

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 10736-17:2017
ISO 16000-17:2008**

**KHÔNG KHÍ TRONG NHÀ - PHẦN 17:
PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM NẤM MỐC -
PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY**

Indoor air - Part 17: Detection and enumeration of moulds - Culture-based method

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 10736-17:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 16000-17:2008.

TCVN 10736-17:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 146 *Chất lượng không khí* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 10736 (ISO 16000) *Không khí trong nhà* gồm các phần sau:

- TCVN 10736-1:2015 (ISO 16000-1:2004) *Phần 1: Các khía cạnh chung của kế hoạch lấy mẫu;*
- TCVN 10736-2:2015 (ISO 16000-2:2004) *Phần 2: Kế hoạch lấy mẫu formaldehyt;*
- TCVN 10736-3:2015 (ISO 16000-3:2011) *Phần 3: Xác định formaldehyt và hợp chất cacbonyl khác trong không khí trong nhà và không khí trong buồng thử – Phương pháp lấy mẫu chủ động;*
- TCVN 10736-4:2015 (ISO 16000-4:2011) *Phần 4: Xác định formaldehyt – Phương pháp lấy mẫu khuếch tán;*
- TCVN 10736-5:2015 (ISO 16000-5:2007) *Phần 5: Kế hoạch lấy mẫu đối với hợp chất hữu cơ bay hơi (VOC);*
- TCVN 10736-6:2016 (ISO 16000-6:2011) *Phần 6: Xác định hợp chất hữu cơ bay hơi trong không khí trong nhà và trong buồng thử bằng cách lấy mẫu chủ động trên chất hấp phụ Tenax TA®, giải hấp nhiệt và sắc ký khí sử dụng MS hoặc MS-FID;*
- TCVN 10736-7:2016 (ISO 16000-7:2007) *Phần 7: Chiến lược lấy mẫu để xác định nồng độ sợi amiăng truyền trong không khí;*
- TCVN 10736-8:2016 (ISO 16000-8:2007) *Phần 8: Xác định thời gian lưu trung bình tại chỗ của không khí trong các tòa nhà để xác định đặc tính các điều kiện thông gió;*
- TCVN 10736-9:2016 (ISO 16000-9:2006) *Phần 9: Xác định phát thải của hợp chất hữu cơ bay hơi từ các sản phẩm xây dựng và đồ nội thất – Phương pháp buồng thử phát thải;*
- TCVN 10736-10:2016 (ISO 16000-10:2006) *Phần 10: Xác định phát thải của hợp chất hữu cơ bay hơi từ các sản phẩm xây dựng và đồ nội thất – Phương pháp ngăn thử phát thải;*
- TCVN 10736-11:2016 (ISO 16000-11:2006) *Phần 11: Xác định phát thải của hợp chất hữu cơ bay hơi từ các sản phẩm xây dựng và đồ nội thất – Lấy mẫu, bảo quản mẫu và chuẩn bị mẫu thử;*
- TCVN 10736-12:2016 (ISO 16000-12:2008) *Phần 12: Chiến lược lấy mẫu đối với polycloro biphenyl (PCB), polycloro dibenzo-p-dioxin (PCDD), polycloro dibenzofuran (PCDF) và hydrocacbon thơm đa vòng (PAH);*
- TCVN 10736-13:2016 (ISO 16000-13:2008) *Phần 13: Xác định tổng (pha khí và pha hạt) polycloro biphenyl giống dioxin (PCB) và polycloro dibenzo-p-dioxin/polycloro dibenzofuran (PCDD/PCDF) – Thu thập mẫu trên cái lọc được hỗ trợ bằng chất hấp phụ;*
- TCVN 10736-14:2016 (ISO 16000-14:2009) *Phần 14: Xác định tổng (pha khí và pha hạt) polycloro biphenyl giống dioxin (PCB) và polycloro dibenzo-p-dioxin/polycloro dibenzofuran (PCDD/PCDF) – Chiết, làm sạch và phân tích bằng sắc ký khí phân giải cao và khối phổ.*
- TCVN 10736-15:2017 (ISO 16000-15:2008) *Phần 15: Cách thức lấy mẫu nitơ dioxit (NO₂).*

TCVN 10736-17:2017

- TCVN 10736-16:2017 (ISO 16000-16:2008) *Phần 16: Phát hiện và đếm nấm mốc – Lấy mẫu bằng cách lọc.*
- TCVN 10736-17:2017 (ISO 16000-17:2008) *Phần 17: Phát hiện và đếm nấm mốc – Phương pháp nuôi cấy.*
- TCVN 10736-18:2017 (ISO 16000-18:2011) *Phần 18: Phát hiện và đếm nấm mốc – Lấy mẫu bằng phương pháp va đập.*
- TCVN 10736-19:2017 (ISO 16000-19:2012) *Phần 19: Cách thức lấy mẫu nấm mốc.*
- TCVN 10736-20:2017 (ISO 16000-20:2014) *Phần 20: Phát hiện và đếm nấm mốc – Xác định số đếm bào tử tổng số.*
- TCVN 10736-21:2017 (ISO 16000-21:2013) *Phần 21: Phát hiện và đếm nấm mốc – Lấy mẫu từ vật liệu.*
- TCVN 10736-23:2017 (ISO 16000-23:2009) *Phần 23: Thử tính năng để đánh giá sự giảm nồng độ formaldehyt do vật liệu xây dựng hấp thu.*
- TCVN 10736-24:2017 (ISO 16000-24:2009) *Phần 24: Thử tính năng để đánh giá sự giảm nồng độ hợp chất hữu cơ bay hơi (trừ fomaldehyt) do vật liệu xây dựng hấp thu.*
- TCVN 10736-25:2017 (ISO 16000-25:2011) *Phần 25: Xác định phát thải của hợp chất hữu cơ bán bay hơi từ các sản phẩm xây dựng – Phương pháp buồng thử nhỏ.*
- TCVN 10736-26:2017 (ISO 16000-26:2012) *Phần 26: Cách thức lấy mẫu cacbon dioxit (CO₂)*
- TCVN 10736-27:2017 (ISO 16000-27:2014) *Phần 27: Xác định bụi sợi lắng đọng trên bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) (phương pháp trực tiếp)*
- TCVN 10736-28:2017 (ISO 16000-28:2012) *Phần 28: Xác định phát thải mùi từ các sản phẩm xây dựng sử dụng buồng thử.*
- TCVN 10736-29:2017 (ISO 16000-29:2014) *Phần 29: Phương pháp thử các thiết bị đo hợp chất hữu cơ bay hơi (VOC).*
- TCVN 10736-30:2017 (ISO 16000-30:2014) *Phần 30: Thử nghiệm cảm quan của không khí trong nhà.*
- TCVN 10736-31:2017 (ISO 16000-31:2014) *Phần 31: Đo chất chống cháy và chất tạo dẻo trên nền hợp chất phospho hữu cơ-este axit phosphoric.*
- TCVN 10736-32:2017 (ISO 16000-32:2014) *Phần 32: Khảo sát tòa nhà để xác định sự xuất hiện của các chất ô nhiễm.*
- TCVN 10736-33:2017 (ISO 16000-33:2017) *Phần 33: Xác định phtalat bằng sắc ký khí/khối phổ (GC/MS).*

Lời giới thiệu

Nấm mốc là tên thông thường của nấm sợi từ các nhóm phân loại khác nhau (Ascomycota, Zygomycota và các tên gọi khác trước đây như Deuteromycota hoặc nấm bất toàn). Chúng tạo thành sợi nấm và các bào tử. Hầu hết các bào tử nằm trong khoảng kích thước từ 2 μm đến 10 μm , một số lên đến 30 μm và chỉ vài loài đến 100 μm . Bào tử của một số chi nấm mốc rất nhỏ và rất dễ phát tán vào không khí (ví dụ *Aspergillus*, *Penicillium*), trong khi các chi khác lớn hơn và/hoặc chìm trong chất lỏng (ví dụ *Stachybotrys*, *Fusarium*) và ít di động.

Các bào tử nấm mốc được phân tán rộng rãi trong môi trường ngoài trời, do đó xuất hiện trong không khí trong nhà với các nồng độ khác nhau. Tuy nhiên sự phát triển nấm mốc trong môi trường trong nhà được coi là một vấn đề vệ sinh vì các nghiên cứu dịch tễ học đã cho thấy rằng có ẩm ướt và/hoặc nấm mốc trong nhà và các vấn đề sức khỏe của cư dân có liên quan chặt chẽ với nhau.

Các phương pháp tiêu chuẩn đối với việc lấy mẫu, phát hiện và định lượng nấm mốc bao gồm các tiêu chuẩn về cách thức lấy mẫu là rất quan trọng đối với việc đánh giá so sánh các vấn đề nấm mốc trong nhà. Trước khi thực hiện phép đo bất kỳ cần thực hiện kế hoạch đo.

Tiêu chuẩn này mô tả các phương pháp lấy mẫu không khí bào tử nấm mốc để phân tích vi tiếp theo.

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa trên VDI 4253-2^[5] và các phần của VDI 4300-10^[6].

