TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10736-21:2017
ISO 16000-21:2013

KHÔNG KHÍ TRONG NHÀ - PHẦN 21: PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM NẤM MỐC - LẤY MẪU TỪ VẬT LIỆU

Indoor air - Part 21: Detection and enumeration of moulds - Sampling from materials

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 10736-21:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 16000-21:2013.

TCVN 10736-21:2017 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 (NO_2).*

- 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 (CO_2)*
- 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 (ISO16000-32:2014) *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, Fusahum*) 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 hài hoà đối với việc lấy mẫu, phát hiện và định lượng nấm mốc bao gồm các tiêu chuẩn về chiến lược 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 từ các vật liệu xây dựng.

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa trên các phần của VDI 4300 Phần 10.

Không khí trong nhà – Phần 21: Phát hiện và đếm nấm mốc – Lấy mẫu từ vật liệu

Indoor air –

Part 21: Detection and enumeration of moulds – Sampling from materials

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu để lấy mẫu nấm mốc từ vật liệu xây dựng. Theo các hướng dẫn đã nêu, mẫu được soi bằng kính hiển vi hoặc phát hiện tiếp nấm mốc bằng cách nuôi cấy theo TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

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 10736-17 (ISO 16000-17), *Không khí trong nhà - Phần 17: Phát hiện và đếm nấm mốc - Phương pháp nuôi cấy*

3 Thuật ngữ, định nghĩa

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

3.1

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

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

[EN 13098:2000]

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.

3.2

Nuôi cấy (cultivation)

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

[Nguồn:TCVN 10736-16: 2017 (ISO 16000-16: 2008), 3.6]

3.3

Nấm sợi (Filamentous fungus)

Nấm phát triển dưới dạng các sợi tế bào.

CHÚ THÍCH 1: Thuật ngữ "nấm sợi" phân biệt với sợi phát triển từ nấm men.

[Nguồn: TCVN 10736-16: 2017 (ISO 16000-16: 2008), 3.3].

3.4

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.

[Nguồn: EN 13098:2000]

3.5

Nấm mốc (mould)

<chất lượng không khí> Nấm sợi từ một vài nhóm phân loại zygomycete, ascomycete và deuteromycete hoặc nấm bất toàn.

CHÚ THÍCH 1: Nấm mốc hình thành các dạng bào tử khác nhau phụ thuộc vào nhóm phân loại của chúng, gọi là bào tử hạt đính (hạt đính), cuống túi bào tử hoặc nang bào tử.

3.6

Sợi nấm (mycelium)

Mạng lưới các sợi nấm phân nhánh

[Nguồn: ISO/TS 10832:2009, 3.5]

4 Nguyên tắc của phương pháp

Vật liệu nhiễm nấm mốc được kiểm tra bằng cách lấy mẫu bề mặt (xem 7.1) hoặc lấy mẫu số lượng lớn (xem 7.2), có nghĩa là kiểm tra toàn bộ vật liệu hoặc các lớp vật liệu phía sâu bên trong. Các phương pháp được sử dụng phụ thuộc vào mục tiêu điều tra nêu trong TCVN 10736-19 (ISO 16000-19). Các bề mặt được lấy mẫu bằng cách sử dụng đĩa tiếp xúc trực tiếp (xem 7.1.2) hoặc dùng băng dính (xem 7.1.3) hoặc dùng gạc bông (xem 7.1.4). Sau khi lấy mẫu, các bào tử nấm mốc có thể được phân tích bằng soi kính hiển vi trực tiếp (xem 7.4) hoặc được xử lý và nuôi cấy sử dụng phương pháp tạo huyền phù (xem 7.5). Quy trình nuôi cấy được mô tả trong TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

5 Thiết bị và vật liệu

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường, cụ thể là:

5.1 Thiết bị lấy mẫu

5.1.1 Đĩa thạch hoặc các dải nhựa dẻo, chứa thạch DG-18 và chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây (xem Điều 6) với môi trường nuôi cấy hơi nhô ở mép đĩa.

