



# TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN xxx : 2024

(Bản dự thảo xin ý kiến)

**SƠN VÀ LỚP PHỦ - PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM  
MỐC BẰNG THỬ NGHIỆM GIA TỐC 4 TUẦN TRÊN ĐĨA THẠCH”**

**Paints and coatings - Standard Test Method for Determining the Fungal  
Resistance by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay**

HÀ NỘI – 2024



**Lời nói đầu**

TCVN xxxx:2024 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ASTM D 5590-17, Standard test method for determining the resistance of paint films and related coatings to fungal defacement by accelerated four-week agar plate assay.

TCVN xxxx:2024 do Viện Kỹ thuật nhiệt đới – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam biên soạn, Bộ Xây dựng đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## SƠN VÀ LỚP PHỦ - PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM MỐC BẰNG THỬ NGHIỆM GIA TỐC 4 TUẦN TRÊN ĐĨA THẠCH"

*Paints and coatings - Standard Test Method for Determining the Fungal Resistance by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay*

**CẢNH BÁO:** Chỉ những người được đào tạo về kỹ thuật vi sinh mới được thực hiện các phép thử về vi sinh. Các quá trình thực hiện phải kiểm tra nghiêm ngặt khâu vệ sinh cá nhân, khử trùng.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thử nghiệm gia tốc để xác định khả năng ngăn chặn sự phát triển của nấm mốc đối với sơn hoặc lớp phủ hữu cơ.

Tiêu chuẩn này không đề cập đến tất cả các vấn đề liên quan đến an toàn khi sử dụng. Người sử dụng tiêu chuẩn này có trách nhiệm thiết lập các nguyên tắc về an toàn và bảo vệ sức khỏe cũng như khả năng áp dụng phù hợp với giới hạn quy định

### 2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 1058:1978, *Hóa chất - Phân nhóm và ký hiệu mức độ tinh khiết.*

TCVN 2094:1993, *Phương pháp gia công màng.*

TCVN 9760:2013 (ISO 2808:2007), *Sơn và vecni - Xác định độ dày màng.*

D3273-21, *Standard test method for resistance to growth of mold on the surface of interior coatings in an environmental chamber (Phương pháp kiểm tra khả năng chống lại sự phát triển của nấm mốc trên bề mặt của lớp phủ bên trong trong tủ môi trường).*

D3456-18, *Standard practice for determining by exterior exposure tests the susceptibility of paint films to microbiological attack (Quy trình xác định khả năng tấn công của vi sinh vật lên màng sơn bằng phương pháp phơi nhiễm ngoài trời).*

TCVN 11608-2:2016 (ISO 16474-2:2013), *Sơn và vecni - Phương pháp phơi nhiễm với nguồn sáng phòng thử nghiệm - Phần 2: Đèn hồ quang xenon.*

TCVN 11608-3:2016 (ISO 16474-3:2013), *Sơn và vecni - Phương pháp phơi nhiễm với nguồn sáng phòng thử nghiệm - Phần 3: Đèn huỳnh quang UV.*

ASTM G21-15, *Standard practice for determining resistance of synthetic polymeric materials to fungi (Phương pháp xác định khả năng kháng nấm mốc của vật liệu polyme tổng hợp).*

### 3 Nguyên vật liệu

#### 3.1 Chủng nấm mốc dùng để thử nghiệm

Cả hai chủng nấm mốc sau sẽ được sử dụng:

a) *Aspergillus niger*

b) *Chaetomium globosum*

Ngoài hai loại trên, các loại khác cũng có thể được sử dụng nếu được yêu cầu. Trường hợp sử dụng loại chủng nấm mốc khác thì trong báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ loài chủng nấm mốc và lý do sử dụng chúng.

### 3.2 Môi trường nuôi cấy và pha loãng

Sử dụng nước cất hoặc nước có độ sạch tương đương và hơn.

Tất cả hóa chất phải là hóa chất phân tích (theo TCVN 1058:1978).