Không khí trong nhà –

Phần 17: Phát hiện và đếm nấm mốc – Phương pháp nuôi cấy

Indoor air –

Part 17: Detection and enumeration of moulds – Culture-based method

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn liên quan đến người sử dụng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các qui tắc an toàn, sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn quy định phương pháp phát hiện và định lượng nấm mốc bằng cách nuôi cấy sau khi lấy mẫu bằng phương pháp va đập theo TCVN 10736-18 (ISO 16000-18) hoặc bằng cách lọc theo TCVN 10736-16 (ISO 16000-16). Phương pháp này cũng thích hợp để nuôi cấy nấm mốc từ dung dịch huyền phù mẫu thử hoặc từ phương pháp đồ đĩa trực tiếp.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 9716 (ISO 8199) *Chất lượng nước - Hướng dẫn chung về định lượng vi sinh vật bằng nuôi cấy*

TCVN 10736-16 (ISO 16000-16), *Không khí trong nhà – Phần 16: Phát hiện và định lượng nấm mốc - Lấy mẫu bằng phương pháp lọc*

TCVN 10736-18 (ISO 16000-18), *Không khí trong nhà – Phần 18: Phát hiện và định lượng nấm mốc - Lấy mẫu bằng phương pháp va đập*

3 Thuật ngữ, định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Nấm sợi (filamentous fungus)

Nấm phát triển dưới dạng các sợi tế bào.

CHÚ THÍCH 1: Các sợi dính vào nhau được gọi là hệ nấm sợi.

CHÚ THÍCH 2: Thuật ngữ "nấm sợi" khác với sợi nấm men.

[TCVN 10736-16:2017 (ISO 16000-16):2008]

3.2

Lọc (filtration)

Việc thu lấy các hạt lơ lửng trong môi trường khí hoặc lỏng bằng cách cho đi qua vật liệu xốp.

[EN 13098:2000⁴⁾]

CHÚ THÍCH: Trong tiêu chuẩn này việc lọc được hiểu là tách các vi sinh vật hoặc nấm mốc ra khỏi một thể tích xác định của không khí bằng phương tiện lọc.

3.3

Phương pháp gián tiếp (indirect method)

<Chất lượng không khí> tái huyền phù các vi sinh vật kết lắng với đồ đĩa trực tiếp trên môi trường nuôi cấy thích hợp, ủ và đếm khuẩn lạc phát triển trong các điều kiện được chọn.

3.4

Đơn vị hình thành khuẩn lạc, cfu (colony forming unit)

Đơn vị biểu thị số lượng vi sinh vật có thể cấy được.

[EN 13098:2000⁶⁾]

CHÚ THÍCH 1: Một đơn vị hình thành khuẩn lạc có thể bắt nguồn từ một vi sinh vật, từ tập hợp của nhiều vi sinh vật cũng như từ một hoặc nhiều vi sinh vật dính vào một hạt.

CHÚ THÍCH 2: Số lượng khuẩn lạc có thể phụ thuộc vào các điều kiện nuôi cấy.

3.5

Nuôi cấy (cultivation)

<chất lượng không khí> sự phát triển của vi sinh vật trên môi trường nuôi cấy.

[TCVN 10736 -16:2017 (ISO 16000-16:2008)]

3.6

Vi sinh vật (microorganism)

Mọi thực thể vi sinh, có tế bào hoặc không có tế bào có thể tái tạo hoặc di truyền hoặc các thực thể bị mất các đặc tính của chúng.

[EN 13098:2000^[4]]

3.7

Chỉ thị độ ẩm (moisture indicator)

<Chất lượng không khí> nấm mốc trong môi trường trong nhà ưa thích độ ẩm tương đối cao để phát triển và do đó, nấm mốc là chỉ thị các vấn đề về độ ẩm.

3.8

Khuẩn lạc thứ cấp (secondary colony)

Khuẩn lạc không có nguồn gốc từ việc lấy mẫu "ban đầu" các bào tử có trong không khí, mà từ một bào tử được giải phóng ra từ một khuẩn lạc phát triển trên các đĩa thạch

3.9

Nấm mốc (mould)

<chất lượng không khí> Nấm sợi từ một vài nhóm phân loại Zygomycete, Ascomycete (Asmycota) và Deuteromycete (nấm bất toàn)

CHÚ THÍCH: Nấm mốc hình thành các dạng bào tử khác nhau phụ thuộc vào nhóm phân loại của chúng, gọi là bào tử hạt dính (hạt dính), cuống túi bào tử hoặc nang bào tử.

[TCVN 10736-16:2017 (ISO 16000-16:2008)]

4 Nguyên tắc

Các đĩa thạch (thạch DG18 và thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây) thu được từ việc lấy mẫu và đập được ủ trực tiếp ở $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Cải lọc thu được từ việc lấy mẫu bằng phương pháp lọc được hòa lại vào dung dịch nước muối (NaCl 0,9 % khối lượng) với 0,01 % polysorbate 80¹⁾. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân của huyền phù và và cấy đều các thể tích này lên thạch DG18 cũng như lên thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây (phương pháp gián tiếp). Các đĩa thạch được ủ ở $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Đối với các mục đích đặc biệt, các đĩa này có thể được ủ ở $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (ví dụ *Aspergillus* spp. chịu nhiệt) hoặc $(45 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (*Aspergillus fumigatus*).

Sau khi ủ, nhận biết và đếm các khuẩn lạc mốc. Mức độ nhận biết phụ thuộc vào mục tiêu của việc điều tra.

¹⁾ Polysorbate 80 tương đương với polyoxyethylenesorbitan monooleat hoặc polyethylen glycol sorbitan monooleat. Tween là một ví dụ về một sản phẩm phù hợp sẵn có. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh vật và cụ thể như sau.

- 5.1 Tủ ấm, không rung, kiểm soát nhiệt độ ổn định ở $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$.
- 5.2 Tủ ấm, không rung, kiểm soát nhiệt độ ổn định ở $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
- 5.3 Tủ ấm, không rung, kiểm soát nhiệt độ ổn định ở $(45 \pm 2) ^\circ\text{C}$.
- 5.4 Tủ lạnh, kiểm soát nhiệt độ ổn định ở $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.
- 5.5 Máy đo pH, có độ chính xác ở $\text{pH} \pm 0,1$ đơn vị.
- 5.6 Tủ an toàn sinh học, cấp II, để bảo vệ người sử dụng và sản phẩm.
- 5.7 Bể điều nhiệt, có khả năng duy trì ở $35 ^\circ\text{C}$ đến $40 ^\circ\text{C}$ có bộ phận rung lắc.
- 5.8 Bộ lắc ống nghiệm, ví dụ bộ lắc Vortex²⁾.
- 5.9 Đĩa Petri vô trùng, có lỗ thông khí, đường kính khoảng 90 mm.
- 5.10 Nồi hấp sấy, khả năng hoạt động ở $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$ và ở $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

6 Môi trường nuôi cấy và chất pha loãng

Sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, có thể sử dụng các loại khác nếu cho kết quả tương tự và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

Sử dụng các cơ chất khô bán sẵn trên thị trường nếu phù hợp với mô tả quy định và phải được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.1 Thạch dicloran 18 % glycerol (thạch DG18)

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 1.

²⁾ Ví dụ về một sản phẩm thương mại có bán sẵn Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Các sản phẩm tương đương có thể sử dụng nếu chúng cho kết quả như nhau.

Bảng 1 - Thành phần của thạch dicloran 18 % glycerol (thạch DG18)

Thành phần	Khối lượng
Pepton ³	5,0 g
Glucose	10,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dicloran (2,6-diclo-4-nitroanilin) 0,2 % thể tích trong etanol	1,0 ml ^a
Chloramphenicol	0,1 g
Glycerol	220 g ^b
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml
^a Nồng độ cuối cùng trong môi trường: 0,002 g/l.	
^b 18 % phần khối lượng của 1 220 g khối lượng cuối cùng = 220 g.	

Bổ sung các thành phần với lượng nhỏ và thạch vào khoảng 800 ml nước và hòa tan bằng cách đun sôi. Thêm nước đến 1 000 ml và thêm 220 g glycerol. Tiệt trùng trong nồi hấp sấy ở $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong (15 ± 1) min. Sau khi khử trùng, pH phải là $5,6 \pm 0,2$ ở 25°C . Phân phối các lượng khoảng 20 ml vào các đĩa Petri.

Giữ các đĩa thạch DG18 để trong túi ở nhiệt độ $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ nơi tối sẽ giữ được một tuần.

Thạch DG18 có hoạt độ nước giảm. Cần thận để tránh giảm tiếp hoạt độ nước do bị khô vì điều này có thể ngăn cản sự phát triển của nấm mốc trên môi trường thạch này.

CHÚ THÍCH: Thạch DG18 thích hợp cho việc phát hiện một phổ rộng các nấm mốc ưa khô (nghĩa là nấm ưa thích khô). Glycerol làm giảm hoạt độ nước, $a_{\text{H}_2\text{O}}$, đến 0,95. Cloramphenicol ức chế vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn gram âm. Dicloran ức chế sự lây lan các khuẩn lạc nấm mốc phát triển nhanh và do đó ngăn ngừa mọc lan các khuẩn lạc phát triển chậm.

6.2 Thạch chất chiết malt

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 2.

Bảng 2 - Thành phần của thạch chất chiết malt

Thành phần	Khối lượng
Chất chiết malt	30,0 g
Pepton từ đậu tương	3,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

³) Các pepton khác nhau được sử dụng bởi các nhà sản xuất khác nhau (ví dụ casein pepton, pepton nấm). Điều này thường không ảnh hưởng đến kết quả định lượng của các phép đo, nhưng có thể có ảnh hưởng đến vẻ bề ngoài của các khuẩn lạc. Các kiểm chứng dương tính để so sánh độ thu hồi và so sánh hình thái của các khuẩn lạc là rất quan trọng.