5.1.2 Gạc bông, vô trùng, để lấy mẫu.

5.1.3 Hộp đựng để bảo quản các đĩa thạch và mẫu vật liệu trong quá trình vận chuyển, ví dụ: túi bằng chất dẻo.

5.1.4 Chất khử trùng, ví dụ iso-propanol hoặc etanol (70 % thể tích) để khử trùng dụng cụ lấy mẫu.

5.1.5 Máy khoan, đã được khử trùng, có đường kính ít nhất 3 cm, tốt nhất là 5 cm, để lấy các lõi từ vật liệu.

5.1.6 Hộp đựng cách nhiệt/làm lạnh, để vận chuyển các đĩa thạch và mẫu vật liệu dưới 25 °C.

5.17 Dụng cụ lấy mẫu, vô trùng, để lấy các mẫu số lượng lớn của các vật liệu ở các độ sâu khác nhau, ví dụ: thìa, muỗng, dao, máy khoan.

5.2 Dụng cụ để chuẩn bị các đĩa thạch

5.2.1 Nồi hấp sấy, duy trì nhiệt độ ở (121 ± 3) °C và (115 ± 3) °C.

5.2.2 Đĩa Petri, vô trùng, có đường kính khoảng 9 cm.

5.2.3 Máy đo pH, có độ chính xác ± 0,1.

5.3 Dụng cụ để xử lý các mẫu số lượng lớn

5.3.1 Vật chứa bằng nhôm, để cân các mẫu vật liệu.

5.3.2 Cân phân tích, với độ chính xác ± 0,01 g.

5.3.3 Bình thủy tinh, vô trùng, dung tích 250 ml.

5.3.4 Đĩa lắc ngang, 200 r/m.

5.3.5 Máy lắc ống nghiệm, ví dụ máy lắc Vortex.

6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

6.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng các thuốc thử và hoá chất có chất lượng được công nhận "dùng cho vi sinh" hoặc loại tốt hơn. Nước được dùng phải là nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương.

Nên sử dụng các sản phẩm khô có bán sẵn trên thị trường, nếu đáp ứng các yêu cầu đã nêu. Các cơ chất khô được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với việc lấy mẫu bề mặt, có thể sử dụng các đĩa thạch hoặc các dải nhựa dẻo có chứa môi trường thạch có bán sẵn trên thị trường.

6.2 Thạch dichloran 18 % glycerol (DG-18)

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1 – Thành phần của thạch dichlorane 18 % glycerol (DG-18)

Thành phần	Lượng
Pepton[a]	5,0 g
Glucose	10,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline) 0,2 % thể tích trong etanol (100 %)	1,0 ml[a]
Chloramphenicol	0,1 g
Glycerol	220 g[b]
Thạch	15,0 g
Nước cất	1 000 ml

[a] Nồng độ cuối cùng trong môi trường là: 0,002 g/l.

[b] 18 % khối lượng xấp xỉ 1 220 g khối lượng cuối cùng = khoảng 220 g.

[c] Các loại pepton khác nhau của các nhà sản xuất khác nhau được sử dụng (ví dụ: casein pepton, pepton nấm]. Điều này thường không ảnh hưởng đến kết quả định lượng nhưng có thể ảnh hưởng đến hình dạng bên ngoài của khuẩn lạc. Các kiểm chứng dương tính để so sánh độ thu hồi và so sánh hình dạng bên ngoài của khuẩn lạc là rất quan trọng.

Cho các thành phần nhỏ và thạch vào khoảng 800 ml nước và hòa tan bằng cách đun sôi. Thêm nước đến 1000 ml và thêm 220 g glycerol. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở (121 ± 3) °C trong (15 ± 1) min. Sau khi khử trùng, pH phải là 5,6 ± 0,2 ở 25 °C. Phân phối các lượng 20 ml vào các đĩa Petri.

