sốt rét, , Arbo- virút

Thực trạng hiện nay, riêng việc phát hiện tác nhân gây dịch, nhất là tác nhân gây dịch do virút là điều hết sức khó khăn, mà chủ yếu chỉ xác định được phương thức lây truyền của bệnh, để có thể can thiệp trong đó có khử trùng để cắt đứt những mắt xích của quá trình dịch phải chủ động.

Trong điều kiện sử dụng khủng bố sinh học, toàn bộ môi trường sống đều có nguy cơ bị ô nhiễm, việc khử trùng tẩy uế cần được tiến hành đồng bộ bằng nhiều biện pháp và phương pháp khử trùng phù hợp cho mỗi loại môi trường sống. Trong khi đó ở nước ta việc khử trùng dịch vẫn được tiến hành dựa theo các qui định của Bộ y tế cho từng loại dịch trên cơ sở sử dụng các dữ liệu của các Tổ chức sức khoẻ thế giới , trên thực tế các qui trình này không thể phù hợp với điều kiện Việt nam vì có sự khác biệt về nhiệt độ , khí hậu , độ ẩm, môi trường khử trùng ..., đây là các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của tác khử trùng. Theo các số liệu báo cáo thì ở Việt nam chưa có công trình nghiên cứu nào về công tác khử trùng. Bộ y tế Việt nam chưa có qui định qui trình khử trùng theo một văn bản chính thức nào, theo chúng tôi đây là lĩnh vực còn mới ở Việt nam, cần tiếp tục được nghiên cứu với quy mô và trình độ công nghệ ở mức độ cao hơn.

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành xây dựng mô hình khử trùng tẩy uế vi sinh vật độc hại trong môi trường, đất, nước, không khí, chủ yếu bằng hai phương pháp chính là phương pháp vật lý và hoá học, phù hợp với điều kiện Việt nam và điều kiện trang thiết bị hiện có trong Quân đội, nhất là các phương pháp khử trùng dễ thực hiện trong điều kiện bộ đội hoạt động trong điều kiện dã ngoại, trên nguyên tắc các phương pháp đơn giản dễ thực hiện, hiệu quả cao, hạn chế tồn lưu của hoá chất khử trùng trong môi trường sống, giá thành rẻ.

Những điểm mới trong đề tài:

1. Xây dựng mô hình thử nghiệm bất hoạt bào tử trực khuẩn than ô nhiễm không khí và đất lần đầu tiên được thử nghiệm ở Việt nam.

+ Thiết kế buồng sinh học , đảm bảo nhiệt độ, duy trì độ ẩm, tốc độ phun, tạo khí dung trong buồng sinh học.

+ sản xuất bộ sinh phẩm phát hiện hiệu quả của phương pháp khử trùng, theo nguyên tắc đơn giản dễ thực hiện, áp dụng trong điều kiện dã ngoại.

+ Trên cơ sở mô hình thử nghiệm đưa ra các số liệu cần thiết phù hợp với điều kiện Việt nam.

2. Từ các mô hình thử nghiệm, đề tài đã khái quát hoá thành các qui trình kỹ thuật khử trùng, tẩy uế riêng biệt cho từng loại vi sinh vật độc hại trong đất, nước, không khí và thực phẩm.

Mục tiêu và nội dung chủ yếu của đề tài:

1. Tuyển chọn chủng vi sinh vật độc hại:

- Trực khuẩn than (*B. anthracis*) thể bào tử (Spore) và thể sinh dưỡng
- Phẩy khuẩn tả (*V.cholerae*)
- Vi khuẩn thương hàn (*Salmonella typhi*)
- Vi khuẩn lỵ (*Shigella*)
- Vi khuẩn dịch hạch (*Y.pestis*)

Các chủng vi sinh vật này phân lập từ các khu vực khác nhau hoặc do các cơ sở sinh học trong và ngoài Quân đội cung cấp.

2. Lựa chọn phương pháp và các loại hoá chất diệt khuẩn (bacterocid), tính năng, khả năng hoạt động, ưu nhược điểm của các loại hoá chất đang được sử dụng trong Quân đội và lưu hành trên thị trường Việt nam.

3. Xây dựng các mô hình thử nghiệm diệt vi sinh vật độc hại trong môi trường sống (Đất, nước, không khí, thực phẩm) bằng các phương pháp có thể áp dụng thuận tiện trong điều kiện tác chiến nhanh

4. Xây dựng 04 qui trình kỹ thuật (Cụ thể hoá từ mô hình thực nghiệm) khử trùng, tẩy uế môi trường bị ô nhiễm bởi các tác nhân vi sinh vật độc hại, nguy hiểm.

5. Trong nội dung đề cương nghiên cứu đặt ra xây dựng 4 qui trình khử trùng tẩy uế môi trường với 5 loại vi sinh vật độc hại nguy hiểm (Tả, lỵ, thương hàn, dịch hạch, trực khuẩn than), nhưng trên thực tế số liệu tập trung chủ yếu vào khử trùng các tác nhân chính như: trực khuẩn than(hai thể sinh dưỡng và thể bào tử) vi khuẩn thương hàn, phẩy khuẩn tả vì dựa trên cấu trúc tế bào thì 3 loại vi khuẩn này đại diện cho dòng vi khuẩn nói chung, và

là tác nhân vi sinh vật chính, nguy hiểm. Tính đại diện cho nghiên cứu khử trùng vi khuẩn gây bệnh:

- phẩy khuẩn tả: là một dạng xoắn khuẩn, cấu trúc là vi khuẩn gram (-)
- Vi khuẩn thương hàn: đại diện cho loài vi khuẩn đường ruột, cấu trúc tế bào là vi khuẩn gram (-) hoàn toàn giống ly trực khuẩn
- Trực khuẩn than thể sinh dưỡng: là loại vi khuẩn có cấu trúc tế bào là vi khuẩn gram (+) có khả năng bền vững hơn vi khuẩn bắt màu Gram (-), do đó lựa chọn các phương pháp khử trùng diệt được trực khuẩn than thể sinh dưỡng theo đường không khí thì có hoàn toàn bất hoạt được vi khuẩn dịch hạch.
- Trực khuẩn than thể bào tử: Đại diện cho các loại vi sinh vật gây bệnh hoặc không gây bệnh có cấu trúc tế bào đặc biệt, bền vững khi tồn tại trong điều kiện sống bất lợi, do đó các phương pháp thử nghiệm diệt được trực khuẩn than thể bào tử thì có khả năng bất hoạt được các loại vi sinh vật sinh bào tử.

Phần 1
ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU TRONG NGHIÊN CỨU

.....***.....

1.1. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG THÍ NGHIỆM :

Để tiến hành thí nghiệm đề mục đã tiến hành thu thập, phân lập các chủng, kiểm tra đặc tính sinh học, giữ trong thạch mềm và đông khô bảo quản các chủng thí nghiệm. Riêng với chủng trực khuẩn Than khi tiến hành thử trong không khí, chúng tôi dùng chủng không độc (nonpathogen) để đảm bảo an toàn cho người làm thí nghiệm.

** Phẩy khuẩn Tả (Vibrio cholerae 01, Inaba):*

- Chủng được phân lập tại các vụ dịch tại Cần Thơ, An Giang năm 2001
- Kiểm tra đặc tính sinh học của chủng nghiên cứu
- Giữ trong thạch mềm, đông khô để bảo quản và dùng trong các thí nghiệm

** Chủng trực khuẩn lỵ (Shigella flexneri) :*

- Chủng được phân lập tại các vụ dịch tại Tuyên Quang, Sơn Tây năm 2001
- Kiểm tra đặc tính sinh học của chủng nghiên cứu
- Giữ trong thạch mềm, đông khô để bảo quản và dùng trong các thí nghiệm

** Vi khuẩn dịch hạch (Y.pestis) :*

- Dùng chủng phân lập Tại Tây Nguyên năm 1998, 1989 có đủ yếu tố độc lực, loại trừ Murin toxin
- Kiểm tra lại các đặc tính sinh học bằng phương pháp phân lập và Multiplex - PCR
- Giữ trong thạch mềm, đông khô để bảo quản và dùng trong các thí nghiệm

**Vi khuẩn thương hàn (Salmonella typhi) :*

- Các chủng thương hàn được tuyển chọn từ các chủng phân lập của Khoa vi sinh vật Viện VSPD-QĐ từ 1997 - 2001 tại các vụ dịch Điện Biên Lai Châu, Mường Tè, Sơn La
- Kiểm tra lại các đặc tính sinh học

- Giữ trong thạch mềm, đông khô để bảo quản và dùng trong các thí nghiệm

* *Trực khuẩn Than (B.anthraxis)* :

- Bao gồm 3 chủng do Khoa vi sinh vật phân lập và Học viện Quân y cung cấp để tiến hành thí nghiệm khử bằng nhiệt, vi sóng và bằng hóa chất. Chủng không độc (chủng vaccine) được xác định không có plasmids pX01 và pX02 bằng phương pháp Nested PCR đã được dùng cho thử nghiệm gây nhiễm không khí đường khí dung, đất, nước và thực phẩm.
- Kiểm tra đặc tính sinh học
- Sản xuất chủng thí nghiệm dưới 2 thể sinh dưỡng (vegetative) và bào tử (spore)
- Đông khô để bảo quản và dùng trong thí nghiệm

1.2. MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VÀ PHÂN LẬP VI SINH VẬT ĐỘC HẠI.

- Môi trường canh thanh BHI
- Môi trường thạch dinh dưỡng Muller- Hinton
- Canh thang kiểm
- Môi trường thạch dinh dưỡng (Muller Hillton)
- Môi trường tạo bào tử than

Casein (tryptic)	50,0g
Cao thịt	10,0g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,03g
K ₂ HPO ₄	5,0g
KH ₂ PO ₄	1,0g
Thạch	22,0g
Nước cất	1000ml

Tất cả hoà tan trong nước bằng cách đun nóng nhẹ, chỉnh pH 7,4, cho vào chai Roux (120ml/chai), hấp vô trùng. Sau khi thạch đông để tủ ấm 37°C/ 2 ngày cho khô mặt và kiểm tra vô trùng. - *Tiến hành kỹ thuật* :

Cho 2ml chủng giống, láng đều mặt thạch, để 37°C cho đến khi hình thành ít nhất 80% bào tử . Cho 10ml nước cất để gặt chủng. Rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng. Ly

tâm lấy cặn, cho vào bình vô trùng miệng rộng, bổ xung phụ gia (pha trong đường Lactose 5%) để đạt 5.10^9 bào tử/ml. Đông khô hỗn dịch bào tử theo thường quy.

- Kiểm tra tỷ lệ hình thành bào tử bằng nhuộm Gram, nhuộm huỳnh quang và soi kính hàng ngày:

Kết quả hình thành bào tử theo thời gian

TT	Thời điểm	Số bào tử/tổng số *	% Bào tử**
1	18 h sau khi cấy chủng	5/87	5
2	24 h sau khi cấy chủng	21/106	20
3	32 h sau khi cấy chủng	15/68	22
4	40 h sau khi cấy chủng	20/83	24
5	48 h sau khi cấy chủng	35/61	51
6	56 h sau khi cấy chủng	43/74	58
7	64 h sau khi cấy chủng	39/58	67
8	72 h sau khi cấy chủng	56/69	81
9	80h sau khi cấy chủng	75/93	80

Chú chú: * : Đếm số bào tử/tổng số tế bào (bào tử + sinh dưỡng) trong 1 vi trường.

** : Tỷ lệ % bào tử/ tổng số tế bào (bào tử + sinh dưỡng), kết quả lấy tròn số.

Từ bảng trên chúng tôi thấy rằng : Sau 72 giờ có thể gặt thu sinh khối trực khuẩn Than với tỷ lệ bào tử khoảng 80%. Nếu muốn đạt tỷ lệ bào tử cao hơn (như để sản xuất vaccine có thể dùng phương pháp Glycerol hoá để phân huỷ tế bào thể sinh dưỡng. Do yêu cầu của thí nghiệm nên chúng tôi chỉ cần dùng ở mức có 80% bào tử, vì nếu có lẫn thể sinh dưỡng cũng không làm ảnh hưởng kết quả thí nghiệm, ngược lại nếu bào tử có trong các thí nghiệm với thể sinh dưỡng sẽ làm sai lệch kết quả thí nghiệm.

Các bộ thuốc nhuộm kiểm tra vi sinh vật : thuốc nhuộm gram, xanh malachite, hiss, thuốc nhuộm huỳnh quang than, dịch hạch do Khoa Vi sinh Viện VSPDQĐ sản xuất.

Một số hình ảnh kiểm tra các chủng nghiên cứu



Hình 1A: Than thể dinh dưỡng nhuộm Gram; Hình 1B: Bào tử than nhuộm Hiss



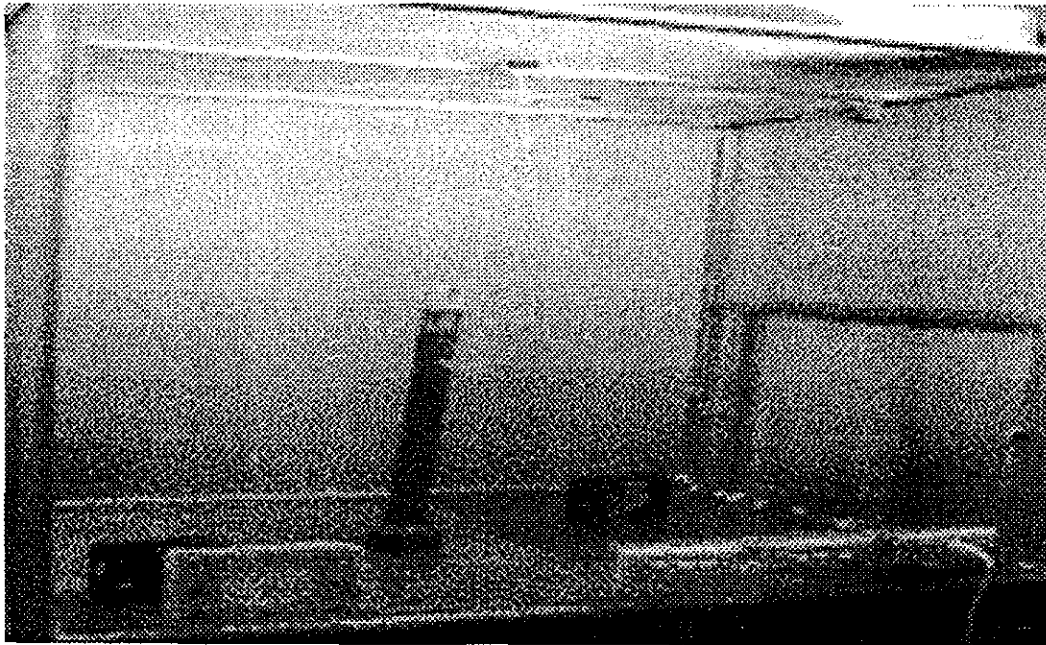
Hình 2A: Trục khuẩn than nhuộm huỳnh quang ; Hình 2B: vi khuẩn dịch hạch nhuộm Huỳnh quang

1.3. TRANG THIẾT BỊ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU:

- *Buồng sinh học*

Đã hoàn thành thiết kế, xây dựng buồng tạo khí dung để thử gây nhiễm mầm bệnh Than, dịch hạch trong không khí. Buồng dùng để thử các biện pháp khử khuẩn bằng xông hoá chất.

- Thể tích buồng : 1,000m³
- Khung nhôm kính, bọc xung quanh bằng kính kín không cho khí thoát, các cửa có gioăng kín
- Tạo độ ẩm theo chỉ số mong muốn
- Quạt tạo gió trong buồng để trộn đều khí dung
- Mua và thử máy tạo khí dung kích cỡ hạt 5,2 micromet (OMRON CX) của Nhật:
Chỉ số khí dung 400ml/phút, dung tích sinh khối vi khuẩn : 10ml, kích thước hạt khí dung : 5,2micromet,áp suất phun tối đa : 2,0bar (200kPa), nhiệt độ tối thiểu : 10°C, tối đa : 40°C, độ ẩm : Tối thiểu : 10%, tối đa : 95%
- Thử tạo khí dung vi khuẩn bằng máy tạo khí dung trong buồng thí nghiệm với nồng độ 10⁹ CFU/ml , nhiệt độ 20-40°C, độ ẩm 60-85%.



Hình 3: Buồng sinh học tự sản xuất và thiết kế phục vụ cho khử trùng .

- Hotte an toàn mức độ II (Tây ban nha)
- Tủ sấy khô (Tây ban nha)
- Nồi hấp ướt Tomy (Mĩ)
- ống nghiệm các loại
- Micropipetter Gilson (Pháp)

- Hộp chứa các loại đất



Hình 4: Chuẩn bị gây nhiễm môi trường đất trong buồng sinh học..

- Lấy 10 ml bào tử có nồng độ 10^8 CFU/ ml, phun đều trên bề mặt đất có tổng diện tích là 200 cm^2
- Đặt hộp đất ở phòng thí nghiệm (nhiệt độ 20°C - 25°C / 24- 48 giờ)
- Khử trùng môi trường đất bằng formaldehyde ở các nồng độ khác nhau và đánh giá hiệu quả diệt khuẩn bằng cách: Lấy 1 g đất ở các vị trí 5 cm, 10 cm, 15 cm, 20 cm , trộn đều với 10 ml nước muối sinh lý, lấy 50 μ l dàn đều trên mặt thạch và ủ 37°C / 24- 48 giờ, đọc số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch (ở mỗi vị trí lấy mẫu cấy vào 3 đĩa thạch và tính số khuẩn lạc trung bình)

- Các loại hoá chất sử dụng khử trùng, tẩy uế:
 - Chlorine
 - Iodophors
 - Peroxide
 - Chlorhexidine
 - Quaternary ammonia
 - Formaldehyde

* Sodium hypochlorites (NaOCl) :

Thuộc nhóm Halogen, không có hiệu quả diệt bào tử, có khả năng ăn mòn kim loại, ở nồng độ cao kích thích niêm mạc đường hô hấp, da, mắt, các chất liệu khử trùng có bản chất hữu cơ có khả năng hạn chế hoạt động của chlorine, do đó bề mặt muốn khử trùng bằng clo cần phải làm sạch.

thành phẩm dung dịch 6 % NaClO

*Iodine :

Đặc tính:

1. chất sát trùng phổ rộng và không độc
2. Giảm hoạt tính khi sử dụng trên bao bì có các chất hữu cơ
3. có khả năng ăn mòn và biến màu của các chất liệu bảo quản thực phẩm
4. Hiệu quả diệt bào tử khá tốt hơn cả chlorine
5. Hiệu quả thấp đối với bao bì bằng gỗ
6. Giá thành thấp thuận lợi cho việc khử trùng.

* Chất oxy hoá peroxides : hydrogen peroxide (H₂O₂):

Đặc tính:

1. dạng chất sát trùng phổ rộng, có khả năng ăn mòn và không độc tính.
2. Không có hiệu quả khi có sự có mặt của chất hữu cơ
3. tồn lưu thấp
4. Không có hiệu quả với vi khuẩn và nấm thể bào tử
5. Có tác dụng như một chất làm sạch và giá thành thấp

*Khử trùng bằng phenolic:

Tên thương mại: O-Syl, Matar, Septicol, Hexachlorophene, Environ, One-Stroke, Lysovet, Tek-Trol, Lysol, Pantek, Discan, Pine-sol and Staphene.

Đặc tính:

1. Chất sát trùng mạnh, phổ rộng , không có khả năng ăn mòn kim loại và độc tính thấp
2. Rất có hiệu quả khi sử dụng cho các chất liệu hữu cơ
3. Khả năng tồn dư thấp
4. Không diệt được thể bào tử
5. Có khả năng khử mùi và giá thành không cao

* Quaternary Ammonium Compounds(QA): thành phần chủ yếu trong khử trùng bao gồm NH₄ :

Đặc tính:

1. Chất sát trùng phổ rộng , không ăn mòn và độc tính thấp
2. Hiệu quả giảm khi khử trùng vật liệu có chất hữu cơ
3. Không diệt được bào tử, tác dụng tốt với vi khuẩn thể dinh dưỡng, nấm, virus
4. Hiệu quả hạn chế trong xà phòng và trong nước cứng

*Formandehyde(CH₂O 36%):

Đặc tính:

- 1.chất khử trùng mạnh, phổ rộng, diệt cả vi khuẩn thể bào tử và nấm, độc tính cao cho người và động vật cho người nếu sử dụng không đúng mục đích
2. Hiệu quả vừa phải khi khử trùng các sự hiện diện của chất hữu cơ
3. Giá thành cao

1. 4. THUẬT TOÁN SỬ DỤNG TRONG KHỬ TRÙNG, TẮY UẾ

* Công thức chuyển đổi giữa °C và °F

$$^{\circ}\text{F} = (^{\circ}\text{C} \times 9/5) + 32$$

$$^{\circ}\text{C} = (^{\circ}\text{F} - 32) \times 5/9$$

- Thời gian chết do nhiệt (TDT: Thermal Death Time) : là thời gian cần thiết diệt bào tử ở nhiệt độ xác định
- Giá trị D : là thời gian cần thiết để bất hoạt hoặc diệt 90 % số lượng vi khuẩn
- Giá trị F: là thời gian tính theo phút diệt toàn bộ bào tử trong chất lỏng khi xử lý nhiệt từ 120°C hoặc 250 ° F.
- Giá trị Z : xác định sự thay đổi nhiệt độ làm thay đổi giá trị D đối với một loại vi khuẩn đặc trưng.
- CT : Hiệu lực của tẩy uế trong đó C: nồng độ của chất khử trùng, tẩy uế, T: thời gian cần thiết để bất hoạt tính theo tỷ lệ %
- Giá trị Q10 : là tỷ lệ của giá trị D ở 2 nhiệt độ mà nhiệt độ này cách nhiệt độ tiếp theo 10°C

* Công thức tính nồng độ PPM : chuyển phần trăm sang phần triệu

$$\text{ví dụ } 1\% = 1/100 = \frac{1}{100} \times \frac{100.000}{100.000} = 10.000 \text{ PPm}$$

Cách pha nồng độ hoá chất theo ý muốn:

Nồng độ hoá chất thiết kế	số lượng ml hoá chất cần pha	hoá chất cung cấp	Số lượng cần bổ sung
(A%) X	(B ml) =	C% X	D ml
Ví dụ: 1% X	3.000 ml =	6% X	D ml
Suy ra D = 500 ml			
Số lượng nước cần bổ sung (W) = số lượng (ml)hoá chất cần pha- số lượng bổ sung (D)			
Ví dụ: số lượng nước(W)= 3000 ml — 500 ml = 2500 ml (5 phần nước)			
Để được dung dịch từ 6% xuống 1% thì cứ 1 phần (6%) + 5 phần nước (W)			

Cách tính vi khuẩn bị bất hoạt:

$$\text{Hiệu quả diệt khuẩn (\%)} = \frac{\text{CFU* mẫu chứng} - \text{CFU* sau khử trùng}}{\text{CFU* mẫu chứng}} \times 100$$

CFU* (clone forming units): được tính trên cm² bề mặt nếu khử trùng bề mặt bao bì bảo quản thực phẩm, hoặc trên g thực phẩm

XÂY DỰNG QUI TRÌNH KHỬ TRÙNG KHÔNG KHÍ NHIỄM VI SINH VẬT ĐỘC HẠI

2.1. MÔ HÌNH THỬ NGHIỆM BẤT HOẠT TRỰC KHUẨN THAN TRONG KHÔNG KHÍ

2.1.1. Gây nhiễm không khí bằng máy phun khí dung :

Do trong các mầm bệnh Tả, lỵ, thương hàn, dịch hạch, trực khuẩn Than thì chỉ có dịch hạch, trực khuẩn Than (thể bào tử) mới được dùng để gây nhiễm đường không khí, nên đề tài tập trung nghiên cứu khử trùng không khí đối với trực khuẩn Than (thể bào tử).

Để tiến hành thí nghiệm trước hết chúng tôi tạo không khí nhiễm khuẩn bằng máy phun OMRON CX của Nhật tạo khí dung hỗn dịch vi khuẩn, điều chỉnh nồng độ, tốc độ phun để đạt 10^9 CFU/m³ không khí. Xác định lại số lượng vi khuẩn bằng phương pháp xác định tổng số vi khuẩn trong không khí theo phương pháp R.Koch.

Tất cả quá trình thí nghiệm thực hiện trong buồng sinh học.

2.1.2. Kết quả diệt trực khuẩn than bằng xông hơi Formaldehyde

Sau khi có không khí trong buồng đạt 10^9 CFU bào tử Than/ml, đóng kín buồng xông bằng hóa chất Formalin đậm đặc (Formaldehyde 36%) của hãng Merk. Cách xông như sau : Đo lượng hóa chất cần thử , trộn với nước cất theo tỷ lệ 1V hóa chất + 9 V nước (cứ 10ml Formalin cho vào 90ml nước) , cho vào bình xông, đặt bình trên bếp điện, khi toàn bộ hỗn hợp bay hơi hết thì tắt điện (công tác điện ngoài buồng) .

Lấy mẫu tại các thời điểm bằng tămpon quét bề mặt buồng rồi cấy vào canh thang dinh dưỡng kiểm tra khả năng sống sót của bào tử.

Để đảm bảo an toàn cho người làm thí nghiệm và cộng đồng buồng thử đặt trong một buồng khác, tất cả cửa đóng kín, dán băng keo các kẽ cửa để không có mầm bệnh thoát ra ngoài. Khi lấy mẫu đeo mặt nạ phòng độc. Kết thúc một thí nghiệm bật đèn cực tím qua đêm để khử khuẩn.

Bảng 1 : Kết quả diệt trực khuẩn Than Formaldehyde (Độ ẩm 81-85%, nhiệt độ 30-35°C), thời gian khử trùng 1 giờ

Thể tích Formalin đậm	Kết quả diệt bào tử than	Kết quả diệt trực
-----------------------	--------------------------	-------------------

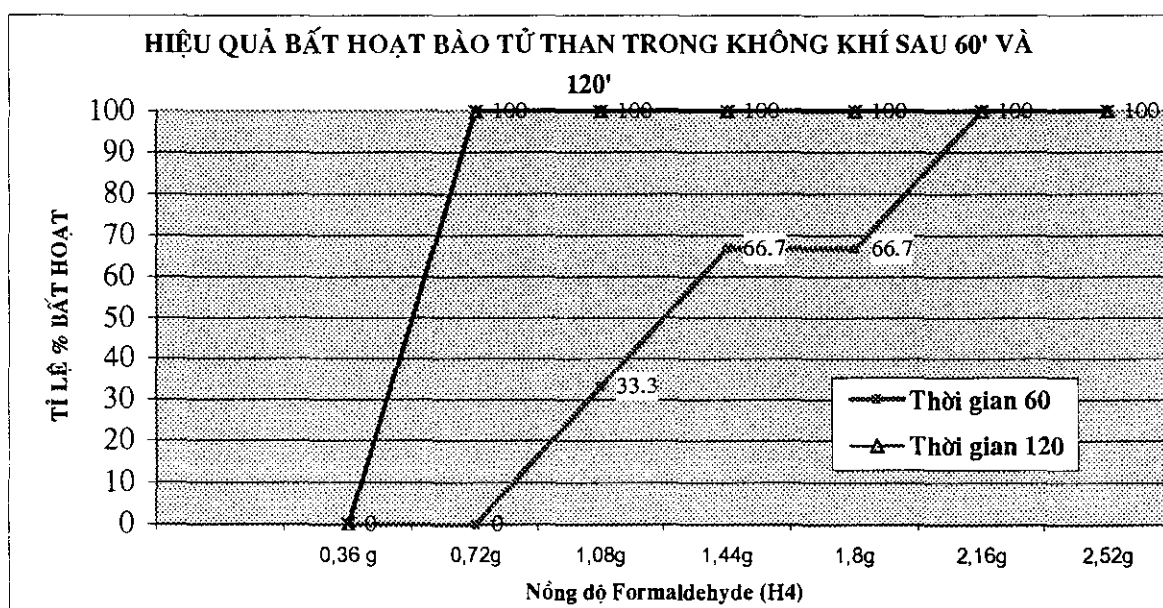
đặc/m ³ không khí ≈ Formaldehyde (gam/m ³)*	(số mẫu sống sót/tổng số mẫu)	khuẩn than thể sinh dưỡng
5ml (1,8)	2/3	0/3
6ml (2,16)	0/3	0/3
7ml (2,52)	0/3	0/3
8ml (2,88)	0/3	0/3
9ml (3,24)	0/3	0/3
10ml (3,6)	0/3	0/3
11ml (3,96)	0/3	0/3
12ml (4,32)	0/3	0/3
13ml (4,68)	0/3	0/3
14ml (5,04)	0/3	0/3
15ml (5,4)	0/3	0/3
16ml (5,76)	0/3	0/3

* Tỷ trọng của dung dịch Formalin là 1,098, lấy tròn số

Bảng trên cho thấy : nồng độ 6ml Formalin có 36% Formaldehyde (tương đương 2,16 gam/m³) đã có tác dụng diệt bào tử Than ở điều kiện nhiệt 30-35°C, độ ẩm 81-85%, cả 3 mẫu thử đều không có mẫu nào có trực khuẩn Than sống sót. Nồng độ này thấp hơn nồng độ 10-16ml Formalin đậm đặc (tương đương 3,6-5,76g Formaldehyde/m³) mà một số tác giả khác đưa vào thường quy khử trùng tẩy uế. Theo chúng tôi, có lẽ do điều kiện nhiệt độ ở các nước phương Tây thấp hơn nhiều so với nhiệt độ trên nên trong thường quy khử trùng không khí các tác giả đưa ra hàm lượng cao hơn và do thí nghiệm của chúng tôi trong buồng hoàn toàn kín, khống chế được độ ẩm và nhiệt độ nên lượng hóa chất cần thiết để diệt khuẩn thấp hơn.