CHÚ THÍCH: Có thể cần bổ sung Chloramphenicol (0,05 g/l) nếu mẫu chứa nồng độ cao các vi khuẩn. Điều này thường không phải là trường hợp đối với các mẫu không khí trong nhà nhưng vi khuẩn có thể có mặt với số lượng lớn trong các mẫu vật liệu và bụi.

Bổ sung các thành phần và thạch vào nước và hòa tan bằng cách đun sôi. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở $(115 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong (10 ± 1) min. Sau khi khử trùng, pH phải là $5,5 \pm 0,2$ ở 25°C . Phân phối các lượng khoảng 20 ml vào các đĩa Petri.

Giữ các đĩa thạch chất chiết malt trong túi ở nhiệt độ $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ nơi tối sẽ giữ được một tháng.

Trên thị trường có nhiều loại thạch chất chiết malt với các thành phần khác nhau. Cần đảm bảo rằng các thạch này có thành phần tương ứng với thành phần nêu trên.

6.3 Thạch dextrose khoai tây

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 3.

Bảng 3 - Thành phần thạch dextrose khoai tây

Thành phần	Khối lượng
Chất chiết khoai tây	4,0 g
Glucose	20,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

CHÚ THÍCH: Có thể cần bổ sung cloramphenicol (0,05 g/l) nếu mẫu chứa nồng độ cao các vi khuẩn.

Bổ sung các thành phần và thạch vào nước và hòa tan bằng cách đun sôi. Khử trùng trong nồi hấp sấy ở $(115 \pm 3)^\circ\text{C}$ (10 ± 1) min. Sau khi khử trùng, pH phải là $5,6 \pm 0,2$ ở 25°C . Phân phối các lượng khoảng 20 ml vào các đĩa Petri.

Giữ các đĩa thạch dextrose khoai tây để trong túi ở nhiệt độ $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ nơi tối sẽ giữ được một tuần.

6.4 Dung dịch nước muối

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 4.

Bảng 4 - Thành phần của dung dịch nước muối

Thành phần	Khối lượng
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 ml

Hòa tan NaCl trong nước và khử trùng trong nồi hấp sấy ở $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong (15 ± 1) min.

6.5 Dung dịch nước muối với polysorbate 80

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 5.

Bảng 5 – Thành phần của dung dịch nước muối với polysorbate 80

Thành phần	Khối lượng
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Polysorbate 80	0,1 g
Nước	1 000 ml

Hòa tan NaCl trong nước và khử trùng trong nồi hấp ở $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong (15 ± 1) min. Để nguội và thêm polysorbate 80.

7 Cách tiến hành

7.1 Yêu cầu chung

Các mẫu được phân tích là các đĩa thạch được lấy mẫu bằng phương pháp va đập theo TCVN 10736-18 (ISO 16000-18) hoặc cái lọc được lấy mẫu bằng cách lọc theo TCVN 10736-16 (ISO 16000-16). Các mẫu từ huyền phù được đổ đĩa trực tiếp hoặc huyền phù mẫu có thể được xử lý thích hợp.

7.1.1 Các mẫu từ phương pháp va đập

Ủ trực tiếp các đĩa thạch (xem 7.3).

7.1.2 Các mẫu thu được bằng phương pháp lọc

Cái lọc được hòa lại (tái huyền phù) và phân phối các lượng nhỏ lên các đĩa thạch (xem 7.2) sau đó ủ (xem 7.3).

Xử lý mẫu trong phòng thử nghiệm càng sớm càng tốt, không để quá 48 h sau khi lấy mẫu xong. Bảo quản mẫu trong phòng thử nghiệm ở nơi tối có nhiệt độ không vượt quá nhiệt độ ủ ($< 25^\circ\text{C}$), bảo vệ tránh các ảnh hưởng bất lợi (ấm, mất nước, nhiễm bẩn). Ghi lại các điều kiện bảo quản.

Thực hiện tất cả các thao tác trong các điều kiện bảo vệ được mẫu khỏi ô nhiễm bất kỳ. Kiểm tra các điều kiện vô trùng thường xuyên bằng các biện pháp kiểm soát và ghi lại các kết quả.

7.2 Xử lý cái lọc

7.2.1 Yêu cầu chung

Nấm mốc trong không khí lắng đọng trên cái lọc được thực hiện bằng phương pháp đổ đĩa gián tiếp.

CHÚ THÍCH: Chất kết tụ của các bào tử hoặc kết tụ của các hạt có thể được hòa tan bằng tạo huyền phù hoặc bằng cách pha loãng có thể dẫn đến số đếm cao hơn của các khuẩn lạc sau khi ủ. Trong trường hợp này, một chất kết tụ có 30 bào tử có thể cho 30 khuẩn lạc. Ngược lại, số đếm khuẩn lạc có thể giảm nếu tách không hết các bào tử nấm mốc ra khỏi cái lọc hoặc do các tế bào nấm bị tổn thương trong quá trình xử lý tại phòng thử nghiệm.

7.2.2 Tái tạo huyền phù

Trong không khí vô trùng của tủ an toàn (5.6), dùng kẹp vô trùng chuyển cái lọc (gelatin và polycarbonat) vào vật chứa vô trùng có chứa 5 ml dung dịch nước muối với polysorbate 80 (xem 6.5).

Dùng bộ lắc ống nghiệm (5.8) để làm chìm cái lọc trong dung dịch này trong vật chứa theo phương nằm ngang được đặt trong bể điều nhiệt duy trì ở nhiệt độ trong khoảng từ 35 °C đến 40 °C (5.7) trong 15 min. Cần đảm bảo rằng bề mặt cái lọc chứa các bào tử nằm ngang bằng với bề mặt hướng lên trên và có thể chuyển động tự do trong khi rung lắc.

Tiến hành xử lý mẫu theo 7.2.3 trong vòng 1 h sau khi tạo huyền phù.

7.2.3 Pha loãng

Từ huyền phù ban đầu, tạo ra một dãy dung dịch pha loãng.

Ngay trước khi pha loãng, lắc huyền phù trong 1 min trên bộ lắc ống nghiệm (5.8). Thêm 1 ml dung dịch huyền phù vào 9 ml dung dịch nước muối (6.4), sử dụng pipet vô trùng dùng một lần hoặc pipet thủy tinh có chèn bông. Tương tự, thực hiện hai bước pha loãng tiếp tạo ra các dung dịch pha loãng 1:10, 1:100 và 1:1 000.

Số lượng các bước pha loãng và dải pha loãng cần thích ứng với nồng độ nấm mốc dự kiến và phép đo cụ thể. Có thể cần phải tạo ra các bước pha loãng bổ sung.

7.2.4 Đổ đĩa

Cấy 0,1 ml huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng (7.2.3) trên đĩa thạch DG18 (6.1) cũng như trên đĩa thạch chất chiết malt (6.2) hoặc thạch dextrose khoai tây (6.3). Sử dụng ít nhất hai đĩa song song cho mỗi độ pha loãng và ủ mẫu theo quy định (7.3).

Nếu theo nguyên tắc lấy mẫu, dự kiến nấm mốc với nồng độ thấp, thì có thể đổ đĩa 1 ml dung dịch ban đầu lên bốn đĩa cho mỗi loại môi trường thạch (sử dụng 250 µl/dĩa) để tăng độ nhạy của phương pháp.

Xác định các mẫu trắng cho tất cả các bước pha loãng.

7.3 Ủ

Ủ các đĩa thạch trong tủ ẩm ở (25 ± 3) °C trong 7 ngày theo hướng lên trên. Đĩa thạch DG18 có thể yêu cầu kéo dài thời gian ủ đến 10 ngày, đặc biệt là nếu dự đoán có sự khác nhau của các loại nấm.

Đối với các mục đích đặc biệt (ví dụ: các *Aspergillus* spp. chịu nhiệt), có thể ủ tiếp các đĩa thạch chất chiết malt hoặc đĩa thạch dextrose khoai tây ở (36 ± 2) °C. Để nuôi cấy chọn lọc *Aspergillus fumigatus*, sử dụng nhiệt độ ủ ở (45 ± 2) °C.

CHÚ THÍCH: Cần đặc biệt chú ý để không làm khô các đĩa thạch khi ủ ở nhiệt độ trên 25 °C.

Ủ các đĩa thạch theo cách sao cho cung cấp đủ oxy để nấm mốc phát triển tối ưu, ví dụ: tránh ủ trong túi polyetylen kín khí. Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm không rung, để giảm thiểu nguy cơ về khuẩn lạc thứ cấp do bào tử mọc lan. Ngoài ra, tránh dòng không khí quá mạnh làm khô các đĩa thạch.

7.4 Kiểm tra và đếm

Kiểm tra đĩa thạch để lần đầu tiên sau từ 2 ngày đến 3 ngày và sau đó lặp lại khoảng thời gian này cho đến ít nhất là 7 ngày.

Đếm các nấm mốc chịu nhiệt (36 °C hoặc 45 °C) sau 1 ngày đến 3 ngày, khi chúng phát triển rất nhanh chóng.

Việc xử lý các đĩa thạch có thể làm phân tán các bào tử trên đĩa dẫn đến các khuẩn lạc thứ cấp trong quá trình ủ. Cần thận để không đếm các khuẩn lạc thứ cấp.

