
NORME INTERNATIONALE



846

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Plastiques — Détermination du comportement sous l'action des champignons et des bactéries — Évaluation par estimation visuelle ou par mesurage des variations de masse ou de caractéristiques physiques

iTeh STANDARD PREVIEW

Plastics — Determination of behaviour under the action of fungi and bacteria — Evaluation by visual examination or measurement of change in mass or physical properties

Première édition — 1978-09-01

[ISO 846:1978](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/47c0bd71-1bfa-4346-8c9a-c5918731b566/iso-846-1978)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/47c0bd71-1bfa-4346-8c9a-c5918731b566/iso-846-1978>

CDU 678.5/.8 : 620.193.81/.82

Réf. n° : ISO 846-1978 (F)

Descripteurs : matière plastique, essai physico-chimique, essai de résistance aux organismes, bactérie, champignon, biodégradabilité, examen visuel, stabilité pondérale, préparation de spécimen d'essai.

Prix basé sur 10 pages

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 confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 846 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 61, *Plastiques*, et a été soumise aux comités membres en décembre 1976,

(standards.iteh.ai)

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Autriche
Belgique
Brésil
Canada
Chili
Corée, Rép. de
Espagne
France

Hongrie
Inde
Iran
Israël
Mexique
Nouvelle-Zélande
Pays-Bas
Pologne

ISO 846:1978

Portugal

Suède

Suisse

Tchécoslovaquie

Turquie

U.S.A.

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques :

Australie
Royaume-Uni

Cette Norme internationale annule et remplace la Recommandation ISO/R 846-1968, dont elle constitue une révision technique.

Plastiques – Détermination du comportement sous l'action des champignons et des bactéries – Évaluation par estimation visuelle ou par mesurage des variations de masse ou de caractéristiques physiques

0 INTRODUCTION

L'action des micro-organismes sur les plastiques peut être séparée en deux processus se déroulant d'ailleurs en général simultanément.

Dans le premier processus, l'action provient du fait que les micro-organismes se développent aux dépens du plastique lui-même (en tant que seule source de carbone) et, par cela même, l'altèrent.

Dans le second processus, l'action provient des produits du métabolisme des micro-organismes qui se sont développés sur le plastique ou sur les salissures lorsque le plastique n'a aucun effet antimicrobien.

Ce sont les actions combinées de ces deux processus que la présente Norme internationale a pour but de mettre en évidence.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination du comportement des plastiques sous l'action des champignons ou des bactéries par estimation visuelle et/ou par mesurage des variations de masse et/ou de caractéristiques physiques observées.

Elle est applicable à la plupart des plastiques, à l'exception, en particulier, des matériaux cellulaires, dont le nettoyage complet est pratiquement impossible.

2 RÉFÉRENCES

ISO 75, *Matières plastiques et ébonite – Détermination de la température de fléchissement sous charge.*

ISO 178, *Matières plastiques – Détermination des caractéristiques de flexion des matières plastiques rigides.*

ISO/R 179, *Matières plastiques – Détermination de la résilience Charpy des matières plastiques rigides (essai Charpy de résistance à la flexion par choc).*

ISO/R 180, *Matières plastiques – Détermination de la résilience Izod des matières plastiques rigides (essais Izod de flexion par choc).*

ISO 291, *Plastiques – Atmosphères normales de conditionnement et d'essai.*

ISO 527, *Plastiques – Détermination des caractéristiques en traction.*¹⁾

ISO 537, *Plastiques – Essai au pendule de torsion.*¹⁾

ISO 604, *Matières plastiques – Détermination des caractéristiques en compression.*

ISO 868, *Matières plastiques – Détermination de la dureté par pénétration au moyen d'un duromètre (dureté Shore).*

ISO/R 974, *Matières plastiques – Méthode de détermination de la température de fragilité au choc.*

NOTE – Avec l'accord des parties intéressées, on peut déterminer des propriétés spécifiées dans d'autres Normes internationales lorsque celles-là sont jugées plus adaptées à l'usage des plastiques considérés.

3 PRINCIPE

L'essai consiste à exposer des éprouvettes de plastiques à l'action des champignons ou des bactéries pendant des durées fixées et dans des conditions de température et d'humidité elles aussi fixées.

En fin d'exposition, les éprouvettes sont examinées visuellement puis nettoyées, réexaminées visuellement et/ou soumises à la pesée et/ou à des mesurages de caractéristiques physiques.

Les résultats ainsi obtenus sont comparés à ceux correspondant à des éprouvettes non exposées, c'est-à-dire conservées

– soit à l'abri de toute action autre que l'ambiance «normale»;

– soit dans les conditions mêmes de l'exposition microbienne mais sans cette dernière, donc stérilement ou aseptiquement.

L'essai de résistance aux champignons peut se faire suivant deux méthodes :

a) Dans la méthode A, on met en présence l'éprouvette de plastique et des spores de champignons définis, en ne fournissant à ceux-ci qu'un milieu nutritif incomplet. La croissance des champignons ne peut se faire qu'aux dépens des composants du plastique. S'il n'y a pas de composants ou salissures nutritif(ve)s, les spores ne donnent pas de culture et il n'y a pas d'attaque. L'essai effectué selon cette méthode est, en conséquence, appelé parfois «essai de croissance».

1) Actuellement au stade de projet. (Révision de recommandation ISO.)

b) Dans la méthode B, on met en présence l'éprouvette de plastique et des spores de champignons définis, déposés sur un milieu nutritif complet permettant leur croissance. Même si le plastique n'apporte aucun élément nutritif, la croissance des champignons peut continuer sur l'éprouvette et les produits secrétés par leur métabolisme attaquent le substrat.

Par contre, une inhibition d'un développement révèle l'action fongistatique du plastique. L'essai effectué selon cette méthode est, en conséquence, appelé parfois «essai d'effet fongistatique».

L'essai de résistance aux bactéries consiste à soumettre l'éprouvette de plastique à l'action des bactéries avec milieu nutritif incomplet.

4 CHOIX DE LA MÉTHODE D'EXPOSITION ET CHOIX DES CARACTÉRISTIQUES À DÉTERMINER

4.1 Choix de la méthode d'exposition

Le choix d'une ou plusieurs des méthodes d'exposition dépend d'ordinaire de l'utilisation envisagée pour le plastique.

Par exemple, on pourra considérer que, pour la résistance aux champignons, la méthode A suffit lorsque les conditions d'emploi du plastique excluent toute salissure de la surface par des substances organiques. Par contre, lorsque ces conditions d'emploi entraînent de fortes salissures, il convient d'utiliser la méthode B.

NOTE — Pour gagner du temps et mieux comprendre l'ensemble du phénomène, des essais selon les deux méthodes devraient être menés simultanément.

4.2 Choix des caractéristiques à déterminer avant et après exposition

L'estimation visuelle après exposition peut toujours être faite et, compte tenu de la simplicité de la méthode, elle est généralement recommandée. Quant aux caractéristiques à mesurer, comme en 4.1, leur choix dépend essentiellement de l'utilisation envisagée pour le plastique.

Cependant, ce choix peut dépendre aussi de la composition du plastique.

Par exemple, la méthode de variation de masse convient spécialement pour les plastiques qui contiennent des composés biodégradables tels que plastifiants, lubrifiants, stabilisants (par exemple PVC plastifié).

NOTES

1 Dans ce dernier cas, la perte de masse est souvent inférieure à la perte réelle de plastifiant, ce qui est dû à ce que le composé biodégradable n'est que partiellement dégradé et que des résidus du métabolisme restent à l'intérieur du plastique.

2 L'attaque des plastiques se produisant à la surface, on a souvent intérêt à utiliser des méthodes de détermination faisant intervenir les propriétés de surface, par exemple la résistance à la traction à de faibles allongements, le module de flexion.

5 MATIÈRES, RÉACTIFS, SOLUTIONS ET MILIEUX

L'eau utilisée pour la préparation des milieux et solutions indiqués ci-après, ainsi que pour les essais, doit être de l'eau distillée ou de pureté similaire de résistivité minimale égale à 1 MΩ·cm.

Les champignons et bactéries risquant d'être pathogènes, il est nécessaire que les manipulations d'organismes enseignés soient réalisées par un personnel qualifié en microbiologie. D'une façon générale, les règles de sécurité habituelles des laboratoires de microbiologie doivent être respectées.

5.1 POUR TOUTS LES ESSAIS

5.1.1 Chlorure de mercure(II), solution aqueuse à 1 g/l.

AVERTISSEMENT — Le chlorure de mercure(II) est très toxique. Éviter toute inhalation et tout contact avec la peau. Il est recommandé de ne pas projeter la solution, mais de l'appliquer au moyen d'une seringue ou d'une pipette de sécurité. Une pipette à aspiration buccale ne doit pas être utilisée.

5.2 POUR ESSAIS AVEC CHAMPIGNONS

5.2.1 Champignons pour essais

5.2.1.1 Liste des champignons

Nom	Origine de la culture type (à titre d'information)
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem	ATCC 6275
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	IAM 7013, CMI 114933
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	IAM 5001, ATCC 10121
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Fr.	IAM 5061, ATCC 9645
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	ATCC 6205

NOTE — Pour certaines raisons techniques et par accord entre les parties intéressées, des espèces supplémentaires peuvent être utilisées. Celles-ci doivent alors être mentionnées dans le procès-verbal d'essai. Dans le cas d'essais sur plastiques destinés aux composants et à l'appareillage électronique selon la publication CEI 68-2-10. *Essais fondamentaux climatiques et de robustesse mécanique — Deuxième partie : Essais — Essai J : Moisissures*, utiliser les champignons susmentionnés, à l'exception du *Chaetomium globosum* Kunze, et les espèces supplémentaires suivantes : *Aspergillus terreus*, Thom, PQMD 82 j; *Aureobasidium pullulans*, (De Bary) Arnaud, ATCC 9348; *Penicillium ochro-chloron*, Biourge, ATCC 9112; *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bain Va. glabra, Thom, IAM 5146.

5.2.1.2 Origine des souches

Les champignons utilisés pour les essais doivent provenir de souches bien définies, obtenues auprès de centres biologiques officiels. Les références des souches doivent être notées et indiquées dans le procès-verbal d'essai.

NOTE — Les adresses des centres biologiques officiels peuvent être obtenues par l'intermédiaire des associations nationales de normalisation de chaque pays.

5.2.1.3 Entretien

Les souches d'essai (5.2.1.1) peuvent être entretenues en tubes à essais sur le milieu suivant :

farine d'avoine :	20 g
extrait de malt :	10 g
agar-agar :	20 g
eau :	1 000 ml

Stériliser en autoclave à 120 ± 1 °C durant 20 min.

Les cultures peuvent être utilisées après incubation à 25 ± 2 °C et ne doivent pas être conservées plus de 1 mois à cette température.

Pour maintenir en bon état les cultures d'entretien, il est nécessaire de préparer des subcultures toutes les 4 semaines au moins, pour chacune des espèces.

5.2.2 Solution et milieux pour essais avec champignons

On trouvera leur préparation dans l'annexe. Ces solutions et milieux sont

- la solution minérale de base (A.1.1);
- la solution minérale mouillante (A.1.2);
- la solution minérale glucosée mouillante (A.1.3);
- le milieu gélosé incomplet (A.1.4);
- les milieux gélosés complets (A.1.5).

5.3 POUR ESSAIS AVEC BACTÉRIES

5.3.1 Bactéries pour essais

5.3.1.1 Bactérie

Pseudomonas aeruginosa – souche NCTC 8060 ou ATCC 13888.

NOTE – D'autres bactéries peuvent être employées. Il faut alors le mentionner dans le procès-verbal d'essai.

5.3.1.2 Origine de la souche

La (ou les) bactérie(s) doit (doivent) provenir de souches bien définies, obtenues auprès de centres biologiques officiels (voir note à 5.2.1.2).

5.3.1.3 Entretien

Cultiver les souches d'essai sur gélose aux extraits de cerveau et de cœur (voir A.2.1).

5.3.2 Solutions et milieux pour essais avec bactéries

On trouvera leur préparation dans l'annexe. Ces solutions et milieux sont :

- la gélose aux extraits de cerveau et de cœur (A.2.1);
- le bouillon aux extraits de cerveau et de cœur (A.2.2);

- le milieu gélosé aux sels minéraux (A.2.3);
- la solution tampon stérile, à pH 7,0 à 20 °C (A.2.4).

6 APPAREILLAGE

Appareils normaux d'un laboratoire de microbiologie (autoclaves, fours, étuves, centrifugeuses, microscope stéréoscopique avec un grossissement d'environ 50 X), et notamment :

6.1 Récipients d'essai

Il est recommandé d'utiliser des boîtes de Pétri, de diamètre 100 à 120 mm.

7 ÉPROUVETTES

7.1 Dimensions

Les dimensions des éprouvettes dépendent des déterminations qui doivent être effectuées après l'action des micro-organismes.

En ce qui concerne l'épaisseur, si l'on veut étudier le comportement d'une plaque, on devrait prendre des éprouvettes découpées dans la plaque et donc de même épaisseur que cette plaque. Si, au contraire, on veut étudier le comportement de la matière elle-même, il est conseillé de prendre une épaisseur ne dépassant pas 0,5 mm.

Quant aux autres dimensions, il est recommandé

- a) pour l'estimation visuelle, d'utiliser des éprouvettes carrées, de côté 30 à 40 mm et d'épaisseur voisine de 2 mm;
- b) pour mesurer la variation de masse, d'utiliser des éprouvettes de 10 à 40 mm (à signaler que, pour des raisons de facilité de la comparaison toutes les éprouvettes correspondant à une même série d'essais doivent avoir les mêmes dimensions);
- c) pour mesurer les variations de caractéristiques physiques, d'utiliser des éprouvettes ayant les dimensions prévues dans les Normes internationales concernant le mesurage de ces caractéristiques.

7.2 Nombre

Pour chaque échantillon et pour chaque méthode à utiliser [c'est-à-dire méthode A (voir 8.2), méthode B (voir 8.3) et méthode B' (voir note 8.3.6)], préparer trois groupes d'éprouvettes.

Un groupe sera conservé au laboratoire (témoin zéro, groupe O), un deuxième sera soumis aux expositions microbiologiques (éprouvettes ensemencées, groupe I),

et le troisième sera soumis aux mêmes conditions d'incubation que les précédents, mais sans ensemencement (témoins incubés stériles, groupe S).

a) Pour l'estimation visuelle, prévoir au moins trois éprouvettes par groupe, c'est-à-dire un minimum de neuf éprouvettes au total.

b) Pour chaque autre propriété étudiée, le nombre d'éprouvettes par groupe est indiqué dans la Norme internationale concernant cette détermination (voir chapitre 2). En particulier dans le cas de mesurage de variation de masse, le nombre prévu d'éprouvettes est de six, c'est-à-dire qu'il faut préparer dix-huit éprouvettes.

NOTE — En général, toutes les déterminations sont effectuées séparément, mais, bien entendu, il est possible de prévoir l'examen visuel sur les éprouvettes destinées aux déterminations de variation de masse ou de caractéristiques physiques.

7.3 Nettoyage

Plonger les éprouvettes pour l'essai selon la méthode A et selon celles des méthodes qui nécessitent l'emploi de bactéries, durant 1 min environ dans de l'éthanol à 70 % (V/V), puis les sécher à l'air libre. Manipuler les éprouvettes avec des pinces pour éviter la contamination provenant des graisses de la peau ou d'autres matières organiques.

NOTE — Le nettoyage à l'éthanol ne doit pas être effectué si ce solvant attaque la matière soumise à l'essai; les éprouvettes utilisées pour les essais selon les méthodes B et B' ne devraient pas être nettoyées à l'éthanol.

7.4 Repérage et conservation

Repérer individuellement les éprouvettes par un moyen convenable, en évitant toute contamination.

Conserver les éprouvettes dans un récipient fermé.

7.5 Conditionnement et pesée

Sécher les trois groupes d'éprouvettes (O, I, S) destinés aux mesurages des variations de masse dans un dessiccateur jusqu'à masse constante, déterminée sur chaque éprouvette à 0,1 mg près (en général 48 h). Soit m_1 , m_2 , etc., les masses de chaque éprouvette.

Les groupes d'éprouvettes destinés à l'estimation visuelle et/ou aux mesurages des variations de caractéristiques physiques ne nécessitent pas de conditionnement à ce stade.

8 MODE OPÉRATOIRE

8.1 Choix du mode opératoire et des caractéristiques à déterminer — Schéma général des modes opératoires

Le choix du mode opératoire et celui des caractéristiques à déterminer dépendent surtout des modalités d'emploi de la matière soumise à l'essai, mais aussi du plastique lui-même (voir chapitre 4).

On trouvera ci-après, dans le tableau 1, le schéma général des modes opératoires des différentes méthodes.

TABLEAU 1 — Schéma général des divers modes opératoires

		Essais avec champignons							Essais avec bactéries		
		Méthode									
		A		B		B'					
Référence au paragraphe		8.2		8.3		Note à 8.3.6			8.4		
Garnissage des récipients		Milieu gélosé incomplet (A.1.4)		Milieu gélosé complet (A.1.5)		Aucun	Milieu gélosé complet (A.1.5)		Milieu gélosé minéral ensemencé (8.4.5)	Milieu gélosé minéral (8.4.2)	
Groupe d'éprouvettes		I	S	I	S	I	I	S	I	S	
Solution mise sur éprouvettes		Suspension de spores (8.2.3)		Suspension de spores (8.3.3)		HgCl ₂ (5.1.1)		Suspension de spores (8.3.3)		HgCl ₂ (5.1.1)	
Incubation	Conditions	Température : 29 ± 1 °C et humidité relative : > 90 %									
	Durée	4 semaines ou plus									

8.2 Mode opératoire des essais avec champignons selon la méthode A (essai de croissance)

8.2.1 Garnissage des récipients d'essai

Le nombre de récipients d'essai (6.1) à préparer doit être suffisant pour y déposer les éprouvettes nécessaires. Chauffer le milieu gélosé incomplet (A.1.4), afin de le liquéfier et, en ambiance stérile, verser une quantité suffisante dans chaque récipient sur une épaisseur de 5 à 10 mm. Laisser se solidifier par refroidissement.

8.2.2 Mise en place des éprouvettes

Placer les éprouvettes à plat sur le milieu solidifié, en en mettant le maximum, mais en évitant tout contact entre elles ou avec le bord du récipient, et s'assurer que le même nombre d'éprouvettes se trouve dans chaque récipient.

Séparer au hasard les récipients ainsi préparés en deux groupes égaux, l'un étant marqué I et l'autre S.

8.2.3 Préparation de la suspension de spores pour ensemencement

On trouvera cette préparation dans le chapitre A.3 de l'annexe, en réalisant la suspension finale dans la solution A.1.2.

8.2.4 Contrôle de la viabilité des spores

Garnir deux récipients d'essai (6.1) avec du milieu gélosé complet (A.1.5) de la manière indiquée en 8.2.1. Les ensemencer en répartissant la suspension de spores (A.3.2) sur la surface de la gélose.

Mettre en incubation à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 3 à 4 jours. S'il n'y a pas un copieux développement, préparer une nouvelle suspension de spores à partir d'autres cultures en tubes et l'utiliser pour refaire l'essai en totalité.

8.2.5 Ensemencement ou désinfection des éprouvettes et du milieu

Sur chacune des éprouvettes (7.2) des récipients du groupe I et sur la surface de la gélose, répandre ou déposer avec une pipette, régulièrement, 0,1 ml de la suspension de spores (A.3.2).

Sur chacune des éprouvettes des récipients du groupe S et sur la surface de la gélose, déposer avec une pipette de la solution aqueuse de chlorure de mercure(II) (5.1.1).

8.2.6 Incubation

Fermer les récipients d'essai, et mettre en incubation à la fois les éprouvettes ensemencées (groupe I) et les témoins stériles (groupe S), à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une humidité relative supérieure à 90 %, durant 4 semaines ou plus longtemps selon accord entre les parties intéressées.

Toutes les précautions doivent être prises pour éviter un ruissellement sur la surface.

Si l'essai dure plus de 4 semaines, il faut utiliser une série supplémentaire d'éprouvettes.

NOTE — Si le développement des champignons est visible à l'œil nu durant les 4 semaines d'incubation, l'essai peut être considéré comme achevé si l'on prévoit seulement l'estimation visuelle.

8.3 Mode opératoire des essais avec champignons selon la méthode B (essai d'effet fongistatique)

8.3.1 Garnissage des récipients d'essai

Opérer comme il est indiqué en 8.2.1, mais en utilisant le milieu gélosé complet (A.1.5).

8.3.2 Mise en place des éprouvettes

Opérer comme il est indiqué en 8.2.2, mais en notant que le nettoyage des éprouvettes n'est pas nécessaire (voir note à 7.3).

8.3.3 Préparation de la suspension de spores pour ensemencement

On trouvera cette préparation dans le chapitre A.3 de l'annexe, en réalisant la suspension finale dans la solution (A.1.3).

8.3.4 Contrôle de la viabilité des spores

Opérer comme il est indiqué en 8.2.4.

8.3.5 Ensemencement ou désinfection des éprouvettes et du milieu

Sur chacune des éprouvettes (7.2) des récipients du groupe I et sur la surface de la gélose, répandre ou déposer avec une pipette de la suspension de spores (voir 8.3.3 et chapitre A.3 de l'annexe).

Sur chacune des éprouvettes des récipients du groupe S et sur la surface de la gélose, déposer avec une pipette de la solution aqueuse de chlorure de mercure(II) (5.1.1).

8.3.6 Incubation

Fermer les récipients d'essai, et mettre en incubation à la fois les éprouvettes ensemencées (groupe I) et les témoins stériles (groupe S), à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une humidité relative supérieure à 90 %, durant 4 semaines.

Il peut être décidé, par accord entre les parties intéressées, que la durée d'incubation soit plus longue, par exemple fixée à 8 semaines. Dans ce cas, il convient, au terme de chaque période de 4 semaines, de répandre ou de déposer avec une pipette, sur les éprouvettes, une petite quantité de la solution minérale glucosée (A.1.3), cela afin d'entretenir la croissance des champignons.

NOTE — Méthode B'

Une variante possible de la méthode B consiste à attendre le développement mycélien pour y déposer les éprouvettes.

Pour cela, opérer comme il est indiqué en 8.3.1 et en 8.3.2, mais en mettant en place seulement la moitié des éprouvettes. Les récipients correspondants constituent le groupe S.

L'autre moitié des éprouvettes est placée dans des récipients d'essai (6.1) non garnis.

On a finalement un groupe de récipients garnis de gélose et d'éprouvettes constituant le groupe S, un deuxième groupe de récipients garnis de gélose constituant, avec le troisième groupe de récipients contenant seulement des éprouvettes, le groupe I.

Opérer ensuite comme il est indiqué en 8.3.3 et en 8.3.4, puis selon 8.3.5, mais en ensemençant la totalité des récipients du groupe I et en désinfectant ceux du groupe S.

Mettre en incubation les trois groupes de récipients à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une humidité relative supérieure à 90 %.

Suivre visuellement le développement de la culture dans les récipients du groupe I. Dès que celle-ci est bien établie mais non sporulée (après 2 à 3 jours environ), enlever les éprouvettes des récipients non garnis et les déposer sur les cultures.

Remettre en incubation dans les mêmes conditions et pendant la même durée qu'il est prévu en 8.3.6.

Cette variante de la méthode B correspond généralement à une attaque plus poussée.

8.4 Mode opératoire des essais avec bactéries

8.4.1 Stérilisation des éprouvettes

Stériliser les éprouvettes par un moyen approprié. Les méthodes employées en laboratoire sont : l'autoclave à $120 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 20 min, ou, lorsqu'on ne peut pas employer la chaleur, une fumigation avec un produit approprié et une bonne ventilation, dans des conditions aseptiques afin de chasser toutes les fumées avant de commencer l'essai.

Par la suite, conserver les éprouvettes en récipients stériles et les manipuler avec des pinces stériles.

NOTE — Suivre attentivement les instructions de sécurité du fabricant du produit fumigène.

8.4.2 Préparation du milieu gélosé aux sels minéraux

En préparer une quantité suffisante pour l'utilisation prévue suivant le mode opératoire indiqué en A.2.3.

Laisser refroidir jusqu'à 45°C , puis continuer l'opération comme il est indiqué en 8.4.5.

8.4.3 Préparation de la suspension de cellules bactériennes

Sur la culture de bactéries entretenues sur gélose (5.3.1.3), faire un prélèvement, ensemençant du bouillon aux extraits de cerveau et de cœur (A.2.2) et mettre en incubation à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 h. Sur cette dernière culture, faire un prélèvement au moyen d'une anse en platine stérile et l'introduire dans 10 ml de la solution tampon (A.2.4).

Diluer cette suspension avec la solution (A.2.4) jusqu'à ce que la suspension finale de cellules bactériennes contienne environ 10^6 cellules par millilitre (déterminées à la chambre de comptage ou par turbidimétrie).

Cette suspension de cellules doit être utilisée dans l'heure qui suit sa préparation.

8.4.4 Contrôle de la viabilité des bactéries

En même temps que l'essai lui-même, préparer deux récipients contenant chacun 10 ml de la gélose aux extraits de cerveau et de cœur (A.2.1). Déposer 3 gouttes de la suspension finale de cellules bactériennes (8.4.3) et mettre en incubation à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 à 48 h. Il doit y avoir un copieux développement de la bactérie dans les deux récipients; sinon, refaire l'essai en totalité.

8.4.5 Préparation du milieu gélosé aux sels minéraux ensemencé

À environ 45°C , ensemencher la gélose (8.4.2) encore fondue avec une quantité suffisante de suspension de cellules bactériennes pour obtenir une concentration d'environ 50 000 cellules par millilitre de gélose, et mélanger.

8.4.6 Garnissage des récipients d'essai et mise en place des éprouvettes

Verser une quantité suffisante de la gélose ensemencée (8.4.5) dans des récipients d'essai stériles de manière à avoir une couche de gélose d'épaisseur 1 cm environ.

Après solidification de la gélose, mettre un premier groupe d'éprouvettes sur la surface de la gélose. Verser de nouveau sur les éprouvettes une quantité de la même gélose (8.4.5) suffisante pour les recouvrir, et laisser se gélifier (éprouvettes ensemençées).

Verser de même, dans d'autres récipients d'essai stériles, une quantité de la gélose non ensemencée (8.4.2) et laisser se solidifier. Y déposer un second groupe d'éprouvettes et désinfecter leur surface en y déposant avec une pipette de sécurité de la solution aqueuse de chlorure de mercure(II) (5.1.1). Verser de nouveau sur les éprouvettes une quantité de la même gélose (8.4.2) suffisante pour les recouvrir, et laisser se gélifier (éprouvettes témoins stériles).

8.4.7 Incubation

Fermer les récipients d'essai, et mettre en incubation à la fois les éprouvettes ensemençées (groupe I) et les éprouvettes stériles (groupe S), à $29 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une humidité relative supérieure à 90 %, durant 4 semaines ou plus longtemps selon accord entre les parties intéressées.

NOTES

1 Si le développement des bactéries est visible à l'œil nu durant les 4 semaines d'incubation, l'essai peut être considéré comme achevé si l'on prévoit seulement l'estimation visuelle.

2 Pour certaines bactéries, une autre température d'incubation pourra être choisie par accord entre les parties intéressées.

9 EXAMEN DES ÉPROUVETTES

9.1 Examen du développement des champignons ou des bactéries sur les éprouvettes destinées à l'estimation visuelle

Les éprouvettes exposées (ensemencées I et stériles S) sont

d'abord directement examinées à l'œil nu, puis, si nécessaire, à l'aide d'un microscope stéréoscopique (grossissement environ 50 X).

L'importance du développement des champignons est cotée comme suit.

9.1.1 Méthode A

- 0 — pas de croissance visible, même au microscope;
- 1 — croissance invisible ou à peine visible à l'œil nu, mais nettement visible au microscope;
- 2 — croissance à la surface visible à l'œil nu, mais ne couvrant pas plus de 25 % de la surface de l'éprouvette;
- 3 — croissance à la surface visible à l'œil nu et couvrant plus de 25 % de la surface de l'éprouvette.

9.1.2 Méthode B

- 0 — pas de croissance visible, même au microscope. Auréole d'inhibition absente ou présente; dans ce dernier cas, indiquer sa largeur, en millimètres;
- 1 — croissance invisible ou à peine visible à l'œil nu, mais nettement visible au microscope;
- 2 — croissance légère couvrant moins de 25 % de la surface de l'éprouvette;
- 3 — croissance moyenne couvrant 25 à 50 % de la surface de l'éprouvette;
- 4 — croissance importante couvrant plus de 50 % et moins de 100 % de la surface de l'éprouvette;
- 5 — croissance très importante couvrant la totalité de la surface de l'éprouvette.

NOTES

- 1 Si la différence entre les résultats donnés par les éprouvettes d'un même groupe atteint ou dépasse deux degrés de l'échelle, il est conseillé de refaire l'essai avec d'autres éprouvettes du même échantillon.
- 2 Dans certains cas, la cotation des éprouvettes après nettoyage (voir 9.2.1) donne des indications utiles. Des photographies en couleurs peuvent servir à conserver les résultats du contrôle de l'aspect.
- 3 S'il n'y a pas de croissance visible, remettre les éprouvettes en incubation durant une période supplémentaire de 4 à 8 semaines et les examiner de nouveau.

9.2 Examen des éprouvettes destinées aux déterminations de variation de masse et/ou de caractéristiques physiques

9.2.1 Nettoyage des éprouvettes exposées (ensemencées I et stériles S)

Les récipients avec une croissance visible doivent être inactivés soit par la stérilisation au gaz, soit par l'autoclave après la fin de l'essai.

Séparer les éprouvettes des cultures et des milieux.

Les plonger durant 5 min dans de la solution de chlorure de mercure(II) (5.1.1).

Les nettoyer à l'eau courante en les frottant doucement entre les doigts gantés.

Les éponger avec du papier filtre.

Laisser sécher 1 nuit à l'air à la température du laboratoire.

9.2.2 Pesée ou conditionnement des éprouvettes

- a) Pour les mesurages des variations de masse, mettre les trois groupes d'éprouvettes (témoins O, ensemencées I et stériles S) au dessiccateur et les peser régulièrement, à 0,1 mg près, jusqu'à masse constante, déterminée sur chaque éprouvette (en général 48 h). Soit m'_1 , m'_2 , etc., les masses de chaque éprouvette.
- b) Pour les mesurages des variations de caractéristiques physiques, conditionner les trois groupes d'éprouvettes (O, I et S) dans les conditions spécifiées dans l'ISO 291.

9.2.3 Détermination de la variation de masse

Déterminer, pour chaque éprouvette, la différence de pesée avant (voir 7.5) et après (voir 9.2.2) l'essai ($m'_1 - m_1$; $m'_2 - m_2$; etc.). Cette différence est en général négative, ce qui correspond à une perte.

9.2.4 Détermination de la variation des caractéristiques physiques

Déterminer, pour chaque groupe (O, I et S), les valeurs de la caractéristique physique envisagée selon la Norme internationale concernant le mesurage de cette caractéristique.

Les caractéristiques suivantes peuvent être mesurées :

- température de fléchissement sous charge (voir ISO 75);
- caractéristiques en flexion (voir ISO 178);
- résistance au choc (voir ISO/R 179 et ISO/R 180);
- caractéristiques en traction (voir ISO 527);
- caractéristiques en torsion (voir ISO 537);
- caractéristiques en compression (voir ISO 604);
- dureté (voir ISO 868);
- température de fragilité au choc (voir ISO/R 974);
- etc.

10 EXPRESSION DES RÉSULTATS

10.1 Estimation visuelle

Les résultats de l'observation visuelle de chaque éprouvette doivent être notés.

L'expression des résultats sera faite par indication, pour chaque éprouvette, des cotes d'importance de la croissance.