МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 16000-21— 2016

ВОЗДУХ ЗАМКНУТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

Часть 21

Обнаружение и подсчет плесневых грибков. Отбор проб из материала

(ISO 16000-21:2013, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Научно-исследовательский центр контроля и диагностики технических систем» (АО «НИЦ КД») на основе собственного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 22 ноября 2016 г № 93-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Грузия	GE	Грузстандарт
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 февраля 2017 г. № 40-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 16000-21—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 декабря 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 16000-21:2013 «Воздух замкнутых помещений. Часть 21. Обнаружение и подсчет плесневых грибков. Отбор проб из материала» («Indoor air — Part 21: Detection and enumeration of moulds — Sampling from materials», IDT)

Международный стандарт разработан подкомитетом ISO/TC 146/SC 6 «Воздух замкнутых помещений» технического комитета по стандартизации ISO/TC 146 «Качество воздуха» Международной организации по стандартизации (ISO).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии.

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомления и тексты также размещаются в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2017

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 1
4 Основные положения . . . 2
5 Оборудование и материалы . . . 2
5.1 Оборудование для отбора проб . . . 2
5.2 Оборудование для подготовки чашек Петри с агаровой средой . . . 2
5.3 Оборудование для проведения отбора проб сыпучих материалов . . . 2
6 Питательная среда для культур и реактивы . . . 2
6.1 Общие положения . . . 2
6.2 18 %-ный дихлоранглицериновый агар (DG-18) . . . 3
6.3 Агар на солодовом экстракте . . . 3
6.4 Картофельный агар с декстрозой . . . 4
6.5 Буферный раствор . . . 4
6.6 Окрашивающий раствор . . . 5
7 Метод определения и подсчета . . . 5
7.1 Отбор проб с поверхности . . . 5
7.2 Отбор проб сыпучего материала . . . 6
7.3 Транспортирование и хранение проб . . . 6
7.4 Прямая микроскопия . . . 6
7.5 Суспендирование материала и проб-мазков . . . 7
8 Обеспечение качества . . . 7
9 Протокол отбора проб . . . 7
10 Характеристики эффективности . . . 8
Приложение А (справочное) Результаты испытаний, проведенных при валидации метода . . . 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам . . . 11
Библиография . . . 12

Введение

Плесень — общее название нитевидных грибков, принадлежащих к различным таксономическим группам (аскомицеты, зигомицеты и их анаморфные состояния, ранее известные как дейтеромицеты или несовершенные грибы). Они образуют мицелий и споры, по которым их можно визуально обнаружить с помощью микроскопа. Диаметр большинства спор составляет от 2 до 10 мкм, некоторые имеют размер до 30 мкм, и только немногие достигают в диаметре 100 мкм. Споры грибков некоторых видов малы и очень легко попадают в воздух (например, аспергилл, пенициллин), а других — имеют большие размеры и/или покрыты слизью (стахиботрикс, фузариум) и не так подвижны.

Споры грибков широко распространены в окружающей среде, и поэтому в разном количестве они также встречаются в замкнутых помещениях. Рост плесени в замкнутых помещениях следует рассматривать как проблему, касающуюся здоровья обитателей помещений, поскольку результаты эпидемиологических исследований подтвердили тесную взаимосвязь между сыростью и/или ростом плесени в домах и ухудшением здоровья их обитателей.

Согласованные методы отбора проб, обнаружения и подсчета плесневых грибков и в том числе стандарты, устанавливающие методы отбора проб, важны для сравнительной оценки грибков в воздухе замкнутого помещения. Перед проведением любых измерений должен быть составлен план для методики измерений.

Настоящий стандарт устанавливает методику отбора проб плесневых грибков из строительных материалов.