#### 3.2.1 Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy potato dextrose agar (PDA) và Malt Agar sẽ được sử dụng. Các môi trường này có thể nhận được từ các nhà cung cấp thương mại ở dạng đĩa chuẩn bị sẵn hoặc dạng bột và phải làm theo hướng dẫn của nhà cung cấp khi sử dụng.

Môi trường nuôi cấy cũng có thể là agar muối dinh dưỡng. Môi trường này được chuẩn bị bằng cách trộn các thành phần sau trong nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương:

- Kali dihydro photphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,7 g/L
- Magie sulphat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,7 g/L
- Amoni nitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 1,0 g/L
- Natri clorua ( $\text{NaCl}$ ) 0,005 g/L
- Sắt (II) sulphat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,002 g/L
- Kẽm sulphat ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,002 g/L
- Magie sulphat ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0,001 g/L
- Agar 15.0 g/L
- Kali hydro photphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0,7 g/L

#### 3.2.2 Dung dịch muối dinh dưỡng

Dung dịch muối dinh dưỡng được chuẩn bị tương tự như môi trường nuôi cấy agar muối dinh dưỡng (xem 3.2.1) nhưng không có agar.

## 4 Thiết bị, dụng cụ

Trừ khi có quy định riêng khác, các thiết bị, dụng cụ sau được sử dụng:

- Cân phân tích, có khả năng cân chính xác đến 0,10 g.
- Tủ nuôi cấy, có khả năng duy trì nhiệt độ trong khoảng từ 25 °C đến 30°C, độ ẩm tương đối ít nhất là 85 %.
- Tủ lạnh, có khả năng duy trì nhiệt độ  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Đĩa Petri thủy tinh, có kích thước 100 x 15 mm.
- Nồi khử trùng, có khả năng duy trì áp suất 103 kPa ở nhiệt độ 121°C trong khoảng thời gian ít nhất là 15 phút.

- Cọ sơn, que cấy, que gạt, tăm bông vô trùng.
- Chất nền, Giấy lọc (xenluloz, sợi thủy tinh,.....) cắt thành kích thước 4 x 4 cm.
- Thiết bị phun sương vô trùng.
- Que thủy tinh vô trùng, kẹp, bình thủy tinh Erlenmeyer dung tích 250 mL, ống nghiệm và các thiết bị vi sinh thông dụng khác.
- Buồng đếm hồng cầu (Hemocytometer), được sử dụng để đếm trực tiếp bào tử nấm mốc.
- Bông thủy tinh vô trùng.

## 5 Cách tiến hành

### 5.1 Chuẩn bị bào tử nấm mốc

#### 5.1.1 Nuôi cấy nấm mốc

Sử dụng các loại chủng nấm mốc thử nghiệm sau đây để chuẩn bị mẫu nấm thử nghiệm:

Chủng mốc	Ký hiệu/Mã số
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275
	NRRL 334
	VTCC 30904
<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC 6205
	NRRL 54669
	VTCC 31528

**CHÚ THÍCH:** Do vi sinh vật nói chung hay nấm mốc nói riêng, có tính đặc hữu vùng rất cao (phụ thuộc vào địa lý từng nơi), nên việc lựa chọn các chủng nấm mốc cho thử nghiệm có thể dựa trên mỗi vùng địa lý nhất định. Có thể dựa trên các nghiên cứu trước đó về chủng nấm mốc xuất hiện phổ biến trong vùng hoặc các chủng phân lập trực tiếp từ nơi muốn kiểm tra dưới sự đồng thuận của các bên liên quan.

Các chủng nấm mốc sử dụng được nêu ở trên phải là các chủng được lấy từ thành viên của ngân hàng giống thế giới (WFCC) hoặc ngân hàng giống Nhật Bản (JSCC) hoặc trung tâm nguồn gen vi sinh vật quốc gia Việt Nam (VTCC).

Các chủng nấm mốc được duy trì trên môi trường thích hợp (xem mục 3.2.1) trên đĩa petri. Các chủng nấm mốc được bảo quản trong điều kiện 3°C đến 10°C và không quá 4 tháng. Cấy truyền từng loại nấm mốc riêng lẻ lên đĩa petri từ 7 ngày đến 20 ngày ở nhiệt độ 28°C đến 30°C và sử dụng các dịch cấy truyền này cho quá trình chuẩn bị dung dịch huyền phù chứa bào tử nấm mốc.

#### 5.1.2 Chuẩn bị huyền phù bào tử nấm mốc

Đưa vào các đĩa petri chứa từng loại nấm mốc đã chuẩn bị (xem 5.1.1) 10 ml nước vô trùng hoặc nước vô trùng có chứa 0,05 g/L chất làm ướt không độc hại như natri dioctylsulfosuccine hay Tween 80. Xoay hoặc lắc nhẹ đĩa petri để làm bong các bào tử. Cẩn thận hút nước và huyền phù bào tử bằng pipet Pasteur vô trùng (cố gắng tránh

lấy sợi nấm mốc).

Có thể lọc huyền phù thu được sau khi lắc qua một lớp bông thủy tinh mỏng vô trùng trong phễu thủy tinh vào một bình vô trùng để loại bỏ các mảnh sợi nấm mốc.

Pha loãng huyền phù bào tử với dung dịch muối dinh dưỡng (xem 3.2.2) vô trùng sao cho huyền phù bào tử thu được chứa  $0,8 \times 10^6$  bào tử/mL đến  $1,2 \times 10^6$  bào tử/mL được xác định bằng buồng đếm hoặc bằng phương pháp thích hợp khác (ví dụ: phương pháp đếm khuẩn lạc).

Lặp lại thao tác này cho từng chủng được sử dụng. Huyền phù bào tử nấm mốc có thể chứa riêng rẽ từng chủng hoặc có thể được trộn vào nhau với cùng thể tích đưa vào.

Hỗn hợp huyền phù chứa bào tử nấm mốc có thể được chuẩn bị tươi mỗi ngày hoặc có thể được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ  $3^{\circ}\text{C}$  đến  $10^{\circ}\text{C}$  không quá bốn ngày. Các huyền phù chứa bào tử nấm mốc riêng lẻ có thể được giữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ  $3^{\circ}\text{C}$  đến  $10^{\circ}\text{C}$  không quá mười bốn ngày.

### 5.1.3 Chuẩn bị mẫu các mẫu thử

Một quy trình thử nghiệm cần phải chuẩn bị mẫu đối chứng dương (C+) và mẫu đối chứng âm (C-) song song với mẫu sơn thử nghiệm. Mẫu đối chứng dương là mẫu cho phép chủng phát triển và sinh trưởng tốt (Ví dụ: giấy lọc có gốc xenlulozo đặt trên môi trường dinh dưỡng) và mẫu đối chứng âm là mẫu có khả năng ức chế hoặc đơn giản là nấm mốc không thể sinh trưởng trên nền chất đó (Ví dụ: thủy tinh, PVC, PP...).

Khi chuẩn bị, thao tác với các mẫu thử, cần tránh nhiễm vi sinh vật hoặc các chất hữu cơ ngoại lai. Các dụng cụ thao tác như: kéo, nhíp, tăm bông cần phải được vô trùng trước khi thử nghiệm.

Các mẫu sơn thử nghiệm được chuẩn bị theo TCVN 2094:1993 lên trên vật liệu nền (ví dụ: thủy tinh, giấy lọc sợi thủy tinh, nhựa...) và có cùng độ dày cho tất cả các mẫu hoặc theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Độ dày lớp phủ được xác định theo TCVN 9760:2013 hoặc có thể được ghi lại bằng tốc độ trải rộng (ví dụ: gam/cm<sup>2</sup>) và cần được ghi chú trong báo cáo. Thử nghiệm phải lặp lại ít nhất 3 lần từ mỗi loại vật liệu.

**CHÚ THÍCH:** Chất nền có thể được phủ sơn thử nghiệm lên một mặt hoặc cả hai mặt và cần được ghi chú trong báo cáo.

Sau khi phủ, mẫu thử được để khô tự nhiên theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc có thể xử lý ở các điều kiện cụ thể nào đó là do sự đồng thuận giữa các bên liên quan và phải được ghi chú trong báo cáo.

Nếu quá trình gia tốc thời tiết, lão hóa nhiệt hoặc điều kiện thử nghiệm gia tốc khác của mẫu được tiến hành trước khi thử nghiệm, cần chuẩn bị một bộ đĩa riêng biệt để có thể thực hiện phép thử nghiệm ít nhất 3 lần từ mỗi loại vật liệu. Các kết quả từ các mẫu này có thể được so sánh với các kết quả từ các mẫu không bị gia tốc thời tiết hoặc không bị tiền xử lý trong các điều kiện đặc biệt nào khác.

**CHÚ THÍCH:** Có nhiều phương pháp gia tốc có thể được sử dụng để mô phỏng một cách nhanh chóng các tác động của thời tiết như: ánh sáng mặt trời, mưa,... (theo các tiêu chuẩn như: TCVN 11608-2:2016, TCVN 11608-3:2016,...). Các điều kiện thử nghiệm gia tốc phải được chỉ rõ trong báo cáo.

Các mẫu thử được cắt dưới dạng hình vuông có kích thước 4 x 4 cm. Đặt các mẫu thử này vào giữa các đĩa chứa môi trường dinh dưỡng (PDA, Malt Agar hay agar muối

dinh dưỡng). Nếu các đĩa này được bảo quản trong tủ lạnh thì cần để chúng trở về nhiệt độ phòng trước khi đặt mẫu.

**CHÚ THÍCH:** Trong trường hợp các mẫu thử nghiệm trên môi trường dinh dưỡng đều bị hỏng (nấm mốc mọc trên tất cả các mẫu, từ đối chứng dương, âm và mẫu thử nghiệm) thì có thể xem xét thử nghiệm trên môi trường không có nguồn cacbon và các điều kiện thử nghiệm khác nghiệt hơn.

#### 5.1.4 Cấy mẫu nấm mốc lên mẫu thử:

Các mẫu nấm mốc thử nghiệm có thể được cấy cùng với nhau trong 1 đĩa agar hoặc tách ra thử nghiệm riêng lẻ.

Kết hợp một phần huyền phù bào tử của các chủng với lượng bằng nhau trong trường hợp muốn kiểm nghiệm chung.

Cần đếm số lượng bào tử bằng buồng đếm hoặc phương pháp đếm khuẩn lạc để xác nhận số lượng trong huyền phù bào tử cho mỗi phép thử (xem 5.1.2)

Phủ một lớp mỏng huyền phù chứa nấm mốc lên từng mẫu bằng cách sử dụng vòi phun hoặc pipet vô trùng, đảm bảo phủ kín toàn bộ bề mặt mẫu và đĩa agar, nhưng không được làm quá bão hòa mẫu. Bên cạnh đó, có thể sử dụng tấm bông vô trùng riêng biệt để dàn đều huyền phù chứa bào tử nấm mốc lên trên bề mặt của từng mẫu thử và đĩa agar. Cần chắc chắn rằng, lượng mẫu nấm thử nghiệm được sử dụng là như nhau giữa các mẫu khác nhau được thử nghiệm. Điều này nên được thực hiện bằng cách sử dụng cùng một phương pháp bởi cùng một dụng cụ cùng một lúc cho tất cả các mẫu.

Ủ tất cả các đĩa ở  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  dưới độ ẩm tương đối  $\geq 85\%$  trong bốn tuần, kiểm tra và ghi lại nhiệt độ và độ ẩm trước khi thực hiện các phép đọc hàng tuần.

## 6 Đánh giá kết quả

**Xếp hạng sự sinh trưởng hàng tuần trong bốn tuần theo bảng sau:**

Tăng trưởng quan sát được trên mẫu vật	Đánh giá
Không sinh trưởng	0
Có dấu vết sự sinh trưởng (<10%)	1
Sinh trưởng nhẹ (10-30%)	2
Sinh trưởng trung bình(>30-60%)	3
Sinh trưởng mạnh (>60%- che phủ toàn bộ)	4

## 7 Báo cáo kết quả thử nghiệm

Báo cáo kết quả thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Ngày thử nghiệm, loài nấm mốc được sử dụng, điều kiện ủ, tốc độ lây lan;
- Loại mẫu sơn hoặc lớp phủ. Nếu thực hiện phép thử so sánh kết quả nuôi cấy trong điều kiện chứa dưỡng chất và không chứa dưỡng chất thì cần ghi rõ độ dày lớp phủ;
- Nếu thực hiện các phương pháp giá thử nghiệm gia tốc, trước khi thử nghiệm khả năng kháng nấm mốc, cần mô tả đầy đủ về tên phương pháp, chu kỳ chạy, thời gian mỗi chu kỳ và các thiết bị được sử dụng;
- Kết quả quan sát sự sinh trưởng của nấm mốc hàng tuần, bao gồm: ngày, tháng; ghi chú về bất kỳ sự cố bất thường nào; và đánh giá mức độ kháng nấm mốc (theo bảng



xếp hạng sự sinh trưởng) cho mỗi lần thử nghiệm lặp lại;

- Ngày xuất báo cáo kết quả;

- Nêu rõ tên phòng thí nghiệm, tên và chữ ký của người đứng đầu phòng thí nghiệm.

## **8 Độ chính xác và độ chệch**

### **8.1 Độ chính xác**

Do khả năng kháng nấm mốc của lớp phủ thử nghiệm tại các thời điểm khác nhau hoặc trong các phòng thí nghiệm khác nhau sẽ bị ảnh hưởng tới những yếu tố về mật độ huyền phù bào tử, chất nền hoặc các điều kiện khác liên quan đến sự phát triển của nấm mốc, nên rất khó để đưa ra quy định về độ chính xác của quy trình trong phương pháp thử nghiệm này. Ngoài ra, sự khác biệt về trình độ của kỹ thuật viên thử nghiệm cũng gây ra sự sai lệch về kết quả khi thực hiện tại các phòng thí nghiệm khác nhau.

Có thể thực hiện so sánh giữa các mẫu được thử nghiệm cùng lúc bằng cách sử dụng cùng một dịch huyền phù bào tử, trong một phòng thí nghiệm nhất định với cùng các kĩ thuật viên. Nên tránh so sánh các chỉ số đánh giá thực tế giữa các mẫu được thử nghiệm vào các thời điểm khác nhau hoặc trong các phòng thí nghiệm khác nhau.

### **8.2 Độ lệch chuẩn**

Chưa có thông tin đề cập về độ lệch chuẩn trong quy trình thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm mốc của lớp phủ vì chưa có vật liệu có giá trị tham chiếu phù hợp .

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASTM D5590, *Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint Films and Related Coatings to Fungal Defacement by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay* (Phương pháp thử tiêu chuẩn để xác định độ bền của màng sơn và các lớp phủ liên quan đến sự phát triển của nấm mốc bằng thử nghiệm gia tốc trên đĩa thạch sau bốn tuần).
- [2] ASTM D3273-21, *Standard Test Method for Resistance to Growth of Mold on the Surface of Interior Coatings in an Environmental Chamber*. (Phương pháp thử khả năng chống lại sự phát triển của nấm mốc trên bề mặt của lớp phủ bên trong trong tủ môi trường).
- [3] ASTM D3456-18, *Standard Practice for Determining by Exterior Exposure Tests the Susceptibility of Paint Films to Microbiological Attack*. (Thực hành xác định thử nghiệm tiếp xúc với bên ngoài về tính nhạy cảm của màng sơn đối với sự tấn công của vi sinh vật).
- [4] ASTM D4708-19, *Standard Practice for Preparation of Uniform Free Films of Organic Coatings*. (Phương pháp chuẩn bị màng phủ hữu cơ tự do đồng nhất).
- [5] ASTM D6132-13, *Standard Test Method for Nondestructive Measurement of Dry Film Thickness of Applied Organic Coatings Using an Ultrasonic Coating Thickness Gage*. (Phương pháp thử nghiệm đo không phá hủy độ dày màng khô của lớp phủ hữu cơ được ứng dụng bằng thiết bị đo độ dày lớp phủ siêu âm).
- [6] ASTM G21-15, *Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi*. (Phương pháp xác định khả năng kháng nấm mốc của vật liệu polyme tổng hợp).