Bảng 2: kết quả diệt khuẩn trực khuẩn than bằng formaldehyde theo thời gian tiếp xúc khác nhau

Thể tích formaldehyde (g/ m ³)	Kết quả bào tử than (B. anthracis spore)		Kết quả bất hoạt trực khuẩn than thể sinh dưỡng (B. anthracis vegetative)	
	Thời gian khử trùng	(số mẫu sống sót/tổng số mẫu)	Thời gian khử trùng	(số mẫu sống sót/tổng số mẫu)
1ml = 0,36 g	1 giờ	3/3	30.phút	0/3
	1 giờ 50 phút	3/3		
2 ml= 0,72g	1 giờ	3/3	2 giờ	0/3
	2 giờ	0/3		
	3 giờ	0/3		
3 ml = 1,08g	1 giờ	2/3	1 giờ	0/3
	2 giờ	0/3		
4 ml=1,44g	1 giờ	1/3	1 giờ	0/3
	2 giờ	0/3		



Hình 5: kết quả bất hoạt bào tử than trong không khí

- Nồng độ 0,36g/ m³ không khí không diệt được bào tử, tối thiểu liều 0,72g/ m³ trong thời gian 2-3 giờ
- Nếu sử dụng khử trùng trong thời gian 1 giờ cần 2,52g = 7 ml formaldehyde (36%)
- Tốt nhất khử trùng ở liều từ 0,72 g đến 2,25g/ m³ không khí với thời gian 2-3 giờ.
- Đối với thể sinh dưỡng chỉ cần nồng độ formaldehyde 0,36g đến 0,72 gam trong thời gian 30 phút có thể bất hoạt được 100% .

2.2. MÔ HÌNH BẤT HOẠT BÀO TỬ THAN TRONG CÁC VẬT LIỆU NHIỄM

2.2.1. Cách tiến hành thử nghiệm

- Chủng vi khuẩn : B.anthraxis thể bào tử
- Dạng thử nghiệm : Bột đựng trong bì thư

Cách tiến hành : Chủng vi khuẩn cho vào phong bì thư dán kín (các phong bì đã được sấy khử khuẩn và kiểm tra vô trùng trước khi cho chủng thí nghiệm). Cho vào lò vi sóng tiến hành thử nghiệm. Lấy mẫu theo thời gian quy định, cấy vào canh thang dinh dưỡng kiểm tra khả năng sống sót của bào tử.

2.2.2. kết quả thử nghiệm

Bảng 3 : Kết quả diệt bào tử Than bằng lò vi sóng (công suất 450W)

Thời gian (phút)	Bề dày bì bảo vệ	Kết quả bất hoạt bào tử than bằng lò vi sóng với công suất khác nhau		
		Công suất 260 W	Công suất 450W	Công suất 900 W
1	4 lớp giấy	Không	Không	Không
2	4 lớp giấy	Không	Không	Không
3	4 lớp giấy	Không	Không	Không
4	4 lớp giấy	Không	Không	Không
5	4 lớp giấy	Không	Không	Không
6	4 lớp giấy	Không	Không	Không (Giấy chuyển màu)
7	4 lớp giấy	Không	Không	Không

8	4 lớp giấy	Không	Không	Không
9	4 lớp giấy	Không	Không (chuyển màu vàng)	Không
10	4 lớp giấy	Không	Không (Chuyển màu nâu)	Không (cháy đen)
15	4 lớp giấy	Không	Không (cháy)	
20	4 lớp giấy	Không		
25	4 lớp giấy	Không (giấy chuyển màu vàng)		
30	4 lớp giấy	không (Giấy chuyển màu nâu)		

- Với công suất 260 W (công suất thấp nhất) đến tận 30 phút vẫn không diệt được bào tử trực khuẩn Than. Ngoài ra do tác dụng nhiệt làm biến đổi lớp bao bì chứa bào tử Than.

- Với công suất 450 W (công suất trung bình) đến tận 15 phút vẫn không diệt được bào tử trực khuẩn Than. Ngoài ra do tác dụng nhiệt làm biến đổi lớp bao bì chứa bào tử Than, đến phút thứ 15 có biểu hiện cháy lớp giấy chứa bào tử nên dừng thí nghiệm.

- Sử dụng lò vi sóng công suất 900 W (công suất cao nhất), đến phút thứ 6 ,lớp giấy chứa bào tử đổi màu vàng nâu và có mùi thơm. Đến tận phút thứ 10 vẫn không diệt được bào tử trực khuẩn Than, có biểu hiện cháy lớp giấy chứa bào tử nên dừng thí nghiệm.

Từ kết quả bảng 1,2,3 cho thấy phong bì thư hoặc bưu phẩm nghi chứa bào tử Than trong khủng bố sinh học không thể khử khuẩn bằng lò vi sóng hiện có trên thị trường.

2.3. KẾT LUẬN

** Không thể diệt bào tử Than bằng vi sóng :*

- Khi thử đến mức cao là 900W bào tử Than vẫn không bị diệt, lớp giấy chứa bào tử chuyển màu nâu đen có biểu hiện nếu tăng thời gian có thể cháy. Như vậy khi bột nghi chứa bào tử Than đựng trong bì thư, bưu phẩm không thể dùng vi sóng để khử khuẩn mà còn làm hỏng bưu phẩm.
- Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng thấy hiệu quả cao của formaldehyde xông hơi nồng độ 2,16 g/ m³ không khí trong thời gian 60 phút, hoặc trên 0,72 g/ m³ trong thời gian 120 phút ở các điều kiện nhiệt độ 30- 35°C bất hoạt được 100% bào tử than
- Bất hoạt trực khuẩn than thể sinh dưỡng bằng formadehyde trong không khí, liều tối thiểu 0,36 g / m³ trong thời gian từ 30 -60 phút có thể bất hoạt 99,99 %- 100%.

2.4. QUI TRÌNH KHỬ TRÙNG, TẮY UẾ VI SINH VẬT ĐỘC HẠI TRONG KHÔNG KHÍ

Khử trùng không khí là một khái niệm tương đối, vì không khí khi nhiễm mầm bệnh, độc tố hay phóng xạ thì tất cả các mọi vật đều bị nhiễm. Khi nói tới khử trùng, tẩy uế môi trường không khí có nghĩa là khử trùng trong một không gian giới hạn như: buồng kín, nhà ở, xe quân dụng...

Phần này chúng tôi trình bày qui trình xử lý trực khuẩn than vì đây là tác nhân chính thường được sử dụng trong khủng bố sinh học , hơn nữa đặc điểm của tác nhân này tồn tại ngoài môi trường dưới dạng bào tử, có sức đề kháng cao với ngoại cảnh, phương pháp diệt bào tử hoàn toàn có khả năng diệt những tác nhân gây dịch khác

2.4.1. LỰA CHỌN HOÁ CHẤT:

Hóa chất cơ bản để khử trùng bào tử trực khuẩn than là Formaldehyde, Glutaraldehyde (ở pH 8,0-8,5), hydrogen peroxide và peracetic acid. Hypochlorit cũng có tính chất diệt bào tử nhưng bị trung hoà rất nhanh bởi các chất hữu cơ nên không phù hợp. Hydrogen peroxide và Ethylene oxide là chất rất dễ gây cháy nổ, khi dùng phải có thiết bị riêng và thực hiện nghiêm ngặt quy trình nên không phù hợp khi dùng trong trường hợp

khẩn cấp. Peracetic acid có thể dùng khử trùng dụng cụ, tuy nhiên do tác dụng phá hủy các thiết bị kim loại nên khả năng ứng dụng rất hạn chế.

Để bảo vệ môi trường và sức khỏe người và động vật nên sử dụng Formaldehyde trong khử trùng bề mặt, dụng cụ, không khí.

2.4.2. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG KHÔNG KHÍ

** Khử trùng bằng xông hoá chất vật dụng kín như nhà, buồng...:*

Những buồng kín không thể khử trùng bề mặt như phòng thí nghiệm, xe khí tài quân sự...có thể xông bằng hơi hoá chất sôi trong nước. Một buồng khoảng 25 — 30 m³ cần 4 lít nước có 400ml Formalin đậm đặc (37% W/V Formaldehyde), tương đương 135-160ml Formalin 10% (V/V) pha từ dung dịch đậm đặc 37% Formaldehyde/ m³ dung tích buồng. Sử dụng bình xông tự động đặt thời gian hoặc tự động ngắt điện khi chất lỏng trong bình đến giới hạn, để qua đêm (hoặc không ngắn hơn 4 giờ kể từ thời điểm bắt đầu sôi đến khi hết hoá chất trước khi thông gió). Nhiệt độ phòng nên > 15°C.

Bước 1: Tính thể tích cần khử trùng: $m^3 = \text{chiều cao (m)} \times \text{chiều dài (m)} \times \text{chiều rộng (m)}$

Bước 2 : tính lượng hoá chất cần thiết:

Hiện nay hoá chất phổ biến thường được sử dụng khử trùng bào tử than trong không khí là formaldehyde (36%- 37% dạng thương phẩm). Từ kết quả các bảng trên có hệ số an toàn cho m³ không khí từ 3,6 - 5,4 g tương đương với 10 - 15 ml formaldehyde nồng độ 36%-37%, từ thể tích không khí cần khử trùng, tính lượng hoá chất cần thiết. Đông lượng hoá chất cần thiết tính tỷ lệ 1V hoá chất cộng với 9 thể tích nước, sau đó cho vào bình xông hơi

Bước 3: Chuẩn bị dụng cụ xông hoá chất

Tốt nhất sử dụng bình tự động ngắt, khi hoá chất bay hơi hết hoặc bình xông có ống dẫn hơi hoá chất vào các phòng cần khử trùng

Bước 4: Trước khi xông đóng tất cả cửa, dán chặt bằng băng keo, có ký hiệu an toàn các cửa ra vào, thời gian xông hơi khử trùng không khí khoảng 4 giờ , tính từ khi formaldehyde bay hơi hết, nếu có điều kiện có thể để trong thời gian qua đêm, cấm người và động vật vào khu vực xông hơi.

Bước 5: để kiểm tra tác dụng khử trùng dùng một miếng giấy thấm nhúng vào hỗn dịch bào tử (ngoại trừ điều kiện chuẩn dùng các chủng B.subtilis var globigii (NCTC 10073)

hoặc B.cereus (ATCC 12826) nếu không có có thể dùng bào tử của chủng vaccin của B.anthraxis có nồng độ 10^9 CFU/ cm² , để khô rồi đặt vào vị trí bất kỳ xa bình xông.

Kết thúc quá trình xông lấy giấy nhúng bào tử thả vào ống canh thang dinh dưỡng . Nếu sau thời gian ủ $37^{\circ}\text{C}/24$ giờ không thấy vi khuẩn mọc thì việc khử trùng có kết quả “ Dùng mặt nạ hoá học khi làm việc” . Mở các cửa để thông gió hoặc mở nhiều quạt. Nếu có máy đo Formaldehyde thì thông gió cho tới khi chỉ còn $< 2\text{ppm}$, nếu không có máy đo thì phải không còn mùi của Formaldehyde trước khi vào phòng.

Với mục đích bảo vệ sức khoẻ và môi trường đã có những bước tiến trong việc thay thế Formalin bằng Hydrogen Peroxide trong việc xông khử trùng vi khuẩn. Việc sử dụng Formalin ngày càng được nhiều nước cấm, thế nhưng thiết bị cần thiết cho việc xông hydrogen peroxide công kênh, phức tạp và đắt nên chưa trở nên phổ biến và phù hợp cho kỹ thuật xông thường quy tại các phòng thí nghiệm.

Bước 6: trung hoà formaldehyde kết thúc qui trình khử trùng không khí , cân trung hoà lượng formaline tồn dư, tiến hành xông dung dịch amoniac 25% theo tỷ lệ : 1 thể tích amoniac cho 2 thể tích formalin . Nếu khử trùng không khí ở những vùng rộng rãi thoáng gió có thể mở rộng cửa phòng, bật quạt đuổi khí có formaldehyde ra khỏi phòng.

Phần 3

XÂY DỰNG MÔ HÌNH VÀ QUI TRÌNH BẮT HOẠT VI SINH VẬT ĐỘC HẠI TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC

3.1. XỬ LÝ TÁC NHÂN SINH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHIỆT :

3.1.1. Trục khuẩn tả, thương hàn :

- *Phương pháp đun sôi (100°C) :*

Tiến hành:

- Cho vào bình nút mài khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.
- Đun sôi, lấy mẫu (0,1ml) cấy vào canh thang dinh dưỡng, để 37°C/ qua đêm để kiểm tra sống sót.

Bảng 4: Kết quả diệt vi khuẩn khuẩn thương hàn và phẩy khuẩn tả bằng nhiệt (100°C)

Thời điểm lấy mẫu ¹	Kết quả (còn sống sót)	
	Phẩy khuẩn tả	Thương hàn (S.typhi)
Bắt đầu sôi	3/9	7/9
1 phút	0/9	5/9
2 phút	0/9	1/9
3 phút	0/9	1/9
4 phút	0/9	0/9
5 phút	0/9	0/9
6 phút	0/9	0/9
7 phút	0/9	0/9
8 phút	0/9	0/9
9 phút	0/9	0/9
10 phút	0/9	0/9

Kết quả bảng trên cho thấy: rất dễ diệt V.cholerae bằng nhiệt, ngay sau 1 phút kể từ khi sôi đã không có mẫu nào trong 9 mẫu thử còn vi khuẩn mọc. Riêng với thương hàn thì phải hết phút thứ 3 mới diệt vi khuẩn của cả 9 mẫu thử. Tuy nhiên do thí nghiệm thực hiện

với thể tích nhỏ (invitro) nên khi áp dụng thực tế phải có hệ số an toàn (thời gian ít nhất gấp 2 —3 lần).

- *Phương pháp Tyndall (pasteurization): ở nhiệt độ 60°C*

*** Tiến hành:**

- Cho vào các tít (hoặc bình nút mài) khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn. Đun cách thuỷ 60°C. Tại thời điểm định sẵn lấy một vòng dây que cấy, cấy vào canh thang dinh dưỡng, để ủ ấm 37 °C/ qua đêm.

- Chứng : Cấy dây một đầu que cấy hỗn dịch vi khuẩn chưa xử lý nhiệt và làm như trên.

Bảng 5 : Kết quả diệt trực khuẩn thương hàn và phẩy khuẩn tả bằng nhiệt (Tyndall, đun cách thuỷ 60°C)

Thời điểm lấy mẫu	Kết quả (còn sống sót)	
	Phẩy khuẩn tả	Thương hàn (S.typhi)
Đạt nhiệt độ 60°C	9/9	9/9
1 phút	8/9	9/9
2 phút	8/9	9/9
3 phút	5/9	9/9
4 phút	1/9	7/9
5 phút	1/9	5/9
6 phút	0/9	5/9
7 phút	0/9	2/9
8 phút	0/9	0/9
9 phút	0/9	0/9
10 phút	0/9	0/9

Bảng trên cho thấy: V.cholerae bị diệt toàn bộ (9/9 mẫu) sau phút thứ 5 kể từ lúc đạt 60°C.. Riêng với thương hàn thì phải hết phút thứ 7 mới diệt vi khuẩn của cả 9 mẫu thử. Tuy nhiên do thí nghiệm thực hiện với thể tích nhỏ (invitro) nên khi áp dụng thực tế phải có hệ số an toàn (thời gian ít nhất gấp 2 —3 lần).

3.1.2. Trục khuẩn Than :

- Thử bằng đun sôi (100°C) :

Cho vào bình nút mài khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.

Đun sôi, lấy mẫu (10 μ l) ria cấy lên mặt thạch thường, để 37°C / qua đêm, đếm số khuẩn lạc hình thành.

Bảng 6 : Kết quả diệt bào tử trực khuẩn than bằng nhiệt (100°C)

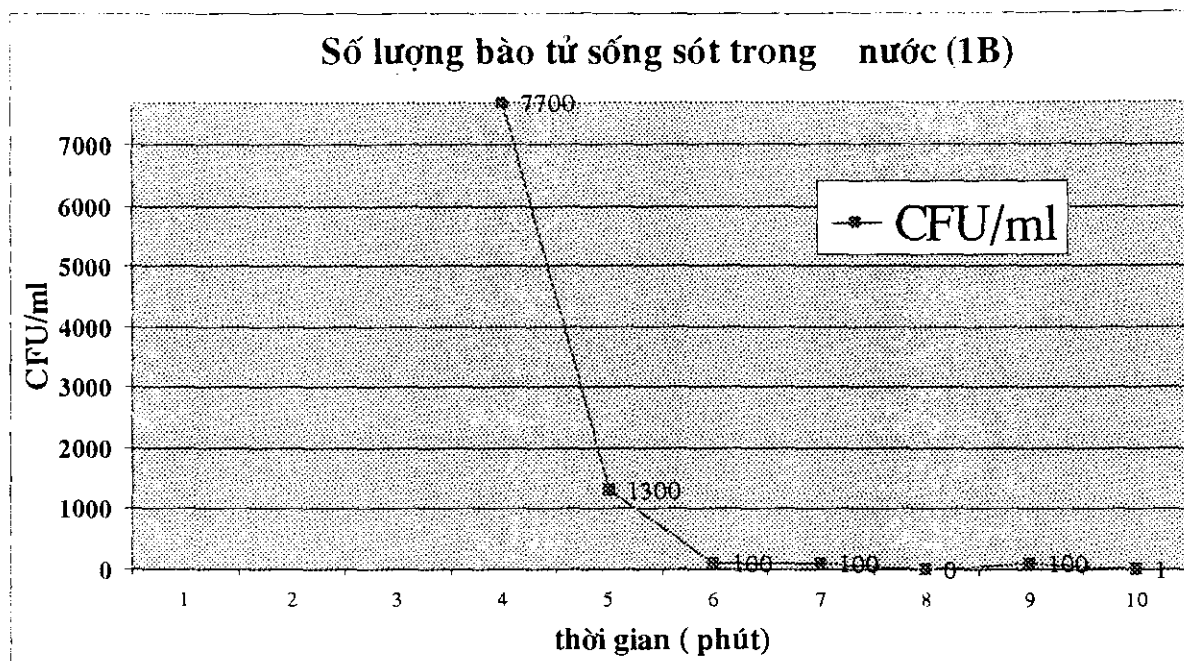
Thời điểm lấy mẫu	Kết quả (số khuẩn lạc*)	
	Thể sinh dưỡng	Bào tử
Bắt đầu sôi	Dây không đếm được	Dây không đếm được
1 phút	Dây không đếm được	Dây không đếm được
2 phút	93	Dây không đếm được
3 phút	6	Dây không đếm được
4 phút	1	77
5 phút	0	13
6 phút	1**	1
7 phút	0	1
8 phút	0	0
9 phút	0	1
10 phút	0	1**
11 phút	0	0
12 phút	0	0
13 phút	0	0
14 phút	0	0
15 phút	0	0

* : Số khuẩn lạc trung bình của 9 đĩa thạch.

** Chỉ còn 1 đĩa có 1 khuẩn lạc

Bảng trên cho thấy: trực khuẩn Than thể sinh dưỡng bị diệt toàn bộ (không thấy còn khuẩn lạc nào trên tất cả 9 đĩa thạch) sau phút thứ 6 kể từ khi sôi. Sau phút thứ 10 kể từ lúc đạt 100°C mới không thấy thể bào tử còn sống sót trên các mẫu thử. Tuy nhiên do thí

thực hiện với thể tích nhỏ (invitro) nên khi áp dụng thực tế phải có hệ số an toàn (thời gian ít nhất gấp 2 - 3 lần).



Hình 6: Số lượng bào tử sống sót trong môi trường nước được xử lý bằng phương pháp nhiệt.

Khử trùng nguồn nước nghi ô nhiễm bào tử than (nồng độ bào tử 10^6 CFU/ ml), thời gian cần thiết để bất hoạt bào tử là sau 10 phút tính từ thời điểm nhiệt độ đạt 100°C

3. 2.KHỬ TRÙNG VI SINH ĐỘC HẠI TRONG NƯỚC BẰNG HOÁ CHẤT :

* Hoá chất sinh Chlor

* Tiến hành thí nghiệm :

- Cho vào dãy ống nghiệm 9ml dung dịch hoá chất có Chlor:
- Cho vào mỗi ống 1ml hỗn dịch vi khuẩn có 1.10^5 CFU/ml
- Lắc đều, để nhiệt độ phòng, lấy 10 μ l (tương đương 100 CFU) ria cấy trên đĩa thạch, để ủ ấm 37°C / 24h, đếm số khuẩn lạc hình thành.
- ống chứng : Cũng tiến hành như trên nhưng thay hoá chất sinh Chlor bằng nước muối sinh lý vô trùng. Lắc đều để thời gian như với hoá chất sau đó để nhiệt độ

phòng, lấy 10µl (tương đương 100 CFU) ria cấy trên đĩa thạch, để ủ ấm 37°C/ 24h, đếm số khuẩn lạc hình thành.

Bảng 7 : Kết quả diệt vi khuẩn Thương hàn, Tả bằng Chloramin

Nồng độ Clo mg/ml	Tả		Thương hàn		
	Số CFU**		Số CFU**		
	1/2h	Chúng*	1/2h	6h	Chúng*
0,0002	78	ống chúng (Thay hoá chất Chlor bằng nước cất) có số CFU trung bình là 81.	86	49	ống chúng (Thay hoá chất Chlor bằng nước cất) có số CFU trung bình là 91.
0,0003	56		89	51	
0,0004	12		64	34	
0,0005	2		52	12	
0,001	2		41	5	
0,002	0		13	0	
0,003	0		6	0	
0,004	0		1	0	
0,005	0		0	0	
0,01	0		0	0	
0,2	0		0	0	
0,5	0		0	0	
1,0	0		0	0	
2,0	0		0	0	
5,0	0		0	0	
10,0	0		0	0	

* Chúng : Dây chúng thay hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý.

** CFU (Colony forming unit) : Số khuẩn lạc trên đĩa thạch sau 24 giờ, chỉ số trung bình của 5 đĩa, lấy tròn số.

Bảng trên cho thấy : Với vi khuẩn Tả nồng độ Clo trong nước 0,002mg/ml (2mg/lít có nồng độ chlor hoạt là 0,5 mg/ lít) diệt toàn bộ số vi khuẩn thử sau 30 phút (không thấy khuẩn lạc nào trên cả 5 đĩa thạch). Với trực khuẩn thương hàn nồng độ Clo có tác dụng diệt khuẩn sau 30 phút là 0,005mg/ml (5mg/lít có nồng độ chlor hoạt là 1,25 mg/ lít), nếu

để thời gian tác dụng lâu hơn, 6 giờ, thì nồng độ diệt của Clo đối với Thương hàn là 0,002mg/ml (tương đương 0,5 mg chlor hoạt tính/ lít) Do điều kiện thí nghiệm là pha hoá chất có Clo trong nước cất nên lượng Clo sử dụng hầu như không, nhưng khi áp dụng thực tế để khử trùng nước thì phải dùng lượng hoá chất lớn hơn vì một số Ion kim loại, chất hữu cơ cũng sẽ tiêu thụ mất một lượng Chlor nhất định.

Bảng 8 : Kết quả diệt trực khuẩn Than bằng Chloramin

Nồng độ Chlor mg/ml	Trực khuẩn Than (sinh dưỡng)			Trực khuẩn Than (bào tử)		
	Số mẫu có vi khuẩn/ tổng số			Số mẫu có vi khuẩn/ tổng số		
	1/2h	18h	Chứng*	1/2h	18h	Chứng*
10	1/3	0/3	Dây chứng thay dung dịch hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý : vi khuẩn mọc 3/3 mẫu	3/3	0/3	Dây chứng thay dung dịch hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý : vi khuẩn mọc 3/3 mẫu
5	1/3	0/3		2/3	0/3	
2	3/3	0/3		3/3	0/3	
1	1/3	1/3		3/3	1/3	
0,5	1/3	0/3		3/3	2/3	
0,2	3/3	1/3		3/3	3/3	
0,1	3/3	1/3		3/3	3/3	
0,05	3/3	2/3		3/3	3/3	
0,01	3/3	3/3		3/3	3/3	

Kết quả bảng trên cho thấy :

Rất khó diệt trực khuẩn Than cả 2 thể sinh dưỡng và bào tử bằng hoá chất có Clo, ở nồng độ 10mg/ml (10.000mg/lít, tương đương dung dịch mẹ thường dùng tại phòng thí nghiệm là 1% Clo) vẫn chưa diệt được cả thể sinh dưỡng lẫn bào tử trong vòng 30 phút, ở thể sinh dưỡng vẫn có 1/3 mẫu còn vi khuẩn sống sót. Thể bào tử trong vòng 30 phút không nồng độ nào diệt được.

Thời gian tác dụng lâu hơn (18 h) có vẻ như đã xuất hiện tác dụng diệt khuẩn ở nồng độ 0,5mg/ml đối với thể sinh dưỡng, với thể bào tử nồng độ là 2mg/ml.

3.3. KẾT LUẬN

- **Tiệt trùng bằng phương pháp nhiệt:**

- * *Phương pháp đun sôi:*

- Phẩy khuẩn tả (*V.cholerae*) bị bất hoạt sau thời gian 1 phút tính từ thời điểm đạt nhiệt độ 100°C, nhưng vi khuẩn thương hàn sau 3 phút với nồng độ vi khuẩn 10⁹ CFU/ ml
- Trực khuẩn than thể dinh dưỡng thời gian cần thiết 100% bị bất hoạt sau 5 phút và thể bào tử ngoài thời gian 10 phút

- * *Tyndall (Pasteurization):*

- phẩy khuẩn tả bị bất hoạt trong thời gian 5 phút và thương hàn sau 7 phút 100% vi khuẩn mới bị bất hoạt với nồng độ vi khuẩn 10⁹ CFU/ ml

Kết quả thử nghiệm bất hoạt vi khuẩn bằng phương pháp nhiệt ở thể tích hạn chế và nồng độ vi khuẩn được xác định, nhưng trên thực tế ở thể tích khử trùng lớn và nồng độ không xác định do đó tốt nhất phải có hệ số an toàn (thời gian gấp từ 2-3 lần số thời gian thử nghiệm)

- **Khử trùng bằng hoá chất**

- Phẩy khuẩn tả nồng độ Clo trong nước 0,002mg/ml (2mg/lít) diệt toàn bộ số vi khuẩn thử sau 30 phút, với trực khuẩn thương hàn là 0,005mg/ml (5mg/lít). Nồng độ 2mg/lít và 5mg/lít đều cao hơn lượng Clo dư trong nước xử lý của các nhà máy nước.
- Rất khó diệt trực khuẩn Than cả 2 thể sinh dưỡng và bào tử bằng hoá chất có Chloramin B, ở nồng độ 10mg/ml (10.000mg/lít, tương đương dung dịch mẹ thường dùng tại phòng thí nghiệm là 1% Clo) vẫn chưa diệt được cả thể sinh dưỡng lẫn bào tử trong vòng 30 phút, nhưng sau 18 giờ khử trùng bằng dung dịch chloramin ở nồng độ 0,5 mg/ ml và 2mg/ ml bất hoạt được 100% trực khuẩn than thể dinh dưỡng và thể bào tử , do đó muốn giảm thời gian thì cần tăng liều cho hoạt tính từ 2,3-2,4 mg/ lít với thời gian tiếp xúc tối thiểu là 1 giờ .

3.4. quy trình khử trùng tẩy uế nguồn nước

3.4.1. Hướng dẫn chung :

Lựa chọn hóa chất :

Có rất nhiều loại hóa chất để khử trùng nước, tùy theo mỗi loại mầm bệnh mà người ta dùng một loại hóa chất khác nhau. Thông thường nhất người ta dùng các hóa chất

có Chlor để khử trùng nước sinh hoạt và nguồn nước (như giếng, bể chứa, nước nhà máy...) vì ít độc hại nhất đối với sức khỏe con người và môi trường.

Theo chúng tôi nên dùng Chloramin trong khử trùng nước vì đây là loại hóa chất phổ biến trên thị trường Việt Nam, giá thành rẻ, dễ sử dụng và có thể diệt được nhiều mầm bệnh khác nhau. Trong nghiên cứu của đề tài chúng tôi cũng thử với hóa chất này..

***Lựa chọn phương pháp khử trùng, tẩy uế :**

Thực tế rất khó tách biệt riêng từng quy trình xử lý như khử trùng không khí, đất, nước...vì khi nhiễm tác nhân sinh học tất cả môi trường sống đều nhiễm mầm bệnh nên biện pháp khử trùng tẩy uế phải áp dụng đồng bộ, tổng thể. Ví dụ khi một khu doanh trại bị nhiễm mầm bệnh sinh học đường khí dung thì toàn bộ các ngôi nhà, không khí, đất, nước và các vật dụng, thiết bị quân sự trong khu vực đều bị nhiễm.

Trong trường hợp có thể thì nên ưu tiên dùng biện pháp xử lý bằng nhiệt nhất là với thực phẩm, vật dụng bằng kim loại, thủy tinh... Một số vật dụng phù hợp hoặc các chế phẩm từ động vật có thể dùng biện pháp khử trùng bằng tia gamma , tia phóng xạ hoặc xông bằng các hoá chất dạng hơi như Ethylene oxide. Các thiết bị quân sự (xe, vũ khí...) có thể áp dụng biện pháp tẩy uế bề mặt bằng Chloramin ...

Biện pháp tốt nhất để khử trùng nước là dùng thiết bị lọc với màng lọc cỡ 0,45µ. Tuy nhiên đây là các thiết bị đắt tiền và hiện tại vẫn chưa trang bị nhiều tại Việt Nam, vì vậy phương pháp phổ biến vẫn là dùng Chloramin.

***Các phương pháp khử trùng nước :**

1. Phương pháp nhiệt : Đun sôi nước 100°C là phương pháp thông dụng nhất, giá thành rẻ, khả năng khử trùng cao.
2. Phương pháp lọc : Sử dụng các loại màng lọc có kích thước nhỏ (0,2µm) để lọc giữ vi khuẩn.
3. Phương pháp hoá học : Dùng các chất hóa học diệt khuẩn hoặc các chất oxy hoá mạnh. Hoá chất khử trùng nước để ăn uống : khí chlor, ozôn, các chất giải phóng chlor (Chloramin B, T, canxi Chlorrua hypoChlorride (Chlorrua vôi), thuốc tím.

3.4.3. KHỬ TRÙNG NƯỚC DÙNG CHO ĂN UỐNG NHIỄM TÁC NHÂN SINH

HỌC :

* Nước nhiễm Tả, Lỵ, Thương hàn :

Khi nguồn nước bị nhiễm các mầm bệnh đường ruột thì biện pháp hiệu quả nhất là đun sôi. Từ kết quả nghiên cứu ở bảng 4 thì thời gian đun kể từ lúc sôi là 4 phút đủ để giết cả phẩy khuẩn Tả, trực khuẩn lỵ và vi khuẩn Thương hàn. Tuy nhiên khi áp dụng thực tế do thể tích nước lớn hơn và nhất là đối với thực phẩm còn bị ảnh hưởng bởi quá trình truyền nhiệt không đều nên phải tính thêm hệ số an toàn 2-3 lần, nên thời gian cần thiết từ khi sôi từ 8-10 phút đủ để diệt toàn bộ vi khuẩn đường ruột.