Методика, установленная в настоящем стандарте, основана на VDI 4300 часть 10.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ВОЗДУХ ЗАМКНУТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

Часть 21

Обнаружение и подсчет плесневых грибков. Отбор проб из материала

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

Дата введения — 2017—12—01

1 Область применения

В настоящем стандарте установлены требования к отбору проб плесневых грибков из строительных материалов. Следуя приведенным ниже инструкциям, получают пробы, пригодные для микроскопии или для дальнейшего определения плесневых грибков культивированием в соответствии с ISO 16000-17.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована ссылка на следующий международный стандарт:

ISO 16000-17, Indoor air — Detection and enumeration of moulds — Culture based method (Воздух замкнутых помещений. Часть 17. Обнаружение и подсчет числа плесневых грибков. Метод культивирования)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **колониеобразующая единица; КОЕ** (colony forming unit; CFU): Единица, в которой выражают число микроорганизмов, способных к образованию культур.

[EN 13098:2000]

Примечания

1 Одна колониеобразующая единица может происходить от одного отдельного микроорганизма, агрегатов нескольких микроорганизмов, а также от одного или нескольких микроорганизмов, присоединившихся к частице.

2 Число колоний может зависеть от условий культивирования.

3.2 **культивирование <качество воздуха>** (cultivation <air quality>): Выращивание микроорганизмов на питательной среде.

[ISO 16000-16:2008, 3.6]

3.3 **нитевидный грибок** (filamentous fungus): Грибок, растущий в форме нитевидных клеток — гифов.

Примечание — Термин «нитевидные грибки» необходим для различения грибков и дрожжевых грибков.

[ISO 16000-16:2008, 3.3]

3.4 **микроорганизм** (microorganism): Любая микробиологическая форма, клеточная или неклеточная, способная к репликации или переносу генетического материала или формы, утратившие эти свойства.

[EN 13098:2000]

Издание официальное

3.5 **плесневые грибки <качество воздуха>** (mould <air quality>): Нитевидные грибки, принадлежащие нескольким таксономическим группам, а именно аскомицеты, зигомицеты и их анаморфные состояния, ранее известные как дейтеромицеты или несовершенные грибы.

Примечание — Плесневые грибки образуют споры различного вида в зависимости от того, к какой таксономической группе они принадлежат, а именно конидиоспоры (конидиа), спорангиоспоры и аскоспоры.

3.6 **мицелий** (mycelium): Разветвленная сеть грибковых гифов.
[ISO/TS 10832:2009, 3.5]

4 Основные положения

Зараженные плесенью материалы исследуют, отбирая пробы либо с поверхности (см. 7.1), либо из объема (см. 7.2), т. е. проводят исследование всего материала или определенных более глубоких слоев. Используемый метод зависит от цели исследования, как приведено в ISO 16000-19. Отбор проб с поверхности проводят с использованием контактных пластин (см. 7.1.2), метода снятия пленки (см. 7.1.3.) или методом проб-мазков (см. 7.1.4). После отбора проб споры плесневых грибков могут быть проанализированы прямой микроскопией (см. 7.4) или обработаны и культивированы с применением метода суспендирования (см. 7.5).

5 Оборудование и материалы

Используют обычное микробиологическое лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 Оборудование для отбора проб

5.1.1 Чашка Петри с агаровой средой или пластинки из эластичного пластика, содержащие агар DG-18, агар на солодовом экстракте или картофельный агар с декстрозой (см. 6) с питательной средой, немного выступающей над краем.

5.1.2 Хлопковые тампоны, стерильные, для взятия проб-мазков.

5.1.3 Контейнеры для защиты чашек Петри с агаровой средой и материала проб при транспортировании, например, пластиковые эластичные емкости.

5.1.4 Дезинфицирующее средство, например, изопропанол или этанол (с объемной долей основного вещества 70 %) для дезинфекции инструментов для отбора проб.

5.1.5 Бур, продезинфицированный, диаметром, по крайней мере, 3 см, предпочтительно 5 см, для взятия определенных образцов из материала.

5.1.6 Изотермический/охлаждаемый контейнер для транспортирования чашек Петри с агаровой средой и материалом проб при температуре ниже 25 °С.

