
**Косметика. Микробиология. Подсчет и
обнаружение аэробных
мезофилических бактерий**

*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>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 21149:2006(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21149:2006

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



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2006

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office

Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20

Tel. + 41 22 749 01 11

Fax + 41 22 734 09 47

E-mail copyright @ iso.org

Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	1
4 Принцип	2
4.1 Общие положения	2
4.2 Определение титра чашечным методом	2
4.3 Мембранная фильтрация.....	2
4.4 Обнаружение бактерий посредством обогащения	3
5 Разбавители, нейтрализаторы и культуральные среды	3
5.1 Общие положения	3
5.2 Нейтрализующие разбавители и разбавители	3
5.3 Разбавитель для бактериальной суспензии (раствор триптонохлорида натрия)	5
5.4 Культуральная среда.....	5
6 Аппаратура и стеклянная посуда	7
7 Штаммы микроорганизмов	8
8 Обращение с косметическими продуктами и лабораторными пробами	8
9 Методика	8
9.1 Общая рекомендация.....	8
9.2 Приготовление исходной суспензии	8
9.3 Методы подсчета	9
9.4 Обогащение	10
10 Подсчет колоний (определение титра чашечным методом и методами мембранного фильтрования).....	11
11 Обнаружение роста (обогатительный метод).....	11
12 Выражение результатов	11
12.1 Метод вычисления для определения титра чашечным способом	11
12.2 Истолкование	12
12.3 Примеры.....	13
12.4 Обнаружение после обогащения.....	15
13 Нейтрализация антимикробных свойств продукта	15
13.1 Общие положения	15
13.2 Приготовление инокулята	15
13.3 Подтверждение методов подсчета	15
13.4 Подтверждение метода обнаружения обогащением.....	17
13.5 Истолкование результатов подтверждения	17
14 Протокол испытания.....	18
Приложение А (информативное) Прочие нейтрализующие разбавители	19
Приложение В (информативное) Прочие разбавители.....	21
Приложение С (информативное) Прочие культуральные среды.....	22
Приложение D (информативное) Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывных жидкостей	25
Библиография.....	26

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией, объединяющей национальные органы по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по разработке международных стандартов, как правило, ведется в технических комитетах ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в разработке теме, ради которой был образован данный технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, поддерживающие связь с ISO, также принимают участие в ее работе. ISO тесно сотрудничает с Международной Электротехнической Комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Части 2 Директив ISO/IEC.

Основное назначение технических комитетов заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Для опубликования международного стандарта требуется собрать не менее 75 % положительных голосов комитетов-членов, принявших участие в голосовании.

Обращается внимание на тот факт, что некоторые элементы настоящего документа могут являться предметом патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию части или всех подобных патентных прав.

ISO 21149 разработан Техническим комитетом ISO/TC 217, *Косметика*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21149:2006

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

Косметика. Микробиология. Подсчет и обнаружение аэробных мезофилических бактерий

1 Область применения

Настоящий международный стандарт приводит общие указания по подсчету и обнаружению мезофилических бактерий, присутствующих в косметических продуктах,

- посредством подсчета колоний на агарной среде после аэробной инкубации, или
- посредством проверки отсутствия бактериального роста после обогащения.

Из-за слишком большого разнообразия косметических продуктов в данной области применения этот метод может оказаться непригодным к определенным продуктам во всех отношениях (например, некоторые не смешивающиеся с водой продукты). Другие методы могут оказаться целесообразными. Отличные методы (например, автоматизированные) могут заменить тесты, представленные здесь, при условии, что их эквивалентность была продемонстрирована или выбранный метод был подтвержден как-то иначе.

Если необходимо, подсчитанные и обнаруженные микроорганизмы могут быть идентифицированы с помощью соответствующих идентификационных тестов, описанных в стандартах, приведенных в библиографии.

Чтобы обеспечить качество и безопасность продукта потребителям, целесообразно проведение соответствующего анализа микробиологического риска с целью определения типов косметических продуктов, на которые распространяется настоящий международный стандарт. Продукты, рассматриваемые как представляющие низкий микробиологический риск, включают те изделия, которые характеризуются низкой активностью воды, водоспиртовые продукты, экстремальные значения pH и т.д.

2 Нормативные ссылки

Следующие нормативные документы являются обязательными для применения с настоящим международным стандартом. Для жестких ссылок применяются только указанное по тексту издание. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 21148:2005, *Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю*

3 Термины и определения

Исходя из назначения данного документа, применимы следующие термины и определения.

3.1

аэробные мезофилические бактерии **aerobic mesophilic bacteria**

мезофилические бактерии, произрастают аэробно в условиях, установленных в настоящем международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ В описанных условиях могут быть обнаружены другие типы микроорганизмов (например, дрожжи, плесень).

3.2

продукт
product

часть идентифицированного косметического продукта, полученная в лаборатории для тестирования

3.3

проба
sample

часть продукта (не менее 1 г или 1 мл), которая используется в испытании для приготовления исходной суспензии

3.4

исходная суспензия
initial suspension

суспензия (или раствор) образца в определенном объеме соответствующей жидкости (разбавитель, нейтрализатор, бульон или их сочетания)

3.5

пробное разбавление
sample dilution

разбавление исходной суспензии

4 Принцип

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4.1 Общие положения

Данный метод касается подсчета и обнаружения колоний на неселективной агарной среде или посредством присутствия или отсутствия бактериального роста после обогащения. Вероятное торможение микробного роста пробой должно быть нейтрализовано, чтобы можно было обнаружить жизнеспособный микроорганизм [1]. Во всех случаях и независимо от методологии нейтрализация антимикробных свойств продукта должна быть проверена и подвержена [2] [3] [4].

4.2 Определение титра чашечным методом

Определение титра чашечным методом состоит из следующих стадий.

- Приготовление разлитых планшетов или пастообразных планшетов, используя заданную культуральную среду, и инокуляция планшетов, используя определенное количество исходной суспензии или разбавление продукта.
- Аэробная инкубация планшетов при температуре $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение $72\text{ ч} \pm 6\text{ ч}$.
- Подсчет числа колониеобразующих единиц (colony forming units)(CFU) и вычисление числа аэробных мезофилических бактерий на миллилитр или грамм продукта.

4.3 Мембранная фильтрация

Мембранная фильтрация состоит из следующих стадий:

- Переносят соответствующее количества пробы, приготовленной как действительная, в фильтровальное устройство, смоченное небольшим количеством соответствующего стерильного разбавителя, сразу же фильтруют и промывают в соответствии с установленной методикой (см. 13.3.4). Переносят мембранный фильтр на поверхность заданной агарной среды согласно ISO 21148.
- Аэробная инкубация мембран при температуре $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ в течение $72\text{ ч} \pm 6\text{ ч}$.
- Подсчет числа колониеобразующих единиц (CFU) и вычисление числа аэробных мезофилических бактерий на миллилитр или грамм продукта.

4.4 Обнаружение бактерий посредством обогащения

Обнаружение бактерий посредством обогащения состоит из следующих стадий:

- Инкубация при температуре $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ в течение не менее 20 ч определенного количества исходной суспензии в неселективной жидкой среде, содержащей соответствующие нейтрализаторы и/или диспергирующие агенты.
- Перенос определенного количества предыдущей суспензии на неселективную твердую агарную среду.
- Аэробная инкубация при температуре $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ в течение 48 ч - 72 ч.
- Обнаружение роста и выражение результатов как “присутствие/отсутствие” аэробных мезофилических бактерий на пробу *S* продукта.

5 Разбавители, нейтрализаторы и культуральные среды

5.1 Общие положения

Общие технические условия приводятся в ISO 21148. Если в формуле присутствует вода, используют дистиллированную воду или очищенную воду согласно ISO 21148.

Следующие разбавители, нейтрализаторы и культуральные среды пригодны для подсчета и обнаружения аэробных мезофилических бактерий. Прочие разбавители, нейтрализаторы и культуральные среды могут использоваться, если будет продемонстрировано, что они пригодны для использования.

5.2 Нейтрализующие разбавители и разбавители

5.2.1 Общие положения

Разбавитель используется для диспергирования пробы. Он может содержать нейтрализаторы, если тестируемая проба обладает антимикробными свойствами. Эффективность диспергирования должна быть продемонстрирована перед определением подсчета (см. Раздел 13). Информация относительно соответствующих нейтрализаторов приводится в Приложении D.

5.2.2 Нейтрализующие разбавители

5.2.2.1 Жидкая среда казеинового гидролизата – соевого лецитина –полисорбата 20 (SCDLP 20 бульон)

5.2.2.1.1 Химический состав

Панкреатический гидролизат казеина	20,0 г
Соевый лецитин	5,0 г
Полисорбат 20	40,0 мл
Вода	960,0 мл

5.2.2.1.2 Приготовление

Растворяют полисорбат 20 в 960 мл воды, перемешивая при нагревании, в водяной бане при температуре $49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Добавляют панкреатический гидролизат казеина и соевый лецитин. Нагревают приблизительно 30 мин для получения раствора. Смешивают и диспергируют среду в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. После стерилизации pH должен быть эквивалентен $7,3 \pm 0,2$, когда проводят измерение при комнатной температуре.

5.2.2.2 Прочие нейтрализующие агенты

Прочие нейтрализующие агенты могут использоваться, если это целесообразно (см. Приложение А и Приложение D).

5.2.3 Разбавитель

5.2.3.1 Жидкость А

5.2.3.1.1 Химический состав

Пептический гидролизат животной ткани	1,0 г
Вода	1 000 мл

5.2.3.1.2 Приготовление

Растворяют 1 г пептона в воде для получения 1 л. Нагревают с частым перемешиванием. Дозируют в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. После стерилизации pH должен быть эквивалентен $7,1 \pm 0,2$, когда проводят измерение при комнатной температуре.

5.2.3.2 Прочие разбавители

Прочие нейтрализующие агенты могут использоваться, если это целесообразно (см. Приложение В).

5.3 Разбавитель для бактериальной суспензии (раствор триптонохлорида натрия)

5.3.1 Химический состав

Триптон, панкреатический гидролизат казеина	1,0 г
Хлорид натрия	8,5 г
Вода	1 000 мл

5.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде путем смешивания при нагревании. Дозируют в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации рН должен быть эквивалентен $7,0 \pm 0,2$, когда измеряют при комнатной температуре.

5.4 Культуральная среда

5.4.1 Общее

Культуральные среды могут быть приготовлены нижеследующим образом или из дегидрированных культуральных сред в соответствии с инструкциями изготовителя. Готовые к использованию среды могут использоваться, когда их химический состав и/или урожайи клеток сравнимы с формулами, приводимыми ниже.

5.4.2 Культуральные среды для подсчета

5.4.2.1 Агарная среда соево-казеинового гидролизата (SCDA) или триптического соевого агара (TSA)

ISO 21149:2006

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

5.4.2.1.1 Химический состав

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаический гидролизат соевой муки	5,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода	1 000 мл

5.4.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или полностью дегидрированную среду в воде путем смешивания при нагревании. Дозируют в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения рН должен быть эквивалентен $7,3 \pm 0,2$, когда проводят измерение при комнатной температуре.

5.4.2.2 Прочие среды для подсчета

Прочие среды могут использоваться, если это целесообразно (см. Приложение С).

5.4.3 Культуральные среды для обнаружения

5.4.3.1 Общие положения

Будучи выбранным, обогатительный бульон и агарная среда должны использоваться для бактериального обнаружения.

Обогатительный бульон используется для диспергирования пробы и увеличения начальной микробной популяции. Он может содержать нейтрализаторы, если проба, подлежащая тестированию, обладает антимикробными свойствами.

5.4.3.2 Обогатительный бульон: Эвгон LT 100 бульон

5.4.3.2.1 Общие положения

Данная среда содержит ингредиенты

- которые нейтрализуют вещества, присутствующие в пробе: лецитин и полисорбат 80,
- диспергирующий агент: октоксинол 9.

5.4.3.2.2 Химический состав

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаиновый гидролизат соевой муки	5,0 г
L-цистин	0,7 г
Хлорид натрия	4,0 г
Сульфит натрия	0,2 г
Глюкоза	5,5 г
Яичный лецитин	1,0 г
Полисорбат 80	5,0 г
Октоксинол 9	1,0 г
Вода	1 000 мл

5.4.3.2.3 Приготовление

Растворяют последовательно полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин в кипящей воде до полного их растворения. Растворяют другие компоненты в воде путем смешивания при нагревании. Дозируют среду в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °C в течение 15 мин. После стерилизации pH должен быть эквивалентен $7,0 \pm 0,2$, когда проводят измерение при комнатной температуре.

5.4.3.3 Агарная среда для обнаружения

5.4.3.3.1 Эвгон LT 100 агарная среда

5.4.3.3.1.1 Химический состав

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаический гидролизат соевой муки	5,0 г
L-цистин	0,7 г
Хлорид натрия	4,0 г
Сульфит натрия	0,2 г
Глюкоза	5,5 г
Яичный лецитин	1,0 г
Полисорбат 80	5,0 г
Октоксинол 9	1,0 г
Агар	15,0 г
Вода	1 000 мл

5.4.3.3.1.2 Приготовление

Растворяют последовательно полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин в кипящей воде до полного их растворения. Растворяют другие компоненты путем смешивания при нагревании. Осторожно перемешивают, чтобы исключить образование пены. Дозируют среду в соответствующие контейнеры. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH должен быть эквивалентен $7,0 \pm 0,2$, когда проводят измерение при комнатной температуре.

5.4.3.2.2 Прочие агарные среды для обнаружения

Прочие среды могут использоваться, если это целесообразно (см. Приложение С).

5.4.4 Агарная среда для культивирования эталонных штаммов

Используют агарную среду соево-казеинового гидролизата (SCDA) или триптоновый соевый агар (TSA) (5.4.2.1).

6 Аппаратура и стеклянная посуда

Лабораторное оборудование, аппаратура и стеклянная посуда описаны в ISO 21148.

7 Штаммы микроорганизмов

Для тестирования эффективности нейтрализаторов используют два штамма, типичные для микроорганизмов как грамотрицательные, так и грамположительные [2] [5] соответственно:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (эквивалентный штамм: CIP 82.118, или NCIMB 8626, или NBRC 13275, или KCTC 2513, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции);
- *Staphylococcus aureus* ATCC¹⁾ 6538 (эквивалентный штамм: CIP²⁾ 4.83, или NCIMB³⁾, 9518 или NBRC⁴⁾ 13276, или KCTC⁵⁾ 1916, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции).

Альтернативой грамотрицательному штамму могут служить: *Escherichia coli* ATCC 8739 (эквивалентный штамм: CIP 53.126, или NCIMB 8545, или NBRC 3972, или KCTC 2571 или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции).

Культура должна быть восстановлена сообразно методик, предусмотренных поставщиком эталонного штамма.

Штаммы могут храниться в лаборатории в соответствии с EN 12353.

8 Обращение с косметическими продуктами и лабораторными пробами

Если необходимо, хранят продукты, подлежащие тестированию, при комнатной температуре. Не инкубируют, замораживают или охлаждают продукты (3.2) и пробы (3.3) до или после анализа.

Взятие проб косметических продуктов, подлежащих анализу, должно осуществляться согласно описанию, приведенному в ISO 21148. Анализируют пробы согласно описанию, приведенному в ISO 21148, и в соответствии со следующей методикой.

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

9 Методика

9.1 Общая рекомендация

Используют стерильный материал, оборудование и асептические методы для приготовления пробы, исходной суспензии и разбавлений. Для случая приготовления исходной суспензии, время, которое прошло между окончанием приготовления и моментом, когда инокулят вступает в контакт с культуральной средой, не должно превышать 45 мин, если не оговаривается особо в установленных протоколах или документах.

9.2 Приготовление исходной суспензии

9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию приготавливают из пробы (3.3) не менее 1 г или 1 мл хорошо смешанного испытываемого продукта (3.2).

-
- 1) ATCC = Американская коллекция типовых культур.
 - 2) CIP = Коллекция Института Пастера.
 - 3) NCIMB = Национальная коллекция промышленных и морских бактерий.
 - 4) NBRC = Национальный биологический исследовательский центр.
 - 5) KCTC = Корейская коллекция типовых культур.