Có thể dùng biện pháp Tyndall với các chất lỏng dễ bị phá hủy ở nhiệt độ cao. Từ kết quả bảng 5 và hệ số an toàn thì nhiệt độ 60°C/ 25-30 phút đủ để diệt phẩy khuẩn tả, trực khuẩn thương hàn trong nước.

* Nước nhiễm trực khuẩn Than thể sinh dưỡng và bào tử:

Nước dùng cho sinh hoạt như nước đánh răng rửa mặt, tắm, giặt...do thể tích lớn nên dùng hóa chất có Chlor. Biện pháp này ứng dụng cho khử trùng nước cung cấp tập trung như trạm cung cấp nước, bể chứa, giếng ăn bị ô nhiễm mầm bệnh đường ruột.

Nguyên lý : Chlor vào nước tăng thế năng ôxy hoá một số chất nguyên sinh của tế bào, mặt khác Chlor cũng tác động trực tiếp lên một số chất trong nguyên sinh chất và màng tế bào vi khuẩn.

Chlor cần thiết để khử khuẩn gồm lượng Chlor tiêu thụ và Chlor dư. Nồng độ Chlor cần thiết phải đạt : 2 - 5 mg/l .

• QUY TRÌNH KHỬ TRÙNG NƯỚC BẰNG CÁC CHẤT SINH CHLOR HOẠT:

***Bước 1 :** Phải xác định được % Clo trong hóa chất khử trùng theo " Quy trình xác định Chlor hoạt " ở phần Phụ lục 2 . Bước này thực hiện đều hàng tháng thì khi cần sử dụng ngay đã biết được kết quả, không mất thời gian để định lượng.

***Bước 2 :** Tính thể tích nước cần khử trùng : Đối với bể thì đo trực tiếp và tính theo (Chiều rộng bể X chiều dài bể X Chiều cao mực nước trong bể). Giếng miệng hình tròn (Bán kính miệng giếng X Bán kính miệng giếng X 3,2 X Chiều cao mực nước).

- Chiều cao mực nước đo bằng thước hoặc tốt nhất là buộc một vật nặng (gạch hoặc cục sắt) vào đầu dây rồi thả xuống tới đáy. Kéo lên đo đoạn dây bị ướt.
- Đơn vị đo là mét.

Bước 3 : Pha dung dịch Chlor mẹ 1%

Công thức tính như sau :

$$\text{Khối lượng hóa chất cho 1 lít, (gam)} = \frac{1000}{\% \text{ Clo hoạt}}$$

Ví dụ pha Canxi hypochlorit 70% chlor hoạt : Lượng hóa chất cần thiết để pha 1 lít dung dịch 1% là : $1000/70 = 14,28$ gam, lấy tròn là 15 gam (nguyên tắc khi lấy tròn số để pha dung dịch khử trùng là lấy số lớn hơn).

Để thuận lợi chúng tôi đã tính sẵn với một số chất ở bảng dưới đây:

Bảng 9 : *Bảng tính pha dung dịch Chlor hoạt 1%*

Hoá chất (% Chlor *)	Khối lượng cho 1 lít**
Calci hypochlorit (70%)	15g
Chlorua vôi, $\text{CaClOH} \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (30%)	33g
Natri hypochlorit (NaOCl , 5%) (dạng nước)	250ml
Monochloramin, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NNaCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (25%)	40g
Dichloramin B, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NCl}_2$, (60%)	17g
Dichloramin T, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NCl}_2$, (60%)	17g
Hexachlormelamin, $\text{C}_3\text{N}_6\text{Cl}_6$, (10%)	100g

* Xác định theo " Quy trình xác định hàm lượng Chlor trong chất khử trùng "

** Tùy theo thể tích nước cần khử trùng để tính cụ thể thể tích dung dịch mẹ 1%.

Bước 4 : Khử trùng bằng dung dịch Chlor mẹ 1%.

Cho dung dịch mẹ vào nước cần khử trùng theo hướng dẫn dưới đây :

Bảng 10 : *Hướng dẫn liều khử trùng Tả, thương hàn, Lỵ bằng dung dịch Chlor 1%.*

Nước cần khử	Dung dịch mẹ
1 lít	5 ml

10 lít	50 ml
100 lít	500ml
1000 lít (1m ³)	5000ml

Trộn đều bằng que hoặc trong giếng, bể thì bằng cách thả gầu mức nước vào kéo lên xuống nhiều lần để trộn đều. Với liều khử trùng như bảng 12 đậm độ Chlor từ 3- 5 mg/lít nước khử trùng tùy theo các chất (hữu cơ, các Ion kim loại...) có trong nước.

- Chú ý : Nếu nước vẫn đục (có nhiều hạt lơ lửng) nên lọc nước trước khi cho Chlor.
- Khử trùng bằng hoá chất có Chlor dạng bột :

Trong trường hợp không có hoặc không kịp pha dung dịch Chlor 1% thì có thể thả trực tiếp hoá chất sinh Chlor vào bể, hoặc giếng cần khử trùng. Để đạt lượng Chlor từ 3 -5 mg/lít thì cách tính lượng hoá chất theo bảng chúng tôi tính sẵn dưới đây.

Bảng 11 : Bảng tính lượng hoá chất cho 1m³

Hoá chất (% Chlor hoạt *)	Khối lượng cho 1m ³
Calci hypochlorit (70%)	7,2g
Chlorua vôi, CaClOH.Ca(OH) ₂ .xH ₂ O (30%)	17,0g
Monochloramin, C ₆ H ₅ SO ₂ NNaCl.3H ₂ O, (25%)	20,0g
Dichloramin B, C ₆ H ₅ SO ₂ NCl ₂ , (60%)	8,3g
Dichloramin T, CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂ NCl ₂ , (60%)	8,3g
Hexachlormelamin, C ₃ N ₆ Cl ₆ , (10%)	50g

Trộn lượng hoá chất cần dùng (tương đối chính xác) cho vào một xô, cho nước vào trộn đều cho tan sau đó đổ vào giếng hoặc bể cần khử trùng. Dùng que hoặc trong giếng, bể thì bằng cách thả gầu mức nước vào kéo lên xuống nhiều lần để trộn đều.

Nước khử trùng bằng Chlor thường có mùi hăng, nên để sau 1 giờ hoặc lâu hơn để bớt mùi trước khi dùng.

Phần 4

XÂY DỰNG MÔ HÌNH VÀ QUI TRÌNH BẤT HOẠT VI SINH VẬT ĐỘC HẠI TRONG THỰC PHẨM VÀ CÁC DẠNG BAO BÌ BẢO QUẢN THỰC PHẨM TRONG ĐIỀU KIỆN TÁC CHIẾN HIỆN NAY.

4.1. tác nhân sinh học và khả năng gây độc thực phẩm:

* *Nguyên nhân gây độc thực phẩm* : hầu hết là do tác nhân vi sinh vật, mỗi loại vi sinh vật có cơ chế gây nhiễm khác nhau, thông thường các loại vi khuẩn đường ruột trong quá trình phát triển tạo ra các sản phẩm ngoại bào (ngoại độc tố) đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh đường ruột như: Salmonella, shigella, Y.pestis, V.cholerae ... sản xuất ra độc tố ruột gây các hội chứng rối loạn tiêu hoá...Để gây nhiễm độc thực phẩm trước tiên vi khuẩn phải có đủ điều kiện thuận lợi cho sự phát triển như: Loại thực phẩm, độ ẩm , nhiệt độ, thời gian, một số vi khuẩn có khả năng phát triển tạo ra polyscharide để tạo ra màng sinh học trên bề mặt các loại thực phẩm

- *Điều kiện gây nhiễm độc thực phẩm:*

- + gây nhiễm bề mặt thực phẩm do gây nhiễm, tiếp xúc với đất và dụng cụ cấp dưỡng không được khử trùng trước khi sử dụng
- + Ăn thức ăn sống hoặc để lâu
- + Điều kiện bảo quản vận chuyển thực phẩm không bảo đảm
- + Thực phẩm khử trùng bằng phương pháp nhiệt không bảo đảm nhiệt độ và thời gian cần thiết để tiệt trùng

- *Thực phẩm lây nhiễm chéo từ các nguồn:*

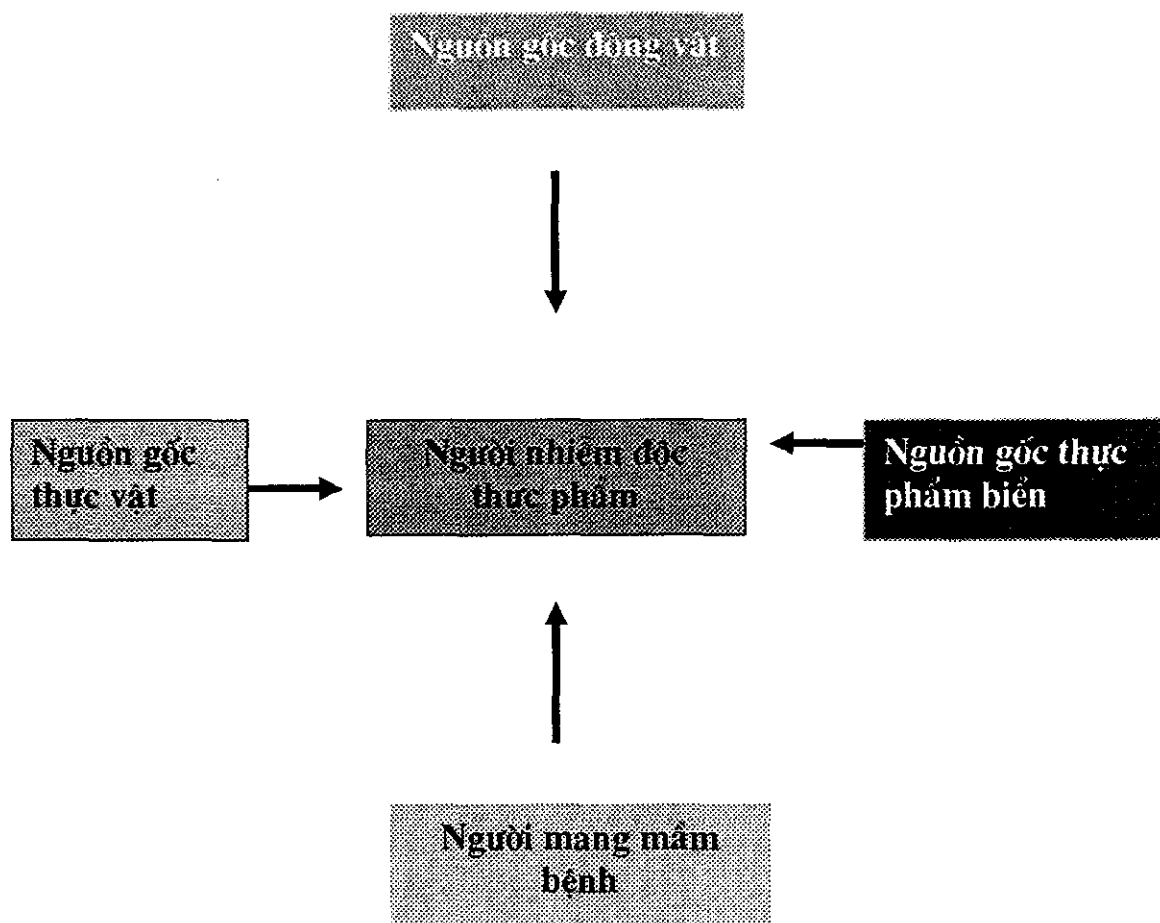
- + Nước nhiễm tác nhân gây bệnh: phẩy khuẩn tả, vi khuẩn thương hàn, trực khuẩn lỵ và bào tử của trực khuẩn than
- + Thực phẩm nhiễm phân người và các loại gia súc gia cầm mắc bệnh
- + Thực phẩm nhiễm từ sản phẩm bài tiết của động vật cảm nhiễm

- *Sử dụng trong kháng bố sinh học*

- + Mục đích: tiêu diệt đối phương bằng cách gây ra các vụ dịch, làm mất khả năng chiến đấu

+ Tính chất của các tác nhân sinh học : độc lực cao, khả năng sống và tồn tại ngoài môi trường rất lâu, một số phương thức lây truyền thay đổi để tạo ra tính bất ngờ.

SƠ ĐỒ NGƯỜI NHIỄM ĐỘC THỰC PHẨM



Bảng 12. Tình hình sử dụng bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm hiện nay trong quân đội và trong điều kiện tác chiến mới

TT	LOẠI BAO BÌ BẢO QUẢN LƯƠNG THỰC, THỰC PHẨM	CHẤT LIỆU	TÁC DỤNG	SỨC CHỊU ĐỤNG
1	Đựng gạo	01 lớp PP tron	Tránh bụi	Thấm nước, rẽ rách khi va chạm mạnh
	Đựng gạo cung cấp trường sa	03 lớp (PVC, PP, PE)	Tránh xâm nhập của tác nhân sinh học	Chịu va chạm mạnh và chống khả năng ăn mòn của nước biển

2	Đựng đậu xanh, lạc, vùng	03 lớp (PVC, PP, PE)	Tránh xâm nhập của tác nhân sinh học	Chịu va chạm mạnh và khả năng ăn mòn của nước biển
3	Dầu thực vật, mỡ, nước mắm	Can nhựa	Tránh xâm nhập của tác nhân sinh học	Chịu va chạm mạnh và khả năng ăn mòn của nước biển
4	Đồ hộp (Thịt, cá, rau, hoa quả)	Hộp thiếc trong, bìa caton ngoài (dạng kim loại)	Tránh VSV xâm nhập	Vỏ ngoài kim loại dễ bị nước biển ăn mòn
5	Lương khô	Bao PE phủ parafin, đóng 10 kg trong thùng sắt	Tránh VSV xâm nhập	Vỏ ngoài kim loại dễ bị nước biển ăn mòn
6	Thức ăn sẵn phục vụ dã ngoại	Thực phẩm chứa trong tộp nhựa, đầu hàn kín bằng thiếc	Tránh VSV xâm nhập	Chịu được va đập
7	Bao bì đựng thịt, hoa quả , rau tươi	Sọt tre hoặc kim loại	Nguy cơ tiếp xúc trực tiếp với tác nhân sinh học	Không chịu được va chạm
8	Thức ăn phục vụ cho hoạt động dã ngoại và tác chiến trong chiến tranh sinh học (đang nghiên cứu)	Túi PE , nhôm hàn kín ngoài cùng lớp OPP	Tránh nhiễm tác nhân sinh học	Chịu được va đập mạnh

4.2. Mô hình thử nghiệm khử trùng các dạng bao bì bảo quản thực phẩm hoặc dụng cụ nhà bếp bằng hóa chất:

Hiện nay một số thực phẩm cung cấp trong quân đội và thị trường có nhiều dạng, nhưng chủ yếu xếp vào 2 loại chính là :

***Loại không thấm nước :**

- Bao bì cấu tạo bởi 1 hoặc nhiều lớp polyethylen hoặc giấy tráng paraffin
- Loại đóng trong hộp kim loại
- Bao bì có chất liệu có nguồn gốc từ cao su
- Bao bì dạng chất dẻo

4.2.1. Kết quả thử nghiệm diệt khuẩn trên loại bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm bằng chất liệu không thấm nước:

* Khử trùng vi sinh vật độc hại bằng hoá chất

Cách tiến hành:

- Các chủng vi sinh vật tăng sinh trên môi trường thạch cơ bản và thạch kiềm pH: 8,5 %, pha canh khuẩn với nước muối sinh lý có nồng độ 0,5 Macfarland tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml. Dùng tăm bông vô trùng phết lên bề mặt các chất liệu với diện tích 5-10 cm²
- Pha dung dịch hypochlorite (6%), iodine và cloramin hoạt với các nồng độ khác nhau
- Nhúng toàn bộ bao bì đã gây nhiễm vào hoá chất
- Thời gian khử trùng trong thời gian 5 - 60 phút.
- Thử nghiệm được tiến hành ở điều kiện: Nhiệt độ phòng thí nghiệm 22- 25°C (bao gồm cả dung dịch hoá chất và bao bì đựng thực phẩm)

Đánh giá kết quả:

- Sử dụng tăm bông lấy mẫu trên diện tích 1cm² cấy vào thạch dinh dưỡng
- Mẫu chứng dương: thay dung dịch khử trùng bằng nước muối sinh lý

Bảng 13: kết quả diệt trực khuẩn than trên bề mặt bao bì polyethylen không thấm nước bằng hypochlorite

Hoá chất	Nồng độ hoá chất (%=ppm/cm ²)	% hiệu quả diệt trực khuẩn than (sinh dưỡng)		% hiệu quả diệt trực khuẩn than (bào tử)	
		Sau 30□	Sau 60□	Sau 30□	Sau 60□
HYP- 6 (NaOCl) pH: 7,0 T°C: 22°C	100 ppm (0,01%)	95,63 %	98,67 %	65, 24 %	92,63%

	500 ppm (0,05%)	100%	100 %	99,99 %	100%
	5.000 ppm (0,5 %)	100%	100%	99,99 %	100%
	10.000 ppm (1%)	100%	100 %	100%	100%

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy:

Sử dụng hypo-6 ở nồng độ 500 ppm có thể bất hoạt được toàn bộ trực khuẩn than thể sinh dưỡng sau 30 phút tiếp xúc, nhưng cũng ở nồng độ tiếp xúc tương ứng chỉ diệt 99,99 % trực khuẩn than thể bào tử. Để bất hoạt 100 % trực khuẩn than thể bào tử cần phải sử dụng sodium hypochlorite có nồng độ 10.000 ppm với thời gian tiếp xúc 30 phút hoặc nồng độ 500 ppm với thời gian tiếp xúc 60 phút.

Bảng 14: kết quả diệt vi khuẩn thương hàn trên bề mặt bao bì bằng dung dịch hypochlorite, iodine và QACs

Nhiệt độ thử nghiệm 22 ^o C		Thời gian 10 phút		Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland	
Bề mặt vật liệu thử nghiệm		Tỷ lệ % diệt khuẩn bằng Hypochlorite(HYPO)			
Nồng độ clo hoạt tính ppm	50 ppm (0,005%)	100 ppm (0,01%)	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1%)	
Kim loại	86,72 %	99,64 %	100 %	100 %	
Nhựa tổng hợp	45,78 %	64,73 %	84,34 %	92,64 %	
Thủy tinh	94,63 %	98,52 %	100 %	100 %	
Chất liệu		Tỷ lệ % diệt khuẩn bằng iodine			

Nồng độ hoá chất	10 ppm (0,001%)	50 ppm (0,005%)	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1%)
Kim loại	94,63 %	100 %	100%	100%
Nhựa tổng hợp	92,72 %	98,63 %	100 %	100 %
Thủy tinh	96,72 %	100 %	100 %	100 %
Chất liệu bao bì	Tỷ lệ % diệt khuẩn bằng QACs (hợp chất amonium bậc 4 (NH₄))			
Nồng độ hoá chất	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1 %)	10.000 ppm (1%)	100.000 ppm (10 %)
Kim loại	99,46 %	100 %	100 %	100 %
Nhựa tổng hợp	72,64 %	96,24 %	99,68 %	100 %
Thủy tinh	100 %	100 %	100 %	100 %

Bảng trên cho thấy:

- Nếu sử dụng hypochlorite để khử trùng bề mặt bao bì nhiễm vi khuẩn đường ruột làm bằng chất liệu là kim loại và thủy tinh đòi hỏi nồng độ tối thiểu từ 500 ppm — 1000 ppm và chất liệu nhựa tổng hợp đòi hỏi trên 1000 ppm
- Nếu sử dụng dung dịch iodine khử trùng bề mặt chất liệu bao bì bằng kim loại và thủy tinh cần nồng độ từ 50 ppm — 500
- Nếu khử trùng bằng QACs đối với chất liệu thủy tinh và kim loại cần 1000 ppm — 10.000 ppm và bao bì sản xuất bằng chất liệu nhựa cần 100.000 ppm

** Khử trùng bao bì bảo quản thực phẩm bằng bằng clo hoạt tính:*

Pha loãng nồng độ hoá chất theo tỷ lệ nồng độ chlorine hoạt tính của chế phẩm do Phân viện Phòng chống vũ khí NBC cung cấp (tên thương mại là bột 3/2) có thành phần clo hoạt động là 40%.

- Tiến hành xác định nồng độ như sau:

+ Cân 10 g chế phẩm trộn đều với 10 ml nước cất vô trùng có nồng độ clo hoạt là 40%.

+ Pha loãng bậc 2 liên tiếp có nồng độ clo là 20%, 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%, 0,3125 %...

+ Xác định khoảng nồng độ diệt khuẩn theo từng loại vi khuẩn và đặc tính cấu trúc tế bào cũng như khả năng kháng chất diệt khuẩn của từng loại, sau đó tiến hành pha loãng tiếp trong khoảng để xác định nồng độ diệt và ức chế vi khuẩn .

+Xác định số lượng vi khuẩn mọc trên đĩa thạch bằng cách lấy tám bông vô trùng thấm nước muối sinh lý di đều trên 1 cm² bề mặt chất liệu đã khử trùng cấy vào thạch dinh dưỡng, ủ 370C/ 24- 48 giờ, đếm số khuẩn lạc trên đĩa, cũng làm tương tự với mẫu chứng dương khi không có hoá chất tiết trùng.

- Nồng độ vi khuẩn gây nhiễm bề mặt:

+ 0,5 Macfaland tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml

Bảng 15: kết quả diệt trực khuẩn than trên bề mặt các chất liệu bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm bằng dung dịch clo hoạt tính

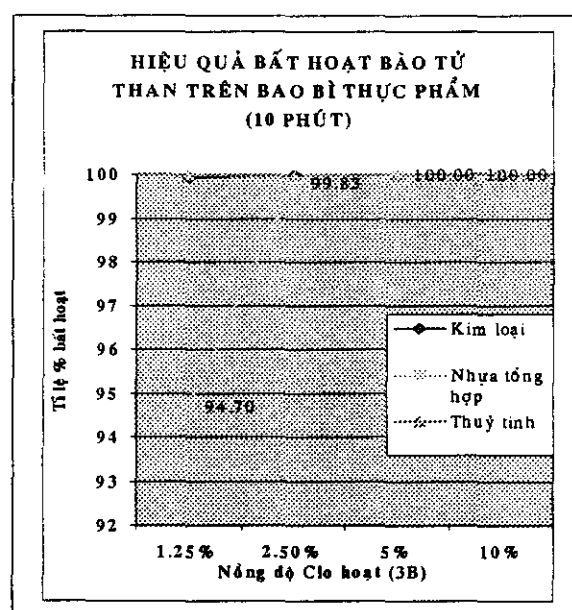
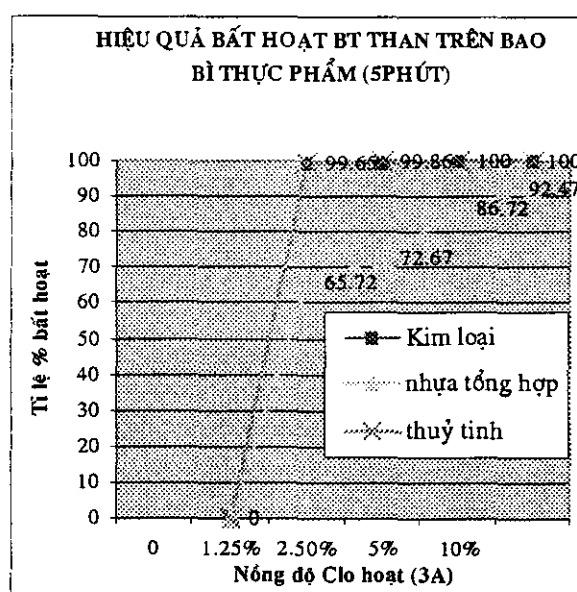
Vật liệu khử trùng	Hiệu quả (%) bất hoạt bào tử than			
Nhiệt độ thử nghiệm 22 ⁰ C		Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland		
Thời gian (Tm)	Sau 5 phút			
Nồng độ clo hoạt tính ppm	12500ppm (1,25 %)	25.000 ppm (2,5 %)	50.000 ppm (5 %)	100.000 ppm (10 %)
Kim loại	99.56 %	99,68 %	99,81 %	99,86 %
Nhựa tổng hợp	65,72 %	72,67 %	86,74 %	92,47 %
Thủy tinh	99,65 %	99,86 %	100 %	100 %
Thời gian (Tm)	Sau 10 phút			
Kim loại	99,93 %	100 %	100%	100 %

Nhựa tổng hợp	94,7 %	99,83 %	100 %	100 %
Thủy tinh	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 15 phút</i>			
Kim loại	100 %	100 %	100 %	100 %
Nhựa tổng hợp	100 %	100 %	100 %	100 %
Thủy tinh	100 %	100 %	100 %	100 %

Kết quả bảng 17 cho thấy:

Xử lý bao bì thực phẩm và các đồ dùng nhà bếp được sản xuất bằng các chất liệu như thủy tinh, nhựa tổng hợp, kim loại nghi nhiễm tác nhân là bào tử than thì sử dụng khử trùng tối thiểu 12.000 ppm — 25.000 ppm trong thời gian 15 phút hoặc 50.000 — 100.000 ppm trong thời gian trong thời gian 10 phút hoặc.

Chú ý : khử trùng các chất liệu trên có nhiễm các dạng thực phẩm dư thừa như : protein, lipid hoặc polycharcarid thì cần phải làm sạch bề mặt trước khi tiến hành khử trùng hay tẩy uế và các thành phần hoá học trên có thể làm giảm hoạt tính của các chất hoá học.



Hình 7: hiệu quả bất hoạt bào tử than trên bề mặt chất liệu bao bì bảo quản thực phẩm

Hình (7A) : Hiệu quả khử trùng bào tử than bằng cloramin trong thời gian 5 □ 10 phút tiếp xúc , cần nồng độ 5%- 10% (50.000 ppm □ 10.000 ppm)

Hình (7B) : nếu sử dụng nồng độ 1,25% (12500ppm) khử trùng 10 phút chỉ có thể áp dụng với vật liệu bao bì bằng kim loại và thủy tinh.

- Nếu sử dụng nồng độ clo hoạt thấp nhất trong thử nghiệm là 1,25% để bất hoạt 100% bào tử , thời gian khử trùng cần thiết trên 15 phút.

Bảng 16: kết quả khử trùng bề mặt bao bì nhiễm vi khuẩn *S. typhi* bằng clo hoạt tính

Vật liệu khử trùng	Tỷ lệ % diệt vi khuẩn thương hàn				
Nhiệt độ thử nghiệm 24 ^o C			Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland		
Thời gian (Tm)	Sau 5 phút				
Nồng độ clo hoạt tính (ppm= %)	100 ppm (0,01%)	150 ppm (0,015%)	3.125 ppm (0,3125%)	6.250 ppm (0,65%)	12.500 ppm (1,25 %)
Kim loại bề mặt nhẵn (sữa hộp)	85,6 %	92,23 %	96,55 %	99,98 %	100 %
Nhựa tổng hợp	56,23 %	86,16 %	90,34 %	99,27 %	99, 34 %
Thủy tinh	92,35 %	94, 63 %	98, 93 %	100 %	100 %
Thời gian (Tm)	Sau 10 phút				
Kim loại	92,60 %	94,23 %	99,77 %	100 %	100 %
Nhựa	72, 36 %	87,54 %	92, 62 %	99,86 %	100 %
Thủy tinh	94,57 %	98,62 %	99,94 %	100 %	100 %
Thời gian (Tm)	Sau 15 phút				
Kim loại	94,72 %	99,63 %	100 %	100 %	100 %
Nhựa tổng hợp	92,12 %	94,63 %	99,42 %	100 %	100 %

Thủy tinh	99,24 %	100 %	100 %	100 %	100 %
-----------	---------	-------	-------	-------	-------

Kết quả bảng trên cho thấy:

- Nếu sử dụng clo hoạt tính để khử trùng bề mặt bao bì , tối thiểu cần nồng độ 12.500 ppm bất hoạt được vi khuẩn thương hàn từ 99,34 % - 100 % từ trong thời gian 5 phút với
- Có thể sử dụng ở nồng độ 6250 ppm bất hoạt vi khuẩn từ 99,86 % - 100 % trong thời gian 10 phút
- Nếu sử dụng nồng độ 3125 ppm bất hoạt vi khuẩn từ 99,42%- 100% trong thời gian 15 phút.

4.4. KẾT QUẢ KHỬ TRÙNG LƯƠNG THỰC, THỰC PHẨM NHIỄM VI SINH VẬT ĐỘC HẠI

4.4.1. Đặc điểm của các loại lương thực, thực phẩm

- *Các dạng thực phẩm:*

- Thực phẩm có nguồn gốc từ động vật (thịt gia súc gia cầm, sữa..)
- Thực phẩm có nguồn gốc thực vật (hoa quả, củ, rau...)
- Thực phẩm có nguồn gốc từ biển (cá, cua, sò...)

- *Đặc điểm của các loại thực phẩm:*

Rất giàu chất dinh dưỡng (protein), khi tiếp xúc với tác nhân vi sinh học, thường gây nhiễm bề mặt và là điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển , đây là điều kiện thuận lợi hơn vì:

+ Thực phẩm giàu protein thường có nguồn gốc động vật, và vi khuẩn gây bệnh từ động vật rất có khả năng lây nhiễm cho thực phẩm.

+ Thực phẩm giàu chất dinh dưỡng, là yếu tố quan trọng nuôi dưỡng vi sinh vật độc hại phát sinh, phát triển.

+ Chế biến thực phẩm và dụng cụ nhà ăn nhà bếp không được khử trùng làm lây nhiễm mầm bệnh vào thực phẩm.