5.1.7 Инструменты для отбора проб, стерильные, для отбора проб сыпучих материалов на различных глубинах, например, лопаточки, ложки, ножи, буровое оборудование.

5.2 Оборудование для подготовки чашек Петри с агаровой средой

5.2.1 Автоклав, работающий при температурах (121 ± 3) °С и (115 ± 3) °С.

5.2.2 Чашки Петри с вентиляционным отверстием, стерильные, диаметром приблизительно 9 см.

5.2.3 pH-метр с пределом допускаемой погрешности ±0,1 единицы pH.

5.3 Оборудование для проведения отбора проб сыпучих материалов

5.3.1 Алюминиевый контейнер для взвешивания материала проб.

5.3.2 Аналитические весы, с пределом допускаемой погрешности ±0,1 г.

5.3.3 Стеклянная колба, колба с перегородками, стерильная, 250 мл.

5.3.4 Установка для встряхивания, горизонтальная, 200 об/мин.

5.3.5 Мешалка для пробирок, например, с режимом встряхивания.

6 Питательная среда для культур и реактивы

6.1 Общие положения

Все реактивы и химические вещества должны быть известной степени чистоты «химически чистый» («х.ч.») или выше. Следует использовать дистиллированную воду или воду эквивалентной чистоты.

Рекомендуется использовать серийно выпускаемые обезвоженные подложки при условии, что они соответствуют установленным требованиям. Эти обезвоженные подложки готовят в соответствии с

инструкциями изготовителя. Чашки Петри с агаровой средой или пластинки из эластичного пластика при отборе проб с поверхности также должны быть серийно выпускаемыми.

6.2 18 %-ный дихлоранглицериновый агар (DG-18)

Состав агара приведен в таблице 1.

Таблица 1 — Состав 18 %-ого дихлоранглицеринового агара (агар DG-18)

Компонент	Количество
Пептон[a)]	5,0 г
Глюкоза	10,0 г
Дигидрофосфат калия (KH_2PO_4)	1,0 г
Сульфат магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5 г
Раствор дихлорана (2,6-дихлоро-4-нитроанилин) в этаноле с объемной долей 0,2 %	1,0 мл[b)]
Хлорамфеникол	0,1 г
Глицерин	220 г[c)]
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

[a)] Разные изготовители применяют различные пептоны (например, казеиновый, микологический). Обычно это не влияет на количественные результаты измерений, но может влиять на внешний вид колоний. Поэтому необходим положительный контроль для сравнения извлечения и морфологического вида колоний.

[b)] Итоговое содержание в среде: 0,002 г/л.

[c)] Массовая доля вещества 18 %, что соответствует содержанию 220 г глицерина в 1220 г раствора.

Вносят вспомогательные ингредиенты и агар в 800 мл воды и при кипячении растворяют. Доводят водой до метки 1000 мл и добавляют 220 г глицерина. Стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин. После стерилизации pH должен быть в пределах 5,6 ± 0,2 при 25 °С. Переносят аликвоты объемом приблизительно 20 мл в чашки Петри.

Чашки с агаром DG-18, упакованные в пакеты, можно хранить в темном месте при температуре (15 ± 3) °С в течение недели.

Примечания

1 Агар DG-18 подходит для обнаружения широкого спектра ксерофильных грибков (т.е. грибков, предпочитающих сухость). Глицерин понижает активность воды до 0,95. Хлорамфеникол подавляет деятельность бактерий, особенно грамм-отрицательных. Дихлоран подавляет распространение быстрорастущих колоний плесневых грибков, тем самым обеспечивая возможность роста медленно растущих колоний.

2 В зависимости от сопутствующей флоры могут быть использованы другие антибиотики, например, стрептомицин или ампициллин, при условии, что они не оказывают влияние на результаты испытаний. В случае использования стрептомицина или ампициллина эти антибиотики должны быть введены в стерилизованный агар DG-18 перед переносом.

6.3 Агар на солодовом экстракте

Состав агара приведен в таблице 2.

