IEC 60068-2-10

Edition 6.1 2018-04

CONSOLIDATED VERSION

VERSION CONSOLIDÉE

colour inside

BASIC SAFETY PUBLICATION

PUBLICATION FONDAMENTALE DE SÉCURITÉ

Environmental testing – Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

Essais d'environnement – Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

IEC 60068-2-10:2005-06+AMD1:2018-04 CSV(en-fr)

THIS PUBLICATION IS COPYRIGHT PROTECTED

Copyright © 2018 IEC, Geneva, Switzerland

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from either IEC or IEC's member National Committee in the country of the requester. If you have any questions about IEC copyright or have an enquiry about obtaining additional rights to this publication, please contact the address below or your local IEC member National Committee for further information.

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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'IEC ou du Comité national de l'IEC du pays du demandeur. Si vous avez des questions sur le copyright de l'IEC ou si vous désirez obtenir des droits supplémentaires sur cette publication, utilisez les coordonnées ci-après ou contactez le Comité national de l'IEC de votre pays de résidence.

IEC Central Office
3, rue de Varembé
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

Tel.: +41 22 919 02 11
info@iec.ch
www.iec.ch

About the IEC
The International Electrotechnical Commission (IEC) is the leading global organization that prepares and publishes International Standards for all electrical, electronic and related technologies.

About IEC publications
The technical content of IEC publications is kept under constant review by the IEC. Please make sure that you have the latest edition, a corrigenda or an amendment might have been published.

IEC Catalogue - webstore.iec.ch/catalogue
The stand-alone application for consulting the entire bibliographical information on IEC International Standards, Technical Specifications, Technical Reports and other documents. Available for PC, Mac OS, Android Tablets and iPad.

IEC publications search - webstore.iec.ch/advsearchform
The advanced search enables to find IEC publications by a variety of criteria (reference number, text, technical committee,…). It also gives information on projects, replaced and withdrawn publications.

IEC Just Published - webstore.iec.ch/justpublished
Stay up to date on all new IEC publications. Just Published details all new publications released. Available online and also once a month by email.

Electropedia - www.electropedia.org
The world's leading online dictionary of electronic and electrical terms containing 21 000 terms and definitions in English and French, with equivalent terms in 16 additional languages. Also known as the International Electrotechnical Vocabulary (IEV) online.

IEC Glossary - std.iec.ch/glossary
67 000 electrotechnical terminology entries in English and French extracted from the Terms and Definitions clause of IEC publications issued since 2002. Some entries have been collected from earlier publications of IEC TC 37, 77, 86 and CISPR.

IEC Customer Service Centre - webstore.iec.ch/csc
If you wish to give us your feedback on this publication or need further assistance, please contact the Customer Service Centre: sales@iec.ch.

A propos de l'IEC
La Commission Electrotechnique Internationale (IEC) est la première organisation mondiale qui élabore et publie des Normes internationales pour tout ce qui a trait à l'électricité, à l'électronique et aux technologies apparentées.

A propos des publications IEC
Le contenu technique des publications IEC est constamment revu. Veuillez vous assurer que vous possédez l'édition la plus récente, un corrigendum ou amendement peut avoir été publié.

Catalogue IEC - webstore.iec.ch/catalogue
Application autonome pour consulter tous les renseignements bibliographiques sur les Normes internationales, Spécifications techniques, Rapports techniques et autres documents de l'IEC. Disponible pour PC, Mac OS, tablettes Android et iPad.

Recherche de publications IEC - webstore.iec.ch/advsearchform
La recherche avancée permet de trouver des publications IEC en utilisant différents critères (numéro de référence, texte, comité d'études,…). Elle donne aussi des informations sur les projets et les publications remplacées ou retirées.

IEC Just Published - webstore.iec.ch/justpublished
Restez informé sur les nouvelles publications IEC. Just Published détaille les nouvelles publications parues. Disponible en ligne et aussi une fois par mois par email.

Electropedia - www.electropedia.org
Le premier dictionnaire en ligne de termes électroniques et électriques. Il contient 21 000 termes et définitions en anglais et en français, ainsi que les termes équivalents dans 16 langues additionnelles. Egalement appelé Vocabulaire Electrotechnique International (IEV) en ligne.

Glossaire IEC - std.iec.ch/glossary
67 000 entrées terminologiques électrotechniques, en anglais et en français, extraites des articles Termes et Définitions des publications IEC parues depuis 2002. Plus certaines entrées antérieures extraites des publications des CE 37, 77, 86 et CISPR de l'IEC.

Service Clients - webstore.iec.ch/csc
Si vous désirez nous donner des commentaires sur cette publication ou si vous avez des questions contactez-nous: sales@iec.ch.

IEC 60068-2-10

Edition 6.1 2018-04

CONSOLIDATED VERSION

VERSION CONSOLIDÉE

colour inside

BASIC SAFETY PUBLICATION
PUBLICATION FONDAMENTALE DE SÉCURITÉ

Environmental testing – Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

Essais d'environnement – Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION

COMMISSION ELECTROTECHNIQUE INTERNATIONALE

ICS 19.040

ISBN 978-2-8322-5660-2

Warning! Make sure that you obtained this publication from an authorized distributor.
Attention! Veuillez vous assurer que vous avez obtenu cette publication via un distributeur agréé.

® Registered trademark of the International Electrotechnical Commission
Marque déposée de la Commission Electrotechnique Internationale

IEC 60068-2-10

Edition 6.1 2018-04

REDLINE VERSION

VERSION REDLINE

colour inside

BASIC SAFETY PUBLICATION

PUBLICATION FONDAMENTALE DE SÉCURITÉ

Environmental testing –
Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

Essais d'environnement –
Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

IEC 60068-2-10:2005-06+AMD1:2018-04 CSV(en-fr)

CONTENTS

FOREWORD 3
1 Scope 5
2 Normative references 5
3 General description 5
3.1 Background 5
3.2 Selection of test procedure 6
3.3 Considerations when specifying test procedures 6
4 Health hazards to operators 7
5 Description of the test variants 8
5.1 Test variant 1 8
5.2 Test variant 2 8
6 Reagents and materials 8
6.1 Cultures or spores – Supply and conditions 8
6.2 Preparation of spore suspension 9
6.3 Control strips 10
7 Description of test apparatus 11
7.1 Inoculation by spraying 11
7.2 Incubation of small specimens 11
7.3 Incubation of large specimens 11
8 Severities 11
9 Initial examinations 12
10 Pre-conditioning 12
10.1 Cleaning 12
10.2 Damp heat storage 12
11 Conditioning 12
11.1 Application 12
11.2 Inoculation 13
11.3 Incubation 13
12 Final examinations 14
12.1 Visual examination 14
12.2 Effect of growth 14
12.3 Extent of growth 14
13 Information to be given in the relevant specification 15
14 Information to be given in the test report as a minimum 15
Annex A (informative) Danger to personnel 16
Annex B (normative) Inoculation methods (see also 11.2) 18
Annex C (informative) Recommended safety precautions 21
Annex D (informative) Decontamination procedures 23
Annex E (informative) Information on the test fungi 25
Annex F (informative) Guidance 27
Bibliography 34

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION

_____

ENVIRONMENTAL TESTING –

Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

FOREWORD

1) The International Electrotechnical Commission (IEC) is a worldwide organization for standardization comprising all national electrotechnical committees (IEC National Committees). The object of IEC is to promote international co-operation on all questions concerning standardization in the electrical and electronic fields. To this end and in addition to other activities, IEC publishes International Standards, Technical Specifications, Technical Reports, Publicly Available Specifications (PAS) and Guides (hereafter referred to as "IEC Publication(s)"). Their preparation is entrusted to technical committees; any IEC National Committee interested in the subject dealt with may participate in this preparatory work. International, governmental and non-governmental organizations liaising with the IEC also participate in this preparation. IEC collaborates closely with the International Organization for Standardization (ISO) in accordance with conditions determined by agreement between the two organizations.
2) The formal decisions or agreements of IEC on technical matters express, as nearly as possible, an international consensus of opinion on the relevant subjects since each technical committee has representation from all interested IEC National Committees.
3) IEC Publications have the form of recommendations for international use and are accepted by IEC National Committees in that sense. While all reasonable efforts are made to ensure that the technical content of IEC Publications is accurate, IEC cannot be held responsible for the way in which they are used or for any misinterpretation by any end user.
4) In order to promote international uniformity, IEC National Committees undertake to apply IEC Publications transparently to the maximum extent possible in their national and regional publications. Any divergence between any IEC Publication and the corresponding national or regional publication shall be clearly indicated in the latter.
5) IEC itself does not provide any attestation of conformity. Independent certification bodies provide conformity assessment services and, in some areas, access to IEC marks of conformity. IEC is not responsible for any services carried out by independent certification bodies.
6) All users should ensure that they have the latest edition of this publication.
7) No liability shall attach to IEC or its directors, employees, servants or agents including individual experts and members of its technical committees and IEC National Committees for any personal injury, property damage or other damage of any nature whatsoever, whether direct or indirect, or for costs (including legal fees) and expenses arising out of the publication, use of, or reliance upon, this IEC Publication or any other IEC Publications.
8) Attention is drawn to the Normative references cited in this publication. Use of the referenced publications is indispensable for the correct application of this publication.
9) Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this IEC Publication may be the subject of patent rights. IEC shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

DISCLAIMER
This Consolidated version is not an official IEC Standard and has been prepared for user convenience. Only the current versions of the standard and its amendment(s) are to be considered the official documents.

This Consolidated version of IEC 60068-2-10 bears the edition number 6.1. It consists of the sixth edition (2005-06) [documents 104/365/FDIS and 104/373/RVD] and its amendment 1 (2018-04) [documents 104/740/CDV and 104/790/RVC]. The technical content is identical to the base edition and its amendment.

In this Redline version, a vertical line in the margin shows where the technical content is modified by amendment 1. Additions are in green text, deletions are in strikethrough red text. A separate Final version with all changes accepted is available in this publication.

International Standard IEC 60068-2-10 has been prepared by IEC technical committee 104: Environmental conditions, classification and methods of test.

This sixth edition constitutes a technical revision.

The main changes with respect to the previous edition are listed below:

– Two test fungi replaced by two others
– Concentration of the spores defined for each test fungus
– Spores suspension in mineral salt solution additionally introduced
– Pre-conditioning of the specimens by damp heat storage prescribed
– Supersonic aerosolization of the spores suspension as the preferred inoculation method introduced
– Duration of incubation reduced from 84 days to 56 days
– Extent of mould growth grade 2 split into grade 2a and grade 2b
– Detailed information on methods of inoculation given in Annex B
– Annex E: flow-chart deleted

This publication has been drafted in accordance with the ISO/IEC Directives, Part 2.

It has the status of a basic safety publication in accordance with IEC Guide 104.

This standard forms Part 2-10 of IEC 60068 which consists of the following major parts, under the general title *Environmental testing*:

Part 1: General and guidance
Part 2: Tests
Part 3: Supporting documentation and guidance
Part 4: Information for specification writers
Part 5: Guide to drafting of test methods

The committee has decided that the contents of the base publication and its amendment will remain unchanged until the stability date indicated on the IEC web site under "http://webstore.iec.ch" in the data related to the specific publication. At this date, the publication will be

- reconfirmed,
- withdrawn,
- replaced by a revised edition, or
- amended.

IMPORTANT – The 'colour inside' logo on the cover page of this publication indicates that it contains colours which are considered to be useful for the correct understanding of its contents. Users should therefore print this document using a colour printer.

ENVIRONMENTAL TESTING –

Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

1 Scope

This part of IEC 60068 provides a test method for determining the extent to which electrotechnical products support mould growth and how any mould growth may affect the performance and other relevant properties of the product.

Since mould growth conditions include high relative humidity, the test is applicable to electrotechnical products intended for transportation, storage and use under humid conditions over a period of some days at least.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/IEC 17025:1999, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*

ISO 846:1997, *Plastics – Evaluation of the action of microorganisms*

MIL–STD–810 F:2000, *Method 508.5 Fungus*

Laboratory Biosafety Manual 2nd Ed., WHO 1993, ISBN 92 4 1544503

3 General description

~~This test covers the inoculation of electrotechnical products with a selection of mould spores followed by a period of incubation under conditions which promote spore germination and the growth of mould.~~

~~Two variations of the test are given. Variant 1 specifies inoculation of the specimen with the mould spores without nutrients whereas variant 2 specifies the inoculation with the mould spores suspended in a nutritive solution which supports mould growth.~~

~~It is advisable to use testing procedures such as specified for plastics in ISO 846 to assess the vulnerability to damage by mould growth of the constructional materials used.~~

~~NOTE Laboratories for microbiological testing of technical products should be accredited in accordance with ISO/IEC 17025. See further Annex F.~~

3.1 Background

Under certain climatic and environmental conditions, micro-organisms may settle on and colonize the surface of electrotechnical equipment. Their presence or their metabolic products may not only damage the equipment itself, but may also affect the equipment's operability and serviceability. The actions of micro-organisms on equipment are influenced by two different processes: direct action in which the deterioration of material serve as a nutritive substance

for the growth of the micro-organisms and indirect action in which the metabolic products of the micro-organisms generate deterioration.

The preferred method for controlling the effects of micro-organisms is by the selection of materials that do not promote growth. Also acceptable is the treatment, or hermetic sealing, of potentially vulnerable materials and components. Additionally, equipment may not need to be evaluated if it is stored and/or operated throughout its entire life, in conditions unlikely to encourage the growth of micro-organisms. Only if these cannot be achieved is it usually necessary to demonstrate the resistance of complete or partial equipment by testing.

The test procedures and severities of this document are most commonly used to evaluate the resistance of complete or partial equipment, to the damaging effects due to the presence of micro-organisms and their metabolic products. Testing of entire equipment is usually necessary if it is critical that performance be demonstrated after exposure to adverse temperature/humidity conditions that would support the growth of micro-organisms.

An alternative approach which is sometimes used is to consider only the individual materials of which an equipment is composed. This alternative approach may be particularly relevant when the primary concern is with deterioration of structural materials of the equipment rather than its operability and serviceability. In such cases, individual materials may need to be evaluated, only if previous evidence exists as to its resistance to the effects of growth of micro-organisms. The testing procedures in ISO 846 are essentially the equivalent of those set out in this document but applied to specimens comprising samples of material.

Some materials can, when buried in natural soil that has a water holding capacity, exhibit significant degradation in structural characteristics. The evaluation of such conditions are not included in this document. However, should the evaluation of material be required, Method D (soil-burial test) in ISO 846 is suggested. Similarly, if it is necessary to evaluate a material's resistance to biological growth, Method C (resistance to bacteria) in ISO 846 is suggested.

3.2 Selection of test procedure

The test procedures of this document involves exposing electrotechnical products to the action of a selection of test strains of mould spores for a period of incubation under conditions which promote spore germination and the growth of mould. At the end of the exposure, the specimens are assessed for deterioration by visual examination and, if applicable, for any change in mass or other physical properties.

This document contains two basic test procedures Variant 1 and Variant 2:

a) In Variant 1, specimens are inoculated with a mixed suspension of mould spores in the presence of an incomplete nutritive medium (without a carbon source). The mould can only grow at the expense of the specimen. If the specimens contain no nutritive component, the fungi cannot develop mycelia and there is no deterioration of the material.

b) In Variant 2, specimens are inoculated with a mixed suspension of mould spores in a (complete) nutritive solution, i.e. with a carbon source. Even if the specimen does not contain any nutritive elements, the mould can grow over the specimen and their metabolic products can attack the material. Any inhibition of the growth on the specimen shows fungal activity of the material or the presence of a fungicidal treatment.

3.3 Considerations when specifying test procedures

Surface contamination in the form of dusts, ~~splashes~~ liquids, condensed volatile nutrients or grease may be deposited upon assembled specimens. This can be brought about by storage and use or transport with the product exposed to the atmosphere or handled without protective covering. This surface contamination can cause an increased colonization by fungi and may lead to greater growth and damage. An assessment of the effect of such contamination can be given by the application of test variant 2.

Due to the difficulty of maintaining the necessary conditions in a very large chamber, ~~a~~ large ~~composite~~ equipment ~~will normally~~ may be tested as a number of sub–units. This will in any case minimize the cost of the test since several sub-units may be so similar in construction that only one of them needs to be tested.

Due to the difficulty of maintaining the necessary conditions in a very large chamber, large equipment may be tested as a number of sub–units. This will in any case minimize the cost of the test since several sub-units may be so similar in construction that only one of them needs to be tested.

The incubation period for determining degradation resistance of equipment is a pragmatic duration which is normally sufficient for the degradation actions of micro-organisms to become apparent. It is not necessarily related to, nor is it intended to replicate, the exposure duration of equipment to adverse temperature/humidity conditions that would support the growth of micro-organisms.

Regardless of the test variant used, specimens are inoculated with a suspension of mould spores typically by spraying. The preferred approach is by means of a supersonic aerosol apparatus, such as that used for therapeutic treatment by inhalation. Such an approach allows a homogeneous distribution of the spores to be achieved on the surfaces of the specimen and consequently results in a high reproducibility of the test results. However, if spraying is not suitable due to the size, design or other properties of the specimen, inoculation with spore suspension by dipping or painting may be carried out, as stated in the relevant specification.

This document contains guidance on the post-test visual inspection of specimens as well as an approach for grading the extent of mould growth. If the purpose of the test is to establish degradation of the operability of electrotechnical equipment, additional electrical and/or mechanical checks will need to be specified by the relevant specification. In such cases, it may be essential that the incubation conditions of temperature and relative humidity surrounding the specimen are maintained throughout such electrical and/or mechanical checks. Additionally, controlled recovery conditions may be needed in order to prevent moisture being absorbed or lost by the specimen before undertaking any required post-test examinations. IEC 60068-1:2013, 4.4.2 indicates an approach that may be used if the specimen needs to be subjected to controlled recovery conditions.

4 Health hazards to operators

This test procedure requires the use of viable mould spores and the application of ambient conditions which promote mould growth.

Therefore before any attempt is made to handle mould cultures, or to carry out steps of the test subsequently described, it is important that the annexes of this standard be studied.

Annex A Danger to personnel

Annex B Inoculation methods

Annex C Recommended safety precautions

Annex D Decontamination procedures

Laboratory Biosafety Manual, 2nd Ed., World Health Organization 1993, ISBN 92 4 1544503 includes general background reading on safety in facilities dealing with fungi.

5 Description of the test variants

5.1 Test variant 1

After a 28 days incubation period determine

- the extent of mould growth by visual inspection;
- the physical damage caused by mould growth;
- in the case of mould growth the effect on functioning and/or electrical properties if required in the relevant specification.

The incubation period shall be extended to a total of 56 days before checking the function and/or measuring electrical properties if required in the relevant specification.

5.2 Test variant 2

After a simulated contamination with nutrients followed by a 28 days incubation period determine

- the extent of mould growth by visual inspection;
- the physical damage caused by mould growth;
- the effect of the mould growth on functioning and/or electrical properties if required in the relevant specification.

The surface resistance of the specimen will be reduced by application of nutrients for simulation of contamination without any mould growth. This effect should be considered if checking the function and/or measuring electrical properties.

Due to the application of nutrients, mould growth will exist; failing this, a fungicidal effect shall be considered.

6 Reagents and materials

6.1 Cultures or spores – Supply and conditions

The following fungi shall be used for performing the test (see Table 1). The nature of the attack to be expected from each fungus is indicated for guidance. The spores of all cultures, however, shall be used together in a mixed suspension whatever the nature of the specimen.

The cultures or freeze-dried spores shall be obtained from a recognized mycological cultures collection. They shall be supplied in containers with the date of inoculation of the culture thereon.

A certificate shall confirm the accordance of the culture with the fungus and strain number as specified in Table 1 and/or Annex E.

Cultures and freeze-dried spores shall be handled and stored in accordance with the recommendations of the supplier and the relevant requirements of this standard. Preparing a culture by the test laboratory from a stock culture or from freeze-dried spores the date of inoculation shall be marked on the culture tube.

Table 1 – Test fungi

No.	Name	Strain No. [3)]	Attacks	Note
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	many materials	[1) 2)]
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	plastic materials	[1) 2)]
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	cellulose	[1) 2)]
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	hydrocarbon based lubricants	–
5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	plastics and leather	[1) 2)]
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	many materials especially textiles	[1) 2)]
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	rubber	[1) 2)]
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	cellulose, textiles and plastics	[2)]

[1)] Also specified in ISO 846.
[2)] Also specified in MIL–STD–810 F, Table 508.5–I.
[3)] See also Annex E.

Cultures shall be used for preparing the test spore suspension when they are well sporulated.

This is reached in most cases after a 7 to 14 days incubation period at (29 ± 1) °C.

NOTE The supplier of cultures or freeze-dried spores may recommend other conditions to develop the culture.

If the cultures are not for immediate use, they shall be stored in a refrigerator at a temperature between 5 °C and 10 °C, for a continuous period of not more than six weeks commencing not earlier than 14 days and not later than 28 days from the date of inoculation given on the container.

The lid of the container shall not be opened once the preparation of the spore suspension has started. Only one suspension shall be made from the opened container.

6.2 Preparation of spore suspension

6.2.1 General

The suspension is first prepared in sterilized distilled water, to which has been added a wetting agent with a concentration between 0,005 % and 0,01 %. An agent based on N-methyl-taurine or on dioctyl-sodium sulphosuccinate has been found to be suitable. The wetting agent shall not contain substances which support or inhibit mould growth.

10 ml of the water containing the wetting agent shall be added gently to each culture. A platinum or nichrome wire shall be sterilized by heating to red heat in a flame and allowed to cool. This wire shall be used to gently scrape the surface of the culture to liberate spores.

The liquid shall be slightly agitated to disperse the spores without detaching mycelial fragments and the suspension shall be gently decanted and filtered through a thin layer of sterile glass wool or through a micro filter funnel with a pore size from 40 µm to 100 µm into a sterilized centrifuge tube.

The filtered spore suspension shall be centrifuged and the supernatant liquid shall be discarded. The residue shall be re-suspended in not less than 10 ml of sterilized distilled water and centrifuged again. The spores shall be washed in this manner three times.

6.2.2 Preparation for test variant 1

Dilute the final spore residue of each culture in a volume of

- mineral salt solution in accordance with 6.3 but without sucrose (saccharose) if the relevant specification prescribes visual inspection only (see 5.1);
- sterilized distilled water if the relevant specification prescribes checking the function or measuring electrical properties (see 5.1);

that adjusting the spore concentration to 1×10^6 to 2×10^6/ml determined with a counting chamber or by turbimetry.

Blend equal volumes of the single suspensions sufficient for the relevant inoculation procedure to obtain the final mixed spore suspension ready for inoculation. Spore suspension in mineral salt solution shall be used within 48 h after preparation. Spore suspension in sterilized distilled water shall be used within 6 h after preparation.

NOTE Prepare total volumes of about 100 ml for inoculation by spraying or of about 500 ml for inoculation by painting or dipping.

6.2.3 Preparation for test variant 2

Dilute the final spore residue of each culture in such a volume of nutritive solution in accordance with 6.3 adjusting the spore concentration to 1×10^6 to 2×10^6/ml determined with a counting chamber or by turbimetry.

Blend equal volumes of the single suspensions sufficient for the relevant inoculation procedure to obtain the final mixed spore suspension ready for inoculation. Use the spore suspension within 6 h after preparation.

NOTE See 6.2.2.

6.3 Control strips

The control strips called for in the test shall consist of strips of pure white filter paper or untreated cotton textile.

The nutritive solution called for in preparing the control strips shall consist of a solution of the following reagents in distilled water.

Reagent	g/l
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0,7
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0,3
Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,5
Sodium nitrate ($NaNO_3$)	2,0
Potassium chloride (KCl)	0,5
Ferrous sulphate ($FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,01
Sucrose (saccharose)	30,0

The pH shall be 6,0 to 6,5 at 20 °C. It shall be adjusted with 0,01 molar NaOH if needed. The solution shall be sterilized in an autoclave at (120 ± 1) °C for 20 min.

Immediately before inoculated (see 11.2), the control strips shall be saturated by the nutritive solution, removed from it and allowed to drain free of drips.

7 Description of test apparatus

7.1 Inoculation by spraying

Preferably a supersonic aerosol apparatus, as used for therapeutic treatment by inhalation, should be used in connection with a safety inoculation chamber (see Annex B).

7.2 Incubation of small specimens

Containers of glass or plastic with lids provided with devices for putting on or suspending the specimens and control strips shall be used.

The container shall be of such size and shape as to expose a sufficient surface area of free water in the base at all times in order to maintain a value of relative humidity greater than 90 % within it.

The devices for putting on or suspending shall be such as to ensure that specimens and control strips are not allowed to touch or to be splashed by the water.

The containers shall be placed in a chamber maintaining a uniform temperature throughout the working space within the range of 28 °C to 30 °C for incubating the specimens and control strips. Any periodic cycling of temperature due to action of the thermostat shall not exceed 1 °C/h.

7.3 Incubation of large specimens

A suitable humidity chamber shall be used for incubation specimens too large for the containers specified in 7.2. The humidity chamber shall have a well sealed door to prevent exchange of atmosphere between its interior and the laboratory.

The relative humidity within the working space shall be maintained at a value greater than 90 %. No condensed water from the walls or roof of the chamber shall be allowed to fall on the specimens and control strips. The temperature throughout the working space shall be maintained uniformly within the range of 28 °C to 30 °C. Any periodic cycling of the temperature due to action of the thermostat shall not exceed 1 °C/h.

In order to achieve the specified humidity and temperature uniformly throughout the working space it may be necessary to use forced air circulation within it. The flow rate shall not exceed 1 m/s over the surface of the specimen(s).

8 Severities

The severity for each test variant is determined by the duration of the incubation.

Test variant 1 – severity 1 28 days
– severity 2 56 days

as required in the relevant specification.

Test variant 2 – severity 28 days

9 Initial examinations

The specimens shall be visually inspected and shall be electrically and mechanically checked as required by the relevant specification.

10 Pre-conditioning

10.1 Cleaning

The specimens shall be used for the test in the “as received” condition. Normally, they shall not be submitted to any special cleaning.

If prescribed by the relevant specification half of the lot of specimens shall be cleaned by washing with ethanol or demineralized water containing a detergent followed by rinsing with demineralized water free of detergent and the other half shall remain in the “as received” condition. By this means any mould growth caused by the use of unsuitable materials in construction of the product can be distinguished from that due to surface contamination.

When the grade 0 is required in the relevant specification (Test variant 1), consideration should be given to the need to clean specimens because presence of contamination may promote mould growth.

NOTE Grade 0, see 12.3.

10.2 Damp heat storage

The specimen(s) shall be stored under the conditions of incubation at (29 ± 1) °C and a relative humidity > 90 % and < 100 % not less than 4 h immediately before inoculation.

11 Conditioning

11.1 Application

For the test variant stated in the relevant specification the application shall be carried out according to the method described below.

11.1.1 Test variant 1

If the relevant specification requires checks of functioning and/or measurement of electrical properties two groups of specimens shall be involved:

Group 1 test specimen(s) inoculated with the spore suspension and incubated;

Group 2 negative control specimen(s) sprayed or painted with or dipped in sterilized distilled water in accordance with the inoculation method used for group 1 and stored at the same temperature and relative humidity as prescribed for incubation but in a sterile environment.

If the relevant specification requires no checks of functioning and/or measurement of electrical properties the group 1 shall be used only.

11.1.2 Test variant 2

Two groups of specimens shall be involved:

Group 1 test specimens inoculated with spores suspended in the nutritive solution and incubated;

Group 2 in accordance with test variant 1, group 2.

NOTE Negative control specimen(s) should be exposed to the specified conditions in a separate chamber to that in which the inoculated specimens are held. To ensure that no mould grows on the negative control specimens, the chamber should be sterilized by one of the methods given in D.1.1. The test is valid unless both the test specimen(s) and a negative control specimen support growth.

11.2 Inoculation

The inoculation of the test specimen(s) and control strips (see 6.3) with the spore suspension (see 6.2) shall be carried out by spraying if not otherwise prescribed in the relevant specification.

If spraying is not suitable due to the size, design or other properties of the specimen inoculation with spore suspension by dipping or painting may be carried out as stated in the relevant specification.

NOTE Spraying by aerosolization of the spore suspension with a supersonic aerosol apparatus as used for therapeutic treatment by inhalation in connection with a safety inoculation chamber (see Annex B) allows a very homogeneous distribution of the spores on the surface to be tested giving a high reproducibility of the test results. That should be the preferred inoculation method.

11.3 Incubation

The conditions of incubation are (29 ± 1) °C and a relative humidity of >90 % and <100 %. The conditions shall be maintained in the containers (see 7.2) for small specimens or in the humidity incubation chamber (see 7.3) for large specimens.

Immediately after inoculation, the small specimens and at least 3 control strips shall be arranged in the container in a well spaced layout and without restriction of setting the required relative humidity. After that the container shall be placed in the incubation chamber.

Where applicable, negative control specimens shall be arranged in similar but sterilized containers as for the inoculated specimens without control strips. The containers shall then be placed in the incubation chamber.

In the case of large specimens a suitable number of control strips shall be placed in the chamber with the specimens. Any negative control specimens shall be exposed in a separate freshly disinfected chamber (see Annex D) used preferably for negative control specimens only.

The containers or the humidity chamber shall be opened only to

- inspect the control strips ascertaining the viability of the spores and the maintenance of the conditions of incubation after 7 days;
- supply the containers with oxygen from the air once every 7 days until the completion of the prescribed duration of incubation;
- perform visual intermediate inspection(s) in accordance with 11.3.7.

The opening shall be for a few minutes only.

After the 7 days incubation, mould growth of more than one strain shall be visible to the naked eye on each of the control strips. Otherwise the test shall be considered void and shall be recommenced. In this case, the same specimens may be used.

Any interruption of the incubation is permitted for a visual inspection only and for not more than 10 min in each case and if required in the relevant specification. Not more than two visual inspections shall be prescribed to perform within the duration of the incubation. The time(s) of the visual inspection shall be specified in the relevant specification.

12 Final examinations

12.1 Visual examination

The specimens shall be examined (see 12.3), checked and/or photographed (as required by the relevant specification), immediately after they are removed from the container or humidity chamber, because the growth can change its appearance by desiccation. See Annex C, for recommended safety methods of handling.

Following a visual examination and assessment of the actual growth, the mycelium shall be carefully removed with ethanol 70 % vol from the surface which shall then be examined through a microscope to assess the nature and extent of any attack (e. g. etching) on the specimen. See Annex C for recommended safety methods when removing the mould growth.

12.2 Effect of growth

When the relevant specification calls for electrical and/or mechanical checks while damp (following incubation), it is essential that the relative humidity of the surroundings of the specimen(s) shall not be allowed to fall unduly until after such checks have been made. The checks shall therefore be carried out on small specimens while still exposed in the container with the lid fitted and free water. For large specimens checks shall be made while they are still in the humidity chamber.

NOTE When electrical connections have to be made or work has to be done on specimens in containers or humidity chambers with the lids or doors necessarily opened, this operation should be carried out with regard to the safety of operators. See Annex C for recommended safety methods of handling. Requirements of the manufacturer for operation under damp heat conditions given in the operation manual will be observed.

Similar checks shall be made on the specimens inoculated with spore suspensions and those inoculated with water only. Any significant difference between the two groups is considered to be additional due to the presence of mould growth as well as the high humidity.

Following the checks, the specimens shall be removed and visually examined as prescribed in 12.1.1 and finally any attack on the specimen shall be determined as in 12.1.2.

If the relevant specification prescribes checks after recovery, the specimens shall be removed from the container or chamber then visually examined as specified in 12.1.1 and then exposed to the specified conditions for recovery for a period of 24 h at the conclusion of which the checks shall be made.

12.3 Extent of growth

The specimens shall be inspected first by the naked eye and then if necessary with a stereoscopic microscope with a nominal magnification of approximately 50 x.

The extent of growth shall be assessed and expressed according to the following grade:

Grade

0 No growth apparent under a nominal magnification of 50 x

1 Traces of growth plainly visible under the microscope

2a Sparse growth visible to the naked eye and/or under the microscope scattered only or localized to a few places covering all together not more than 5 % of the test surface

2b Growth plainly visible to the naked eye and/or under the microscope distributed more or less homogeneously on many places covering all together not more than 25 % of

the test surface

3 Growth plainly visible to the naked eye and covering more than 25 % of the test surface

NOTE Where specimens comprising an assembly show varying grades of growth they should be assessed separately. For test variant 2 grade 0 should be required only if it is specified to examine for a fungistatic effect.

13 Information to be given in the relevant specification

When this test is included in the relevant specification, the following details shall be given

		Clause or subclause
a)	Test variant 1 or 2	5, 11.1
b)	Test variant 1 duration of incubation (severity)	5, 8
c)	Initial electrical and mechanical measurements and functional checks (only if performance deterioration is to be determined)	5, 9, 11.1
d)	Preconditioning by cleaning	10.1
e)	Inoculation method (if not by spraying)	11.2
f)	Interruption of incubation for visual intermediate inspection	11.3.7
g)	Final examinations	12
h)	Extent of growth (grade) to be approved (if needed)	12.3

14 Information to be given in the test report as a minimum

a) Test laboratory (name, address and accreditation)
b) Customer (name and address)
c) Description of the specimen(s)
d) Test standard, edition and test variant
e) Severity for test variant 1
f) Test fungi (if deviating from the test standard)
g) Initial, intermediate and final examinations (detailed)
h) Cleaning of the specimen(s) (if applied)
i) Method of inoculation
j) Conditions of incubation (if deviating from the test standard)
k) Mould growth on the control strips (after 7 days incubation)
l) Test results (specific observations inclusive)
m) Test criterion (permissible grade of mould growth if prescribed)
n) Evaluation of the performance (basing on the test criterion)

Annex A
(informative)

Danger to personnel

A.1 General

It is the opinion of mycologists and pathologists that conducting the mould growth test can constitute a health hazard, unless special precautions are taken.

The precautions detailed in Annexes A, B, C and D are based upon established microbiological techniques and specialized equipment. Persons carrying out the test shall be trained in microbiological laboratory work.

A microbiological laboratory shall be provided for mould growth testing.

The use of a microbiological safety cabinet (MSC) is recommended for carrying out certain parts of the procedure.

Airborne mould spores continually enter the human body through the nose and mouth but they do not normally present a hazard to health. Certain susceptible individuals may, however, be affected by the repeated inhalation of some spores, including those of the moulds used in this test and attention is drawn to the precautions to be adopted when carrying out the test. These are outlined in Annex C. Growth of foreign fungi and other micro-organisms can develop as an unintentional intruder during the incubation period at incubation locations and/or specimens. Some of these fungi or other micro-organisms may be injurious to the human system.

Persons intended to be involved in this test should be advised to notify the medical officer, or their own doctor, that they are required to undertake the work. Medical opinion for or against participation should be followed.

Persons carrying out the test should be informed of the potential hazards to which they will be exposed in relation to their current state of health.

National safety regulations shall be followed.

A.2 Notes for the guidance of medical officers

The test involves a hazard from the inhalation or traumatic implantation of spores.

The safety precautions to be adapted are given in Annex C and are designed to minimize this hazard.

