
Plastiques — Évaluation de l'action des micro-organismes

Plastics — Evaluation of the action of microorganisms

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 846:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfaf3/iso-846-1997>



Sommaire

Page

Introduction.....	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	2
3 Définitions	2
4 Principe	2
5 Appareillage et matériaux	4
6 Éprouvettes	8
7 Préparation des éprouvettes	9
8 Modes opératoires	9
9 Estimation	15
10 Expression des résultats	16
11 Exactitude des mesurages	18
12 Rapport d'essai	18
13 Bibliographie	19

Annexes

A Détermination de la teneur en eau et de la capacité de rétention d'eau d'un sol	20
B Fidélité	22
C Informations relatives aux champignons pour essai	23

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La norme internationale ISO 846 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 61, *Plastiques*, sous-comité SC 6, *Vieillessement et résistance aux agents chimiques et environnants*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 846:1978), dont elle constitue une révision technique.

Le Groupe des Projets Plastiques de l'International Biodeterioration Research Group (Groupe international de recherche sur la biodégradation) a effectué plusieurs essais interlaboratoires entre 1984 et 1990 en appliquant la méthodologie préconisée dans l'édition de 1978 de cette norme, dans le but de contrôler la reproductibilité des résultats d'essai. L'expérience acquise lors de ces essais a été incorporée dans la présente édition. En outre, un essai par enfouissement dans le sol a été ajouté dans le paragraphe 8.2.4, fondé sur une spécification établie par la Eidgenössische Materialprüfungsanstalt de Saint-Gall, en Suisse.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale. Les annexes B et C sont données uniquement à titre d'information.

Introduction

Dans certaines conditions climatiques et environnementales, les micro-organismes peuvent se fixer et coloniser la surface des plastiques ou des produits en matériaux plastiques. Non seulement leur présence et/ou les produits de leur métabolisme peuvent endommager le plastique lui-même, mais il arrive qu'ils altèrent également l'aptitude à l'emploi des matériaux de construction et des systèmes qui comprennent des parties en matériaux plastiques.

Les essais et les conditions d'essai prescrites dans la présente Norme internationale sont empiriques et couvrent beaucoup d'applications possibles, mais pas toutes.

Pour certaines applications spécifiques et pour certains essais de longue durée, il convient de se mettre d'accord sur des modes opératoires qui reflètent les performances dans les conditions réelles.

L'action des micro-organismes sur les plastiques est influencée par deux types de processus:

- a) action directe: détérioration du plastique qui sert de substance nutritive pour la croissance des micro-organismes;
- b) action indirecte: influence des produits du métabolisme des micro-organismes, par exemple: décoloration ou aggravation de la détérioration.

La présente Norme internationale traite de ces deux processus et de leur action combinée.

Plastiques — Évaluation de l'action des micro-organismes

AVERTISSEMENT — La manutention et la manipulation de micro-organismes potentiellement dangereux, requièrent un niveau élevé de compétences techniques et peuvent être soumises aux réglementations et à la législation nationales en vigueur. Il convient que ces essais ne soient effectués que par un personnel spécialement formé aux techniques de microbiologie. Les codes de bonnes pratiques de désinfection, de stérilisation et d'hygiène doivent être rigoureusement respectés.

Il est recommandé aux opérateurs de consulter la CEI 68-2-10:1988, annexe A intitulée «Dangers pour le personnel», ainsi que l'ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

1 Domaine d'application

ISO 846:1997

La présente Norme internationale prescrit des méthodes pour la détermination de la détérioration des plastiques lorsqu'ils sont exposés à l'action des champignons et des bactéries, et à celle des micro-organismes vivant dans le sol. Elle n'a pas pour but de déterminer la biodégradabilité des plastiques.

Le type et l'ampleur de la détérioration engendrée peuvent être déterminés

a) par un examen visuel

et/ou

b) à partir des variations de masse

et/ou

c) à partir des variations d'autres propriétés physiques.