4.4.2. Kết quả khử trùng vi sinh vật độc hại trong lương thực và thực phẩm

- Bất hoạt vi sinh vật độc hại trong lương thực, thực phẩm bằng phương pháp nhiệt:
- Chủng B.anthraxis thể bào tử và sinh dưỡng được tăng sinh khối theo thường qui kỹ thuật

Cách tiến hành:

- Pha trực khuẩn B.anthraxis thể bào tử và sinh dưỡng với nước muối sinh lý (0,9 %) để tạo dung dịch treo có nồng độ 0,5 MacFaland
- Chuẩn bị mẫu thử:

+ *Mẫu thịt* : Cắt vô trùng thịt bò có kích cỡ 1 cm² x 1 cm², nhúng vào canh khuẩn, sau đó chuyển vào ống nghiệm

Bảng 17: Kết quả khử trùng vi khuẩn thương hàn và phẩy khuẩn tả trong mẫu thịt và rau bằng phương pháp nhiệt (Đun sôi 100⁰C)

Thời gian (phút)	Hiệu quả diệt khuẩn (%) (n=9)			
	S. typhi		V.cholerae	
	Mẫu thịt	Mẫu rau	Mẫu thịt	Mẫu rau
2	8/9	7/9	3/9	2/9
4	4/9	2/9	0/9	0/9
6	1/9	0/9	0/9	0/9
8	0/9	0/9	0/9	0/9
10	0/9	0/9	0/9	0/9
12	0/9	0/9	0/9	0/9

Kết quả bảng trên cho thấy:

- + Phẩy khuẩn tả (V.cholerae) rất nhạy cảm với nhiệt hơn là vi khuẩn thương hàn (Salmonella) , để diệt phẩy khuẩn tả chỉ cần đun sôi thời gian không quá 4 phút, nhưng với vi khuẩn thương hàn cần hơn 6 phút.
- + Đối với S. typhi, thời gian cần thiết 6-8 phút, khử trùng bằng phương pháp đun sôi (100⁰C)
- + V.cholerae, thời gian cần thiết là 4 phút (Nhiệt độ 100⁰C)

Bảng 18: Kết quả khử trùng vi khuẩn độc hại trong mẫu sữa

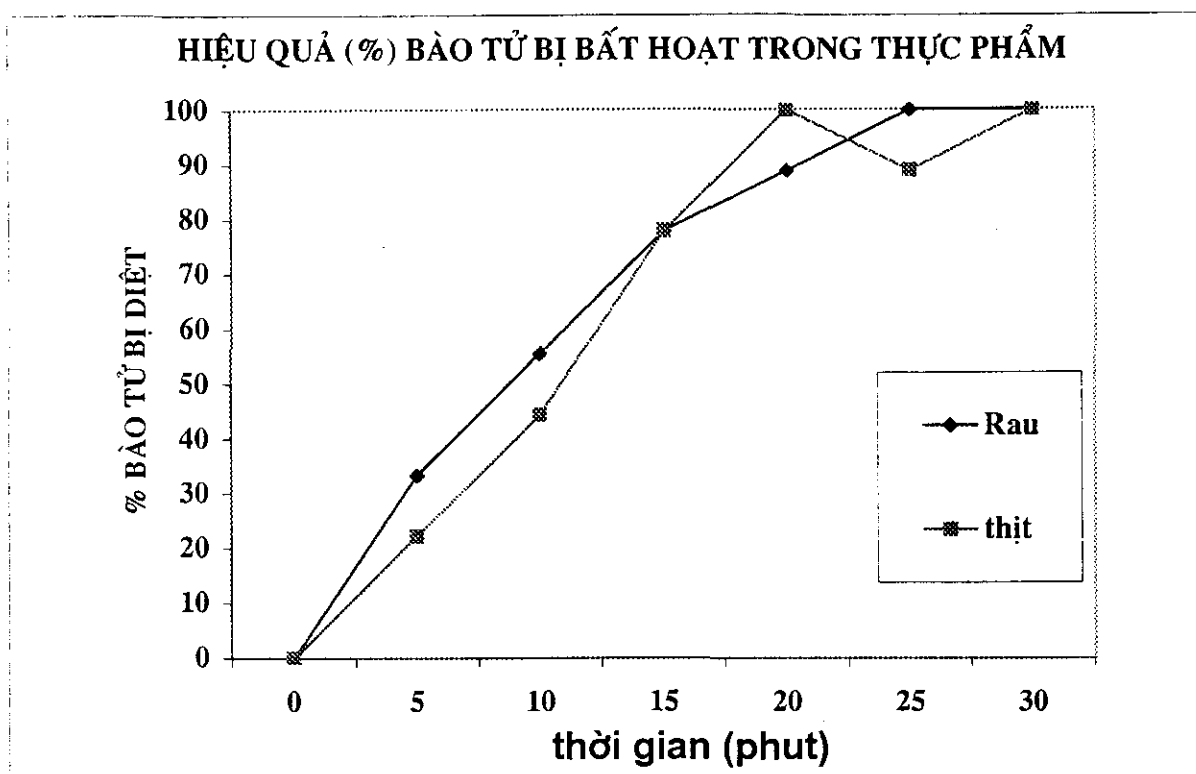
Đối với các nguồn thực phẩm dạng lỏng như: sữa, dầu ăn, bơ, mỡ, fromage... không nên sử dụng các biện pháp khử trùng bằng các phương pháp hoá học vì phần tồn dư của hoá chất phần nào ảnh hưởng tới sức khoẻ con người, và mất mùi vị và không nên dùng phương pháp đun sôi vì làm biến chất của sản phẩm, do đó biện pháp thích hợp nhất là sử dụng phương pháp pasteurization

Thời gian (phút)	Hiệu quả diệt khuẩn(%) ở nhiệt độ 62°C-64°C (n=9 ống)		
	<i>B. anthracis</i> (sinh dưỡng)	<i>S.typhi</i>	<i>V.cholerae</i>
1	9/9	9/9	9/9
5	8/9	5/9	0/9 (100%)
7	6/9	2/9	0/9
8	5/9	0/9 (100%)	0/9
10	5/9	0/9	0/9
15	2/9	ND*	ND*
20	1/9	ND*	ND*
25	0/9 (100%)	ND*	ND*
30	0/9	ND*	ND*

*ND: not done (Không thực hiện)

Kết quả bảng 20 cho thấy:

- + Tiệt trùng *B. anthracis* bằng phương pháp pasteurization ở nhiệt độ 62°C- 64°C, với thời gian cần thiết 20 phút — 25 phút,
- + Đối với *S.typhi* , thời gian 8 phút
- + Với *V. cholerae*, thời gian 5 phút



Hình 8: Tỷ lệ(%) bào tử Than bị bất hoạt (1A) và (1B) số lượng CFU/ ml bào tử sống sót theo thời gian

- Khử trùng thực phẩm dạng hữu cơ và rau thời gian cần thiết để bất hoạt 100 % bào tử từ 25 - 35 phút (nồng độ bào tử gây nhiễm $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml).

4.5.KẾT LUẬN HIỆU QUẢ CỦA MÔ HÌNH KHỬ TRÙNG VI SINH VẬT ĐỘC HẠI TRONG THỰC PHẨM VÀ BAO BÌ BẢO QUẢN THỰC PHẨM

- Khử trùng tác nhân sinh học nhiễm trên các chất liệu bao bì bảo quản thực phẩm bằng phương pháp hoá học:

- Trục khuẩn than thể bào tử (*Bacillus anthracis spore*):
 - Nếu sử dụng dung dịch Hypochlorite ở điều kiện pH: 7,2 ; nhiệt độ 22°C:
 - + nồng độ 5.000ppm — 10.000 ppm trong thời gian 30 phút hoặc 500 ppm trong thời gian 60 phút. (chú ý chất liệu bao bì)
 - Nếu sử dụng dung dịch chlorine hoạt tính :
 - + nồng độ 50.000 ppm tiếp xúc trong 10 phút

+ nồng độ 12.500 ppm tiếp xúc trong thời gian 15 phút

- *Trực khuẩn than thể sinh dưỡng (Bacillus anthracis vegetative)*

+ Cần nồng độ hypolorite 100 —500 ppm, thời gian diệt trong 30 phút

Trên thực tế mẫu thực phẩm nhiễm trực khuẩn than thường tồn tại dưới cả 2 thể bào tử và sinh dưỡng, do đó để đảm bảo tốt công tác khử trùng, tốt nhất sử dụng nồng độ hoá chất như là diệt thể bào tử.

- Diệt vi khuẩn thương hàn (*Salmonella typhi*) trong điều kiện nhiệt độ hoá chất 22°C, thời gian diệt khuẩn 20 phút.

+ Nồng độ hypochlorine 1000 ppm — 5000 ppm

+ Nồng độ iodine : 50 ppm- 500 ppm

+ nồng độ QACs : 500 ppm — 10.000 ppm ,tùy theo chất liệu bao bì

+ Nếu sử dụng chlorine hoạt tính trong thời gian khử trùng 5 phút cần nồng độ 6250 ppm —12.500ppm, với thời gian 10 phút đến 15 phút cần nồng độ 150 ppm - 3125 ppm tùy theo chất liệu bao bì.

- Khử trùng lương thực, thực phẩm bằng phương pháp nhiệt :

- *Trực khuẩn than thể sinh dưỡng (bacillus anthracis vegetative)*: bằng phương pháp đun sôi 100°C, diệt khuẩn trong thời gian 15-20 phút và phương pháp pasteurization ở nhiệt độ 62-64°C, thời gian diệt là 25 —30 phút
- *Trực khuẩn than thể bào tử (Bacillus anthracis spore)* ở nhiệt độ 100°C, bị diệt sau thời gian 30 phút
- *Vi khuẩn thương hàn (salmonella typhi)* ở 100°C, bị diệt sau 6 phút, nếu sử dụng tiệt trùng bằng phương pháp pasteur, bị diệt sau 8 phút
- *Phẩy khuẩn tả (Vibrio cholerae)* ở 100°C, bị diệt trong khoảng thời gian 4 phút, nếu sử dụng tiệt trùng bằng phương pháp pasteur, trong thời gian 5 phút -10 phút

4.6. QUI TRÌNH KHỬ TRÙNG, TẨY UẾ MẦM BỆNH ĐỘC HẠI TRONG THỰC PHẨM

4.6.1. Hướng dẫn chung : Khi khử trùng, tẩy uế bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm trên cơ sở nguyên tắc:

+ Kiểm tra, lựa chọn loại chất liệu bao bì để quyết định hoá chất khử trùng phù hợp và hiệu quả cao

+ Loại bỏ các bao bì bị rách, nhằm tránh lương thực, thực phẩm tiếp xúc trực tiếp với hoá chất khử trùng có thể gây độc cho người.

+ Đối với tất cả các loại lương thực, hoặc thực phẩm trước khi sử dụng khử trùng đều phải qua giai đoạn làm sạch để giảm bớt nồng độ vi khuẩn trên bề mặt bị nhiễm

+ Đối với thực phẩm đã nhiễm tác nhân sinh học, nếu phát hiện được bằng cảm quan thì không nên sử dụng và huỷ toàn bộ.

+ Rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả của các phương pháp khử trùng thực phẩm như: nhiệt độ hoá chất và chất liệu khử trùng, pH, nồng độ hoá chất, thời gian khử trùng...

+ Dạng vi sinh vật gây nhiễm độc thực phẩm, lượng protein trên các chất liệu khử trùng (vì protein hấp phụ và bất hoạt một số hoá chất khử trùng)

+ Lựa chọn biện pháp khử trùng phù hợp với từng loại lương thực, thực phẩm .

+ Lựa chọn hoá chất phù hợp với chất liệu khử trùng vì nồng độ hoá chất dư thừa có thể ảnh hưởng chất liệu được khử trùng, gây độc cho môi trường và động vật.

+ Giá thành hoá chất phù hợp, dễ sử dụng

4.6.2. QUI TRÌNH KHỬ TRÙNG BỀ MẶT BAO BÌ BẢO QUẢN THỰC PHẨM VÀ DỤNG CỤ NHÀ ĂN NHÀ BẾP (NGĂN NGỪA VI SINH VẬT ĐỘC TỪ BAO BÌ HẠI XÂM NHẬP VÀO LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM)

Các bước tiến hành: Làm sạch, rửa, khử trùng, phơi khô

- **Làm sạch :**

- Loại bỏ các chất vô cơ hoặc hữu cơ có trên bề mặt bao bì bảo quản lương thực và thực phẩm, vì trong quá trình vận chuyển gây ra vỡ đổ vỡ, các loại thực phẩm giàu chất dinh dưỡng dạng lỏng như protein, lipid, đất...sẽ tạo ra một lớp bao phủ bề mặt của các bao bì, đây là điều kiện thuận lợi cho các loại vi sinh độc hại phát triển

+ Đối với bề mặt bao bì có protein, giàu ăn, lipid, carbohydrate cần sử dụng các dung dịch có tính chất kiềm để loại bỏ như các dung dịch nước rửa thường có trên thị trường hoặc dùng dung dịch KOH có nồng độ 100 ppm -500 ppm

+ Với các bề mặt bao bì bao phủ bởi các chất vô cơ như: hợp chất calcium, magnesium hoặc muối ...làm sạch bề mặt bằng các loại axit như HCL nồng độ 100 ppm - 200 ppm

- Sử dụng nước ấm 42°C - 43°C, rửa sạch bề mặt bao bì , nếu bao bì bằng kim loại hoặc thủy tinh có thể sử dụng nước ở nhiệt độ cao (Chú ý nguồn nước rửa bề mặt bao bì cũng phải được tiệt trùng bằng phương pháp đun sôi, vì có thể nguồn nước cũng bị ô nhiễm vi sinh vật độc hại) nhằm loại bỏ hoá chất tồn lưu trên bề mặt bao bì bảo quản thực phẩm

Bảng 19: Lựa chọn giải pháp làm sạch bề mặt bao bì bảo quản lương thực, thực loại bỏ các chất hữu cơ và vô cơ trên bề mặt ảnh hưởng tới hiệu quả khử trùng của các chất hoá học:

Chất ô nhiễm bề mặt lương thực, thực phẩm	Tính chất tan trong nước	Loại bỏ	Thay đổi bởi nhiệt	Phương pháp làm sạch
Proteine	Không tan	Khó	Biến tính	clo trong môi trường kiềm
Chất béo và giàu ăn	Không hoà tan trong nước	khó	Tạo ra phản ứng trùng hợp rất khó làm sạch	Kiểm
Carbohydrates	Hoà tan trong nước	Dễ	Khó làm sạch vì tạo ra lớp caramen	Kiểm
Muối khoáng	Có thể không tan trong nước	Tuỳ theo tính chất của từng loại muối khoáng	Dễ thay đổi	axit

- sau khi làm sạch bề mặt nhằm loại giảm nồng độ vi sinh vật độc hại có trên bao bì và loại thành phần hữu cơ và vô cơ có trên bề mặt sẽ ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của các hoá chất khử trùng, tẩy uế

- **Khử trùng** :Lựa chọn hoá chất phù hợp về nồng độ và tác nhân nghi ngờ gây ô nhiễm bao bì bảo quản thực phẩm

Bảng 20. Nồng độ hoá chất cần thiết khử trùng vi sinh vật độc hại trong các dạng bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm .

<i>Tác nhân vi sinh</i>	<i>Tên hoá chất</i>	<i>Điều kiện khử trùng, nồng độ vi khuẩn</i>	<i>Nồng độ hoá chất, thời gian</i>	<i>Hiệu quả diệt hoặc ức chế phát triển</i>
B. anthracis (Spore)	Hypochlorite	PH: 7,2; 22°C; 1,5 x 10 ⁸ CFU/cm ²	* 100 — 500 ppm / 60 phút	99,99%
	Chlorine hoạt tính	PH: 7,2; 22°C; 1,5 x 10 ⁸ CFU/cm ²	*12.500 ppm/ 15 phút -hoặc 5.000 ppm/ 10 phút	100%
B.anthraxis (vegetative)	Hypoclorite	PH: 7,2; 22°C; 1,5 x 10 ⁸ CFU/cm ²	* 100 ppm —500 ppm / 30 phút	95,6% - 100%
Vi khuẩn đường ruột (<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> ,	Hypoclorite	PH: 7,2; 22°C; 1,5 x 10 ⁸ CFU/cm ²	*100 ppm *500 ppm * 1000 ppm (thời gian 10 phút)	- 64,3% - 99,6%** - 84,3% —100%** - 92,6% - 100% ** (** tùy theo chất liệu bao bì)

<i>shigella</i> , <i>Yersinia</i>)	Iodine	10 ppm 50 ppm (thời gian 10 phút	- 92,7%—96,7%** - 98% - 100%** (** tùy theo chất liệu bao bì)
	QACs	500 ppm 1000ppm 10.000 ppm (thời gian 10 phút)	- 72,6% - 100%** - 96,2% - 100%** - 99,2% - 100%** (** tùy theo chất liệu bao bì)
	Chlorine hoạt tính	*100 ppm *150 ppm *3,215 ppm (thời gian 15 phút)	- 92,1% - 99,2 %** -94,1% - 99,6%** - 99,4%- 100%** (** tùy theo chất liệu bao bì)

- Kiểm tra tính toàn vẹn của bao bì, loại bỏ lương thực, thực phẩm khi bao bì rách và ngấm hoá chất khử trùng.
- **Rửa:** sử dụng nguồn nước sạch không nhiễm tác nhân sinh học, rửa toàn bộ bề mặt bao bì bảo quản (có thể sử dụng nước ấm nhưng chú ý chất liệu bao bì , bảo quản thực phẩm). Tiến hành rửa nhiều lần nhằm loại bỏ các hoá chất tồn dư còn tồn lưu trên bề mặt bao bì
- **Làm khô bề mặt bao bì:** bằng quạt gió công nghiệp, nếu có điều kiện có thể tiến hành sấy khô (nếu bao bì bảo quản thực phẩm dạng khô) , với thực phẩm trong bao bì đựng chất hữu cơ thì nhanh chóng chuyển vào bảo quản ở nhiệt độ lạnh dưới 4°C. hoặc bảo quản bằng phương pháp nhiệt như đun hoặc phương pháp pasteurization

4.6.3. Qui trình khử trùng lương thực, thực phẩm có nguồn gốc động vật (thịt), thực vật (rau, củ, quả...) và động vật biển (cá, sò...)

- **Làm sạch:** đối với các loại lương thực thực phẩm trực tiếp tiếp xúc với nguy cơ xâm nhập của các tác nhân sinh học và đất, cần phải làm sạch bằng rửa trong nước nhiều lần.
- **Khử trùng :** bằng phương pháp đun sôi (100°C)
 - Đối với loại vi khuẩn có khả năng sinh bào tử như *B. anthracis*, cần đun 100°C, trong thời gian 30 phút tính từ thời điểm sôi, nhưng tốt nhất sau khi đun 30 phút để nguội nhanh, sau đó đun tiếp 30 mới có thể sử dụng ăn
 - Đối với vi khuẩn gram (+) đại diện là vi khuẩn *B. anthracis* thể sinh dưỡng, khử trùng bằng phương pháp đun 15- 20 phút hoặc bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ 62°C- 64°C
 - Đối với vi khuẩn gram (-) như họ vi khuẩn đường ruột (*Salmonella*, *shigella*, *vibrio*, *yersinia*) đun sôi trong thời gian 5- 6 phút, hoặc khử trùng theo phương pháp pasteurization ở 62°C- 64°C trong thời gian 10 phút

Phần 5

**XÂY DỰNG MÔ HÌNH VÀ QUI TRÌNH BẮT HOẠT VI SINH VẬT ĐỘC
HẠI TRONG ĐẤT**

.....***.....

5.1. Xây dựng mô hình thử nghiệm khử trùng bào tử trực khuẩn than trong đất

5.1.1 Các bước tiến hành gây nhiễm bào tử than môi trường đất :

Phương pháp đánh giá độ ẩm của đất:

Hàm lượng nước trong mẫu đất liên quan tới độ thấm thấu của vi khuẩn

Tiến hành: Cân 10 gam đất mỗi loại, sấy khô ở nhiệt độ 170°C trong thời gian 30 phút, sau đó lấy ra cân lại(tiếp tục làm như vậy lần 2) để xác định nồng độ nước có trong đất
Công thức tính lượng nước trong đất:

Trọng lượng đất (g) - trọng lượng đất (g) sau sấy khô

100% x

Trọng lượng đất ban đầu (g)

5.1.2. Phương pháp gây nhiễm bào tử than trên môi trường đất:

- Bào tử than được pha với nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm PBS (pH: 7,2) để đạt nồng độ 10^8 CFU/ ml.
- Thử nghiệm được tiến hành trên các hộp chứa các loại đất khác nhau: đất cát, đất mùn, và đất hỗn hợp, đất sét. Hộp chứa đất có kích thước: 20 cm chiều dài, 10 cm chiều ngang và 30 cm chiều sâu = 6000 cm³

- Trước khi gây nhiễm bào tử than trên môi trường đất, cần đưa toàn bộ hộp đựng đất vào autoclave, hấp ướt ở 121°C / 30 phút để loại bỏ toàn bộ vi khuẩn, ký sinh trùng có trong đất sau đó mới tiến hành gây nhiễm bào tử than.

- Lấy 10 ml bào tử có nồng độ 10^8 CFU/ ml, phun đều trên bề mặt đất có tổng diện tích là 200 cm²

- Đặt hộp đất ở phòng thí nghiệm (nhiệt độ 20°C —25°C/ 24- 48 giờ

- Lấy 1 g đất ở các vị trí 5 cm, 10 cm, 15 cm, 20 cm (đánh giá độ thấm thấu của vi khuẩn) , trộn đều với 10 ml nước muối sinh lý, lấy 50μl dàn đều trên mặt thạch và ủ 37°C/ 24- 48 giờ đọc số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch (ở mỗi vị trí lấy mẫu cấy vào 3 đĩa thạch và tính số khuẩn lạc trung bình)

Công thức tính tính số khuẩn lạc trong g đất:

$$CFU/ g \text{ đất} = CFU / 50\mu l \times 200 \text{ (hệ số pha loãng)}$$

5.1.3.Các phương pháp diệt bào tử than trong môi trường đất :

* Phương pháp nhiệt

Phương pháp này chỉ có thể áp dụng trong phạm vi môi trường đất nhiễm bào tử than với diện tích hẹp như:

- + khu vực đất nghi ô nhiễm do xác động vật chết vì mắc bệnh
- + do vận chuyển mẫu bệnh phẩm nhiễm trực khuẩn than bị vỡ
- + Môi trường đất bão hoà với nước, khó sử dụng phương pháp khử trùng bằng hoá chất
- + Đất ô nhiễm bào tử than quá rắn, hoá chất không đủ khả năng thấm thấu

* Các bước tiến hành:

- Bóc toàn bộ phần đất có chiều sâu bị nhiễm bào tử than (dựa trên cơ sở đánh giá mức độ thấm thấu của bào tử than trên các hộp gỗ thử nghiệm) hoặc có thể đưa toàn bộ hộp gỗ có kích cỡ 20 cm x 30 cm x 10 cm để tiến hành khử trùng bằng phương pháp nhiệt (autoclave) ở nhiệt độ 121°C ở các khoảng thời gian 10, 20, 30 phút tính từ thời điểm đủ nhiệt độ
- Lấy 1 g đất sau khi đã xử lý ở các vị trí 5, 10, 15 ,20,25,30 cm chiều sâu của hộp cho vào canh thang BHI (Brain heart infusion), ủ ở 37°C/ 24 —72 giờ, đọc kết quả.

- Nhận định kết quả:
 - + Nếu canh thang BHI đục, chứng tỏ khử trùng chưa đạt yêu cầu
 - + Nếu canh thang trong chứng minh vi khuẩn không phát triển

* Diệt bào tử than trong môi trường đất bằng hoá chất:

- Sau khi gây nhiễm bào tử than trên môi trường đất như trên
- Pha dung dịch formaldehyde (36%) với nước cất để có nồng độ 2%; 4%, 8%, 10 %....
- Phun formaldehyde với các nồng độ này trên bề mặt và sử dụng ống thông kim loại đưa formaldehyde xuống sâu hộp đựng đất có chiều cao 30 cm
- số lượng khử trùng bề mặt là: 100 ml hoá chất ở các nồng độ formaldehyde khác nhau (2%; 4%; 6%,8%)/ 200 cm² tương đương với 50 lít/ m² với các nồng độ formaldehyde pha loãng khác nhau.
- chiều sâu cứ 10 cm cho 5 ml formalin ở nồng độ khác nhau.

*Đánh giá hiệu quả diệt bào tử:

- + Sau thời gian 4 giờ, 8 giờ, 10 giờ, sau 12 giờ khử trùng bằng formaldehyde .
- + Lấy 1 g đất (ở các vị trí có chiều sâu 5, 10, 15, 20 cm) trộn đều với 5 ml nước cất khử trùng, lấy 0,1 ml hỗn dịch cấy vào thạch dưỡng.
- + ủ đĩa thạch ở 37°C/ 24- 48 giờ đọc số khuẩn lạc mọc trên đĩa
- + Tính tỷ lệ % bào tử bị ức chế:

$$CFU/ g \text{ không khử trùng} \square CFU/ g \text{ đất đã khử trùng}$$

Công thức tính: $100 \% \times$

$$CFU/ g \text{ không khử trùng}$$

5.2. Kết quả thử nghiệm bất hoạt bào tử than ô nhiễm đất

5.2.1.Kết quả đánh giá độ thấm thấu của môi trường đất nhiễm bào tử than:

Mỗi loại đất có những đặc tính khác nhau, độ thấm thấu khác nhau, cũng như nồng độ các chất hữu cơ khác nhau... việc khử trùng phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, độ nén của đất nhiệt độ thử nghiệm, nồng độ hoá chất...

Bảng 21: Đánh giá độ ẩm của đất

STT	Loại đất	Trọng lượng trước khi sấy khô	Trọng lượng sau khi sấy	Tỷ lệ (%) nước
1	Đất mùn	10,0023	7,5017	25%
2	Đất hỗn hợp	9,9994	7,7996	22%
3	đất cát	10,003	9,5789	4,23%
4	Đất sét	10,00073	9,2998	7,0%

Kết quả bảng trên cho thấy:

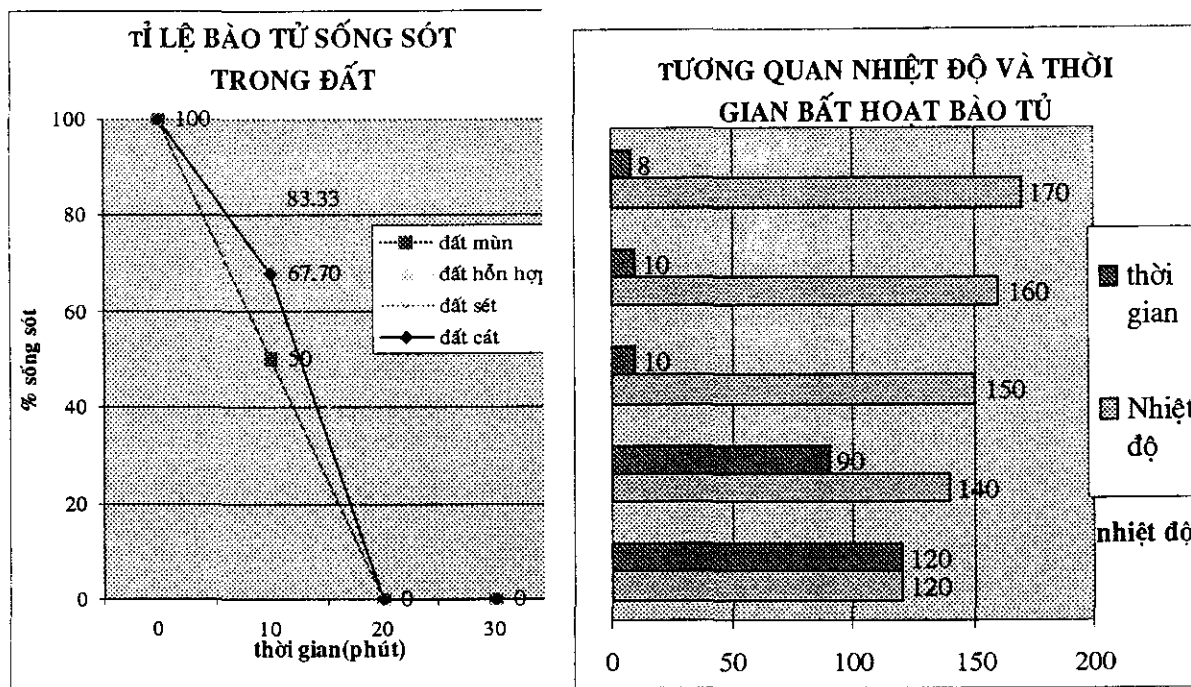
- Dạng đất mùn và đất hỗn hợp có tỷ lệ nước cao từ 22%- 25% cao hơn lượng nước có trong đất cát và đất sét có hàm lượng nước là 4,23% - 7%. Tỷ lệ % nước trong các loại đất không có nghĩa là tỷ lệ thuận với độ thấm thấu của bào tử than, mà phụ thuộc chủ yếu vào tính chất và kết cấu của loại đất.

Bảng 22: Đánh giá hiệu quả diệt bào tử trực khuẩn than bằng phương pháp hấp ướt ở 121°C

TT	Loại đất	Số mẫu vi khuẩn mọc / tổng số mẫu		
		10 phút	20 phút	30 phút
1	Đất cát	2/6	0/6	0/6
2	đất mùn	3/6	0/6	0/6
3	đất hỗn hợp	1/6	0/6	0/6
4	Đất thịt	2/6	0/6	0/6

* Chứng dương : mẫu đất không qua xử lý hấp ướt, sau khi bào tử gây nhiễm sau 24 giờ, lấy 1 g đất cấy thẳng vào canh thang BHI.

Bảng trên cho thấy : Điều kiện cần thiết để khử trùng đất nhiễm bào tử trực khuẩn than bằng hấp ướt (autoclave) tối thiểu từ 20 đến 30 phút, đặc biệt hàm lượng nước trong đất càng cao thì khả năng dẫn nhiệt càng tốt, thời gian diệt khuẩn càng ngắn.