Specific hazards exist for susceptible persons, e. g. those who are

- atopic patients who are normally allergic to pollen, house dust, animal dander, etc. and suffer from rhinitis, asthma or other allergic symptoms. The hazard here is in the development of Type I allergy to mould spores, but in certain circumstances Type III reactions may develop (Farmer's Lung type);
- patients who have chronic lung damage e.g. bronchiectasis, chronic bronchitis, sarcoidosis, emphysema, etc. The deposition and germination of spores in lung cavities may lead to the growth of the fungus as a fungus ball or aspergilloma, mainly associated with *Aspergillus spec.* Healed tubercular lesions constitute a possible site for fungal growth;

– patients who are currently undergoing broad–spectrum antibiotic treatment, being given immuno-suppressive drugs including corticosteroids or taking other prescribed chemo therapeutic preparations. Elimination of the normal bacterial flora of the respiratory and alimentary tracts sometimes enables fungi to develop extensively, whilst immuno-suppression may render the individual more susceptible to fungal infection.

Although the hazards involved in carrying out the test in accordance with the specified procedures are regarded as low, it is recommended that persons in these categories should not be involved in the test.

Annex B
(normative)

Inoculation methods
(see also 11.2)

B.1 General

Annex C "recommended safety precautions" shall be studied prior to commencing inoculation. Spraying on the spore suspension to the specimens and control strips is a generally suitable method.

B.2 Spraying by the aerosol inoculation method (AIM)

B.2.1 General

Using a spray gun for inoculation, the distribution of the spores on the surface of the specimen is much more inhomogeneous than using the AIM.

The reproducibility and explainability of the test results are evidently better using the AIM, due to a very homogeneous distribution of the spores on the specimen surface(s).

The AIM is favourably applicable to specimens with a barely surface wetted by the spore suspension also.

Suitable dimensions of the safety inoculation box may be 500 mm x 500 mm x 500 mm. The material of the box should be polymethylmetacrylate.

B.2.2 Description of the method

Aerosol inoculation method (AIM), see Figure B.1.

The spore suspension will be aerosolized by a supersonic aerosol apparatus as used for therapeutic treatments by inhalation of aerosolized medicaments (1) .

An exactly measured quantity of spore suspension can be introduced into the atomizer vessel of the supersonic aerosol apparatus by a graduated syringe (2) .

The aerosol containing the spores is led through a tube (3) into the inoculation box by a slight air flow produced by the supersonic aerosol apparatus.

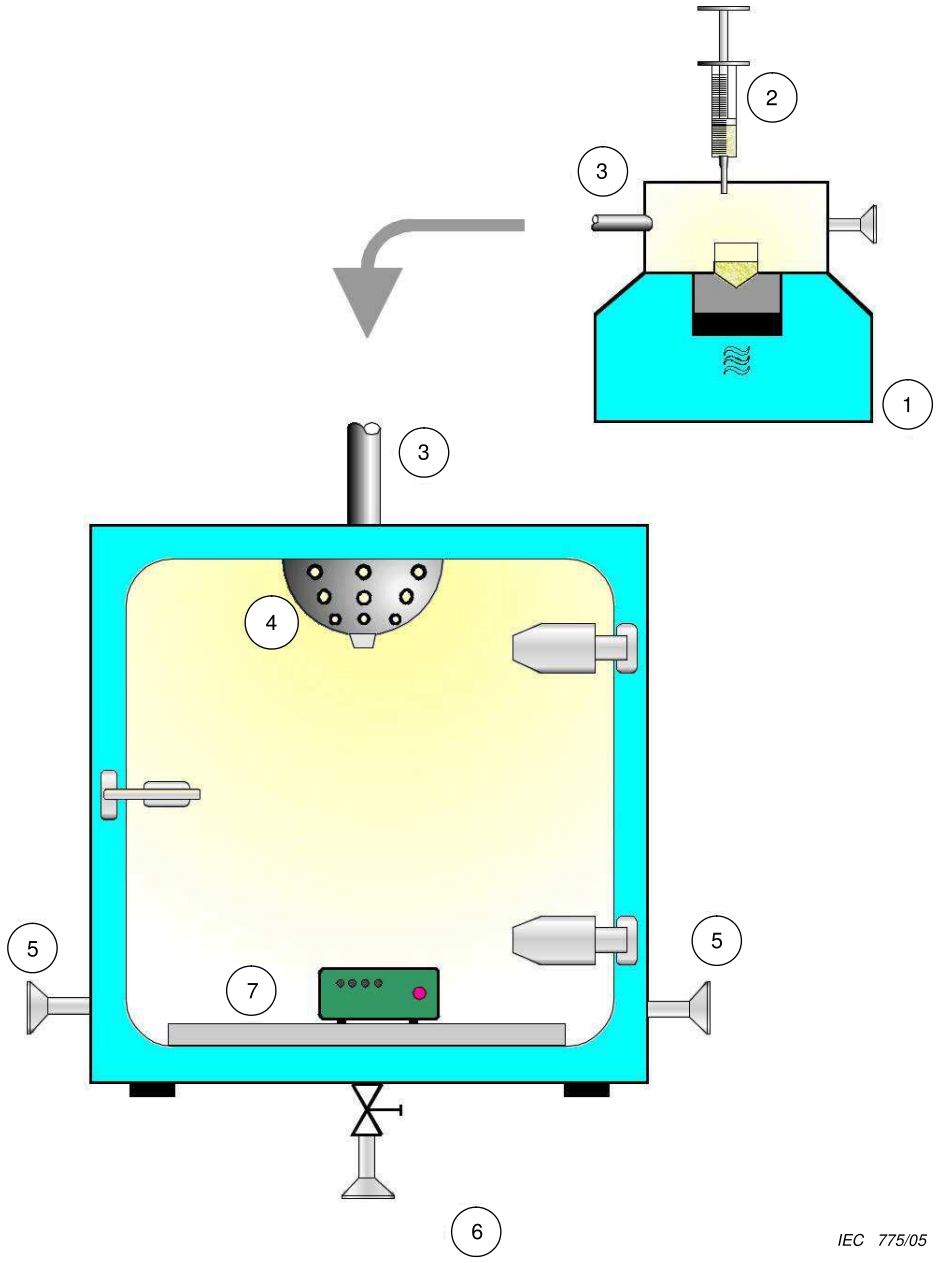
The aerosol is distributed in the box by a funnel with holes (4) mounted in the shelter of the box.

The specimen is placed under the funnel on the bottom of the box with the main test areas in the direction to the aerosol settling.

The pressure within the box is compensated through two vent holes fitted with microbiological filters (5) situated on opposite sides of the chamber.

After the aerosolization and the aerosol settling are finished the box shall be ventilated by the air flow from the supersonic aerosol apparatus through the tube in the bottom of the box (6) fitted with a valve and a microbiological filter at the end.

Before the door of the box which is sealed under operation is opened the air flow from the supersonic aerosol apparatus shall be stopped.



Key

1 Supersonic aerosol apparatus
2 Graduated syringe
3 Tube
4 Funnel with holes
5 Filters
6 Bottom of the box
7 Specimen

Figure B.1 – Aerosol inoculation method (AIM)

B.2.3 Decontamination and cleaning

After removal of the specimen (7) , the door of the box shall be immediately shut and the whole system shall be decontaminated by aerosolization of a disinfectant, e.g. per-acetic acid solution.

For similar spore suspensions, more than one inoculation operation may be performed one after another onthe same day without decontamination between them.

If the spores were suspended in mineral salt solution (Test variant 1, see 6.2.2) or in mineral salt nutrient solution (Test variant 2, see 6.2.3) the atomizer vessel, the tube between the supersonic aerosol apparatus and the inoculation box, the distributing funnel and the internal surfaces of the box shall be cleaned by distilled water after decontamination.

B.2.4 Calibrating of the AIM system

The amount of spore suspension settled on a defined surface range depending on the adjusted performance of the supersonic apparatus and other factors can be assessed by weighing Petri dishes made from polystyrene with an analytical balance before and after exposure at the bottom of the inoculation box during aerosolizing. Instead of the spore suspension, mineral salt solution (see 6.3.2) shall be aerosolized .

NOTE A recommended amount of deposited aerosol is (100 ± 20) mg/dm².

B.3 Inoculation of small specimens by dipping

For small specimens, dipping them into the spore suspension may be found to be a quick and effective inoculation method provided that the spores can adhere to the surface.

B.4 Inoculation of large specimens by spraying or painting

Where possible, large specimens should be broken down into sub-units in accordance with 3.4.

However, if specimens are still too large to be inoculated inside the available MSC or the safety inoculation box, consideration should be given to erecting a temporary exhaust hood over the specimen. This should approximate the same airflow conditions and be fitted with the same microbiological exhaust system as specified for an MSC. Alternatively, it may be possible to place the large specimen in the humidity chamber in which incubation is to take place and then paint on the spore suspension. Although this method may not produce an aerosol, the recommended exhaust system fitted to the humidity chamber should be operating during the inoculation. During inoculation by spraying the exhaust system shall not be operated to avoid additional air movement and the door shall be closed to minimize spore release.

It is recommended to carry out inoculation within an MSC because of the possibility of aerosol formation.

In the case of AIM, the MSC is replaced by the safety inoculation box (see Figure B.1).

Annex C
(informative)

Recommended safety precautions

Precautions should be observed to minimize inhalation of mould spores and their coming in contact with the skin, particularly around the finger nails.

Inhalation of mould spores may take place when transporting or examining incubated specimens or control strips or when disturbing the air around them, for example when opening or shutting chamber doors and container lids. This risk is increased when the mould growth dries out and small detached particles can more easily become airborne. There is also a greater risk of inhalation when inoculating specimens by the spraying method, except the aerosol inoculation method (AIM) using an inoculation box (see Annex B).

Direct protection against the inhalation of mould spores may be achieved by wearing an approved and fitted respirator filter combination rated for dust in the range of 1 µm to 10 µm diameter or for biohazard or radiohazard applications. A gauze or loose fitting mask is not adequate protection. However, the preferred method is to make use of an microbiological safety cabinet (MSC).

To minimize the risk of moulds coming in contact with the skin, protective gloves may be worn whilst handling all cultures, inocula and test specimens after inoculation and incubation. Disposable gloves shall be preferred and shall be decontaminated before removed.

All operations involving the opening of mould culture containers, from the preparation of the spore suspension, the inoculation of specimens and controls if not performed within an inoculation box (AIM) and the examination and measurement of incubated specimens should be performed within MSC, taking account of the following precautions:

a) during the preparation of the spore suspension using the specified wetting agent (see 6.2.1);
b) wiping the outside of the incubating container with 70 % ethanol before removing it from the MSC to the incubation chamber;
c) wiping or washing the specimens with 70% ethanol, after completion of the test and whilst still within the MSC. This is to remove mould growth prior to final decontamination and disposal;
d) when using the aerosol inoculation method (AIM), the design of the inoculation box and its operation shall be as specified in Annex B to prevent the escape of aerosol containing spores.

When the specimen is too large for a separate container, and therefore must be incubated in a humidity chamber, spores may become airborne due to air disturbance when the chamber door is opened and closed.

An exhaust system with microbiological filters to the outside atmosphere can avoid the escaping of spores when the door is opened. When the door is closed the exhaust system shall not be operated to prevent increased air movement or negative pressure within the chamber.

The microbiological filters shall be decontaminated or replaced after finishing the incubation. Before opening the door the circulating fan should be shut off to minimize spore distribution.

Should it be necessary to use a walk-in type incubator, protective clothing shall be worn and a complete closed hood with a respirator as specified in Clause C.3 above or with a suitable piped air supply to the hood shall be worn.

All chambers and apparatus used for mould growth tests should be decontaminated immediately after use in accordance with Annex D.

Specimens and control strips may be covered with heavy mould growth by the end of the test and care should be taken in their disposal.

Control strips should be immersed in a vessel containing a solution of sodium hypochlorite (see Annex D) before finally disposing of them. Specimens should be treated initially in accordance with item c) of Clause C.5, prior to final decontamination by a method selected from those given in Annex D.

Decontamination of chambers and equipment is recommended prior to commencing the test, if there is any doubt regarding their sterility and in any case if decontamination was carried out more than 28 days previously.

Consumption of food or drink and smoking are not allowed in the test laboratory.

Protective clothing worn within the mould growth testing laboratory shall not be used outside.

Annex D
(informative)

Decontamination procedures

It is probable that containers and humidity chambers used as incubators for test of mould growth will become contaminated with both test moulds and intruder contaminant moulds. A decontamination procedure is therefore necessary. This procedure should be effective against both test organisms and intruder contaminants. It must not leave decontaminant residues likely to interfere with the growth of the test fungi. In addition, it must present a minimum risk to the user.

D.1 Recommended decontamination procedures

D.1.1 Application of chemical active solutions

Washing with or immersion in a solution of sodium hypochlorite. A solution should be prepared of sodium hypochlorite containing 500×10^{-6} to $1\ 000 \times 10^{-6}$ available chlorine in water.

Contaminated incubation spaces, containers or equipment should be wetted with or if applicable immersed in the solution, ensuring that it penetrates into all the crevices. Not less than 30 min later the item should be thoroughly rinsed in fresh water.

Climatic chambers can be decontaminated by raising the temperature to 60 °C – 70 °C for 1 h to 2 h and then by wiping clean with a sodium hypochlorite soap solution.

About 30 min later the residue of the solution should be removed by rinsing or wiping with fresh water.

Sodium hypochlorite has a strong bleaching action. Therefore the use of this disinfectant may not be suitable for some materials.

A very effective disinfectant to be applied instead of sodium hypochlorite solution is based on organic nitrogen compounds such as n–Octyl–dimethyl–benzylammonium–acetate, benzethonium-acetate or methylbenzethoniumacetate.

Only disinfectants tested on fungicidal effectiveness and toxicological safety by an authorized laboratory shall be used.

D.1.2 Autoclaving

This method is suitable for smaller items able to withstand the high temperature as well as for cultures. The autoclave should be set to a pressure of 10 kPa (1 bar) giving 121 °C for a period of 20 min.

D.1.3 Wiping or spraying with ethanol 70 % vol

All surfaces which could have been in contact with spores or spore suspension minute droplets, shall be thoroughly wetted in ethanol 70 % vol. The duration of the affecting shall be not less than 15 min.

D.1.4 Application of volatile disinfectants

The use of volatile disinfectants such as formaldehyde should be avoided. Formaldehyde vapour is an effective disinfectant, but the removal of its residue is rarely if ever complete and gives rise to further formaldehyde vapour in enclosed spaces, thus inhibiting the growth of test moulds.

Furthermore formaldehyde is a toxic substance.

Other volatile germicides are available but may present explosive and/or toxic problems affecting safety, especially where large chambers are involved. In many cases the aerosolization of 0,5 % vol Per-acetic acid solution within the contaminated space may be a suitable method of decontamination.

D.2 Disposal

Prior to the disposal of contaminated materials, surplus cultures, spore suspensions etc., they should be decontaminated by method D.1.1 or D.1.2.

NOTE Overgrown nutrient media (cultures) should be preferably decontaminated by autoclaving. Spilt spore suspension and glass from a broken tube and other lost infected waste material should be disinfected by covering with cellulose saturated with sodium hypochlorite solution or another disinfectant given in D.1.1 for several hours before disposing.

Annex E
(informative)

Information on the test fungi

E.1 List of identical strains

No.	Name	Strain No.	Identical strains [1)]
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	CBS 131.52 CMI 45551 DSM 1957 NBRC 6341 NRRL 334 QM 324 QM 458 IAM 3001
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	CBS 377.64 CMI 45543 DSM 1958 NBRC 6346 NRRL 571 QM 82 j IAM 3004
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	CBS 148.51 CMI 45550 DSM 1962 NRRL 1870 QM 459 NBRC 6347 IAM 8059
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	NRRL 2778 NBRC 100535
5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	CBS 284.48 CMI 40025 DSM 1961 NRRL 1115 QM 6764 IAM 5001 NBRC 33284 IAM 13426
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	CBS 631.66 CMI 114933 DSM 1944 IAM 7013 NBRC 33285 JCM 5594
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	CMI 49528 DSM 9122 QM ~~9958~~ 9985 NBRC 100536
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	DSM 1963 IAM 5061 NBRC 6355

[1)] Other identical strains may be used.

E.2 Recommended nutritive media for maintaining the cultures

All the Agar media shall be sterilized in an autoclave at (120 ± 1) °C for 15 min.

No.	Test fungus	Nutritive medium	
1	*Aspergillus niger*	Malt extract for microbiology	25 g/l distilled water
2	*Aspergillus terreus*	with an addition of	15 g to 20 g/l Agar
4	*Hormoconis resinae*		
5	*Paecilomyces variotii*		
6	*Penicillium funiculosum*		
3	*Chaetomium globosum*	Mineral salt-glucose-Agar in acc. with the solution given in 6.3.2 *)	
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	with an addition of	15 g to 20 g/l Agar
8	*Trichoderma virens*		
*) *Chaetomium globosum* with a sterile strip of filter paper overlaid on the surface.			

A plate of the nutritive medium inoculated with spores from the test fungus culture and incubated after it can be used to verify the viability within a period of 7 days. However it cannot be used to ascertain whether or not the temperature and relative humidity conditions in the incubation chamber can sufficiently support the mould growth as can be performed by control strips (see 6.3).

Annex F
(informative)

Guidance

F.1 Mechanisms of infection

Fungi grow in soil and in, or on, many types of common material. They propagate by producing spores which become detached from the main growth and later germinate to produce further growth.

These spores are very small (1 µm to 10 µm) and readily carried in moving air. They also adhere to dust particles and enter with them into equipment.

Thus all parts of equipment into which air penetrates may be infected with spores. The infection can also occur due to handling, for example spores can be carried over by finger-prints.

Another cense of infection is the penetrating of mites carrying spores on their bodies. Mites are capable of entering into very small gaps down to 25 µm. The dead bodies and excreta of the mites collect and may provide a film of nutrient and moisture which may favour the propagation of mould from the spores.

F.2 Germination and growth

Moisture is essential to allow the spores to germinate and where a layer of dust or other hydrophilic material is present on the surface, sufficient moisture may be abstracted by it from the atmosphere.

When the relative humidity is below 65 % no germination or growth will occur. The higher the relative humidity above this value, the more rapid the growth will be. Spores can however survive prolonged periods of very low humidity and even though the main growth has died. They will germinate and start a new growth as soon as the relative humidity becomes favourable again.

In addition to high humidity in the atmosphere the spores require that there shall be on the surface of the product a layer of material which absorbs moisture. Providing this damp layer is present, most organic materials will supply sufficient nutrient to support at least some growth. Organic dust itself contains sufficient nutrient for mould growth. Mould growth is encouraged by stagnant air spaces and lack of ventilation.

The optimum temperature of germination for the majority of fungi likely to give trouble in equipment lies between 20 °C and 30 °C. Rare types can however germinate below 0 °C and some as high as 40 °C.

Many spores are not damaged by prolonged exposure to subzero temperatures, nor by exposure to high temperatures up to 80 °C.

F.3 Effects of growth

F.3.1 Primary effects

Moulds can live on most organic materials, but some of these materials are much more susceptible to attack than others. Growth normally occurs only on surfaces exposed to the air and those which absorb or adsorb moisture will generally be more susceptible to attack.

Even where only a slightly harmful attack on a material occurs, the formation of an electrically conducting path across the surface due to a layer of wet mycelium can drastically lower the insulation resistance between electrical conductors.

When the wet mycelium grows in a position where it is within the electromagnetic field of a critically adjusted electronic circuit, it can cause a serious variation in the frequency-impedance characteristics of the circuit.

Among the materials highly susceptible to attack are leather, wood, cotton textiles, cellulose, silk and other natural materials. Most plastics materials are less susceptible but are also attacked.

Plastics materials may contain non-polymerized monomers, oligomers and/or additives which may exude to the surface and be a nutrient for fungi and a copious growth may occur.

Mould attack on materials results in a decrease of mechanical strength and/or changes in other physical properties.

The properties of some plastic materials depend on the presence of a plasticizer for a satisfactory life-span. If the plasticizer is digested by fungi the material will become brittle.

F.3.2 Secondary effects

Mould growth yields acid of metabolism products and other substances which will cause a secondary attack on the material.

This attack can lead to electrolytic or ageing effects, and even glass can lose its transparency due to this process. Oxidation or decomposition may be facilitated by the presence of enzymes secreted by the mould.

The presence of mould growth can be aesthetically disagreeable due both to poor appearance and to the aroma which frequently accompanies the mould.

F.3.3 Effects associated with equipment design

Due to the modular design and inter-connection of much equipment mould growth in one area of equipment may have quite severe effects in another sub-unit which in itself may not permit the growth of mould.

The possible effects on the performance as a whole shall therefore be assessed when considering primary or secondary effects on individual sub-units or components.

Attention is drawn to the fact that everything contributing to the identification of the material and equipment, e.g. labels, markings, etc. should be given the same level of protection as the product itself.

F.4 Prevention of mould growth

The following procedures can be used with varying degrees of success in combating the harmful effects of mould growth.

All insulating materials used should be chosen to have a resistance to mould growth as great as possible, thus maximizing the time taken for mycelium to grow and minimizing any damage to the material consequent upon such growth.

The use of lubricants, varnishes, finishes etc., is frequently necessary in order to obtain the required performance or durability of a product. Such materials should be chosen with regard to their ability to resist mould growth. Even though it can be shown that the lubricants, etc. do not support mould growth, they may collect dust which in turn will support mould growth. However, it should be noted that the use of products containing fungicides is often recommended for the protection of some materials.

Moisture traps which may be formed during the assembly of equipment and in which mould can grow should be avoided. Examples of such less obvious traps are between unsealed mating plugs and sockets or between printed circuit cards and edge connectors in particular attitudes.

Complete sealing of the equipment with a dry, clean atmosphere within is the most effective technique for preventing mould growth.

Continuous heat dissipation within an enclosure can ensure a sufficiently low relative humidity there to avoid mould growth.

Operation of equipment within a suitable controlled environment can prevent harmful growth of fungi.

Regularly replaced desiccants within a partially sealed enclosure can maintain a relative humidity, sufficiently low to prevent harmful growth of fungi.

Periodic and careful cleaning of enclosed equipment to remove any accumulated growth and dust (nutritive layer) can hold deterioration in check.

Fungicides carried for example in varnishes, included in tablets or sprayed directly can prevent mould growth for a time. See Clause F.7 .

Where the material and functioning of the equipment allows such treatment ultraviolet radiation or ozone may be used for sterilization.

Air currents of adequate velocity flowing over parts of the equipment can retard the development of mould growth there.

Acaricides can be used to control the action of mites.

The application of protective coatings such as epoxy, silicone polymers, acrylics or para-polyxylylene on printed wiring boards minimizes the wetting of the surface by any condensing water vapour and hence inhibits growth of mould if the protective coating in itself is resistant to mould growth.

F.5 Applicability of the mould growth test

Mould growth testing of equipment should be normally limited to verifying that suitable components and materials have been used, as any mould growth tests involving the complete equipment will often be prohibitively expensive or may yield results of rather doubtful value.

Most of the required information can usually be more readily and accurately obtained from tests on materials, components, sub-assemblies, small composite sections, etc. (see clause F.4).

Testing of the materials for resistance to mould growth shall be performed in accordance with special standards such as ISO 846 and shall be delegated to laboratories competent for it.

NOTE Laboratories for microbiological testing of technical products should be accreditated in accordance with ISO/IEC 17025.

Test variant 1 is intended as an overall check where a wise choice of previously tested materials has been made at the design stage and where significant contamination is not anticipated.

Where contamination is likely to occur both variant 1 and variant 2 should be used in order to assess the performance of the contaminated and non-contaminated specimen.

These tests are not a substitute for a proper choice of materials. It is impossible to devise simple tests which replace careful pre-testing of materials and expert assessment of the results.

The choice of previously tested materials is the most important single precaution to take when designing equipment to operate in a humid environment.

Where severe contamination of the insulating surfaces will not occur, such a choice is often the only precaution which needs to be taken and will prove adequate for all but the most severe conditions.

Where the equipment operates under conditions which favour mould growth for only a small proportion of the total life, or where some measure of protection is given as for example enclosing or heating continuously to reduce internal humidity, there should be no necessity to employ the mould growth test provided materials have been correctly chosen and good constructional principles have been employed.

If such principles have not been employed. Test J is not adequate to detect all possible sources of trouble.

Test J as a final overall check employs only a small selection of cultures chosen to attack those materials which are fairly resistant to mould growth.

It will indicate therefore the nature of any trouble to be encountered on well designed products.

On products with poor design and unsuitable materials these tests cannot locate all the potential faults.

F.6 Basic types of effect

F.6.1 Extent of growth and attack on the surface after 28 days of incubation

F.6.1.1 Variant 1

This is the form of test which will be most frequently used. The extent of growth checks whether resistant materials have been used. The location of growth will indicate areas in which trouble may be expected and where greatest clearances or creepage distances should have been allowed.

Attack on the surface will indicate locations where physical damage is likely to result from mould growth.

F.6.1.2 Variant 2

Even though a product is resistant, mould growth can appear as a result of the contamination of surfaces with nutrients.

In this case, secondary effects may occur, such as attack by metabolites produced by mould growth or physical penetration by fungal mycelium.

Variant 2 shall be used in order to assess the secondary effects of mould growth on the materials or on the performance of the products when the mould growth is caused by a significant surface contamination with nutrients.

Variant 2 may also be used to assess the effectiveness of a fungicide treatment of the product (see F.7.2).

Variant 2 is not a suitable method to simulate the conditions of a very intensive surface contamination, e.g. due to a large quantity of organic dust or dead insects.

In order to ascertain that normally resistant materials and good design principles have been used, specimens subjected to test variant 2 should satisfy the requirements of variant 1.

In this case the variant 1 test should be performed using separate specimens.

F.6.2 Effect on performance while still damp after 28 days incubation (variant 2) or after 28 or 56 days of incubation (variant 1)

This procedure gives an indication of the order and nature of performance variation to be expected where the products operate under conditions in which mould is growing.

The presence of humidity will itself result in variation of performance and it is essential to perform two sets of measurements, one on specimens without fungus infection and one with.

The differences between the two will be the effect of the presence of wet mycelium.

The components of the nutritive solution needed for variant 2 can themselves influence the performance of the specimen, for example by decreasing the surface resistance.

Accurate assessment of the difference can be difficult since mould growth can appear on the non-inoculated specimens (negative control specimens) also when have been infected by spores from the very start or were infected during the test.

To avoid spontaneous mould growth particular precautions are necessary.

F.6.3 Effect on performance after a recovery period of 24 h

This procedure gives an indication of the order and nature of performance variation due to the presence of mycelium which has grown during a period of high relative humidity and is desiccated under low relative humidity after that.

This procedure is intended for products to be stored in conditions where mould growth will be profuse and later to be installed and operated in an air-conditioned room.

For this also, two series of measurements are necessary to discriminate between permanent effects due to humidity exposure and those due to the presence of mycelium.

F.7 Use of fungicides

A method often used to give equipment an additional resistance to harmful mould growth is to use a suitable fungicide to inhibit or prevent the growth of fungi.

F.7.1 Limitation of use

When choosing a fungicide which will be enclosed in equipment, the following principles must be borne in mind.

The fungicide shall not give rise to a toxic atmosphere which would harm personnel during operating, servicing or testing the product. Metal organic compounds useful as a fungicide are toxins such as volatile organic mercury compounds.

The volatile components of the fungicide shall not lead to the deterioration of parts of the equipment such as electrolytic corrosion of metallic parts, lowering of insulation resistance or breakdown voltage over the surface of insulators, formation or deposition of an insulating film on the contacts of relays, switches, etc.

Where light-sensitive components such as photocells are included in the equipment the volatile products of fungicide shall not give light-absorbing layers on the windows of the component.

F.7.2 Performance of fungicidal action

The fungicide shall be stable and durable at the highest temperature likely to be experienced inside the equipment.

It shall resist leaching by repeated condensation of moisture over the internal surfaces.

It shall not be so volatile as to be completely expended before the needed duration of protection is finished.

If a long-range effect of the fungicide is needed, its vapour pressure shall be sufficient to allow an effective concentration to be maintained wherever mould growth might give rise to harmful effects.

Even when a fungicide is intended to give prolonged protection, normal evolutionary variation tends to select a mutant of the mould which is resistant to the fungicide used. It is desirable therefore when permanent protection is required, that not only the fungicide should be renewed periodically, but that it should be replaced by a fungicide of a different type.

F.7.3 Duration of protection and testing

A fungicide may be chosen to give either protection for a few months during transit through humid environments or a protection over a prolonged period. When the fungicide is used to give short-term protection during transit, variant 1 should be performed with the active fungicide in place. When long-term protection is intended and/or it is considered that surface contamination may occur, then variant 2 should be carried out also.

To check the permanence of the fungicide it may be necessary to carry out tests at high temperature and/or high relative humidity before making the mould growth test. Where such a programme is considered necessary it should be stated in the relevant specification.

Bibliography

IEC 60068-1:2013, *Environmental testing – Part 1: General and guidance*

_____

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 37
1 Domaine d'application 39
2 Références normatives 39
3 Description générale 39
3.1 Contexte 40
3.2 Choix de la procédure d'essai 40
3.3 Aspects à prendre en considération lors de la spécification des procédures d'essai 41
4 Risques auxquels est exposée la santé des investigateurs 42
5 Description des variantes d'essai 42
5.1 Variante d'essai 1 42
5.2 Variante d'essai 2 42
6 Réactifs et matériaux 42
6.1 Cultures ou spores – Fourniture et conditions 42
6.2 Préparation d'une suspension de spores 44
6.3 Bandes de contrôle 45
7 Description de l'appareillage d'essai 45
7.1 Inoculation par pulvérisation 45
7.2 Incubation des spécimens de petites dimensions 45
7.3 Incubation des spécimens de grandes dimensions 45
8 Sévérités 46
9 Examens initiaux 46
10 Préconditionnement 46
10.1 Nettoyage 46
10.2 Stockage en chaleur humide 46
11 Epreuve 47
11.1 Application 47
11.2 Inoculation 47
11.3 Incubation 47
12 Examens finaux 48
12.1 Examen visuel 48
12.2 Effet de la croissance 48
12.3 Importance de la croissance 49
13 Renseignements à fournir dans la spécification particulière 49
14 Renseignements à fournir, au minimum, dans le rapport d'essai 50
Annexe A (informative) Dangers encourus par le personnel 51
Annexe B (normative) Méthodes d'inoculation (se reporter également à 11.2) 53
Annexe C (informative) Mesures de sécurité recommandées 56
Annexe D (informative) Procédures de décontamination 58
Annexe E (informative) Informations sur les champignons d'essai 60
Annexe F (informative) Guide 62
Bibliographie 69

COMMISSION ÉLECTROTECHNIQUE INTERNATIONALE

_____

ESSAIS D'ENVIRONNEMENT –

Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

AVANT-PROPOS

1) La Commission Electrotechnique Internationale (IEC) est une organisation mondiale de normalisation composée de l'ensemble des comités électrotechniques nationaux (Comités nationaux de l'IEC). L'IEC a pour objet de favoriser la coopération internationale pour toutes les questions de normalisation dans les domaines de l'électricité et de l'électronique. A cet effet, l'IEC – entre autres activités – publie des Normes internationales, des Spécifications techniques, des Rapports techniques, des Spécifications accessibles au public (PAS) et des Guides (ci-après dénommés "Publication(s) de l'IEC"). Leur élaboration est confiée à des comités d'études, aux travaux desquels tout Comité national intéressé par le sujet traité peut participer. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'IEC, participent également aux travaux. L'IEC collabore étroitement avec l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), selon des conditions fixées par accord entre les deux organisations.
2) Les décisions ou accords officiels de l'IEC concernant les questions techniques représentent, dans la mesure du possible, un accord international sur les sujets étudiés, étant donné que les Comités nationaux de l'IEC intéressés sont représentés dans chaque comité d'études.
3) Les Publications de l'IEC se présentent sous la forme de recommandations internationales et sont agréées comme telles par les Comités nationaux de l'IEC. Tous les efforts raisonnables sont entrepris afin que l'IEC s'assure de l'exactitude du contenu technique de ses publications; l'IEC ne peut pas être tenue responsable de l'éventuelle mauvaise utilisation ou interprétation qui en est faite par un quelconque utilisateur final.
4) Dans le but d'encourager l'uniformité internationale, les Comités nationaux de l'IEC s'engagent, dans toute la mesure possible, à appliquer de façon transparente les Publications de l'IEC dans leurs publications nationales et régionales. Toutes divergences entre toutes Publications de l'IEC et toutes publications nationales ou régionales correspondantes doivent être indiquées en termes clairs dans ces dernières.
5) L'IEC elle-même ne fournit aucune attestation de conformité. Des organismes de certification indépendants fournissent des services d'évaluation de conformité et, dans certains secteurs, accèdent aux marques de conformité de l'IEC. L'IEC n'est responsable d'aucun des services effectués par les organismes de certification indépendants.
6) Tous les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils sont en possession de la dernière édition de cette publication.
7) Aucune responsabilité ne doit être imputée à l'IEC, à ses administrateurs, employés, auxiliaires ou mandataires, y compris ses experts particuliers et les membres de ses comités d'études et des Comités nationaux de l'IEC, pour tout préjudice causé en cas de dommages corporels et matériels, ou de tout autre dommage de quelque nature que ce soit, directe ou indirecte, ou pour supporter les coûts (y compris les frais de justice) et les dépenses découlant de la publication ou de l'utilisation de cette Publication de l'IEC ou de toute autre Publication de l'IEC, ou au crédit qui lui est accordé.
8) L'attention est attirée sur les références normatives citées dans cette publication. L'utilisation de publications référencées est obligatoire pour une application correcte de la présente publication.
9) L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments de la présente Publication de l'IEC peuvent faire l'objet de droits de brevet. L'IEC ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de brevets et de ne pas avoir signalé leur existence.

DÉGAGEMENT DE RESPONSABILITÉ
Cette version consolidée n'est pas une Norme IEC officielle, elle a été préparée par commodité pour l'utilisateur. Seules les versions courantes de cette norme et de son(ses) amendement(s) doivent être considérées comme les documents officiels.

Cette version consolidée de l'IEC 60068-2-10 porte le numéro d'édition 6.1. Elle comprend la sixième édition (2005-06) [documents 104/365/FDIS et 104/373/RVD] et son amendement 1 (2018-04) [documents 104/740/CDV et 104/790/RVC]. Le contenu technique est identique à celui de l'édition de base et à son amendement.

Dans cette version Redline, une ligne verticale dans la marge indique où le contenu technique est modifié par l'amendement 1. Les ajouts sont en vert, les suppressions sont en rouge, barrées. Une version Finale avec toutes les modifications acceptées est disponible dans cette publication.

Cette sixième édition constitue une révision technique.

Les principaux changements par rapport à l'édition précédente sont listés ci-dessous:

– Deux champignons d'essai remplacés par deux autres
– Concentration des spores définie pour chaque champignon d'essai
– Suspension de spores dans une solution de sels minéraux (addition)
– Préconditionnement des spécimens par stockage en chaleur humide (exigence)
– Production d'aérosols ultrasonores de la suspension de spores comme méthode d'inoculation privilégiée (addition)
– Réduction de la durée d'incubation de 84 jours à 56 jours
– Extension du grade 2 de moisissures divisé en grade 2a et 2b
– Information détaillée sur les méthodes d'inoculation à l'Annexe B
– Annexe E: suppression du diagramme

Cette publication a été rédigée selon les Directives ISO/IEC, Partie 2.

Elle a le statut d'une publication fondamentale de sécurité conformément au Guide IEC 104.