Les essais sont applicables à tous les produits fabriqués en matériaux plastiques ayant une surface plane et qui peuvent, de ce fait, être aisément nettoyés, exception faite de matériaux poreux, tels les mousses en matériaux plastiques.

La présente Norme internationale utilise les mêmes champignons pour essai que la CEI 68-2-10. La méthode CEI, qui utilise ce qu'on appelle des «spécimens assemblés», nécessite l'inoculation des éprouvettes avec une suspension de spores, l'incubation des éprouvettes inoculées et l'estimation de la croissance fongique ainsi que de l'attaque physique des éprouvettes.

Le volume des essais et les souches d'essai à utiliser dépendront de l'application prévue pour le plastique. De ce fait, il convient de définir avant les essais les paramètres utilisés et de les consigner dans le rapport d'essai.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 291:—1), *Plastiques — Atmosphères normales de conditionnement et d'essai*.

CEI 68-2-10:1988, *Essais fondamentaux climatiques et de robustesse mécanique — Partie 2: Essais — Essai J et guide: Moisissures*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent:

3.1 biodétérioration: Variation des propriétés chimiques ou physiques d'un matériau provoquée par l'action d'un micro-organisme.

3.2 effet fongistatique: Effet antimycotique d'un traitement antimicrobien qui empêche un matériau donné de se recouvrir de champignons dans des conditions d'humidité.

3.3 biodégradation: Le terme «biodégradation» fait l'objet de discussions au sein du TC 61/SC 5/WG 22, *Biodégradabilité*, et la définition officielle sera ajoutée ici une fois disponible.

4 Principe

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfa3/iso-846-1997>

4.1 L'essai consiste à exposer des éprouvettes de plastique à l'action de souches déterminées de champignons et de bactéries (ou, dans le cadre de l'essai par enfouissement dans le sol, à l'action d'un sol microbiologiquement actif) pendant des durées spécifiées ou ayant fait l'objet d'un accord entre les parties intéressées, et dans des conditions déterminées de température et d'humidité.

À la fin de l'exposition, les éprouvettes font l'objet d'une estimation avant et/ou après nettoyage, par examen visuel et/ou en déterminant les variations de masse ou d'autres propriétés physiques.

Les résultats obtenus avec les éprouvettes exposées à l'attaque biologique (lot I) sont comparés à ceux obtenus avec des éprouvettes non traitées (lot O) ou avec des éprouvettes stériles (lot S) conservées dans des conditions identiques.

4.2 La description succincte des méthodes d'essai utilisées pour déterminer la résistance des plastiques aux champignons (méthode A) ou les effets fongistatiques (méthodes B et B'), la résistance aux bactéries (méthode C) et la résistance aux micro-organismes contenus dans le sol (méthode D) est donnée ci-après.

4.2.1 Résistance aux champignons

4.2.1.1 Méthode A: Essai de croissance fongique

Les éprouvettes sont exposées à une suspension de plusieurs spores de champignons en présence d'un milieu nutritif incomplet (exempt de source de carbone). Les champignons ne peuvent croître qu'au détriment du matériau.

1) À publier. (Révision de l'ISO 291:1977)

Si les éprouvettes ne contiennent aucune substance nutritive, les champignons ne peuvent développer le mycélium et il n'y a pas détérioration du plastique.

La méthode A est appropriée à l'estimation de la résistance inhérente des plastiques à toute attaque fongique en l'absence de toute autre matière organique.

Il est recommandé que, en mettant en œuvre la méthode A, les méthodes B et B' soient également mises en œuvre en vue de faciliter l'interprétation des résultats.

4.2.1.2 Méthodes B et B': Détermination des effets fongistatiques

Les éprouvettes sont exposées à une suspension de plusieurs spores de champignons en présence d'un milieu nutritif complet (c'est-à-dire, avec une source de carbone). Même si le plastique ne contient aucune substance nutritive, les champignons peuvent se développer sur les éprouvettes et les produits de leur métabolisme peuvent attaquer le matériau.