Giữ các đĩa thạch DG-18 trong các túi, nơi tối ở (5 ± 3) °C có thể được một tháng.

CHÚ THÍCH 1: Thạch DG-18 thích hợp cho việc phát hiện một phổ rộng các nấm xerophilic (tức là thích khô). Glycerol làm giảm hoạt độ nước, a_w đến 0,95. Cloramphenicol ức chế vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gram âm. Dichlorane ức chế mọc lan của các khuẩn lạc nấm mốc phát triển nhanh và do đó ngăn ngừa sự mọc lấn át của các khuẩn lạc mọc chậm.

CHÚ THÍCH 2: Tùy thuộc vào hệ thực vật phát triển đồng thời, mà có thể sử dụng các chất kháng sinh khác, ví dụ streptomycin hoặc ampicillin nếu chúng cho thấy không ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Trong trường hợp

sử dụng streptomycin hoặc ampicillin, thì chúng nên được thêm vào thạch DG-18 đã khử trùng ngay trước khi phân phối vào đĩa.

6.3 Thạch chất chiết malt

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 2.

Bảng 2 - Thành phần của thạch chất chiết malt

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

CHÚ THÍCH 1: Có thể cần bổ sung cloramphenicol (0,05 g/l) nếu mẫu chứa nồng độ cao các vi khuẩn.

CHÚ THÍCH 2: Tùy thuộc vào hệ thực vật phát triển đồng thời, mà có thể sử dụng các kháng sinh khác, ví dụ streptomycin hoặc ampicillin nếu chúng cho thấy không ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Trong trường hợp sử dụng streptomycin hoặc ampicillin, thì chúng nên được thêm vào thạch chất chiết malt đã khử trùng ngay trước khi phân phối vào đĩa.

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

Giữ các đĩa thạch chất chiết malt trong các túi, nơi tối ở (5 ± 3) °C có thể được một tháng.

CHÚ THÍCH 3: Nhiều đĩa thạch chất chiết malt với các thành phần khác nhau có bán sẵn trên thị trường. Điều quan trọng là phải kiểm tra các thành phần tương ứng với các thành phần nêu trên.

6.4 Thạch dextrose khoai tây

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 3.

Bảng 3 – Thành phần của thạch dextrose khoai tây

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

CHÚ THÍCH 1: Có thể cần bổ sung cloramphenicol (0,05 g/l) nếu mẫu chứa nồng độ cao các vi khuẩn.

CHÚ THÍCH 2: Tùy thuộc vào hệ thực vật phát triển đồng thời, mà có thể sử dụng các kháng sinh khác, ví dụ streptomycin hoặc ampicillin chúng cho thấy không ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Trong trường hợp sử

dụng streptomycin hoặc ampicillin, thì chúng nên được thêm vào thạch dextrose khoai tây đã khử trùng ngay trước khi phân phối vào đĩa.

Cho các thành phần và thạch vào nước và hòa tan bằng cách đun sôi. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở (115 ± 3) °C trong (10 ± 1) min. Sau khi khử trùng, pH phải là 5,6 ± 0,2 ở 25 °C. Phân phối các lượng 20 ml vào các đĩa Petri.

Giữ các đĩa thạch thạch dextrose khoai tây trong các túi, nơi tối ở (5 ± 3) °C có thể được một tháng.

6.5 Dung dịch đệm pha loãng

Các thành phần được liệt kê trong Bảng 4. Dung dịch đệm pha loãng có chứa đệm phosphate để bù cho các tình trạng axit hoặc kiềm trong mẫu vật liệu.

Bảng 4 – Thành phần của dung dịch đệm pha loãng

Thành phần	Lượng
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	3,52 g
Dinatri hydro phosphat ngậm hai phân tử nước ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$)	7,27 g
Natri clorua (NaCl)	4,30 g
Tween®a 80/(0,01 % thể tích)	0,1 ml
Nước cất	1 000 ml
[a] Tween® là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.	