Cette norme constitue la partie 2-10 de l'IEC 60068 qui comporte les parties principales suivantes, présentées sous le titre général *Essais d'environnement*:

Partie 1 Généralités
Partie 2: Essais
Partie 3: Documentations d'accompagnement et guide
Partie 4: Renseignements destinés aux rédacteurs de spécification
Partie 5: Guide pour la rédaction des méthodes d'essais

Le comité a décidé que le contenu de la publication de base et de son amendement ne sera pas modifié avant la date de stabilité indiquée sur le site web de l'IEC sous "http://webstore.iec.ch" dans les données relatives à la publication recherchée. A cette date, la publication sera

- reconduite,
- supprimée,
- remplacée par une édition révisée, ou
- amendée.

IMPORTANT – Le logo *"colour inside"* qui se trouve sur la page de couverture de cette publication indique qu'elle contient des couleurs qui sont considérées comme utiles à une bonne compréhension de son contenu. Les utilisateurs devraient, par conséquent, imprimer cette publication en utilisant une imprimante couleur.

ESSAIS D'ENVIRONNEMENT –

Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

1 Domaine d'application

La présente partie de l'IEC 60068 fournit une méthode d'essai pour déterminer l'importance des moisissures supportées par les produits électrotechniques et la manière dont une moisissure peut compromettre la performance et les autres propriétés correspondantes du produit.

Etant donné que les conditions de moisissures comprennent une humidité relative élevée, l'essai est applicable aux produits électrotechniques destinés au transport, au stockage et à l'utilisation dans des conditions humides sur une période d'au moins quelques jours.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO/IEC 17025:1999, *Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais*

ISO 846:1997, *Plastiques – Evaluation de l'action des micro-organismes*

MIL–STD–810 F:2000, *Méthode 508.5 Fungus (champignons)*

Laboratory Biosafety Manual 2nd Ed., WHO 1993, ISBN 92 4 1544503

3 Description générale

~~Le présent essai a pour objet l'inoculation des produits électrotechniques avec une sélection de spores de moisissures, suivie par une période d'incubation dans des conditions favorables à la germination de spores et à la croissance de moisissures.~~

~~Deux variantes d'essai sont proposées. La variante 1 préconise une inoculation du spécimen avec les spores de moisissures sans substances nutritives, tandis que la variante 2 prescrit l'inoculation avec les spores de moisissures en suspension dans une solution nutritive qui entretient la croissance de moisissures.~~

~~Il est conseillé d'utiliser des méthodes d'essais tels que spécifiés pour les plastiques dans l'ISO 846 afin d'évaluer la vulnérabilité aux dommages par moisissures des matériaux de construction utilisés.~~

~~NOTE Il est recommandé que les laboratoires de microbiologie testant les produits techniques soient accrédités conformément à l'ISO/IEC 17025. Pour de plus amples informations, voir l' Annexe F.~~

3.1 Contexte

Dans certaines conditions climatiques et environnementales, les micro-organismes peuvent se fixer et coloniser la surface des équipements électrotechniques. Leur présence ou les produits de leur métabolisme peuvent non seulement endommager l'équipement lui-même mais aussi en altérer l'aptitude à l'emploi et l'aptitude au service. Les actions des micro-organismes sur l'équipement subissent l'influence de deux processus différents: une action directe avec la détérioration du matériau qui sert de substance nutritive pour la croissance des micro-organismes et une action indirecte dans laquelle les produits du métabolisme des micro-organismes causent la détérioration.

La méthode préférentielle pour contrôler les effets des micro-organismes consiste à choisir des matériaux qui ne favorisent pas leur croissance. Une autre méthode acceptable consiste à traiter ou à sceller de manière hermétique les matériaux et les composants qui peuvent être vulnérables. De plus, il n'y a pas obligation de procéder à l'évaluation d'un équipement si celui-ci est stocké ou s'il fonctionne tout au long de sa vie dans des conditions qui ne sont pas susceptibles de favoriser la croissance des micro-organismes. Ce n'est que dans le cas où ces conditions ne peuvent pas être remplies qu'il est généralement nécessaire de démontrer la résistance de tout ou partie de l'équipement par des essais.

Les procédures d'essai et les sévérités du présent document sont le plus souvent utilisées pour évaluer la résistance de tout ou partie d'un équipement aux effets nuisibles dus à la présence de micro-organismes et des produits de leur métabolisme. L'essai d'un équipement complet est généralement nécessaire s'il est crucial de démontrer ses performances après une exposition à des conditions de température/d'humidité défavorables de nature à permettre la croissance des micro-organismes.

Une approche alternative qui est parfois utilisée consiste à prendre en compte uniquement les matériaux particuliers dont l'équipement est constitué. Cette approche alternative peut se révéler particulièrement pertinente lorsque la préoccupation principale concerne la détérioration des matériaux de la structure de l'équipement plutôt que son aptitude à l'emploi. ou son aptitude au service. Dans de tels cas, il peut s'avérer nécessaire d'évaluer les matériaux particuliers uniquement s'il existe déjà des indications concernant la résistance aux effets de la croissance des micro-organismes. Les procédures d'essai de l'ISO 846 sont pour l'essentiel équivalentes à celles stipulées dans le présent document mais appliquées à des éprouvettes constituées d'échantillons de matériaux.

Certains matériaux peuvent donner lieu à une dégradation importante des caractéristiques des structures, lorsqu'ils sont enfouis dans un sol naturel ayant une capacité de rétention d'eau. L'évaluation de telles conditions n'est pas incluse dans le présent document. Toutefois, si l'évaluation du matériau est nécessaire, il est suggéré de recourir au mode opératoire D (essai par enfouissement dans le sol) de l'ISO 846. De même, s'il est nécessaire d'évaluer la résistance d'un matériau à la croissance biologique, il est suggéré de recourir au mode opératoire C (résistance aux bactéries) de l'ISO 846.

3.2 Choix de la procédure d'essai

Les procédures d'essai du présent document consistent à exposer les produits électrotechniques à l'action d'une sélection de souches d'essai de spores de moisissures pendant une période d'incubation donnée dans des conditions favorables à la germination de spores et à la croissance de moisissures. A la fin de l'exposition, les spécimens sont évalués de la manière suivante: recherche de détérioration par examen visuel et, si cela est applicable, recherche de toute modification de masse ou d'autres propriétés physiques.

Le présent document contient deux méthodes d'essai de base désignées Variante 1 et Variante 2:

a) Dans la Variante 1, une suspension de plusieurs spores de moisissures est inoculée aux spécimens en présence d'un milieu nutritif incomplet (sans source de carbone). Les moisissures ne peuvent croître qu'au détriment du spécimen. Si les spécimens ne

contiennent aucune substance nutritive, les champignons ne peuvent pas développer le mycélium et il n´y a pas de détérioration du matériau.

b) Dans la Variante 2, une suspension de plusieurs spores de moisissures est inoculée aux spécimens dans une solution nutritive (complète), c'est à dire avec une source de carbone. Même si celui-ci ne contient aucun élément nutritif, les moisissures peuvent se développer sur le spécimen et les produits de leur métabolisme peuvent attaquer le matériau. Toute inhibition de la croissance sur le spécimen met en évidence l´activité fongique du matériau ou la présence d´un traitement fongicide.

3.3 Aspects à prendre en considération lors de la spécification des procédures d'essai

Les spécimens assemblés peuvent ~~se couvrir d'~~ subir une contamination de surface sous forme de dépôt de poussières, d'éclaboussures, de ~~dépôts nutritifs~~ substances nutritives ou de graisses volatiles condensées. Cela peut être causé par l'exposition à l'air des produits lors de leur stockage, de leur utilisation ou de leur transport ou lors de leur manipulation sans couverture protectrice. Cette contamination de surface peut être responsable de la formation d'importantes colonies fongueuses qui ~~risquent de~~ peuvent continuer à croître et ~~de~~ provoquer des dégâts plus ~~grands~~ importants. Une évaluation des effets d'une telle contamination peut être obtenue par l'application de la variante d'essai 2.

En raison des difficultés inhérentes au maintien des conditions requises dans une très grande étuve, un ~~matériel composite~~ équipement de taille importante ~~sera généralement essayé~~ peut être soumis aux essais élément par élément. ~~Le prix de l'essai s'en trouvera ainsi diminué, car plusieurs éléments peuvent avoir une construction tellement similaire qu'il ne sera nécessaire d'en essayer qu'un seul.~~ Il en résultera dans tous les cas une réduction du coût de l'essai, car plusieurs éléments peuvent avoir une construction similaire à tel point que l'essai d'un seul d'entre eux soit nécessaire.

La période d'incubation pour déterminer la résistance à la dégradation de l'équipement est une durée pragmatique qui est normalement suffisante pour que les actions de dégradation des micro-organismes deviennent apparentes. Elle n'est pas nécessairement liée à, et elle n'est pas non plus destinée à répliquer la durée d'exposition de l'équipement aux conditions de température/d'humidité défavorables qui soutiendraient la croissance des micro-organismes.

Quelle que soit la variante utilisée, la suspension de spores de moisissures est généralement inoculée aux spécimens par pulvérisation. L'approche préférentielle consiste à utiliser un appareillage à aérosol ultrasonore comme celui utilisé pour les traitements thérapeutiques par inhalation. Une telle approche permet d'obtenir une répartition homogène des spores sur les surfaces du spécimen et par conséquent assure une grande reproductibilité des résultats d'essai. Toutefois, si la pulvérisation n'est pas adaptée en raison de la taille, de la conception ou d'autres propriétés du spécimen, l'inoculation avec la suspension de spores peut être effectuée par immersion ou badigeonnage comme indiqué dans la spécification applicable.

Le présent document contient des recommandations concernant l'examen visuel après l'essai des spécimens ainsi qu'une approche pour évaluer l'étendue de la croissance des moisissures. Si l'essai est destiné à établir la dégradation de l'aptitude à l'emploi de l'équipement électrotechnique, des vérifications complémentaires électriques et/ou mécaniques devront être stipulées dans la spécification applicable. Dans de tels cas, il peut être essentiel que les conditions de température et d'humidité relative pour l'incubation autour du spécimen soient maintenues tout au long des vérifications électriques et/ou mécaniques. En outre, les conditions de reprise contrôlées peuvent être nécessaires pour empêcher que l'humidité soit absorbée ou perdue par le spécimen avant que les examens exigés après essai ne soient réalisés. L'IEC 60068-1:2013 donne, en 4.4.2, une approche qui peut être utilisée si le spécimen doit être soumis à des conditions de reprise contrôlées.

4 Risques auxquels est exposée la santé des investigateurs

Des spores de moisissures viables sont requises pour cette procédure d'essai, et les conditions ambiantes doivent favoriser la croissance de moisissures.

En conséquence, il est essentiel d'étudier les annexes contenues dans la présente norme avant de manipuler les cultures de moisissures ou d'entreprendre les phases de l'essai décrites ultérieurement.

Annexe A Dangers encourus par le personnel

Annexe B Méthodes d'inoculation

Annexe C Mesures de sécurité recommandées

Annexe D Procédures de décontamination

Le Laboratory Biosafety Manual, 2nd Ed., World Health Organization 1993, ISBN 92 4 1544503 contient des informations générales de base sur la sécurité des installations traitant des champignons.

5 Description des variantes d'essai

5.1 Variante d'essai 1

Après une période d'incubation de 28 jours déterminant

- l'importance de la croissance de moisissures par examen visuel;
- les détériorations physiques provoquées par la croissance de moisissures;
- dans le cas de croissances de moisissures, l'effet sur le fonctionnement et/ou les propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

La période d'incubation doit être portée à un total de 56 jours avant vérification de la fonction et/ou mesure des propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

5.2 Variante d'essai 2

Après une contamination simulée avec des substances nutritives suivie par une période d'incubation de 28 jours déterminant

- l'importance de la croissance de moisissures par examen visuel;
- les détériorations physiques provoquées par la croissance de moisissures;
- l'effet de croissances de moisissures sur le fonctionnement et/ou les propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

La résistance superficielle du spécimen sera réduite par application des substances nutritives pour la simulation de la contamination sans croissance de moisissures. Cet effet doit être pris en considération si la fonction est vérifiée et/ou si les propriétés électriques sont mesurées.

Du fait de l'application de substances nutritives, des croissances de moisissures existeront et un effet fongique doit donc être considéré.

6 Réactifs et matériaux

6.1 Cultures ou spores – Fourniture et conditions

Les champignons suivants doivent être utilisés pour effectuer l'essai (voir le Tableau 1). La nature de l'attaque que l'on peut attribuer à chaque champignon est donnée à titre indicatif. Mais les spores de toutes les cultures doivent être utilisées ensemble dans une suspension mélangée quelle que soit la nature du spécimen.

Les cultures ou les spores lyophilisées doivent être obtenues par une collection de cultures mycologiques reconnue. Elles doivent être livrées dans des boîtes avec la date d'inoculation de la culture sur les boîtes.

Un certificat doit confirmer la conformité de la culture avec le champignon et le numéro d'origine comme spécifié dans le Tableau 1 et/ou à l'Annexe E.

Les cultures et les spores lyophilisées doivent être stockées et manipulées conformément aux recommandations de l'organisme fournisseur et des exigences correspondantes de la présente norme. Lors de la préparation d'une culture par le laboratoire d'essai à partir d'une culture de souche ou de spores lyophilisées, la date d'inoculation doit être marquée sur le tube de culture.

Tableau 1 – Champignons d'essai

N°	Nom	Origine N° [3]	Attaque sur	Note
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	nombreux matériaux	[1] [2]
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	matériaux en plastique	[1] [2]
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	cellulose	[1] [2]
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	lubrifiants à base d'hydrocarbures	–
5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	plastiques et cuir	[1] [2]
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	nombreux matériaux spécialement les textiles	[1] [2]
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	caoutchouc	[1] [2]
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	cellulose, textiles et plastiques	[2]

[1] Egalement spécifié dans l'ISO 846.

[2] Egalement spécifié dans la MIL–STD–810 F, Tableau 508.5–I.

[3] Voir également l'Annexe E.

Les cultures doivent être utilisées pour la préparation de la suspension de spores d'essai lorsqu'elles sont bien sporulées.

On l'atteint dans la plupart des cas après une période d'incubation de 7 à 14 jours à (29 ± 1) °C.

NOTE Le fournisseur des cultures ou des spores lyophilisées peut recommander d'autres conditions pour développer la culture.

Si les cultures ne sont pas appelées à être utilisées immédiatement, elles doivent être stockées dans un réfrigérateur à une température comprise entre 5 °C et 10 °C pendant une période ininterrompue ne dépassant pas six semaines. Les cultures utilisées pour préparer la suspension doivent avoir au moins 14 jours mais pas plus de 28 jours à partir de la date d'inoculation indiquée sur la boîte.

Le bouchon du récipient ne doit être retiré qu'au début de la préparation de la suspension de spore. Une seule suspension doit être effectuée à partir d'une boîte ouverte.

6.2 Préparation d'une suspension de spores

6.2.1 Généralités

La suspension est d'abord préparée dans de l'eau distillée stérilisée à laquelle on aura ajouté 0,05 % d'un agent mouillant. On a constaté que l'utilisation d'un agent à base de taurine-méthyle-N ou de dioctylsulfosuccinate de sodium est appropriée. L'agent mouillant ne doit pas contenir de substances susceptibles de stimuler ou d'inhiber la croissance des moisissures.

10 ml du mélange eau/agent mouillant sont versés doucement dans chaque culture. Un fil de platine ou de nichrome doit être stérilisé par chauffage au rouge dans une flamme, puis refroidi. Ce fil doit être utilisé pour gratter légèrement la surface de la culture de façon à libérer les spores.

Le liquide doit être agité doucement pour disperser les spores sans détacher les fragments mycéliens. La suspension doit être ensuite transvasée lentement et filtrée à travers une couche mince de laine de verre stérile ou à travers un entonnoir de microfiltration à dimensions de pores de 40 µm à 100 µm dans un tube centrifugeur stérilisé

La suspension de spores filtrée doit être centrifugée et le liquide surnageant doit être rejeté. Le résidu doit être remis en suspension dans au moins 10 ml d'eau distillée stérilisée et être centrifugé à nouveau. Les spores doivent être lavées de cette manière trois fois de suite.

6.2.2 Préparation pour la variante d'essai 1

Diluer le résidu de spores final de chaque culture dans un volume

- de solution de sels minéraux conformément à 6.3 mais sans saccharose si la spécification particulière prescrit un examen visuel uniquement (voir 5.1);
- d'eau distillée stérilisée si la spécification particulière prescrit de vérifier la fonction ou de mesurer les propriétés électriques (voir 5.1);

en réglant la concentration de spores à 1×10^6 à 2×10^6/ml déterminée à l'aide d'une chambre de comptage ou par turbimétrie.

Mélanger des volumes égaux des suspensions uniques suffisants pour la procédure d'inoculation appropriée afin d'obtenir une suspension de spores mélangées finale prête pour l'inoculation. La suspension de spores dans la solution de sels minéraux doit être utilisée dans les 48 h qui suivent la préparation. La suspension de spores dans l'eau distillée stérilisée doit être utilisée dans les 6 h qui suivent la préparation.

NOTE Préparer des volumes totaux d'environ 100 ml pour l'inoculation par pulvérisation ou d'environ 500 ml pour l'inoculation par badigeonnage ou immersion par exemple.

6.2.3 Préparation pour la variante d'essai 2

Diluer le résidu de spores final de chaque culture dans un volume de solution nutritive conformément à 6.3 en réglant la concentration de spores à 1×10^6 à 2×10^6/ml déterminée à l'aide d'une chambre de comptage ou par turbimétrie.

Mélanger des volumes égaux des suspensions uniques suffisants pour la procédure d'inoculation appropriée afin d'obtenir une suspension de spores mélangées finale prête pour l'inoculation. Utiliser la suspension de spores dans les 6 h qui suivent la préparation.

NOTE Voir 6.2.2.

6.3 Bandes de contrôle

Les bandes de contrôle nécessaires à cet essai doivent consister en des bandes de papier-filtre blanc stérilisé ou en tissu de coton non traité.

La solution nutritive nécessaire à la préparation des bandes de contrôle doit consister en une solution des réactifs suivants dans de l'eau distillée.

Réactifs	g/l
Phosphate dihydrogéné de potassium (KH_2PO_4)	0,7
Phosphate hydrogéné de dipotassique (K_2HPO_4)	0,3
Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,5
Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	2,0
Chlorure de potassium (KCl)	0,5
Sulfate ferreux ($FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,01
Saccharose	30,0

Le pH doit être compris entre 6,0 et 6,5 à 20 °C. On doit l'ajuster avec du NaOH 0,01 molaire, si nécessaire. La solution doit être stérilisée dans un autoclave à (120 ± 1) °C pendant 20 min.

Immédiatement avant l'inoculation (voir 11.2), les bandes de contrôle doivent être saturées par la solution nutritive retirées de cette solution et égouttées.

7 Description de l'appareillage d'essai

7.1 Inoculation par pulvérisation

Il convient d'utiliser de préférence un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation en liaison avec une chambre d'inoculation de sécurité (voir l'Annexe B).

7.2 Incubation des spécimens de petites dimensions

Des récipients de verre ou de plastique munis de couvercles doivent être utilisés pour mettre ou suspendre les éprouvettes et les bandes de contrôle.

Le récipient doit avoir une taille et une forme telles qu'il puisse contenir en permanence un volume d'eau suffisant pour maintenir à l'intérieur une humidité relative supérieure à 90 %.

Les dispositifs pour le montage ou la suspension doivent être tels que les spécimens et les bandes de contrôle ne soient à aucun moment en contact avec l'eau ni aspergés.

Les récipients doivent être placés dans une chambre maintenant une température uniforme dans l'espace de travail comprise entre 28 °C et 30 °C pour l'incubation des spécimens et des bandes de contrôle. Les variations périodiques de la température dues à l'action du régulateur ne doivent pas dépasser 1 °C/h.

7.3 Incubation des spécimens de grandes dimensions

Une chambre de chaleur humide de taille appropriée doit être utilisée pour les spécimens d'incubation trop grands pour les récipients prévus en 7.2. La chambre doit être munie d'une porte à fermeture hermétique pour éviter qu'un échange d'air ne se produise avec le laboratoire où elle se trouve.

L'humidité relative dans l'espace de travail doit être maintenue à une valeur supérieure à 90 %. L'eau de condensation provenant des parois latérales ou de la partie supérieure de la chambre ne doit pouvoir en aucun cas tomber sur les spécimens et les bandes de contrôle. La température dans l'espace de travail doit être uniforme et comprise entre 28 °C et 30 °C. Les variations périodiques de la température dues à l'action du régulateur ne doivent pas dépasser 1 °C/h.

Pour obtenir l'humidité requise et maintenir une température uniforme à l'intérieur de l'espace de travail, une circulation forcée d'air peut être nécessaire. La vitesse du déplacement d'air ne doit pas dépasser 1 m/s à la surface du ou des spécimens.

8 Sévérités

La sévérité pour chaque variante d'essai est déterminée par la durée de l'incubation.

Variante d'essai 1	– sévérité 1	28 jours
	– sévérité 2	56 jours

comme l'exige la spécification particulière.

Variante d'essai 2	– sévérité	28 jours

9 Examens initiaux

Les spécimens doivent être examinés visuellement et soumis aux vérifications électriques et mécaniques prescrites par la spécification particulière.

10 Préconditionnement

10.1 Nettoyage

Les spécimens doivent être utilisés pour l'essai dans le même état qu'à la livraison. Ils ne doivent normalement pas subir de lavage spécial.

Si la spécification particulière le prescrit, on doit laver la moitié du lot des spécimens dans de l'éthanol ou de l'eau déminéralisée contenant un détergent; cette procédure sera suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée exempte de détergent et l'autre moitié doit demeurer dans le même état qu'à la livraison. De cette façon, toute croissance de moisissures due à l'utilisation de matériaux impropres dans la construction du spécimen pourra être distinguée de celle résultant d'une contamination de surface.

Si le grade 0 est requis par la spécification particulière (variante d'essai 1), il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les spécimens en raison de la présence d'une contamination qui peut favoriser la croissance de moisissures.

NOTE Grade 0: voir 12.3.

10.2 Stockage en chaleur humide

Le ou les spécimens doivent être stockés dans les conditions d'incubation à (29 ± 1) °C et une humidité relative > 90 % et < 100 % pendant au moins 4 h immédiatement avant l'inoculation.

11 Epreuve

11.1 Application

La méthode d'application dépend de la variante d'essai prescrite par la spécification particulière; elle doit être effectuée selon la méthode décrite ci-dessous.

11.1.1 Variante d'essai 1

Si la spécification particulière exige des vérifications de fonctionnement et/ou une mesure des propriétés électriques deux groupes d'éprouvettes sont nécessaires:

Groupe 1 le ou les spécimens d'essai inoculés avec la suspension de spores et incubés;

Groupe 2 le ou les spécimens de contrôle négatif pulvérisés ou badigeonnés ou encore immergés dans l'eau distillée stérilisée conformément à la méthode d'inoculation utilisée pour le groupe 1 et stockés à la même température et humidité relative prescrites pour l'incubation mais dans un environnement stérile.

Si la spécification particulière n'exige aucune vérification de fonctionnement et/ou mesure des propriétés électriques seul le groupe 1 doit être utilisé.

11.1.2 Variante d'essai 2

Deux groupes de spécimens doivent être nécessaires:

Groupe 1 les spécimens d'essai inoculés avec des spores en suspension dans la solution nutritive et incubés;

Groupe 2 conformément au groupe 2 de la variante d'essai 1.

NOTE Il convient que les spécimens de contrôle négatif soient placés, dans les conditions prescrites, dans une chambre autre que celle qui contient les spécimens inoculés. Pour s'assurer qu'aucune moisissure ne pourra croître sur les spécimens de contrôle négatif, il convient que la chambre soit stérilisée selon l'une des méthodes indiquées en D.1.1. L'essai est valable, excepté si une croissance de moisissures se manifeste sur les spécimens d'essai et les spécimens de contrôle négatif.

11.2 Inoculation

Sauf prescription contraire dans la spécification particulière, l'inoculation du ou des spécimens d'essai et des bandes de contrôle (voir 6.3) avec la suspension de spore (voir 6.2) doit être effectuée par pulvérisation.

Si la pulvérisation n'est pas adaptée du fait de la taille, de la conception et autres propriétés de l'éprouvette l'inoculation avec la suspension de spore par immersion ou badigeonnage peut être effectuée comme indiqué dans la spécification particulière.

NOTE La pulvérisation par production d'aérosols de la suspension de spores avec un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation en liaison avec une chambre d'inoculation de sécurité (voir Annexe B) permet une répartition très homogène des spores sur la surface à essayer donnant une reproductibilité élevée des résultats d'essai. Il convient que cette méthode d'inoculation soit la méthode privilégiée.

11.3 Incubation

Les conditions d'incubation sont (29 ± 1) °C et une humidité relative >90 % et <100 %. Les conditions doivent être maintenues dans les récipients (voir 7.2) pour les spécimens de petites dimensions ou dans la chambre d'incubation de chaleur humide (voir 7.3) pour les grands spécimens.

Immédiatement après l'inoculation, les petits spécimens et au moins 3 bandes de contrôle doivent être suffisamment espacés dans le récipient et sans restriction de réglage de l'humidité relative nécessaire. Le récipient doit être ensuite placé dans la chambre d'incubation.

Si applicable, les spécimens de contrôle négatif doivent être placés, comme les spécimens inoculés, dans des récipients similaires mais stérilisés sans les bandes de contrôle. Les récipients doivent ensuite être placés dans la chambre d'incubation.

Dans le cas de spécimens de grandes dimensions, un nombre approprié de bandes de contrôle doit être placé dans la chambre avec les éprouvettes. Tout spécimen de contrôle négatif doit être exposé dans une chambre séparée fraîchement désinfectée (voir Annexe D) utilisée de préférence pour les spécimens de contrôle négatif uniquement.

Les récipients ou la chambre de chaleur humide doivent être ouverts uniquement pour

- examiner les bandes de contrôle déterminant la viabilité des spores et le maintien des conditions d'incubation après 7 jours;
- alimenter les récipients en oxygène de l'air une fois tous les 7 jours jusqu'à la fin de la durée prescrite d'incubation;
- réaliser un ou des examens visuels intermédiaires, conformément à 11.3.7.

L'ouverture ne doit durer que quelques minutes seulement.

Après 7 jours d'incubation, la croissance de moisissures de plus d'une origine doit être visible à l'œil nu sur chacune des bandes de contrôle. Sinon l'essai doit être considéré comme nul et il doit être recommencé. Dans ce cas, les mêmes éprouvettes peuvent être utilisées.

Toute interruption de l'incubation est autorisée pour un examen visuel uniquement et pendant moins de 10 min dans chaque cas et si nécessaire dans la spécification particulière. Deux examens visuels, au maximum, doivent être prescrits pour une exécution pendant la durée d'incubation. La ou les durées de l'examen visuel doivent être spécifiées dans la spécification particulière.

12 Examens finaux

12.1 Examen visuel

Les spécimens doivent être examinés (voir 12.3), vérifiés/ou photographiés (comme l'exige la spécification particulière), immédiatement après ils sont retirés du récipient ou de la chambre de chaleur humide, car la croissance peut changer son apparence par dessiccation. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées pour la manipulation.

Après un examen visuel et l'évaluation de la croissance réelle, le mycélium doit être retiré avec soin à l'aide d'éthanol 70 % vol de la surface qui doit ensuite être examinée au microscope pour évaluer la nature et l'importance de l'attaque (comme la corrosion) sur le spécimen. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées lorsqu'on enlève les moisissures.

12.2 Effet de la croissance

Quand la spécification particulière indique des vérifications électriques et/ou mécaniques à effectuer dans des conditions d'humidité (après l'incubation), il est indispensable que l'humidité relative entourant le ou les spécimens ne diminue pas avant que ces vérifications soient réalisées. Ces vérifications doivent donc être effectuées sur les petits spécimens tandis qu'ils sont encore exposés dans le récipient, couvercle fermé, avec présence d'eau. Pour les gros spécimens, les vérifications doivent être effectuées lorsqu'ils sont encore dans la chambre de chaleur humide.

NOTE Si des connexions électriques sont à réaliser ou un travail à effectuer sur des spécimens se trouvant dans les récipients ou les chambres de chaleur humide avec les couvercles ou portes nécessairement ouvertes, il convient d'effectuer cette opération en veillant à la sécurité des opérateurs. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées pour la manipulation. Les exigences du fabricant pour le fonctionnement dans des conditions de chaleur humide fournies dans le manuel de fonctionnement seront observées.

Des vérifications similaires doivent être effectuées sur des spécimens inoculés avec des suspensions de spores et sur d'autres inoculés avec une solution aqueuse seulement. Toute différence significative entre les résultats des mesures des deux groupes est considérée comme résultant de la croissance des moisissures et du milieu très humide.

Après les vérifications, les spécimens doivent être retirés et examinés visuellement selon 12.1.1 et, pour finir, l'attaque du spécimen doit être déterminée selon 12.1.2.

Si la spécification indique des vérifications à effectuer après reprise, les spécimens doivent être retirés du récipient ou de la chambre, puis examinés conformément à 12.1.1 et ensuite placés dans les conditions spécifiées de reprise pendant 24 h, après quoi ils doivent être soumis aux vérifications.

12.3 Importance de la croissance

Les spécimens d'essai exposés doivent être d'abord examinés à l'œil nu et ensuite, si nécessaire, au microscope stéréoscopique avec un grossissement nominal d'environ 50 x.

L'importance de la croissance des moisissures doit être évaluée et exprimée selon le grade suivant:

Grade

0 Aucune croissance apparente avec un grossissement nominal de 50 x

1 Traces de croissance bien visibles au microscope

2a Croissance sporadique visible à l'œil nu et/ou au microscope uniquement dispersée ou localisée en quelques endroits ne couvrant au total pas plus de 5 % de la surface d'essai

2b Croissance bien visible à l'œil nu et/ou au microscope répartie de manière plus ou moins homogène en plusieurs endroits ne couvrant au total pas plus de 25 % de la surface d'essai

3 Croissance bien visible à l'œil nu et ne couvrant au total pas plus de 25 % de la surface d'essai

NOTE Lorsque les spécimens comportent un assemblage et présentent de ce fait différents grades de croissance, il est préférable d'évaluer les différentes parties séparément. Pour la variante d'essai 2, il est recommandé que le grade 0 ne soit prescrit que s'il est spécifié d'examiner l'effet fongistatique.

13 Renseignements à fournir dans la spécification particulière

Lorsque cet essai est inclus dans la spécification particulière, les détails suivants doivent être fournis

		Article ou paragraphe
a)	Variante d'essai 1 ou 2	5, 11.1
b)	Variante d'essai 1 durée d'incubation (sévérité)	5, 8
c)	Mesures initiales électriques et mécaniques et vérifications fonctionnelles (si l'altération du fonctionnement est à déterminer)	5, 9, 11.1
d)	Préconditionnement par nettoyage	10.1
e)	Méthode d'inoculation (s'il ne s'agit pas de pulvérisation)	11.2
f)	Interruption d'incubation pour l'examen visuel intermédiaire	11.3.7
g)	Examens finaux	12
h)	Importance de la croissance (grade) devant faire l'objet d'une approbation (si nécessaire)	12.3

14 Renseignements à fournir, au minimum, dans le rapport d'essai

a) Laboratoire d'essai (nom, adresse et accréditation)
b) Client (nom et adresse)
c) Description du ou des spécimens
d) Norme d'essai, édition et variante d'essai
e) Sévérité pour la variante d'essai 1
f) Champignons d'essai (s'il y a divergence par rapport à la norme d'essai)
g) Examens initiaux, intermédiaires et finaux (détaillés)
h) Nettoyage du ou des spécimens (si applicable)
i) Méthode d'inoculation
j) Conditions d'incubation (s'il y a divergence par rapport à la norme d'essai)
k) Moisissures sur les bandes de contrôle (après incubation de 7 jours)
l) Résultats d'essai (observations spécifiques comprises)
m) Critère d'essai (grade admissible de moisissures si cela est prescrit)
n) Évaluation de la performance (reposant sur le critère d'essai)

Annexe A
(informative)

Dangers encourus par le personnel

A.1 Généralités

Les mycologues et les pathologistes sont d'avis que la mise en œuvre de l'essai de croissance des moisissures peut constituer un danger pour la santé, à moins que des précautions spéciales ne soient prises.

Les précautions qui sont décrites en détail dans les Annexes A, B, C et D sont fondées sur des techniques microbiologiques bien établies et sur l'utilisation d'un équipement spécialisé. Les personnes effectuant l'essai doivent être formées pour les travaux en laboratoires microbiologiques.

Un laboratoire microbiologique doit être équipé pour les essais de croissances de moisissures.

L'utilisation d'une armoire microbiologique de sécurité est recommandée pour l'exécution de certaines parties de la procédure.

Les spores de moisissures transportées par l'air environnant pénètrent en permanence dans le corps humain par le nez et la bouche, mais ne présentent pas, en principe, de danger réel pour la santé. Certains individus particulièrement sensibles peuvent cependant être affectés par l'inhalation répétée de certaines spores, y compris celles des moisissures utilisées dans cet essai. Il convient donc d'attirer l'attention sur les précautions à prendre lors de la réalisation de l'essai. Elles sont exposées de manière succincte dans l'Annexe C. Une croissance de champignons étrangers et autres microorganismes peuvent se développer par accident au cours de la période d'incubation aux emplacements d'incubation et/ou sur les spécimens. Certains de ces champignons ou autres micro-organismes peuvent être préjudiciables au corps humain.

Il est conseillé à toute personne susceptible de participer à cet essai d'en aviser le médecin du travail ou son médecin traitant. Elle doit alors se conformer à la décision du corps médical quant à cette participation.

Il convient que tout membre du personnel participant à cet essai soit informé des risques auxquels il (ou elle) s'expose, compte tenu de son état de santé.

Les règles nationales de sécurité doivent être suivies.

A.2 Renseignements destinés au corps médical

L'essai comporte un risque dû à l'inhalation ou à l'implantation traumatique de spores.

Les mesures de sécurité à prendre sont indiquées dans l'Annexe C et sont destinées à réduire ce risque.

Il existe des risques particuliers pour les personnes sensibles, à savoir

– les sujets atopiques habituellement allergiques au pollen, à la poussière de maison, aux petits fragments de poil ou de plumes d'animaux, etc., et qui souffrent de rhinite, d'asthme

ou d'autres symptômes d'allergie. Une allergie aux spores de moisissures de type I peut apparaître et, dans certaines circonstances, des allergies du type III (maladie professionnelle du poumon du fermier);

– les sujets atteints de maladies chroniques des poumons, par exemple les personnes souffrant de bronchiectasie, de bronchite chronique, de sarcoïdose ou d'emphysème, etc. Le dépôt et la germination de spores dans les alvéoles des poumons peuvent entraîner une croissance fongique sous forme d'agglomérat fongique ou d'aspergillome en association avec *Aspergillus spec.* Les lésions tuberculeuses guéries constituent un terrain favorable à la croissance fongique;

– les malades qui reçoivent un traitement de longue durée d'antibiotique à large spectre, ou ceux qui prennent des médicaments immunodépresseurs incluant les corticostéroïdes, ou encore ceux à qui on a prescrit des préparations chimiothérapiques. L'élimination de la flore bactérienne normale des voies respiratoires et digestives favorise quelquefois une croissance fongique considérable, et l'ingestion d'immunodépresseurs a tendance à prédisposer l'individu à une infection fongique.

Bien que les dangers liés à la réalisation de l'essai selon les procédures prescrites soient considérés comme étant assez limités, il est néanmoins recommandé que les personnes appartenant aux catégories mentionnées ci-dessus s'abstiennent de participer à l'essai.

Annexe B
(normative)

Méthodes d'inoculation
(se reporter également à 11.2)

B.1 Généralités

Il est nécessaire de consulter l'Annexe C, «Mesures de sécurité recommandées», avant le commencement de l'inoculation. La pulvérisation de la suspension de spores sur les spécimens et les bandes de contrôle est généralement une méthode appropriée.

B.2 Pulvérisation par la méthode d'inoculation par aérosol (AIM)

B.2.1 Généralités

En utilisant un pulvérisateur pour l'inoculation, la répartition des spores à la surface du spécimen est bien moins homogène que l'utilisation de l'AIM.

La reproductibilité et l'interprétation des résultats d'essais sont à l'évidence meilleures en utilisant l'AIM, du fait d'une répartition très homogène des spores à la surface du spécimen

L'AIM est favorablement applicable aux spécimens dont la surface doit être à peine humidifiée par la suspension de spores également.

Les dimensions adaptées de la boîte d'inoculation de sécurité peuvent être 500 mm × 500 mm × 500 mm. Il convient que le matériau de la boîte soit du polyméthacrylate de méthyle.

B.2.2 Description de la méthode

Méthode d'inoculation par aérosol (AIM) voir la Figure B.1.

La suspension de spores sera transformée en aérosol par un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation de médicaments sous forme d'aérosols (1).

Une quantité exactement mesurée de suspensions de spores peut être introduite dans la cuve d'atomisation de l'appareillage ultrasonore pour aérosol, à l'aide d'une seringue graduée (2).

L'aérosol contenant les spores est conduit à travers un tube (3) dans la boîte d'inoculation par une légère ventilation produite par l'appareil ultrasonore d'aérosol.

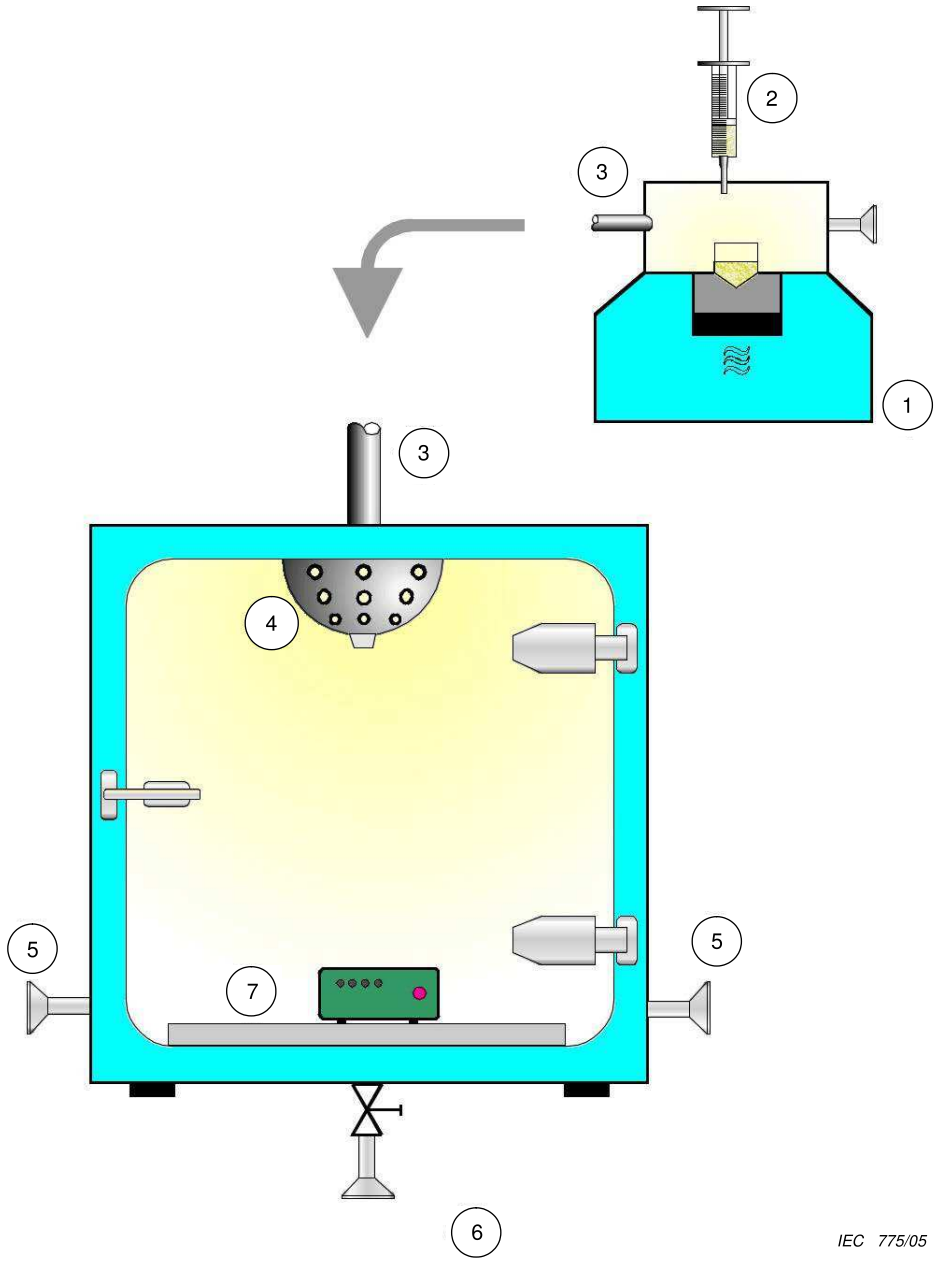
L'aérosol est réparti dans la boîte par un entonnoir à trous (4) monté à l'abri de la boîte.

Le spécimen est placé sous l'entonnoir au fond de la boîte dont les zones principales d'essai sont dans la direction de la propulsion de l'aérosol.

La pression à l'intérieur de la boîte est compensée par deux trous d'aération disposés de manière équilatérale et équipés de filtres microbiologiques (5).

Après achèvement de la production d'aérosols et de la propulsion de l'aérosol, la boîte doit être soumise à la ventilation provenant de l'appareil ultrasonore d'aérosol au travers d'un tube au fond de la boîte (6) équipée d'une soupape et d'un filtre microbiologique à l'extrémité.

Avant d'ouvrir la porte de la boîte qui est scellée au cours du fonctionnement, la ventilation provenant de l'appareil ultrasonore d'aérosol doit être arrêtée.



Légende

1 Appareil à aérosol ultrasonore
2 Seringue graduée
3 Tube
4 Entonnoir à trou
5 Filtres microbiologiques
6 Fond de boîte
7 Spécimen

Figure B.1 – Méthode d'inoculation par aérosol (AIM)

B.2.3 Décontamination et nettoyage

Après la sortie du spécimen (7), la porte de la boîte doit être immédiatement fermée et tout le système doit être décontaminé par un désinfectant sous forme de production d'aérosol comme une solution peracétique, par exemple.

Pour des suspensions de spores similaires, on peut réaliser plus d'une opération d'inoculation l'une après l'autre, le même jour, sans interruption pour des décontaminations.

Si les spores étaient en suspension dans une solution de sels minéraux (Variante d'essai 1, voir 6.2.2) ou dans la solution nutritive de sels minéraux (Variante d'essai 2, voir 6.2.3) la cuve d'atomisation, le tube entre l'appareil ultrasonore d'aérosol et la boîte d'inoculation, l'entonnoir de répartition et les surfaces internes de la boîte doivent être nettoyés à l'aide d'eau distillée après décontamination.

B.2.4 Etalonnage du système AIM

La quantité de suspension de spores diffusée sur une gamme de surface définie en fonction du réglage de performance de l'appareil ultrasonore et d'autres facteurs peut être évaluée en pesant les boîtes de Pétri en polystyrène à l'aide d'une balance analytique avant et après exposition au fond de la boîte d'inoculation au cours de la production d'aérosol. A la place de la suspension de spores, la solution de sels minéraux (voir 6.3.2) doit être transformée en aérosol.

NOTE La quantité recommandée d'aérosol déposé est de (100 ± 20) mg/dm².

B.3 Inoculation de petits spécimens par immersion

Pour les spécimens de petites dimensions, l'immersion dans la suspension de spores constitue une méthode rapide et efficace d'inoculation, à condition que les spores puissent adhérer à la surface.

B.4 Inoculation de spécimens de grandes dimensions par pulvérisation ou badigeonnage

Il convient que les grands spécimens soient, si possible, divisés en éléments selon 3.4.

Toutefois, si les spécimens sont encore trop grands pour être inoculés à l'intérieur de l'armoire microbiologique de sécurité disponible, il y a lieu d'envisager l'installation d'une hotte d'échappement temporaire au-dessus du spécimen. Il convient que les mêmes conditions de ventilation soient maintenues, et que le même système d'échappement que celui qui est prescrit pour l'armoire microbiologique de sécurité soit installé. Il est également possible de placer le grand spécimen dans la chambre de chaleur humide où doit avoir lieu l'incubation, et de le badigeonner sur la suspension de spores. Bien qu'il soit peu probable que cette méthode donne lieu à une formation d'aérosol, il convient que le système d'échappement recommandé, installé sur la chambre de chaleur humide, soit mis en fonctionnement durant l'inoculation. Pendant l'inoculation par pulvérisation, le système d'évacuation ne doit pas être mis en fonctionnement pour éviter un déplacement d'air supplémentaire et la porte doit être fermée pour réduire le dégagement de spores.

Il est recommandé d'effectuer l'inoculation dans une armoire microbiologique de sécurité, du fait de l'éventualité de formation d'aérosol.

Dans le cas de la méthode d'inoculation par aérosol (AIM), l'armoire microbiologique de sécurité (MSC) est remplacée par la boîte d'inoculation de sécurité (voir Figure B.1).

Annexe C
(informative)

Mesures de sécurité recommandées

Il convient que les précautions utiles soient prises pour réduire l'inhalation de spores de moisissures et pour éviter qu'elles n'entrent en contact avec la peau, en particulier au niveau des ongles.

L'inhalation des spores de moisissures risque de se produire lors du transport ou de l'examen des spécimens incubés ou des bandes de contrôle, ou encore si l'air qui les entoure est déplacé, lors de l'ouverture ou de la fermeture des portes des chambres et des couvercles des récipients, par exemple. Ce risque est accru quand les spores de moisissures sont desséchées, car les petites particules de spores qui se détachent peuvent plus facilement se propager dans l'air. Le risque d'inhalation est également plus grand lors de l'inoculation des spécimens par la méthode de pulvérisation à l'exception de la méthode d'inoculation par aérosol (AIM) en utilisant une boîte d'inoculation (voir l'Annexe B).

Une protection directe contre l'inhalation de spores de moisissures peut être réalisée grâce au port d'un assemblage homologué et adapté de filtre respirateur assigné pour des poussières dans la gamme de diamètre entre 1 µm et 10 µm ou pour des applications de dangers biologiques ou de dangers radioélectriques. Une gaze ou un masque non hermétique ne représente pas une protection suffisante. Cependant, la méthode préférentielle consiste à utiliser une armoire microbiologique de sécurité (MSC).

De façon à diminuer les risques de contact entre la peau et les moisissures, des gants de protection peuvent être portés lors de la manipulation des cultures, des inoculums et des spécimens d'essai après l'inoculation et l'incubation. On doit privilégier des gants jetables et les décontaminer avant de les enlever.

Il convient que toutes les opérations relatives à l'ouverture de récipients de cultures de moisissures, à la préparation de suspensions de spores, à l'inoculation de spécimens et de bandes de contrôle, si elle n'est pas réalisée dans une boîte d'inoculation (AIM) ainsi qu'à l'examen et à la mesure de spécimens incubés, soient effectuées dans une armoire microbiologique de sécurité, en prenant en compte les précautions suivantes:

a) utiliser l'agent mouillant prescrit pour la préparation d'une suspension de spores (voir 6.2.1);
b) nettoyer les parois externes du récipient d'incubation avec de l'éthanol à 70 % avant de le retirer de l'armoire microbiologique de sécurité et de le transférer dans la chambre d'incubation;
c) nettoyer ou laver les spécimens avec de l'éthanol à 70 % à la fin de l'essai, pendant qu'ils sont encore dans l'armoire microbiologique de sécurité. Il s'agit de retirer les moisissures avant la décontamination finale et la mise au rebut;
d) en utilisant la méthode d'inoculation par aérosol (AIM), la conception de la boîte d'inoculation et le fonctionnement doivent être comme spécifié dans l'Annexe B pour empêcher que ne s'échappent l'aérosol contenant les spores .

Dans le cas où le spécimen est trop grand pour être placé dans un récipient individuel et qu'il se révèle nécessaire de l'incuber dans une chambre de chaleur humide, les spores peuvent se déplacer en raison du mouvement de l'air lors de l'ouverture ou de la fermeture de la porte de la chambre.

Un système d'échappement à filtres microbiologiques pour un échappement dans l'atmosphère extérieure peut empêcher les spores de s'échapper par la porte quand elle est

ouverte. Lorsque la porte est fermée, le système d'échappement ne doit pas être mis en fonctionnement pour empêcher une augmentation de déplacement d'air ou une pression négative dans la chambre.

Les filtres microbiologiques doivent être décontaminés ou remplacés après la fin de l'incubation. Avant l'ouverture de la porte, il convient que le ventilateur brasseur d'air soit fermé pour réduire la diffusion de spores.

S'il est nécessaire d'utiliser un grand incubateur, il est nécessaire de porter des habits protecteurs ainsi qu'un casque muni d'un respirateur, comme indiqué ci-dessus à l'Article C.3, ou d'un tuyau permettant de l'approvisionner correctement en air.

Il convient de décontaminer toutes les chambres et tous les appareils utilisés pour les essais de croissances de moisissures immédiatement après utilisation conformément à l'Annexe D.

En fin d'essai, il est possible que les spécimens et les bandes de contrôle soient couverts d'une épaisse couche de moisissures, et il y a lieu d'apporter un soin particulier à leur destruction.

Il convient d'immerger les bandes de contrôle dans un récipient contenant une solution d'hypochlorure de sodium (voir Annexe D) avant d'être mises au rebut. Il convient de traiter préalablement les spécimens conformément au point c) de l'Article C.5, avant la décontamination finale par une méthode sélectionnée parmi celles figurant dans l'Annexe D.

Il est recommandé de décontaminer les étuves et l'équipement avant le démarrage de l'essai, au cas où des doutes subsisteraient sur leur stérilité. Si une décontamination n'a pas été effectuée dans les 28 jours précédant l'essai, elle sera entreprise quel que soit l'état de propreté.

Il est interdit de fumer ou de consommer des aliments ou des boissons dans le laboratoire d'essai.

Les vêtements de protection portés dans le laboratoire d'essai de croissances de moisissures ne doivent pas être utilisés à l'extérieur.

Annexe D
(informative)

Procédures de décontamination

Il est probable que les chambres de chaleur humide et les récipients utilisés en tant qu'incubateurs pour faire croître les moisissures seront contaminés à la fois par les moisissures d'essai et par des moisissures contaminantes étrangères. Une procédure de décontamination est de ce fait nécessaire. Il convient qu'elle soit efficace contre les germes d'essai et les contaminants étrangers. Il ne doit être laissé aucun résidu de décontamination susceptible de freiner la croissance des champignons d'essai. De plus, cette décontamination doit présenter le moins de risque possible pour l'expérimentateur.

D.1 Procédures de décontamination recommandées

D.1.1 Application de solutions chimiques actives

Lavage avec une solution d'hypochlorure de sodium ou immersion dans celle-ci. Il convient de préparer une solution d'hypochlorure de sodium contenant 500×10^{-6} à $1\,000 \times 10^{-6}$ de chlorure dilué dans de l'eau.

Il convient de mouiller les espaces d'incubation, les récipients ou l'équipement avec la solution ou le cas échéant de les immerger dans la solution, en s'assurant qu'elle pénètre dans toutes les fentes. Au minimum 30 min après il convient que l'appareil soit soigneusement rincé à l'eau fraîche.

Les chambres climatiques peuvent être décontaminées en augmentant la température à 60 °C – 70 °C pendant 1 h à 2 h puis en les nettoyant au moyen d'une solution savonneuse d'hypochlorure de sodium.

Environ 30 min après, il convient que les résidus de la solution soient enlevés en rinçant ou en nettoyant avec de l'eau fraîche.

L'hypochlorure de sodium présente une forte action blanchissante. L'utilisation de ce désinfectant risque de ne pas convenir pour certains matériaux.

Un désinfectant très efficace à appliquer à la place de la solution d'hypochlorure de sodium est à base de mélanges d'azotes organiques tels que l'acétate d'ammonium diméthyl-benzylique d'octyl–n, l'acétate de benzethonium ou l'acétate méthylbenzethonium.

Seuls les désinfectants essayés par rapport à leur efficacité fongique et leur sécurité toxicologique par un laboratoire autorisé doivent être utilisés.

D.1.2 Stérilisation à l'autoclave

Cette méthode convient aux appareils plus petits qui peuvent supporter une température élevée ainsi que pour les cultures. Il convient de régler l'autoclave à une pression de 10 kPa (1 bar) de façon à obtenir une température de 121 °C pendant 20 min.

D.1.3 Nettoyage ou pulvérisation avec de l'éthanol 70 % vol

Toutes les surfaces qui ont pu avoir été en contact avec les spores ou avec de plus petites gouttelettes de suspension de spores doivent être intensément mouillées par de l'éthanol 70 % vol. La durée du nettoyage ne doit pas être inférieure à 15 mm.

D.1.4 Application de désinfectants volatils

Il convient d'éviter l'utilisation de désinfectants volatils tels que le formaldéhyde. Les vapeurs de formaldéhyde sont un décontaminant efficace, mais elles laissent des résidus dont l'élimination n'est presque jamais complète. En conséquence, elles peuvent réapparaître dans les espaces fermés, empêchant de ce fait la croissance des moisissures d'essai.

De plus, le formaldéhyde est une substance toxique.

Il existe d'autres antiseptiques volatils, mais qui peuvent provoquer des explosions et/ou avoir des effets toxiques et, par conséquent, présenter un risque pour la sécurité, surtout dans le cas de chambres de grandes dimensions. Dans de nombreux cas, la production d'aérosol à partir d'une solution acide peracétique 0,5 % vol dans l'espace contaminé peut être une méthode adaptée de décontamination.

D.2 Mise au rebut

Avant d'être jetés, il est recommandé que les matériaux contaminés, les surplus de cultures, les suspensions de spores, etc., soient décontaminés selon la méthode D.1.1 ou D.1.2.

NOTE Il convient que les supports nutritifs de surcroissance (cultures) soient de préférence décontaminés par autoclave. Il est recommandé qu'une suspension de spores renversée ou du verre provenant d'un tube brisé ou autres déchets infectés soient désinfectés en les couvrant de cellulose saturée de solution d'hypochlorure de sodium ou autre désinfectant indiqué en D 1.1 pendant plusieurs heures avant la mise au rebut.

Annexe E
(informative)

Informations sur les champignons d'essai

E.1 Liste des souches identiques

N°	Nom	Souche N°	Souche identique [1)]
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	CBS 131.52 CMI 45551 DSM 1957 NBRC 6341 NRRL 334 QM 324 QM 458 IAM3001
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	CBS 377.64 CMI 45543 DSM 1958 NBRC 6346 NRRL 571 QM 82 j IAM 3004
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	CBS 148.51 CMI 45550 DSM 1962 NRRL 1870 QM 459 NBRC 6347 IAM 8059
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	NRRL 2778 NBRC 100535
5	*Paecilomyces varioti*	ATCC 18502	CBS 284.48 CMI 40025 DSM 1961 NRRL 1115 QM 6764 IAM 5001 NBRC 33284 IAM 13426
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	CBS 631.66 CMI 114933 DSM 1944 IAM 7013 NBRC 33285 JCM 5594
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	CMI 49528 DSM 9122 QM ~~9958~~ 9985 NBRC 100536
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	DSM 1963 IAM 5061 NBRC 6355

1) D'autres souches identiques peuvent être utilisées.

E.2 Supports nutritifs recommandés pour le maintien des cultures

Tous les supports Agar doivent être stérilisés dans un autoclave à (120 ± 1) °C pendant 15 min.

N°	Champignons d'essais	Milieu nutritif	
1	*Aspergillus niger*	Extrait de malt pour la microbiologie avec addition de	25 g/l d'eau distillée 15 g à 20 g/l Agar
2	*Aspergillus terreus*		
4	*Hormoconis resinae*		
5	*Paecilomyces varioti*		
6	*Penicillium funiculosum*		
3	*Chaetomium globosum*	Agar-glucose-sels minéraux selon la solution donnée en 6.3.2 *) avec addition de	 15 g à 20 g/l Agar
7	*Scopulariopsis brevicaulis*		
8	*Trichoderma virens*		
*) *Chaetomium globosum* avec une bande stérile de papier filtre recouvrant la surface.			

Une plaque du support nutritif inoculé avec des spores provenant de la culture de champignons d'essais et incubés après que l'on a la possibilité de l'utiliser pour en vérifier la viabilité durant une période de 7 jours.

Mais on ne peut pas l'utiliser pour s'assurer si les conditions de température et d'humidité relative dans la chambre d'incubation peuvent soutenir ou non de manière suffisante la croissance de moisissures comme on peut l'exécuter par des bandes de contrôle (voir 6.3).

Annexe F
(informative)

Guide

F.1 Mécanismes d'infection

Les champignons se développent dans le sol et dans ou sur la plupart des matériaux usuels. Ils se propagent par des spores qui se détachent du mycélium d'origine et, plus tard, germent pour donner un nouveau mycélium.

Ces spores sont très petites (1 µm à 10 µm) et sont facilement transportées par l'air en mouvement. Elles peuvent aussi se coller sur des particules de poussière et s'introduire dans les appareils.

Ainsi, toutes les parties d'un appareil dans lesquelles l'air peut pénétrer peuvent être infectées par les spores. L'infection peut également être provoquée par les manipulations. Les spores peuvent être transportées par les empreintes digitales, par exemple.

Un autre facteur d'infection est celui de la pénétration des acariens portant des spores sur leur corps. Les acariens sont capables de pénétrer dans de très petites fentes jusqu'à 25 µm. Les corps et les excréments des acariens, en s'agglutinant, peuvent produire un film d'agents nutritifs et d'humidité qui peut favoriser la propagation des moisissures à partir des spores.

F.2 Germination et développement

L'humidité est indispensable à la germination des spores et, lorsqu'un film de poussière ou d'autre matériau hydrophile est présent à la surface, il peut extraire de l'atmosphère une humidité suffisante.

Lorsque l'humidité relative est inférieure à 65 %, il ne peut y avoir ni germination ni croissance du mycélium. La croissance du mycélium sera d'autant plus rapide que l'humidité sera plus élevée au-dessus de cette valeur. Les spores peuvent néanmoins survivre pendant longtemps avec une humidité relative très faible; même lorsque le mycélium est mort. Elles peuvent germer et redonner un nouveau mycélium dès que l'humidité est redevenue favorable.

En plus d'une humidité élevée de l'atmosphère, il est nécessaire, pour les spores, qu'il existe à la surface du produit une couche de matériau absorbant l'humidité. En supposant cela, la plupart des matériaux organiques apportent une nourriture suffisante pour un léger développement de mycélium. La poussière organique elle-même contient une source de nourriture suffisante pour la croissance de moisissures. La croissance de moisissures est favorisée par de l'air stagnant et une absence de ventilation.

La température optimale pour la germination de la majorité des champignons susceptibles de perturber le matériel est située entre 20 °C et 30 °C. Rares sont ceux qui peuvent germer au-dessous de 0 °C, quelques-uns le peuvent jusqu'à 40 °C.

De nombreuses spores ne sont nullement altérées par une exposition prolongée au-dessous de 0 °C ou à des températures élevées, allant jusqu'à 80 °C.

F.3 Effet du mycélium

F.3.1 Effets primaires

Les moisissures peuvent vivre sur la plupart des matériaux organiques, mais certains de ces matériaux peuvent être plus facilement attaqués que d'autres. La croissance des moisissures ne se produit normalement que sur des surfaces exposées à l'air et celles qui absorbent ou adsorbent l'humidité sont généralement plus susceptibles d'être attaquées.

Même s'il ne se produit qu'une légère attaque dangereuse sur un matériau, la formation d'un cheminement conducteur le long de la surface, due à une couche humide de mycélium, peut abaisser fortement la résistance d'isolement entre des conducteurs électriques.

Lorsque le mycélium humide se développe en un endroit situé dans le champ électro-magnétique d'un circuit électronique à réglage critique, il peut provoquer une importante variation dans les caractéristiques fréquence-impédance du circuit.

Les matériaux les plus sensibles à l'attaque des moisissures sont les matériaux naturels tels que cuir, bois, textiles, cellulose et soie. La plupart des matériaux plastiques sont moins sensibles mais néanmoins exposés.

Les matériaux plastiques contiennent parfois des monomères et des oligomères non polymérisés et/ou additifs qui peuvent resurgir à la surface et constituer une nourriture pour les champignons; ainsi, une croissance importante peut se produire.

L'attaque des matériaux par les moisissures provoque une dégradation des caractéristiques mécaniques et/ou des modifications d'autres propriétés physiques.

Les propriétés de certains matériaux plastiques exigent, pour avoir une durée de vie satisfaisante, la présence d'un plastifiant. Si le plastifiant est digéré par les champignons le matériau est cassant.

F.3.2 Effets secondaires

La croissance de moisissure dégage des produits acides du métabolisme et d'autres substances qui entraîneront une attaque de type secondaire du matériau.

Cette attaque peut conduire à des effets d'électrolyse ou de vieillissement, et le verre même peut perdre sa transparence dans ce processus. L'oxydation ou la décomposition peut être facilitée par la présence d'enzymes sécrétées par les moisissures.

La présence des champignons affecte l'esthétique de l'appareil par une apparence désagréable et aussi par l'odeur qui accompagne fréquemment les moisissures.

F.3.3 Effets associés à la conception des matériels

En raison de la conception modulaire et de l'interconnexion de la plupart des matériels, le développement des moisissures dans une partie d'un matériel peut avoir des effets sévères sur un autre sous-ensemble ou module qui, en lui-même, ne permettrait pas le développement de moisissures.

Les effets possibles sur les performances globales du matériel doivent donc être évalués lorsque l'on considère les effets primaires et secondaires obtenus sur les sous-ensembles ou les composants individuels.

Il y a lieu de noter que tout ce qui concerne l'identification du matériau et de l'équipement, par exemple: étiquettes, marquage, etc. doit avoir de préférence le même niveau de protection que le produit lui-même.

F.4 Prévention contre le développement des moisissures

Les procédés suivants seront utilisés avec des degrés de réussite différents pour combattre les effets nuisibles du développement des moisissures.

Il convient que tous les matériaux isolants soient choisis de façon à présenter la plus grande résistance possible aux moisissures, pour rendre maximal le temps pris par le mycélium pour se développer, et minimiser tout dommage causé aux matériaux par un tel développement de moisissures.

L'utilisation de lubrifiants dans l'assemblage, de vernis et de produits de finition, etc. est souvent nécessaire pour obtenir le fonctionnement désiré ou une certaine durabilité du produit. Il convient que ces matériaux soient choisis en fonction de leur aptitude à résister au développement des moisissures. Même s'il apparaît que les lubrifiants, etc., ne peuvent porter des moisissures, ils peuvent attirer de la poussière qui, à son tour, portera des moisissures. Cependant, il convient de noter que l'emploi de produits contenant des fongicides est souvent recommandé pour la protection de certains matériaux.

Il convient d'éviter les pièges à humidité, qui peuvent se former lors de l'assemblage du matériel et dans lesquels les moisissures peuvent se développer. Exemples de ces pièges accidentels: les espaces compris entre des prises non étanches et leurs supports ou les espaces compris entre des cartes de circuits imprimés et leurs connecteurs latéraux dans certaines positions particulières.

L'étanchéité absolue du matériel avec une atmosphère interne sèche et propre est la technique la plus efficace pour empêcher le développement des moisissures.

Une dissipation de chaleur permanente dans une enceinte fermée peut maintenir un degré d'humidité relative suffisamment bas pour éviter le développement des moisissures.

Le fonctionnement d'un matériel dans un environnement convenablement contrôlé peut empêcher le développement nuisible des champignons.

Un dessiccateur régulièrement renouvelé, placé dans une enceinte partiellement étanche, peut y maintenir un degré d'humidité relative suffisamment bas pour empêcher le développement nuisible des champignons.

Le nettoyage soigneux et périodique d'un matériel sous coffret, éliminant toute poussière et moisissures accumulées (film nutritif), peut empêcher temporairement la détérioration.

Les fongicides incorporés dans des vernis, en tablettes, ou pulvérisés directement peuvent empêcher le développement des moisissures pendant un certain temps. Voir l'Article F.7.

Lorsque le matériau et le fonctionnement de l'équipement ne présentent pas de contre-indication, on peut utiliser les rayons ultraviolets ou de l'ozone pour stériliser.

Les courants d'air de vitesse adéquate, circulant sur ces parties du matériel, peuvent retarder le développement des moisissures.

Des acaricides peuvent être utilisés pour combattre l'action des acariens.

L'application de revêtements de protection tels que l'époxyde, les polymères silicone, les acryliques ou le parapolyxylylène sur les cartes imprimées réduit le mouillage de la surface par de la vapeur d'eau en voie de condensation et ainsi empêche la croissance de moisissures si le revêtement de protection en lui-même est résistant au développement de moisissures.

F.5 Conditions d'application de l'essai de moisissures

Il convient que l'essai de moisissures d'un matériel ne consiste normalement qu'à vérifier que les composants et les matériaux utilisés ont été correctement choisis, puisque tout essai de moisissures effectué sur un matériel complet sera souvent d'un coût prohibitif ou pourra donner des résultats assez douteux.

La plupart des renseignements utiles pourront généralement être obtenus d'une façon plus aisée et plus précise à partir d'essais sur des matériaux, des composants, des sous-ensembles, des parties d'assemblage de faibles dimensions, etc. (voir article F.4).

L'essai de la résistance des matériaux aux moisissures doit être effectué conformément à l'ISO 846 et doit être délégué aux laboratoires compétents.

NOTE Il est recommandé que les laboratoires de microbiologie testant les produits techniques soient accrédités conformément à l'ISO/IEC 17025.

L'essai selon la variante 1 est prévu comme épreuve finale exécutée sur des matériaux choisis de façon appropriée, au stade de la conception, contrôlés au préalable, et il ne doit pas, normalement, provoquer de contamination importante.

Lorsqu'une contamination est normalement prévue, il est conseillé d'appliquer à la fois les variantes 1 et 2 de façon à vérifier le fonctionnement des spécimens contaminés et non contaminés.

Ces essais ne peuvent pas se substituer au choix approprié des matériaux. Il est impossible d'imaginer une épreuve simplifiée qui puisse remplacer des essais préalables des matériaux et un examen, par spécialiste, des résultats obtenus.

Le choix des matériaux, contrôlés au préalable, est la précaution la plus importante à prendre lors de la conception de matériels destinés à fonctionner en milieu humide.

Lorsqu'une contamination grave des surfaces isolantes ne peut se produire, cet examen est souvent la seule précaution nécessaire et elle se révèle suffisante dans la majorité des cas, hormis dans les conditions les plus sévères.

Lorsque le matériel fonctionne dans des conditions favorisant le développement des moisissures pendant une petite partie de sa durée de vie seulement, ou bien lorsqu'une mesure de protection quelconque est observée, par exemple: appareil dans une enceinte fermée ou avec un chauffage permanent pour réduire l'humidité intérieure, il n'est pas indispensable d'effectuer l'essai des moisissures si les matériaux ont été correctement sélectionnés et de bons principes de construction employés.

Si ce n'est pas le cas, l'essai J n'est pas suffisant pour mettre en évidence toutes les sources possibles de perturbation.

L'essai J, en tant que contrôle final comporte seulement une petite sélection de souches choisies pour attaquer les matériaux qui sont utilisés dans l'industrie et qui sont très résistants aux moisissures.

Il indiquera donc la nature de tous les ennuis susceptibles de se produire sur des spécimens bien conçus.

Sur des spécimens mal conçus et constitués de matériaux impropres, ces essais ne peuvent mettre en évidence tous les défauts potentiels.

F.6 Types principaux d'effets

F.6.1 Envahissement par le mycélium et attaque de la surface après 28 jours d'incubation

F.6.1.1 Variante 1

Cette forme d'essai sera la plus utilisée. L'étendue de l'envahissement montre si l'on a utilisé des matériaux résistants. La localisation du mycélium indiquera les zones où des perturbations sont à craindre et où de plus grandes distances dans l'air ou lignes de fuite sont à prévoir.

L'attaque de la surface indiquera les endroits où une dégradation physique est susceptible de résulter d'un développement de moisissures.

F.6.1.2 Variante 2

Même si un produit est résistant, une croissance peut apparaître par la contamination en surface résultant des substances nutritives.

Dans ce cas, des effets secondaires peuvent se produire, comme une attaque par les métabolites produits par des croissances de moisissures ou, physiquement, par une pénétration du mycélium.

La variante 2 doit être utilisée pour vérifier les effets secondaires des moisissures sur les matériaux ou sur les caractéristiques des produits lorsque la croissance des moisissures est provoquée par une contamination significative de surface apportée par des substances nutritives.

La variante 2 peut aussi être utilisée pour vérifier l'efficacité d'un traitement fongicide sur l'éprouvette (voir F.7.2).

La variante 2 n'est pas une méthode appropriée pour simuler les conditions d'une contamination de surface très intense, par exemple due à une grande quantité de poussière organique ou d'insectes morts.

Afin d'avoir la certitude que des matériaux normalement résistants et des principes de conception corrects ont été utilisés, il convient que les spécimens soumis à la variante 2 de l'essai satisfassent aussi aux conditions de la variante 1.

Dans ce cas, il convient que l'essai de la variante 1 soit exécuté en utilisant des spécimens séparés.

F.6.2 Effet sur les caractéristiques du matériel encore humide après 28 jours d'incubation (variante 2) ou après 28 ou 56 jours d'incubation (variante 1)

Cette procédure donne une indication sur l'ordre et la nature des variations des caractéristiques susceptibles de se produire sur des produits fonctionnant dans des conditions produisant le développement des moisissures.

La présence d'humidité est en elle-même une cause de variations des caractéristiques; aussi est-il essentiel de faire deux séries de mesures; l'une sur des échantillons non contaminés par les moisissures, l'autre sur échantillons contaminés.

C'est la différence entre les deux séries de mesures qui donnera l'effet de la présence du mycélium humide.

Les composantes de la solution nutritive nécessaire pour la variante 2 peuvent elles-mêmes influer sur les caractéristiques du spécimen, par exemple en faisant diminuer la résistance superficielle.

Il peut être difficile de s'assurer, d'une façon précise, de la valeur de cette différence étant donné que la croissance de moisissure peut apparaître sur les spécimens non inoculés (spécimens de contrôle négatif) également lorsqu'ils ont été infectés par les spores depuis le tout début ou étaient infectés pendant l'essai.

Pour empêcher un développement spontané de moisissures, des précautions particulières doivent être prises.

F.6.3 Effet sur les caractéristiques après 24 h de reprise

Cette procédure donne une indication sur le degré et la nature de la variation dans les caractéristiques dues à l'existence du mycélium qui s'est développé durant une période d'humidité relative élevée et est ensuite séché sous une faible humidité relative.