Таблица 2 — Состав агара на солодовом экстракте

Компонент	Количество
Солодовый экстракт	30,0 г
Соевый пептон	3,0 г
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Примечания

1 Если пробы содержат большое число бактерий, может потребоваться добавление хлорамфеникола (0,05 г/л).

2 В зависимости от сопутствующей флоры могут быть использованы другие антибиотики, например, стрептомицин или ампициллин, при условии, что они не оказывают влияние на результаты испытаний. В случае использования стрептомицина или ампициллина эти антибиотики должны быть введены в стерилизованный агар на солодовом экстракте перед переносом.

Агар и вспомогательные компоненты растворяют в воде при кипячении. Стерилизуют в автоклаве при температуре (115 ± 3) °С в течение (10 ± 1) мин. После стерилизации pH должен быть в пределах 5,5 ± 0,2 при 25 °С. Переносят аликвоты объемом приблизительно 20 мл в чашки Петри.

Чашки с агаром на солодовом экстракте, упакованные в пакеты, хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С в течение месяца.

Примечание — Серийно выпускают агар на солодовом экстракте различного состава. Важно убедиться в том, что он соответствует составу приведенному выше.

6.4 Картофельный агар с декстрозой

Состав агара приведен в таблице 3.

Таблица 3 — Состав картофельного агара с декстрозой

Компонент	Количество
Картофельный экстракт	4,0 г
Глюкоза	20,0 г
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Примечания

1 Если пробы содержат большое число бактерий, может потребоваться добавление хлорамфеникола (0,05 г/л).

2 В зависимости от сопутствующей флоры могут быть использованы другие антибиотики, например, стрептомицин или ампициллин, при условии, что они не оказывают влияние на результаты испытаний. В случае использования стрептомицина или ампициллина эти антибиотики должны быть введены в стерилизованный картофельный агар с декстрозой перед переносом.

Агар и вспомогательные компоненты растворяют в воде при кипячении. Стерилизуют в автоклаве при температуре (115 ± 3) °С в течение (10 ±) мин. После стерилизации pH должен быть в пределах 5,6 ± 0,2 при 25 °С. Переносят аликвоты объемом приблизительно 20 мл в чашки Петри.

Чашки с картофельным агаром с декстрозой, упакованные в пакеты, можно хранить в темном месте при температуре (5 ± 3) °С в течение месяца.

6.5 Буферный раствор

Состав буферного раствора приведен в таблице 4. Буферный раствор содержит фосфаты для компенсации кислотной или щелочной среды в материале пробы.

Таблица 4 — Состав буферного раствора

Компонент	Количество
Дигидрофосфат калия (KH_2PO_4)	3,52 г
Сульфат магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	7,27 г
Хлорид натрия (NaCl)	4,30 г
Tween® [a] 80 (с объемным содержанием основного вещества 0,01 %)	0,1 мл
Дистиллированная вода	1000 мл
[a] Tween® является примером подходящей серийно выпускаемой продукции. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO данной продукции.	

Вносят все компоненты в примерно 900 мл воды и растворяют. Значение pH должно быть в пределах 7,0 ± 0,2 при 25 °С. Проверяют и корректируют pH, при необходимости. Доводят водой до метки 1000 мл и переносят соответствующие аликвоты в колбы и аликвоты объемом 9 мл в пробирки. Стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин.

6.6 Окрашивающий раствор

Состав окрашивающего раствора приведен в таблице 5.

Таблица 5 — Состав окрашивающего раствора

Компонент	Количество
Лактофенол хлопковый голубой	0,5 г
Молочная кислота (80—85 %)	4,0 г
Глицерин	8,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Вносят все компоненты в 100 мл воды и растворяют.

7 Метод определения и подсчета

В зависимости от задачи измерений могут быть применены различные методы отбора проб и анализа материалов, как определено в ISO 16000-19.

7.1 Отбор проб с поверхности

7.1.1 Общие положения

Напрямую методы контактных пластин (см. 7.1.2) и снятия пленки (см. 7.1.3) применяют для отбора проб с поверхности материала. Кроме того, для отбора проб с поверхности материала могут быть использованы стерильные тампоны в случаях, когда поверхность недоступна для использования пластин с агаровой средой [например, углы, щели (см. 7.1.4)]. Эти методы отбора проб с поверхности обеспечивают только полуколичественные результаты. Представлять результаты измерений в единицах «колониеобразующая единица (КОЕ) на единицу площади» не рекомендуется, поскольку на поверхности проб пораженных материалов образуется плотный слой плесневых грибков, и некоторые грибки могут перерасти или замедлить рост конкурирующих видов. Более приемлемым способом является описание плотности популяции на питательной среде (например, спорадический, высокий, плотный слой). Идентификация видов плесневых грибков предоставляет больше информации в сравнении с количественной оценкой. Для очень чистых поверхностей (исследование на стерильность) количественная оценка прямым методом контактных пластин может не понадобиться, если прогнозируют отсутствие или наличие очень малого количества колоний, выросших на поверхности агара.

7.1.2 Метод контактных пластин

Специализированные чашки Петри (например, RODAC®[1)]) или специализированные полиэтиленовые емкости наполняют таким образом, чтобы питательная среда, немного выступающая над их краем, была прижата к материалу в исследуемом месте. В качестве питательной среды используют агар DG-18, агар на солодовом экстракте или картофельный агар с декстрозой. В зависимости от поставленной задачи может понадобиться другая питательная среда.

Чашки Петри транспортируют в лабораторию (см. 7.3), культивируют плесневые грибки и анализируют их в соответствии с ISO 16000-17.

[1)] Торговое наименование продукции, серийно выпускаемой различными изготовителями. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ИСО данной продукции. Допускается использовать другую продукцию, если с ее помощью можно получить аналогичные результаты.

7.1.3 Метод снятия пленки

Методом снятия пленки плесневые грибки переносят с поверхности материала на прозрачную клейкую ленту. Для этих целей следует плотно прижать пленку клейкой стороной к поверхности материала, с которого необходимо отобрать пробу, и затем разделить их. Пленку с отобранными плесневыми грибками прикрепляют к пластиковой папке для документов с зернистой поверхностью, помещают ее в чистый пакет для транспортирования и отправляют в лабораторию для анализа. В качестве альтернативы пленку с отобранными плесневыми грибками прикрепляют к предметному стеклу или к чистому прозрачному полиэтиленовому пакету.

Примечание — В случае если только несколько плесневых грибков или частиц поверхности материала приклеились к пленке, использование предметных стекол или чистых прозрачных полиэтиленовых пакетов не допустимо, поскольку будет трудно удалить пленку без деформаций или разрывов на ней.

Отобранные пробы транспортируют в лабораторию (см. 7.3) и анализируют под микроскопом (см. 7.4).

Методы снятия пленки и прямой микроскопии обладают преимуществом, заключающимся в том, что предполагаемый рост плесневых грибков на материале может быть подтвержден обнаружением мицелия.

7.1.4 Пробы-мазки

В зависимости от исследуемой проблемы пробу с поверхности материала отбирают сухим или влажным стерильным тампоном и затем проводят им по поверхности агара DG-18, агара на солодовом экстракте или картофельного агара с декстрозой. В зависимости от поставленной задачи может понадобиться другая питательная среда. Таким методом можно получить только качественные или полуколичественные (если метод отбора проб определен) результаты. Когда ожидают высокое содержание плесневых грибков, проба-мазок может быть обработана с применением метода суспендирования (см. 7.5), что дает показатель содержания плесневых грибков, присутствующих на поверхности в месте отбора проб. По сравнению с прямым методом контактных пластин этот метод имеет преимущество в том, что проба может выращиваться на двух питательных средах параллельно. Кроме того, этот метод позволяет отбирать пробы, когда поверхность недоступна для использования пластин с агаровой средой (например, углы, щели).

7.2 Отбор проб сыпучего материала

В зависимости от цели исследования сыпучих материалов, их анализируют, отобрав пробы во всем объеме материала или из определенных слоев. Исследуемый материал вынимают подходящим способом с использованием стерилизованных инструментов и упаковывают в стерильные контейнеры или эластичные емкости.

Наиболее оптимальным вариантом получения пробы является отбор на разной глубине образцов диаметром 3—5 см. Пробы на определенной глубине впоследствии могут быть отобраны с соблюдением стерильных условий и проанализированы в лаборатории.

Отобранные пробы транспортируют в лабораторию (см. 7.3) и анализируют либо методом прямой микроскопии (см. 7.4), либо методом суспендирования (см. 7.5), сопровождаемым культивированием, как установлено в ISO 16000-17.

7.3 Транспортирование и хранение проб

Материал проб упаковывают в стерильные контейнеры или эластичные емкости; чашки Петри с агаровой средой, на которую проводят отбор проб, — в закрытые контейнеры. Материал проб и чашки Петри с агаровой средой предохраняют от всяческих воздействий (солнечный свет, избыточная влажность или высушивание, высокая температура, пыль и т. д.) и транспортируют в лабораторию сразу же после отбора проб. Температура при транспортировании не должна превышать температуру периода инкубации, которая составляет (25 ± 3) °С. При необходимости во время транспортирования пробы охлаждают. Следует следить за тем, чтобы не заморозить пробы, и избегать очень низких температур ввиду возможности уплотнения материала пробы. Условия при транспортировании пробы (температура, продолжительность) должны быть задокументированы. Провести анализ отобранных проб следует в течение 24 ч, но не позднее 48 ч, после окончания отбора проб. До последующей обработки пробы следует хранить в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

7.4 Прямая микроскопия

Пробы, отобранные снятием пленки, используют для прямой микроскопии. Пробы сыпучих материалов могут быть проанализированы прямой микроскопией путем предварительной подготовки проб материала (например, дробление частей материала, поперечный разрез, подготовка промыванием).

Микроскопический анализ обладает преимуществом, заключающимся в том, что предполагаемый рост плесневых грибков на материале может быть подтвержден обнаружением мицелия.

Пробы окрашивают раствором хлопкового голубого в молочной кислоте (см. 6.6) и оценивают под микроскопом не более чем при тысячекратном увеличении. В случае известь-содержащих материалов (например, штукатурки) оценка после окрашивания с использованием хлопкового голубого в молочной кислоте практически не осуществима из-за пузырьков газа, образующихся в результате реакции молочной кислоты с карбонатами. В этом случае следует использовать альтернативный краситель (например, анилиновый синий).

При анализе проб с поверхности или проб сыпучего материала следует обратить внимание, присутствуют ли в пробе только споры или также мицелий плесневых грибков. Наличие мицелия является показателем роста грибков на/в материале, в то время как споры могут попасть в пробу из других источников.

Оценка методом микроскопии обеспечивает только полуколичественные результаты. Как результат в протокол заносят типы спор и фрагментов мицелия, установленных в порядке частоты их нахождения.

7.5 Суспендирование материала и проб-мазков

Метод суспендирования используют для гомогенизации материала, который суспендируют в буферном растворе (см. 6.5) для отделения плесневых грибков от материала или хлопкового тампона (см. 7.1.4). Хлопковый тампон помещают в пробирку с определенным объемом буферного раствора (см. 6.5) и путем различных разбавлений получают суспензию. Впоследствии, аликвоты суспензии переносят на чашки Петри с агаровой средой для культивирования (агар DG-18, агар на солодовом экстракте или картофельный агар с декстрозой), как установлено в ISO 16000-17.

Пробу материала взвешивают, оценивают и описывают с точки зрения влажности и других особенностей. Впоследствии пробу разрезают/дробят на части размером менее 5 мм. В зависимости от материала переносят от 1 до 10 г пробы в стерильную мерную колбу. Вносят 50—100 мл буферного раствора. Буферный раствор служит для поддержания такого уровня pH, при котором большинству плесневых грибков будет нанесен минимальный ущерб. Для снижения поверхностного натяжения и образования суспензии используют Tween 80®. Необходимо следить, чтобы проба была полностью покрыта буферным раствором.

Колбу встряхивают в течение 15 минут при 200 об/мин для отделения спор от материала.

Примечание — Для отделения спор от проб материалов успешно используют сочетание процессов разрушения и перемешивания. Предварительные результаты сравнительных исследований показали более высокое извлечение с их применением по сравнению с методом встряхивания, описанным в 7.5.

На основе исходной суспензии готовят серию разведений. Непосредственно перед этим суспензию встряхивают на мешалке для пробирок, по схеме 3×3 сек. Добавляют 1 мл суспензии к 9 мл буферного раствора (см. 6.5) стерильной одноразовой пипеткой или стеклянной пипеткой с хлопковым фильтром. Аналогичным образом проводят дальнейшее разбавление до 1:10, 1:100 и 1:1000.

Число этапов разбавления и коэффициенты разбавления должны быть подобраны в соответствии с ожидаемым содержанием спор плесневых грибков и конкретной целью измерений. Могут потребоваться дополнительные этапы разбавления.

Последующий посев аликвот исходной и разбавленной суспензии, культивирование и дальнейший анализ, проводят в соответствии с ISO 16000-17.

8 Обеспечение качества

Лаборатория должна иметь оформленное документально руководство по качеству, находящееся в свободном доступе для сотрудников.

9 Протокол отбора проб

Маркируют пробы для их однозначной идентификации.

Заполняют протокол отбора проб для каждой пробы перед ее отбором (или сразу после отбора).

Протокол должен содержать, по крайней мере, следующую информацию:

а) ссылку на настоящий стандарт;

b) ФИО и адрес заказчика;
c) цель измерений;
d) тип отобранного материла;
e) тип применяемого устройства отбора проб;
f) дату, время, описание места отбора пробы.

10 Характеристики эффективности

Пригодность метода изначально была проверена на основе сравнительных измерений с применением агара DG-18 и агара на солодовом экстракте (см. приложение А).

Приложение А
(справочное)

Результаты испытаний, проведенных при валидации метода

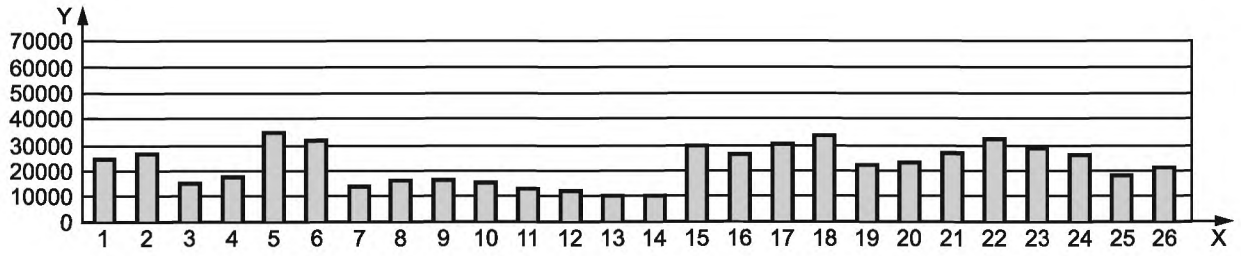
Пригодность метода отбора проб, установленного в настоящем стандарте, была проверена путем отправления проб, отобранных из гомогенизированного поврежденного влажностью материала, в 8—10 различных лабораторий. Одной или двум из этих лабораторий было предложено провести параллельный анализ пяти проб для проверки распределения грибков в материале. Оставшиеся лаборатории проводили параллельный анализ двух проб.

Один результат испытаний был получен шестью лабораториями для штукатурки. Суммарное содержание культивируемых грибков, рассчитанное согласно ISO 16000-17, было относительно низким [среднее значение 502 КОЕ/г (см. таблица А.1)]. Погрешность измерения для пяти параллельных проб в одной лаборатории составила 25 % и для результатов всех лабораторий — 33 %.

Несколько результатов испытаний было получено для полистирола и минерального волокна. Лабораториям было предложено представить результаты отдельно для агара DG-18 и для агара на солодовом экстракте. Типичные результаты представлены на рисунке А.1 для агара DG-18 и на рисунке А.2 для агара на солодовом экстракте. Погрешность измерений для параллельного анализа проб в одной лаборатории находилась в диапазоне от 10 % до 20 % и для результатов всех лабораторий — приблизительно 30 %.

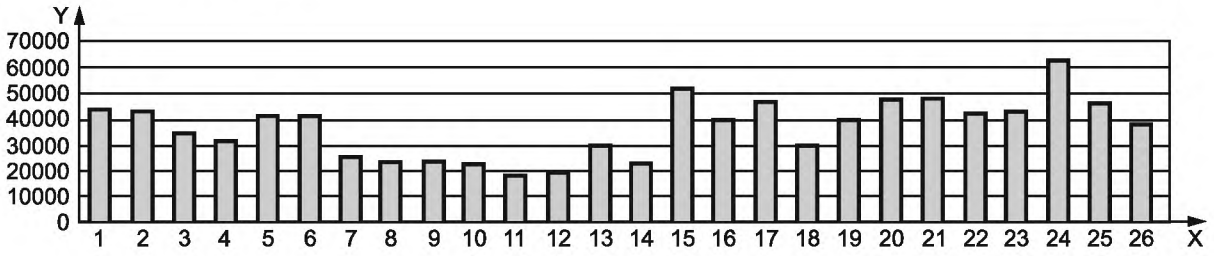
Таблица А.1 — Результаты испытаний с использованием штукатурки

Номер лаборатории	Содержание грибков в материале, КОЕ/г (суммарный результат для агара DG-18 и для агара на солодовом экстракте)
1	478, 353, 360, 327, 231 350 (среднее) со стандартным отклонением 25 %
2	463
3	355
4	430
5	720
6	695
Среднее значение, полученное лабораториями 1-6	502
Стандартное отклонение измерений лабораторий 1-6	33 %



X — номер лаборатории, Y — колониеобразующая единица (КОЕ) на грамм дихлоранглицеринового агара (DG-18)

Рисунок А.1 — Результат содержания грибков (КОЕ/г DG-18) в полистироле по время испытаний (номера от 1 до 26 обозначают лаборатории и параллельные пробы)



X — номер лаборатории, Y — колониеобразующая единица (КОЕ) на грамм агара на солодковом экстракте (MEA)

Рисунок А.2 — Результат содержания грибков (КОЕ/г MEA) в полистироле во время испытаний (номера от 1 до 26 обозначают лаборатории и параллельные пробы)

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 16000-17	—	*,1)
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод данного международного стандарта на русский язык.		

1) В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 16000-17—2012 «Воздух замкнутых помещений. Часть 17. Обнаружение и подсчет числа плесневых грибков. Метод культивирования»

Библиография

[1] ISO 16000-16 — *Indoor air — Part 16: Detection and enumeration of moulds — Sampling by filtration*

[2] VDI 4300 Part 10 — *Messen von Innenraumluftverunreinigungen — Messstrategien zum Nachweis von Schimmelpilzen im Innenraum* [*Measurement of indoor air pollution — Measurement strategies for determination of mould fungi in indoor environment*] (Методики количественного определения плесневых грибков в воздухе замкнутых помещений)

[3] EN 13098 — *Workplace atmosphere — Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin* (Воздух рабочей зоны. Руководство по измерению содержания взвешенных в воздухе микроорганизмов и эндотоксинов)

УДК 504.3:006.354 МКС 13.040.20 Т58

Ключевые слова: воздух замкнутых помещений, качество воздуха, обнаружение, подсчет, плесневые грибки, культивирование, нитевидный грибок, микроорганизм

Редактор *Л.Б. Базякина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 13.02.2017. Подписано в печать 21.02.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10. Тираж 28 экз. Зак. 379.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru