
**Cosmétiques — Microbiologie —
Dénombrement et détection des bactéries
aérobies mésophiles**

*Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic
mesophilic bacteria*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21149:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21149:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006>

© ISO 2006

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions.....	1
4 Principes.....	2
4.1 Généralités	2
4.2 Dénombrement sur gélose en boîtes de Pétri	2
4.3 Filtration sur membrane.....	2
4.4 Détection des bactéries par enrichissement	3
5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture.....	3
5.1 Généralités	3
5.2 Diluants neutralisants et diluants	3
5.3 Diluant pour la suspension bactérienne (solution tryptone chlorure de sodium).....	4
5.4 Milieux de culture.....	4
6 Matériel et verrerie.....	7
7 Souches de micro-organismes	7
8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire	7
9 Mode opératoire.....	8
9.1 Recommandations générales.....	8
9.2 Préparation de la suspension mère.....	8
9.3 Méthodes de dénombrement.....	8
9.4 Enrichissement	9
10 Dénombrement des colonies (méthodes de dénombrement sur gélose et par filtration sur membrane).....	10
11 Détection de croissance (méthode par enrichissement).....	10
12 Expression des résultats	10
12.1 Méthode de calcul pour le dénombrement sur gélose en boîtes de Pétri	10
12.2 Interprétation.....	11
12.3 Exemples	12
12.4 Détection après enrichissement	14
13 Neutralisation des propriétés antimicrobiennes du produit.....	14
13.1 Généralités	14
13.2 Préparation de l'inoculum.....	14
13.3 Validation des méthodes de dénombrement.....	14
13.4 Validation de la méthode de détection par enrichissement.....	16
13.5 Interprétation des résultats de validation	16
14 Rapport d'essai	17
Annexe A (informative) Autres diluants neutralisants	18
Annexe B (informative) Autres diluants	20
Annexe C (informative) Autres milieux de culture	21
Annexe D (informative) Neutralisants de l'activité antimicrobienne des conservateurs et des liquides de rinçage	25
Bibliographie	26

Avant-propos

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

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

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

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 21149 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21149:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006>

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des lignes directrices générales pour le dénombrement et la détection des bactéries aérobies mésophiles présentes dans les cosmétiques,

- par dénombrement des colonies en milieu gélosé après une incubation aérobie, ou
- en vérifiant l'absence de croissance bactérienne après enrichissement.

En raison de la grande variété de produits cosmétiques entrant dans ce domaine d'application, la présente méthode peut ne pas être, en tout point, adaptée à certains produits (par exemple à certains produits non miscibles dans l'eau). Il est possible de remplacer les essais présentés ici par d'autres méthodes (automatisées, par exemple), sous réserve que leur équivalence ait été démontrée ou que la méthode ait été validée par ailleurs.

Au besoin, les micro-organismes dénombrés ou détectés peuvent être identifiés à l'aide d'essais d'identification appropriés, décrits dans les normes indiquées en Bibliographie.

Pour garantir la qualité du produit et la sécurité des consommateurs, il est conseillé d'effectuer une analyse de risque microbiologique appropriée, afin de déterminer les types de produits cosmétiques qui relèvent de la présente Norme internationale. Les produits dont on considère qu'ils présentent un faible risque microbiologique comprennent ceux ayant une faible activité de l'eau, les produits hydro-alcooliques, les produits ayant des valeurs de pH extrêmes, etc.

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 21148:2005, *Cosmétiques — Microbiologie — Instructions générales pour les examens microbiologiques*

3 Termes et définitions

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

3.1

bactéries aérobies mésophiles

bactéries mésophiles se développant en aérobie dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale

NOTE D'autres types de micro-organismes (par exemple des levures et des moisissures) peuvent également être détectés dans les conditions décrites.

3.2

produit

portion d'un produit cosmétique identifié, reçue au laboratoire pour essais

3.3

échantillon

portion du produit (au moins 1 g ou 1 ml) utilisée dans l'essai pour préparer la suspension mère

3.4

suspension mère

suspension (ou solution) d'un échantillon dans un volume défini d'un liquide approprié (diluant, agent neutralisant, bouillon ou combinaison de ceux-ci)

3.5

dilution(s) de l'échantillon

dilution(s) de la suspension mère

4 Principes

4.1 Généralités

Cette méthode est fondée sur le dénombrement de colonies sur un milieu gélosé non sélectif ou sur la présence ou l'absence de croissance bactérienne après enrichissement. L'inhibition potentielle de la croissance bactérienne par l'échantillon doit être neutralisée pour permettre la détection des micro-organismes viables [1]. Dans tous les cas et quelle que soit la méthode employée, la neutralisation des propriétés antimicrobiennes du produit doit être vérifiée et validée [2] [3] [4].

4.2 Dénombrement sur gélose en boîtes de Pétri

Le dénombrement sur gélose comprend les étapes suivantes.

- Préparation des géloses pour ensemencement en profondeur ou pour étalement en surface, au moyen d'un milieu de culture défini, et inoculation des géloses avec une quantité définie de la suspension mère ou d'une dilution du produit.
- Incubation aérobie des géloses à $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ pendant $72\text{ h} \pm 6\text{ h}$.
- Dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC) et calcul du nombre de bactéries aérobies mésophiles par millilitre ou par gramme de produit.

4.3 Filtration sur membrane

La filtration sur membrane comprend les étapes suivantes.

- Transfert d'une quantité adaptée d'échantillon préparé selon une méthode validée dans l'appareil de filtration humidifié à l'aide d'un faible volume de diluant approprié stérile, filtration immédiate et lavage selon un mode opératoire validé (voir 13.3.4). Transfert de la membrane de filtration à la surface du milieu gélosé spécifié, comme indiqué dans l'ISO 21148.
- Incubation aérobie des membranes à $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ pendant $72\text{ h} \pm 6\text{ h}$.
- Dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC) et calcul du nombre de bactéries aérobies mésophiles par millilitre ou par gramme de produit.

4.4 Détection des bactéries par enrichissement

La détection des bactéries par enrichissement comprend les étapes suivantes.

- Incubation à $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$, pendant au moins 20 h, d'une quantité définie de la suspension mère dans un milieu liquide non sélectif contenant des agents neutralisants et/ou des agents de dispersion appropriés.
- Transfert d'une quantité définie de la suspension précédente sur un milieu gélosé solide non sélectif.
- Incubation aérobie à $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ pendant 48 h à 72 h.
- Détection de la croissance et expression des résultats sous la forme de «présence/absence» de bactéries aérobies mésophiles par échantillon *S* du produit.

5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture

5.1 Généralités

Les spécifications générales sont indiquées dans l'ISO 21148. Lorsque de l'eau est mentionnée dans une formulation, utiliser de l'eau distillée ou purifiée telle qu'indiquée dans l'ISO 21148.

Les diluants, agents neutralisants et milieux de culture suivants conviennent pour le dénombrement et la détection de bactéries aérobies mésophiles. D'autres diluants, agents neutralisants et milieux de culture peuvent être utilisés s'il a été démontré qu'ils sont adaptés pour cet emploi.

5.2 Diluants neutralisants et diluants

ISO 21149:2006

5.2.1 Généralités <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-a2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006>

Le diluant est utilisé pour disperser l'échantillon. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai possède des propriétés antimicrobiennes. L'efficacité de la neutralisation doit être démontrée avant la détermination de la concentration microbienne (voir Article 13). Des informations relatives à des agents neutralisants appropriés sont fournies dans l'Annexe D.

5.2.2 Diluants neutralisants

5.2.2.1 Milieu à la peptone de caséine-lécithine de soja-polysorbate 20 (bouillon SCDLP 20)

5.2.2.1.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine	20,0 g
Lécithine de soja	5,0 g
Polysorbate 20	40,0 ml
Eau	960,0 ml

5.2.2.1.2 Préparation

Dissoudre le polysorbate 20 dans 960 ml d'eau en mélangeant tout en chauffant dans un bain-marie à $49\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Ajouter la peptone pancréatique de caséine et la lécithine de soja. Chauffer pendant environ 30 min afin d'obtenir une solution. Mélanger et répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.2.2.2 Autres diluants neutralisants

D'autres diluants neutralisants peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe A et Annexe D).

5.2.3 Diluant

5.2.3.1 Liquide A

5.2.3.1.1 Composition

Peptone pepsique de tissus animaux	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.1.2 Préparation

Dissoudre 1 g de peptone dans l'eau pour obtenir 1 l. Chauffer en agitant fréquemment. Répartir dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, le pH doit être de $7,1 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.2.3.2 Autres diluants

D'autres diluants peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe B).

5.3 Diluant pour la suspension bactérienne (solution tryptone chlorure de sodium)

5.3.1 Composition

Tryptone, peptone pancréatique de caséine	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau	1 000 ml

5.3.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en mélangeant tout en chauffant. Répartir dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, le pH doit être de $7,0 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.4 Milieux de culture

5.4.1 Généralités

Les milieux de culture peuvent être préparés comme suit ou à partir de milieux de culture déshydratés en respectant les instructions du fabricant. Des milieux prêts à l'emploi peuvent être utilisés si leur composition et/ou leur rendement de croissance sont comparables à ceux des formulations indiquées ci-après.

5.4.2 Milieux de culture pour le dénombrement

5.4.2.1 Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (SCDA) ou gélose trypto-caséine soja (TSA)

5.4.2.1.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine	15,0 g
Peptone papaïque de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en mélangeant tout en chauffant. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation et refroidissement, le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.4.2.2 Autres milieux pour le dénombrement

D'autres milieux peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe C).

5.4.3 Milieux de culture pour la détection par enrichissement

5.4.3.1 Généralités

Un bouillon d'enrichissement et un milieu gélosé doivent être utilisés pour la détection de bactéries, lorsque cette méthode est sélectionnée.

Le bouillon d'enrichissement sert à disperser l'échantillon et à accroître la population microbienne initiale. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai possède des propriétés antimicrobiennes.

5.4.3.2 Bouillon d'enrichissement: bouillon Eugon LT 100

5.4.3.2.1 Généralités

Ce milieu contient

- des ingrédients qui neutralisent les substances inhibitrices présentes dans l'échantillon: lécithine et polysorbate 80, et
- un agent dispersant: octoxynol 9.

5.4.3.2.2 Composition

Peptone pancréatique de caséine	15,0 g
Peptone papaïque de soja	5,0 g
L-cystine	0,7 g

ISO 21149:2006(F)

Chlorure de sodium	4,0 g
Sulfite de sodium	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lécithine d'œuf	1,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.3.2.3 Préparation

Dissoudre successivement dans l'eau bouillante le polysorbate 80, l'octoxynol 9 et la lécithine d'œuf jusqu'à dissolution complète. Dissoudre les autres composants en mélangeant tout en chauffant. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, le pH doit être de $7,0 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.4.3.3 Milieux gélosés pour la détection par enrichissement

5.4.3.3.1 Milieu gélosé Eugon LT 100

5.4.3.3.1.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine	15,0 g
Peptone papaique de soja	5,0 g
L-cystine	0,7 g
Chlorure de sodium	4,0 g
Sulfite de sodium	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lécithine d'œuf	1,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.3.3.1.2 Préparation

Dissoudre successivement dans l'eau bouillante le polysorbate 80, l'octoxynol 9 et la lécithine d'œuf jusqu'à dissolution complète. Dissoudre les autres composants en mélangeant tout en chauffant. Mélanger doucement pour éviter toute formation de mousse. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation et refroidissement, le pH doit être de $7,0 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à la température ambiante.

5.4.3.3.2 Autres milieux gélosés pour la détection par enrichissement

D'autres milieux peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe C).

5.4.4 Milieu gélosé pour la culture de souches de référence

Utiliser le milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (SCDA) ou la gélose trypto-caséine soja (TSA) (5.4.2.1).

6 Matériel et verrerie

Les équipements, le matériel et la verrerie de laboratoire sont décrits dans l'ISO 21148.

7 Souches de micro-organismes

Afin de vérifier l'efficacité des agents neutralisants, deux souches représentatives aussi bien des micro-organismes Gram négatifs que Gram positifs [2] [5], respectivement, sont utilisées:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (souche équivalente: CIP 82.118 ou NCIMB 8626 ou NBRC 13275 ou KCTC 2513, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale);
- *Staphylococcus aureus* ATCC¹⁾ 6538 (souche équivalente: CIP²⁾ 4.83 ou NCIMB³⁾ 9518 ou NBRC⁴⁾ 13276 ou KCTC⁵⁾ 1916, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale).

Une alternative à la souche Gram négative peut être *Escherichia coli* ATCC 8739 (souche équivalente: CIP 53.126 ou NCIMB 8545 ou NBRC 3972 ou KCTC 2571, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale).

ISO 21149:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588d04764d/iso-21149-2006>

Il convient de reconstituer la culture conformément aux méthodes indiquées par le fournisseur de la souche de référence.

Les souches peuvent être conservées au laboratoire conformément à l'EN 12353.

8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire

Si nécessaire, conserver les produits à soumettre à essai à température ambiante. Ne pas incuber, réfrigérer ou congeler les produits (3.2) et les échantillons (3.3) avant ou après analyse.

Il convient d'effectuer l'échantillonnage des produits cosmétiques à analyser, tel que décrit dans l'ISO 21148. Analyser les échantillons selon l'ISO 21148 et selon le mode opératoire suivant.

1) ATCC = American Type Culture Collection (Collection américaine de cultures types).

2) CIP = Collection de l'Institut Pasteur.

3) NCIMB = National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Collection nationale de bactéries industrielles et marines).

4) NBRC = National Biological Resource Center (Centre de national de ressources biologiques).

5) KCTC = Korean Collection for Type Culture (Collection coréenne de cultures types).

9 Mode opératoire

9.1 Recommandations générales

Utiliser du matériel et des équipements stériles ainsi que des techniques aseptiques pour préparer l'échantillon, la suspension mère et les dilutions. En cas de préparation d'une suspension mère, le temps écoulé entre la fin de la préparation et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min, sauf indications particulières mentionnées dans les protocoles ou dans la documentation préétablis.

9.2 Préparation de la suspension mère

9.2.1 Généralités

La suspension mère est préparée à partir d'un échantillon (3.3) d'au moins 1 g ou 1 ml du produit à analyser (3.2) préalablement mélangé avec soin.

Noter S comme le volume ou la masse exact(e) de l'échantillon.

La suspension mère est généralement une dilution 1:10. De plus grands volumes de diluant ou de bouillon d'enrichissement peuvent être nécessaires si des niveaux élevés de contamination sont attendus et/ou si des propriétés antimicrobiennes persistent dans la dilution 1:10.

9.2.2 Produits miscibles dans l'eau

Transférer l'échantillon S de produit dans un volume adéquat (par exemple 9 ml) de diluant neutralisant (5.2.2) ou de diluant (5.2.3) ou de bouillon d'enrichissement (5.4.3.2), selon la méthode utilisée (9.3 ou 9.4).

Noter d le facteur de dilution.

ISO 21149:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9945a4a6-af2c-40b0-bd89-5588fd04764d/iso-21149-2006>

9.2.3 Produits non miscibles dans l'eau

Transférer l'échantillon S de produit dans un récipient approprié contenant une quantité adéquate d'agent solubilisant (polysorbate 80, par exemple). Disperser l'échantillon dans l'agent solubilisant et ajouter un volume approprié (par exemple 9 ml) de diluant neutralisant (5.2.2) ou de diluant (5.2.3) ou de bouillon d'enrichissement (5.4.3.2), selon la méthode utilisée (9.3 ou 9.4).

Noter « d » le facteur de dilution.

9.3 Méthodes de dénombrement

9.3.1 Dilutions pour les méthodes de dénombrement

La suspension mère est généralement la première dilution dénombrée. Au besoin, d'autres dilutions en série (dilution 1:10, par exemple) peuvent être réalisées à partir de la suspension mère en utilisant le même diluant (en fonction du niveau de contamination attendu pour le produit).

Le dénombrement est généralement effectué en utilisant au moins deux boîtes de Pétri. Cependant, il est possible de n'utiliser qu'une seule boîte de Pétri dans le cas d'un essai de routine ou si les dénombrements sont réalisés sur des dilutions successives du même échantillon ou en fonction de résultats antérieurs.