Cette procédure est destinée aux produits devant être stockés dans des conditions où les moisissures prolifèrent, et qui, par la suite, sont installés et mis en fonctionnement dans une salle à air conditionné, par exemple.

Dans ce cas également, deux séries de mesures sont nécessaires pour distinguer les effets permanents dus à l'exposition à l'humidité de ceux qui sont dus à la présence de mycélium.

F.7 Emploi des fongicides

Une méthode souvent employée pour donner au matériel une résistance supplémentaire au développement préjudiciable des moisissures consiste à utiliser une substance fongicide appropriée pour prévenir ou empêcher le développement des champignons.

F.7.1 Conditions d'emploi

Lors d'un choix de fongicides pour équipements, les principes suivants doivent être observés.

Le fongicide ne doit pas créer une atmosphère toxique qui pourrait nuire au personnel au cours du fonctionnement, de l'entretien ou de l'essai du produit. Les composés organiques métalliques utiles comme fongicide sont des toxines telles que les composés mercuriques organiques volatils, par exemple.

Les composants volatils du fongicide ne doivent pas amener une détérioration des parties d'un matériel, telle que corrosion électrolytique de parties métalliques, chute de la résistance d'isolement ou de la rigidité diélectrique des surfaces des isolateurs, formation ou dépôt d'un film isolant sur les contacts des relais, des interrupteurs, etc.

Lorsque des composants sensibles à la lumière, tels que cellules photoélectriques, sont inclus dans le matériel, les produits volatils d'un fongicide ne doivent pas créer des couches absorbant la lumière sur les fenêtres du composant.

F.7.2 Performance de l'action du fongicide

Le fongicide doit être stable et durable à la plus haute température susceptible de régner à l'intérieur de l'appareil.

Il doit résister au délayage par des condensations répétées d'humidité sur les surfaces intérieures.

Il ne doit pas être volatil au point de disparaître avant le terme de la durée nécessaire de protection.

Si un effet à long terme du fongicide est nécessaire, la pression de sa vapeur doit être suffisante pour permettre le maintien d'une concentration efficace dans les cas où la croissance de moisissure pourrait donner lieu à des effets préjudiciables.

Même si un fongicide est destiné à fournir une protection prolongée, une évolution normale tend à créer un mutant de la moisissure qui résiste alors au fongicide utilisé. Il est donc souhaitable, lorsqu'une protection de longue durée est nécessaire, non seulement de renouveler périodiquement le fongicide, mais de le remplacer par un fongicide d'un type différent.

F.7.3 Durée de protection et essais

Un fongicide peut être choisi pour donner soit une protection pour quelques mois, pendant un séjour provisoire en atmosphère humide, soit au contraire, une protection pendant une période prolongée. Lorsque le fongicide est utilisé pour donner une protection de courte durée, il y a lieu d'effectuer la variante 1 avec le fongicide actif en place. Si l'on recherche une protection de longue durée et/ou l'on considère qu'une contamination de surface est possible, il convient d'appliquer également la variante 2.

Pour vérifier la permanence de l'action du fongicide, il peut être nécessaire d'effectuer des essais à haute température et/ou à haute humidité relative avant d'effectuer l'essai des moisissures. Lorsqu'un tel programme est jugé nécessaire, il convient de l'indiquer dans la spécification particulière.

Bibliographie

IEC 60068-1:2013, *Essais d'environnement – Partie 1: Généralités et lignes directrices*

_____

IEC 60068-2-10

Edition 6.1 2018-04

FINAL VERSION

VERSION FINALE

colour inside

BASIC SAFETY PUBLICATION

PUBLICATION FONDAMENTALE DE SÉCURITÉ

Environmental testing –
Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

Essais d'environnement –
Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

IEC 60068-2-10:2005-06+AMD1:2018-04 CSV(en-fr)

CONTENTS

FOREWORD 3
1 Scope 5
2 Normative references 5
3 General description 5
3.1 Background 5
3.2 Selection of test procedure 6
3.3 Considerations when specifying test procedures 6
4 Health hazards to operators 7
5 Description of the test variants 7
5.1 Test variant 1 7
5.2 Test variant 2 8
6 Reagents and materials 8
6.1 Cultures or spores – Supply and conditions 8
6.2 Preparation of spore suspension 9
6.3 Control strips 10
7 Description of test apparatus 11
7.1 Inoculation by spraying 11
7.2 Incubation of small specimens 11
7.3 Incubation of large specimens 11
8 Severities 11
9 Initial examinations 12
10 Pre-conditioning 12
10.1 Cleaning 12
10.2 Damp heat storage 12
11 Conditioning 12
11.1 Application 12
11.2 Inoculation 13
11.3 Incubation 13
12 Final examinations 14
12.1 Visual examination 14
12.2 Effect of growth 14
12.3 Extent of growth 14
13 Information to be given in the relevant specification 15
14 Information to be given in the test report as a minimum 15
Annex A (informative) Danger to personnel 16
Annex B (normative) Inoculation methods (see also 11.2) 18
Annex C (informative) Recommended safety precautions 21
Annex D (informative) Decontamination procedures 23
Annex E (informative) Information on the test fungi 25
Annex F (informative) Guidance 27
Bibliography 34

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION

_____

ENVIRONMENTAL TESTING –

Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

FOREWORD

1) The International Electrotechnical Commission (IEC) is a worldwide organization for standardization comprising all national electrotechnical committees (IEC National Committees). The object of IEC is to promote international co-operation on all questions concerning standardization in the electrical and electronic fields. To this end and in addition to other activities, IEC publishes International Standards, Technical Specifications, Technical Reports, Publicly Available Specifications (PAS) and Guides (hereafter referred to as "IEC Publication(s)"). Their preparation is entrusted to technical committees; any IEC National Committee interested in the subject dealt with may participate in this preparatory work. International, governmental and non-governmental organizations liaising with the IEC also participate in this preparation. IEC collaborates closely with the International Organization for Standardization (ISO) in accordance with conditions determined by agreement between the two organizations.
2) The formal decisions or agreements of IEC on technical matters express, as nearly as possible, an international consensus of opinion on the relevant subjects since each technical committee has representation from all interested IEC National Committees.
3) IEC Publications have the form of recommendations for international use and are accepted by IEC National Committees in that sense. While all reasonable efforts are made to ensure that the technical content of IEC Publications is accurate, IEC cannot be held responsible for the way in which they are used or for any misinterpretation by any end user.
4) In order to promote international uniformity, IEC National Committees undertake to apply IEC Publications transparently to the maximum extent possible in their national and regional publications. Any divergence between any IEC Publication and the corresponding national or regional publication shall be clearly indicated in the latter.
5) IEC itself does not provide any attestation of conformity. Independent certification bodies provide conformity assessment services and, in some areas, access to IEC marks of conformity. IEC is not responsible for any services carried out by independent certification bodies.
6) All users should ensure that they have the latest edition of this publication.
7) No liability shall attach to IEC or its directors, employees, servants or agents including individual experts and members of its technical committees and IEC National Committees for any personal injury, property damage or other damage of any nature whatsoever, whether direct or indirect, or for costs (including legal fees) and expenses arising out of the publication, use of, or reliance upon, this IEC Publication or any other IEC Publications.
8) Attention is drawn to the Normative references cited in this publication. Use of the referenced publications is indispensable for the correct application of this publication.
9) Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this IEC Publication may be the subject of patent rights. IEC shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

DISCLAIMER
This Consolidated version is not an official IEC Standard and has been prepared for user convenience. Only the current versions of the standard and its amendment(s) are to be considered the official documents.

This Consolidated version of IEC 60068-2-10 bears the edition number 6.1. It consists of the sixth edition (2005-06) [documents 104/365/FDIS and 104/373/RVD] and its amendment 1 (2018-04) [documents 104/740/CDV and 104/790/RVC]. The technical content is identical to the base edition and its amendment.

This Final version does not show where the technical content is modified by amendment 1. A separate Redline version with all changes highlighted is available in this publication.

International Standard IEC 60068-2-10 has been prepared by IEC technical committee 104: Environmental conditions, classification and methods of test.

This sixth edition constitutes a technical revision.

The main changes with respect to the previous edition are listed below:

– Two test fungi replaced by two others
– Concentration of the spores defined for each test fungus
– Spores suspension in mineral salt solution additionally introduced
– Pre-conditioning of the specimens by damp heat storage prescribed
– Supersonic aerosolization of the spores suspension as the preferred inoculation method introduced
– Duration of incubation reduced from 84 days to 56 days
– Extent of mould growth grade 2 split into grade 2a and grade 2b
– Detailed information on methods of inoculation given in Annex B
– Annex E: flow-chart deleted

This publication has been drafted in accordance with the ISO/IEC Directives, Part 2.

It has the status of a basic safety publication in accordance with IEC Guide 104.

This standard forms Part 2-10 of IEC 60068 which consists of the following major parts, under the general title *Environmental testing*:

Part 1: General and guidance
Part 2: Tests
Part 3: Supporting documentation and guidance
Part 4: Information for specification writers
Part 5: Guide to drafting of test methods

The committee has decided that the contents of the base publication and its amendment will remain unchanged until the stability date indicated on the IEC web site under "http://webstore.iec.ch" in the data related to the specific publication. At this date, the publication will be

- reconfirmed,
- withdrawn,
- replaced by a revised edition, or
- amended.

IMPORTANT – The 'colour inside' logo on the cover page of this publication indicates that it contains colours which are considered to be useful for the correct understanding of its contents. Users should therefore print this document using a colour printer.

ENVIRONMENTAL TESTING –

Part 2-10: Tests – Test J and guidance: Mould growth

1 Scope

This part of IEC 60068 provides a test method for determining the extent to which electrotechnical products support mould growth and how any mould growth may affect the performance and other relevant properties of the product.

Since mould growth conditions include high relative humidity, the test is applicable to electrotechnical products intended for transportation, storage and use under humid conditions over a period of some days at least.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/IEC 17025:1999, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*

ISO 846:1997, *Plastics – Evaluation of the action of microorganisms*

MIL–STD–810 F:2000, *Method 508.5 Fungus*

Laboratory Biosafety Manual 2nd Ed., WHO 1993, ISBN 92 4 1544503

3 General description

3.1 Background

Under certain climatic and environmental conditions, micro-organisms may settle on and colonize the surface of electrotechnical equipment. Their presence or their metabolic products may not only damage the equipment itself, but may also affect the equipment's operability and serviceability. The actions of micro-organisms on equipment are influenced by two different processes: direct action in which the deterioration of material serve as a nutritive substance for the growth of the micro-organisms and indirect action in which the metabolic products of the micro-organisms generate deterioration.

The preferred method for controlling the effects of micro-organisms is by the selection of materials that do not promote growth. Also acceptable is the treatment, or hermetic sealing, of potentially vulnerable materials and components. Additionally, equipment may not need to be evaluated if it is stored and/or operated throughout its entire life, in conditions unlikely to encourage the growth of micro-organisms. Only if these cannot be achieved is it usually necessary to demonstrate the resistance of complete or partial equipment by testing.

The test procedures and severities of this document are most commonly used to evaluate the resistance of complete or partial equipment, to the damaging effects due to the presence of micro-organisms and their metabolic products. Testing of entire equipment is usually

necessary if it is critical that performance be demonstrated after exposure to adverse temperature/humidity conditions that would support the growth of micro-organisms.

An alternative approach which is sometimes used is to consider only the individual materials of which an equipment is composed. This alternative approach may be particularly relevant when the primary concern is with deterioration of structural materials of the equipment rather than its operability and serviceability. In such cases, individual materials may need to be evaluated, only if previous evidence exists as to its resistance to the effects of growth of micro-organisms. The testing procedures in ISO 846 are essentially the equivalent of those set out in this document but applied to specimens comprising samples of material.

Some materials can, when buried in natural soil that has a water holding capacity, exhibit significant degradation in structural characteristics. The evaluation of such conditions are not included in this document. However, should the evaluation of material be required, Method D (soil-burial test) in ISO 846 is suggested. Similarly, if it is necessary to evaluate a material's resistance to biological growth, Method C (resistance to bacteria) in ISO 846 is suggested.

3.2 Selection of test procedure

The test procedures of this document involves exposing electrotechnical products to the action of a selection of test strains of mould spores for a period of incubation under conditions which promote spore germination and the growth of mould. At the end of the exposure, the specimens are assessed for deterioration by visual examination and, if applicable, for any change in mass or other physical properties.

This document contains two basic test procedures Variant 1 and Variant 2:

a) In Variant 1, specimens are inoculated with a mixed suspension of mould spores in the presence of an incomplete nutritive medium (without a carbon source). The mould can only grow at the expense of the specimen. If the specimens contain no nutritive component, the fungi cannot develop mycelia and there is no deterioration of the material.
b) In Variant 2, specimens are inoculated with a mixed suspension of mould spores in a (complete) nutritive solution, i.e. with a carbon source. Even if the specimen does not contain any nutritive elements, the mould can grow over the specimen and their metabolic products can attack the material. Any inhibition of the growth on the specimen shows fungal activity of the material or the presence of a fungicidal treatment.

3.3 Considerations when specifying test procedures

Surface contamination in the form of dusts, liquids, condensed volatile nutrients or grease may be deposited upon assembled specimens. This can be brought about by storage and use or transport with the product exposed to the atmosphere or handled without protective covering. This surface contamination can cause an increased colonization by fungi and may lead to greater growth and damage. An assessment of the effect of such contamination can be given by the application of test variant 2.

Due to the difficulty of maintaining the necessary conditions in a very large chamber, large equipment may be tested as a number of sub–units. This will in any case minimize the cost of the test since several sub-units may be so similar in construction that only one of them needs to be tested.

Due to the difficulty of maintaining the necessary conditions in a very large chamber, large equipment may be tested as a number of sub–units. This will in any case minimize the cost of the test since several sub-units may be so similar in construction that only one of them needs to be tested.

The incubation period for determining degradation resistance of equipment is a pragmatic duration which is normally sufficient for the degradation actions of micro-organisms to become apparent. It is not necessarily related to, nor is it intended to replicate, the exposure duration

of equipment to adverse temperature/humidity conditions that would support the growth of micro-organisms.

Regardless of the test variant used, specimens are inoculated with a suspension of mould spores typically by spraying. The preferred approach is by means of a supersonic aerosol apparatus, such as that used for therapeutic treatment by inhalation. Such an approach allows a homogeneous distribution of the spores to be achieved on the surfaces of the specimen and consequently results in a high reproducibility of the test results. However, if spraying is not suitable due to the size, design or other properties of the specimen, inoculation with spore suspension by dipping or painting may be carried out, as stated in the relevant specification.

This document contains guidance on the post-test visual inspection of specimens as well as an approach for grading the extent of mould growth. If the purpose of the test is to establish degradation of the operability of electrotechnical equipment, additional electrical and/or mechanical checks will need to be specified by the relevant specification. In such cases, it may be essential that the incubation conditions of temperature and relative humidity surrounding the specimen are maintained throughout such electrical and/or mechanical checks. Additionally, controlled recovery conditions may be needed in order to prevent moisture being absorbed or lost by the specimen before undertaking any required post-test examinations. IEC 60068-1:2013, 4.4.2 indicates an approach that may be used if the specimen needs to be subjected to controlled recovery conditions.

4 Health hazards to operators

This test procedure requires the use of viable mould spores and the application of ambient conditions which promote mould growth.

Therefore before any attempt is made to handle mould cultures, or to carry out steps of the test subsequently described, it is important that the annexes of this standard be studied.

Annex A Danger to personnel

Annex B Inoculation methods

Annex C Recommended safety precautions

Annex D Decontamination procedures

Laboratory Biosafety Manual, 2nd Ed., World Health Organization 1993, ISBN 92 4 1544503 includes general background reading on safety in facilities dealing with fungi.

5 Description of the test variants

5.1 Test variant 1

After a 28 days incubation period determine

- the extent of mould growth by visual inspection;
- the physical damage caused by mould growth;
- in the case of mould growth the effect on functioning and/or electrical properties if required in the relevant specification.

The incubation period shall be extended to a total of 56 days before checking the function and/or measuring electrical properties if required in the relevant specification.

5.2 Test variant 2

After a simulated contamination with nutrients followed by a 28 days incubation period determine

- the extent of mould growth by visual inspection;
- the physical damage caused by mould growth;
- the effect of the mould growth on functioning and/or electrical properties if required in the relevant specification.

The surface resistance of the specimen will be reduced by application of nutrients for simulation of contamination without any mould growth. This effect should be considered if checking the function and/or measuring electrical properties.

Due to the application of nutrients, mould growth will exist; failing this, a fungicidal effect shall be considered.

6 Reagents and materials

6.1 Cultures or spores – Supply and conditions

The following fungi shall be used for performing the test (see Table 1). The nature of the attack to be expected from each fungus is indicated for guidance. The spores of all cultures, however, shall be used together in a mixed suspension whatever the nature of the specimen.

The cultures or freeze-dried spores shall be obtained from a recognized mycological cultures collection. They shall be supplied in containers with the date of inoculation of the culture thereon.

A certificate shall confirm the accordance of the culture with the fungus and strain number as specified in Table 1 and/or Annex E.

Cultures and freeze-dried spores shall be handled and stored in accordance with the recommendations of the supplier and the relevant requirements of this standard. Preparing a culture by the test laboratory from a stock culture or from freeze-dried spores the date of inoculation shall be marked on the culture tube.

Table 1 – Test fungi

No.	Name	Strain No. [3)]	Attacks	Note
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	many materials	[1) 2)]
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	plastic materials	[1) 2)]
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	cellulose	[1) 2)]
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	hydrocarbon based lubricants	–
5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	plastics and leather	[1) 2)]
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	many materials especially textiles	[1) 2)]
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	rubber	[1) 2)]
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	cellulose, textiles and plastics	[2)]

[1)] Also specified in ISO 846.
[2)] Also specified in MIL–STD–810 F, Table 508.5–I.
[3)] See also Annex E.

Cultures shall be used for preparing the test spore suspension when they are well sporulated.

This is reached in most cases after a 7 to 14 days incubation period at (29 ± 1) °C.

NOTE The supplier of cultures or freeze-dried spores may recommend other conditions to develop the culture.

If the cultures are not for immediate use, they shall be stored in a refrigerator at a temperature between 5 °C and 10 °C, for a continuous period of not more than six weeks commencing not earlier than 14 days and not later than 28 days from the date of inoculation given on the container.

The lid of the container shall not be opened once the preparation of the spore suspension has started. Only one suspension shall be made from the opened container.

6.2 Preparation of spore suspension

6.2.1 General

The suspension is first prepared in sterilized distilled water, to which has been added a wetting agent with a concentration between 0,005 % and 0,01 %. An agent based on N-methyl-taurine or on dioctyl-sodium sulphosuccinate has been found to be suitable. The wetting agent shall not contain substances which support or inhibit mould growth.

10 ml of the water containing the wetting agent shall be added gently to each culture. A platinum or nichrome wire shall be sterilized by heating to red heat in a flame and allowed to cool. This wire shall be used to gently scrape the surface of the culture to liberate spores.

The liquid shall be slightly agitated to disperse the spores without detaching mycelial fragments and the suspension shall be gently decanted and filtered through a thin layer of sterile glass wool or through a micro filter funnel with a pore size from 40 µm to 100 µm into a sterilized centrifuge tube.

The filtered spore suspension shall be centrifuged and the supernatant liquid shall be discarded. The residue shall be re-suspended in not less than 10 ml of sterilized distilled water and centrifuged again. The spores shall be washed in this manner three times.

6.2.2 Preparation for test variant 1

Dilute the final spore residue of each culture in a volume of

- mineral salt solution in accordance with 6.3 but without sucrose (saccharose) if the relevant specification prescribes visual inspection only (see 5.1);
- sterilized distilled water if the relevant specification prescribes checking the function or measuring electrical properties (see 5.1);

that adjusting the spore concentration to 1×10^6 to 2×10^6/ml determined with a counting chamber or by turbimetry.

Blend equal volumes of the single suspensions sufficient for the relevant inoculation procedure to obtain the final mixed spore suspension ready for inoculation. Spore suspension in mineral salt solution shall be used within 48 h after preparation. Spore suspension in sterilized distilled water shall be used within 6 h after preparation.

NOTE Prepare total volumes of about 100 ml for inoculation by spraying or of about 500 ml for inoculation by painting or dipping.

6.2.3 Preparation for test variant 2

Dilute the final spore residue of each culture in such a volume of nutritive solution in accordance with 6.3 adjusting the spore concentration to 1×10^6 to 2×10^6/ml determined with a counting chamber or by turbimetry.

Blend equal volumes of the single suspensions sufficient for the relevant inoculation procedure to obtain the final mixed spore suspension ready for inoculation. Use the spore suspension within 6 h after preparation.

NOTE See 6.2.2.

6.3 Control strips

The control strips called for in the test shall consist of strips of pure white filter paper or untreated cotton textile.

The nutritive solution called for in preparing the control strips shall consist of a solution of the following reagents in distilled water.

Reagent	g/l
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0,7
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0,3
Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,5
Sodium nitrate ($NaNO_3$)	2,0
Potassium chloride (KCl)	0,5
Ferrous sulphate ($FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,01
Sucrose (saccharose)	30,0

The pH shall be 6,0 to 6,5 at 20 °C. It shall be adjusted with 0,01 molar NaOH if needed. The solution shall be sterilized in an autoclave at (120 ± 1) °C for 20 min.

Immediately before inoculated (see 11.2), the control strips shall be saturated by the nutritive solution, removed from it and allowed to drain free of drips.

7 Description of test apparatus

7.1 Inoculation by spraying

Preferably a supersonic aerosol apparatus, as used for therapeutic treatment by inhalation, should be used in connection with a safety inoculation chamber (see Annex B).

7.2 Incubation of small specimens

Containers of glass or plastic with lids provided with devices for putting on or suspending the specimens and control strips shall be used.

The container shall be of such size and shape as to expose a sufficient surface area of free water in the base at all times in order to maintain a value of relative humidity greater than 90 % within it.

The devices for putting on or suspending shall be such as to ensure that specimens and control strips are not allowed to touch or to be splashed by the water.

The containers shall be placed in a chamber maintaining a uniform temperature throughout the working space within the range of 28 °C to 30 °C for incubating the specimens and control strips. Any periodic cycling of temperature due to action of the thermostat shall not exceed 1 °C/h.

7.3 Incubation of large specimens

A suitable humidity chamber shall be used for incubation specimens too large for the containers specified in 7.2. The humidity chamber shall have a well sealed door to prevent exchange of atmosphere between its interior and the laboratory.

The relative humidity within the working space shall be maintained at a value greater than 90 %. No condensed water from the walls or roof of the chamber shall be allowed to fall on the specimens and control strips. The temperature throughout the working space shall be maintained uniformly within the range of 28 °C to 30 °C. Any periodic cycling of the temperature due to action of the thermostat shall not exceed 1 °C/h.

In order to achieve the specified humidity and temperature uniformly throughout the working space it may be necessary to use forced air circulation within it. The flow rate shall not exceed 1 m/s over the surface of the specimen(s).

8 Severities

The severity for each test variant is determined by the duration of the incubation.

Test variant 1 – severity 1 28 days
– severity 2 56 days

as required in the relevant specification.

Test variant 2 – severity 28 days

9 Initial examinations

The specimens shall be visually inspected and shall be electrically and mechanically checked as required by the relevant specification.

10 Pre-conditioning

10.1 Cleaning

The specimens shall be used for the test in the “as received” condition. Normally, they shall not be submitted to any special cleaning.

If prescribed by the relevant specification half of the lot of specimens shall be cleaned by washing with ethanol or demineralized water containing a detergent followed by rinsing with demineralized water free of detergent and the other half shall remain in the “as received” condition. By this means any mould growth caused by the use of unsuitable materials in construction of the product can be distinguished from that due to surface contamination.

When the grade 0 is required in the relevant specification (Test variant 1), consideration should be given to the need to clean specimens because presence of contamination may promote mould growth.

NOTE Grade 0, see 12.3.

10.2 Damp heat storage

The specimen(s) shall be stored under the conditions of incubation at (29 ± 1) °C and a relative humidity > 90 % and < 100 % not less than 4 h immediately before inoculation.

11 Conditioning

11.1 Application

For the test variant stated in the relevant specification the application shall be carried out according to the method described below.

11.1.1 Test variant 1

If the relevant specification requires checks of functioning and/or measurement of electrical properties two groups of specimens shall be involved:

Group 1 test specimen(s) inoculated with the spore suspension and incubated;

Group 2 negative control specimen(s) sprayed or painted with or dipped in sterilized distilled water in accordance with the inoculation method used for group 1 and stored at the same temperature and relative humidity as prescribed for incubation but in a sterile environment.

If the relevant specification requires no checks of functioning and/or measurement of electrical properties the group 1 shall be used only.

11.1.2 Test variant 2

Two groups of specimens shall be involved:

Group 1 test specimens inoculated with spores suspended in the nutritive solution and incubated;

Group 2 in accordance with test variant 1, group 2.

NOTE Negative control specimen(s) should be exposed to the specified conditions in a separate chamber to that in which the inoculated specimens are held. To ensure that no mould grows on the negative control specimens, the chamber should be sterilized by one of the methods given in D.1.1. The test is valid unless both the test specimen(s) and a negative control specimen support growth.

11.2 Inoculation

The inoculation of the test specimen(s) and control strips (see 6.3) with the spore suspension (see 6.2) shall be carried out by spraying if not otherwise prescribed in the relevant specification.

If spraying is not suitable due to the size, design or other properties of the specimen inoculation with spore suspension by dipping or painting may be carried out as stated in the relevant specification.

NOTE Spraying by aerosolization of the spore suspension with a supersonic aerosol apparatus as used for therapeutic treatment by inhalation in connection with a safety inoculation chamber (see Annex B) allows a very homogeneous distribution of the spores on the surface to be tested giving a high reproducibility of the test results. That should be the preferred inoculation method.

11.3 Incubation

The conditions of incubation are (29 ± 1) °C and a relative humidity of >90 % and <100 %. The conditions shall be maintained in the containers (see 7.2) for small specimens or in the humidity incubation chamber (see 7.3) for large specimens.

Immediately after inoculation, the small specimens and at least 3 control strips shall be arranged in the container in a well spaced layout and without restriction of setting the required relative humidity. After that the container shall be placed in the incubation chamber.

Where applicable, negative control specimens shall be arranged in similar but sterilized containers as for the inoculated specimens without control strips. The containers shall then be placed in the incubation chamber.

In the case of large specimens a suitable number of control strips shall be placed in the chamber with the specimens. Any negative control specimens shall be exposed in a separate freshly disinfected chamber (see Annex D) used preferably for negative control specimens only.

The containers or the humidity chamber shall be opened only to

- inspect the control strips ascertaining the viability of the spores and the maintenance of the conditions of incubation after 7 days;
- supply the containers with oxygen from the air once every 7 days until the completion of the prescribed duration of incubation;
- perform visual intermediate inspection(s) in accordance with 11.3.7.

The opening shall be for a few minutes only.

After the 7 days incubation, mould growth of more than one strain shall be visible to the naked eye on each of the control strips. Otherwise the test shall be considered void and shall be recommenced. In this case, the same specimens may be used.

Any interruption of the incubation is permitted for a visual inspection only and for not more than 10 min in each case and if required in the relevant specification. Not more than two visual inspections shall be prescribed to perform within the duration of the incubation. The time(s) of the visual inspection shall be specified in the relevant specification.

12 Final examinations

12.1 Visual examination

The specimens shall be examined (see 12.3), checked and/or photographed (as required by the relevant specification), immediately after they are removed from the container or humidity chamber, because the growth can change its appearance by desiccation. See Annex C, for recommended safety methods of handling.

Following a visual examination and assessment of the actual growth, the mycelium shall be carefully removed with ethanol 70 % vol from the surface which shall then be examined through a microscope to assess the nature and extent of any attack (e. g. etching) on the specimen. See Annex C for recommended safety methods when removing the mould growth.

12.2 Effect of growth

When the relevant specification calls for electrical and/or mechanical checks while damp (following incubation), it is essential that the relative humidity of the surroundings of the specimen(s) shall not be allowed to fall unduly until after such checks have been made. The checks shall therefore be carried out on small specimens while still exposed in the container with the lid fitted and free water. For large specimens checks shall be made while they are still in the humidity chamber.

NOTE When electrical connections have to be made or work has to be done on specimens in containers or humidity chambers with the lids or doors necessarily opened, this operation should be carried out with regard to the safety of operators. See Annex C for recommended safety methods of handling. Requirements of the manufacturer for operation under damp heat conditions given in the operation manual will be observed.

Similar checks shall be made on the specimens inoculated with spore suspensions and those inoculated with water only. Any significant difference between the two groups is considered to be additional due to the presence of mould growth as well as the high humidity.

Following the checks, the specimens shall be removed and visually examined as prescribed in 12.1.1 and finally any attack on the specimen shall be determined as in 12.1.2.

If the relevant specification prescribes checks after recovery, the specimens shall be removed from the container or chamber then visually examined as specified in 12.1.1 and then exposed to the specified conditions for recovery for a period of 24 h at the conclusion of which the checks shall be made.

12.3 Extent of growth

The specimens shall be inspected first by the naked eye and then if necessary with a stereoscopic microscope with a nominal magnification of approximately 50 x.

The extent of growth shall be assessed and expressed according to the following grade:

Grade

0 No growth apparent under a nominal magnification of 50 x

1 Traces of growth plainly visible under the microscope

2a Sparse growth visible to the naked eye and/or under the microscope scattered only or localized to a few places covering all together not more than 5 % of the test surface

2b Growth plainly visible to the naked eye and/or under the microscope distributed more or less homogeneously on many places covering all together not more than 25 % of

the test surface

3 Growth plainly visible to the naked eye and covering more than 25 % of the test surface

NOTE Where specimens comprising an assembly show varying grades of growth they should be assessed separately. For test variant 2 grade 0 should be required only if it is specified to examine for a fungistatic effect.

13 Information to be given in the relevant specification

When this test is included in the relevant specification, the following details shall be given

		Clause or subclause
a)	Test variant 1 or 2	5, 11.1
b)	Test variant 1 duration of incubation (severity)	5, 8
c)	Initial electrical and mechanical measurements and functional checks (only if performance deterioration is to be determined)	5, 9, 11.1
d)	Preconditioning by cleaning	10.1
e)	Inoculation method (if not by spraying)	11.2
f)	Interruption of incubation for visual intermediate inspection	11.3.7
g)	Final examinations	12
h)	Extent of growth (grade) to be approved (if needed)	12.3

14 Information to be given in the test report as a minimum

a) Test laboratory (name, address and accreditation)
b) Customer (name and address)
c) Description of the specimen(s)
d) Test standard, edition and test variant
e) Severity for test variant 1
f) Test fungi (if deviating from the test standard)
g) Initial, intermediate and final examinations (detailed)
h) Cleaning of the specimen(s) (if applied)
i) Method of inoculation
j) Conditions of incubation (if deviating from the test standard)
k) Mould growth on the control strips (after 7 days incubation)
l) Test results (specific observations inclusive)
m) Test criterion (permissible grade of mould growth if prescribed)
n) Evaluation of the performance (basing on the test criterion)

Annex A
(informative)

Danger to personnel

A.1 General

It is the opinion of mycologists and pathologists that conducting the mould growth test can constitute a health hazard, unless special precautions are taken.

The precautions detailed in Annexes A, B, C and D are based upon established microbiological techniques and specialized equipment. Persons carrying out the test shall be trained in microbiological laboratory work.

A microbiological laboratory shall be provided for mould growth testing.

The use of a microbiological safety cabinet (MSC) is recommended for carrying out certain parts of the procedure.

Airborne mould spores continually enter the human body through the nose and mouth but they do not normally present a hazard to health. Certain susceptible individuals may, however, be affected by the repeated inhalation of some spores, including those of the moulds used in this test and attention is drawn to the precautions to be adopted when carrying out the test. These are outlined in Annex C. Growth of foreign fungi and other micro-organisms can develop as an unintentional intruder during the incubation period at incubation locations and/or specimens. Some of these fungi or other micro-organisms may be injurious to the human system.

Persons intended to be involved in this test should be advised to notify the medical officer, or their own doctor, that they are required to undertake the work. Medical opinion for or against participation should be followed.

Persons carrying out the test should be informed of the potential hazards to which they will be exposed in relation to their current state of health.

National safety regulations shall be followed.

A.2 Notes for the guidance of medical officers

The test involves a hazard from the inhalation or traumatic implantation of spores.

The safety precautions to be adapted are given in Annex C and are designed to minimize this hazard.

Specific hazards exist for susceptible persons, e. g. those who are

- atopic patients who are normally allergic to pollen, house dust, animal dander, etc. and suffer from rhinitis, asthma or other allergic symptoms. The hazard here is in the development of Type I allergy to mould spores, but in certain circumstances Type III reactions may develop (Farmer's Lung type);
- patients who have chronic lung damage e.g. bronchiectasis, chronic bronchitis, sarcoidosis, emphysema, etc. The deposition and germination of spores in lung cavities may lead to the growth of the fungus as a fungus ball or aspergilloma, mainly associated with *Aspergillus spec.* Healed tubercular lesions constitute a possible site for fungal growth;

– patients who are currently undergoing broad–spectrum antibiotic treatment, being given immuno-suppressive drugs including corticosteroids or taking other prescribed chemo therapeutic preparations. Elimination of the normal bacterial flora of the respiratory and alimentary tracts sometimes enables fungi to develop extensively, whilst immuno-suppression may render the individual more susceptible to fungal infection.

Although the hazards involved in carrying out the test in accordance with the specified procedures are regarded as low, it is recommended that persons in these categories should not be involved in the test.

Annex B
(normative)

Inoculation methods
(see also 11.2)

B.1 General

Annex C "recommended safety precautions" shall be studied prior to commencing inoculation. Spraying on the spore suspension to the specimens and control strips is a generally suitable method.

B.2 Spraying by the aerosol inoculation method (AIM)

B.2.1 General

Using a spray gun for inoculation, the distribution of the spores on the surface of the specimen is much more inhomogeneous than using the AIM.

The reproducibility and explainability of the test results are evidently better using the AIM, due to a very homogeneous distribution of the spores on the specimen surface(s).

The AIM is favourably applicable to specimens with a barely surface wetted by the spore suspension also.

Suitable dimensions of the safety inoculation box may be 500 mm x 500 mm x 500 mm. The material of the box should be polymethylmetacrylate.

B.2.2 Description of the method

Aerosol inoculation method (AIM), see Figure B.1.

The spore suspension will be aerosolized by a supersonic aerosol apparatus as used for therapeutic treatments by inhalation of aerosolized medicaments (1) .

An exactly measured quantity of spore suspension can be introduced into the atomizer vessel of the supersonic aerosol apparatus by a graduated syringe (2) .

The aerosol containing the spores is led through a tube (3) into the inoculation box by a slight air flow produced by the supersonic aerosol apparatus.

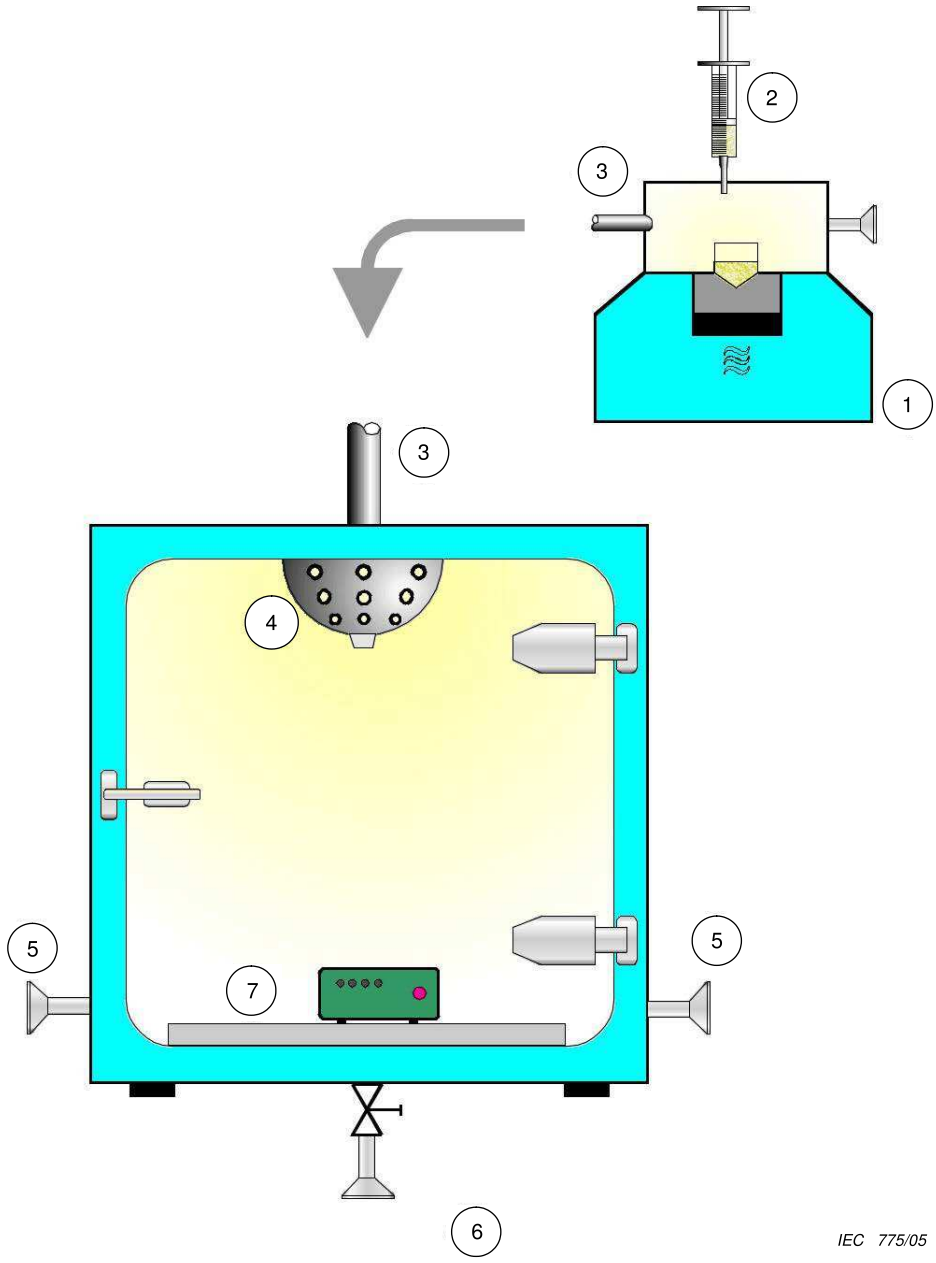
The aerosol is distributed in the box by a funnel with holes (4) mounted in the shelter of the box.

The specimen is placed under the funnel on the bottom of the box with the main test areas in the direction to the aerosol settling.

The pressure within the box is compensated through two vent holes fitted with microbiological filters (5) situated on opposite sides of the chamber.

After the aerosolization and the aerosol settling are finished the box shall be ventilated by the air flow from the supersonic aerosol apparatus through the tube in the bottom of the box (6) fitted with a valve and a microbiological filter at the end.

Before the door of the box which is sealed under operation is opened the air flow from the supersonic aerosol apparatus shall be stopped.



Key

1 Supersonic aerosol apparatus
2 Graduated syringe
3 Tube
4 Funnel with holes
5 Filters
6 Bottom of the box
7 Specimen

Figure B.1 – Aerosol inoculation method (AIM)

B.2.3 Decontamination and cleaning

After removal of the specimen (7) , the door of the box shall be immediately shut and the whole system shall be decontaminated by aerosolization of a disinfectant, e.g. per-acetic acid solution.

For similar spore suspensions, more than one inoculation operation may be performed one after another onthe same day without decontamination between them.

If the spores were suspended in mineral salt solution (Test variant 1, see 6.2.2) or in mineral salt nutrient solution (Test variant 2, see 6.2.3) the atomizer vessel, the tube between the supersonic aerosol apparatus and the inoculation box, the distributing funnel and the internal surfaces of the box shall be cleaned by distilled water after decontamination.

B.2.4 Calibrating of the AIM system

The amount of spore suspension settled on a defined surface range depending on the adjusted performance of the supersonic apparatus and other factors can be assessed by weighing Petri dishes made from polystyrene with an analytical balance before and after exposure at the bottom of the inoculation box during aerosolizing. Instead of the spore suspension, mineral salt solution (see 6.3.2) shall be aerosolized .

NOTE A recommended amount of deposited aerosol is (100 ± 20) mg/dm².

B.3 Inoculation of small specimens by dipping

For small specimens, dipping them into the spore suspension may be found to be a quick and effective inoculation method provided that the spores can adhere to the surface.

B.4 Inoculation of large specimens by spraying or painting

Where possible, large specimens should be broken down into sub-units in accordance with 3.4.

However, if specimens are still too large to be inoculated inside the available MSC or the safety inoculation box, consideration should be given to erecting a temporary exhaust hood over the specimen. This should approximate the same airflow conditions and be fitted with the same microbiological exhaust system as specified for an MSC. Alternatively, it may be possible to place the large specimen in the humidity chamber in which incubation is to take place and then paint on the spore suspension. Although this method may not produce an aerosol, the recommended exhaust system fitted to the humidity chamber should be operating during the inoculation. During inoculation by spraying the exhaust system shall not be operated to avoid additional air movement and the door shall be closed to minimize spore release.

It is recommended to carry out inoculation within an MSC because of the possibility of aerosol formation.

In the case of AIM, the MSC is replaced by the safety inoculation box (see Figure B.1).

Annex C
(informative)

Recommended safety precautions

Precautions should be observed to minimize inhalation of mould spores and their coming in contact with the skin, particularly around the finger nails.

Inhalation of mould spores may take place when transporting or examining incubated specimens or control strips or when disturbing the air around them, for example when opening or shutting chamber doors and container lids. This risk is increased when the mould growth dries out and small detached particles can more easily become airborne. There is also a greater risk of inhalation when inoculating specimens by the spraying method, except the aerosol inoculation method (AIM) using an inoculation box (see Annex B).

Direct protection against the inhalation of mould spores may be achieved by wearing an approved and fitted respirator filter combination rated for dust in the range of 1 µm to 10 µm diameter or for biohazard or radiohazard applications. A gauze or loose fitting mask is not adequate protection. However, the preferred method is to make use of an microbiological safety cabinet (MSC).

To minimize the risk of moulds coming in contact with the skin, protective gloves may be worn whilst handling all cultures, inocula and test specimens after inoculation and incubation. Disposable gloves shall be preferred and shall be decontaminated before removed.

All operations involving the opening of mould culture containers, from the preparation of the spore suspension, the inoculation of specimens and controls if not performed within an inoculation box (AIM) and the examination and measurement of incubated specimens should be performed within MSC, taking account of the following precautions:

a) during the preparation of the spore suspension using the specified wetting agent (see 6.2.1);
b) wiping the outside of the incubating container with 70 % ethanol before removing it from the MSC to the incubation chamber;
c) wiping or washing the specimens with 70% ethanol, after completion of the test and whilst still within the MSC. This is to remove mould growth prior to final decontamination and disposal;
d) when using the aerosol inoculation method (AIM), the design of the inoculation box and its operation shall be as specified in Annex B to prevent the escape of aerosol containing spores.

When the specimen is too large for a separate container, and therefore must be incubated in a humidity chamber, spores may become airborne due to air disturbance when the chamber door is opened and closed.

An exhaust system with microbiological filters to the outside atmosphere can avoid the escaping of spores when the door is opened. When the door is closed the exhaust system shall not be operated to prevent increased air movement or negative pressure within the chamber.

The microbiological filters shall be decontaminated or replaced after finishing the incubation. Before opening the door the circulating fan should be shut off to minimize spore distribution.

Should it be necessary to use a walk-in type incubator, protective clothing shall be worn and a complete closed hood with a respirator as specified in Clause C.3 above or with a suitable piped air supply to the hood shall be worn.

All chambers and apparatus used for mould growth tests should be decontaminated immediately after use in accordance with Annex D.

Specimens and control strips may be covered with heavy mould growth by the end of the test and care should be taken in their disposal.

Control strips should be immersed in a vessel containing a solution of sodium hypochlorite (see Annex D) before finally disposing of them. Specimens should be treated initially in accordance with item c) of Clause C.5, prior to final decontamination by a method selected from those given in Annex D.

Decontamination of chambers and equipment is recommended prior to commencing the test, if there is any doubt regarding their sterility and in any case if decontamination was carried out more than 28 days previously.

Consumption of food or drink and smoking are not allowed in the test laboratory.

Protective clothing worn within the mould growth testing laboratory shall not be used outside.

Annex D
(informative)

Decontamination procedures

It is probable that containers and humidity chambers used as incubators for test of mould growth will become contaminated with both test moulds and intruder contaminant moulds. A decontamination procedure is therefore necessary. This procedure should be effective against both test organisms and intruder contaminants. It must not leave decontaminant residues likely to interfere with the growth of the test fungi. In addition, it must present a minimum risk to the user.

D.1 Recommended decontamination procedures

D.1.1 Application of chemical active solutions

Washing with or immersion in a solution of sodium hypochlorite. A solution should be prepared of sodium hypochlorite containing 500×10^{-6} to $1\ 000 \times 10^{-6}$ available chlorine in water.

Contaminated incubation spaces, containers or equipment should be wetted with or if applicable immersed in the solution, ensuring that it penetrates into all the crevices. Not less than 30 min later the item should be thoroughly rinsed in fresh water.

Climatic chambers can be decontaminated by raising the temperature to 60 °C – 70 °C for 1 h to 2 h and then by wiping clean with a sodium hypochlorite soap solution.

About 30 min later the residue of the solution should be removed by rinsing or wiping with fresh water.

Sodium hypochlorite has a strong bleaching action. Therefore the use of this disinfectant may not be suitable for some materials.

A very effective disinfectant to be applied instead of sodium hypochlorite solution is based on organic nitrogen compounds such as n–Octyl–dimethyl–benzylammonium–acetate, benzethonium-acetate or methylbenzethoniumacetate.

Only disinfectants tested on fungicidal effectiveness and toxicological safety by an authorized laboratory shall be used.

D.1.2 Autoclaving

This method is suitable for smaller items able to withstand the high temperature as well as for cultures. The autoclave should be set to a pressure of 10 kPa (1 bar) giving 121 °C for a period of 20 min.

D.1.3 Wiping or spraying with ethanol 70 % vol

All surfaces which could have been in contact with spores or spore suspension minute droplets, shall be thoroughly wetted in ethanol 70 % vol. The duration of the affecting shall be not less than 15 min.

D.1.4 Application of volatile disinfectants

The use of volatile disinfectants such as formaldehyde should be avoided. Formaldehyde vapour is an effective disinfectant, but the removal of its residue is rarely if ever complete and gives rise to further formaldehyde vapour in enclosed spaces, thus inhibiting the growth of test moulds.

Furthermore formaldehyde is a toxic substance.

Other volatile germicides are available but may present explosive and/or toxic problems affecting safety, especially where large chambers are involved. In many cases the aerosolization of 0,5 % vol Per-acetic acid solution within the contaminated space may be a suitable method of decontamination.

D.2 Disposal

Prior to the disposal of contaminated materials, surplus cultures, spore suspensions etc., they should be decontaminated by method D.1.1 or D.1.2.

NOTE Overgrown nutrient media (cultures) should be preferably decontaminated by autoclaving. Spilt spore suspension and glass from a broken tube and other lost infected waste material should be disinfected by covering with cellulose saturated with sodium hypochlorite solution or another disinfectant given in D.1.1 for several hours before disposing.

Annex E
(informative)

Information on the test fungi

E.1 List of identical strains

No.	Name	Strain No.	Identical strains [1)]
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	CBS 131.52 CMI 45551 DSM 1957 NBRC 6341 NRRL 334 QM 324 QM 458 IAM 3001
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	CBS 377.64 CMI 45543 DSM 1958 NBRC 6346 NRRL 571 QM 82 j IAM 3004
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	CBS 148.51 CMI 45550 DSM 1962 NRRL 1870 QM 459 NBRC 6347 IAM 8059
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	NRRL 2778 NBRC 100535
5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	CBS 284.48 CMI 40025 DSM 1961 NRRL 1115 QM 6764 IAM 5001 NBRC 33284 IAM 13426
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	CBS 631.66 CMI 114933 DSM 1944 IAM 7013 NBRC 33285 JCM 5594
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	CMI 49528 DSM 9122 QM 9985 NBRC 100536
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	DSM 1963 IAM 5061 NBRC 6355

[1)] Other identical strains may be used.

E.2 Recommended nutritive media for maintaining the cultures

All the Agar media shall be sterilized in an autoclave at (120 ± 1) °C for 15 min.

No.	Test fungus	Nutritive medium	
1	*Aspergillus niger*	Malt extract for microbiology	25 g/l distilled water
2	*Aspergillus terreus*	with an addition of	15 g to 20 g/l Agar
4	*Hormoconis resinae*		
5	*Paecilomyces variotii*		
6	*Penicillium funiculosum*		
3	*Chaetomium globosum*	Mineral salt-glucose-Agar in acc. with the solution given in 6.3.2 *)	
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	with an addition of	15 g to 20 g/l Agar
8	*Trichoderma virens*		
*) *Chaetomium globosum* with a sterile strip of filter paper overlaid on the surface.			

A plate of the nutritive medium inoculated with spores from the test fungus culture and incubated after it can be used to verify the viability within a period of 7 days. However it cannot be used to ascertain whether or not the temperature and relative humidity conditions in the incubation chamber can sufficiently support the mould growth as can be performed by control strips (see 6.3).

Annex F
(informative)

Guidance

F.1 Mechanisms of infection

Fungi grow in soil and in, or on, many types of common material. They propagate by producing spores which become detached from the main growth and later germinate to produce further growth.

These spores are very small (1 µm to 10 µm) and readily carried in moving air. They also adhere to dust particles and enter with them into equipment.

Thus all parts of equipment into which air penetrates may be infected with spores. The infection can also occur due to handling, for example spores can be carried over by finger-prints.

Another cense of infection is the penetrating of mites carrying spores on their bodies. Mites are capable of entering into very small gaps down to 25 µm. The dead bodies and excreta of the mites collect and may provide a film of nutrient and moisture which may favour the propagation of mould from the spores.

F.2 Germination and growth

Moisture is essential to allow the spores to germinate and where a layer of dust or other hydrophilic material is present on the surface, sufficient moisture may be abstracted by it from the atmosphere.

When the relative humidity is below 65 % no germination or growth will occur. The higher the relative humidity above this value, the more rapid the growth will be. Spores can however survive prolonged periods of very low humidity and even though the main growth has died. They will germinate and start a new growth as soon as the relative humidity becomes favourable again.

In addition to high humidity in the atmosphere the spores require that there shall be on the surface of the product a layer of material which absorbs moisture. Providing this damp layer is present, most organic materials will supply sufficient nutrient to support at least some growth. Organic dust itself contains sufficient nutrient for mould growth. Mould growth is encouraged by stagnant air spaces and lack of ventilation.

The optimum temperature of germination for the majority of fungi likely to give trouble in equipment lies between 20 °C and 30 °C. Rare types can however germinate below 0 °C and some as high as 40 °C.

Many spores are not damaged by prolonged exposure to subzero temperatures, nor by exposure to high temperatures up to 80 °C.

F.3 Effects of growth

F.3.1 Primary effects

Moulds can live on most organic materials, but some of these materials are much more susceptible to attack than others. Growth normally occurs only on surfaces exposed to the air and those which absorb or adsorb moisture will generally be more susceptible to attack.

Even where only a slightly harmful attack on a material occurs, the formation of an electrically conducting path across the surface due to a layer of wet mycelium can drastically lower the insulation resistance between electrical conductors.

When the wet mycelium grows in a position where it is within the electromagnetic field of a critically adjusted electronic circuit, it can cause a serious variation in the frequency-impedance characteristics of the circuit.

Among the materials highly susceptible to attack are leather, wood, cotton textiles, cellulose, silk and other natural materials. Most plastics materials are less susceptible but are also attacked.

Plastics materials may contain non-polymerized monomers, oligomers and/or additives which may exude to the surface and be a nutrient for fungi and a copious growth may occur.

Mould attack on materials results in a decrease of mechanical strength and/or changes in other physical properties.

The properties of some plastic materials depend on the presence of a plasticizer for a satisfactory life-span. If the plasticizer is digested by fungi the material will become brittle.

F.3.2 Secondary effects

Mould growth yields acid of metabolism products and other substances which will cause a secondary attack on the material.

This attack can lead to electrolytic or ageing effects, and even glass can lose its transparency due to this process. Oxidation or decomposition may be facilitated by the presence of enzymes secreted by the mould.

The presence of mould growth can be aesthetically disagreeable due both to poor appearance and to the aroma which frequently accompanies the mould.

F.3.3 Effects associated with equipment design

Due to the modular design and inter-connection of much equipment mould growth in one area of equipment may have quite severe effects in another sub-unit which in itself may not permit the growth of mould.

The possible effects on the performance as a whole shall therefore be assessed when considering primary or secondary effects on individual sub-units or components.

Attention is drawn to the fact that everything contributing to the identification of the material and equipment, e.g. labels, markings, etc. should be given the same level of protection as the product itself.

F.4 Prevention of mould growth

The following procedures can be used with varying degrees of success in combating the harmful effects of mould growth.

All insulating materials used should be chosen to have a resistance to mould growth as great as possible, thus maximizing the time taken for mycelium to grow and minimizing any damage to the material consequent upon such growth.

The use of lubricants, varnishes, finishes etc., is frequently necessary in order to obtain the required performance or durability of a product. Such materials should be chosen with regard to their ability to resist mould growth. Even though it can be shown that the lubricants, etc. do not support mould growth, they may collect dust which in turn will support mould growth. However, it should be noted that the use of products containing fungicides is often recommended for the protection of some materials.

Moisture traps which may be formed during the assembly of equipment and in which mould can grow should be avoided. Examples of such less obvious traps are between unsealed mating plugs and sockets or between printed circuit cards and edge connectors in particular attitudes.

Complete sealing of the equipment with a dry, clean atmosphere within is the most effective technique for preventing mould growth.

Continuous heat dissipation within an enclosure can ensure a sufficiently low relative humidity there to avoid mould growth.

Operation of equipment within a suitable controlled environment can prevent harmful growth of fungi.

Regularly replaced desiccants within a partially sealed enclosure can maintain a relative humidity, sufficiently low to prevent harmful growth of fungi.

Periodic and careful cleaning of enclosed equipment to remove any accumulated growth and dust (nutritive layer) can hold deterioration in check.

Fungicides carried for example in varnishes, included in tablets or sprayed directly can prevent mould growth for a time. See Clause F.7 .

Where the material and functioning of the equipment allows such treatment ultraviolet radiation or ozone may be used for sterilization.

Air currents of adequate velocity flowing over parts of the equipment can retard the development of mould growth there.

Acaricides can be used to control the action of mites.

The application of protective coatings such as epoxy, silicone polymers, acrylics or para-polyxylylene on printed wiring boards minimizes the wetting of the surface by any condensing water vapour and hence inhibits growth of mould if the protective coating in itself is resistant to mould growth.

F.5 Applicability of the mould growth test

Mould growth testing of equipment should be normally limited to verifying that suitable components and materials have been used, as any mould growth tests involving the complete equipment will often be prohibitively expensive or may yield results of rather doubtful value.

Most of the required information can usually be more readily and accurately obtained from tests on materials, components, sub-assemblies, small composite sections, etc. (see clause F.4).

Testing of the materials for resistance to mould growth shall be performed in accordance with special standards such as ISO 846 and shall be delegated to laboratories competent for it.

NOTE Laboratories for microbiological testing of technical products should be accreditated in accordance with ISO/IEC 17025.

Test variant 1 is intended as an overall check where a wise choice of previously tested materials has been made at the design stage and where significant contamination is not anticipated.

Where contamination is likely to occur both variant 1 and variant 2 should be used in order to assess the performance of the contaminated and non-contaminated specimen.

These tests are not a substitute for a proper choice of materials. It is impossible to devise simple tests which replace careful pre-testing of materials and expert assessment of the results.

The choice of previously tested materials is the most important single precaution to take when designing equipment to operate in a humid environment.

Where severe contamination of the insulating surfaces will not occur, such a choice is often the only precaution which needs to be taken and will prove adequate for all but the most severe conditions.

Where the equipment operates under conditions which favour mould growth for only a small proportion of the total life, or where some measure of protection is given as for example enclosing or heating continuously to reduce internal humidity, there should be no necessity to employ the mould growth test provided materials have been correctly chosen and good constructional principles have been employed.

If such principles have not been employed. Test J is not adequate to detect all possible sources of trouble.

Test J as a final overall check employs only a small selection of cultures chosen to attack those materials which are fairly resistant to mould growth.

It will indicate therefore the nature of any trouble to be encountered on well designed products.

On products with poor design and unsuitable materials these tests cannot locate all the potential faults.

F.6 Basic types of effect

F.6.1 Extent of growth and attack on the surface after 28 days of incubation

F.6.1.1 Variant 1

This is the form of test which will be most frequently used. The extent of growth checks whether resistant materials have been used. The location of growth will indicate areas in which trouble may be expected and where greatest clearances or creepage distances should have been allowed.

Attack on the surface will indicate locations where physical damage is likely to result from mould growth.

F.6.1.2 Variant 2

Even though a product is resistant, mould growth can appear as a result of the contamination of surfaces with nutrients.

In this case, secondary effects may occur, such as attack by metabolites produced by mould growth or physical penetration by fungal mycelium.

Variant 2 shall be used in order to assess the secondary effects of mould growth on the materials or on the performance of the products when the mould growth is caused by a significant surface contamination with nutrients.

Variant 2 may also be used to assess the effectiveness of a fungicide treatment of the product (see F.7.2).

Variant 2 is not a suitable method to simulate the conditions of a very intensive surface contamination, e.g. due to a large quantity of organic dust or dead insects.

In order to ascertain that normally resistant materials and good design principles have been used, specimens subjected to test variant 2 should satisfy the requirements of variant 1.

In this case the variant 1 test should be performed using separate specimens.

F.6.2 Effect on performance while still damp after 28 days incubation (variant 2) or after 28 or 56 days of incubation (variant 1)

This procedure gives an indication of the order and nature of performance variation to be expected where the products operate under conditions in which mould is growing.

The presence of humidity will itself result in variation of performance and it is essential to perform two sets of measurements, one on specimens without fungus infection and one with.

The differences between the two will be the effect of the presence of wet mycelium.

The components of the nutritive solution needed for variant 2 can themselves influence the performance of the specimen, for example by decreasing the surface resistance.

Accurate assessment of the difference can be difficult since mould growth can appear on the non-inoculated specimens (negative control specimens) also when have been infected by spores from the very start or were infected during the test.

To avoid spontaneous mould growth particular precautions are necessary.

F.6.3 Effect on performance after a recovery period of 24 h

This procedure gives an indication of the order and nature of performance variation due to the presence of mycelium which has grown during a period of high relative humidity and is desiccated under low relative humidity after that.

This procedure is intended for products to be stored in conditions where mould growth will be profuse and later to be installed and operated in an air-conditioned room.

For this also, two series of measurements are necessary to discriminate between permanent effects due to humidity exposure and those due to the presence of mycelium.

F.7 Use of fungicides

A method often used to give equipment an additional resistance to harmful mould growth is to use a suitable fungicide to inhibit or prevent the growth of fungi.

F.7.1 Limitation of use

When choosing a fungicide which will be enclosed in equipment, the following principles must be borne in mind.

The fungicide shall not give rise to a toxic atmosphere which would harm personnel during operating, servicing or testing the product. Metal organic compounds useful as a fungicide are toxins such as volatile organic mercury compounds.

The volatile components of the fungicide shall not lead to the deterioration of parts of the equipment such as electrolytic corrosion of metallic parts, lowering of insulation resistance or breakdown voltage over the surface of insulators, formation or deposition of an insulating film on the contacts of relays, switches, etc.

Where light-sensitive components such as photocells are included in the equipment the volatile products of fungicide shall not give light-absorbing layers on the windows of the component.

F.7.2 Performance of fungicidal action

The fungicide shall be stable and durable at the highest temperature likely to be experienced inside the equipment.

It shall resist leaching by repeated condensation of moisture over the internal surfaces.

It shall not be so volatile as to be completely expended before the needed duration of protection is finished.

If a long-range effect of the fungicide is needed, its vapour pressure shall be sufficient to allow an effective concentration to be maintained wherever mould growth might give rise to harmful effects.

Even when a fungicide is intended to give prolonged protection, normal evolutionary variation tends to select a mutant of the mould which is resistant to the fungicide used. It is desirable therefore when permanent protection is required, that not only the fungicide should be renewed periodically, but that it should be replaced by a fungicide of a different type.

F.7.3 Duration of protection and testing

A fungicide may be chosen to give either protection for a few months during transit through humid environments or a protection over a prolonged period. When the fungicide is used to give short-term protection during transit, variant 1 should be performed with the active fungicide in place. When long-term protection is intended and/or it is considered that surface contamination may occur, then variant 2 should be carried out also.

To check the permanence of the fungicide it may be necessary to carry out tests at high temperature and/or high relative humidity before making the mould growth test. Where such a programme is considered necessary it should be stated in the relevant specification.

Bibliography

IEC 60068-1:2013, *Environmental testing – Part 1: General and guidance*

_____

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 37
1 Domaine d'application 39
2 Références normatives 39
3 Description générale 39
3.1 Contexte 39
3.2 Choix de la procédure d'essai 40
3.3 Aspects à prendre en considération lors de la spécification des procédures d'essai 40
4 Risques auxquels est exposée la santé des investigateurs 41
5 Description des variantes d'essai 41
5.1 Variante d'essai 1 41
5.2 Variante d'essai 2 42
6 Réactifs et matériaux 42
6.1 Cultures ou spores – Fourniture et conditions 42
6.2 Préparation d'une suspension de spores 43
6.3 Bandes de contrôle 44
7 Description de l'appareillage d'essai 45
7.1 Inoculation par pulvérisation 45
7.2 Incubation des spécimens de petites dimensions 45
7.3 Incubation des spécimens de grandes dimensions 45
8 Sévérités 45
9 Examens initiaux 45
10 Préconditionnement 46
10.1 Nettoyage 46
10.2 Stockage en chaleur humide 46
11 Epreuve 46
11.1 Application 46
11.2 Inoculation 47
11.3 Incubation 47
12 Examens finaux 48
12.1 Examen visuel 48
12.2 Effet de la croissance 48
12.3 Importance de la croissance 48
13 Renseignements à fournir dans la spécification particulière 49
14 Renseignements à fournir, au minimum, dans le rapport d'essai 49
Annexe A (informative) Dangers encourus par le personnel 50
Annexe B (normative) Méthodes d'inoculation (se reporter également à 11.2) 52
Annexe C (informative) Mesures de sécurité recommandées 55
Annexe D (informative) Procédures de décontamination 57
Annexe E (informative) Informations sur les champignons d'essai 59
Annexe F (informative) Guide 61
Bibliographie 68

COMMISSION ÉLECTROTECHNIQUE INTERNATIONALE

_____

ESSAIS D'ENVIRONNEMENT –

Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

AVANT-PROPOS

1) La Commission Electrotechnique Internationale (IEC) est une organisation mondiale de normalisation composée de l'ensemble des comités électrotechniques nationaux (Comités nationaux de l'IEC). L'IEC a pour objet de favoriser la coopération internationale pour toutes les questions de normalisation dans les domaines de l'électricité et de l'électronique. A cet effet, l'IEC – entre autres activités – publie des Normes internationales, des Spécifications techniques, des Rapports techniques, des Spécifications accessibles au public (PAS) et des Guides (ci-après dénommés "Publication(s) de l'IEC"). Leur élaboration est confiée à des comités d'études, aux travaux desquels tout Comité national intéressé par le sujet traité peut participer. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'IEC, participent également aux travaux. L'IEC collabore étroitement avec l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), selon des conditions fixées par accord entre les deux organisations.
2) Les décisions ou accords officiels de l'IEC concernant les questions techniques représentent, dans la mesure du possible, un accord international sur les sujets étudiés, étant donné que les Comités nationaux de l'IEC intéressés sont représentés dans chaque comité d'études.
3) Les Publications de l'IEC se présentent sous la forme de recommandations internationales et sont agréées comme telles par les Comités nationaux de l'IEC. Tous les efforts raisonnables sont entrepris afin que l'IEC s'assure de l'exactitude du contenu technique de ses publications; l'IEC ne peut pas être tenue responsable de l'éventuelle mauvaise utilisation ou interprétation qui en est faite par un quelconque utilisateur final.
4) Dans le but d'encourager l'uniformité internationale, les Comités nationaux de l'IEC s'engagent, dans toute la mesure possible, à appliquer de façon transparente les Publications de l'IEC dans leurs publications nationales et régionales. Toutes divergences entre toutes Publications de l'IEC et toutes publications nationales ou régionales correspondantes doivent être indiquées en termes clairs dans ces dernières.
5) L'IEC elle-même ne fournit aucune attestation de conformité. Des organismes de certification indépendants fournissent des services d'évaluation de conformité et, dans certains secteurs, accèdent aux marques de conformité de l'IEC. L'IEC n'est responsable d'aucun des services effectués par les organismes de certification indépendants.
6) Tous les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils sont en possession de la dernière édition de cette publication.
7) Aucune responsabilité ne doit être imputée à l'IEC, à ses administrateurs, employés, auxiliaires ou mandataires, y compris ses experts particuliers et les membres de ses comités d'études et des Comités nationaux de l'IEC, pour tout préjudice causé en cas de dommages corporels et matériels, ou de tout autre dommage de quelque nature que ce soit, directe ou indirecte, ou pour supporter les coûts (y compris les frais de justice) et les dépenses découlant de la publication ou de l'utilisation de cette Publication de l'IEC ou de toute autre Publication de l'IEC, ou au crédit qui lui est accordé.
8) L'attention est attirée sur les références normatives citées dans cette publication. L'utilisation de publications référencées est obligatoire pour une application correcte de la présente publication.
9) L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments de la présente Publication de l'IEC peuvent faire l'objet de droits de brevet. L'IEC ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de brevets et de ne pas avoir signalé leur existence.

DÉGAGEMENT DE RESPONSABILITÉ
Cette version consolidée n'est pas une Norme IEC officielle, elle a été préparée par commodité pour l'utilisateur. Seules les versions courantes de cette norme et de son(ses) amendement(s) doivent être considérées comme les documents officiels.

Cette version consolidée de l'IEC 60068-2-10 porte le numéro d'édition 6.1. Elle comprend la sixième édition (2005-06) [documents 104/365/FDIS et 104/373/RVD] et son amendement 1 (2018-04) [documents 104/740/CDV et 104/790/RVC]. Le contenu technique est identique à celui de l'édition de base et à son amendement.

Cette version Finale ne montre pas les modifications apportées au contenu technique par l'amendement 1. Une version Redline montrant toutes les modifications est disponible dans cette publication.

Cette sixième édition constitue une révision technique.

Les principaux changements par rapport à l'édition précédente sont listés ci-dessous:

– Deux champignons d'essai remplacés par deux autres
– Concentration des spores définie pour chaque champignon d'essai
– Suspension de spores dans une solution de sels minéraux (addition)
– Préconditionnement des spécimens par stockage en chaleur humide (exigence)
– Production d'aérosols ultrasonores de la suspension de spores comme méthode d'inoculation privilégiée (addition)
– Réduction de la durée d'incubation de 84 jours à 56 jours
– Extension du grade 2 de moisissures divisé en grade 2a et 2b
– Information détaillée sur les méthodes d'inoculation à l'Annexe B
– Annexe E: suppression du diagramme

Cette publication a été rédigée selon les Directives ISO/IEC, Partie 2.

Elle a le statut d'une publication fondamentale de sécurité conformément au Guide IEC 104.

Cette norme constitue la partie 2-10 de l'IEC 60068 qui comporte les parties principales suivantes, présentées sous le titre général *Essais d'environnement*:

Partie 1 Généralités
Partie 2: Essais
Partie 3: Documentations d'accompagnement et guide
Partie 4: Renseignements destinés aux rédacteurs de spécification
Partie 5: Guide pour la rédaction des méthodes d'essais

Le comité a décidé que le contenu de la publication de base et de son amendement ne sera pas modifié avant la date de stabilité indiquée sur le site web de l'IEC sous "http://webstore.iec.ch" dans les données relatives à la publication recherchée. A cette date, la publication sera

- reconduite,
- supprimée,
- remplacée par une édition révisée, ou
- amendée.

IMPORTANT – Le logo *"colour inside"* qui se trouve sur la page de couverture de cette publication indique qu'elle contient des couleurs qui sont considérées comme utiles à une bonne compréhension de son contenu. Les utilisateurs devraient, par conséquent, imprimer cette publication en utilisant une imprimante couleur.

ESSAIS D'ENVIRONNEMENT –

Partie 2-10: Essais – Essai J et guide: Moisissures

1 Domaine d'application

La présente partie de l'IEC 60068 fournit une méthode d'essai pour déterminer l'importance des moisissures supportées par les produits électrotechniques et la manière dont une moisissure peut compromettre la performance et les autres propriétés correspondantes du produit.

Etant donné que les conditions de moisissures comprennent une humidité relative élevée, l'essai est applicable aux produits électrotechniques destinés au transport, au stockage et à l'utilisation dans des conditions humides sur une période d'au moins quelques jours.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO/IEC 17025:1999, *Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais*

ISO 846:1997, *Plastiques – Evaluation de l'action des micro-organismes*

MIL–STD–810 F:2000, *Méthode 508.5 Fungus (champignons)*

Laboratory Biosafety Manual 2nd Ed., WHO 1993, ISBN 92 4 1544503

3 Description générale

3.1 Contexte

Dans certaines conditions climatiques et environnementales, les micro-organismes peuvent se fixer et coloniser la surface des équipements électrotechniques. Leur présence ou les produits de leur métabolisme peuvent non seulement endommager l'équipement lui-même mais aussi en altérer l'aptitude à l'emploi et l'aptitude au service. Les actions des micro-organismes sur l'équipement subissent l'influence de deux processus différents: une action directe avec la détérioration du matériau qui sert de substance nutritive pour la croissance des micro-organismes et une action indirecte dans laquelle les produits du métabolisme des micro-organismes causent la détérioration.

La méthode préférentielle pour contrôler les effets des micro-organismes consiste à choisir des matériaux qui ne favorisent pas leur croissance. Une autre méthode acceptable consiste à traiter ou à sceller de manière hermétique les matériaux et les composants qui peuvent être vulnérables. De plus, il n'y a pas obligation de procéder à l'évaluation d'un équipement si celui-ci est stocké ou s'il fonctionne tout au long de sa vie dans des conditions qui ne sont pas susceptibles de favoriser la croissance des micro-organismes. Ce n'est que dans le cas où ces conditions ne peuvent pas être remplies qu'il est généralement nécessaire de démontrer la résistance de tout ou partie de l'équipement par des essais.

Les procédures d'essai et les sévérités du présent document sont le plus souvent utilisées pour évaluer la résistance de tout ou partie d'un équipement aux effets nuisibles dus à la présence de micro-organismes et des produits de leur métabolisme. L'essai d'un équipement complet est généralement nécessaire s'il est crucial de démontrer ses performances après une exposition à des conditions de température/d'humidité défavorables de nature à permettre la croissance des micro-organismes.

Une approche alternative qui est parfois utilisée consiste à prendre en compte uniquement les matériaux particuliers dont l'équipement est constitué. Cette approche alternative peut se révéler particulièrement pertinente lorsque la préoccupation principale concerne la détérioration des matériaux de la structure de l'équipement plutôt que son aptitude à l'emploi. ou son aptitude au service. Dans de tels cas, il peut s'avérer nécessaire d'évaluer les matériaux particuliers uniquement s'il existe déjà des indications concernant la résistance aux effets de la croissance des micro-organismes. Les procédures d'essai de l'ISO 846 sont pour l'essentiel équivalentes à celles stipulées dans le présent document mais appliquées à des éprouvettes constituées d'échantillons de matériaux.

Certains matériaux peuvent donner lieu à une dégradation importante des caractéristiques des structures, lorsqu'ils sont enfouis dans un sol naturel ayant une capacité de rétention d'eau. L'évaluation de telles conditions n'est pas incluse dans le présent document. Toutefois, si l'évaluation du matériau est nécessaire, il est suggéré de recourir au mode opératoire D (essai par enfouissement dans le sol) de l'ISO 846. De même, s'il est nécessaire d'évaluer la résistance d'un matériau à la croissance biologique, il est suggéré de recourir au mode opératoire C (résistance aux bactéries) de l'ISO 846.

3.2 Choix de la procédure d'essai

Les procédures d'essai du présent document consistent à exposer les produits électrotechniques à l'action d'une sélection de souches d'essai de spores de moisissures pendant une période d'incubation donnée dans des conditions favorables à la germination de spores et à la croissance de moisissures. A la fin de l'exposition, les spécimens sont évalués de la manière suivante: recherche de détérioration par examen visuel et, si cela est applicable, recherche de toute modification de masse ou d'autres propriétés physiques.

Le présent document contient deux méthodes d'essai de base désignées Variante 1 et Variante 2:

a) Dans la Variante 1, une suspension de plusieurs spores de moisissures est inoculée aux spécimens en présence d'un milieu nutritif incomplet (sans source de carbone). Les moisissures ne peuvent croître qu'au détriment du spécimen. Si les spécimens ne contiennent aucune substance nutritive, les champignons ne peuvent pas développer le mycélium et il n´y a pas de détérioration du matériau.

b) Dans la Variante 2, une suspension de plusieurs spores de moisissures est inoculée aux spécimens dans une solution nutritive (complète), c'est à dire avec une source de carbone. Même si celui-ci ne contient aucun élément nutritif, les moisissures peuvent se développer sur le spécimen et les produits de leur métabolisme peuvent attaquer le matériau. Toute inhibition de la croissance sur le spécimen met en évidence l´activité fongique du matériau ou la présence d´un traitement fongicide.

3.3 Aspects à prendre en considération lors de la spécification des procédures d'essai

Les spécimens assemblés peuvent subir une contamination de surface sous forme de dépôt de poussières, d'éclaboussures, de substances nutritives ou de graisses volatiles condensées. Cela peut être causé par l'exposition à l'air des produits lors de leur stockage, de leur utilisation ou de leur transport ou lors de leur manipulation sans couverture protectrice. Cette contamination de surface peut être responsable de la formation d'importantes colonies fongueuses qui peuvent continuer à croître et provoquer des dégâts plus importants. Une évaluation des effets d'une telle contamination peut être obtenue par l'application de la variante d'essai 2.

En raison des difficultés inhérentes au maintien des conditions requises dans une très grande étuve, un équipement de taille importante peut être soumis aux essais élément par élément. Il en résultera dans tous les cas une réduction du coût de l'essai, car plusieurs éléments peuvent avoir une construction similaire à tel point que l'essai d'un seul d'entre eux soit nécessaire.

La période d'incubation pour déterminer la résistance à la dégradation de l'équipement est une durée pragmatique qui est normalement suffisante pour que les actions de dégradation des micro-organismes deviennent apparentes. Elle n'est pas nécessairement liée à, et elle n'est pas non plus destinée à répliquer la durée d'exposition de l'équipement aux conditions de température/d'humidité défavorables qui soutiendraient la croissance des micro-organismes.

Quelle que soit la variante utilisée, la suspension de spores de moisissures est généralement inoculée aux spécimens par pulvérisation. L'approche préférentielle consiste à utiliser un appareillage à aérosol ultrasonore comme celui utilisé pour les traitements thérapeutiques par inhalation. Une telle approche permet d'obtenir une répartition homogène des spores sur les surfaces du spécimen et par conséquent assure une grande reproductibilité des résultats d'essai. Toutefois, si la pulvérisation n'est pas adaptée en raison de la taille, de la conception ou d'autres propriétés du spécimen, l'inoculation avec la suspension de spores peut être effectuée par immersion ou badigeonnage comme indiqué dans la spécification applicable.

Le présent document contient des recommandations concernant l'examen visuel après l'essai des spécimens ainsi qu'une approche pour évaluer l'étendue de la croissance des moisissures. Si l'essai est destiné à établir la dégradation de l'aptitude à l'emploi de l'équipement électrotechnique, des vérifications complémentaires électriques et/ou mécaniques devront être stipulées dans la spécification applicable. Dans de tels cas, il peut être essentiel que les conditions de température et d'humidité relative pour l'incubation autour du spécimen soient maintenues tout au long des vérifications électriques et/ou mécaniques. En outre, les conditions de reprise contrôlées peuvent être nécessaires pour empêcher que l'humidité soit absorbée ou perdue par le spécimen avant que les examens exigés après essai ne soient réalisés. L'IEC 60068-1:2013 donne, en 4.4.2, une approche qui peut être utilisée si le spécimen doit être soumis à des conditions de reprise contrôlées.

4 Risques auxquels est exposée la santé des investigateurs

Des spores de moisissures viables sont requises pour cette procédure d'essai, et les conditions ambiantes doivent favoriser la croissance de moisissures.

En conséquence, il est essentiel d'étudier les annexes contenues dans la présente norme avant de manipuler les cultures de moisissures ou d'entreprendre les phases de l'essai décrites ultérieurement.

Annexe A Dangers encourus par le personnel

Annexe B Méthodes d'inoculation

Annexe C Mesures de sécurité recommandées

Annexe D Procédures de décontamination

Le Laboratory Biosafety Manual, 2nd Ed., World Health Organization 1993, ISBN 92 4 1544503 contient des informations générales de base sur la sécurité des installations traitant des champignons.

5 Description des variantes d'essai

5.1 Variante d'essai 1

Après une période d'incubation de 28 jours déterminant

- l'importance de la croissance de moisissures par examen visuel;
- les détériorations physiques provoquées par la croissance de moisissures;
- dans le cas de croissances de moisissures, l'effet sur le fonctionnement et/ou les propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

La période d'incubation doit être portée à un total de 56 jours avant vérification de la fonction et/ou mesure des propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

5.2 Variante d'essai 2

Après une contamination simulée avec des substances nutritives suivie par une période d'incubation de 28 jours déterminant

- l'importance de la croissance de moisissures par examen visuel;
- les détériorations physiques provoquées par la croissance de moisissures;
- l'effet de croissances de moisissures sur le fonctionnement et/ou les propriétés électriques si cela est prescrit dans la spécification particulière.

La résistance superficielle du spécimen sera réduite par application des substances nutritives pour la simulation de la contamination sans croissance de moisissures. Cet effet doit être pris en considération si la fonction est vérifiée et/ou si les propriétés électriques sont mesurées.

Du fait de l'application de substances nutritives, des croissances de moisissures existeront et un effet fongique doit donc être considéré.

6 Réactifs et matériaux

6.1 Cultures ou spores – Fourniture et conditions

Les champignons suivants doivent être utilisés pour effectuer l'essai (voir le Tableau 1). La nature de l'attaque que l'on peut attribuer à chaque champignon est donnée à titre indicatif. Mais les spores de toutes les cultures doivent être utilisées ensemble dans une suspension mélangée quelle que soit la nature du spécimen.

Les cultures ou les spores lyophilisées doivent être obtenues par une collection de cultures mycologiques reconnue. Elles doivent être livrées dans des boîtes avec la date d'inoculation de la culture sur les boîtes.

Un certificat doit confirmer la conformité de la culture avec le champignon et le numéro d'origine comme spécifié dans le Tableau 1 et/ou à l'Annexe E.

Les cultures et les spores lyophilisées doivent être stockées et manipulées conformément aux recommandations de l'organisme fournisseur et des exigences correspondantes de la présente norme. Lors de la préparation d'une culture par le laboratoire d'essai à partir d'une culture de souche ou de spores lyophilisées, la date d'inoculation doit être marquée sur le tube de culture.

Tableau 1 – Champignons d'essai

N°	Nom	Origine N° [3)]	Attaque sur	Note
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	nombreux matériaux	[1) 2)]
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	matériaux en plastique	[1) 2)]
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	cellulose	[1) 2)]
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	lubrifiants à base d'hydrocarbures	–

5	*Paecilomyces variotii*	ATCC 18502	plastiques et cuir	1) 2)
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	nombreux matériaux spécialement les textiles	1) 2)
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	caoutchouc	1) 2)
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	cellulose, textiles et plastiques	2)

1) Egalement spécifié dans l'ISO 846.

2) Egalement spécifié dans la MIL–STD–810 F, Tableau 508.5–I.

3) Voir également l'Annexe E.

Les cultures doivent être utilisées pour la préparation de la suspension de spores d'essai lorsqu'elles sont bien sporulées.

On l'atteint dans la plupart des cas après une période d'incubation de 7 à 14 jours à (29 ± 1) °C.

NOTE Le fournisseur des cultures ou des spores lyophilisées peut recommander d'autres conditions pour développer la culture.

Si les cultures ne sont pas appelées à être utilisées immédiatement, elles doivent être stockées dans un réfrigérateur à une température comprise entre 5 °C et 10 °C pendant une période ininterrompue ne dépassant pas six semaines. Les cultures utilisées pour préparer la suspension doivent avoir au moins 14 jours mais pas plus de 28 jours à partir de la date d'inoculation indiquée sur la boîte.

Le bouchon du récipient ne doit être retiré qu'au début de la préparation de la suspension de spore. Une seule suspension doit être effectuée à partir d'une boîte ouverte.

6.2 Préparation d'une suspension de spores

6.2.1 Généralités

La suspension est d'abord préparée dans de l'eau distillée stérilisée à laquelle on aura ajouté 0,05 % d'un agent mouillant. On a constaté que l'utilisation d'un agent à base de taurine-méthyle-N ou de dioctylsulfosuccinate de sodium est appropriée. L'agent mouillant ne doit pas contenir de substances susceptibles de stimuler ou d'inhiber la croissance des moisissures.

10 ml du mélange eau/agent mouillant sont versés doucement dans chaque culture. Un fil de platine ou de nichrome doit être stérilisé par chauffage au rouge dans une flamme, puis refroidi. Ce fil doit être utilisé pour gratter légèrement la surface de la culture de façon à libérer les spores.

Le liquide doit être agité doucement pour disperser les spores sans détacher les fragments mycéliens. La suspension doit être ensuite transvasée lentement et filtrée à travers une couche mince de laine de verre stérile ou à travers un entonnoir de microfiltration à dimensions de pores de 40 µm à 100 µm dans un tube centrifugeur stérilisé

La suspension de spores filtrée doit être centrifugée et le liquide surnageant doit être rejeté. Le résidu doit être remis en suspension dans au moins 10 ml d'eau distillée stérilisée et être centrifugé à nouveau. Les spores doivent être lavées de cette manière trois fois de suite.

6.2.2 Préparation pour la variante d'essai 1

Diluer le résidu de spores final de chaque culture dans un volume

- de solution de sels minéraux conformément à 6.3 mais sans saccharose si la spécification particulière prescrit un examen visuel uniquement (voir 5.1);
- d'eau distillée stérilisée si la spécification particulière prescrit de vérifier la fonction ou de mesurer les propriétés électriques (voir 5.1);

en réglant la concentration de spores à 1×10^6 à 2×10^6/ml déterminée à l'aide d'une chambre de comptage ou par turbimétrie.

Mélanger des volumes égaux des suspensions uniques suffisants pour la procédure d'inoculation appropriée afin d'obtenir une suspension de spores mélangées finale prête pour l'inoculation. La suspension de spores dans la solution de sels minéraux doit être utilisée dans les 48 h qui suivent la préparation. La suspension de spores dans l'eau distillée stérilisée doit être utilisée dans les 6 h qui suivent la préparation.

NOTE Préparer des volumes totaux d'environ 100 ml pour l'inoculation par pulvérisation ou d'environ 500 ml pour l'inoculation par badigeonnage ou immersion par exemple.

6.2.3 Préparation pour la variante d'essai 2

Diluer le résidu de spores final de chaque culture dans un volume de solution nutritive conformément à 6.3 en réglant la concentration de spores à 1×10^6 à 2×10^6/ml déterminée à l'aide d'une chambre de comptage ou par turbimétrie.

Mélanger des volumes égaux des suspensions uniques suffisants pour la procédure d'inoculation appropriée afin d'obtenir une suspension de spores mélangées finale prête pour l'inoculation. Utiliser la suspension de spores dans les 6 h qui suivent la préparation.

NOTE Voir 6.2.2.

6.3 Bandes de contrôle

Les bandes de contrôle nécessaires à cet essai doivent consister en des bandes de papier-filtre blanc stérilisé ou en tissu de coton non traité.

La solution nutritive nécessaire à la préparation des bandes de contrôle doit consister en une solution des réactifs suivants dans de l'eau distillée.

Réactifs	g/l
Phosphate dihydrogéné de potassium (KH_2PO_4)	0,7
Phosphate hydrogéné de dipotassique (K_2HPO_4)	0,3
Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,5
Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	2,0
Chlorure de potassium (KCl)	0,5
Sulfate ferreux ($FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	0,01
Saccharose	30,0

Le pH doit être compris entre 6,0 et 6,5 à 20 °C. On doit l'ajuster avec du NaOH 0,01 molaire, si nécessaire. La solution doit être stérilisée dans un autoclave à (120 ± 1) °C pendant 20 min.

Immédiatement avant l'inoculation (voir 11.2), les bandes de contrôle doivent être saturées par la solution nutritive retirées de cette solution et égouttées.

7 Description de l'appareillage d'essai

7.1 Inoculation par pulvérisation

Il convient d'utiliser de préférence un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation en liaison avec une chambre d'inoculation de sécurité (voir l'Annexe B).

7.2 Incubation des spécimens de petites dimensions

Des récipients de verre ou de plastique munis de couvercles doivent être utilisés pour mettre ou suspendre les éprouvettes et les bandes de contrôle.

Le récipient doit avoir une taille et une forme telles qu'il puisse contenir en permanence un volume d'eau suffisant pour maintenir à l'intérieur une humidité relative supérieure à 90 %.

Les dispositifs pour le montage ou la suspension doivent être tels que les spécimens et les bandes de contrôle ne soient à aucun moment en contact avec l'eau ni aspergés.

Les récipients doivent être placés dans une chambre maintenant une température uniforme dans l'espace de travail comprise entre 28 °C et 30 °C pour l'incubation des spécimens et des bandes de contrôle. Les variations périodiques de la température dues à l'action du régulateur ne doivent pas dépasser 1 °C/h.

7.3 Incubation des spécimens de grandes dimensions

Une chambre de chaleur humide de taille appropriée doit être utilisée pour les spécimens d'incubation trop grands pour les récipients prévus en 7.2. La chambre doit être munie d'une porte à fermeture hermétique pour éviter qu'un échange d'air ne se produise avec le laboratoire où elle se trouve.

L'humidité relative dans l'espace de travail doit être maintenue à une valeur supérieure à 90 %. L'eau de condensation provenant des parois latérales ou de la partie supérieure de la chambre ne doit pouvoir en aucun cas tomber sur les spécimens et les bandes de contrôle. La température dans l'espace de travail doit être uniforme et comprise entre 28 °C et 30 °C. Les variations périodiques de la température dues à l'action du régulateur ne doivent pas dépasser 1 °C/h.

Pour obtenir l'humidité requise et maintenir une température uniforme à l'intérieur de l'espace de travail, une circulation forcée d'air peut être nécessaire. La vitesse du déplacement d'air ne doit pas dépasser 1 m/s à la surface du ou des spécimens.

8 Sévérités

La sévérité pour chaque variante d'essai est déterminée par la durée de l'incubation.

Variante d'essai 1	– sévérité 1	28 jours
	– sévérité 2	56 jours

comme l'exige la spécification particulière.

Variante d'essai 2	– sévérité	28 jours

9 Examens initiaux

Les spécimens doivent être examinés visuellement et soumis aux vérifications électriques et mécaniques prescrites par la spécification particulière.

10 Préconditionnement

10.1 Nettoyage

Les spécimens doivent être utilisés pour l'essai dans le même état qu'à la livraison. Ils ne doivent normalement pas subir de lavage spécial.

Si la spécification particulière le prescrit, on doit laver la moitié du lot des spécimens dans de l'éthanol ou de l'eau déminéralisée contenant un détergent; cette procédure sera suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée exempte de détergent et l'autre moitié doit demeurer dans le même état qu'à la livraison. De cette façon, toute croissance de moisissures due à l'utilisation de matériaux impropres dans la construction du spécimen pourra être distinguée de celle résultant d'une contamination de surface.

Si le grade 0 est requis par la spécification particulière (variante d'essai 1), il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les spécimens en raison de la présence d'une contamination qui peut favoriser la croissance de moisissures.

NOTE Grade 0: voir 12.3.

10.2 Stockage en chaleur humide

Le ou les spécimens doivent être stockés dans les conditions d'incubation à (29 ± 1) °C et une humidité relative > 90 % et < 100 % pendant au moins 4 h immédiatement avant l'inoculation.

11 Epreuve

11.1 Application

La méthode d'application dépend de la variante d'essai prescrite par la spécification particulière; elle doit être effectuée selon la méthode décrite ci-dessous.

11.1.1 Variante d'essai 1

Si la spécification particulière exige des vérifications de fonctionnement et/ou une mesure des propriétés électriques deux groupes d'éprouvettes sont nécessaires:

Groupe 1 le ou les spécimens d'essai inoculés avec la suspension de spores et incubés;

Groupe 2 le ou les spécimens de contrôle négatif pulvérisés ou badigeonnés ou encore immergés dans l'eau distillée stérilisée conformément à la méthode d'inoculation utilisée pour le groupe 1 et stockés à la même température et humidité relative prescrites pour l'incubation mais dans un environnement stérile.

Si la spécification particulière n'exige aucune vérification de fonctionnement et/ou mesure des propriétés électriques seul le groupe 1 doit être utilisé.

11.1.2 Variante d'essai 2

Deux groupes de spécimens doivent être nécessaires:

Groupe 1 les spécimens d'essai inoculés avec des spores en suspension dans la solution nutritive et incubés;

Groupe 2 conformément au groupe 2 de la variante d'essai 1.

NOTE Il convient que les spécimens de contrôle négatif soient placés, dans les conditions prescrites, dans une chambre autre que celle qui contient les spécimens inoculés. Pour s'assurer qu'aucune moisissure ne pourra croître sur les spécimens de contrôle négatif, il convient que la chambre soit stérilisée selon l'une des méthodes indiquées en D.1.1. L'essai est valable, excepté si une croissance de moisissures se manifeste sur les spécimens d'essai et les spécimens de contrôle négatif.

11.2 Inoculation

Sauf prescription contraire dans la spécification particulière, l'inoculation du ou des spécimens d'essai et des bandes de contrôle (voir 6.3) avec la suspension de spore (voir 6.2) doit être effectuée par pulvérisation.

Si la pulvérisation n'est pas adaptée du fait de la taille, de la conception et autres propriétés de l'éprouvette l'inoculation avec la suspension de spore par immersion ou badigeonnage peut être effectuée comme indiqué dans la spécification particulière.

NOTE La pulvérisation par production d'aérosols de la suspension de spores avec un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation en liaison avec une chambre d'inoculation de sécurité (voir Annexe B) permet une répartition très homogène des spores sur la surface à essayer donnant une reproductibilité élevée des résultats d'essai. Il convient que cette méthode d'inoculation soit la méthode privilégiée.

11.3 Incubation

Les conditions d'incubation sont (29 ± 1) °C et une humidité relative >90 % et <100 %. Les conditions doivent être maintenues dans les récipients (voir 7.2) pour les spécimens de petites dimensions ou dans la chambre d'incubation de chaleur humide (voir 7.3) pour les grands spécimens.

Immédiatement après l'inoculation, les petits spécimens et au moins 3 bandes de contrôle doivent être suffisamment espacés dans le récipient et sans restriction de réglage de l'humidité relative nécessaire. Le récipient doit être ensuite placé dans la chambre d'incubation.

Si applicable, les spécimens de contrôle négatif doivent être placés, comme les spécimens inoculés, dans des récipients similaires mais stérilisés sans les bandes de contrôle. Les récipients doivent ensuite être placés dans la chambre d'incubation.

Dans le cas de spécimens de grandes dimensions, un nombre approprié de bandes de contrôle doit être placé dans la chambre avec les éprouvettes. Tout spécimen de contrôle négatif doit être exposé dans une chambre séparée fraîchement désinfectée (voir Annexe D) utilisée de préférence pour les spécimens de contrôle négatif uniquement.

Les récipients ou la chambre de chaleur humide doivent être ouverts uniquement pour

- examiner les bandes de contrôle déterminant la viabilité des spores et le maintien des conditions d'incubation après 7 jours;
- alimenter les récipients en oxygène de l'air une fois tous les 7 jours jusqu'à la fin de la durée prescrite d'incubation;
- réaliser un ou des examens visuels intermédiaires, conformément à 11.3.7.

L'ouverture ne doit durer que quelques minutes seulement.

Après 7 jours d'incubation, la croissance de moisissures de plus d'une origine doit être visible à l'œil nu sur chacune des bandes de contrôle. Sinon l'essai doit être considéré comme nul et il doit être recommencé. Dans ce cas, les mêmes éprouvettes peuvent être utilisées.

Toute interruption de l'incubation est autorisée pour un examen visuel uniquement et pendant moins de 10 min dans chaque cas et si nécessaire dans la spécification particulière. Deux examens visuels, au maximum, doivent être prescrits pour une exécution pendant la durée d'incubation. La ou les durées de l'examen visuel doivent être spécifiées dans la spécification particulière.

12 Examens finaux

12.1 Examen visuel

Les spécimens doivent être examinés (voir 12.3), vérifiés/ou photographiés (comme l'exige la spécification particulière), immédiatement après ils sont retirés du récipient ou de la chambre de chaleur humide, car la croissance peut changer son apparence par dessiccation. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées pour la manipulation.

Après un examen visuel et l'évaluation de la croissance réelle, le mycélium doit être retiré avec soin à l'aide d'éthanol 70 % vol de la surface qui doit ensuite être examinée au microscope pour évaluer la nature et l'importance de l'attaque (comme la corrosion) sur le spécimen. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées lorsqu'on enlève les moisissures.

12.2 Effet de la croissance

Quand la spécification particulière indique des vérifications électriques et/ou mécaniques à effectuer dans des conditions d'humidité (après l'incubation), il est indispensable que l'humidité relative entourant le ou les spécimens ne diminue pas avant que ces vérifications soient réalisées. Ces vérifications doivent donc être effectuées sur les petits spécimens tandis qu'ils sont encore exposés dans le récipient, couvercle fermé, avec présence d'eau. Pour les gros spécimens, les vérifications doivent être effectuées lorsqu'ils sont encore dans la chambre de chaleur humide.

NOTE Si des connexions électriques sont à réaliser ou un travail à effectuer sur des spécimens se trouvant dans les récipients ou les chambres de chaleur humide avec les couvercles ou portes nécessairement ouvertes, il convient d'effectuer cette opération en veillant à la sécurité des opérateurs. Voir l'Annexe C pour les méthodes de sécurité recommandées pour la manipulation. Les exigences du fabricant pour le fonctionnement dans des conditions de chaleur humide fournies dans le manuel de fonctionnement seront observées.

Des vérifications similaires doivent être effectuées sur des spécimens inoculés avec des suspensions de spores et sur d'autres inoculés avec une solution aqueuse seulement. Toute différence significative entre les résultats des mesures des deux groupes est considérée comme résultant de la croissance des moisissures et du milieu très humide.

Après les vérifications, les spécimens doivent être retirés et examinés visuellement selon 12.1.1 et, pour finir, l'attaque du spécimen doit être déterminée selon 12.1.2.

Si la spécification indique des vérifications à effectuer après reprise, les spécimens doivent être retirés du récipient ou de la chambre, puis examinés conformément à 12.1.1 et ensuite placés dans les conditions spécifiées de reprise pendant 24 h, après quoi ils doivent être soumis aux vérifications.

12.3 Importance de la croissance

Les spécimens d'essai exposés doivent être d'abord examinés à l'œil nu et ensuite, si nécessaire, au microscope stéréoscopique avec un grossissement nominal d'environ 50 x.

L'importance de la croissance des moisissures doit être évaluée et exprimée selon le grade suivant:

Grade

0 Aucune croissance apparente avec un grossissement nominal de 50 x

1 Traces de croissance bien visibles au microscope

2a Croissance sporadique visible à l'œil nu et/ou au microscope uniquement dispersée ou localisée en quelques endroits ne couvrant au total pas plus de 5 % de la surface d'essai

2b Croissance bien visible à l'œil nu et/ou au microscope répartie de manière plus ou moins homogène en plusieurs endroits ne couvrant au total pas plus de 25 % de la surface d'essai

3 Croissance bien visible à l'œil nu et ne couvrant au total pas plus de 25 % de la surface d'essai

NOTE Lorsque les spécimens comportent un assemblage et présentent de ce fait différents grades de croissance, il est préférable d'évaluer les différentes parties séparément. Pour la variante d'essai 2, il est recommandé que le grade 0 ne soit prescrit que s'il est spécifié d'examiner l'effet fongistatique.

13 Renseignements à fournir dans la spécification particulière

Lorsque cet essai est inclus dans la spécification particulière, les détails suivants doivent être fournis

		Article ou paragraphe
a)	Variante d'essai 1 ou 2	5, 11.1
b)	Variante d'essai 1 durée d'incubation (sévérité)	5, 8
c)	Mesures initiales électriques et mécaniques et vérifications fonctionnelles (si l'altération du fonctionnement est à déterminer)	5, 9, 11.1
d)	Préconditionnement par nettoyage	10.1
e)	Méthode d'inoculation (s'il ne s'agit pas de pulvérisation)	11.2
f)	Interruption d'incubation pour l'examen visuel intermédiaire	11.3.7
g)	Examens finaux	12
h)	Importance de la croissance (grade) devant faire l'objet d'une approbation (si nécessaire)	12.3

14 Renseignements à fournir, au minimum, dans le rapport d'essai

a) Laboratoire d'essai (nom, adresse et accréditation)
b) Client (nom et adresse)
c) Description du ou des spécimens
d) Norme d'essai, édition et variante d'essai
e) Sévérité pour la variante d'essai 1
f) Champignons d'essai (s'il y a divergence par rapport à la norme d'essai)
g) Examens initiaux, intermédiaires et finaux (détaillés)
h) Nettoyage du ou des spécimens (si applicable)
i) Méthode d'inoculation
j) Conditions d'incubation (s'il y a divergence par rapport à la norme d'essai)
k) Moisissures sur les bandes de contrôle (après incubation de 7 jours)
l) Résultats d'essai (observations spécifiques comprises)
m) Critère d'essai (grade admissible de moisissures si cela est prescrit)
n) Évaluation de la performance (reposant sur le critère d'essai)

Annexe A
(informative)

Dangers encourus par le personnel

A.1 Généralités

Les mycologues et les pathologistes sont d'avis que la mise en œuvre de l'essai de croissance des moisissures peut constituer un danger pour la santé, à moins que des précautions spéciales ne soient prises.

Les précautions qui sont décrites en détail dans les Annexes A, B, C et D sont fondées sur des techniques microbiologiques bien établies et sur l'utilisation d'un équipement spécialisé. Les personnes effectuant l'essai doivent être formées pour les travaux en laboratoires microbiologiques.

Un laboratoire microbiologique doit être équipé pour les essais de croissances de moisissures.

L'utilisation d'une armoire microbiologique de sécurité est recommandée pour l'exécution de certaines parties de la procédure.

Les spores de moisissures transportées par l'air environnant pénètrent en permanence dans le corps humain par le nez et la bouche, mais ne présentent pas, en principe, de danger réel pour la santé. Certains individus particulièrement sensibles peuvent cependant être affectés par l'inhalation répétée de certaines spores, y compris celles des moisissures utilisées dans cet essai. Il convient donc d'attirer l'attention sur les précautions à prendre lors de la réalisation de l'essai. Elles sont exposées de manière succincte dans l'Annexe C. Une croissance de champignons étrangers et autres microorganismes peuvent se développer par accident au cours de la période d'incubation aux emplacements d'incubation et/ou sur les spécimens. Certains de ces champignons ou autres micro-organismes peuvent être préjudiciables au corps humain.

Il est conseillé à toute personne susceptible de participer à cet essai d'en aviser le médecin du travail ou son médecin traitant. Elle doit alors se conformer à la décision du corps médical quant à cette participation.

Il convient que tout membre du personnel participant à cet essai soit informé des risques auxquels il (ou elle) s'expose, compte tenu de son état de santé.

Les règles nationales de sécurité doivent être suivies.

A.2 Renseignements destinés au corps médical

L'essai comporte un risque dû à l'inhalation ou à l'implantation traumatique de spores.

Les mesures de sécurité à prendre sont indiquées dans l'Annexe C et sont destinées à réduire ce risque.

Il existe des risques particuliers pour les personnes sensibles, à savoir

– les sujets atopiques habituellement allergiques au pollen, à la poussière de maison, aux petits fragments de poil ou de plumes d'animaux, etc., et qui souffrent de rhinite, d'asthme

ou d'autres symptômes d'allergie. Une allergie aux spores de moisissures de type I peut apparaître et, dans certaines circonstances, des allergies du type III (maladie professionnelle du poumon du fermier);

– les sujets atteints de maladies chroniques des poumons, par exemple les personnes souffrant de bronchiectasie, de bronchite chronique, de sarcoïdose ou d'emphysème, etc. Le dépôt et la germination de spores dans les alvéoles des poumons peuvent entraîner une croissance fongique sous forme d'agglomérat fongique ou d'aspergillome en association avec *Aspergillus spec.* Les lésions tuberculeuses guéries constituent un terrain favorable à la croissance fongique;

– les malades qui reçoivent un traitement de longue durée d'antibiotique à large spectre, ou ceux qui prennent des médicaments immunodépresseurs incluant les corticostéroïdes, ou encore ceux à qui on a prescrit des préparations chimiothérapiques. L'élimination de la flore bactérienne normale des voies respiratoires et digestives favorise quelquefois une croissance fongique considérable, et l'ingestion d'immunodépresseurs a tendance à prédisposer l'individu à une infection fongique.

Bien que les dangers liés à la réalisation de l'essai selon les procédures prescrites soient considérés comme étant assez limités, il est néanmoins recommandé que les personnes appartenant aux catégories mentionnées ci-dessus s'abstiennent de participer à l'essai.

Annexe B
(normative)

Méthodes d'inoculation
(se reporter également à 11.2)

B.1 Généralités

Il est nécessaire de consulter l'Annexe C, «Mesures de sécurité recommandées», avant le commencement de l'inoculation. La pulvérisation de la suspension de spores sur les spécimens et les bandes de contrôle est généralement une méthode appropriée.

B.2 Pulvérisation par la méthode d'inoculation par aérosol (AIM)

B.2.1 Généralités

En utilisant un pulvérisateur pour l'inoculation, la répartition des spores à la surface du spécimen est bien moins homogène que l'utilisation de l'AIM.

La reproductibilité et l'interprétation des résultats d'essais sont à l'évidence meilleures en utilisant l'AIM, du fait d'une répartition très homogène des spores à la surface du spécimen

L'AIM est favorablement applicable aux spécimens dont la surface doit être à peine humidifiée par la suspension de spores également.

Les dimensions adaptées de la boîte d'inoculation de sécurité peuvent être 500 mm × 500 mm × 500 mm. Il convient que le matériau de la boîte soit du polyméthacrylate de méthyle.

B.2.2 Description de la méthode

Méthode d'inoculation par aérosol (AIM) voir la Figure B.1.

La suspension de spores sera transformée en aérosol par un appareillage à aérosol ultrasonore comme ceux utilisés pour les traitements thérapeutiques par inhalation de médicaments sous forme d'aérosols (1).

Une quantité exactement mesurée de suspensions de spores peut être introduite dans la cuve d'atomisation de l'appareillage ultrasonore pour aérosol, à l'aide d'une seringue graduée (2).

L'aérosol contenant les spores est conduit à travers un tube (3) dans la boîte d'inoculation par une légère ventilation produite par l'appareil ultrasonore d'aérosol.

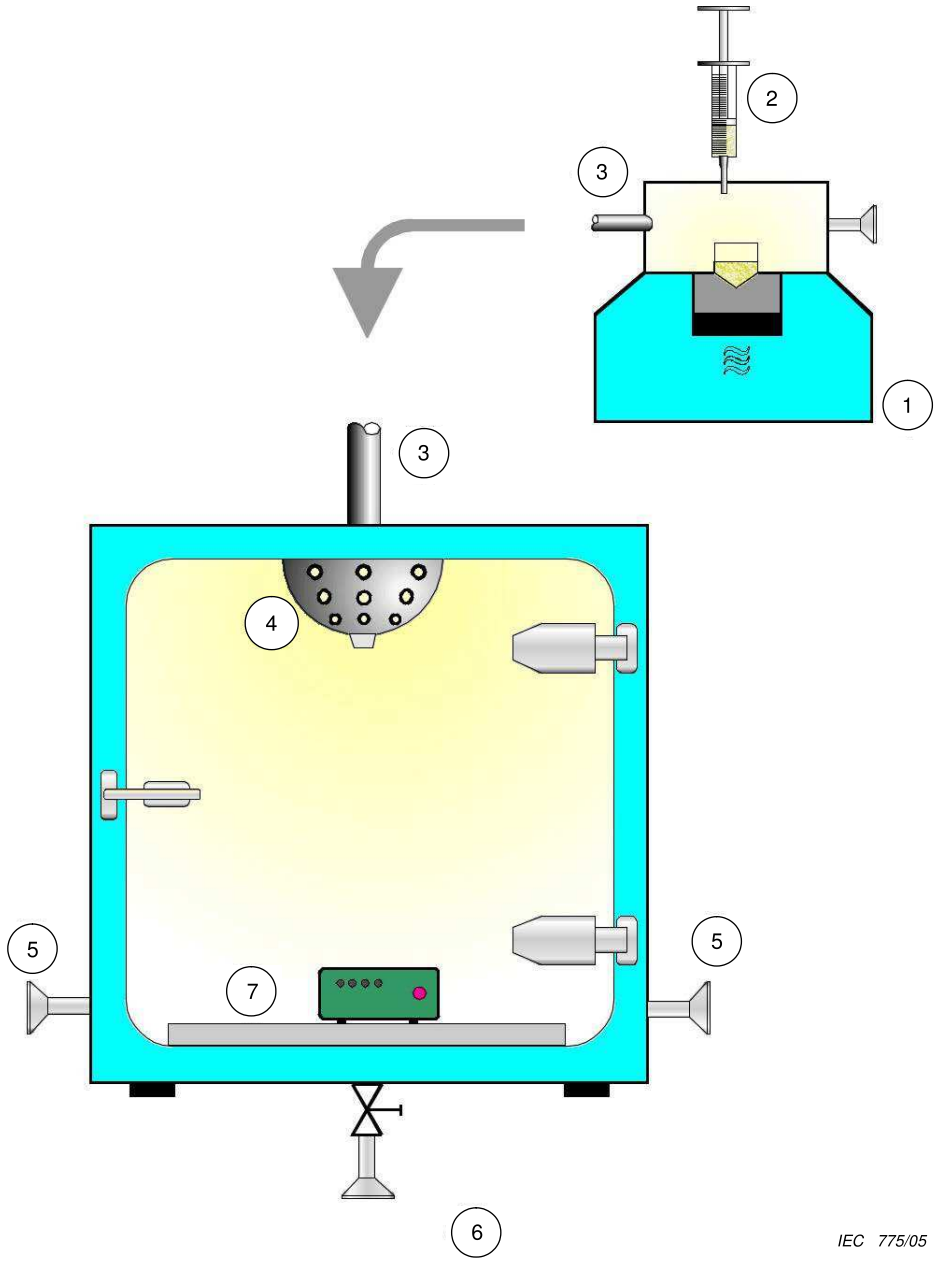
L'aérosol est réparti dans la boîte par un entonnoir à trous (4) monté à l'abri de la boîte.

Le spécimen est placé sous l'entonnoir au fond de la boîte dont les zones principales d'essai sont dans la direction de la propulsion de l'aérosol.

La pression à l'intérieur de la boîte est compensée par deux trous d'aération disposés de manière équilatérale et équipés de filtres microbiologiques (5).

Après achèvement de la production d'aérosols et de la propulsion de l'aérosol, la boîte doit être soumise à la ventilation provenant de l'appareil ultrasonore d'aérosol au travers d'un tube au fond de la boîte (6) équipée d'une soupape et d'un filtre microbiologique à l'extrémité.

Avant d'ouvrir la porte de la boîte qui est scellée au cours du fonctionnement, la ventilation provenant de l'appareil ultrasonore d'aérosol doit être arrêtée.



Légende

1 Appareil à aérosol ultrasonore
2 Seringue graduée
3 Tube
4 Entonnoir à trou
5 Filtres microbiologiques
6 Fond de boîte
7 Spécimen

Figure B.1 – Méthode d'inoculation par aérosol (AIM)

B.2.3 Décontamination et nettoyage

Après la sortie du spécimen (7), la porte de la boîte doit être immédiatement fermée et tout le système doit être décontaminé par un désinfectant sous forme de production d'aérosol comme une solution peracétique, par exemple.

Pour des suspensions de spores similaires, on peut réaliser plus d'une opération d'inoculation l'une après l'autre, le même jour, sans interruption pour des décontaminations.

Si les spores étaient en suspension dans une solution de sels minéraux (Variante d'essai 1, voir 6.2.2) ou dans la solution nutritive de sels minéraux (Variante d'essai 2, voir 6.2.3) la cuve d'atomisation, le tube entre l'appareil ultrasonore d'aérosol et la boîte d'inoculation, l'entonnoir de répartition et les surfaces internes de la boîte doivent être nettoyés à l'aide d'eau distillée après décontamination.

B.2.4 Etalonnage du système AIM

La quantité de suspension de spores diffusée sur une gamme de surface définie en fonction du réglage de performance de l'appareil ultrasonore et d'autres facteurs peut être évaluée en pesant les boîtes de Pétri en polystyrène à l'aide d'une balance analytique avant et après exposition au fond de la boîte d'inoculation au cours de la production d'aérosol. A la place de la suspension de spores, la solution de sels minéraux (voir 6.3.2) doit être transformée en aérosol.

NOTE La quantité recommandée d'aérosol déposé est de (100 ± 20) mg/dm².

B.3 Inoculation de petits spécimens par immersion

Pour les spécimens de petites dimensions, l'immersion dans la suspension de spores constitue une méthode rapide et efficace d'inoculation, à condition que les spores puissent adhérer à la surface.

B.4 Inoculation de spécimens de grandes dimensions par pulvérisation ou badigeonnage

Il convient que les grands spécimens soient, si possible, divisés en éléments selon 3.4.

Toutefois, si les spécimens sont encore trop grands pour être inoculés à l'intérieur de l'armoire microbiologique de sécurité disponible, il y a lieu d'envisager l'installation d'une hotte d'échappement temporaire au-dessus du spécimen. Il convient que les mêmes conditions de ventilation soient maintenues, et que le même système d'échappement que celui qui est prescrit pour l'armoire microbiologique de sécurité soit installé. Il est également possible de placer le grand spécimen dans la chambre de chaleur humide où doit avoir lieu l'incubation, et de le badigeonner sur la suspension de spores. Bien qu'il soit peu probable que cette méthode donne lieu à une formation d'aérosol, il convient que le système d'échappement recommandé, installé sur la chambre de chaleur humide, soit mis en fonctionnement durant l'inoculation. Pendant l'inoculation par pulvérisation, le système d'évacuation ne doit pas être mis en fonctionnement pour éviter un déplacement d'air supplémentaire et la porte doit être fermée pour réduire le dégagement de spores.

Il est recommandé d'effectuer l'inoculation dans une armoire microbiologique de sécurité, du fait de l'éventualité de formation d'aérosol.

Dans le cas de la méthode d'inoculation par aérosol (AIM), l'armoire microbiologique de sécurité (MSC) est remplacée par la boîte d'inoculation de sécurité (voir Figure B.1).

Annexe C
(informative)

Mesures de sécurité recommandées

Il convient que les précautions utiles soient prises pour réduire l'inhalation de spores de moisissures et pour éviter qu'elles n'entrent en contact avec la peau, en particulier au niveau des ongles.

L'inhalation des spores de moisissures risque de se produire lors du transport ou de l'examen des spécimens incubés ou des bandes de contrôle, ou encore si l'air qui les entoure est déplacé, lors de l'ouverture ou de la fermeture des portes des chambres et des couvercles des récipients, par exemple. Ce risque est accru quand les spores de moisissures sont desséchées, car les petites particules de spores qui se détachent peuvent plus facilement se propager dans l'air. Le risque d'inhalation est également plus grand lors de l'inoculation des spécimens par la méthode de pulvérisation à l'exception de la méthode d'inoculation par aérosol (AIM) en utilisant une boîte d'inoculation (voir l'Annexe B).

Une protection directe contre l'inhalation de spores de moisissures peut être réalisée grâce au port d'un assemblage homologué et adapté de filtre respirateur assigné pour des poussières dans la gamme de diamètre entre 1 µm et 10 µm ou pour des applications de dangers biologiques ou de dangers radioélectriques. Une gaze ou un masque non hermétique ne représente pas une protection suffisante. Cependant, la méthode préférentielle consiste à utiliser une armoire microbiologique de sécurité (MSC).

De façon à diminuer les risques de contact entre la peau et les moisissures, des gants de protection peuvent être portés lors de la manipulation des cultures, des inoculums et des spécimens d'essai après l'inoculation et l'incubation. On doit privilégier des gants jetables et les décontaminer avant de les enlever.

Il convient que toutes les opérations relatives à l'ouverture de récipients de cultures de moisissures, à la préparation de suspensions de spores, à l'inoculation de spécimens et de bandes de contrôle, si elle n'est pas réalisée dans une boîte d'inoculation (AIM) ainsi qu'à l'examen et à la mesure de spécimens incubés, soient effectuées dans une armoire microbiologique de sécurité, en prenant en compte les précautions suivantes:

a) utiliser l'agent mouillant prescrit pour la préparation d'une suspension de spores (voir 6.2.1);
b) nettoyer les parois externes du récipient d'incubation avec de l'éthanol à 70 % avant de le retirer de l'armoire microbiologique de sécurité et de le transférer dans la chambre d'incubation;
c) nettoyer ou laver les spécimens avec de l'éthanol à 70 % à la fin de l'essai, pendant qu'ils sont encore dans l'armoire microbiologique de sécurité. Il s'agit de retirer les moisissures avant la décontamination finale et la mise au rebut;
d) en utilisant la méthode d'inoculation par aérosol (AIM), la conception de la boîte d'inoculation et le fonctionnement doivent être comme spécifié dans l'Annexe B pour empêcher que ne s'échappent l'aérosol contenant les spores .

Dans le cas où le spécimen est trop grand pour être placé dans un récipient individuel et qu'il se révèle nécessaire de l'incuber dans une chambre de chaleur humide, les spores peuvent se déplacer en raison du mouvement de l'air lors de l'ouverture ou de la fermeture de la porte de la chambre.

Un système d'échappement à filtres microbiologiques pour un échappement dans l'atmosphère extérieure peut empêcher les spores de s'échapper par la porte quand elle est

ouverte. Lorsque la porte est fermée, le système d'échappement ne doit pas être mis en fonctionnement pour empêcher une augmentation de déplacement d'air ou une pression négative dans la chambre.

Les filtres microbiologiques doivent être décontaminés ou remplacés après la fin de l'incubation. Avant l'ouverture de la porte, il convient que le ventilateur brasseur d'air soit fermé pour réduire la diffusion de spores.

S'il est nécessaire d'utiliser un grand incubateur, il est nécessaire de porter des habits protecteurs ainsi qu'un casque muni d'un respirateur, comme indiqué ci-dessus à l'Article C.3, ou d'un tuyau permettant de l'approvisionner correctement en air.

Il convient de décontaminer toutes les chambres et tous les appareils utilisés pour les essais de croissances de moisissures immédiatement après utilisation conformément à l'Annexe D.

En fin d'essai, il est possible que les spécimens et les bandes de contrôle soient couverts d'une épaisse couche de moisissures, et il y a lieu d'apporter un soin particulier à leur destruction.

Il convient d'immerger les bandes de contrôle dans un récipient contenant une solution d'hypochlorure de sodium (voir Annexe D) avant d'être mises au rebut. Il convient de traiter préalablement les spécimens conformément au point c) de l'Article C.5, avant la décontamination finale par une méthode sélectionnée parmi celles figurant dans l'Annexe D.

Il est recommandé de décontaminer les étuves et l'équipement avant le démarrage de l'essai, au cas où des doutes subsisteraient sur leur stérilité. Si une décontamination n'a pas été effectuée dans les 28 jours précédant l'essai, elle sera entreprise quel que soit l'état de propreté.

Il est interdit de fumer ou de consommer des aliments ou des boissons dans le laboratoire d'essai.

Les vêtements de protection portés dans le laboratoire d'essai de croissances de moisissures ne doivent pas être utilisés à l'extérieur.

Annexe D
(informative)

Procédures de décontamination

Il est probable que les chambres de chaleur humide et les récipients utilisés en tant qu'incubateurs pour faire croître les moisissures seront contaminés à la fois par les moisissures d'essai et par des moisissures contaminantes étrangères. Une procédure de décontamination est de ce fait nécessaire. Il convient qu'elle soit efficace contre les germes d'essai et les contaminants étrangers. Il ne doit être laissé aucun résidu de décontamination susceptible de freiner la croissance des champignons d'essai. De plus, cette décontamination doit présenter le moins de risque possible pour l'expérimentateur.

D.1 Procédures de décontamination recommandées

D.1.1 Application de solutions chimiques actives

Lavage avec une solution d'hypochlorure de sodium ou immersion dans celle-ci. Il convient de préparer une solution d'hypochlorure de sodium contenant 500×10^{-6} à $1\,000 \times 10^{-6}$ de chlorure dilué dans de l'eau.

Il convient de mouiller les espaces d'incubation, les récipients ou l'équipement avec la solution ou le cas échéant de les immerger dans la solution, en s'assurant qu'elle pénètre dans toutes les fentes. Au minimum 30 min après il convient que l'appareil soit soigneusement rincé à l'eau fraîche.

Les chambres climatiques peuvent être décontaminées en augmentant la température à 60 °C – 70 °C pendant 1 h à 2 h puis en les nettoyant au moyen d'une solution savonneuse d'hypochlorure de sodium.

Environ 30 min après, il convient que les résidus de la solution soient enlevés en rinçant ou en nettoyant avec de l'eau fraîche.

L'hypochlorure de sodium présente une forte action blanchissante. L'utilisation de ce désinfectant risque de ne pas convenir pour certains matériaux.

Un désinfectant très efficace à appliquer à la place de la solution d'hypochlorure de sodium est à base de mélanges d'azotes organiques tels que l'acétate d'ammonium diméthyl-benzylique d'octyl–n, l'acétate de benzethonium ou l'acétate méthylbenzethonium.

Seuls les désinfectants essayés par rapport à leur efficacité fongique et leur sécurité toxicologique par un laboratoire autorisé doivent être utilisés.

D.1.2 Stérilisation à l'autoclave

Cette méthode convient aux appareils plus petits qui peuvent supporter une température élevée ainsi que pour les cultures. Il convient de régler l'autoclave à une pression de 10 kPa (1 bar) de façon à obtenir une température de 121 °C pendant 20 min.

D.1.3 Nettoyage ou pulvérisation avec de l'éthanol 70 % vol

Toutes les surfaces qui ont pu avoir été en contact avec les spores ou avec de plus petites gouttelettes de suspension de spores doivent être intensément mouillées par de l'éthanol 70 % vol. La durée du nettoyage ne doit pas être inférieure à 15 mm.

D.1.4 Application de désinfectants volatils

Il convient d'éviter l'utilisation de désinfectants volatils tels que le formaldéhyde. Les vapeurs de formaldéhyde sont un décontaminant efficace, mais elles laissent des résidus dont l'élimination n'est presque jamais complète. En conséquence, elles peuvent réapparaître dans les espaces fermés, empêchant de ce fait la croissance des moisissures d'essai.

De plus, le formaldéhyde est une substance toxique.

Il existe d'autres antiseptiques volatils, mais qui peuvent provoquer des explosions et/ou avoir des effets toxiques et, par conséquent, présenter un risque pour la sécurité, surtout dans le cas de chambres de grandes dimensions. Dans de nombreux cas, la production d'aérosol à partir d'une solution acide peracétique 0,5 % vol dans l'espace contaminé peut être une méthode adaptée de décontamination.

D.2 Mise au rebut

Avant d'être jetés, il est recommandé que les matériaux contaminés, les surplus de cultures, les suspensions de spores, etc., soient décontaminés selon la méthode D.1.1 ou D.1.2.

NOTE Il convient que les supports nutritifs de surcroissance (cultures) soient de préférence décontaminés par autoclave. Il est recommandé qu'une suspension de spores renversée ou du verre provenant d'un tube brisé ou autres déchets infectés soient désinfectés en les couvrant de cellulose saturée de solution d'hypochlorure de sodium ou autre désinfectant indiqué en D 1.1 pendant plusieurs heures avant la mise au rebut.

Annexe E
(informative)

Informations sur les champignons d'essai

E.1 Liste des souches identiques

N°	Nom	Souche N°	Souche identique [1)]
1	*Aspergillus niger*	ATCC 6275	CBS 131.52 CMI 45551 DSM 1957 NBRC 6341 NRRL 334 QM 324 QM 458 IAM3001
2	*Aspergillus terreus*	ATCC 10690	CBS 377.64 CMI 45543 DSM 1958 NBRC 6346 NRRL 571 QM 82 j IAM 3004
3	*Chaetomium globosum*	ATCC 6205	CBS 148.51 CMI 45550 DSM 1962 NRRL 1870 QM 459 NBRC 6347 IAM 8059
4	*Hormoconis resinae*	DSM 1203	NRRL 2778 NBRC 100535
5	*Paecilomyces varioti*	ATCC 18502	CBS 284.48 CMI 40025 DSM 1961 NRRL 1115 QM 6764 IAM 5001 NBRC 33284 IAM 13426
6	*Penicillium funiculosum*	ATCC 36839	CBS 631.66 CMI 114933 DSM 1944 IAM 7013 NBRC 33285 JCM 5594
7	*Scopulariopsis brevicaulis*	ATCC 36840	CMI 49528 DSM 9122 QM 9985 NBRC 100536
8	*Trichoderma virens*	ATCC 9645	DSM 1963 IAM 5061 NBRC 6355
1) D'autres souches identiques peuvent être utilisées.			

E.2 Supports nutritifs recommandés pour le maintien des cultures

Tous les supports Agar doivent être stérilisés dans un autoclave à (120 ± 1) °C pendant 15 min.

Nº	Champignons d'essais	Milieu nutritif	
1	*Aspergillus niger*	Extrait de malt pour la microbiologie avec addition de	25 g/l d'eau distillée 15 g à 20 g/l Agar
2	*Aspergillus terreus*		
4	*Hormoconis resinae*		
5	*Paecilomyces varioti*		
6	*Penicillium funiculosum*		
3	*Chaetomium globosum*	Agar-glucose-sels minéraux selon la solution donnée en 6.3.2 *) avec addition de	 15 g à 20 g/l Agar
7	*Scopulariopsis brevicaulis*		
8	*Trichoderma virens*		
*) *Chaetomium globosum* avec une bande stérile de papier filtre recouvrant la surface.			

Une plaque du support nutritif inoculé avec des spores provenant de la culture de champignons d'essais et incubés après que l'on a la possibilité de l'utiliser pour en vérifier la viabilité durant une période de 7 jours.

Mais on ne peut pas l'utiliser pour s'assurer si les conditions de température et d'humidité relative dans la chambre d'incubation peuvent soutenir ou non de manière suffisante la croissance de moisissures comme on peut l'exécuter par des bandes de contrôle (voir 6.3).

Annexe F
(informative)

Guide

F.1 Mécanismes d'infection

Les champignons se développent dans le sol et dans ou sur la plupart des matériaux usuels. Ils se propagent par des spores qui se détachent du mycélium d'origine et, plus tard, germent pour donner un nouveau mycélium.

Ces spores sont très petites (1 µm à 10 µm) et sont facilement transportées par l'air en mouvement. Elles peuvent aussi se coller sur des particules de poussière et s'introduire dans les appareils.

Ainsi, toutes les parties d'un appareil dans lesquelles l'air peut pénétrer peuvent être infectées par les spores. L'infection peut également être provoquée par les manipulations. Les spores peuvent être transportées par les empreintes digitales, par exemple.

Un autre facteur d'infection est celui de la pénétration des acariens portant des spores sur leur corps. Les acariens sont capables de pénétrer dans de très petites fentes jusqu'à 25 µm. Les corps et les excréments des acariens, en s'agglutinant, peuvent produire un film d'agents nutritifs et d'humidité qui peut favoriser la propagation des moisissures à partir des spores.

F.2 Germination et développement

L'humidité est indispensable à la germination des spores et, lorsqu'un film de poussière ou d'autre matériau hydrophile est présent à la surface, il peut extraire de l'atmosphère une humidité suffisante.

Lorsque l'humidité relative est inférieure à 65 %, il ne peut y avoir ni germination ni croissance du mycélium. La croissance du mycélium sera d'autant plus rapide que l'humidité sera plus élevée au-dessus de cette valeur. Les spores peuvent néanmoins survivre pendant longtemps avec une humidité relative très faible; même lorsque le mycélium est mort. Elles peuvent germer et redonner un nouveau mycélium dès que l'humidité est redevenue favorable.

En plus d'une humidité élevée de l'atmosphère, il est nécessaire, pour les spores, qu'il existe à la surface du produit une couche de matériau absorbant l'humidité. En supposant cela, la plupart des matériaux organiques apportent une nourriture suffisante pour un léger développement de mycélium. La poussière organique elle-même contient une source de nourriture suffisante pour la croissance de moisissures. La croissance de moisissures est favorisée par de l'air stagnant et une absence de ventilation.

La température optimale pour la germination de la majorité des champignons susceptibles de perturber le matériel est située entre 20 °C et 30 °C. Rares sont ceux qui peuvent germer au-dessous de 0 °C, quelques-uns le peuvent jusqu'à 40 °C.

De nombreuses spores ne sont nullement altérées par une exposition prolongée au-dessous de 0 °C ou à des températures élevées, allant jusqu'à 80 °C.

F.3 Effet du mycélium

F.3.1 Effets primaires

Les moisissures peuvent vivre sur la plupart des matériaux organiques, mais certains de ces matériaux peuvent être plus facilement attaqués que d'autres. La croissance des moisissures ne se produit normalement que sur des surfaces exposées à l'air et celles qui absorbent ou adsorbent l'humidité sont généralement plus susceptibles d'être attaquées.

Même s'il ne se produit qu'une légère attaque dangereuse sur un matériau, la formation d'un cheminement conducteur le long de la surface, due à une couche humide de mycélium, peut abaisser fortement la résistance d'isolement entre des conducteurs électriques.

Lorsque le mycélium humide se développe en un endroit situé dans le champ électro-magnétique d'un circuit électronique à réglage critique, il peut provoquer une importante variation dans les caractéristiques fréquence-impédance du circuit.

Les matériaux les plus sensibles à l'attaque des moisissures sont les matériaux naturels tels que cuir, bois, textiles, cellulose et soie. La plupart des matériaux plastiques sont moins sensibles mais néanmoins exposés.

Les matériaux plastiques contiennent parfois des monomères et des oligomères non polymérisés et/ou additifs qui peuvent resurgir à la surface et constituer une nourriture pour les champignons; ainsi, une croissance importante peut se produire.

L'attaque des matériaux par les moisissures provoque une dégradation des caractéristiques mécaniques et/ou des modifications d'autres propriétés physiques.

Les propriétés de certains matériaux plastiques exigent, pour avoir une durée de vie satisfaisante, la présence d'un plastifiant. Si le plastifiant est digéré par les champignons le matériau est cassant.

F.3.2 Effets secondaires

La croissance de moisissure dégage des produits acides du métabolisme et d'autres substances qui entraîneront une attaque de type secondaire du matériau.

Cette attaque peut conduire à des effets d'électrolyse ou de vieillissement, et le verre même peut perdre sa transparence dans ce processus. L'oxydation ou la décomposition peut être facilitée par la présence d'enzymes sécrétées par les moisissures.

La présence des champignons affecte l'esthétique de l'appareil par une apparence désagréable et aussi par l'odeur qui accompagne fréquemment les moisissures.

F.3.3 Effets associés à la conception des matériels

En raison de la conception modulaire et de l'interconnexion de la plupart des matériels, le développement des moisissures dans une partie d'un matériel peut avoir des effets sévères sur un autre sous-ensemble ou module qui, en lui-même, ne permettrait pas le développement de moisissures.

Les effets possibles sur les performances globales du matériel doivent donc être évalués lorsque l'on considère les effets primaires et secondaires obtenus sur les sous-ensembles ou les composants individuels.

Il y a lieu de noter que tout ce qui concerne l'identification du matériau et de l'équipement, par exemple: étiquettes, marquage, etc. doit avoir de préférence le même niveau de protection que le produit lui-même.

F.4 Prévention contre le développement des moisissures

Les procédés suivants seront utilisés avec des degrés de réussite différents pour combattre les effets nuisibles du développement des moisissures.

Il convient que tous les matériaux isolants soient choisis de façon à présenter la plus grande résistance possible aux moisissures, pour rendre maximal le temps pris par le mycélium pour se développer, et minimiser tout dommage causé aux matériaux par un tel développement de moisissures.

L'utilisation de lubrifiants dans l'assemblage, de vernis et de produits de finition, etc. est souvent nécessaire pour obtenir le fonctionnement désiré ou une certaine durabilité du produit. Il convient que ces matériaux soient choisis en fonction de leur aptitude à résister au développement des moisissures. Même s'il apparaît que les lubrifiants, etc., ne peuvent porter des moisissures, ils peuvent attirer de la poussière qui, à son tour, portera des moisissures. Cependant, il convient de noter que l'emploi de produits contenant des fongicides est souvent recommandé pour la protection de certains matériaux.

Il convient d'éviter les pièges à humidité, qui peuvent se former lors de l'assemblage du matériel et dans lesquels les moisissures peuvent se développer. Exemples de ces pièges accidentels: les espaces compris entre des prises non étanches et leurs supports ou les espaces compris entre des cartes de circuits imprimés et leurs connecteurs latéraux dans certaines positions particulières.

L'étanchéité absolue du matériel avec une atmosphère interne sèche et propre est la technique la plus efficace pour empêcher le développement des moisissures.

Une dissipation de chaleur permanente dans une enceinte fermée peut maintenir un degré d'humidité relative suffisamment bas pour éviter le développement des moisissures.

Le fonctionnement d'un matériel dans un environnement convenablement contrôlé peut empêcher le développement nuisible des champignons.

Un dessiccateur régulièrement renouvelé, placé dans une enceinte partiellement étanche, peut y maintenir un degré d'humidité relative suffisamment bas pour empêcher le développement nuisible des champignons.

Le nettoyage soigneux et périodique d'un matériel sous coffret, éliminant toute poussière et moisissures accumulées (film nutritif), peut empêcher temporairement la détérioration.

Les fongicides incorporés dans des vernis, en tablettes, ou pulvérisés directement peuvent empêcher le développement des moisissures pendant un certain temps. Voir l'Article F.7.

Lorsque le matériau et le fonctionnement de l'équipement ne présentent pas de contre-indication, on peut utiliser les rayons ultraviolets ou de l'ozone pour stériliser.

Les courants d'air de vitesse adéquate, circulant sur ces parties du matériel, peuvent retarder le développement des moisissures.

Des acaricides peuvent être utilisés pour combattre l'action des acariens.

L'application de revêtements de protection tels que l'époxyde, les polymères silicone, les acryliques ou le parapolyxylylène sur les cartes imprimées réduit le mouillage de la surface par de la vapeur d'eau en voie de condensation et ainsi empêche la croissance de moisissures si le revêtement de protection en lui-même est résistant au développement de moisissures.

F.5 Conditions d'application de l'essai de moisissures

Il convient que l'essai de moisissures d'un matériel ne consiste normalement qu'à vérifier que les composants et les matériaux utilisés ont été correctement choisis, puisque tout essai de moisissures effectué sur un matériel complet sera souvent d'un coût prohibitif ou pourra donner des résultats assez douteux.

La plupart des renseignements utiles pourront généralement être obtenus d'une façon plus aisée et plus précise à partir d'essais sur des matériaux, des composants, des sous-ensembles, des parties d'assemblage de faibles dimensions, etc. (voir article F.4).

L'essai de la résistance des matériaux aux moisissures doit être effectué conformément à l'ISO 846 et doit être délégué aux laboratoires compétents.

NOTE Il est recommandé que les laboratoires de microbiologie testant les produits techniques soient accrédités conformément à l'ISO/IEC 17025.

L'essai selon la variante 1 est prévu comme épreuve finale exécutée sur des matériaux choisis de façon appropriée, au stade de la conception, contrôlés au préalable, et il ne doit pas, normalement, provoquer de contamination importante.

Lorsqu'une contamination est normalement prévue, il est conseillé d'appliquer à la fois les variantes 1 et 2 de façon à vérifier le fonctionnement des spécimens contaminés et non contaminés.

Ces essais ne peuvent pas se substituer au choix approprié des matériaux. Il est impossible d'imaginer une épreuve simplifiée qui puisse remplacer des essais préalables des matériaux et un examen, par spécialiste, des résultats obtenus.

Le choix des matériaux, contrôlés au préalable, est la précaution la plus importante à prendre lors de la conception de matériels destinés à fonctionner en milieu humide.

Lorsqu'une contamination grave des surfaces isolantes ne peut se produire, cet examen est souvent la seule précaution nécessaire et elle se révèle suffisante dans la majorité des cas, hormis dans les conditions les plus sévères.

Lorsque le matériel fonctionne dans des conditions favorisant le développement des moisissures pendant une petite partie de sa durée de vie seulement, ou bien lorsqu'une mesure de protection quelconque est observée, par exemple: appareil dans une enceinte fermée ou avec un chauffage permanent pour réduire l'humidité intérieure, il n'est pas indispensable d'effectuer l'essai des moisissures si les matériaux ont été correctement sélectionnés et de bons principes de construction employés.

Si ce n'est pas le cas, l'essai J n'est pas suffisant pour mettre en évidence toutes les sources possibles de perturbation.

L'essai J, en tant que contrôle final comporte seulement une petite sélection de souches choisies pour attaquer les matériaux qui sont utilisés dans l'industrie et qui sont très résistants aux moisissures.

Il indiquera donc la nature de tous les ennuis susceptibles de se produire sur des spécimens bien conçus.

Sur des spécimens mal conçus et constitués de matériaux impropres, ces essais ne peuvent mettre en évidence tous les défauts potentiels.

F.6 Types principaux d'effets

F.6.1 Envahissement par le mycélium et attaque de la surface après 28 jours d'incubation

F.6.1.1 Variante 1

Cette forme d'essai sera la plus utilisée. L'étendue de l'envahissement montre si l'on a utilisé des matériaux résistants. La localisation du mycélium indiquera les zones où des perturbations sont à craindre et où de plus grandes distances dans l'air ou lignes de fuite sont à prévoir.

L'attaque de la surface indiquera les endroits où une dégradation physique est susceptible de résulter d'un développement de moisissures.

F.6.1.2 Variante 2

Même si un produit est résistant, une croissance peut apparaître par la contamination en surface résultant des substances nutritives.

Dans ce cas, des effets secondaires peuvent se produire, comme une attaque par les métabolites produits par des croissances de moisissures ou, physiquement, par une pénétration du mycélium.

La variante 2 doit être utilisée pour vérifier les effets secondaires des moisissures sur les matériaux ou sur les caractéristiques des produits lorsque la croissance des moisissures est provoquée par une contamination significative de surface apportée par des substances nutritives.

La variante 2 peut aussi être utilisée pour vérifier l'efficacité d'un traitement fongicide sur l'éprouvette (voir F.7.2).

La variante 2 n'est pas une méthode appropriée pour simuler les conditions d'une contamination de surface très intense, par exemple due à une grande quantité de poussière organique ou d'insectes morts.

Afin d'avoir la certitude que des matériaux normalement résistants et des principes de conception corrects ont été utilisés, il convient que les spécimens soumis à la variante 2 de l'essai satisfassent aussi aux conditions de la variante 1.

Dans ce cas, il convient que l'essai de la variante 1 soit exécuté en utilisant des spécimens séparés.

F.6.2 Effet sur les caractéristiques du matériel encore humide après 28 jours d'incubation (variante 2) ou après 28 ou 56 jours d'incubation (variante 1)

Cette procédure donne une indication sur l'ordre et la nature des variations des caractéristiques susceptibles de se produire sur des produits fonctionnant dans des conditions produisant le développement des moisissures.

La présence d'humidité est en elle-même une cause de variations des caractéristiques; aussi est-il essentiel de faire deux séries de mesures; l'une sur des échantillons non contaminés par les moisissures, l'autre sur échantillons contaminés.

C'est la différence entre les deux séries de mesures qui donnera l'effet de la présence du mycélium humide.

Les composantes de la solution nutritive nécessaire pour la variante 2 peuvent elles-mêmes influer sur les caractéristiques du spécimen, par exemple en faisant diminuer la résistance superficielle.

Il peut être difficile de s'assurer, d'une façon précise, de la valeur de cette différence étant donné que la croissance de moisissure peut apparaître sur les spécimens non inoculés (spécimens de contrôle négatif) également lorsqu'ils ont été infectés par les spores depuis le tout début ou étaient infectés pendant l'essai.

Pour empêcher un développement spontané de moisissures, des précautions particulières doivent être prises.

F.6.3 Effet sur les caractéristiques après 24 h de reprise

Cette procédure donne une indication sur le degré et la nature de la variation dans les caractéristiques dues à l'existence du mycélium qui s'est développé durant une période d'humidité relative élevée et est ensuite séché sous une faible humidité relative.

Cette procédure est destinée aux produits devant être stockés dans des conditions où les moisissures prolifèrent, et qui, par la suite, sont installés et mis en fonctionnement dans une salle à air conditionné, par exemple.

Dans ce cas également, deux séries de mesures sont nécessaires pour distinguer les effets permanents dus à l'exposition à l'humidité de ceux qui sont dus à la présence de mycélium.

F.7 Emploi des fongicides

Une méthode souvent employée pour donner au matériel une résistance supplémentaire au développement préjudiciable des moisissures consiste à utiliser une substance fongicide appropriée pour prévenir ou empêcher le développement des champignons.

F.7.1 Conditions d'emploi

Lors d'un choix de fongicides pour équipements, les principes suivants doivent être observés.

Le fongicide ne doit pas créer une atmosphère toxique qui pourrait nuire au personnel au cours du fonctionnement, de l'entretien ou de l'essai du produit. Les composés organiques métalliques utiles comme fongicide sont des toxines telles que les composés mercuriques organiques volatils, par exemple.

Les composants volatils du fongicide ne doivent pas amener une détérioration des parties d'un matériel, telle que corrosion électrolytique de parties métalliques, chute de la résistance d'isolement ou de la rigidité diélectrique des surfaces des isolateurs, formation ou dépôt d'un film isolant sur les contacts des relais, des interrupteurs, etc.

Lorsque des composants sensibles à la lumière, tels que cellules photoélectriques, sont inclus dans le matériel, les produits volatils d'un fongicide ne doivent pas créer des couches absorbant la lumière sur les fenêtres du composant.

F.7.2 Performance de l'action du fongicide

Le fongicide doit être stable et durable à la plus haute température susceptible de régner à l'intérieur de l'appareil.

Il doit résister au délayage par des condensations répétées d'humidité sur les surfaces intérieures.

Il ne doit pas être volatil au point de disparaître avant le terme de la durée nécessaire de protection.

Si un effet à long terme du fongicide est nécessaire, la pression de sa vapeur doit être suffisante pour permettre le maintien d'une concentration efficace dans les cas où la croissance de moisissure pourrait donner lieu à des effets préjudiciables.

Même si un fongicide est destiné à fournir une protection prolongée, une évolution normale tend à créer un mutant de la moisissure qui résiste alors au fongicide utilisé. Il est donc souhaitable, lorsqu'une protection de longue durée est nécessaire, non seulement de renouveler périodiquement le fongicide, mais de le remplacer par un fongicide d'un type différent.

F.7.3 Durée de protection et essais

Un fongicide peut être choisi pour donner soit une protection pour quelques mois, pendant un séjour provisoire en atmosphère humide, soit au contraire, une protection pendant une période prolongée. Lorsque le fongicide est utilisé pour donner une protection de courte durée, il y a lieu d'effectuer la variante 1 avec le fongicide actif en place. Si l'on recherche une protection de longue durée et/ou l'on considère qu'une contamination de surface est possible, il convient d'appliquer également la variante 2.

Pour vérifier la permanence de l'action du fongicide, il peut être nécessaire d'effectuer des essais à haute température et/ou à haute humidité relative avant d'effectuer l'essai des moisissures. Lorsqu'un tel programme est jugé nécessaire, il convient de l'indiquer dans la spécification particulière.

Bibliographie

IEC 60068-1:2013, *Essais d'environnement – Partie 1: Généralités et lignes directrices*

_____

INTERNATIONAL
ELECTROTECHNICAL
COMMISSION

3, rue de Varembé
PO Box 131
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

Tel: + 41 22 919 02 11
Fax: + 41 22 919 03 00
info@iec.ch
www.iec.ch