Hình 9: Khử trùng bào tử than trên 4 loại đất khác nhau bằng phương pháp hấp ướt (2A) và tương quan giữa nhiệt độ và thời gian bất hoạt bào tử trong đất (2B)

Hình 9 A: Nồng độ bào tử trước khử trùng $1,5 \times 10^8$ CFU/ cm^2 bề mặt, sau thời gian 10 phút ở nhiệt độ $121^\circ C$, số lượng bào tử sống sót ở các loại đất có sự khác biệt, nhưng ở thời điểm 20 phút thì 100% bào tử bị bất hoạt

Hình 9B: Nồng độ bào tử 6×10^3 đến $1,2 \times 10^4$ CFU/ g đất, hiệu quả khử trùng bằng phương pháp sấy khô ở nhiệt độ $120^\circ C$ - $140^\circ C$ cần thời gian trên 90 phút, nếu ở nhiệt độ $150^\circ C$ - $170^\circ C$ cần thời gian 8- 10 phút.

Bảng 23: Số lượng bào tử than sống sót sau khử trùng bằng formaldehyde nồng độ 2% ở thời điểm 4 và 8 giờ.

Điều kiện thử nghiệm: Nhiệt độ : $25-27^\circ C$; Độ ẩm không khí: 85-86%

Số bào tử sống sót/ g đất sau khử trùng formaldehyde (2%)								
Loại đất	Đất cát		Đất mùn		Đất hỗn hợp		Đất sét	
	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ
Bề mặt	0	0	0	200	0	100	100	0

5cm	0	0	1200	4500	0	100	100	0
10 cm	0	200	400	2000	2000	900	0	200
15 cm	1500	200	500	1000	5000	2500	0	200
20 cm	250	5000	300	700	5000	4000	100	100

Kết quả bảng trên cho thấy:

- Toàn bộ các loại đất được khử trùng bằng formaldehyde nồng độ 2% ở thời sau khử trùng 4 giờ 100% bào tử bị bất hoạt, nhưng ở thời điểm 8 giờ phát hiện được từ 100- 200 CFU/ g đất.

-Tỷ uế môi trường đất bằng formaldehyde ở nồng độ 2% thì ở thời điểm sau khử trùng 8 giờ số lượng vi khuẩn phát triển cao hơn số lượng vi khuẩn than lúc 4 giờ, điều này chứng minh rằng với nồng độ formaldehyde 2% sử dụng để khử trùng không đủ để bất hoạt bào tử than trong đất, nồng độ tồn lưu của hoá chất không đủ ức chế bào tử, vì việc kiểm định hiệu quả bất hoạt bào tử được tiến hành cấy trên thạch dinh dưỡng và lúc này để hình thành khuẩn lạc, trực khuẩn than thể bào tử hình thành thể sinh dưỡng.

Bảng 24: Số lượng bào tử than sống sót sau khử trùng formaldehyde nồng độ 4 % ở thời điểm 4 , 8, 12 giờ.

Điều kiện thử nghiệm: Nhiệt độ : 25-27°C. Độ ẩm không khí: 85-86%

Số bào tử sống sót trong đất sau khử trùng formaldehyde (4%)												
Loại đất	Đất cát			Đất mùn			Đất hỗn hợp			Đất sét		
Thời gian kT	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ
Bề mặt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5cm	0	0	0		1*	0	0	1*	0	0	0	0
10 cm	0	2*	0	270	0	0	160	3**	1*	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	2*	0	0	0	0
20 cm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Ghi chú: * = khuẩn lạc chỉ có trong 1 đĩa thạch/ 3 đĩa thử nghiệm ** số khuẩn lạc có trong 2/ 3 đĩa thạch.*

Kết quả bảng trên cho thấy:

- Tẩy uế bào tử than bằng formaldehyde nồng độ 4% trên các loại đất sau thời gian 4 và 8 giờ số bào tử sống sót giao từ 1- 16 CFU/ g đất thường thấy ở độ sâu 10 cm và trên bề mặt 100% bào tử bị bất hoạt.
- Thời gian khử trùng sau 12 giờ ở nồng độ formaldehyde 4%, toàn bộ bào tử bị bất hoạt, điều này chứng minh rằng nồng độ formaldehyde 4% là nồng độ thấp đủ đảm bảo khả năng tồn dư để tiếp tục bất hoạt bào tử
- Lựa chọn được nồng độ và thời gian khử trùng là việc làm hết sức cần thiết vì formaldehyde là một chất có độc tính tương đối cao, nếu sử dụng ở nồng độ cao ảnh hưởng tới thực vật và động vật ở khu vực khử trùng

5.3 KẾT QUẢ MÔ HÌNH KHỬ TRÙNG ĐẤT

* Khử trùng môi trường đất nhiễm vi sinh vật độc hại, nguy hiểm (*Bacillus anthracis* spore)

- **Phương pháp nhiệt (hấp uớt bằng autoclave):** Để đạt hiệu quả cao khử trùng, tẩy uế bào tử than bằng phương pháp nhiệt khô, phương pháp hấp nhiệt cần thiết bảo đảm duy trì ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút (tính từ thời điểm đủ nhiệt độ)
- **Khử trùng đất bằng formaldehyde:**
 - Hiệu quả diệt khuẩn bằng dung dịch formaldehyde phụ thuộc vào loại đất khử trùng, độ ẩm của đất, điều kiện nhiệt độ thử nghiệm.
 - Nồng độ formadehyde 4%- 6% (11,11 ml — 16,66 ml pha với nước đủ 100 ml của dung dịch formaldehyde 36%) có tác dụng diệt bào tử than trong đất ở điều kiện nhiệt độ 25°C - 30°C và độ ẩm không khí 85 % , độ ẩm của đất là: 4%- 25%.

5.4. QUI TRÌNH KHỬ TRÙNG, TẨY UẾ MÔI TRƯỜNG ĐẤT NHIỄM BÀO TỬ THAN

5.4.1 Hướng dẫn chung:

- **Lựa chọn hoá chất khử trùng đất**

Thông thường các hoá chất sử dụng diệt bào tử than trong môi trường rất khó vì mỗi loại có những đặc tính riêng, và điều kiện hoạt động liên quan tới pH của đất, nồng độ các

chất hữu cơ, ánh sáng, cũng như khả năng ảnh hưởng của hoá chất tồn dư ảnh hưởng tới môi trường sống của người và các loại gia súc, gia cầm.

**Các loại hoá chất thông dụng:*

- Chlorine và các hợp chất của nó: có đặc tính diệt bào tử than nhưng hoạt tính giảm hoặc mất khi tiếp xúc với môi trường giàu chất hữu cơ, bị ảnh hưởng của ánh sáng mặt trời, do đó chủ yếu sử dụng khử trùng nước, khử trùng bề mặt, trong các phòng thí nghiệm...

- Formaldehyde và glutaraldehyde : có tính khử trùng mạnh vi sinh vật trong các điều kiện môi trường, nhưng hoạt tính bị giảm khi sử dụng ở nhiệt độ thấp hơn 4°C, các hoá chất này độc cho môi trường bao gồm thực vật và động vật do đó sau thời gian khử trùng việc cần thiết là trung hoà lượng hoá chất tồn dư bằng dung dịch amoniac. Giải pháp khử trùng bào tử than trong môi trường đất bằng formaldehyde vẫn là giải pháp có hiệu quả nhất hiện nay

5.4.2. Lựa chọn phương pháp khử trùng, tẩy uế nguồn truyền nhiễm gây ô nhiễm đất.

** Chôn xác động vật và bệnh nhân tử vong do mắc bệnh than*

Có rất nhiều thông báo về việc phân lập được trực khuẩn than tại khu vực chôn xác động vật bị mắc bệnh chết sau nhiều năm. Những hoạt động đào bới (đặt đường nước, mắc điện... hoặc chôn cất tại khu vực như vậy sẽ tạo điều kiện để bào tử thoát ra và hoạt động , hoặc các súc vật ăn xác thối, tổ kiến, mối cũng có thể thâm nhập mộ phần và tạo điều kiện đưa bào tử lên mặt đất. Chôn cất xác động vật và người chết vì bệnh là nguồn tàng trữ nguy hiểm. Việc khử trùng, tẩy uế cần được lựa chọn tránh sự phát tán của mầm bệnh ra môi trường xung quanh. Việc chôn người và xác động vật nhiễm bệnh là giải pháp không an toàn, nguy cơ cao của việc phát tán các mầm bệnh ra môi trường xung quanh.

**Đốt*

Đây là phương pháp thường được sử dụng, để thiêu huỷ xác động vật và người chết do mắc bệnh than, ít áp dụng trong khử trùng môi trường đất nhiễm bào tử than vì có một số nghiên cứu cho biết trong quá trình hoả thiêu hơi khí nóng đối lưu vẫn có thể làm thoát bào tử nhưng rất hiếm. Blenkharn và Oakland (1989) phân lập được vi khuẩn Gram dương mà chủ yếu là loài *Bacillus* trong thành ống khói sơ cấp và thứ cấp của một lò thiêu rác bệnh viện được thiết kế hoạt động với nhiệt độ 800°C-1000°C, điều này cho thấy kể cả

hoả thiêu cũng không thể hoàn toàn yên tâm. Tuy nhiên số vi khuẩn rất thấp (5-6 CFU/m³ không khí).

Điều đáng chú ý là trực khuẩn than trong xác người, động vật là dạng sinh dưỡng rất nhạy cảm với nhiệt và chất diệt khuẩn.

** Phương pháp hoả thiêu xác động vật và người chết nhiễm bệnh than hiện nay*

Rất nhiều nghiên cứu cho biết hoả thiêu là một trong những biện pháp an toàn nhất để xử lý xác người, động vật bị chết do bệnh than. Tại một số nước có lò thiêu di động với 2 hệ thống ga đốt từ dưới và từ trên xuống cách vật thiêu 0,25m. Tương tự như vậy là lò thiêu với hệ thống ga thổi từ trên xuống đảm bảo thiêu toàn bộ và an toàn.

Khử trùng phân bón, phân súc vật, thức ăn thừa, chuồng gia súc...:

Nếu có thể tất cả vật dụng bị nhiễm trực khuẩn than phải được khử khuẩn bằng biện pháp thiêu hoặc hấp (121°C/30phút). Khử khuẩn bằng cách nhúng vào dung dịch Formaldehyde 4% (10% Formalin) trong thời gian trên 12 giờ cũng là phương pháp thường được dùng nếu chắc chắn rằng hoá chất có thể thẩm thấu sâu vào chất khử khuẩn. *Chú ý : tránh để da tiếp xúc với Formaldehyde hoặc hít hơi chất này.*

** Khử trùng bề mặt nhà ở, chuồng động vật, vật dụng, thiết bị ...:*

Khử trùng gồm 3 giai đoạn : khử trùng sơ bộ, rửa sạch và khử trùng lần cuối. Bất hoạt bào tử một cách có hiệu quả không phải lúc nào cũng thuận lợi do nhiều yếu tố vì vậy việc xử lý nhanh các trường hợp nhiễm để tránh việc giải phóng và hình thành bào tử từ động vật đang và đã chết.

Giai đoạn 1 : Khử trùng sơ bộ :

Có thể sử dụng một trong hóa chất sau từ 1-1,5 lít /m²/2giờ :

- 10% Formadehyde (khoảng 30% Formalin)
- 4% Glutaraldehyde (pH8,0-8,5)

Có thể sử dụng máy phun nhưng áp suất < 10 bar để tránh làm lan sự ô nhiễm.

Giai đoạn 2 : Rửa :

Nếu thực tế cho phép việc rửa bề mặt có thực hiện trực tiếp hoặc bằng máy rửa nước nóng. Người rửa phải mặc quần áo bảo vệ, mặt nạ và găng tay. Rửa tới khi màu cũ của bề mặt và trở lại và nước rửa không còn bụi bẩn. Kết thúc quá trình rửa và hút sạch nước còn lại và để bề mặt khô tự nhiên. tránh dùng máy phun rửa áp suất cao vì nguy cơ lan ô nhiễm

do khí dung, nếu dùng phải để máy phun nước với áp suất 80-100 bar và công suất 12-15 lít/ phút.

Giai đoạn 3 : Khử trùng lần cuối

Khử trùng lần cuối dùng 1 trong các hoá chất sau với thể tích 0,4 lít/m²/2giờ :

- 10% Formadehyde (khoảng 30% Formalin)
- 4% Glutaraldehyde (pH8,0-8,5)

Hydrogen peroxide và peracetic acid không thích hợp nếu có máu trên bề mặt vật liệu cần tẩy trùng. Nếu dùng glutaraldehyde, hydrogen peroxide hoặc peracetic acid phải xử lý bề mặt 2 lần, mỗi lần cách nhau ít nhất 1 giờ. Formaldehyde và glutaraldehyde không nên dùng khi nhiệt độ < 10°C.

5.4.3 .Quy trình khử trùng đất nhiễm bào tử trực khuẩn than

***Khử trùng bằng phương pháp nhiệt:**

phương pháp này chỉ thực hiện trong điều kiện khu vực ô nhiễm mầm bệnh ở giới hạn hẹp bị ô nhiễm bởi chất bài tiết của người hoặc động vật nhiễm bệnh như : phân, máu ... hoặc môi trường đất bão hoà nước không có khả năng sử dụng hoá chất diệt khuẩn.

Bước 1: Bóc toàn bộ lớp đất bề mặt nghi bị ô nhiễm (m²), có chiều sâu khoảng 20 cm, đưa vào các thùng hoặc hộp (chú ý: khi tiến hành bóc lớp đất bề mặt cần có bảo hộ cá nhân tốt như: mũ, găng tay, dụng cụ, hoá chất khử trùng cá nhân như hypochlorine, nitrate) tránh lây nhiễm cho mầm bệnh sang khu vực khác trong quá trình vận chuyển đất.

Nếu có xác động vật chết tiến hành hoá thiêu tại chỗ , sau đó bóc toàn bộ lớp đất

Bước 2: Tiến hành khử trùng bằng phương pháp hấp ướt ở nhiệt độ tối thiểu 121°C/ 20 phút, nếu đất bão hoà trong nước nên ưu tiên khử trùng bằng phương pháp sấy khô ở nhiệt độ 170°C/ 30 phút, tính từ thời điểm đủ nhiệt độ.

Bước 3: Sau khi khử trùng xong, nếu có điều kiện khử trùng một lần nữa bằng formaldehyde nồng độ 4-5% hoặc glutaraldehyde nồng độ 2% trong nước.

*** Khử trùng bằng hoá chất (formaldehyde hoặc glutaraldehyde)**

Bước 1:

- Xác định khu vực cần khử trùng, diện tích khử trùng (m²). Cách tính diện tích khử trùng:
$$S(m^2) = [Chiều dài (m) \times chiều rộng(m)] \times 2$$

- Xác định loại đất cần khử trùng (tính chất đất, độ ẩm của đất, điều kiện nhiệt độ của môi trường khử trùng) liên quan tới khả năng thẩm thấu của hoá chất.

Bước 2: Pha hoá chất :

Bảng tính lượng formaldehyde theo các nồng độ khác nhau

<i>TT</i>	<i>Formaldehyde (36%) ml</i>	<i>Lượng nước (ml)</i>	<i>Nồng độ formaldehyde cuối cùng</i>
1	1 thể tích	35 thể tích	$\approx 1\%$
2	1 thể tích	16,8 thể tích	$\approx 2\%$
3	1 thể tích	11 thể tích	$\approx 3\%$
4	1 thể tích	8 thể tích	$\approx 4\%$
5	1 thể tích	6 thể tích	$\approx 5\%$
6	1 thể tích	5 thể tích	$\approx 6\%$
7	1 thể tích	3,5 thể tích	$\approx 8\%$
8	1 thể tích	2,6 thể tích	$\approx 10\%$

- Tính số lượng hoá chất (lít) dung dịch formaldehyde (36%) cần thiết để được nồng độ 4%- 5%, tính theo diện tích bề mặt khử trùng: số lượng khử trùng 50 lít formaldehyde/ m² diện tích bề mặt và 30 ml cho 10 cm chiều sâu.

Bước 3:

-Phun khử trùng bề mặt chứa dung dịch formaldehyde 4%-5% bằng máy phun áp lực không quá 12- 15 lít/ phút (tránh dùng phun ở áp lực quá mạnh gây phát tán mầm bệnh).

- Khử trùng chiều sâu: Đục các lỗ có chiều sâu khác nhau: 10 cm, 20 cm, 30, 40 cm, 50 cm, cứ khoảng 0,5 m chiều dài khu vực đất khử trùng cho một loạt các lỗ như trên và mỗi lỗ cho 30 ml dung dịch formaldehyde(4%-5%) /10 cm, tổng cộng 150 ml. Nếu mô chôn xúc vật nhiễm trực khuẩn than thì tiến hành đục lỗ ở giữa và đưa lượng formaldehyde 5% xuống.

- Thời gian khử trùng diệt bào tử than cần thiết là :

Bước 4: Sau khi khử trùng xong cấm người không nhiệm vụ vào khu vực và nếu điều kiện có thể trung hoà formaldehyde trên bề mặt bằng dung dịch amoniac 25 %. Với tỷ lệ 1 thể

tích amoniac với 2 thể tích formaldehyde khử trùng. Nếu không có điều kiện trung hoà thì sau 7- 10 ngày mới cho động vật vào khu vực khử trùng.

Chương 6 **KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

1. Xây dựng mô hình thử nghiệm khử trùng tẩy uế vi sinh vật độc hại trong môi trường sống bao gồm: Đất, nước, không khí, thực phẩm phù hợp với điều kiện tác chiến hiện nay.
2. Xây dựng qui trình kỹ thuật khử trùng, tẩy uế môi trường , phù hợp với điều kiện trang thiết bị và khả năng, trình độ của cán bộ nhân viên Quân y, Hậu cần ở các tuyến đơn vị trong Quân đội.
3. Khi tác chiến trong điều kiện chiến tranh sinh học việc khử trùng cần tiến hành đồng bộ và lựa chọn các biện pháp cho phù hợp với điều kiện thực tiễn. Lưu ý khi khử trùng tẩy uế môi trường có rất nhiều yếu tố như : khí hậu thời tiết, tốc độ gió, nhiệt độ... ảnh hưởng tới hiệu quả của việc khử trùng, do đó khi áp dụng cho thực tế nhất là khử trùng bằng phương pháp hoá cần cân nhắc nồng độ gấp từ 2-3 lần số liệu trong thử nghiệm invitro.
4. Cần có sự phối hợp các chuyên ngành kỹ thuật trong việc phát hiện tác nhân nghi ngờ khủng bố sinh học và xây dựng sản xuất các trang thiết bị khử trùng gọn , nhẹ công suất lớn , áp dụng ở mọi địa hình để nhằm xây dựng tổ, đội cơ động đáp ứng nhanh phòng chống chiến tranh sinh học.
5. Kết quả thử nghiệm khử trùng, tẩy uế vi sinh vật độc hại trong môi trường đất, nước, không khí và thực phẩm

KẾT QUẢ XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG Ô NHIỄM TÁC NHÂN VI SINH VẬT ĐỘC HẠI

Bảng 1. Kết quả diệt bào tử than bằng lò vi sóng với công suất khác nhau

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Công suất	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ml)	Thời gian khử trùng	Hiệu quả khử trùng
Trực khuẩn than thể bào tử (<i>B. anthracis</i> spores)	bao bì chưa bào tử than (4 lớp)	260 W	10^9	25-30 phút	bao bì cháy (Không diệt được bào tử)
	bao bì chưa bào tử than (4 lớp)	450W	10^9	9-10 phút	bao bì cháy (Không diệt được bào tử)
	bao bì chưa bào tử than (4 lớp)	900W	10^9	6-10 phút	bao bì cháy (Không diệt được bào tử)

Bảng 2. Kết quả bất hoạt vi sinh vật trong môi trường bằng phương pháp nhiệt

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Nhiệt độ	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ml)	Thời gian khử trùng	Hiệu quả khử trùng
Phẩy khuẩn tả (<i>V. cholerae</i>)	nước	100°C	10^9	1 phút	100%
	nước	60°C	10^7	6 phút	

Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Thực phẩm (dạng rau, thịt)	100 ⁰ C	1,5x 10 ⁸	4 phút	99%-100%
	Thực phẩm dạng sữa	64 ⁰ C	1,5x 10 ⁸	5 phút	
	nước	100 ⁰ C	10 ⁹	4 phút	100%
		60 ⁰ C	10 ⁷	8 phút	
	Thực phẩm (dạng rau, thịt)	100 ⁰ C	1,5x 10 ⁸	6-8 phút	99%-100%
	Thực phẩm dạng sữa	64 ⁰ C	1,5x 10 ⁸	8 phút	
Bào tử than (B. anthracis spores)	nước	100 ⁰ C	10 ⁹	7 phút	100%
	Thực phẩm (dạng rau, thịt)	100 ⁰ C	1,5 x 10 ⁸	20-30 phút	88,88%- 100%
	Đất	121 ⁰ C	10 ⁸	20 phút	100%
Than thể dinh dưỡng (B. anthracis		100 ⁰ C	10 ⁹	11 phút	100%
	Thực phẩm (dạng rau, thịt)	100 ⁰ C	1,5 x 10 ⁸	15-20 phút	88,88%- 100%
	Thực phẩm dạng sữa	64 ⁰ C	1,5x 10 ⁸	20 25 phút	99,99% - 100%

Bảng 3 . Kết quả khử trùng vi sinh vật độc hại trong môi trường bằng phương pháp hoá học

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Hoá chất khử trùng	Nồng độ hoá chất	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ ml), điều kiện thử nghiệm.	Thời gian khử trùng	Hiệu quả khử trùng
Phẩy khuẩn tả (V. cholerae)	Nước	clo hoạt tính	0,5 mg/ lít	1x 10 ⁵	30 phút	100%

Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Nước	clo hoạt tính	1mg/ lít 1,25 mg/ lít	1×10^5	6 giờ 30 phút	100%
	bao bì bảo quản thực phẩm	clo hoạt tính	1,25% 0,65% 0,3125%	$1,5 \times 10^8$, nhiệt độ 24°C,	5 phút 10 phút 15 phút	99,34% - 100% 99,86 — 100% 99,42%-100%
Bào tử than (B. anthracis spores)	Nước	clo hoạt tính	125 mg/ lít	1×10^5 , nhiệt độ 27°C, độ ẩm không khí 82%	18 giờ	100%
	Không khí	formaldehyde	0,72 g — 1,44 g 2,16 g	10^9 , nhiệt độ 30°C - 35°C, độ ẩm không khí ẩm 81%-86%	120 phút 1 giờ	100% 100%
	Bao bì bảo quản thực phẩm với 3 loại chất liệu khác nhau	Hypocloride	0,05 %	$1,5 \times 10^8$, độ ẩm không khí 85%, nhiệt độ 22-25°C	30 phút 60 phút	99,99% 100%
		clo hoạt tính	10% 2,5% 1,25%	$1,5 \times 10^8$, độ ẩm không khí 85%, nhiệt độ 22°C	5 phút 10 phút 15 phút	92,47% - 100% 99,83%- 100% 100%
	Đất	formaldehyde	2%	108, độ ẩm không khí 85- 86%, nhiệt độ 25-27°C	8 giờ	99,99%
			4%		8 giờ -12 giờ	99,99%-100%

Than thể dinh dưỡng	Nước	clo hoạt tính	50 mg/ lít	1×10^5	18 giờ	100%
	Bao bì bảo quản thực phẩm với 3 loại chất liệu khác nhau	Hypocloride	0,01% 0,05%	$1,5 \times 10^8$ độ ẩm 85%, nhiệt độ 22- 25°C	60 phút 30 phút	98,67% 100%

Các kết quả nghiên cứu trên đây nằm trong giới hạn hẹp (nghiên cứu invitro), trên thực tế ở ngoài môi trường diện tích rộng có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả của các phương pháp khử trùng, nhất là khử trùng bằng hoá chất như : Nồng độ vi khuẩn, nhiệt độ, pH, độ ẩm, tốc độ gió, nồng độ hoá chất ảnh hưởng trực tiếp, do đó khi sử dụng trong phòng chống tác nhân sinh học có nguy cơ sử dụng trong chiến tranh nồng độ các hoá chất tăng gấp 2 - 3 lần số liệu trong mô hình thử nghiệm và cần phải xử lý đồng bộ toàn bộ môi trường sống của con người như: đất, nước, không khí , thực phẩm và các dạng bao bì bảo quản thực phẩm.

Chương 7
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. April, J. P., J. E. Rushing, and P. M. Foegeding. 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. Food Prot.* **61**:41-46.
2. Bates S: Fairfax man accused of anthrax threat. *Washington Post* March 3, 1992; C:
3. Brown, K. L. 2000. Control of bacterial spores. *Br. Med. Bull.* **56**:158-171.
4. Butz, P., and H. Ludwig. 1989. Pressure inactivation of microorganisms at moderate temperatures. *Physica* **139**:875-877.
5. Butz, P., J. Ricem, U. Trangott, H. Weber, and H. Ludwig. 1990. Hochdruckinaktivierung von bakterien und bakteriensporen. *Pharm. Ind.* **52**:487-491.
6. CDC: Bioterrorism alleging use of anthrax and interim guidelines for management--United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999 Feb 5; **48**(4): 69-74
7. Cerny, G., W. Hennlich, and K. Poralla. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **179**:224-227.
8. Certes, J. C. 1884. De l'action des hautes pressions sur les phenomenes de la purefaction et sur la vitalite des microorganisms d'eau douce et d'eau de mer. *C. R. Acad. Sci.* **99**:385-388.
9. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM: Biological warfare. A historical perspective. *JAMA* 1997 Aug 6; **278**(5): 412-7.
10. Danzig R, Berkowsky PB: Why should we be concerned about biological warfare? *JAMA* 1997 Aug 6; **278**(5): 431-2
11. Deinhard, G., P. Blanz, K. Poralla, and E. Altan. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**:47-53.
12. Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC: Anthrax. *N Engl J Med* 1999 Sep 9; **341**(11): 815-26
13. Evangelia, K., S. B. Ioannis, E. D. Alison, D. B. Joss, and R. A. Martin. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **34**:81-85.

14. **Ferguson JR:** Biological weapons and US law. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 357-60.
15. **Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM, et al:** Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 399-411.
16. **Hartevelde JL, Nieuwenhuizen MS, Wils ER:** Detection of staphylococcal enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor. Biosens Bioelectron 1997; 12(7): 661-7
17. **Headquarters, Department of the Army, Washington, D.C.:** Field Manual 8-284, Treatment of Biological Warfare Agent Casualties. 17 July 2000.
18. **Henderson DA:** The looming threat of bioterrorism. Science 1999 Feb 26; 283(5406): 1279-82
19. **Holloway HC, Norwood AE, Fullerton CS, et al:** The threat of biological weapons. Prophylaxis and mitigation of psychological and social consequences. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 425-7
20. **Hite, B. H.** 1899. The effects of pressure in the preservation of milk. W. Va. Agric. Exp. Stn. Bull. 58:15-35.
21. **Hoover, D. G.** 1993. Pressure effect on biological systems. Food Technol. 47:150-155.
22. **Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al:** Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. JAMA 1999 May 12; 281(18): 1735-45
23. **Kadlec RP, Zelicoff AP, Vrtis AM:** Biological weapons control. Prospects and implications for the future. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 351-6.
24. **Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP:** The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? Emerg Infect Dis 1997 Apr-Jun; 3(2): 83-94
25. **Keim M, Kaufmann AF:** Principles for emergency response to bioterrorism. Ann Emerg Med 1999 Aug; 34(2): 177-82.
25. **Lebeda FJ:** Deterrence of biological and chemical warfare: a review of policy options. Mil Med 1997 Mar; 162(3): 156-61
26. **Lederberg J:** Infectious disease and biological weapons. Prophylaxis and mitigation. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 435-6
27. **McGovern TW, Christopher GW, Eitzen EM:** Cutaneous manifestations of biological warfare and related threat agents. Arch Dermatol 1999; 135: 311-322.

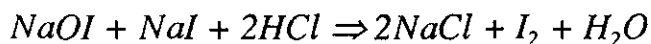
28. **Mallidis, C. G., and D. Drizou.** 1991. Effect of simultaneous application of heat and pressure on the survival of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* **71**:285-288.
29. **McIntyte, S., J. Y. Ikawa, N. Parkinson, J. Haglund, and J. Lee.** 1995. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *J. Food Prot.* **58**:319-321.
30. **Morgan, S. M., R. P. Ross, T. Beresford, and C. Hill.** 2000. Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* **88**:414-420.
31. **Murrell, W. G., and Wills.** 1977. Inactivation of *Bacillus* spore germination by hydrostatic pressure: effect of temperature. *J. Bacteriol.* **129**:1272-1280.
32. **Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, et al:** The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 1994 Nov 18; 266(5188): 1202-8
33. **Mobley JA:** Biological warfare in the twentieth century: lessons from the past, challenges for the future. *Mil Med* 1995 Nov; 160(11): 547-53
34. **Orr, R. V., L. Robert, C. J. H. Shewfelt, T. Sebhat, and L. Y. R. Beuchat.** 2000. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. *J. Food Prot.* **63**:1517-1522.
35. **Okumura T, Takasu N, Ishimatsu S, et al:** Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. *Ann Emerg Med* 1996 Aug; 28(2): 129-35
36. **Pearson GS:** The complementary role of environmental and security biological control regimes in the 21st century. *JAMA* 1997 Aug 6; 278(5): 369-72
37. **Pesik N, Keim M, Sampson TR:** Do US emergency medicine residency programs provide adequate training for bioterrorism? *Ann Emerg Med* 1999 Aug; 34(2): 173-6
38. **Pile JC, Malone JD, Eitzen EM, Friendlander AM:** Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch Intern Med* 1998 Mar 9; 158(5): 429-34
39. **Richards CF, Burstein JL, Waeckerle JF, Hutson HR:** Emergency physicians and biological terrorism. *Ann Emerg Med* 1999 Aug; 34(2): 183-90
40. **Robertson AG, Robertson LJ:** From asps to allegations: biological warfare in history. *Mil Med* 1995 Aug; 160(8): 369-73
41. **Spring, M. P.** 1995. Detectives on a 'juicy' case. *Food Qual.* **1**:32.

42. Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR: Textbook of Military Medicine. Part I: Warfare, Weaponry, and the Casualty: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Washington, DC: Office of the Surgeon General at TMM Publications, Borden Institute 1997: 415-685.
43. Stephenson J: Pentagon-funded research takes aim at agents of biological warfare. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 373-5
44. Sale, A. J. H., G. W. Gould, and W. A. Hamilton. 1970. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. J. Gen. Microbiol. 60:323-334.
45. Splittstoesser, D. F., C. Y. Lee, and J. J. Churry. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. Dairy Food Environ. Sanit. 18:585-587.
46. Torok TJ, Tauxe RV, Wise RP, et al: A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 389-95
47. Timson, W. J., and A. J. Short. 1965. Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. Biotechnol. Bioeng. 7:139-159.
48. Tucker JB: National health and medical services response to incidents of chemical and biological terrorism. JAMA 1997 Aug 6; 278(5): 362-8
49. US Army Medical Research Institute of Infectious Disease: Medical Management of Biological Casualties Handbook, 4th ed. Fort Detrick, Frederick, Maryland: February 2001.
50. Wiener SL: Strategies for the prevention of a successful biological warfare aerosol attack. Mil Med 1996 May; 161(5): 251-6
51. Zajtchuk R, Bellamy RD, eds: Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Part 1. Washington, DC: Office of the Surgeon General, US Dept of the Army; 1997.
53. Walls, I., and R. Chuyate. 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Aust. 52:286-288.
54. Wisotzkey, J. D., P. Jurtshuk, G. E. Fox, G. Deinhard, and K. Poralla. 1992. Comparative sequence analysis of the 16S rRNA DNA of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptancius* and proposal for creation of new genus, *Alicyclobacillus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:263-269.
55. Yamazaki, K., H. Teduka, and H. Shinano. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:543-545.

61. **Zydowicz D:** Anthrax: a disease from antiquity visits the modern world. *Minn Med* 1998 Jul; 81(7): 19-20
62. **U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases.** 1996. Medical management of biological casualties handbook. Fort Detrick, Frederick.
63. **U.S. General Accounting Office.** 1990. Disinfectants, EPA lacks assurance they work. Federal document GAO/RCED-90-139. General Accounting Office, Washington, D.C.
64. **U.S. General Accounting Office.** 1993. Hospital sterilants. Insufficient FDA regulation may pose a public health risk. Federal document GAO/RCED-90-139. General Accounting Office, Washington, D.C.
65. **Wardle, M. D., W. A. Brewer, and M. L. Peterson.** 1971. Dry-heat resistance of bacterial spores recovered from Mariner-Mars 1969 spacecraft. *Appl. Microbiol.* 21:827-831.
66. **World Health Organization.** 1989. The World Health Organization guidelines on sterilization and disinfection methods against HIV. WHO AIDS Ser. 2, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Phụ lục 1 :
**QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG FORMALDEHYDE TỪ CÁC HỢP
CHẤT HOÁ HỌC :**

Nguyên lý kỹ thuật :



Hoá chất :

- Dung dịch I 0,1N
- Dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N
- NaOH 5%
- HCl 30%

Pha dung dịch Iod 0,1N:

13gam Iod + 36 gam kaliiodua (KI) + 50ml lắc đều, bổ xung vừa đủ 1000ml.

Tiến hành :

- Lấy 10ml Formalin cân định lượng cho vào bình 500ml
- Bổ xung nước cất vừa đủ 500ml, trộn đều
- Lấy 5 ml dung dịch đã pha cho vào bình 100ml
- Cho tiếp vào bình 5ml NaOH 5% và 20ml I_2 0,1N (nhỏ từ từ)
- Để dung dịch đã pha vào buồng tối 30 giây
- Cho tiếp vào bình 15ml HCl 30%
- Cho 4-5 giọt hồ tinh bột
- Chuẩn độ bằng Natrtium thiosunfat cho đến khi mất màu, ghi số Natrtium thiosunfat dùng chuẩn độ (ml)

Tính kết quả :

1ml Natrtium thiosunfat dùng chuẩn độ tương đương 0,015gamm Formaldehyde.

$$X\% \text{ Formaldehyde} = \frac{0,015 \times (a \times b) \times 500 \times 100}{10 \times V} \quad \quad \quad X\% = \frac{7,5 \times (a-b)}{V}$$

a: Số ml I₂ đã dùng

b : Số ml Natrtium thiosunfat

V: Thể tích Formalin (5ml)

Phụ lục 2

QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CLO HOẠT TÍNH TRONG CÁC HỢP CHẤT

Trên thị trường có rất nhiều chất có Chlor hoạt dùng trong khử trùng nước, vì vậy tùy theo thực tế thực có để lựa chọn hóa chất. Mỗi loại có nồng độ Chlor hoạt khác nhau, dưới đây là một số chất có Chlor và thường quy xác định Chlor hoạt.

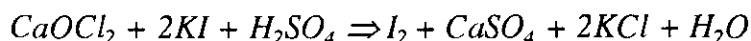
Bảng 11 : Một số hóa chất sinh Chlor hoạt dùng trong khử trùng nước

TT	Tên	Công thức	Nồng độ % Chlor hoạt
1	Chlorua vôi	$\text{CaClOH} \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	28-35
2	Canxi hypochlorit (3/2)	$3\text{Ca}(\text{OCl})_2 \cdot 2\text{Ca}(\text{OH})_2$	56-60
3	Natri hypochlorit	NaOCl	10-12
4	Monochloramin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NNaCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	27-28
5	Dichloramin B	$\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NCl}_2$	60-63
6	Dichloramin T	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NCl}_2$	60-63
7	Hexachlormelamin	$\text{C}_3\text{N}_6\text{Cl}_6$	12-18

* Quy trình xác định hàm lượng chlor hoạt trong chất khử trùng:

Các chất khử trùng sẽ bị phân hủy khi để lâu hoặc bảo quản không tốt vì vậy phải thường xuyên xác định nồng độ chlor hoạt trước khi khử trùng để tính nồng độ hóa chất.

Nguyên lý kỹ thuật :



Iod tự do (tương đương với lượng chlor hoạt) sẽ kết hợp với natri thiosulfat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ theo phản ứng : $\text{I}_2 + 2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \Rightarrow 2\text{NaI} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$

Dựa trên phương pháp chuẩn độ natri thiosulfat sẽ tính được lượng chlor hoạt động.

Cách tiến hành :

- Cân 0,2gam cho vào chén sứ, cho một ít nước cất, dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ thành vữa sệt, khuấy đều cho vào cốc thủy tinh. Dùng nước cất rửa cối sứ nhiều lần cho sạch, nước rửa cho vào cốc thủy tinh. Tổng lượng nước cất là **25ml**.
- Khuấy đều trong 5 phút, không để huyền phù lắng, hút **5ml** huyền phù cho vào cốc thủy tinh, rửa pipett nhiều lần, nước rửa cũng cho vào cốc. Tổng lượng nước cất là **20ml**.
- Cho vào cốc **2ml** dung dịch kali iodua 10% và **5ml** dung dịch axit sunfuaric 10%, lắc đều và đặt vào chỗ tối 10-15 phút.
- Dùng natri thiosulfat 0,1N để chuẩn độ cho đến khi màu vàng nhạt xuất hiện thì nhỏ vào 3-4 giọt hồ tinh bột 1% mới pha. Tiếp tục chuẩn độ cho đến khi mất màu xanh. Ghi số ml natri thiosulfat dùng để chuẩn độ.
- Cách tính hàm lượng Chlor hoạt động :

$$\text{Hàm lượng Chlor hoạt (\%)} = \frac{0,003546.a.V_1}{n.V_2} \cdot 100$$

a: Thể tích trung bình các lần chuẩn độ (tính bằng ml)

V1 : Thể tích dung dịch ban đầu tính bằng ml (25ml)

V2 : Thể tích dung dịch lấy định phân (5ml)

n: Khối lượng ban đầu tính bằng gam (0,2gam)

100: Lượng chlor hoạt tính theo 100gam hóa chất khử trùng

0,003546 : hệ số đương lượng gam của chlor tương đương với 1ml natri thiosulfat 0,1N

**BẢN TỰ ĐÁNH GIÁ VỀ TÌNH HÌNH THỰC HIỆN VÀ NHỮNG ĐÓNG
GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC**

(Kèm theo quyết định số 13/2004/QĐ - BKHCN ngày 25/5/2004 của Bộ khoa học
và Công nghệ)

1.Tên đề tài: *“Nghiên cứu xây dựng qui trình phòng chống ô nhiễm bởi các vi
sinh vật độc hại trong môi trường đất, nước, không khí và thực phẩm.*

Mã số: KC 04-10-10

2.Thuộc chương trình nhà nước: KC 04-10

3.Chủ nhiệm đề tài: TS. Đoàn Trọng Tuyên

4. Cơ quan:

- Cơ quan thực hiện : Viện Vệ sinh phòng dịch Quân đội

- Cơ quan chủ trì: Phân viện công nghệ mới và bảo vệ môi trường

5.Thời gian thực hiện (BĐ- KT): 2001- 2004

6. Tổng kinh phí thực hiện đề tài: 200.000.000 (Hai trăm triệu đồng) thuộc ngân
sách nhà nước.

7. Tình hình nghiên cứu so với hợp đồng

7.1/ Mức độ hoàn thành khối lượng công việc

+ Xây dựng mô hình thử nghiệm khử trùng , tẩy uế vi sinh vật độc hại trong
môi trường : Đất, nước, không khí, thực phẩm phù hợp với điều kiện trang thiết bị
của Quân đội hiện nay

+ Xây dựng 04 qui trình phòng chống ô nhiễm bởi 5 loại vi sinh vật độc hại
(Trực khuẩn than, phẩy khuẩn tả, vi khuẩn thương hàn, dịch hạch) trong nước,
không khí, đất và thực phẩm có tính khả thi.

+ Báo cáo tổng kết đề tài nhánh

+ 01 báo cáo khoa học với tiêu đề : “ Bất hoạt bào tử trực khuẩn than” đăng
trên tuyển tập báo cáo khoa học thuộc hội nghị khoa học về môi trường lần thứ
nhất của trung tâm khoa học kỹ thuật và công nghệ quân sự. Năm 2004.

7.2/ Về yêu cầu khoa học và chỉ tiêu cơ bản của các sản phẩm KHCN

Hoàn thiện 04 qui trình phòng chống ô nhiễm vi sinh vật độc hại trong nước đất, không khí, thực phẩm để thực hiện trong điều kiện tác chiến cơ động, khử trùng, tẩy uế bằng các phương pháp để thực hiện và phù hợp với trang bị, hoá chất hiện nay đang lưu hành trong quân đội và thị trường Việt nam.

7.3/ Về tiến độ thực hiện

Thực hiện theo đúng tiến độ của đề cương của đề tài đưa ra từ năm 2001 và kế hoạch cụ thể hàng năm đã được chủ nhiệm đề tài KC 04-10 phê duyệt .

8. Về đóng góp mới của đề tài:

8.1/ Về giải pháp khoa học - công nghệ

- Hoàn toàn có thể ứng dụng khử trùng môi trường ô nhiễm bởi các tác nhân sinh học khi tác chiến trong điều kiện nguy cơ địch sử dụng vũ khí sinh học (trên nguyên tắc ứng dụng khử trùng bằng các chất hoá học với nồng độ cao giảm ngắn thời gian khử trùng). Qui trình khử trùng cụ thể để thực hiện trong tác chiến cơ động.

- Cho đến nay ở nước ta vấn đề khử trùng các vi sinh vật độc hại trong môi trường đất, nước, không khí, thực phẩm là lĩnh vực hoàn toàn mới, chưa có tác giả hoặc bài báo nào đề cập đến vấn đề này cũng như mô hình thử nghiệm và qui trình khử trùng tẩy uế vi sinh vật độc hại, cũng như chưa có số liệu khoa học nào liên quan tới lĩnh vực này mà từ trước tới nay hoàn toàn áp dụng qui trình của nước ngoài, chưa phù hợp với điều kiện Việt nam, nhất là việc khử trùng môi trường bằng hoá chất có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả khử trùng như : nhiệt độ, pH, độ ẩm...

8.2/ Về phương pháp nghiên cứu

- Đánh giá hiệu quả sau khử trùng bằng phương pháp pha loãng mẫu trên môi trường lỏng và thạch dinh dưỡng tương tự như qui trình của CDC và Quân đội Mỹ .

- áp dụng nhiều phương pháp khử trùng từ phương pháp nhiệt (khô, và ướt) đến sử dụng phương pháp diệt khuẩn bằng các chất hoá học, mỗi phương pháp khử trùng có những ưu nhược điểm riêng, nhưng trong điều kiện tác chiến thì toàn bộ môi trường sống bị ô nhiễm, việc khử trùng cần tiến hành đồng bộ nhưng trên cơ sở tuỳ thuộc vào từng loại môi trường để sử dụng các phương pháp cho hợp lý.

Ví dụ như : lương thực, thực phẩm bị ô nhiễm thì phương pháp khử trùng có hiệu quả nhất chỉ sử dụng phương pháp nhiệt, không thể sử dụng hoá chất được vì nó sẽ gây độc cho con người và động vật sống trong khu vực nhưng khi bao bì chứa thực phẩm thì lại có thể sử dụng hoá chất khử trùng tùy theo chất liệu sản xuất bao bì.

8.3/ Những đóng góp mới :

1. Xây dựng mô hình thử nghiệm bất hoạt bào tử trực khuẩn than ô nhiễm không khí và đất lần đầu tiên được thử nghiệm ở Việt nam.

+ Thiết kế buồng sinh học , đảm bảo nhiệt độ, duy trì độ ẩm, tốc độ phun, tạo khí dung trong buồng sinh học.

+ sản xuất bộ sinh phẩm phát hiện hiệu quả của phương pháp khử trùng, theo nguyên tắc đơn giản dễ thực hiện, áp dụng trong điều kiện dã ngoại.

+ Trên cơ sở mô hình thử nghiệm đưa ra các số liệu cần thiết phù hợp với điều kiện Việt nam.

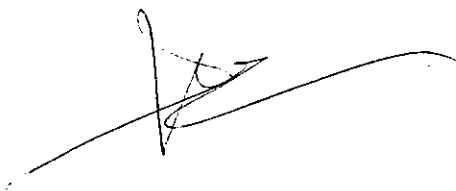
2. Từ các mô hình thử nghiệm, đề tài đã khái quát hoá thành các qui trình kỹ thuật khử trùng, tẩy uế riêng biệt cho từng loại vi sinh vật độc hại trong đất, nước, không khí và thực phẩm.

3. Theo các số liệu báo cáo thì ở Việt nam chưa có công trình nghiên cứu nào về công tác khử trùng đặc biệt là các mô hình thử nghiệm bào tử than. Ở Việt nam chưa có qui định qui trình khử trùng theo một văn bản chính thức nào, theo chúng tôi đây là lĩnh vực còn mới ở Việt nam, cần tiếp tục được nghiên cứu với quy mô và trình độ công nghệ ở mức độ cao hơn

Ngày 20 tháng 9 năm 2004

Chủ nhiệm đề tài

(Họ, tên và chữ ký)



TS. Đoàn Trọng Tuyên

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

**KIỂM ĐỊNH KẾT QUẢ XÂY DỰNG MÔ HÌNH THỬ NGHIỆM BẤT HOẠT VI SINH
ĐỘC HẠI TRONG MÔI TRƯỜNG ĐẤT, NƯỚC, KHÔNG KHÍ, THỰC PHẨM
THUỘC ĐỀ TÀI (KC 04-10-10)**

Hà nội, ngày 25 tháng 8 năm 2004

Cơ quan kiểm nghiệm : Bộ môn vi sinh vật- Học Viện Quân y

Địa điểm kiểm định: Khoa vi sinh vật- Viện Vệ sinh phòng dịch Quân đội

Thời gian kiểm định: 1/08/2004 – 20/08/2004

1. Các yếu tố cần thiết phục vụ nghiên cứu đề tài:

- Hệ thống phòng thí nghiệm an toàn mức độ II và trang thiết bị đủ đáp ứng yêu cầu cho nghiên cứu đề tài.
- Một số phòng xét nghiệm đã được sửa chữa nhỏ phục vụ cho mục đích nghiên cứu khử trùng các mầm bệnh nguy hiểm. Một số phương tiện làm việc như: xây dựng buồng sinh học, máy tạo khí dung, phương tiện thu thập mẫu để đánh giá hiệu quả khử trùng không khí, đất đã được cải tiến để nâng cao chất lượng của thử nghiệm.
- Đội ngũ cán bộ có trình độ chuyên môn, kinh nghiệm trong phòng chống các vụ dịch tối nguy hiểm (dịch hạch, tả, than, thương hàn, màng não cầu...), đủ khả năng thực hiện nội dung nghiên cứu của đề tài.

2. Các chủng vi sinh vật gây bệnh

Khoa Vi sinh vật Viện Vệ sinh phòng dịch hiện đang lưu giữ các chủng dưới dạng đông khô để thực hiện nội dung của đề tài. Cụ thể như sau :

- 3 chủng dịch hạch do Viện Pasteur Tây nguyên cung cấp phân lập từ năm 1989 và 1998 có đầy đủ các đặc tính sinh học

- 3 Chủng trực khuẩn than : 01 phân lập từ Điện biên, 02 chủng do Học viện Quân y cung cấp trong đó 01 chủng có độc lực. Cả 3 chủng đều có đông khô dưới dạng bào tử (spore)
- 05 chủng Salmonella typhi được phân lập từ các khu vực An giang, Hoà bình, Điện biên
- 9 Chủng phẩy khuẩn tả phân lập từ cộng đồng dân cư khu vực Thành phố Hồ Chí Minh từ năm 1990.

Số lượng và các dạng sinh học của chủng vi sinh vật như trên phù hợp với nội dung nghiên cứu, thực hiện đề tài.

3. Phương pháp thử nghiệm :

1. Phương pháp thử nghiệm các quy trình diệt khuẩn (bằng hoá chất, bằng nhiệt) thực hiện theo thường quy kiểm định các chất có tác dụng diệt khuẩn (bacteriocide) hoặc ức chế vi khuẩn hiện đang áp dụng tại các phòng thí nghiệm.
2. Trong nghiên cứu này, tác giả đã xây dựng 4 mô hình thử nghiệm khử trùng, tẩy uế môi trường đất, nước, không khí, thực phẩm trong điều kiện đề phòng môi trường sinh thái bị ô nhiễm với thiết bị tạo khí dung vi khuẩn trong buồng sinh học là hoàn toàn hợp lý. Các thí nghiệm gây ô nhiễm môi trường bằng chủng vi sinh vật không được phép thử thực địa mà chỉ có thể thực hiện trong buồng sinh học.

4. Kết quả mô hình thử nghiệm khử trùng tẩy uế vi sinh vật độc hại

Trong các quy trình khử trùng, tẩy uế vi khuẩn độc hại thì bao giờ người ta cũng dùng nồng độ diệt khuẩn đối với tác nhân có sức bền vững, kháng hoá chất mạnh nhất. Vì vậy, để kiểm tra kết quả của đề tài chỉ thử ngẫu nhiên bằng hoá chất với các mầm bệnh Tả, Thương hàn và tập trung nhiều hơn đối với trực khuẩn than, B.anthraxis, dạng hoạt động và dạng bào tử vì vi khuẩn này có khả năng tồn tại lâu nhất ngoài môi trường và cũng khó diệt hơn cả.

Thử nghiệm để kiểm định được tiến hành với phương pháp, vật liệu, quy trình đúng như đề tài đã tiến hành. Kết quả kiểm tra phù hợp với số liệu báo cáo của đề tài (Xem phần phụ lục)

Kết luận:

Tác giả đã xây dựng mô hình thử nghiệm bất hoạt vi sinh vật độc hại gây ô nhiễm thực nghiệm trong buồng sinh học làm cơ sở triển khai các nghiên cứu gần giống điều kiện thực địa (do không được phép và không thể triển khai nghiên cứu thực địa với mầm bệnh). Các số liệu nghiên cứu đảm bảo tính khách quan và là cơ sở khoa học cho xây dựng các qui trình khử trùng, tẩy uế mầm bệnh độc hại phù hợp với điều kiện khả năng và trang thiết bị hiện có trong Quân đội hiện nay.

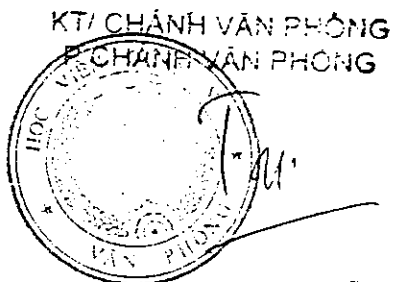
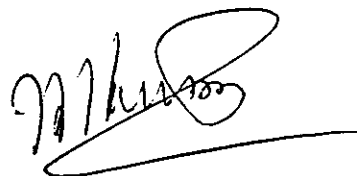
Kiểm định ngẫu nhiên một số mẫu và quy trình cho thấy với các nồng độ hoá chất, nhiệt độ, thời gian, đã thử đều có tác dụng diệt mầm bệnh, kết quả phù hợp với số liệu của đề tài.

Hà nội, ngày 25 tháng 8 năm 2004

THỦ TRƯỞNG HVQY

BỘ MÔN VI SINH VẬT- HVQY

Xác nhận như ký cũ
PGS.TS. Hoàng Ngọc Hiến
Chức nhận B.M. Kinh tế - HVQY



PGS, TS. Hoàng Ngọc Hiến

Thượng tá
BS. NGUYỄN BÁ TRÍ

PHỤ LỤC KẾT QUẢ KIỂM ĐỊNH :

BẢNG 1. KẾT QUẢ KIỂM TRA KHỬ TRÙNG, TẮY UẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG CÁC CHẤT HOÁ HỌC

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Hoá chất khử trùng	Nồng độ hoá chất	Nồng độ vi khuẩn thử (CFU/ ml)	Thời gian khử trùng	Số vi khuẩn còn sống (CFU)/10g
Phẩy khuẩn tả, V. cholerae	Nước	Chlor hoạt tính	0,5 mg/ lít	1×10^5	30 phút	-----
Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Nước	Chlor hoạt tính	1,25 mg/ lít	1×10^5	60 phút	-----
		Chlor hoạt tính	0,5 mg/ lít	1×10^5	30 phút	-----
Bào tử than (B. anthracis spores)	Đất	Formaldehyde	4% (50 lít/ m ²)	10^8	12 giờ	1-3 CFU (ở độ sâu 20 cm)
Bào tử than và than thể dinh dưỡng	Không khí	Formaldehyde	0,72g/ m ³	10^9	120 phút	-----

Ghi chú :

-----: Không có vi khuẩn sống sót trong 10g (hoặc 10ml) chất thử

BẢNG 2. MỘT SỐ KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẤT HOẠT NHIỆT VI SINH VẬT ĐỘC HẠI

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Nhiệt độ	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ ml)	Thời gian khử trùng	Số vi khuẩn còn sống (CFU)/10g
Phẩy khuẩn tả (V. cholerae)	Nước	100 ⁰ C	10 ⁹	3 phút	-----
Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Nước	100 ⁰ C	10 ⁹	5 phút	-----
Bào tử than (B. anthracis spores) và than thể dinh dưỡng	Thực phẩm	100 ⁰ C	10 ⁸	20-25 phút	Trong 3 lần thử có 1 lần còn 2,3.10 ² /10ml thực phẩm

Ghi chú :

-----: Không có vi khuẩn sống sót trong 10g (hoặc 10ml) chất thử

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 16 tháng 12 năm 2001

HỢP ĐỒNG
NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ

Số:07/HĐ.NCKH.....

(dùng cho Đề tài KH&CN thuộc các Chương trình KHCN
trọng điểm cấp Nhà nước giai đoạn 5 năm 2001 - 2005)

- Căn cứ Luật Khoa học và Công nghệ ngày 9 tháng 6 năm 2000;
- Căn cứ Quyết định số 82/2001/QĐ-TTg ngày 24/5/2001 của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt phương hướng, mục tiêu, nhiệm vụ khoa học và công nghệ chủ yếu và danh mục các Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước giai đoạn 5 năm 2001 - 2005;
- Căn cứ Quyết định số 41/2001/QĐ-BKHCNMT ngày 18/7/2001 của Bộ trưởng Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường về việc ban hành Quy định tạm thời về việc quản lý Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước giai đoạn 5 năm 2001 - 2005;
- Căn cứ Quyết định số 8125/QĐ-BKHCNMT ngày 12/9/2001 của Bộ trưởng Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường về việc phê duyệt Đề tài mã số KC - 04.10 thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Nhà nước giai đoạn 5 năm 2001 - 2005, mã số KC - 04;
- Căn cứ vào Hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ số 10/2001/HĐ-ĐTCT-KC-04.10 giữa ông PGS.TSKH Trần Duy Quý, Chủ nhiệm Chương trình KC - 04 và ông GS.TSKH Đỗ Ngọc Khuê, Chủ nhiệm Đề tài KC - 04.10

Chúng tôi gồm:

1. Bên giao (bên A) là: Ông GS.TSKH Đỗ Ngọc Khuê,
Chủ nhiệm Đề tài KC - 04.10: "Nghiên cứu công nghệ sinh học xử lý chất thải Quốc phòng đặc chủng và sự ô nhiễm vi sinh vật độc hại". (KC - 04.10).
Địa chỉ: Số 8, Láng Hạ, Ba Đình, Hà Nội Tel: 8311191
Số Tài khoản: 931 02 205 Kho bạc Nhà nước Hà Nội.

2. Bên nhận (Bên B) là: TS. Vũ Xuân Trường
Chức vụ: C.N.K. TS. Trương Việt Đông, Đ.T.
Cơ quan: Viện Vệ sinh Phòng Dịc Quân đội.
Địa chỉ: TS. Trương Việt Đông, Đ.T. - HN Tel: 661.883.080
Số tài khoản: 931.02.028 Kho bạc Nhà nước - Đống Đa - HN

Hai bên thảo thuận ký Hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ (Sau đây gọi tắt là Hợp đồng) với các điều khoản sau:

I. ĐỐI TƯỢNG HỢP ĐỒNG

Điều 1: Bên B cam kết thực hiện đề mục: *Nghiên cứu xây dựng quy trình phòng chống ô nhiễm bởi các vi sinh vật độc hại trong môi trường nước và không khí*, thuộc Đề tài KC - 04.10

Điều 2: Thời gian thực hiện đề tài là: 36 tháng
từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004.

Điều 3: Bên A phối hợp với Ban Chủ nhiệm Chương trình KC - 04 đánh giá và nghiệm thu kết quả thực hiện đề mục theo các yêu cầu, chỉ tiêu mà hai bên thoả thuận (phần phụ lục).

II. TÀI CHÍNH CỦA HỢP ĐỒNG

Điều 4: Kinh phí để thực hiện đề mục là: 200.000.000 đồng
(Hai trăm triệu đồng chẵn./.)

Điều 5: Bên A có trách nhiệm cấp cho Bên B số kinh phí ghi ở điều 4 để thực hiện đề mục theo đúng tiến độ sau:

STT	Đợt	Kinh phí (triệu đồng)	Thời gian
1	Đợt I	30	Năm 2001
2	Đợt II	100	Năm 2002
3	Đợt III	50	Năm 2003
4	Đợt IV	20	Năm 2004

Trước mỗi đợt cấp kinh phí tiếp theo, trên cơ sở có báo cáo tình hình thực hiện đề mục, bên A sẽ phối hợp với Ban Chủ nhiệm Chương trình tiến hành xem xét và khẳng định kết quả đạt được theo tiến độ thực hiện nêu trong **phụ lục Hợp đồng**. Nếu bên B không hoàn thành công việc đúng tiến độ, bên A có thể kiến nghị thay đổi tiến độ hoặc ngừng việc cấp kinh phí.

Điều 6: Bên B có trách nhiệm báo cáo định kỳ cho bên A về tình hình thực hiện đề mục (*theo HD01 Biểu mẫu C-BC-1-THTH*), báo cáo quyết toán hoặc báo cáo tình hình sử dụng số kinh phí đã nhận được theo chế độ hiện hành trước khi nhận kinh phí của đợt tiếp theo.

Điều 7: Hàng năm bên A sẽ phối hợp với Ban chủ nhiệm Chương trình tiến hành kiểm tra tình hình thực hiện đề mục theo các nội dung ghi trong **phụ lục** kèm theo trong Hợp đồng.

III. TRÌNH TỰ GIAO NHẬN SẢN PHẨM

Điều 8: Khi kết thúc Đề mục, bên B phải chuyển cho bên A những tài liệu và chuẩn bị đầy đủ các mẫu sản phẩm nêu trong phụ lục kèm theo Hợp đồng, báo cáo quyết toán tài chính để đánh giá và nghiệm thu.

Điều 9: Trong thời gian 15 ngày sau khi bên B đã thực hiện xong nội dung nêu ở Điều 8 và quyết toán kinh phí, bên A phối hợp với Ban chủ nhiệm Chương trình tiến hành đánh giá và nghiệm thu đề mục, nghiệm thu và thanh lý Hợp đồng.

Điều 10: Trong quá trình thực hiện đề mục:

- Nếu Bên nào nhận thấy cần đình chỉ thực hiện Hợp đồng với những lý do chính đáng thì cần thông báo bằng văn bản cho bên kia biết trước 15 ngày để tiến hành xác định trách nhiệm của các Bên và lập biên bản xử lý.

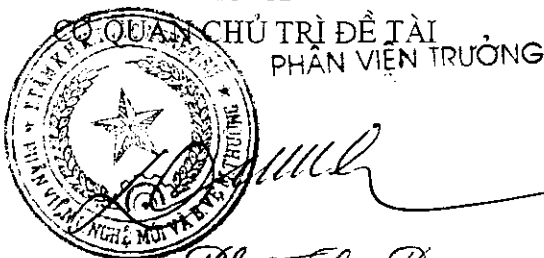
- Nếu có các yêu cầu thay đổi hoặc bổ sung hợp đồng, hai bên phải kịp thời thoả thuận bằng văn bản. Các thay đổi hoặc bổ sung nêu trên là bộ phận của Hợp đồng làm căn cứ khi nghiệm thu.

Điều 12: Hai bên cam kết thực hiện đúng các điều khoản ghi trong hợp đồng. Bên nào không hoàn thành hoặc hoàn thành không đầy đủ các điều khoản ghi trong Hợp đồng sẽ phải chịu trách nhiệm theo luật pháp hiện hành.

Điều 13: Hai bên có trách nhiệm bảo mật các sản phẩm khoa học theo quy định hiện hành.

Điều 14: Hợp đồng này có hiệu lực từ ngày ký. Hợp đồng được làm thành 08 bản có giá trị như nhau, mỗi Bên giữ 03 bản.

BÊN A



Đại tá. *Phạm Sơn Dương*
CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI

[Signature]

BÊN B



Đại tá
PGS.TS. **VŨ QUANG HUY**
CHỦ NHIỆM ĐỀ MỤC

[Signature]
Vũ Xuân Thống

PHỤ LỤC

Bảng 1: Nội dung và kết quả năm 2001 - 2002

STT	Các nội dung công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	Ghi chú
1	Thu thập vi sinh vật độc hại	5 loại vi sinh vật gây bệnh phổ biến (bệnh than, thương hàn, tả, lỵ và dịch hạch)	
2	Xây dựng phương án thử nghiệm	Mô hình lây nhiễm và phương án, quy trình phòng chống	
3	Xây dựng mô hình lây nhiễm trong không khí, nước, đất và thực phẩm		
4	Nghiên cứu biện pháp xử lý		
5	Xây dựng quy trình phòng chống		

Bảng 2: Nội dung và kết quả năm 2003

STT	Các nội dung công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	Ghi chú
1	Thử nghiệm tại hiện trường, đánh giá rút kinh nghiệm	4 quy trình phòng chống ô nhiễm bởi 5 loại vi sinh vật độc hại trên (trong nước, không khí, đất và thực phẩm)	

Bảng 3: Nội dung và kết quả năm 2004

STT	Các nội dung công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	Ghi chú
1	Hoàn thiện quy trình phòng chống	Quy trình phòng chống hoàn thiện, có thể áp dụng	
2	Viết báo cáo tổng kết đề mục	- Báo cáo tổng kết đề mục - Các sản phẩm khác: + 1 - 2 bài báo khoa học + Đào tạo 1 - 2 thạc sỹ, cử nhân	

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

**KIỂM ĐỊNH KẾT QUẢ XÂY DỰNG MÔ HÌNH THỬ NGHIỆM BẤT HOẠT VI SINH
ĐỘC HẠI TRONG MÔI TRƯỜNG ĐẤT, NƯỚC, KHÔNG KHÍ, THỰC PHẨM
THUỘC ĐỀ TÀI (KC 04-10-10)**

Hà nội, ngày 25 tháng 8 năm 2004

Cơ quan kiểm nghiệm : Bộ môn vi sinh vật- Học Viện Quân y

Địa điểm kiểm định: Khoa vi sinh vật- Viện Vệ sinh phòng dịch Quân đội

Thời gian kiểm định: 1/08/2004 – 20/08/2004

1. Các yếu tố cần thiết phục vụ nghiên cứu đề tài:

- Hệ thống phòng thí nghiệm an toàn mức độ II và trang thiết bị đủ đáp ứng yêu cầu cho nghiên cứu đề tài.
- Một số phòng xét nghiệm đã được sửa chữa nhỏ phục vụ cho mục đích nghiên cứu khử trùng các mầm bệnh nguy hiểm. Một số phương tiện làm việc như: xây dựng buồng sinh học, máy tạo khí dung, phương tiện thu thập mẫu để đánh giá hiệu quả khử trùng không khí, đất đã được cải tiến để nâng cao chất lượng của thử nghiệm.
- Đội ngũ cán bộ có trình độ chuyên môn, kinh nghiệm trong phòng chống các vụ dịch tối nguy hiểm (dịch hạch, tả, than, thương hàn, màng não cầu...), đủ khả năng thực hiện nội dung nghiên cứu của đề tài.

2. Các chủng vi sinh vật gây bệnh

Khoa Vi sinh vật Viện Vệ sinh phòng dịch hiện đang lưu giữ các chủng dưới dạng đông khô để thực hiện nội dung của đề tài. Cụ thể như sau :

- 3 chủng dịch hạch do Viện Pasteur Tây nguyên cung cấp phân lập từ năm 1989 và 1998 có đầy đủ các đặc tính sinh học

- 3 Chủng trực khuẩn than : 01 phân lập từ Điện biên, 02 chủng do Học viện Quân y cung cấp trong đó 01 chủng có độc lực. Cả 3 chủng đều có đông khô dưới dạng bào tử (spore)
- 05 chủng Salmonella typhi được phân lập từ các khu vực An giang, Hoà bình, Điện biên
- 9 Chủng phẩy khuẩn tả phân lập từ cộng đồng dân cư khu vực Thành phố Hồ Chí Minh từ năm 1990.

Số lượng và các dạng sinh học của chủng vi sinh vật như trên phù hợp với nội dung nghiên cứu, thực hiện đề tài.

3. Phương pháp thử nghiệm :

1. Phương pháp thử nghiệm các quy trình diệt khuẩn (bằng hoá chất, bằng nhiệt) thực hiện theo thường quy kiểm định các chất có tác dụng diệt khuẩn (bacteriocide) hoặc ức chế vi khuẩn hiện đang áp dụng tại các phòng thí nghiệm.
2. Trong nghiên cứu này, tác giả đã xây dựng 4 mô hình thử nghiệm khử trùng, tẩy uế môi trường đất, nước, không khí, thực phẩm trong điều kiện đề phòng môi trường sinh thái bị ô nhiễm với thiết bị tạo khí dung vi khuẩn trong buồng sinh học là hoàn toàn hợp lý. Các thí nghiệm gây ô nhiễm môi trường bằng chủng vi sinh vật không được phép thử thực địa mà chỉ có thể thực hiện trong buồng sinh học.

4. Kết quả mô hình thử nghiệm khử trùng tẩy uế vi sinh vật độc hại

Trong các quy trình khử trùng, tẩy uế vi khuẩn độc hại thì bao giờ người ta cũng dùng nồng độ diệt khuẩn đối với tác nhân có sức bền vững, kháng hoá chất mạnh nhất. Vì vậy, để kiểm tra kết quả của đề tài chỉ thử ngẫu nhiên bằng hoá chất với các mầm bệnh Tả, Thương hàn và tập trung nhiều hơn đối với trực khuẩn than, B.anthraxis, dạng hoạt động và dạng bào tử vì vi khuẩn này có khả năng tồn tại lâu nhất ngoài môi trường và cũng khó diệt hơn cả.

Thử nghiệm để kiểm định được tiến hành với phương pháp, vật liệu, quy trình đúng như đề tài đã tiến hành. Kết quả kiểm tra phù hợp với số liệu báo cáo của đề tài (Xem phần phụ lục)

Kết luận:

Tác giả đã xây dựng mô hình thử nghiệm bất hoạt vi sinh vật độc hại gây ô nhiễm thực nghiệm trong buồng sinh học làm cơ sở triển khai các nghiên cứu gần giống điều kiện thực địa (do không được phép và không thể triển khai nghiên cứu thực địa với mầm bệnh). Các số liệu nghiên cứu đảm bảo tính khách quan và là cơ sở khoa học cho xây dựng các qui trình khử trùng, tẩy uế mầm bệnh độc hại phù hợp với điều kiện khả năng và trang thiết bị hiện có trong Quân đội hiện nay.

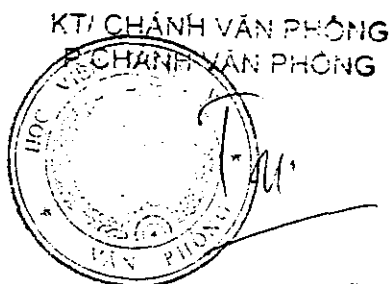
Kiểm định ngẫu nhiên một số mẫu và quy trình cho thấy với các nồng độ hoá chất, nhiệt độ, thời gian, đã thử đều có tác dụng diệt mầm bệnh, kết quả phù hợp với số liệu của đề tài.

Hà nội, ngày 25 tháng 8 năm 2004

BỘ MÔN VI SINH VẬT- HVQY

THỦ TRƯỞNG HVQY

Xác'nhos chos ký' cũ
PGS.TS Hoàng Ngọc Hiến
Chos nh'ân B'M Vĩnh An - HVQY



Thượng tá
BS: NGUYỄN BÁ TRÍ

PGS, TS. Hoàng Ngọc Hiến

PHỤ LỤC KẾT QUẢ KIỂM ĐỊNH :

BẢNG 1. KẾT QUẢ KIỂM TRA KHỬ TRÙNG, TẮY UẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG CÁC CHẤT HOÁ HỌC

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Hoá chất khử trùng	Nồng độ hoá chất	Nồng độ vi khuẩn thử (CFU/ ml)	Thời gian khử trùng	Số vi khuẩn còn sống (CFU)/10g
Phẩy khuẩn tả, V. cholerae	Nước	Chlor hoạt tính	0,5 mg/ lít	1×10^5	30 phút	-----
Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Nước	Chlor hoạt tính	1,25 mg/ lít	1×10^5	60 phút	-----
		Chlor hoạt tính	0,5 mg/ lít	1×10^5	30 phút	-----
Bào tử than (B. anthracis spores)	Đất	Formaldehyde	4% (50 lít/ m ²)	10^8	12 giờ	1-3 CFU (ở độ sâu 20 cm)
Bào tử than và than thể dinh dưỡng	Không khí	Formaldehyde	0,72g/ m ³	10^9	120 phút	-----

Ghi chú :

-----: Không có vi khuẩn sống sót trong 10g (hoặc 10ml) chất thử

BẢNG 2. MỘT SỐ KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẮT HOẠT NHIỆT VI SINH VẬT ĐỘC HẠI

Tác nhân vi sinh vật	Môi trường khử trùng	Nhiệt độ	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ ml)	Thời gian khử trùng	Số vi khuẩn còn sống (CFU)/10g
Phẩy khuẩn tả (V. cholerae)	Nước	100 ⁰ C	10 ⁹	3 phút	-----
Vi khuẩn thương hàn (Salmonella)	Nước	100 ⁰ C	10 ⁹	5 phút	-----
Bào tử than (B. anthracis spores) và than thể dinh dưỡng	Thực phẩm	100 ⁰ C	10 ⁸	20-25 phút	Trong 3 lần thử có 1 lần còn 2,3.10 ² /10ml thực phẩm

Ghi chú :

-----: Không có vi khuẩn sống sót trong 10g (hoặc 10ml) chất thử

Kết quả hình thành bào tử theo thời gian

TT	Thời điểm	Số bào tử/tổng số *	% Bào tử**
1	18 h sau khi cấy chủng	5/87	5
2	24 h sau khi cấy chủng	21/106	20
3	32 h sau khi cấy chủng	15/68	22
4	40 h sau khi cấy chủng	20/83	24
5	48 h sau khi cấy chủng	35/61	51
6	56 h sau khi cấy chủng	43/74	58
7	64 h sau khi cấy chủng	39/58	67
8	72 h sau khi cấy chủng	56/69	81
9	80h sau khi cấy chủng	75/93	80

Kết quả diệt trực Thương hàn, Tả bằng Chloramin

Nồng độ Chlor mg/ml	Tả		Thương hàn		
	Số CFU**		Số CFU**		
	1/2h	Chứng*	1/2h	6h	Chứng*
0,0002	78	ống chủng (Thay hoá chất Chlor bằng nước cất) có số CFU trung bình là 81.	86	49	ống chủng (Thay hoá chất Chlor bằng nước cất) có số CFU trung bình là 91.
0,0003	56		89	51	
0,0004	12		64	34	
0,0005	2		52	12	
0,001	2		41	5	
0,002	0		13	0	
0,003	0		6	0	
0,004	0		1	0	
0,005	0		0	0	
0,01	0		0	0	
0,2	0		0	0	
0,5	0		0	0	
1,0	0		0	0	
2,0	0		0	0	

TRỰC KHUẨN THAN

1.1 Thử nhiệt bình thường :

- Cho vào các tít 0,5ml hỗn dịch vi khuẩn có nồng độ 10^9 vi khuẩn/ ml
- Đun sôi, lấy thời gian như bảng sau :

thời điểm lấy mẫu	than thể sinh dưỡng (số khuẩn lạc)			tha thể bào tử (số khuẩn lạc)		
	tít 1	tít 2	tít 3	tít 1	tít 2	tít 3
bắt đầu sôi						
1 phút	mọc đầy không đếm được			mọc đầy không đếm được		
2 phút	75	110	95	không cấy		
3 phút	6	3	9	mọc đầy không đếm được		
4 phút	3	0	1	48	77	107
5 phút	0	0	0	4	23	10
6 phút	3	0	0	6	4	1
7 phút	0	0	0	2	0	1
8 phút	0	0	0	0	2	1
9 phút	0	0	0	0	0	0
10 phút	0	0	0	0	0	1
11 phút	0	0	0	0	0	0

Cách lấy mẫu : lấy 10 μ l , rĩa đều khắp mặt thạch, để tủ ấm 37°C qua đêm. đếm số khuẩn lạc hình thành.

TRỰC KHUẨN THAN

Tháng 1/03

1. Thử nhiệt

1.1. Thử nhiệt bình thường :

- Cho vào các tít (hoặc bình nút mài) khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.
- Đun sôi, lấy thời gian như bảng 1 : Trực khuẩn Than

Thời điểm lấy mẫu ¹	Than thể sinh dưỡng (số khuẩn lạc)	Than thể bào tử (số khuẩn lạc)
Bắt đầu sôi		
1 phút	5 khuẩn lạc	
2 phút	Không mọc	
3 phút	- NT	
4 phút	- NT	
5 phút	- NT	Không Mọc
6 phút	- NT	- NT
7 phút	- NT	- NT
8 phút	- NT	- NT
9 phút	- NT	- NT
10 phút	- NT	- NT
11 phút	- NT	- NT
12 phút	- NT	- NT
13 phút	- NT	- NT
14 phút	- NT	- NT
15 phút	- NT	- NT

¹ Cách lấy mẫu : Lấy một vòng dây que cấy, ria đều khắp mặt thạch, để tủ ấm 37 OC/ qua đêm. đếm số khuẩn lạc hình thành.

* Chứng : Cấy dây một đầu que cấy hỗn dịch vi khuẩn chưa xử lý nhiệt và làm như trên.

- Chứng Thử ² H₂ H₂O₂ : Mọc dây
- Chứng Thử ² BT Vaccine : Mọc dây

1.2. Tyndall :

- Cho vào các tít (hoặc bình nút mài) khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.
- Đun cách thủy 60°C , lấy thời gian như bảng 2

Thời điểm lấy mẫu ¹	Than thể sinh dưỡng (số khuẩn lạc)	Than thể bào tử (số khuẩn lạc)
Đạt nhiệt độ 60°C	Mọc đầy không đến đũa	Mọc đầy không đến đũa
1 phút		
5 phút	Mọc đầy không đến đũa	Mọc đầy không đến đũa?
10 phút	- nT	- nT
11 phút	- nT	- nT
12 phút	- nT	- nT
13 phút	- nT	- nT
14 phút	- nT	- nT
15 phút	- nT	- nT
16	- nT	- nT
17	- nT	- nT
18	- nT	- nT
19	- nT	- nT
20	- nT	- nT

¹ Cách lấy mẫu : Lấy một vòng dây que cấy, ria đều khắp mặt thạch, để tủ ấm 37°C qua đêm. đếm số khuẩn lạc hình thành.

* Chú ý : Cấy dây một đầu que cấy hỗn dịch vi khuẩn chưa xử lý nhiệt và làm như trên.

- Chuỗi Thứ 2 D² HVQY : mọc đầy
- Chuỗi Thứ BT. Vaccin : mọc đầy

TẢ, THƯƠNG HÀN

1. Thử nhiệt

1.1 Thử nhiệt bình thường :

- Cho vào các tốp (hoặc bình nút mài) khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.
- Đun sôi, lấy thời gian như bảng 1 :

Thời điểm lấy mẫu ¹	Tả	Thương hàn
Bắt đầu sôi	Mọc	Mọc
1 phút	Mọc	Mọc
2 phút	Không mọc	Không mọc
3 phút	m	m
4 phút	@ Mọc	m
5 phút	@ Mọc	m
6 phút	m	m
7 phút	m	m
8 phút	m	m
9 phút	m	m
10 phút	m	m
11 phút	m	m
12 phút	m	m
13 phút	m	m
14 phút	m	m
15 phút	m	m
Chứng	Mọc	Mọc

¹ Cách lấy mẫu : Dùng pipett Pastuer hút và nhỏ 1 giọt vào canh thang pepton kiềm (với vi khuẩn tả) vào canh thang thường (với trực khuẩn thương hàn). Để tủ ấm 37 OC/ qua đêm, kiểm tra có mọc không.

* Chứng : Hút bằng pipett pastuer và nhỏ 1 giọt canh khuẩn chưa xử lý vào pepton kiềm (vi khuẩn tả), canh thang thường (trực khuẩn thương hàn). Để tủ ấm 37 OC/ qua đêm, kiểm tra có mọc không.

1.2. Tyndall :

- Cho vào các tít (hoặc bình nút mài) khoảng 10ml hỗn dịch vi khuẩn có 10^9 CFU/ml có vi khuẩn.
- Đun cách thuỷ 60°C , lấy thời gian như bảng 2

Thời điểm lấy mẫu ¹	Tả	Thương hàn
Đạt nhiệt độ 60°C	<i>C. m</i>	Mọc đục
1 phút	<i>m</i>	Mọc đục
5 phút	<i>m</i>	Không mọc
10 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
11 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
12 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
13 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
14 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
15 phút	<i>m</i>	<i>m</i>
16	<i>m</i>	<i>m</i>
17	<i>m</i>	<i>m</i>
18	<i>m</i>	<i>m</i>
19	<i>m</i>	<i>m</i>
20	<i>m</i>	<i>m</i>
<i>Chứng</i>	<i>Mọc</i>	<i>Mọc</i>

¹ Cách lấy mẫu : Dùng pipett Pastuer hút và nhỏ 1 giọt vào canh thang pepton kiềm (với vi khuẩn tả) vào canh thang thường (với trực khuẩn thương hàn). Để tủ ấm 37°C qua đêm, kiểm tra có mọc không.

* Chứng : Hút bằng pipett pastuer và nhỏ 1 giọt canh khuẩn chưa xử lý vào pepton kiềm (vi khuẩn tả), canh thang thường (trực khuẩn thương hàn). Để tủ ấm 37°C qua đêm, kiểm tra có mọc không.

Chứng' : Mọc đục

5,0	0		0	0	
10,0	0		0	0	

* Chứng : Dãy chứng thay hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý.

** CFU (Colony forming unit) : Số khuẩn lạc trên đĩa thạch sau 24 giờ, chỉ số trung bình của 5 đĩa, lấy tròn số.

Kết quả diệt trực khuẩn Than bằng Chloramin

Nồng độ Chlor mg/ml	Trực khuẩn Than (sinh dưỡng)			Trực khuẩn Than (bào tử)		
	Số mẫu có vi khuẩn/ tổng số			Số mẫu có vi khuẩn/ tổng số		
	1/2h	18h	Chứng*	1/2h	18h	Chứng*
10	1/3	0/3	Dãy chứng thay dung dịch hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý : vi khuẩn mọc 3/3 mẫu	3/3	0/3	Dãy chứng thay dung dịch hóa chất có Chlor bằng nước muối sinh lý : vi khuẩn mọc 3/3 mẫu
5	1/3	0/3		2/3	0/3	
2	3/3	0/3		3/3	0/3	
1	1/3	1/3		3/3	1/3	
0,5	1/3	0/3		3/3	2/3	
0,2	3/3	1/3		3/3	3/3	
0,1	3/3	1/3		3/3	3/3	
0,05	3/3	2/3		3/3	3/3	
0,01	3/3	3/3		3/3	3/3	

Kết quả khử trùng vi khuẩn thương hàn và phẩy khuẩn tả trong mẫu thịt và rau bằng phương pháp nhiệt (Đun sôi 100°C)

Thời gian (phút)	Hiệu quả diệt khuẩn (%) (n=9)			
	S. typhi		V.cholerae	
	Mẫu thịt	Mẫu rau	Mẫu thịt	Mẫu rau

2	8/9	7/9	3/9	2/9
4	4/9	2/9	0/9	0/9
6	1/9	0/9	0/9	0/9
8	0/9	0/9	0/9	0/9
10	0/9	0/9	0/9	0/9
12	0/9	0/9	0/9	0/9

Kết quả khử trùng vi khuẩn độc hại trong mẫu sữa

Đối với các nguồn thực phẩm dạng lỏng như: sữa, dầu ăn, bơ, mỡ, fromage... không nên sử dụng các biện pháp khử trùng bằng các phương pháp hoá học vì phần tồn dư của hoá chất phân nào ảnh hưởng tới sức khoẻ con người, và mất mùi vị và không nên dùng phương pháp đun sôi vì làm biến chất của sản phẩm, do đó biện pháp thích hợp nhất là sử dụng phương pháp pasteurization

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Hiệu quả diệt khuẩn(%) ở nhiệt độ 62°C-64°C (n=9 ống)</i>		
	<i>B. anthracis (sinh duỡng)</i>	<i>S.typhi</i>	<i>V.cholerae</i>
1	9/9	9/9	9/9
5	8/9	5/9	0/9 (100%)
7	6/9	2/9	0/9
8	5/9	0/9 (100%)	0/9
10	5/9	0/9	0/9
15	2/9	ND*	ND*
20	1/9	ND*	ND*
25	0/9 (100%)	ND*	ND*
30	0/9	ND*	ND*

*ND: not done (Không thực hiện

Đánh giá hiệu quả diệt bào tử trực khuẩn than bằng phương pháp hấp ướt ở 121°C

KẾT QUẢ THỬ FOCMALDEHYDE

NGÀY THỬ: 21/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 36%

CHUNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 2 GIỜ			GHI CHÚ
Bào tử Than	10 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 72 h
Than sinh dưỡng	10 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 72 h

NGÀY THỬ: 21/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 36%

CHUNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 4 GIỜ			GHI CHÚ
Bào tử Than	10 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 48 h
Than sinh dưỡng	10 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 48 h

NGÀY THỬ: 25/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,5 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 30%

CHUNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 2 GIỜ			GHI CHÚ
Bào tử Than	02 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 24 h

Than sinh dưỡng	02 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 24 h
-----------------	-------	-----	-----	-----	-------------

NGÀY THỬ: 26/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,5 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 36%

CHŨNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 0 GIỜ 30'			GHI CHÚ
Bào tử Than	01 ml	(+)	(+)	(+)	KT sau 24 h
Than sinh dưỡng	01 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 24 h

NGÀY THỬ: 27/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 36%

CHŨNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 1 GIỜ			GHI CHÚ
Bào tử Than	01 ml	(+)	(+)	(+)	KT sau 24 h

NGÀY THỬ: 27/08/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 30%

CHŨNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 1 GIỜ 20'			GHI CHÚ
Bào tử Than	1 ml	(-)	(+)	(-)	KT sau 24 h

	Kiểm tra lại sau 48 h thấy trực khuẩn mọc cả ở 3 ống
--	--

NGÀY THỬ: 08/09/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 30%

CHUNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 1 GIỜ 40'			GHI CHÚ
Bào tử Than	01 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 24 h không mọc
	Kiểm tra lại sau 48 h thấy trực khuẩn mọc cả ở 3 ống				

NGÀY THỬ: 09/09/03

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,5 °C

NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 30%

CHUNG THỬ	NỒNG ĐỘ HC	KẾT QUẢ THỬ SAU THỜI GIAN 1 GIỜ 20'			GHI CHÚ
Bào tử Than	1,2 ml	(-)	(-)	(-)	KT sau 24 h không mọc
	Kiểm tra lại sau 48h thấy trực khuẩn mọc cả ở 3 ống				

NHIỆT ĐỘ TRONG BOX THỬ: 30,1 °C
 NỒNG ĐỘ FOCMALDEHYDE 36%

Chủng thử	Ngày thử	Nồng độ HC	Thời gian (giờ)	Kết quả	Ghi chú
Bào tử Than	17/10/03	1ml	1h 50'	3/ 3 (+)	
	21/10/03	2ml	1h	3/3 (+)	
	27/10/03	2ml	2h	(-)	âm tính đến ngày 03/11
			3h	(-)	
	28/10	3ml	1h	(-)	
			2h	(-)	

KẾT QUẢ KHỬ TRÙNG ĐẤT

Loại đất: đất cat, mùn, sét, hỗn hợp

Nồng độ bào tử than: 10^8 CFU / cm² bề mặt

Kích thước hộp: 10 cm x 20 cm x 10 cm = 2000 cm³ = 0,2 m³

Cách tiến hành: Phun 10^8 CFU / cm² bề mặt hộp đựng đất

lấy 1 g đất ở các vị trí khác nhau theo chiều sâu hoà đều với 1 ml nước muối sinh lý, lấy 10 µl dàn đều trên mặt thạch dinh dưỡng, ủ 37°C / 48- 72 giờ đọc kết quả (Chú ý ở mỗi chiều sâu cấy 2 –3 đĩa, sau đó tính CFU trung bình x hệ số = CFU/ g đất)

Ngày thử nghiệm 20/03/04

Điều kiện thử nghiệm:

Nhiệt độ 25-27°C

Nồng độ formaldehyde: 2%

TT	Loại đất	Chiều sâu (cm)	KL trung bình/ đĩa	CFU/ g đất	KL trung bình/ đĩa	CFU/ g đất
Thời gian khử trùng 4 giờ				Thời gian khử trùng 8 giờ		
1	Đất mùn	Bề mặt	2	200	2	200
		5	12	1200	45	4500
		10	4	400	20	2000
		15	5	500	10	1000
		20	3	300	7	700
2	Đất sét	Bề mặt	1	100	0	0
		5	1	100	0	0
		10	1	100	2	200
		15	0	0	6	600
		20	0	0	16	1600
3	Đất cát	Bề mặt	0	0	0	0
		5	0	0	0	0
		10	0	0	2	200
		15	15	1500	20	2000
		20	25	2500	50	5000
4	Đất hỗn hợp	Bề mặt	0	0	1	100
		5	0	0	1	100
		10	20	2000	9	900
		15	50	5000	25	2500
		20	50	5000	40	4000

Ngày thử nghiệm 17/04/04

Điều kiện thử nghiệm:

Nhiệt độ 25-27°C

Nồng độ formaldehyde: 2%

TT	Loại đất	Chiều sâu (cm)	KL trung bình/ đĩa	KL trung bình/ đĩa	KL trung bình/ đĩa
			Thời gian khử trùng 4 giờ	Thời gian khử trùng 8 giờ	Thời gian khử trùng 12 giờ
1	Đất mùn	Bề mặt	0	0	0
		5	0	1*	0
		10	270	0	0
		15	0	0	0
		20	0	0	0
2	Đất sét	Bề mặt	0	0	0
		5	0	0	0
		10	0	0	0
		15	0	0	0
		20	0	0	0
3	Đất cát	Bề mặt	0	0	0
		5	0	0	0
		10	0	2*	0
		15	0	0	0
		20	0	0	0
4	Đất hỗn hợp	Bề mặt	0	0	0
		5	0	0	0
		10	0	0	1*
		15	0	0	0
		20	0	0	0

Ghi chú: * = khuẩn lạc chỉ có trong 1 đĩa thạch/ 3 đĩa thử nghiệm ** số khuẩn lạc có trong 2/ 3 đĩa thạch.

kết quả diệt trực khuẩn than trên bề mặt bao bì polyethylen không thấm nước bằng hypochlorite

Cách tiến hành:

- Các chủng vi sinh vật: B. anthracis thể sinh dưỡng và bào tử được tăng sinh trên môi trường thạch cơ bản và thạch kiềm pH: 8,5 %, pha canh khuẩn với nước muối sinh lý có nồng độ 0,5 Macfarlan tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml. Dùng tăm bông vô trùng phết lên bề mặt các chất liệu với diện tích 5-10 cm²
- Pha dung dịch hypochlorite (6%), iodine và cloramin hoạt với các nồng độ khác nhau
- Nhúng toàn bộ bao bì đã gây nhiễm vào hoá chất
- Thời gian khử trùng trong thời gian 5 - 60 phút, độ ẩm 85%.
- Thử nghiệm được tiến hành ở điều kiện: Nhiệt độ phòng thí nghiệm 22- 25°C (bao gồm cả dung dịch hoá chất và bao bì đựng thực phẩm)

Đánh giá kết quả:

- Sử dụng tăm bông lấy mẫu trên diện tích 1cm² cấy vào thạch dinh dưỡng
- Mẫu chứng dương: thay dung dịch khử trùng bằng nước muối sinh lý

Hoá chất	Nồng độ hoá chất (%=ppm/cm ²)	trực khuẩn than (sinh dưỡng) sống sót /cm ²		% bào tử sống sót/ cm ²	
		Sau 30'	Sau 60'	Sau 30'	Sau 60'
HYP- 6 (NaOCl) pH: 7,0 T°C: 22°C	100 (0,01%)	$6,555 \times 10^6$	$1,955 \times 10^6$	$5,214 \times 10^7$	$1,1055 \times 10^7$
	500 (0,05%)	00	00	$1,5 \times 10^4$	00
	5.000 (0,5 %)	00	00	$1,5 \times 10^4$	00
	10.000 (1%)	00	00	00	00

kết quả diệt vi khuẩn thương hàn trên bề mặt bao bì bằng dung dịch hypochlorite, iodine và QACs

Nhiệt độ thử nghiệm 22°C		Thời gian 10 phút		Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland	
Bề mặt vật liệu thử nghiệm		Vi khuẩn sống sót trung bình trong 3 đĩa Dung dịch khử trùng Hypochlorite(HYPO)			
Nồng độ clo hoạt tính ppm	50 ppm (0,005%)	100 ppm (0,01%)	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1%)	
Kim loại	1,992 x10 ⁷	5,4 x 10 ⁵	00	00	
Nhựa tổng hợp	8,133 x 10 ⁷	5,2905 x 10 ⁷	2,349 x10 ⁷	1,104 x 10 ⁷	
Thủy tinh	8,055 x 10 ⁶	2,22 x 10 ⁶	00	00	
Chất liệu		Vi khuẩn sống sót trung bình trong 3 đĩa diệt khuẩn bằng iodine			
Nồng độ hoá chất	10 ppm (0,001%)	50 ppm (0,005%)	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1%)	
Kim loại	8,055 x 10 ⁶	00	00	00	
Nhựa tổng hợp	1,092 x10 ⁷	2,1 x10 ⁶	00	00	
Thủy tinh	4,92 x10 ⁶	00	00	00	
Chất liệu bao bì		diệt khuẩn bằng QACs (hợp chất amonium bậc 4 (NH ₄). Số lượng vi khuẩn sống sót			
Nồng độ hoá chất	500 ppm (0,05%)	1000 ppm (0,1 %)	10.000 ppm (1%)	100.000 ppm (10 %)	
Kim loại	8,1 x10 ⁵	00	00	00	
Nhựa tổng hợp	4,1 x10 ⁷	5,64 x10 ⁶	4,8 x 10 ⁵	00	
Thủy tinh	00	00	00	00	

KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG DIỆT KHUẨN BẰNG CLO HOẠT TÍNH:

Pha loãng nồng độ hoá chất theo tỷ lệ nồng độ chlorine hoạt tính của chế phẩm do Phân viện Phòng chống vũ khí NBC sản xuất (tên thương mại là bột 3/2) có thành phần clo hoạt động là 40%.

- Tiến hành xác định nồng độ như sau:

+ Cân 10 g chế phẩm trộn đều với 10 ml nước cất vô trùng có nồng độ clo hoạt là 40%.

+ Pha loãng bậc 2 liên tiếp có nồng độ clo là 20%, 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%, 0,3125 %...

+ Xác định khoảng nồng độ diệt khuẩn theo từng loại vi khuẩn và đặc tính cấu trúc tế bào cũng như khả năng kháng chất diệt khuẩn của từng loại, sau đó tiến hành pha loãng tiếp trong khoảng để xác định nồng độ diệt và ức chế vi khuẩn .

+Xác định số lượng vi khuẩn mọc trên đĩa thạch bằng cách lấy tăm bông vô trùng thấm nước muối sinh lý di đều trên 1 cm² bề mặt chất liệu đã khử trùng cấy vào thạch dinh dưỡng, ủ 370C/ 24- 48 giờ, đếm số khuẩn lạc trên đĩa, cũng làm tương tự với mẫu chứng dương khi không có hoá chất tiết trùng.

- Nồng độ vi khuẩn gây nhiễm bề mặt:

+ 0,5 Macfaland tương đương với $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml

kết quả diệt trực khuẩn than trên bề mặt các chất liệu bao bì bảo quản lương thực, thực phẩm bằng dung dịch clo hoạt tính

Vật liệu khử trùng	trực khuẩn than thể bào tử sống sót/ cm2			
Nhiệt độ thử nghiệm 22 ⁰ C		Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland		
Thời gian (Tm)	Sau 5 phút			
Nồng độ clo hoạt tính ppm	12500ppm (1,25 %)	25.000 ppm (2,5 %)	50.000 ppm (5 %)	100.000 ppm (10 %)
Kim loại	6,6 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁵	2,85 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵
Nhựa tổng hợp	8,358 x 10 ⁷	4,0095 x 10 ⁷	1,989 x 10 ⁷	1,1295 x 10 ⁶

Thủy tinh	$5,25 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	00	00
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 10 phút</i>			
Kim loại	$1,05 \times 10^5$	00	00	00
Nhựa tổng hợp	$7,95 \times 10^5$	$2,55 \times 10^5$	00	00
Thủy tinh	00	00	00	00
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 15 phút</i>			
Kim loại	00	00	00	00
Nhựa tổng hợp	00	00	00	00
Thủy tinh	00	00	00	00

kết quả khử trùng bề mặt bao bì nhiễm vi khuẩn S. typhi bằng clo hoạt tính

<i>Vật liệu khử trùng</i>	<i>Số lượng vi khuẩn thương hàn sống sót</i>				
<i>Nhiệt độ thử nghiệm 24 ° C</i>	<i>Nồng độ vi khuẩn 0,5 MacFaland</i>				
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 5 phút</i>				
<i>Nồng độ clo hoạt tính (ppm= %)</i>	<i>100 ppm (0,01%)</i>	<i>150 ppm (0,015%)</i>	<i>3.125 ppm (0,3125%)</i>	<i>6.250 ppm (0,65%)</i>	<i>12..500 ppm (1,25 %)</i>
Kim loại bề mặt nhấn (sữa hộp)	$2,16 \times 10^7$	$1,1655 \times 10^7$	$5,175 \times 10^6$	3×10^4	00
Nhựa tổng hợp	$6,5655 \times 10^7$	$2,076 \times 10^7$	$1,449 \times 10^7$	$1,095 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$

Thủy tinh	$1,1475 \times 10^7$	$8,055 \times 10^6$	$1,605 \times 10^6$	00	00
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 10 phút</i>				
Kim loại	$1,11 \times 10^7$	$8,655 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	00	00
Nhựa	$4,146 \times 10^7$	$1,869 \times 10^7$	$1,107 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	00
Thủy tinh	$7,92 \times 10^6$	$2,07 \times 10^6$	$9. 10^4$	00	00
<i>Thời gian (Tm)</i>	<i>Sau 15 phút</i>				
Kim loại	$7,92 \times 10^6$	$5,55 \times 10^5$	00	00	00
Nhựa tổng hợp	$1,182 \times 10^7$	$8,055 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5$	00	00
Thủy tinh	$1,14 \times 10^6$	00	00	00	00

TT	Loại đất	SỐ MẪU VI KHUẨN MỘC / TỔNG SỐ MẪU		
		10 phút	20 phút	30 phút
1	Đất cát	2/6	0/6	0/6
2	đất mùn	3/6	0/6	0/6
3	đất hỗn hợp	1/6	0/6	0/6
4	Đất thịt	2/6	0/6	0/6

* Chứng dương : mẫu đất không qua xử lý hấp uớt, sau khi bào tử gây nhiễm sau 24 giờ, lấy 1 g đất cấy thẳng vào canh thang BHI.

BẤT HOẠT BÀO TỬ TRỰC KHUẨN THAN

Đoàn Trọng Tuyên¹, Vũ Chiến Thắng² và cộng sự¹

1. Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội;
2. Phòng Vệ sinh Phòng dịch – Cục Quân y

ABSTRACT:

At poor living conditions Bacillus anthracis changes into forms of spores, that are very hardy bodies and can survive for very long time under hard environmental conditions. At suitable living conditions these spores change into vegetative forms. The ability of forming spores are very important for the dispersal mechanism of B.anthraxis.

The most common methods of destroying bacteria spores include of : physical and chemical methods. But each method has advantages and disadvantages depending on concentrations of infecting agents and the environmental factors as temperature, pH of used chemical, relative humidity...

In this report we provide a summary of results about researches of destroying B.anthraxis spores.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh than xảy ra ở nhiều khu vực khác nhau trên thế giới, gây bệnh cho động vật chủ yếu thuộc Châu Phi, Á châu Âu và nhiều khu vực khác. Bệnh có thể lây truyền cho cộng đồng dân cư nếu việc giám sát và kiểm soát không chặt chẽ, đặc biệt trong các thời kỳ chiến tranh thì B. anthracis thường được sử dụng như một tác nhân khủng bố sinh học vì độc tính cao, khả năng gây tử vong lớn, dễ sản xuất và tàng trữ, bền vững trong môi trường ngoại cảnh, phương thức lây truyền đa dạng và khó dự phòng và điều trị.

Thông thường động vật lây bệnh than cho động vật với tỷ lệ thấp. Hầu hết sự lây nhiễm bệnh từ động vật sang người là do tiêu hoá bào tử có trong thực phẩm, đất, nước, hoặc hít phải không khí bị ô nhiễm bào tử than và do tiếp xúc trực tiếp.

Bacillus anthracis là loài vi khuẩn thuộc họ Bacillaceae, loài bacillus. Vi khuẩn Gram (+), tạo vỏ, không di động, kỵ khí tùy ngộ, hình que kích thước (1-1,5 μm x 4-8 μm), tồn tại dạng bào tử khi tiếp xúc tồn tại ngoài không khí và môi trường ngoại cảnh không thuận lợi. Trục khuẩn than có khả năng sản xuất Capsule và độc tố, đây là yếu tố độc lực quyết định khả năng gây bệnh.

Khử trùng, tẩy uế tác nhân gây bệnh đã được nghiên cứu từ những năm 1930. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa xác định được qui trình chuẩn thức, nhất là qui trình khử trùng tác nhân sinh học bằng các phương pháp hoá học vì có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới các chất diệt bào tử như: sự thay đổi về thời gian, nhiệt độ, nồng độ hoá chất, độ ẩm của thử nghiệm phù hợp với từng nước khác nhau... Chính vì lý do này chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số phương pháp bất hoạt bào tử than trong môi trường đất, nước, không khí, thực phẩm phù hợp với điều kiện và khả năng hiện có ở nước ta.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tuyển chọn chủng

Bacillus anthracis được phân lập từ môi trường đất, tại khu vực Lai Châu, đã được chẩn đoán xác định bằng các kỹ thuật phân lập, miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (DFA:

Direct fluorescence assay) và không có các yếu tố độc lực phát hiện bằng kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction).

2.2. Mô hình thử nghiệm gây nhiễm bào tử than

2.2.1. Mô hình thử nghiệm bào tử than trong không khí

Được tiến hành trong buồng sinh học có chứa 1m³ không khí

- Máy phun dạng khí dung OMRON CX (Nhật bản) : sử dụng phun bào tử than vào buồng sinh học

- Tốc độ phun sao cho đạt 10⁹ CFU/ m³ không khí (Kiểm tra nồng độ vi khuẩn trong buồng sinh học bằng phương pháp R. Koch)

- Hoá chất khử trùng bào tử than: formaldehyde (36%)

2.2.2. Mô hình gây nhiễm bào tử than trong nước sinh hoạt

- Cho bào tử than vào 100 ml nước cất tiệt trùng để đạt nồng độ bào tử cuối cùng là 10⁶ CFU/ ml.

- Sử dụng canh khuẩn này để khử trùng bằng các phương pháp nhiệt hoặc sử dụng hoá chất để đánh giá.

- Hoá chất khử trùng nước: chlorine hoạt tính

2.2.3. Mô hình thử nghiệm bào tử than trên bao bì bảo quản thực phẩm, và thực phẩm

- Gây nhiễm bào tử than trên bề mặt 3 dạng bao bì bảo quản thực phẩm chủ yếu hiện nay đang sử dụng trong Quân đội (nhựa, kim loại và thuỷ tinh)

- Nồng độ bào tử gây nhiễm 1,5 x 10⁸ CFU / cm²

- Hoá chất khử trùng bề mặt: hypochlorite, QACs, các hợp chất chlorine hoạt tính

2.2.4. Mô hình gây nhiễm bào tử than trên môi trường đất

- Thử nghiệm được tiến hành trên các hộp chứa các loại đất (mùn, cát, sét, hỗn hợp) có kích thước thể 6.000 cm³ và diện tích bề mặt 200 cm²

- Pha canh khuẩn bào tử than có nồng độ 5 MacFaland /10 ml phun lên bề mặt đất, để có nồng độ cuối cùng là 10⁸ CFU/ cm²

- Đánh giá độ thẩm thấu của bào tử than với từng loại đất theo chiều sâu 5, 10, 15, 20, 25 cm.

- Hoá chất sử dụng trong thử nghiệm: formaldehyde

2.3. Các phương pháp bất hoạt bào tử than

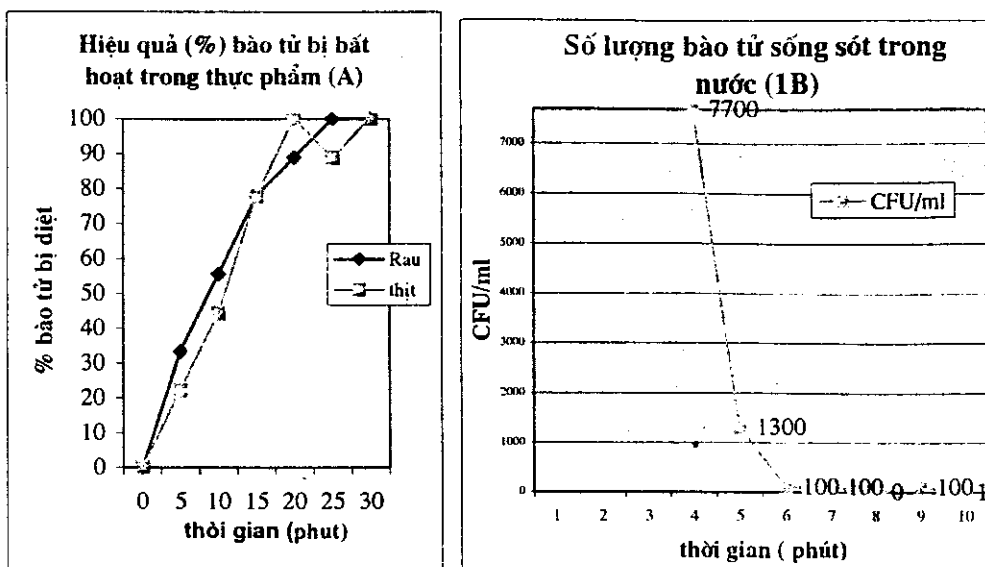
- Phương pháp nhiệt: Đun sôi 100°C, hấp ết bằng Autoclave, sấy khô

- Phương pháp khử trùng, tẩy uế bằng hoá chất: Xác định nồng độ hoá chất cần thiết bất hoạt bào tử than liên quan tới thời gian, nhiệt độ, độ ẩm, nồng độ vi khuẩn thử nghiệm, môi trường thử nghiệm ...

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả bất hoạt bào tử bằng phương pháp nhiệt

3.1.1. Kết quả bất hoạt bào tử bằng phương pháp đun sôi 100°C

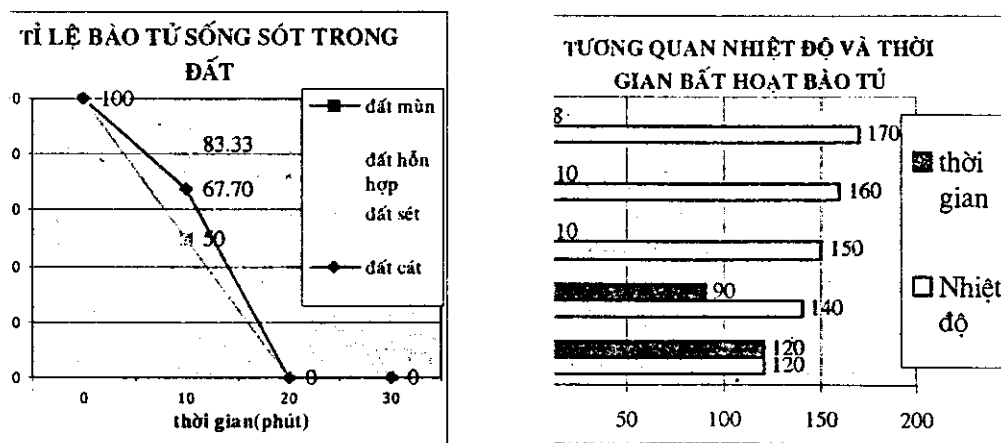


Hình 1. Tỷ lệ (%) bào tử Than bị bất hoạt (1A) và (1B) số lượng CFU/ml bào tử sống sót theo thời gian.

- Khử trùng thực phẩm dạng hữu cơ và rau thời gian cần thiết để bất hoạt 100 % bào tử từ 25 – 35 phút (nồng độ bào tử gây nhiễm $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml).

- Khử trùng nguồn nước nghi ô nhiễm bào tử than (nồng độ bào tử 10^6 CFU/ ml) thời gian cần thiết để bất hoạt bào tử là sau 10 phút tính từ thời điểm nhiệt độ đạt 100°C

3.1.2. Kết quả bất hoạt bào tử than bằng phương pháp hấp ố và sấy khô ở môi trường đất



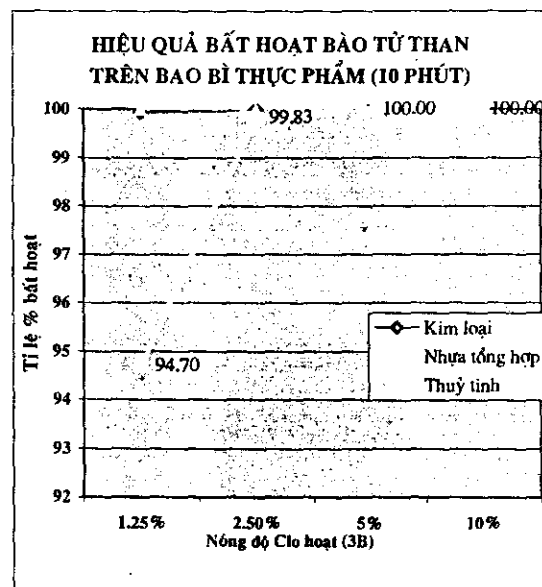
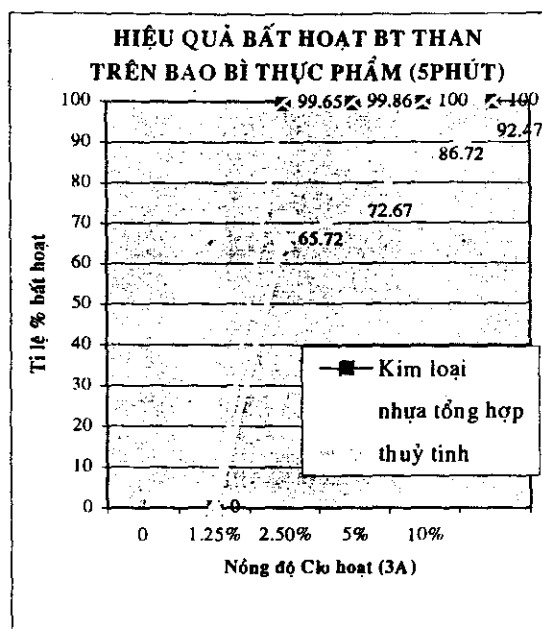
Hình 2. Khử trùng bào tử than trên 4 loại đất khác nhau bằng phương pháp hấp ố (2A) và tương quan giữa nhiệt độ và thời gian bất hoạt bào tử trong đất (2B).

Hình 2 A: Nồng độ bào tử trước khử trùng $1,5 \times 10^8$ CFU/ cm^2 bề mặt, sau thời gian 10 phút ở nhiệt độ 121°C , số lượng bào tử sống sót ở các loại đất có sự khác biệt, nhưng ở thời điểm 20 phút thì 100% bào tử bị bất hoạt

Hình 2B: Nồng độ bào tử từ 6×10^3 đến $1,2 \times 10^4$ CFU/ g đất, hiệu quả khử trùng bằng phương pháp sấy khô ở nhiệt 120°C – 140°C cần thời gian trên 90 phút, nếu ở nhiệt độ 150°C – 170°C cần thời gian 8- 10 phút.

3.2 Hiệu quả bất hoạt bào tử than bằng phương pháp hoá học

3.2.1. Bất hoạt bào tử bằng clo hoạt trên các loại chất liệu bao bì bảo quản thực phẩm



Hình 3. hiệu quả bất hoạt bào tử than trên bề mặt chất liệu bao bì bảo quản thực phẩm.

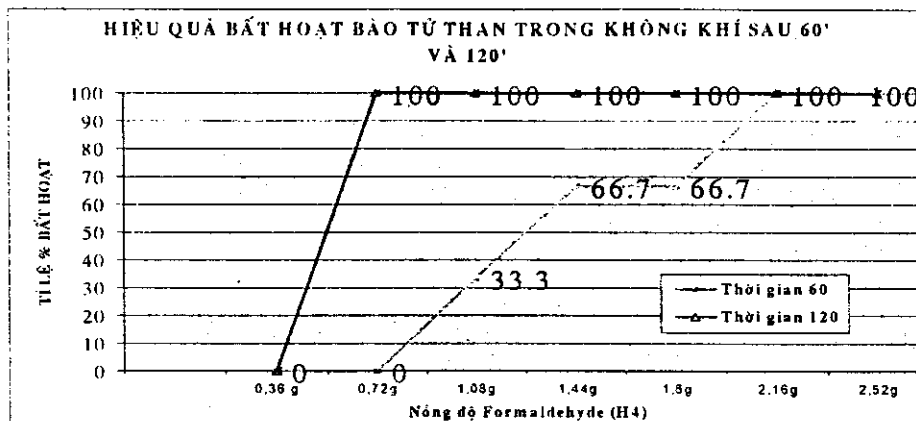
Hình 3 A: Hiệu quả khử trùng bào tử than bằng cloramin trong thời gian 5 –10 phút tiếp xúc, cần nồng độ 5%- 10% (50.000 ppm – 10.000 ppm)

Hình 3 B: Nếu sử dụng nồng độ 1,25% (12500ppm) khử trùng 10 phút chỉ có thể áp dụng với vật liệu bao bì bằng kim loại và thủy tinh.

- Nếu sử dụng nồng độ clo hoạt thấp nhất trong thử nghiệm là 1,25% để bất hoạt 100% bào tử, thời gian khử trùng cần thiết trên 15 phút.

3.2.2. kết quả bất hoạt bào tử than trong không khí và đất

Kết quả bất hoạt bào tử trong không khí bằng formaldehyde



Hình 4. Kết quả bất hoạt bào tử than trong không khí.

- Nồng độ 0,36g/ m³ không khí không diệt được bào tử, tối thiểu liều 0,72g/ m³ trong thời gian 2-3 giờ

- Nếu sử dụng khử trùng trong thời gian 1 giờ cần 2,52g = 7 ml formaldehyde (36%)

- Tốt nhất khử trùng ở liều từ 0,72 g đến 2,25g/ m³ không khí với thời gian 2-3 giờ.

Kết quả bất hoạt bào tử than trong môi trường đất bằng formadehyde

Bảng 1: Số lượng bào tử than sống sót sau khử trùng formalindehyde nồng độ 2% ở thời điểm 4 và 8 giờ. (Điều kiện thử nghiệm: Nhiệt độ: 25-27°C, Độ ẩm không khí: 85-86%)

Số bào tử sống sót/ g đất sau khử trùng formaldehyde (2%)								
Loại đất Thời gian KT	Đất cát		Đất mùn		Đất hỗn hợp		Đất sét	
	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ	4 giờ	8 giờ
Bề mặt	0	0	0	200	0	100	100	0
5cm	0	0	1200	4500	0	100	100	0
10 cm	0	200	400	2000	2000	900	0	200
15 cm	1500	200	500	1000	5000	2500	0	200
20 cm	250	5000	300	700	5000	4000	100	1600

Kết quả bảng trên cho thấy: Tẩy uế bào tử than trên môi trường đất ở nồng độ 2% formaldehyde không bất hoạt được bào tử than ở các độ sâu khác nhau và không đảm bảo lượng hoá chất tồn lu, biểu hiện ở thời gian sau 8 giờ tẩy uế số lượng trực khuẩn than cao hơn thời điểm sau khử trùng 4 giờ.

Bảng 2. Số lượng bào tử than sống sót sau khử trùng formaldehyde nồng độ 4 % ở thời điểm 4 , 8, 12 giờ.

(Điều kiện thử nghiệm: Nhiệt độ: 25-27°C, Độ ẩm không khí: 85-86%)

Số bào tử sống sót/ g đất sau khử trùng formaldehyde (4%)												
Loại đất	Đất cát			Đất mùn			Đất hỗn hợp			Đất sét		
Thời gian kT	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ	4 giờ	8 giờ	12 giờ
Bề mặt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5cm	0	0	0		1*	0	0	1*	0	0	0	0
10 cm	0	2*	0	270	0	0	160	3**	1*	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	2*	0	0	0	0
20 cm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: * = khuẩn lạc chỉ có trong 1 đĩa thạch/ 3 đĩa thử nghiệm ** số khuẩn lạc có trong 2/ 3 đĩa thạch.

Kết quả bảng trên cho thấy: Tẩy uế bào tử than trong đất bằng dung dịch formaldehyde nồng độ 4% bất hoạt hầu hết bào tử than trong thời gian 12 giờ và đảm bảo nồng độ hoá chất tồn dư tối thiểu ức chế bào tử phát triển.

4. BÀN LUẬN

Khử trùng, tẩy uế bất hoạt bào tử than trong đất, nước, không khí, thực phẩm là một lĩnh vực mới, khi tác chiến trong điều kiện nghi có tác nhân sinh học, thì hầu hết môi trường sống của con người bị ô nhiễm, do đó việc xử lý các tác nhân sinh học cần tiến hành đồng bộ với nhiều biện pháp khử trùng phù hợp với mục tiêu phù hợp với nhiệm vụ cụ thể đặt ra.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng giới thiệu nhng phương pháp khử trùng, tẩy uế đơn giản, dễ thực hiện với các hoá chất khử trùng thông có trong Quân đội, hoàn toàn có thể thực hiện trong điều kiện dã ngoại.

Phương pháp đun sôi là phương pháp đơn giản nhất nhưng chỉ có thể áp dụng trong các trường hợp khử trùng bào tử nghi ô nhiễm nguồn nước hay thực phẩm, theo

nguyên cứu của này bất hoạt bào tử trong nước tối thiểu 100°C trong thời gian 10 phút hoặc trong thực phẩm có nguồn gốc động vật hay thực vật thì thời gian cần thiết từ 25 phút- 30 phút. Theo tác giả Stain CD và Mrray TJ thì chỉ cần khử trùng trong thời gian 5 phút- 10 phút, ở đây có sự khác biệt do nồng độ bào tử trong nguyên cứu là từ 10^6 - $1,5 \times 10^8$ CFU/ml nước hoặc cm^2 thực phẩm so với 10^2 - 10^4 CFU/ ml của tác giả.

Khử trùng bằng phương pháp hấp ướt và sấy khô ở nhiệt độ cao thường được áp dụng đối với thực phẩm, nước hoặc đất nghi ô nhiễm bào tử than nhng ở phạm vi thể tích hạn chế, trong khi đó điều kiện để sử dụng hoạt động dã ngoại ít thực hiện vì cần phải có nồi autoclave hoặc tủ sấy nhiệt độ cao, phương pháp này thường được sử dụng trong khử trùng các dụng cụ trong các labo chuyên ngành hoặc dụng cụ thiết bị bệnh viện, phương pháp này áp dụng cho các đội chuyên xử lý khử trùng, tẩy uế thuộc hệ thống chuyên ngành y tế dự phòng. Trong nghiên cứu này, kết quả nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu của Scheneiter .R khẳng định rằng nhiệt độ khử trùng càng cao thì thời gian khử trùng càng ngắn, nhng tối thiểu sử dụng phương pháp hấp ướt thì tốt nhất $121^{\circ}\text{C}/20$ phút hoặc sấy khô từ 150°C - $170^{\circ}\text{C}/10$ phút đối với môi trường đất ô nhiễm.

Khử trùng, tẩy bằng hoá chất thông thường là chlorine và các hợp chất của nó thường được sử dụng rộng rãi nhất là khử trùng nước, khử trùng bề mặt các loại vật liệu nghi ô nhiễm bào tử than, ít khi sử dụng clo để khử trùng không khí và đất vì ít có hiệu quả do clo bị ức chế bởi môi trường có nhiều chất hữu cơ. Hiện nay một số tên hoá chất có thành phần clo NaOCl, như

Tên hoá chất	Nồng độ clo hoạt tính
Calci hypochlorit	70%
Chlorua vôi ($\text{CaClOH} \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	30%
Natri hypochlorit NaOCl	5,25% (dạng dung dịch)
Monochloramin, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NNaCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	25%
Dichloramin B, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NCl}_2$, (60%)	60%
Dichloramin T, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NCl}_2$,	60%
Hexachlormelamin, $\text{C}_3\text{N}_6\text{Cl}_6$, (10%)	10%

Trong nghiên cứu này nồng độ clo hoạt 1,25% có thể bất hoạt từ 94,7 %- 99,6 % bào tử trên các loại vật liệu khác nhau trong thời gian 5- 10 phút, trong khi đó Brazia.A sử dụng nồng độ 2,3- 2,4 mg/ lít bất hoạt được 99,99% bào tử trong thời gian 1 giờ, hay Sagripanti.J sử dụng hypochlorite có nồng độ 0,05% PH 7,2, nhiệt độ 220°C bất hoạt được 99,99% bào tử nhng ở pH 11 chỉ bất hoạt được 50 % trong thời gian 30 phút, do đó khi pha dung dịch clo để khử trùng nên sử dụng dung dịch mẹ ở pH kiềm để bền vững, khi sử dụng điều chỉnh pH tốt nhất là trung tính để tăng khả năng hoạt động của clo.

Các loại hoá chất khử trùng, tẩy uế bào tử trong môi trường không khí và đất thông thường được áp dụng nhiều trên thế giới như: formalin, formaldehyde, glutandehyde.. hay ethylene oxide nhng phần lớn dạng gas dễ gây cháy nổ, điều kiện mang vác không thuận lợi. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng thấy hiệu quả cao của formaldehyde xông hơi nồng độ 2,16 g/ m^3 không khí trong thời gian 60 phút, hoặc trên 0,72 g/ m^3 trong thời gian 120 phút ở các điều kiện nhiệt độ 30 - 35°C bất hoạt được 100% bào tử than, Munro.K và Young LS khử trùng với nồng độ 18 mg- 21 ml/ l để khử trùng labo.

Đặc biệt nhất là việc xử lý ô nhiễm bào tử trong đất bằng formaldehyde, kết quả của chúng tôi xác định nồng độ cần thiết trên 4% có thể bất hoạt được 99% - 100% bào tử bề mặt và độ sâu đến 20 cm và với mỗi loại đất có sự tương quan giữa nồng độ hoá chất với điều kiện khử trùng khác.

Có rất nhiều qui trình thử nghiệm với nhiều loại hoá chất khác nhau, nhưng cho tới nay không có một qui trình chuẩn thức nào chung, vì mỗi quốc gia điều kiện môi trường, yếu tố vật lý (nhiệt độ, độ ẩm...), nồng độ bào tử, do đó mỗi nước phải xây dựng qui trình khử trùng mầm bệnh độc hại phù hợp với điều kiện đặc thù riêng của mỗi quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stain CD, rdgers.H: Observations on the resistance of anthrax spores to heat, Veterinaty madicine 1945; 40: 457- 467
2. Murray TJ : thermal death point; journal infection and disease; 1961; 48: 406- 410
3. Schneiter R, Kolb RW : heat resistance studies with spores of bacillus anthracis 1945; public health; supplemant 207; 1-24
4. Brazis A, Leslic J; The inactivation of spores of bacillus anthracis by free available chlorine, appl Microbiol 1958;;6; 338-342
5. sagripanti J, bonifacino A : Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. Appl environ microbial 1996; 62; 545-551
6. Munro K: Comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological safety cabinets. Appl environ microbial 1999, 65, 873- 876
7. Young LS: Vaporized formaldehyde treatement of a textile mill contaminated with B. anthracis. J.Appl bacteriology 1990; 68; 461- 469