Khoảng nhận biết và định lượng tối ưu về chi/loài sử dụng đĩa nuôi cấy tiêu chuẩn có đường kính 90 mm là từ 20 đến 40 khuẩn lạc. Để có kết quả định lượng, cần có ít nhất 10 khuẩn lạc của chi/loài tương ứng trên đĩa thạch và có tối đa 100 khuẩn lạc. Một số nấm mốc có thể mọc lan rất nhanh ức chế sự phát triển của các khuẩn lạc khác (ví dụ như *Rhizopus*, *Chrysosporium*, *Mucor*, *Botrytis*) ngay cả trên các đĩa chứa dicloran và khả năng giảm số đếm khuẩn lạc thấp hơn trên đĩa.

Ghi lại số lượng tối đa khuẩn lạc đếm được trong vòng 7 ngày ủ đối với mỗi môi trường thạch và thể tích mẫu (phương pháp va đập) hoặc dung dịch pha loãng (đối với phương pháp lọc) tương ứng.

7.5 Nhận biết các loài nấm mốc

Việc nhận diện biết nấm mốc phát triển trên đĩa thạch là điều cần thiết đối với hầu hết các vấn đề liên quan đến nấm mốc của môi trường trong nhà. Việc nhận biết được dựa trên đặc điểm hình thái vĩ mô và vi mô. Những đặc điểm này thường nhận biết trên thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây tốt hơn so với trên thạch DG18.

CHÚ THÍCH: Thạch chất chiết malt và thạch dextrose khoai tây cho các kết quả nhận biết tốt các chi và các loài nấm mốc.

Mức độ nhận biết phụ thuộc vào mục đích của phép xác định.

Để phát hiện các nguồn phát triển nấm mốc trong nhà, điều quan trọng là phải nhận ra sự khác biệt về thành phần chi/loài nấm mốc có trong không khí trong nhà và ngoài trời cũng như các chỉ thị độ ẩm ví dụ *Aspergillus versicolor* hoặc *Chaetomium* spp.

Đối với mục đích của tiêu chuẩn này, không thể nhận biết đến loài trong chi nhất định (ví dụ *Phialophora*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Penicillium* và *Fusarium*) vì rất khó và hầu như không thể đạt được trong phân tích thông thường.

Tuy nhiên, việc nhận biết các loài cụ thể là rất quan trọng liên quan đến vấn đề sức khỏe. Trong trường hợp này, việc nhận biết các loài đối với các chi được đề cập trong đoạn trước cần được dự đoán.

Đối với việc nhận biết hầu hết các loài, cần chuẩn bị các chủng thuần từ các khuẩn lạc phát triển trên môi trường phân lập và chuyển sang môi trường đặc biệt để nhận biết.

Việc nhận biết các loài nấm mốc phải được thực hiện bởi các phòng thử nghiệm có chuyên môn và kinh nghiệm về nấm để nhận biết các vi nấm hoặc việc nhận biết phải được kiểm tra bởi các phòng thử nghiệm đó, để đảm bảo độ tin cậy của kết quả kiểm tra. Việc nhận biết nấm mốc trong nhà cần được kiểm tra bằng phép thử thành thạo với chuyên môn và kinh nghiệm về nấm.

Tài liệu khuyến cáo về nhận biết nấm mốc trong nhà được đưa ra trong các tài liệu tham khảo [7] đến [15]. Việc nhận biết đến chi và loài chủ yếu dựa trên những đặc điểm kiểu hình, ví dụ: cấu trúc hình

thành bào tử, màu khuẩn lạc và kiểu phát triển. Các đặc điểm hình thái được bổ sung bởi các đặc điểm hóa sinh và đặc tính phân tử để xác định các loài trong một số chi.

7.6 Tính và biểu thị kết quả

7.6.1 Yêu cầu chung

Tính nồng độ nấm mốc trong không khí trong nhà chủ yếu dựa trên việc đếm khuẩn lạc thu được từ các đĩa thạch DG18. Chỉ có các loài nấm mốc không phát triển hoặc chỉ phát triển rất ít trên môi trường thạch DG18 (ví dụ *Chaetomium*, *Stachybotrys*) được đếm trên đĩa thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây. Các kết quả đếm trên đĩa thạch DG18 và thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây không được kết hợp, nhưng việc tính toán được dựa vào số đếm khuẩn lạc trên thạch có sự phát triển tốt nhất của các loài/chi tương ứng.

Nồng độ được tính cho từng loài hoặc chi đã nhận biết được. Các loài nấm mốc không nhận biết được được kết luận là "các loài khác". Tuy nhiên, mục tiêu để xác định các loài nấm mốc chiếm đa số ở ít nhất trên chi (xem 7.5). Các sợi nấm vô trùng được tính riêng. Tổng nồng độ nấm mốc được tính là tổng nồng độ của các loài/chi kể cả các khuẩn lạc vô trùng và khuẩn lạc không nhận biết được.

Các kết quả được làm tròn đến hai chữ số có nghĩa.

CHÚ THÍCH: Các nấm men không phát hiện được bằng phương pháp này. Tuy nhiên, các khuẩn lạc nấm men xuất hiện trên đĩa thạch có thể được đưa vào báo cáo thử nghiệm như là một phần riêng.

7.6.2 Va đập

Thông thường cần ít nhất bốn đĩa thạch (hai thể tích lấy mẫu khác nhau, được phân tích song song) cho mỗi mẫu và môi trường.

Nồng độ là số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên một mét khối không khí trong nhà, C_I được tính theo Công thức (1):

$$C_I = \frac{n_{ctu}}{V_I} \quad (1)$$

Trong đó:

n_{ctu} là tổng số đơn vị hình thành khuẩn lạc trên đĩa thạch;

V_I là tổng thể tích lấy mẫu, tính bằng mét khối.

VÍ DỤ: Với một đĩa thạch môi trường, việc lấy mẫu được thực hiện trên hai thể tích không khí khác nhau là 100 l và 200 l được phân tích song song.

Việc đếm khuẩn lạc đã đạt được như sau:

Thể tích mẫu	Số lượng khuẩn lạc
100 lít (0,1 m ³)	15
	23
200 lít (0,2 m ³)	29
	35

Khi đó:

$$n_{ctu} = 15 + 23 + 29 + 35 = 102$$

$$V_i = 0,1 + 0,1 + 0,2 + 0,2 = 0,6$$

và

$$C_i = 102/0,6 = 170 = 1,7 \times 10^2$$

CHÚ THÍCH: Đối với số đếm khuẩn lạc cao, nhà sản xuất khuyến cáo sử dụng hệ số hiệu chỉnh positive hole.

Hệ số hiệu chỉnh là công cụ thống kê để tính số xác suất từ số đếm thô tổng số, có tính đến nhiều hạt có thể tác động vào cùng một lỗ. Vì lý do này, tổng số đếm tính được có thể ít hơn so với số đếm đã hiệu chỉnh. Khi số đếm thô đạt 80 % giá trị lỗ xác thực, số đếm đã hiệu chỉnh cần được coi là số ước tính. Số đếm khuẩn lạc đã hiệu chỉnh, $n_{ctu,c}$ đối với bộ và đập nhiều lỗ với n_i dòng tia không khí có thể tính được như sau:

$$C_i = n_{ctu} [1,075 / (1,052 - f)]^{0,438} \text{ với } f < 0,95$$

Trong đó:

n_{ctu} là số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc hoặc số lỗ va đập đã được lấp đầy;

f là n_{ctu}/n_i

Khi áp dụng tiêu chuẩn này cần sử dụng việc hiệu chỉnh thống kê sử dụng hệ số hiệu chỉnh lỗ xác thực vì: i) hệ số hiệu chỉnh không có liên quan trong dải nhận biết tối ưu các loại nấm và việc tính kết quả (20 đến 40 khuẩn lạc, tối đa 100 khuẩn lạc); ii) tổng số khuẩn lạc được tính bằng cách cộng các số khuẩn lạc đối với chi/loài đã nhận biết thường là << 100 khuẩn lạc; và iii) trong hầu hết các trường hợp khả năng các đĩa cho số đếm thấp do kích thước khác nhau của khuẩn lạc của các loài nấm.

7.6.3 Lọc

Việc định lượng các khuẩn lạc nấm mốc thường bị cản trở bởi sự phát triển mọc lan của một số loài nấm mốc nhất định. Do đó, thường chỉ sử dụng các đĩa thạch từ một bước pha loãng nếu bước pha loãng 1:10 được chọn. Để tính kết quả, chọn các đĩa thạch ít có sự mọc lan nhất giữa các khuẩn lạc và chứa đủ số khuẩn lạc để việc định lượng có hiệu lực (xem 7.4). Nếu có nhiều hơn một đĩa được sử dụng để định lượng, thì tính trung bình kết quả theo TCVN 9716 (ISO 8199).

Nồng độ trong huyền phù ban đầu, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit, Cs, được tính bằng Công thức (2):

$$C_s = \frac{n_{ctu}}{V_s} \quad (2)$$

Trong đó:

n_{clu} là tổng số khuẩn lạc trên các đĩa của bước pha loãng được sử dụng;

V_s là thể tích tổng số tính được của mẫu ban đầu bao gồm trong các đĩa bước pha loãng được sử dụng, tính bằng mililit, tính được bằng Công thức (3):

$$V_s = n_p V_i f_d \quad (3)$$

Trong đó

n_p là số đĩa được đếm đối với bước pha loãng sử dụng;

V_i là thể tích mẫu thử được dàn trên các đĩa thạch, tính bằng mililit;

f_d là hệ số pha loãng đối với thể tích mẫu thử ($f_d = 1$ đối với huyền phù ban đầu; $f_d = 0,1$ đối với độ pha loãng 1:10, v.v...)

VÍ DỤ 1: Với một môi trường thạch: hai đĩa thạch được sử dụng cho mỗi bước pha loãng và 0,1 ml đã được dàn lên các đĩa thạch. Thu được số đếm khuẩn lạc như sau:

Độ pha loãng	Số lượng khuẩn lạc
10^{-1}	26
	33

Khi đó:

$$n_{clu} = 26 + 33 = 59$$

$$V_s = 2 \times 0,1 \times 0,1 = 0,02$$

và

$$C_s = \frac{59}{0,02} = 2950$$

Nồng độ nấm mốc có trong dung dịch huyền phù ban đầu, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mét khối, C_f , được tính bằng Công thức (4):

$$C_f = C_s \frac{V_f}{V_i} \quad (4)$$

Trong đó:

C_s là nồng độ có trong dung dịch huyền phù ban đầu, tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mililit;

V_i là thể tích dung dịch nước muối để tái huyền phù cái lọc;

V_f là thể tích mẫu không khí, tính bằng mét khối.

VÍ DỤ 2: thể tích mẫu không khí là 0,8 m³. Cái lọc đã được tái huyền phù trong 5 ml nước muối.

Khi đó:

$$C_f = 2950 \times \frac{5}{0,8} = 18438$$

Kết quả: $1,8 \times 10^4$ cfu/m³

7.6.4 Mẫu trắng hiện trường

Nồng độ nấm mốc trong các mẫu trắng hiện trường được ghi lại để kiểm soát chất lượng. Thông thường không có khuẩn lạc nào được tìm thấy trên các mẫu trắng này. Số đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch sau khi va đập hoặc sau khi dàn đều huyền phù của cái lọc chưa pha loãng vượt hai cho thấy có sai lỗi lấy mẫu và cần thận trọng khi giải thích kết quả của phép đo. Không hiệu chỉnh kết quả đo của các mẫu theo kết quả của mẫu trắng hiện trường.

8 Báo cáo kết quả thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Viện dẫn tiêu chuẩn lấy mẫu TCVN 10736-16 (ISO 16000-16) đối với phương pháp lọc hoặc TCVN 10736-18 (ISO 16000-18) đối với phương pháp va đập;
- c) Tất cả các chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- d) Thời gian phân tích;
- e) Thời gian tính từ lúc kết thúc lấy mẫu đến khi bắt đầu phân tích;
- f) Thời gian ủ;
- g) Thẻ tích và số lượng mẫu phân tích, nếu có thể,
- h) Các kết quả được biểu thị theo 7.6 bao gồm môi trường nuôi cấy tương ứng và nhiệt độ ủ;
- i) Báo cáo về sai số phép đo và/hoặc độ đúng của phép, nếu có thể;
- j) Bất kỳ thông tin nào khác có liên quan đến phương pháp.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Các đặc điểm cụ thể của bào tử nấm mốc

Nấm mốc thường có mặt tự nhiên và thực hiện một vai trò quan trọng trong việc phân hủy và khoáng hoá các chất hữu cơ trong chu trình dinh dưỡng trong tự nhiên. Một số loài nấm gây bệnh cho cả người và động vật.

Nấm mốc thường phát tán mạnh trong không khí. Chúng phát sinh các bào tử phát tán trong không khí, nhưng cũng có giai đoạn nghỉ và tồn tại lâu dài. Ở một số loài, cho thấy có các dạng hình thái khác nhau của các bào tử (hạt đính, nang bào tử, bào tử chlamydospore), với mỗi loài có một trong những chức năng sinh học đề cập ở trên. Đường kính các bào tử khác nhau giữa các loài khác nhau, từ 2 µm đến 10 µm đối với hầu hết các loài nấm mốc có trong không khí. Trong một vài trường hợp có thể có đường kính bằng hoặc lớn hơn 30 µm (đường kính hình học). Các mảnh sợi nấm có chiều rộng đến 10 µm, nhưng có thể dài hơn 30 µm. Xác suất thống kê cho thấy rằng một tế bào sợi nấm thể hiện một đơn vị hình thành khuẩn lạc là không đáng kể.

Các đơn vị phát tán nấm mốc trong không khí có thể là các bào tử hoặc hạt đính riêng rẽ, các khóm bào tử, hoặc các mảnh sợi nấm có thể xuất hiện tự do dính vào các hạt bụi hoặc lơ lửng các trong giọt nước.

Các bào tử nấm mốc có vách tế bào kitin dày làm cho chúng chịu được sự mất nước. Melanin được giữ trong các màng của nhiều loại nấm mốc, bảo vệ các bào tử khỏi ảnh hưởng của ánh sáng UV. Dựa vào các đặc điểm này, nấm mốc có thể sống sót trong điều kiện khô kéo dài đồng thời chúng có thể phân tán rộng rãi trong không khí (phát tán bào tử liên lục địa).

Hạt đính (các bào tử) của một vài chi nấm mốc, ví dụ *Penicillium* và *Aspergillus* kỵ nước và khó có thể hòa vào nước. Điều này có tầm quan trọng đối với công việc trong phòng thử nghiệm. Các huyền phù hạt đính trong nước luôn phải được bổ sung các chất tẩy rửa.

Bảng A.1 - Nồng độ của các loài nấm trong không khí xung quanh, trong quản lý chất thải và môi trường nông nghiệp

Các loài điển hình trong môi trường không khí			Nồng độ ^a			
Các loài	Cỡ hạt, kích thước bào tử hoặc hạt đính μm	Giá trị aH_{2O} , Vật liệu ^b	Trong nhà cfu/m ³	Nơi làm việc, quản lý chất thải cfu/m ³	Không khí xung quanh cfu/m ³ %	
<i>Alternaria alternata</i>	(18 đến 83) (7 đến 18) (Tài liệu tham khảo [17])	0,85 đến 0,88 (Tài liệu tham khảo [17])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	n.r.	10 ² (Tài liệu tham khảo [18]); 10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	—
<i>Aureobasidium pullulans</i>	(7,5 đến 16) (3,5 đến 7) (Tài liệu tham khảo [17])	—	<5 (Tài liệu tham khảo [19])	n.r.	< 5 (Tài liệu tham khảo [21])	—
<i>Botrytis cinerea</i>	(8 đến 14) (6 đến 9) (Tài liệu tham khảo [17])	0,93 đến 0,95 (Tài liệu tham khảo [17])	< 5 (Tài liệu tham khảo [20])	n.r.	<10 (Tài liệu tham khảo [20])	—
<i>Cladosporium spp.</i>	3 đến 11	—	10 ² (Tài liệu tham khảo [20])	—	10 ³ (Tài liệu tham khảo [18]), [20])	đến 90 (Tài liệu tham khảo [18])
<i>C. herbarum</i>	(5,5 đến 13) (4 đến 6) (Tài liệu tham khảo [16])	0,85 đến 0,88 (Tài liệu tham khảo [16])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [20])	10 ² (Tài liệu tham khảo [19])	10 ² (Tài liệu tham khảo [20])	đến 60
<i>C. cladosporioides</i>	[3 đến 7 (11)] [2 đến 4 (5)] (Tài liệu tham khảo [16])	0,86 đến 0,88 (Tài liệu tham khảo [16])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [20])	10 ³ (Tài liệu tham khảo [19])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [20])	đến 30
<i>Epicoccum nigrum</i>	16 đến 25 (Tài liệu tham khảo [16])	0,86 đến 0,90 (Tài liệu tham khảo [16])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	n.r.	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	—
<i>Absidia corymbifera</i>	(3,4 đến 4,6) (2,8 đến 3,8) (Tài liệu tham khảo [10])	—	n.r.	—	n.r.	
<i>Aspergillus spp.</i>	2,5 đến 5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,71 đến 0,95	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [20])	—	<10 (Tài liệu tham khảo [20])	<3 (Tài liệu tham khảo [18])
<i>A. candidus</i>	2,5 đến 4 (Tài liệu tham khảo [16])	0,75 đến 0,78 (Tài liệu tham khảo [16])	<5	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	—	+

Bảng A.1 - Nồng độ của các loài nấm trong không khí xung quanh, trong quản lý chất thải và môi trường nông nghiệp (tiếp theo)

<i>A. flavus</i>	3,6 (Tài liệu tham khảo [16])	0,78 đến 0,80 (Tài liệu tham khảo [16])	<5	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>A. fumigatus</i>	2,5 đến 3 (Tài liệu tham khảo [16])	0,85 đến 0,94 (Tài liệu tham khảo [16])	Rất ít	10 ⁷ (Tài liệu tham khảo [19])	đến 20	—
<i>A. nidulans</i>	3 đến 3,5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,85 (Tài liệu tham khảo [17])	<5	10 ⁵ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>A. niger</i>	3,5 đến 5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,92 đến 0,95 (Tài liệu tham khảo [17])	Rất ít	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>A. parasiticus</i>	3,5 đến 5,5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,78 đến 0,82 (Tài liệu tham khảo [16])	—	10 ³ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>A. versicolor</i>	2 đến 3,5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,78 (Tài liệu tham khảo [16])	<5 (Tài liệu tham khảo [21])	10 ⁶ (Tài liệu tham khảo [19])	<5 (Tài liệu tham khảo [21])	—
<i>Eurotium herbariorum</i>	4,5 đến 7 (8) (Tài liệu tham khảo [16])	—	<5 (Tài liệu tham khảo [21])	n.r.	<10 (Tài liệu tham khảo [21])	—
<i>F. graminearum</i>	[41 đến 60 (80)] (4 đến 5,5) (Tài liệu tham khảo [16])	0,89 (Tài liệu tham khảo [16])	Không có trong không khí	n.r.	—	—
<i>Mucor hiemalis</i>	(3,5 đến 5,2) (2,5 đến 3,7) (Tài liệu tham khảo [10])	—	—	n.r.	—	—
<i>M. racemosus</i>	[5,5 đến 8,5 (10)] (4 đến 7) (Tài liệu tham khảo [10])	0,94 (Tài liệu tham khảo [16])	—	n.r.	—	—
<i>Paecilomyces variotii</i>	(3 đến 5) (2 đến 4) (Tài liệu tham khảo [16])	0,79 đến 0,84 (Tài liệu tham khảo [16])	—	10 ⁶ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—

Bảng A.1 - Nồng độ của các loài nấm trong không khí xung quanh, trong quản lý chất thải và môi trường nông nghiệp (tiếp theo)

<i>Penicillium spp.</i>	—	0,78 đến 0,98	10 ² (Tài liệu tham khảo [21])	—	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	2,5 đến 13 (Tài liệu tham khảo [18])
<i>P. brevicompactum</i>	3 đến 4,5 (Tài liệu tham khảo [16])	0,78 đến 0,82 (Tài liệu tham khảo [16])	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	<10 (Tài liệu tham khảo [20])	+
<i>P. chrysogenum</i>	(3 đến 4) (2,8 đến 3,8) (Tài liệu tham khảo [16])	0,78 đến 0,81 (Tài liệu tham khảo [16])	đến 10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	10 ² (Tài liệu tham khảo [19])	đến 10 ¹ (Tài liệu tham khảo [21])	+
<i>P. corylophilum</i>	(2,5 đến 3,2) (2,5 đến 3,0)	—	—	n.r.	—	+
<i>P. crustosum</i>	3 đến 4 (Tài liệu tham khảo [16])	—	—	10 ⁵ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>P. expansum</i>	(3 đến 3,5) (2,5 đến 3) (Tài liệu tham khảo [16])	0,82 đến 0,85 (Tài liệu tham khảo [16])	—	10 ¹ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>P. glabrum</i>	3 đến 3,5 (Tài liệu tham khảo [16])	—	<10 (Tài liệu tham khảo [20])	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	<5 (Tài liệu tham khảo [20])	—
<i>P. lanosum</i>	2,5 đến 3,0	—	Rất ít	n.r.	—	+
<i>P. roqueforti</i>	4 đến 6 (8) (Tài liệu tham khảo [16])	0,83 (Tài liệu tham khảo [16])	—	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>Rhizopus oligosporus</i>	[(4) 9 đến 10 (15)] [(4) 7 đến 10 (11)] (Tài liệu tham khảo [10])	—	—	10 ⁴ (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
<i>Sporobolomyces spp.</i>	(2 đến 12) (3 đến 35)	—	—	—	đến 10 ⁵ (Tài liệu tham khảo [18])	—
<i>Stachybotrys chartarum</i>	(7 đến 12) (4 đến 6) (Tài liệu tham khảo [10])	0,94 (Tài liệu tham khảo [16])	—	—	—	—
<i>Trichoderma harzianum</i>	(2,8 đến 3,2) (2,5 đến 2,8) (Tài liệu tham khảo [16])	—	Rất ít	—	—	—

Bảng A.1 - Nồng độ của các loài nấm trong không khí xung quanh, trong quản lý chất thải và môi trường nông nghiệp (kết thúc)

<i>T. citrinoviride</i>	(2,2 đến 3,7) (1,5 đến 2,1)	—	—	10 ² (Tài liệu tham khảo [19])	—	—
Chú giải + là các loài thường xuyên có mặt, thậm chí nếu được phát hiện ở mức thấp hơn; n.r. loài xuất hiện với số lượng cfu rất thấp và không liên quan đến vệ sinh - không có nguồn dữ liệu Chú thích 1: Dữ liệu định lượng không có tài liệu công bố là các dữ liệu thực nghiệm chưa được công bố (DG18 thạch, va đập) của Viện Vệ sinh và Sức khỏe Môi trường, Bệnh viện Đại học Aachen, Đức. Chú thích 2: Chỉ có số kết quả rất hạn chế được làm ví dụ. Nồng độ có thể thay đổi tùy thuộc vào ví dụ về vị trí của tòa nhà và mùa. a Nồng độ chủ yếu được đưa ra theo cấp độ lớn (mũ mười), trong môi trường có nồng độ tương đối thấp của nấm sợi (ví dụ như không khí trong nhà, không khí xung quanh), các cấp thường là <10 cfu / m³, < 5 cfu / m³ và "rất ít". b Các giá trị là các mức hoạt độ nước a_{H2O} thấp nhất đối với sự phát triển của nấm mốc; nhiệt độ, thời gian tiếp xúc và các đặc tính của vật liệu cũng ảnh hưởng đến sự phát triển. Các giá trị a_{H2O} thấp nhất là không phải tất cả xuất phát từ vật liệu cấu thành mà có thể phát sinh từ các chủng cấy phòng thử nghiệm.						

Phụ lục B

(tham khảo)

Trao đổi mẫu để đánh giá xác nhận phương thức nuôi cấy

Ba nghiên cứu khác nhau đã được tiến hành để kiểm tra tính hợp lệ của phương pháp nuôi cấy đã nêu: i) thí nghiệm 1 sử dụng mẫu bụi, ii) thí nghiệm 2 sử dụng vật liệu bị ô nhiễm và iii) thí nghiệm 3 sử dụng đĩa lấy mẫu va đập. Tất cả các mẫu cho các thí nghiệm được một phòng thử nghiệm tham chiếu chuẩn bị và được gửi đến các phòng thử nghiệm tham gia. Đã có bảy phòng thử nghiệm chuẩn tham gia thực hiện theo phương pháp nuôi cấy. Tiếp theo có 25 đến 30 phòng thử nghiệm tham gia thử nghiệm đã được đào tạo nhiều hơn hoặc ít hơn với các phương pháp nuôi cấy.

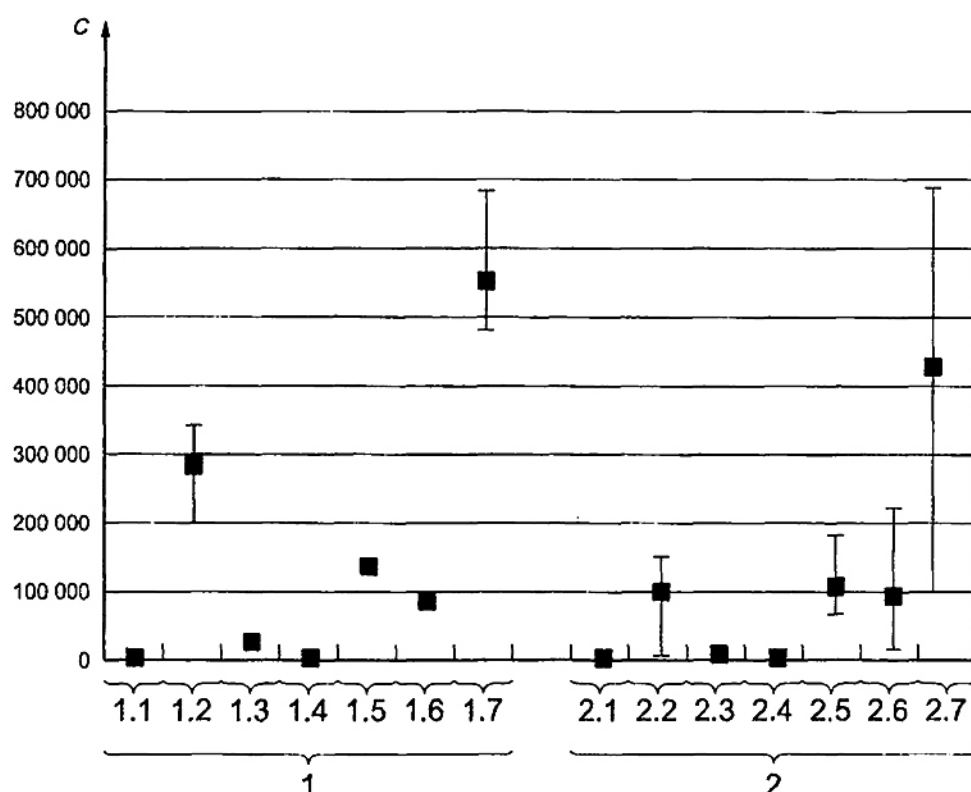
Đối với thí nghiệm 1, mẫu bụi đã được phân tách và các phần có kích thước 100 µm đã được gửi đến các phòng thử nghiệm tham gia. Việc nuôi cấy được thực hiện trên môi trường thạch DG18 và thạch chất chiết malt theo tiêu chuẩn này. Kết quả được nêu trong Hình B.1.