Cho các thành phần trên vào khoảng 900 ml nước và hòa tan. pH phải là 7,0 ± 0,2 ở 25 °C. Kiểm tra pH và điều chỉnh nếu cần. Thêm nước đến 1 000 ml và phân phối các lượng thích hợp vào các bình và ống dung tích 9 ml. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở (121 ± 3) °C trong (15 ± 1) min.

6.6 Dung dịch nhuộm

Các thành phần của dung dịch nhuộm được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5 - Thành phần của dung dịch nhuộm

Thành phần	Lượng
Xanh cotton	0,5 g
Axit lactic (80 % đến 85 %)	4,0 g
Glycerol	8,0 g
Nước cất	100 ml

Cho các thành phần trong khoảng 100 ml nước và hòa tan.

7 Cách tiến hành

Tùy thuộc vào công việc đo, có thể sử dụng các phương pháp khác nhau quy định trong TCVN 10736-19 (ISO 16000-19) để lấy mẫu và phân tích mẫu vật liệu.

7.1 Lấy mẫu từ bề mặt

7.1.1 Yêu cầu chung

Sử dụng đĩa tiếp xúc trực tiếp (xem 7.1.2) và phương pháp băng dính (xem 7.1.3) để lấy mẫu bề mặt của vật liệu. Ngoài ra, có thể sử dụng gạc vô trùng để lấy mẫu bề mặt mà không thể lấy bằng đĩa thạch [ví dụ: các góc, các khe (xem 7.4)]. Các phương pháp lấy mẫu bề mặt này chỉ cung cấp kết quả bán định lượng. Không báo cáo kết quả đo là "đơn vị khuẩn lạc hình thành (cfu) trên một đơn vị diện tích" vì lớp mốc dày đặc thường hình thành trên các mẫu bề mặt của vật liệu bị nhiễm và một số nấm mốc có thể mọc che khuất hoặc ức chế các loài cạnh tranh. Cách tiếp cận phù hợp hơn là mô tả mật độ trên môi trường nuôi cấy (ví dụ: thưa, cao, lớp dày đặc). Việc nhận dạng các loài nấm mốc cung cấp nhiều thông tin hơn so với việc định lượng. Đối với bề mặt rất sạch (thử nghiệm vô trùng), thì việc định lượng có thể được dự đoán bằng phương pháp đĩa trực tiếp vì không có hoặc có rất ít các khuẩn lạc dự kiến sẽ phát triển trên bề mặt thạch.

7.1.2 Phương pháp đĩa tiếp xúc trực tiếp

Đĩa Petri chuyên dụng (ví dụ: RODAC®) hoặc túi nhựa dẻo chuyên dụng đã được đổ đầy bằng chất môi trường phát triển hơi nhô ra trên mép đĩa được ấn vào vật liệu cần kiểm tra. Thạch DG-18 và thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây được sử dụng đồng thời làm môi trường nuôi cấy. Có thể cần đến các môi trường nuôi cấy khác tùy thuộc vào nhu cầu điều tra.

Vận chuyển các đĩa trên đến phòng thử nghiệm (xem 7.3) và ủ rồi phân tích theo TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

7.1.3 Phương pháp băng dính

Phương pháp băng dính chuyển các nấm mốc từ bề mặt vật liệu sang màng phim có chất kết dính trong suốt. Với mục đích này, ấn băng dính cẩn thận vào bề mặt vật liệu được lấy mẫu và sau đó kéo ra. Dính băng có nấm mốc bám vào kẹp nhựa có bề mặt nổi hạt, đặt vào túi vận chuyển sạch và gửi đến phòng thử nghiệm để phân tích. Ngoài ra, dính băng dính vào một vật kính hiển vi hoặc túi nhựa sạch trong suốt.

