

Ouattitude

Mr Daniel LACAMPAGNE

PAE La Baume - 4 Av de l'artisanat -

34290 Servian

Rapport d'essais

Test de résistance de moisissures de matériaux selon le « Guide technique spécialisé pour la consultation d'un dossier technique : Isolants à base de fibres végétales ou animales ». Version de mars 2018 du cahier technique 3713. Phase d'évaluation vis-à-vis des moisissures.

Rapport N° 0719-006_1

Rédigé le 4 novembre 2019

Par Alexia Fuentes

Ce document comporte 10 pages

1. Introduction

Le client souhaite que CONIDIA réalise un test de résistance de matériaux (ouate de cellulose) à la croissance de moisissures selon un protocole issu du « Guide technique spécialisé pour la constitution d'un dossier technique : Isolants à base de fibres végétales ou animales » cahier 3713 version de mars 2018. Le protocole testé correspond au scénario H95 (95% d'humidité).

CONIDIA est un laboratoire certifié **ISO9001:2015** travaillant sur les relations entre les micro-organismes et les matériaux. De nombreux tests de résistance sont effectués dans notre laboratoire (ISO846, ASTM D3273...). De plus, CONIDIA est un laboratoire **agrée CIR** pour la période 2019-2021.

2. Plan d'échantillonnage

Les échantillons ont été reçus au laboratoire le 23/08/2019 sous la référence M167 :

- Le client a fourni à CONIDIA des matériaux en vrac (**ouate de cellulose Ouattitude**). L'échantillonnage est constitué à partir de 3 lots de produits notés :

Référence Conidia	Lots différents	Référence échantillons
1	1.1	31/07/19
	1.2	01/08/19
	1.3	30/07/19

Ces trois échantillons sont utilisés pour réaliser l'ensemble des éprouvettes nécessaires à la réalisation du test.

3. Matériel et Méthode

3.1. Travaux de laboratoire

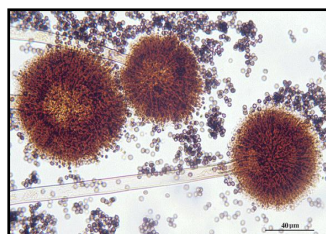
Les analyses ont été réalisées entre le 09/09/2019 et le 30/10/2019.

3.2. Souches de référence

Référence CONIDIA	Nom de la souche
M525	<i>Aspergillus niger</i>
M087	<i>Penicillium funiculosum</i>
M157	<i>Trichoderma viride</i>
M059	<i>Chaetomium globosum</i>
M458	<i>Paecilomyces variotii</i>

Une description détaillée de chaque souche est donnée ci-dessous (Source J.I Pitt et A.D. Hocking et Introduction to food –and airborne fungi by Robert A. Samson).

3.2.1. *Aspergillus niger*



Température minimale de croissance : 6-8°C; Température optimale de croissance : 35-37°C; Température maximale de croissance : 45-47°C; a_w (activité en eau) minimale: 0,77 à 35°C.

Aspergillus niger est un contaminant commun de nombreux substrats. Son habitat privilégié est la nourriture et l'intérieur des habitations. Les pathologies causées par *Aspergillus niger* sont de plusieurs types : mycoses de l'oreille externe, aspergillose pulmonaire...

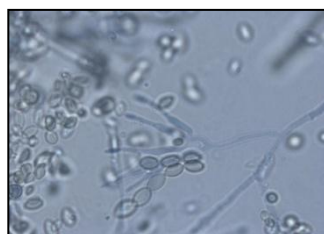
3.2.2. *Penicillium funiculosum*



Température minimale de croissance : 8°C; Température optimale de croissance : 30°C; Température maximale de croissance : 42°C; a_w (activité en eau) minimale : 0,90 à 23°C, 25°C et 30°C.

Cette espèce est présente occasionnellement dans les environnements intérieurs.

3.2.3. *Paecilomyces variotii*

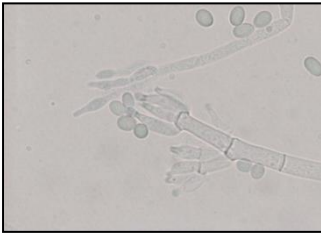


Température minimale de croissance : -2°C; Température optimale de croissance : 30°; Température maximale de croissance : 36°C ;a_w (activité en eau) minimale : 0,80 à 23 et 25°C.

L'habitat primaire de cette espèce est les céréales. *Paecilomyces variotii* est un contaminant de nombreuses matières premières et peut être responsable de maladies comme des pneumonies, des sinusites, des mycoses cutanées (Atlas of medical fungi, De Hoog et al., 2ème édition 2000).

Cette moisissure est aussi connue pour produire des mycotoxines.

3.2.4. *Gliocladium virens* ou *Trichoderma viride*

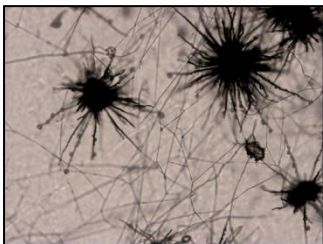


Température minimale de croissance : Non disponible; Température optimale de croissance : Non disponible; Température maximale de croissance : Non disponible.

A_w (activité en eau) minimale : Non disponible

Les moisissures du genre *Gliocladium* sont de grosses productrices d'enzymes. Leur origine est le sol et les matériaux en décomposition (en particulier le bois).

3.2.5. *Chaetomium globosum*



Température minimale de croissance : 4°C; Température optimale de croissance : 28°C; Température maximale de croissance : 38°C; a_w (activité en eau) minimale : 0,94 à 25°C.

Cette espèce est isolée de produits agricoles tels les céréales, le riz... elle est aussi connue pour se développer sur de nombreux produits à base de cellulose dont le papier.

3.3. Milieux de culture pour souches

Le milieu utilisé pour la mise en culture des souches de moisissures est un milieu à base Extrait de malt (4%) ; Agar-agar (2%); Qsp eau distillée 1L. Il est stérilisé à $(120 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant (20 ± 1) min à l'autoclave et coulé en surfusion partiellement refroidi en boîtes de Pétri de 90mm. Les moisissures sont cultivées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pour un maximum de temps de 4 semaines. Elles sont utilisables lorsqu'elles ont abondamment sporulé.

3.3.1. Eau avec agent mouillant.

Il s'agit d'eau stérile additionnée de 0,9% de NaCl et de 0,05% de Tween 80 et stérilisée par autoclavage $(120 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant (20 ± 1) min

3.4. Déroulement de l'essai

3.4.1 Etape I

A réception, les éprouvettes ont été préparées en étant déposées sur support inerte.

Il est nécessaire d'avoir 3 séries d'éprouvettes.

- **Série 1** (S1) : 3 éprouvettes pour évaluer la quantité de spores cultivables déposées à T0.
- **Série 2** (S2) : 9 éprouvettes dédiées aux observations visuelles et le cas échéant à l'évaluation de la quantité de spores cultivables à 28 jours.
- **Série 3** (S3) : 3 éprouvettes destinées à la détermination de prise en eau de l'éprouvette pendant la phase d'incubation de 28 jours. Ces éprouvettes sont pesées à J0, J+1 semaine et J+28 d'incubation.

Les différentes éprouvettes sont stérilisées aux rayons Gamma (cf. annexe 1 page 10).

Des séries de témoin ont été aussi réalisées lors de l'essai :

Témoin de viabilité de l'inoculum : 3 éprouvettes constituées de papier filtre et déposés sur milieu nutritif après inoculation.

Les éprouvettes de la série 2 sont examinées à l'œil nu et sous microscope dès qu'elles sont préparées. En cas de présence de moisissure, l'essai ne pourra pas avoir lieu et le client en sera informé.

En parallèle, les éprouvettes de la série S3 sont pesées.

Les éprouvettes de la série S1 et S2 ont été pulvérisées avec une solution de spores de moisissures calibrées à 10^7 spores/ml **dans de l'eau stérile** et qui est composée des souches précédemment évoquées.

Les suspensions individuelles de spores subissent une dilution pour remise en culture et comptage des UFC.

Les 3 éprouvettes de la série S1 (pulvérisées) sont ensuite traitées par suspension-dilution pour quantifier le nombre de spores déposées sur les éprouvettes.

Les éprouvettes de la série S2 (9 éprouvettes pulvérisées) et la série S3 (3 éprouvettes non pulvérisées) sont alors incubées pendant **28 jours** à (**28°C +/- 2°C et 95% +/- 5% d'humidité**).

3.4.1 Etape II

Après **5** jours d'incubation, les éprouvettes témoins (papier sur MA) sont observées. Si des croissances fongiques sont visibles, le test est prolongé sur **28** jours pour les échantillons S2 et S3.

Après **28** jours d'incubation, les éprouvettes de la série S2 sont observées à l'œil nu et au microscope. L'échelle de notation utilisée sera celle de la norme ISO846 (de 0 à 2).

L'importance de la croissance des moisissures est évaluée selon et exprimée l'échelle suivante:

- 0 aucun croissance visible à la surface de l'éprouvette
- 1 croissance de moisissures visibles au microscope (X 50)
- 2 croissance de moisissures visible à l'œil nu

Ces 9 éprouvettes de la série 2 ont été broyées **à 28 jours** et une suspension dilution a été effectuée pour quantifier le nombre de moisissures présentes.

Les résultats des observations visuelles et des remises en culture permettent de classer les échantillons testés selon les critères suivants :

Comportement moisissures	Exigences
<p>Résistant au développement des moisissures</p>	<p>Aucune moisissure visible à l'œil nu (cotations 0 ou 1 pour les 9 éprouvettes de la série S2 à la surface de l'éprouvette</p> <p>ET</p> <p>Moyenne du nombre d'unités fongiques cultivables en $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^3$ d'isolant en fin d'essai inférieur ou égal à la moyenne du nombre d'unités fongiques en $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^3$ d'isolant en début d'essai (**)</p>
<p>Non-Résistant au développement des moisissures</p>	<p>Développement fongique observé sur les éprouvettes à l'issue de la phase de pré-conditionnement</p> <p>OU</p> <p>Croissance de moisissures visibles à l'œil nu à l'issue de l'essai pour au moins une éprouvette de la série S2</p> <p>OU</p> <p>Aucune moisissure visible à l'œil nu (cotation 0 ou 1 pour les 9 éprouvettes de la série S2 à l'issue de l'essai)</p> <p>ET</p> <p>Moyenne du nombre d'unités fongiques cultivables en $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^3$ d'isolant en fin d'essai supérieure à la moyenne du nombre d'unités fongiques en $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^3$ d'isolant en début d'essai (**)</p>
	<p align="center">**Au seuil de risque de 0,05</p>

4. Résultats

4.1. *Témoins de croissance*

Dans les conditions 25°C et 95% d'humidité relative après 5 jours d'incubation.

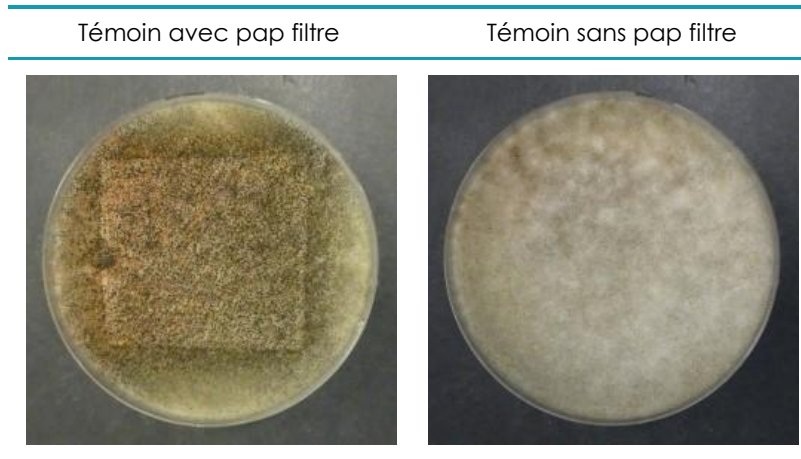


Tableau 1 : Papier filtre déposé sur gélose Malt-Agar pulvérisé (à gauche) et gélose Malt-Agar pulvérisé (à droite). Les témoins sont incubés dans les conditions de l'essai (après 5 jours d'incubation).

Les croissances sont très fortement visibles ce qui confirme la bonne viabilité des spores de moisissures utilisées pour la contamination des éprouvettes et valide le test.

4.2. *Evaluation de la quantité de spores cultivable déposées à T0 (S1)*

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus en nombre de spores revivifiables à T0 sur les éprouvettes de la série S1:

N°	Moyenne nombre d'UFC*/épreuve	Moyenne Log ₁₀ UFC/épreuve
1	3,1.10 ⁵	5,5
Viab	3,7.10 ⁶	NA

Tableau 2 : Nombre de spores de moisissures revivifiables après pulvérisation sur différents lots de matériaux puis traitement par broyage et incubation. (*UFC= Unités Formant Colonies). Les résultats sont la moyenne de 3 remises en culture de la série S1. NA = Non Applicable.

La solution initiale de spores a été calibrée à 3,7.10⁶ UFC/ml (calcul réalisé après culture).

4.3. Observation des croissances à J₊₂₈ (S2)

Dans les conditions 28°C et 95% d'humidité relative après 28 jours d'incubation.

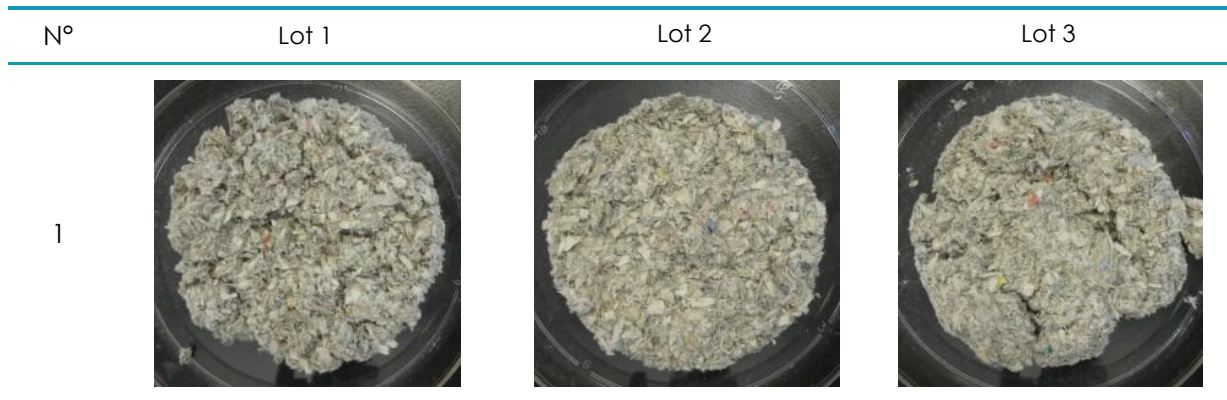


Tableau 3 : Eprouvettes de la série S2 pulvérisées avec une solution de spores de moisissures contenues dans de l'eau stérile après 28 jours d'incubation à 28°C et 95% d'humidité. Les éprouvettes sont déposées sur support inerte.

Les degrés de croissance sur les différentes éprouvettes au bout de 28 jours sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Niveau de cotation moisissures			
N°	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1	0	0	0

Tableau 4 : Résumé des croissances de micro-organismes sur les différentes éprouvettes (3 éprouvettes par lot soit 9 éprouvettes au total) après 28 jours d'incubation.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus en nombre de spores revivifiables après remise en culture (S2 = éprouvettes incubés pendant 28 jours avant remise en culture):

N°	Moyenne nombre d'UFC*/éprouvette	Moyenne Log ₁₀ UFC/éprouvette
1	1,1.10 ⁴	4

Tableau 5 : Nombre de spores de moisissures revivifiables après pulvérisation sur différents lots de matériaux puis traitement par broyage et incubation. (*UFC= Unités Formant Colonies). Les résultats sont la moyenne des 9 remises en culture de la série S2.

4.4. Tableau récapitulatif des pesées de la série S3 :

		Lot	Avant conditionnement J0	Après conditionnement J+ 1 sem	28 jours	Poids sec
1	S3	1	4,0	4,5	4,7	3,7
		2	4,2	4,6	4,8	3,8
		3	5,2	5,8	6,0	4,8

Tableau 6 : Récapitulatif des pesées de la série **S3** : Avant et après pré conditionnement, Après 28 jours à 28°C et 95% d'humidité relative puis après 48h de séchage à 70°C (poids en grammes).

5. Conclusions et interprétations.

Les résultats mentionnés dans ce rapport d'essai ne sont applicables qu'aux échantillons soumis au laboratoire tels qu'ils sont décrits dans le présent rapport.

Lors de l'observation visuelle des échantillons de la série S2 après 28 jours d'incubation pour la référence **Ouate de cellulose Ouattitude** (issu de 3 lots de production), aucune croissance fongique n'a été détectée à l'œil nu sur les 9 échantillons.

Une comparaison des moyennes effectuée selon un test de Student montre que la moyenne du \log_{10} UFC/cm² à T28j des échantillons S2 est inférieure à la moyenne \log_{10} UFC/cm² T0 des échantillons S1.

Le matériau testé à savoir **Ouate de cellulose Ouattitude** est considéré comme **résistant au développement des moisissures** selon le protocole issu du document « Evaluation de la résistance des produits isolants thermiques vis-à-vis des moisissures selon la méthode isolants moisissures FCBA-CSTB » version 20 du 09/02/2018 (conditions H95).

VACHER Sébastien
Docteur en microbiologie
Directeur CONIDIA

BOUVIER Cindy
BTS de biotechnologies
Responsable technique du laboratoire

Annexe 1 : certificat de stérilisation



Ionisation par rayons gamma (gamma irradiation)

Etablissement (factory):

IONISOS
Parc Dombes Côtières Activités
01120 Dagneux - France
Tél : +33 (0)4 78 06 41 14
Fax : +33 (0)4 78 06 06 20

www.ionisos.com

A l'attention de Sébastien VACHER
CONIDIA
Parc d'Activités en Chuel - Route du Chasselay
69650 Quincieux
France

CERTIFICAT DE TRAITEMENT (Treatment certificate)	
Nom du client (Treatment done for)	CONIDIA
Référence article client (Product description)	TRAITEMENT 25-50KGY
Référence BL client (your delivery note)	(N° BL= du)
Référence Commande client (your purchase order)	(N° Cde=BC-2019-171 du 17/09/2019)
Numéro de Lot client (your batch)	
Quantité de colis (Quantity of boxes)	1
Date de traitement (Treatment date)	28/09/2019
N° de traitement Ionisos (Ionisos treatment number)	19T03804D
N° de commande Ionisos (Ionisos order)	1905428D
RELEVÉ DES DOSES (Observed doses)	
Position	Doses lues (Doses controlled) kGy / Doses visées (Doses requested) kGy
R	31.40 - 31.40 / 25.00 - 50.00
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-

DMMP/CDVPC version4

Traitement contrôlé par (treatment controlled by) Véronique Castanier
Fait le (date) 30/09/2019