Các kết quả thu được từ bảy phòng thử nghiệm chuẩn đã có sự thống nhất cao. Độ lệch chuẩn của kết quả cao hơn rất nhiều so với các phòng thử nghiệm tham gia khác. Sự biến thiên các loài là rất cao trong mẫu bụi và không có được phân tích thống kê chi tiết. Do đó, các kết quả chỉ được đưa ra ở mức chi.

Thí nghiệm 2 đã được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy sáu loài nấm khác nhau trên một mẫu vật liệu (gỗ) để hạn chế sự đa dạng các loài trong mẫu. Các loại nấm sau đây đã được sử dụng: *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium Brevicompectum*, *Penicillium expansum* và *Acremonium strictum*. Mẫu gỗ đã được đồng nhất và gửi đến các phòng thử nghiệm tham gia để phân tích. Việc nuôi cấy được thực hiện trên môi trường thạch DG18 và thạch chất chiết malt theo tiêu chuẩn này. Kết quả được nêu trong hình B.2.

Các kết quả thu được từ bảy phòng thử nghiệm có được sự thống nhất cao. Độ lệch chuẩn của kết quả lại vẫn cao hơn nhiều so với kết quả của các phòng thử nghiệm tham gia khác. Đặc biệt là nhiều phòng thử nghiệm khó khăn trong việc phát hiện *Aspergillus restrictus* và *Acremonium strictum*.

Các đĩa thạch được lấy mẫu bằng phương pháp va đập không khí trong nhà và tương ứng với không khí xung quanh đã được sử dụng trong thí nghiệm 3. Tất cả 100 lit mẫu được một phòng thử nghiệm chuẩn lấy trong một ngày sử dụng 5 bộ va đập song song. Các mẫu không khí xung quanh được lấy đầu tiên (1 đến 140 đĩa) tiếp theo lấy các mẫu không khí trong nhà (280 đĩa đến 420 đĩa). Nguồn *Aspergillus versicolor* đã có mặt trong không khí trong nhà. Hai đĩa thạch DG18 và hai đĩa thạch chất chiết malt mẫu không khí trong nhà cũng như không khí xung quanh đã được gửi đến từng phòng thử nghiệm tham gia để nuôi cấy và phát hiện các loại nấm. Mỗi phòng thử nghiệm nhận được một bộ các đĩa từ khi bắt đầu lấy mẫu và một đĩa từ khi kết thúc lấy mẫu. Kết quả được nêu trong hình B 3 a) và b).

**CHÚ DẪN:**

C đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam

1 các phòng thử nghiệm chuẩn

1.1 *Cladosporium* spp.

1.2 *Cladosporium* spp.

1.3 *Alternaria* spp.

1.4 *Eurotium* spp.

1.5 *Penicillium* spp.

1.6 Các loài khác

1.7 Số đếm khuẩn lạc tổng số

2 các phòng thử nghiệm khác

2.1 *Alternaria* spp.

2.2 *Cladosporium* spp.

2.3 *Aspergillus* spp.

2.4 *Eurotium* spp.

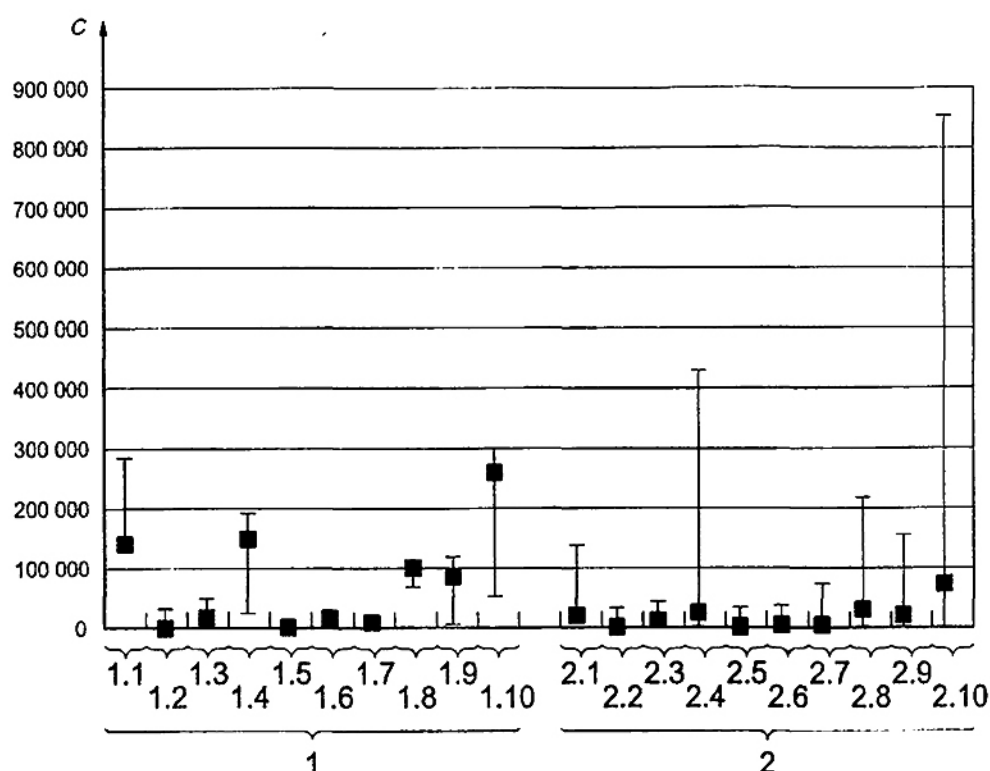
2.5 *Penicillium* spp.

2.6 Các loài khác

2.7 Số đếm khuẩn lạc tổng số

CHÚ THÍCH Các kết quả trình bày riêng biệt cho bảy phòng thử nghiệm chuẩn và các phòng thử nghiệm tham gia khác. Số trung vị cũng như 25 và 75 % được đưa ra cho mỗi loài và cho số đếm khuẩn lạc tổng số.

Hình B.1 – Các kết quả số đếm khuẩn lạc sử dụng mẫu bụi môi trường

**CHÚ DẪN:**

C đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam vật liệu

1 các phòng thử nghiệm chuẩn

1.1 *Aspergillus restrictus*

1.2 *Aspergillus sydowii*

1.3 *Aspergillus versicolor*

1.4 tổng *Aspergillus* spp.

1.5 *Penicillium brevicompactum*

1.6 *Penicillium expansum*

1.7 tổng *Penicillium* spp.

1.8 *Acremonium* spp.

1.9 các loài khác

1.10 số đếm khuẩn lạc tổng số

2 các phòng thử nghiệm khác

2.1 *Aspergillus restrictus*

2.2 *Aspergillus sydowii*

2.3 *Aspergillus versicolor*

2.4 tổng *Aspergillus* spp.

2.5 *Penicillium brevicompactum*

2.6 *Penicillium expansum*

2.7 tổng *Penicillium* spp.

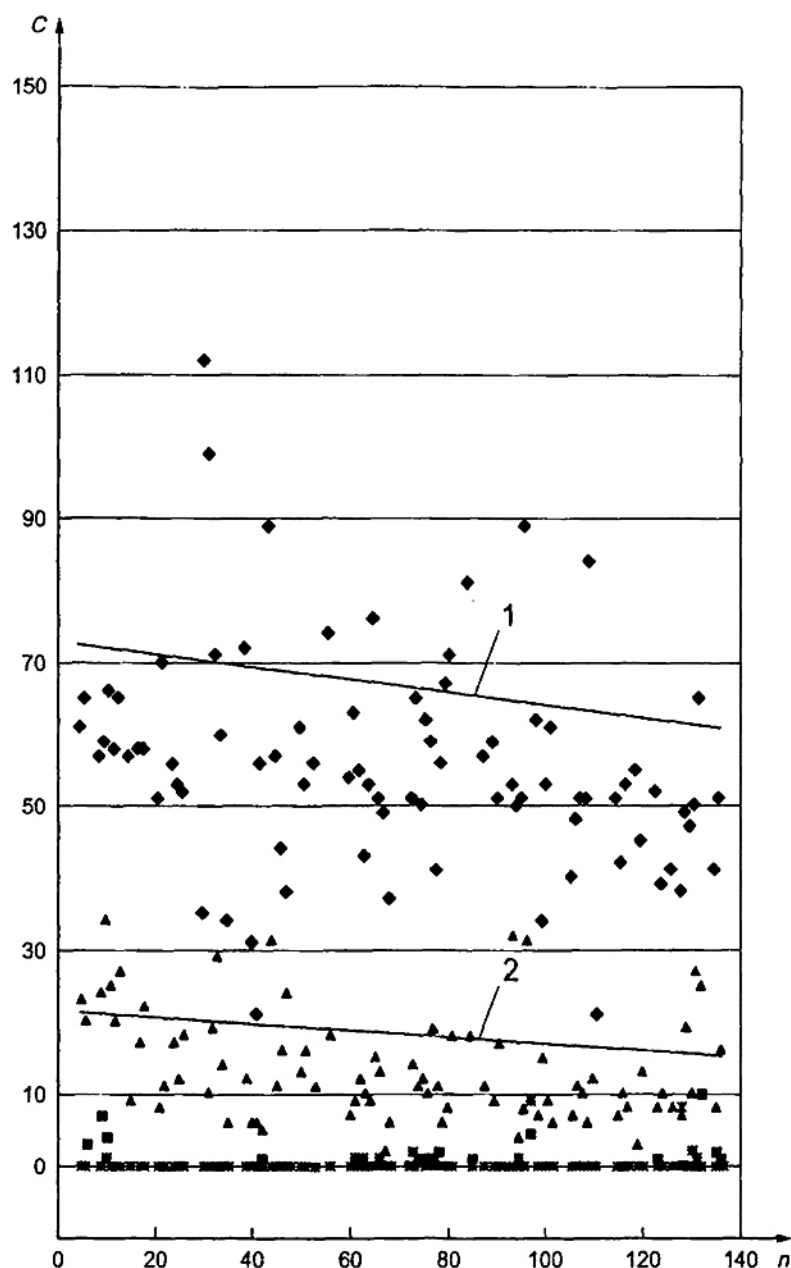
2.8 *Acremonium* spp.

2.9 các loài khác

2.10 số đếm khuẩn lạc tổng số

CHÚ THÍCH Các kết quả trình bày riêng biệt cho bảy phòng thử nghiệm chuẩn và các phòng thử nghiệm tham gia khác. Số trung vị cũng như 5 và 95 % được đưa ra cho mỗi loài, chi và cho số đếm khuẩn lạc tổng số.

Hình B.2 – Các kết quả số đếm khuẩn lạc sử dụng mẫu vật liệu



CHÚ DẪN:

$$1 \quad C = -0,097 \cdot 2n + 58,558 \quad r^2_{nc} = 0,0008$$

$$2 \quad C = -0,052 \cdot 2n + 31,859 \quad r^2_{nc} = 0,001$$

C đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mét khối

n số lượng đĩa thạch

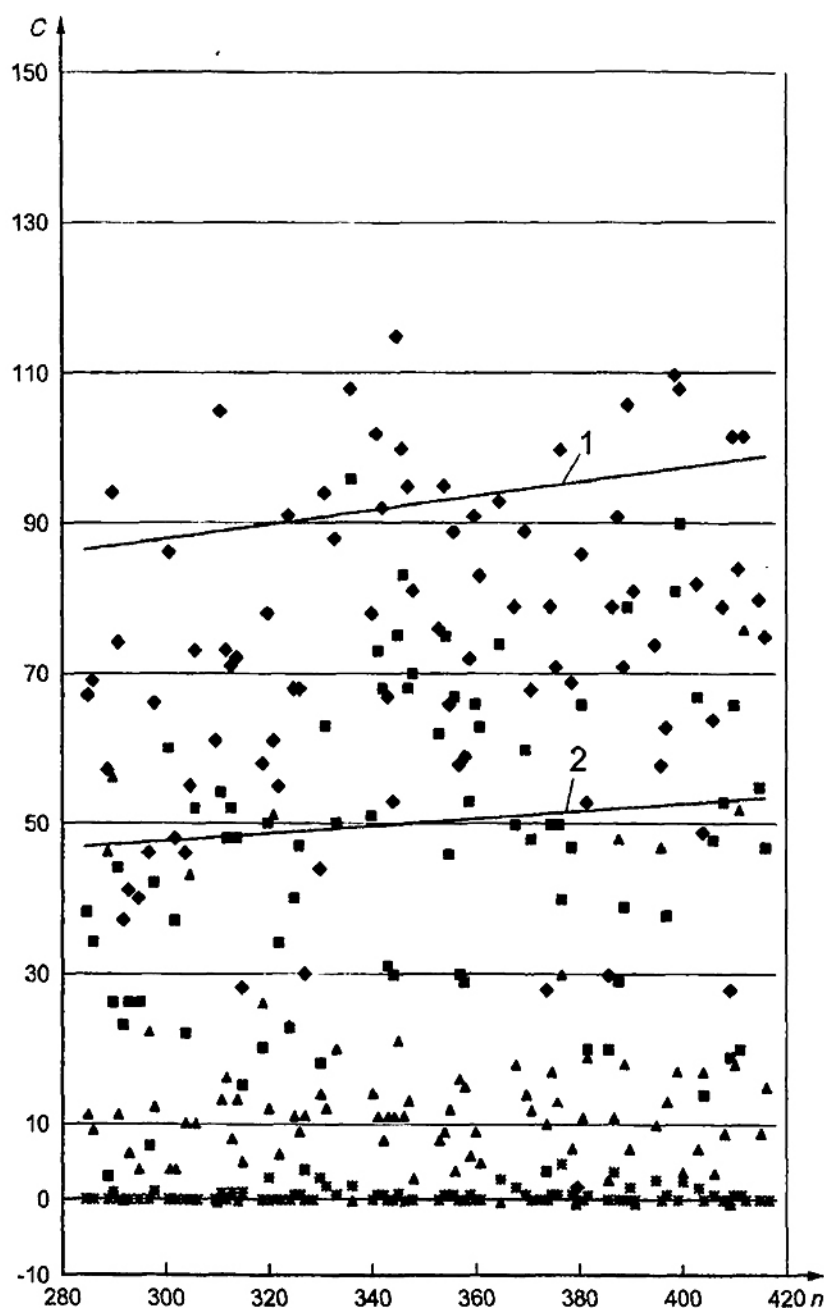
♦ số đếm khuẩn lạc tổng số

■ *Aspergillus* spp.* *Eurotium* spp.▲ *Penicillium* spp.

CHÚ THÍCH: Từ hình vẽ phát hiện được sáu giá trị cực đại (200 đến 1 000). Các đường vạch biểu thị xu hướng thời gian.

a)

Hình B.3 – Kết quả đếm khuẩn lạc sử dụng các đĩa lấy mẫu bằng phương pháp va đập trong không khí trong nhà



CHÚ DẪN:

$$1 \quad C = -0,097 \cdot 2n + 58,558 \quad r^2_{nc} = 0,0008$$

$$2 \quad C = -0,052 \cdot 2n + 31,859 \quad r^2_{nc} = 0,001$$

C đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mét khối

n số lượng đĩa thạch

♦ số đếm khuẩn lạc tổng số

■ *Aspergillus* spp.

* *Eurotium* spp.

▲ *Penicillium* spp.

CHÚ THÍCH: Từ hình vẽ phát hiện được sáu giá trị cực đại (200 đến 1 000). Các đường vạch biểu thị xu hướng thời gian.

b)

Hình B.3 – (Kết thúc)

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 12219-1, *Indoor air - Road vehicles - Part 1: Whole vehicle test chamber - Specification and method for the determination of volatile organic compounds in car interiors*
- [2] ISO 16017-1, *Indoor, ambient and workplace air— Sampling and analysis of volatile organic compounds by sorbent tube thermal desorption/capillary gas chromatography - Part 1: Pumped sampling*
- [3] ISO 16017-2, *Indoor, ambient and workplace air— Sampling and analysis of volatile organic compounds by sorbent tube thermal desorption/capillary gas chromatography— Part 2: Diffusive sampling*
- [4] EN 13098, *Workplace atmospheres - Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin*
- [5] VDI 4252-2, *Measurement of airborne microorganisms and viruses in ambient air - Active sampling of bioaerosols - Separation of airborne mould on gelatine/polycarbonate filters*
- [6] VDI 4300-10, *Measurement of indoor air pollution - Measurement strategies for determination of mould fungi in indoor environment*
- [7] SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., editors. *Introduction to food- and airborne fungi*, 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004, p. 389
- [8] DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M.J., editors. *Atlas of clinical fungi*, 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000. p. 1 160
- [9] FLANNIGAN, B., SAMSON, R.A., MILLER, J.D., editors. *Microorganisms in home and indoor work environments (diversity, health impacts, investigation and control)*. Taylor and Francis, 2001, p. 490
- [10] DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H., editors. *Compendium of soil fungi*, Vols 1 and 2. Academic Press, London, 1980
- [11] KLICH, M.A. (ed.) *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2002, p. 116
- [12] PITT, J.I., editor. *The genus Penicillium and its teleomorphic states*, Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press, London, 1979, p. 634
- [13] NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O., editors. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, 1983, p. 193
- [14] SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C., editors. *Penicillium subgenus Penicillium; New taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004, p. 260 (Studies in mycology, Vol. 49)
- [15] SAMSON, R.A., PITT, J.I., editors. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood, Amsterdam, 2000, p. 510
- [16] SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. *Introduction to food- and airborne fungi*, 6th edition, (2000). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000, p. 389
- [17] REIII, J. *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung* [Mould fungi - Life cycle, uses, damaging effects, combat], 2nd edition, Springer, Berlin, 1997, p. 308

- [18] LACEY, J. Spore dispersal: Its role in ecology and disease: the British contribution to fungal erobiology
Mycol. Res. 1996, 100, pp. 641-660
- [19] FISCHER, G. *Comparison of microbiological and chemical methods for assessing the exposure to airborne fungi in composting plants* - Shaker, Aachen, 2000, p. 245 (*Akademische Edition Umweltforschung*, Vol. 10)
- [20] VERHOEFF, A.P., VAN WIJNEN, J.C., BRUNEKREEF, B., FISCHER, P., VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S., SAMSON, R.A. Presence of viable mould propagules in indoor air in relation to house damp and outdoor air. *Allergy* 1992, 47, pp. 83-91
- [21] FRADKIN, A., TARLO, S.M., TOBIN, R.S., TUCIC-PORETTA, M., MALLOCH, D. Species identification of airborne molds and its significance for the detection of indoor pollution. *J. Air Pollut. Control Assoc* 1987, 37, pp. 51-53.
-