CHÚ THÍCH 1: Trong trường hợp chỉ có vài nấm mốc hoặc vật liệu bề mặt dính vào băng, thì việc sử dụng các vật kính hiển vi hoặc túi nhựa trong suốt sạch là không thuận tiện vì nó sẽ rất khó khăn để lấy băng ra mà không bị hỏng.

Mẫu được vận chuyển đến các phòng thử nghiệm (xem 7.3) và phân tích bằng kính hiển vi (xem 7.4).

Phương pháp băng dính và soi trực tiếp vật liệu bằng kính hiển vi cho ưu điểm là sự phát triển nấm mốc nghi ngờ trên các vật liệu có thể được khẳng định bằng cách phát hiện sợi nấm.

7.1.4 Mẫu gạc

Tùy thuộc vào vấn đề được điều tra, mẫu thu được từ bề mặt vật liệu bằng gạc vô trùng khô hoặc ẩm và cấy vạch trên thạch DG-18 và thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây. Có thể cần sử dụng môi trường nuôi cấy khác phụ thuộc vào nhu cầu điều tra. Bằng phương pháp này chỉ thu được các kết quả định tính hoặc bán định lượng (nếu phương pháp lấy mẫu được xác định). Khi dự kiến nồng độ cao, thì mẫu gạc có thể được xử lý bằng cách sử dụng phương pháp tạo huyền phù (xem 7.5), cho chỉ thị về nồng độ nấm có mặt trên diện tích bề mặt được lấy mẫu. So sánh với phương pháp đĩa tiếp xúc trực tiếp, thì quy trình lấy mẫu này có ưu điểm là mẫu có thể được đổ đĩa trên các loại thạch khác nhau đồng thời. Ngoài ra cho phép lấy mẫu các bề mặt không thể lấy được bằng phương pháp đĩa thạch trực tiếp (ví dụ: các góc, khe).

7.2 Lấy mẫu số lượng lớn

Tùy thuộc vào mục tiêu điều tra, các mẫu vật liệu số lượng lớn được phân tích từ toàn bộ vật liệu hoặc từ các lớp vật liệu xác định. Vật liệu cần kiểm tra được lấy ra một cách thích hợp sử dụng các dụng cụ đã khử trùng và đóng gói vào hộp đựng hoặc túi vô trùng.

Tốt nhất, có thể thu lấy các mẫu từ các độ sâu khác nhau bằng cách lấy mẫu lõi khoan đường kính ít nhất 3 cm, tốt nhất 5 cm. Các mẫu lấy từ độ sâu xác định sau đó có thể được lấy ra một cách vô trùng và được phân tích trong phòng thử nghiệm.

Mẫu được vận chuyển đến các phòng thử nghiệm (xem 7.3) và phân tích bằng cách soi trực tiếp bằng kính hiển vi (xem 7.4) hoặc bằng các phương pháp tạo huyền phù (xem 7.4) sau đó được nuôi cấy như mô tả trong TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

7.3 Vận chuyển và bảo quản

Gói các mẫu vật liệu vào vật đựng hoặc túi vô trùng, đặt các đĩa thạch có bề mặt lấy mẫu hướng lên trong hộp kín. Bảo vệ mẫu vật liệu và đĩa thạch khỏi tác động bên ngoài (nắng, ẩm hoặc khô, nóng và bụi, v.v...) và vận chuyển đến các phòng thử nghiệm ngay sau khi lấy mẫu xong. Nhiệt độ vận chuyển không được vượt quá nhiệt độ ủ (25 ± 3) °C. Làm mát trong khi vận chuyển, nếu cần. Chú ý không làm đông lạnh và tránh nhiệt độ quá thấp vì có thể bị ngưng tụ. Ghi lại các điều kiện trong quá trình vận chuyển (nhiệt độ, thời gian). Xử lý mẫu tốt nhất là trong vòng 24 h nhưng không muộn quá 48 h sau khi kết thúc lấy mẫu. Mẫu phải được để trong tủ lạnh ở (5 ± 3) °C cho đến khi xử lý tiếp.

