

---

---

**Détermination quantitative de  
l'activité antibactérienne des surfaces  
des carreaux céramiques — Méthodes  
d'essai —**

Partie 1:

**Carreaux céramiques incorporant des  
agents antibactériens en surface**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Quantitative determination of antibacterial activity of ceramic tile  
surfaces — Test methods —*

<https://standards.iteh.org/catalog/standards/sis/43cb455f-dh3e-4392-8000-e5601b861525/iso-17721-1-2021>  
**Part 1: Ceramic tile surfaces with incorporated antibacterial agents**



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 17721-1:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43cbd55f-db3c-4392-8000-e5601b861525/iso-17721-1-2021>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Matériel</b> .....	<b>2</b>
4.1 Souches bactériennes.....	2
4.2 Milieux de culture et solutions.....	2
4.2.1 Tensioactif non ionique.....	3
4.2.2 Bouillon nutritif.....	3
4.2.3 Bouillon nutritif dilué à 0,2 %.....	3
4.2.4 Gélose nutritive.....	3
4.2.5 Bouillon de peptones de caséine et de soja avec de la lécithine et du polysorbate 80 (SCDLP).....	3
4.2.6 Tampon phosphate salin (PBS).....	4
<b>5 Éprouvettes d'essai</b> .....	<b>4</b>
5.1 Dimensions.....	4
5.2 Éprouvettes témoins.....	4
5.3 Pré-conditionnement.....	5
5.4 Nombre d'éprouvettes.....	5
<b>6 Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
6.1 Préparation de l'inoculum d'essai.....	5
6.2 Film adhésif.....	5
6.3 Ensemencement des éprouvettes d'essai.....	5
6.4 Récupération des bactéries à partir des éprouvettes témoins non traitées à l'instant $t = 0$ h.....	6
6.5 Incubation.....	7
6.6 Récupération des bactéries à partir des éprouvettes de post-incubation.....	8
6.7 Dénombrement des bactéries viables à partir du lavage des éprouvettes.....	8
<b>7 Validation et calculs</b> .....	<b>8</b>
7.1 Généralités.....	8
7.2 Critères de validité d'un essai.....	9
7.3 Calcul de l'activité antibactérienne.....	9
<b>8 Rapport d'essai</b> .....	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>11</b>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 189, *Carreaux en céramique*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 17721 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

# Détermination quantitative de l'activité antibactérienne des surfaces des carreaux céramiques — Méthodes d'essai —

## Partie 1: Carreaux céramiques incorporant des agents antibactériens en surface

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie des méthodes d'essai permettant d'évaluer l'activité antibactérienne des surfaces des carreaux céramiques incorporant des agents antibactériens.

Le présent document ne traite pas des effets secondaires des traitements antibactériens, tels que la modification de la résistance chimique, la variation de la résistance aux taches ou les faibles différences de couleur, sur les surfaces des carreaux céramiques. Se reporter à l'ISO 10545-13 pour obtenir de plus amples informations sur la résistance chimique, à l'ISO 10545-14 pour la résistance aux taches et à l'ISO 10545-16 pour les différences de couleur.

Il convient que tous les résultats obtenus avec le présent document se réfèrent toujours à ce dit document ainsi qu'aux conditions d'utilisation qui y sont indiquées. Les résultats obtenus à l'aide du présent document indiquent l'activité antibactérienne dans les conditions expérimentales spécifiées, et ne reflètent pas l'activité dans toutes autres circonstances où une diversité de facteurs, tels que la température, l'humidité, les différentes espèces bactériennes, les teneurs en éléments nutritifs, etc., doit être prise en compte.

### 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

#### 3.1 antibactérien

condition dans laquelle le développement des bactéries à la surface des produits est limité, ou décrivant l'effet d'un agent qui limite le développement des bactéries à la surface des produits

#### 3.2 agent antibactérien

agent qui détruit les bactéries ou inhibe leur développement à la surface des produits par l'utilisation d'un traitement de surface *antibactérien* (3.1) ou d'un agent mélangé

**3.3 activité antibactérienne**

différence de logarithme du nombre de cellules viables trouvées sur un produit ayant été soumis à un traitement antibactérien et sur un témoin non traité après l'ensemencement et l'incubation des bactéries

**4 Matériel**

**AVERTISSEMENT** — Toute manipulation de microorganismes potentiellement dangereux nécessite un haut degré de compétences techniques et peut être soumise aux législations et aux réglementations nationales en vigueur. Il convient que ces essais soient exclusivement réalisés par des personnes formées aux techniques microbiologiques. Les pratiques usuelles en matière de désinfection, de stérilisation et d'hygiène de laboratoire doivent être rigoureusement respectées.

**4.1 Souches bactériennes**

Cette méthode d'essai a été développée en utilisant les bactéries suivantes:

- a) *Escherichia coli*;
- b) *Staphylococcus aureus*.

L'essai sera réalisé en utilisant l'une de ces deux bactéries. Les souches bactériennes à utiliser pour l'essai sont indiquées dans le [Tableau 1](#) et sont conservées par des entités enregistrées à la WFCC (World Federation for Culture Collections) ou à la JSCC (Japan Society for Culture Collections). D'autres espèces bactériennes peuvent être soumises à essai en utilisant cette méthode, mais les espèces utilisées, les conditions de culture et le processus d'essai doivent être détaillés dans le rapport d'essai.

Il convient de réaliser les transferts de cultures dans des enceintes de sécurité aseptisées. Ensemencer chaque souche sur un milieu de gélose nutritive inclinée en utilisant une anse d'ensemencement stérile; incubé pendant 18 h à 24 h à  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , puis conserver à une température comprise entre 5 °C et 10 °C. La température et la durée d'ensemencement doivent être choisies en fonction des bactéries utilisées pour l'essai.

Procéder à un repiquage des souches en répétant le processus dans les 30 jours. Au maximum 10 repiquages doivent être effectués à partir de la souche d'origine provenant de la collection de cultures. Après 30 jours, éliminer les cultures obliques de manière appropriée.

**NOTE** Dans le cas des bactéries conservées à  $-80 ^\circ\text{C}$  et des cultures lyophilisées, au maximum 10 repiquages doivent être effectués à partir de la souche d'origine.

Si nécessaire, des essais supplémentaires peuvent être réalisés avec d'autres souches bactériennes, dans les conditions de culture spécifiées pour cette espèce particulière. Ces conditions doivent être détaillées dans le rapport d'essai.

**Tableau 1 — Souches bactériennes et collections de cultures**

Bactérie	Numéro de souche
<i>E. coli</i>	ATCC 8739, DSM 1576, NBRC 3972, CIP 53.156, NCIB 8625
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538P, DSM 346, NBRC 12732, CIP 53.126, NCIB 8545

**4.2 Milieux de culture et solutions**

L'eau utilisée doit être distillée ou déionisée et sa conductivité doit être  $< 1 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Tous les réactifs doivent être de qualité analytique et/ou adaptée aux applications microbiologiques.

#### 4.2.1 Tensioactif non ionique

Le tensioactif non ionique doit être du monooléate de polyoxyéthylène sorbitanne (polysorbate 80).

#### 4.2.2 Bouillon nutritif

Pour 1 000 ml d'eau purifiée, prélever 3,0 g d'extrait de viande, 10,0 g de peptone et 5,0 g de chlorure de sodium, les placer dans une fiole et bien les dissoudre. Une fois le contenu bien dissous, utiliser une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique pour amener le pH à  $(7,1 \pm 0,1)$  à 25 °C. Stériliser en autoclave à  $(121 \pm 2)$  °C pendant au moins 15 min. Après la préparation, si le bouillon nutritif n'est pas utilisé immédiatement, le stocker à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

D'autres milieux de culture peuvent être sélectionnés sur la base des exigences relatives aux bactéries choisies pour l'essai. Le milieu sélectionné et les conditions de culture doivent être détaillés dans le rapport d'essai.

Le milieu de culture préparé peut être conservé au maximum un mois à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

#### 4.2.3 Bouillon nutritif dilué à 0,2 %

Pour 1 000 ml d'eau purifiée, prélever 3,0 g d'extrait de viande, 10,0 g de peptone et 5,0 g de chlorure de sodium, les placer dans une fiole et bien les dissoudre. Diluer 500 fois ce milieu à l'eau distillée ou déionisée, et ajuster le pH à  $(7,0 \pm 0,2)$  en utilisant une solution d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Stériliser en autoclave à  $(121 \pm 2)$  °C pendant au moins 15 min. Après la préparation, si le bouillon nutritif dilué à 0,2 % n'est pas utilisé immédiatement, le conserver à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

D'autres milieux de culture peuvent être sélectionnés sur la base des exigences relatives aux bactéries choisies pour l'essai. Le milieu sélectionné et les conditions de culture doivent être détaillés dans le rapport d'essai. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43cbd55f-db3c-4392-8000-e5601b861525/iso-17721-1-2021>

Le milieu de culture préparé peut être conservé au maximum un mois à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

#### 4.2.4 Gélose nutritive

Pour 1 000 ml d'eau purifiée, prélever 3,0 g d'extrait de viande, 5,0 g de peptone et 15,0 g de poudre de gélose (poudre d'agar-agar), les placer dans une fiole et mélanger. Chauffer la fiole dans l'eau bouillante afin de bien dissoudre son contenu. Utiliser une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/l pour amener le pH à  $(6,8 \pm 0,2)$  à 25 °C. Stériliser en autoclave à  $(121 \pm 2)$  °C pendant au moins 15 min. Après la préparation, si la gélose nutritive n'est pas utilisée immédiatement, la conserver à une température comprise entre 5 °C et 10 °C. Lors du mélange avec une suspension bactérienne, maintenir la température moyenne entre 45 °C et 48 °C.

D'autres milieux de culture peuvent être sélectionnés sur la base des exigences relatives aux bactéries choisies pour l'essai. Le milieu sélectionné et les conditions de culture doivent être détaillés dans le rapport d'essai.

Le milieu de culture préparé peut être conservé au maximum un mois à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

#### 4.2.5 Bouillon de peptones de caséine et de soja avec de la lécithine et du polysorbate 80 (SCDLP)

Pour 1 000 ml d'eau purifiée, prélever 17,0 g de peptone de caséine, 3,0 g de peptone de soja, 5,0 g de chlorure de sodium, 2,5 g de déshydrogénate monopotassique d'acide phosphorique, 2,5 g de glucose et 1,0 g de lécithine, les placer dans une fiole et les dissoudre. Ajouter 7,0 g de tensioactif non ionique et le dissoudre. Utiliser une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique pour amener le pH à

( $7,0 \pm 0,2$ ) à 25 °C. Stériliser en autoclave à ( $121 \pm 2$ ) °C pendant au moins 15 min. Après la préparation, si le SCDLP n'est pas utilisé immédiatement, le stocker à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

La solution SCDLP préparée peut être conservée au maximum un mois à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

#### 4.2.6 Tampon phosphate salin (PBS)

Pour 1 000 ml d'eau purifiée, prélever 34,0 g de phosphate monopotassique, les placer dans une fiole et bien les dissoudre. Utiliser une solution d'hydroxyde de sodium pour amener le pH à ( $7,0 \pm 0,2$ ) à 25 °C. Stériliser en autoclave à ( $121 \pm 2$ ) °C pendant au moins 15 min. Après la préparation, si le PBS n'est pas utilisé immédiatement, le stocker à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

La solution PBS préparée peut être conservée au maximum un mois à une température comprise entre 5 °C et 10 °C.

## 5 Éprouvettes d'essai

### 5.1 Dimensions

Réduire la taille des échantillons de manière à obtenir des éprouvettes d'essai carrées de ( $50 \pm 2$ ) mm × ( $50 \pm 2$ ) mm environ, ou ayant des dimensions aussi proches que possible de celles-ci. Les éprouvettes d'essai doivent être soumises à un processus de stérilisation adapté à l'échantillon. Toutes les surfaces de l'éprouvette doivent être stérilisées.

NOTE Lorsqu'il s'avère difficile, voire impossible, de couper des carrés de ( $50 \pm 2$ ) mm de long (jusqu'à 10 mm d'épaisseur), il est admis d'utiliser une autre taille d'éprouvette à condition que sa surface puisse être recouverte d'un film de 400 mm<sup>2</sup> à 1 600 mm<sup>2</sup>. Lorsque la surface de l'éprouvette est tachée par un contaminant organique, il est admis de commencer par éliminer ce contaminant par exposition à une source lumineuse de 1,0 mW/cm<sup>2</sup> pendant une durée maximale de 24 h.

### 5.2 Éprouvettes témoins

Pour expliquer les résultats et valider l'essai, des éprouvettes témoins appropriées doivent être incluses dans le dispositif expérimental. Il convient que ces éprouvettes témoins soient dépourvues de toutes propriétés antibactériennes et il est recommandé d'établir un référentiel des performances techniques en réduisant le plus possible les résultats erronés ayant les causes suivantes:

- variations quotidiennes des conditions en laboratoire et de la viabilité des organismes d'essai;
- variations d'un échantillon à l'autre de la formulation des émaux (glaçures) du commerce lorsque différentes sources sont utilisées pour les composants de l'émail et que des fluctuations normales apparaissent dans les matériaux d'origine minière. Ces variations ayant souvent des effets irréguliers sur la prolifération microbienne, il devient difficile d'évaluer l'efficacité des modifications apportées à la formule;
- tendance des surfaces céramiques à absorber l'eau, ce qui peut entraîner la mort des organismes par dessiccation et, par conséquent, une représentation erronée de l'activité antibactérienne de l'émail lui-même.

Il convient d'utiliser comme témoins des éprouvettes non traitées, c'est-à-dire n'ayant subi aucun traitement antibactérien.

S'il s'avère impossible de fournir des éprouvettes non traitées, les remplacer par des plaques de verre. Il convient de veiller à éviter toute contamination microbienne et toute contamination croisée entre les éprouvettes.



### 5.3 Pré-conditionnement

Il convient de stériliser les éprouvettes témoins et les éprouvettes d'essai de façon appropriée avant l'étape de pré-conditionnement. Préparer des lits de conditionnement séparés pour les éprouvettes d'essai et les éprouvettes témoins. Garnir la moitié inférieure d'une boîte de Petri stérile de 150 mm x 150 mm d'un papier-filtre Whatman de qualité n° 1 de 150 mm, ou équivalent.

Humidifier soigneusement le papier-filtre à l'aide d'eau déionisée stérile. Placer toutes les éprouvettes sur le papier-filtre humide. Apposer sur l'extérieur de chaque boîte une étiquette fournissant des informations suffisantes pour identifier l'échantillon de manière unique. Conditionner ensuite les échantillons en plaçant ces lits dans un incubateur maintenu à  $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$  et  $\geq 75\%$  HR pendant une durée comprise entre 18 h et 24 h. Après cette période, garder le papier-filtre humide pendant toute la durée de l'incubation.

### 5.4 Nombre d'éprouvettes

L'essai portera sur un minimum de 6 éprouvettes non traitées et 3 éprouvettes traitées. Des éprouvettes supplémentaires peuvent être ajoutées et le nombre d'éprouvettes utilisées doit être précisé dans le rapport d'essai.

## 6 Mode opératoire

### 6.1 Préparation de l'inoculum d'essai

Transférer les bactéries conservées sur la gélose nutritive inclinée en utilisant une anse d'ensemencement stérile et incubé à  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant 16 h à 24 h. Transférer les bactéries sur une gélose nutritive inclinée neuve et incubé à  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  pendant 16 h à 20 h. À l'aide d'une anse en platine, disperser uniformément une petite quantité de bactéries d'essai dans le bouillon nutritif dilué à 0,2 % et déterminer le nombre de bactéries par observation au microscope ou par toute autre méthode adaptée. Bien diluer cette suspension de bactéries avec du NB dilué à 0,2 % pour obtenir un nombre de  $6,7 \times 10^5$  ufc/ml –  $2,6 \times 10^6$  ufc/ml et utiliser la suspension obtenue en tant que suspension bactérienne d'essai. Si cette suspension n'est pas destinée à être utilisée immédiatement, la conserver à  $4 ^\circ\text{C}$  et l'utiliser dans les 4 h.

NOTE Voir [Figure 1](#) pour un organigramme du mode opératoire d'essai.

### 6.2 Film adhésif

Le film adhésif est inerte, n'absorbe pas l'eau et possède de bonnes propriétés d'étanchéité. Les feuilles sont coupées aux dimensions de  $(40 \pm 2)$  mm. Il convient que le film n'affecte pas le développement des bactéries et il peut être en polyéthylène, polypropylène ou polyester [poly(éthylène téréphtalate)]. Il est recommandé d'utiliser un film de 0,05 mm à 0,10 mm d'épaisseur. Les morceaux de film adhésif doivent être stérilisés par autoclave ou stérilisation de surface à l'alcool éthylique à 70 % avant l'application.

NOTE Les films découpés dans des sacs Stomacher conviennent également.

### 6.3 Ensemencement des éprouvettes d'essai

Pré-conditionner les éprouvettes témoins non traitées et les éprouvettes traitées. À l'aide d'une pipette stérilisée, prélever exactement 0,15 ml de suspension bactérienne d'essai et la verser goutte à goutte sur chaque éprouvette d'essai. Placer un film au-dessus de la suspension versée goutte à goutte et exercer une légère pression pour étaler la suspension sur toute la surface du film, en veillant à ce que la suspension ne s'échappe pas par le bord du film.

La quantité de suspension régulée peut entraîner une fuite de la suspension à partir du bord du film ou peut être insuffisante pour étaler la suspension de manière uniforme. Dans ce cas, il est admis de diviser par deux la quantité de suspension ou de la doubler. Cependant, lorsque le volume de l'inoculum d'essai est changé, la concentration des cellules bactériennes dans cet inoculum doit être ajustée pour fournir le même nombre de cellules bactériennes que lorsque le volume normal d'inoculum d'essai est appliqué.

#### **6.4 Récupération des bactéries à partir des éprouvettes témoins non traitées à l'instant $t = 0$ h**

Juste après l'ensemencement, traiter la moitié des éprouvettes témoins non traitées en plaçant chacune d'elles dans 10 ml de bouillon SCDLP (voir [4.2.5](#)) ou d'un neutralisant validé adapté. Agiter énergiquement pendant  $(60 \pm 5)$  secondes pour assurer un retrait total et uniforme des organismes d'essai du film et de l'éprouvette.

Il est possible d'utiliser d'autres méthodes de récupération (sac Stomacher, par exemple). De plus, si une limite de détection inférieure est requise, la quantité de neutralisant ajouté peut alors être réduite, mais la totalité de l'échantillon doit être recouverte d'un bouillon de neutralisant avant de poursuivre l'essai.

## **iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)**

[ISO 17721-1:2021](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43cbd55f-db3c-4392-8000-e5601b861525/iso-17721-1-2021>