Toute inhibition de la croissance sur le plastique ou dans le milieu nutritif (zone d'inhibition) met en évidence l'activité fongistatique du plastique ou la présence d'un traitement fongicide.

Dans la méthode B', les éprouvettes ne sont pas mises sur le milieu nutritif tant qu'il n'est pas complètement couvert.

Les méthodes B et B' sont utilisées lorsqu'une contamination de la surface est prévisible.

Pour ne pas perdre de temps et pour garantir une meilleure compréhension du phénomène, il est recommandé de mettre en œuvre les deux méthodes simultanément.

4.2.2 Méthode C: Résistance aux bactéries

L'estimation de l'action des bactéries sur les éprouvettes s'effectue en utilisant un milieu incomplet. Si l'on ne constate aucune croissance dans l'agar-agar autour de l'éprouvette, cette dernière ne contient pas de substances nutritives.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfafa3/iso-846-1997>

4.2.3 Méthode D: Résistance à un sol microbiologiquement actif (essai par enfouissement dans le sol)

Les éprouvettes sont complètement enfouies dans un sol naturel caractérisé par une capacité de rétention d'eau connue et par une teneur en eau spécifiée (voir annexe A).

L'essai par enfouissement dans le sol a été inclus dans la présente Norme internationale car un grand nombre de plastiques sont utilisés en contact permanent avec le sol et exposés à des niveaux élevés d'humidité.

4.3 Choix des propriétés pour l'évaluation de la biodétérioration

Le choix des propriétés à déterminer dépend du but de l'essai. Il convient de toujours procéder à une estimation visuelle de l'attaque biologique; celui-ci tiendra lieu de première étape dans l'estimation de la résistance du plastique.

Il est recommandé de mesurer les variations de masse, en particulier pour les plastiques qui contiennent des substances biologiquement dégradables, tels que les plastifiants, lubrifiants et stabilisants (comme, par exemple, dans le PVC plastifié). Dans ce cas, la perte de masse mesurée est souvent inférieure à la perte de masse réelle puisque la substance biologiquement dégradable n'est que partiellement utilisée et que les produits métaboliques subsistent fréquemment dans le plastique.

Lorsque la modification porte, avant tout, sur la surface, il est recommandé de déterminer les propriétés qui indiquent de manière nette les variations de l'état de surface, telles que brillant de surface, propriétés en flexion, résistance au choc et dureté.

5 Appareillage et matériaux

5.1 Pour tous les essais

5.1.1 Incubateurs.

Ils sont utilisés pour effectuer des essais sur des souches fongiques et bactériennes; ils doivent permettre de maintenir le réglage de la température à ± 1 °C, et d'établir une température de 20 °C à 35 °C à une humidité relative d'au moins 90 %.

Ils sont également utilisés pour effectuer des essais par enfouissement dans le sol; ils doivent permettre de maintenir le réglage de la température à ± 1 °C et d'établir une température de 29 °C à une humidité relative d'au moins 95%.

NOTE — L'expérience a montré qu'il est préférable d'utiliser deux incubateurs: l'un pour les essais effectués avec les boîtes de Petri et l'autre pour les essais par enfouissement dans le sol.

5.1.2 Étuve, permettant de maintenir la température à 45 °C pour sécher les éprouvettes, et une température comprise entre 103 °C et 105°C pour déterminer la capacité de rétention d'eau du sol.

5.1.3 Dessiccateur, permettant de maintenir les conditions normales de température et d'humidité (23 °C et 50 % d'humidité relative), pour conditionner les éprouvettes et les témoins.

5.1.4 Autoclave, permettant de maintenir une température de 120 °C et une pression de 2 bar, pour stériliser les boîtes de Petri et le sol.

5.1.5 Balance analytique, précise à 0,1 mg.

5.1.6 Centrifugeuse de laboratoire.

[ISO 846:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfa3/iso-846-1997)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfa3/iso-846-1997)

[0138a8dfa3/iso-846-1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dfa3/iso-846-1997)

5.1.7 Microscope stéréoscopique, permettant d'obtenir un grossissement de $\times 50$.

5.1.8 Boîtes de Petri jetables, en verre ou en plastique, de dimensions appropriées pour exposer les éprouvettes.

5.1.9 Récipients en verre, d'une capacité d'environ 1 litre (16 cm de hauteur et 11 cm de diamètre), tels que les pots à confiture avec leur couvercle.

5.1.10 Eau distillée ou déionisée.

L'eau utilisée pour préparer les solutions et les milieux nutritifs et celle employée pour les déterminations doit être de l'eau distillée ou déionisée et avoir une conductivité $< 1 \mu\text{S/cm}$.

5.1.11 Solutions microbicides

5.1.11.1 Mélange eau-éthanol, en proportions, en masse, de 70:30.

5.1.11.2 o-Phénylphénol.

Dissoudre 1 g de o-phénylphénol dans 50 ml d'éthanol à 90 %, compléter à 1 000 ml avec de l'eau et ajuster le pH à 3,5 par addition, goutte à goutte, d'acide lactique.

La solution microbicide utilisée doit être consignée dans le rapport d'essai.

5.2 Pour les essais avec les champignons

5.2.1 Champignons pour essai.

Les champignons pour essai doivent être obtenus auprès des collections nationales de cultures. Les souches à utiliser sont énumérées dans le tableau 1 et consignées dans le rapport d'essai.

Tableau 1

Nom	Souche
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	ATCC 6275
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	CMI 114933
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	ATCC 18502
<i>Gliocladium virens</i> Miller et al.	ATCC 9645
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze: Fries	ATCC 6205

Pour certaines raisons techniques et conformément à tout accord éventuellement conclu entre les parties intéressées, il est possible d'utiliser d'autres espèces. En tout état de cause, les espèces utilisées doivent être consignées dans le rapport d'essai.

Si les essais doivent être conduits sur des plastiques destinés à être utilisés dans la fabrication d'appareils et de composants électroniques conformément à la méthode prescrite dans la CEI 68-2-10, utiliser les champignons *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii* et *Gliocladium virens*, pris dans le tableau 1, conjointement aux quatre souches mentionnées dans le tableau 2.

(standards.iteh.ai)

Tableau 2

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8df1a3/iso-846-1997>

Nom	Souche
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	QM 82j
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	ATCC 9348
<i>Penicillium ochrochloron</i> Biourge	ATCC 9112
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Saccardo) Bainier	CMI 49528

5.2.2 Souches mères.

Cultiver les champignons pour essai (5.2.1) dans des tubes à essai sur de la gélose oblique, ayant la composition suivante:

Farine d'avoine	20 g
Extrait de malt	10 g
Agar-agar	20 g
Eau	1 000 ml

Stériliser à 120 °C ± 1 °C pendant 20 min dans un autoclave en atmosphère saturée de vapeur d'eau.

Après incubation à $29\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, les cultures abondamment sporulées peuvent alors être utilisées. Elles ne doivent pas être conservées plus de quatre semaines à cette température.

Étant donné que les champignons pour essai peuvent subir des modifications génétiques et physiologiques pendant la mise en culture sur les milieux artificiels, il faut réduire au maximum les intervalles entre chaque préparation de sous-cultures par des mesures appropriées (par exemple lyophilisation des cultures, conservation à $+4\text{ °C}$ ou dans de l'azote liquide).

5.2.3 Solutions et milieux nutritifs

5.2.3.1 Solution mère de sels minéraux, ayant la composition suivante (utiliser uniquement des produits chimiques de qualité analytique reconnue ou de pureté équivalente):

NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,7 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
H ₂ O	1 000 ml

Ajuster le pH entre 6,0 et 6,5 avec une solution de NaOH stérile à 0,01 mol/l.

5.2.3.2 Solution de sels minéraux/agent mouillant, préparée en ajoutant, à 1 litre de solution mère de sels minéraux (5.2.3.1), 0,1 g d'agent mouillant non-toxique tel que la N-méthylaurine ou le polyglycol éther, et en stérilisant en autoclave à $120\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 20 min.

5.2.3.3 Solution de sels minéraux/glucose, préparée en ajoutant à la solution mère de sels minéraux (5.2.3.1) suffisamment de glucose pour obtenir une concentration de $30\text{ g/l} \pm 1\text{ g/l}$ et en stérilisant en autoclave à $115\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 30 min.

5.2.3.4 Milieu gélosé incomplet, préparé en ajoutant à la solution mère de sels minéraux (5.2.3.1) suffisamment d'agar-agar pour obtenir une concentration de 20 g/l. Mettre l'agar-agar en solution en portant la solution à ébullition sous agitation. Stériliser en autoclave à $120\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 20 min. Après stérilisation, ajuster le pH entre 6,0 et 6,5 avec une solution de NaOH stérile à 0,01 mol/l.

5.2.3.5 Milieu gélosé complet, préparé en ajoutant au milieu gélosé incomplet (5.2.3.3) suffisamment de glucose pour obtenir une concentration de $30\text{ g/l} \pm 1\text{ g/l}$, et en stérilisant en autoclave à $115\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 30 min. Après stérilisation, ajuster le pH entre 6,0 et 6,5 à 20 °C avec une solution de NaOH stérile à 0,01 mol/l.

5.3 Pour les essais avec bactéries

5.3.1 Bactérie pour essai, constituée d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 8060 ou ATCC 13388.

On doit se procurer une souche bien définie de bactérie pour essai auprès d'une collection nationale de cultures. Cultiver la souche sur de l'agar-agar aux extraits de cerveau et de cœur (voir 5.3.2.1).

Si l'on s'accorde pour utiliser d'autres bactéries, on doit les consigner dans le rapport d'essai.

5.3.2 Milieux nutritifs et solutions

5.3.2.1 Agar-agar aux extraits de cerveau et de cœur.

En variante, on peut utiliser de l'agar-agar à base de caséine de soja peptone.

Le milieu peut être obtenu auprès de fournisseurs et doit avoir été préparé conformément aux instructions du fabricant.

5.3.2.2 Bouillon aux extraits de cerveau et de cœur.

En variante, on peut utiliser un bouillon à base de caséine de soja peptone.

Le milieu peut être obtenu auprès de fournisseurs et doit avoir été préparé conformément aux instructions du fabricant.

5.3.2.3 Milieu gélosé aux sels minéraux, préparé en réalisant une solution ayant la composition suivante:

KH_2PO_4	0,7 g
K_2HPO_4	0,7 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,7 g
NH_4NO_3	1 g
NaCl	0,005 g
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
$\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
H_2O	1 000 ml

iTeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 846:1997
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e05fd20-6c53-46d4-a434-0138a8dffa3/iso-846-1997>

et en ajoutant 20 g d'agar-agar à la solution. Stériliser en autoclave à $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min. Ajuster le pH à 7,0 à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec une solution de NaOH stérile à 0,01 mol/l.

5.3.2.4 Solution tampon stérile, pH 7,0 à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Préparer séparément les deux solutions suivantes:

KH_2PO_4	9,1 g/l	(solution A)
Na_2HPO_4	11,9 g/l	(solution B)

Mélanger 600 ml de solution A avec 400 ml de solution B. Stériliser en autoclave à $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min. Ajuster le pH à 7,0 à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec une solution de NaOH stérile à 0,01 mol/l.

5.4 Pour les essais par enfouissement dans le sol

Utiliser un sol activé ayant une teneur en eau de $(60 \pm 5)\%$ de la capacité de rétention d'eau du sol (voir annexe A).

La capacité de rétention d'eau est la teneur en eau d'un sol lorsqu'il est saturé d'eau.

Le pH d'un extrait aqueux de sol (1 g de sol dans 20 g d'eau) doit être compris entre 4,0 et 7,0.