7.4 Soi trực tiếp bằng kính hiển vi

Các mẫu băng dính được dùng để soi trực tiếp bằng kính hiển vi. Các mẫu vật liệu số lượng lớn có thể được phân tích bằng soi trực tiếp dưới kính hiển (ví dụ: các mảnh vật liệu phân huỷ, các mặt cắt

ngang). Việc phân tích dưới kính hiển vi cung cấp các lợi thế là nấm mốc phát triển nghi ngờ trên/trong vật liệu có thể được khẳng định với sự phát hiện sợi nấm.

Các mẫu được nhuộm xanh cotton trong axit lactic (xem 6.6) và được đánh giá dưới kính hiển vi ở độ khuếch đại đến 1000x. Với vật liệu chứa vôi (ví dụ: thạch cao), việc đánh giá sau khi nhuộm màu xanh cotton trong axit lactic thực tế không hợp lý vì bọt khí hình thành do kết quả phản ứng của axit lactic với cacbonat. Trong trường hợp này, phải sử dụng thuốc nhuộm thay thế (ví dụ: xanh anilin).

Khi phân tích các mẫu bề mặt hoặc mẫu số lượng lớn của vật liệu, cần chú ý đến các bào tử có mặt hoặc sợi nấm mốc. Sự có mặt của sợi nấm là chỉ thị của nấm mốc phát triển trên vật liệu trong khi bào tử cũng có thể bắt nguồn từ các nguồn khác.

Việc đánh giá bằng kính hiển vi chỉ cung cấp kết quả bán định lượng. Kết quả được báo cáo là loại (kiểu) bào tử và mảnh sợi nấm được xác định theo tần suất xuất hiện.

7.5 Tạo huyền phù mẫu vật liệu và mẫu gạc

Phương pháp tạo huyền phù chỉ sử dụng vật liệu đồng nhất được tạo huyền phù trong dung dịch đệm (xem 6.5) để giải phóng các nấm mốc ra khỏi vật liệu hoặc gạc bông (xem 7.1.4). Miếng gạc bông được chuyển vào ống nghiệm đựng một lượng xác định dung dịch đệm (xem 6.5) và tạo huyền phù với các bước pha loãng khác. Sau đó, các lượng dung dịch huyền phù được chuyển vào đĩa thạch để nuôi cấy (thạch DG-18 và thạch chất chiết malt hoặc thạch dextrose khoai tây) như trong TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

Mẫu vật liệu được cân, đo và mô tả độ ẩm và các đặc tính khác. Sau đó, cắt/nghiền mẫu thành các miếng < 5 mm. Tùy thuộc vào vật liệu, chuyển 1 g đến 10 g vào bình có vách ngăn vô trùng. Thêm 50 ml đến 100 ml dung dịch đệm pha loãng. Dung dịch đệm dùng để điều chỉnh độ pH mà tại đó phần lớn nấm mốc sẽ ít bị hư hại nhất. Tween 80® được sử dụng để giảm sức căng bề mặt và tạo điều kiện cho việc huyền phù. Chú ý rằng mẫu vật liệu được bao phủ hoàn toàn bằng dung dịch đệm.

Lắc bình ở 200 r/m trong 15 min để giải phóng các bào tử ra khỏi vật liệu.

CHÚ THÍCH: Các túi nhu động đã được chứng minh sử dụng thành công để giải phóng bào tử ra khỏi các mẫu vật liệu. Các kết quả ban đầu từ các nghiên cứu so sánh đã cho thấy độ thu hồi hơi cao hơn khi sử dụng phương pháp này so với phương pháp lắc mô tả trong 7.5.

Dựa trên huyền phù ban đầu, tạo một dãy các độ pha loãng. Ngay trước khi pha loãng, lắc huyền phù 3 lần mỗi lần 3 s trên máy lắc ống nghiệm. Chuyển 1 ml huyền phù vào 9 ml dung dịch đệm pha loãng (xem 6.5), sử dụng pipet dùng một lần vô trùng hoặc pipet thủy tinh nhồi bông. Trong cùng một cách, thực hiện hai bước pha loãng tiếp theo tạo ra các dung dịch pha loãng 1:10; 1:100 và 1:1 000.

Số lượng các bước pha loãng và các khoảng pha loãng cần thích ứng với nồng độ nấm mốc dự kiến và nhu cầu đo cụ thể. Có thể cần thiết lập các bước pha loãng thêm.

Tiếp theo đổ đĩa các lượng huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng, sau đó nuôi cấy và phân tích theo TCVN 10736-17 (ISO 16000-17).

8 Đảm bảo chất lượng

Các phòng thử nghiệm phải thực hiện các biện pháp đảm bảo chất lượng được lập thành văn bản và luôn có sẵn.

9 Biên bản lấy mẫu

Mẫu phải được nhận biết đầy đủ và dán nhãn tương ứng.

Phải điền đầy đủ các thông tin vào biên bản lấy mẫu trước khi (hoặc ngay sau khi) lấy mẫu.

Biên bản lấy mẫu ít nhất phải bao gồm các thông tin sau:

a) Viện dẫn tiêu chuẩn này,

b) Tên và địa chỉ của khách hàng,

c) Nhiệm vụ đo,

d) Loại vật liệu được lấy mẫu,

e) Kiểu thiết bị lấy mẫu được sử dụng

f) Ngày, giờ lấy mẫu và địa điểm lấy mẫu.

10 Đặc tính hiệu năng

Sự phù hợp của phương pháp tạo huyền phù được kiểm tra bằng các phép đo so sánh với thạch DG-18 và thạch chất chiết malt (xem Phụ lục A).

Phụ lục A
(Tham khảo)
Trao đổi mẫu để đánh giá xác nhận phương pháp

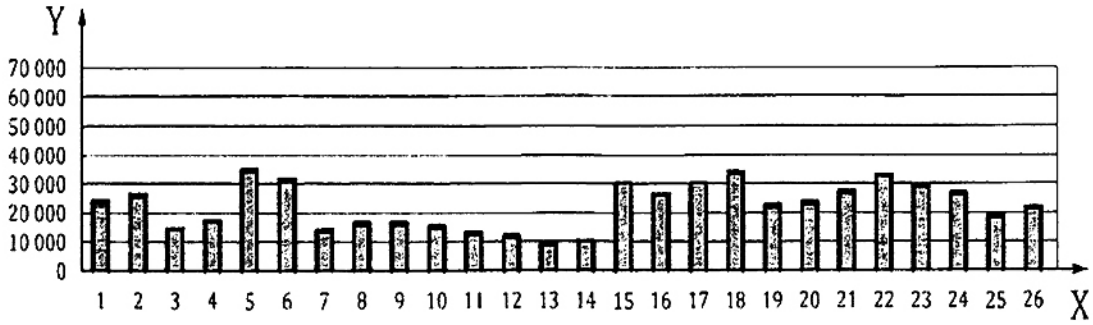
Tính phù hợp của phương pháp lấy mẫu nêu trong tiêu chuẩn này đã được thử nghiệm bằng cách gửi các mẫu từ một loại vật liệu đồng nhất, vật liệu hư hại do ẩm đến tám trong 10 phòng thử nghiệm khác nhau. Một hoặc hai phòng thử nghiệm được yêu cầu phân tích năm mẫu song song để kiểm tra sự phân bố của các loại nấm trong vật liệu. Tất cả các phòng thử nghiệm khác đã phân tích hai mẫu song song.

Một mẫu trao đổi được thực hiện đối với thạch cao với sáu phòng thử nghiệm. Tổng nồng độ của nấm mốc có thể nuôi cấy được, đã được tính theo TCVN 10736-17 (ISO 16000-17) là tương đối thấp [trung bình 502 cfu/g (xem Bảng A.1)]. Độ không đảm bảo đo đối với năm mẫu song song trong một phòng thử nghiệm là 25 % và kết quả của tất cả các phòng thử nghiệm là 33 %.

Một vài thử nghiệm mẫu trao đổi được tiến hành với polystyrene và sợi khoáng. Các phòng thử nghiệm được yêu cầu trình bày các kết quả riêng đối với thạch DG-18 và thạch chất chiết malt. Kết quả điển hình được trình bày trong Hình A.1 đối với thạch DG-18 và trong hình A.2 đối với thạch chất chiết malt. Độ không đảm bảo đo đối với các mẫu song song trong một phòng thử nghiệm nằm trong khoảng từ 10 % đến 20 % và đối với kết quả của tất cả các phòng thử nghiệm là khoảng 30 %.

Bảng A.1 - Kết quả của trao đổi mẫu sử dụng thạch cao

Số của phòng thử nghiệm	**Nồng độ nấm mốc cfu/g vật liệu (kết quả kết hợp của thạch DG-18 và thạch chất chiết malt theo TCVN 10736-17 (ISO 16000-17))**
1	478, 353, 360, 327, 231 350 (trung bình) SD 25 %
2	463
3	355
4	430
5	720
6	695
Trung bình của các phòng thử nghiệm 1 đến 6	502
Độ lệch chuẩn (SD) của phòng thử nghiệm 1 đến phòng thử nghiệm 6	33 %

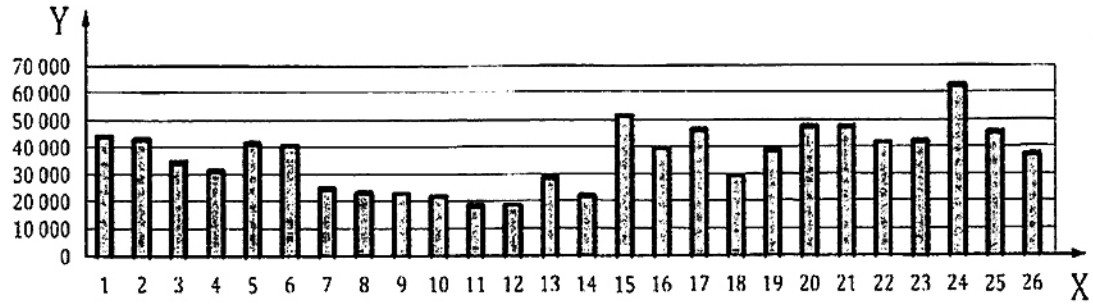


CHÚ DẪN

X số lượng phòng thử nghiệm

Y đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu) trên gam thạch dichlorane glycerol (DG-18)

Hình A.1 – Các kết quả nồng độ nấm mốc (cfu/g DG-18) trong polystyrene trong trao đổi mẫu (số 1 đến 26 chỉ ra các phòng thử nghiệm và các mẫu song song)



CHÚ DẪN

X số lượng phòng thử nghiệm

Y đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu) trên gam thạch chất chiết malt ((MEA)

Hình A.2 – Các kết quả nồng độ nấm mốc (cfu/g MEA) trong polystyrene trong trao đổi mẫu (số 1 đến 26 chỉ ra các phòng thử nghiệm và các mẫu song song)

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 10736-16 (ISO 16000-16), *Không khí trong nhà – Phần 16: Phát hiện và đếm nấm mốc – Lấy mẫu bằng cách lọc.*

[2] VDI 4300 *Part 10,Messen von Innenraumluftverunreinigungen — Messstrategien bei der Untersuchung von Schimmelpilzen im Innenraum* [Measurement of indoor air pollution — Measurement strategies for determination of mould fungi in indoor environment]

[3] EN 13098, *Workplace atmospheres — Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin*