

---

---

**Cosmétiques — Microbiologie —  
Dénombrement des levures et des  
moisissures**

*Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould*

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

[ISO 16212:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>



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

ISO 16212:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2017, Publié en Suisse

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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principes</b> .....	<b>2</b>
4.1    Généralités.....	2
4.2    Dénombrement sur gélose en boîtes de Petri.....	2
4.3    Filtration sur membrane.....	2
<b>5</b> <b>Diluants, agents neutralisants et milieux de culture</b> .....	<b>3</b>
5.1    Généralités.....	3
5.2    Diluants neutralisants et diluants.....	3
5.3    Diluant pour la suspension de levure (solution tryptone sel).....	4
5.4    Milieux de culture.....	4
<b>6</b> <b>Matériel et verrerie</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b> <b>Souches de micro-organismes</b> .....	<b>6</b>
<b>8</b> <b>Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire</b> .....	<b>6</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
9.1    Recommandations générales.....	6
9.2    Préparation de la suspension initiale.....	6
9.2.1    Généralités.....	6
9.2.2    Produits miscibles dans l'eau.....	7
9.2.3    Produits non miscibles dans l'eau.....	7
9.3    Méthodes de dénombrement.....	7
9.3.1    Dilutions pour les méthodes de dénombrement.....	7
9.3.2    Méthodes de dénombrement sur gélose en boîtes de Petri.....	7
<b>10</b> <b>Dénombrement des colonies (méthodes de dénombrement sur gélose en boîtes de Petri et par filtration sur membrane)</b> .....	<b>8</b>
<b>11</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>8</b>
11.1    Méthode de calcul pour le dénombrement sur gélose en boîtes de Petri.....	8
11.2    Interprétation.....	9
<b>12</b> <b>Neutralisation des propriétés fongicides du produit</b> .....	<b>11</b>
12.1    Généralités.....	11
12.2    Préparation de l'inoculum.....	11
12.3    Applicabilité des méthodes de dénombrement.....	11
12.3.1    Principes.....	11
12.3.2    Essai d'applicabilité de la méthode par ensemencement en profondeur.....	12
12.3.3    Applicabilité de la méthode par étalement en surface.....	12
12.3.4    Applicabilité de la méthode par filtration sur membrane.....	12
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe A (informative) Autres diluants neutralisants</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe B (informative) Autres diluants</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe C (informative) Autres milieux de culture</b> .....	<b>17</b>
<b>Annexe D (informative) Neutralisants de l'activité fongicide des conservateurs et des liquides de rinçage</b> .....	<b>19</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>21</b>

## Avant-propos

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

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

L'attention est 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

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

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

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 16212:2008), qui a fait l'objet d'une révision mineure. Les modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- dans le domaine d'application, «voir l'ISO 29621» a été ajouté et la référence a été ajoutée à la Bibliographie;
- dans le domaine d'application, «validée» a été remplacé par «indiquée comme adéquate»;
- en 4.1, «validée» a été remplacé par «démontrée»;
- en 4.3, «selon une méthode validée» a été remplacé par «tel que décrit dans l'Article 12» et «opérateur validé» a été remplacé par «opérateur décrit»;
- en 5.1, «spécifications» a été remplacé par «instructions»;
- en 5.2.3.1.2, «de peptone» a été remplacé par «d'hydrolysate pepsique de tissus animaux»;
- dans l'Article 7, «validation» a été remplacé par «applicabilité»;
- en 9.3.2.1, «validé» a été remplacé par «démontré comme étant applicable»;
- en 9.3.2.3, «validée» a été remplacé par «démontrée comme étant applicable»;
- en 11.2.1, «validées selon» a été remplacé par «démontrées comme étant applicables pour»;
- en 12.3, «validation» a été remplacé par «applicabilité»;

- en [12.3.2](#), les occurrences de «validation» ont été remplacées par «essai d'applicabilité» et «validés» a été remplacé par «satisfaisants»;
- en [12.3.3](#), la première occurrence de «validation» a été remplacée par «applicabilité» et la deuxième occurrence a été remplacée par «essai d'applicabilité»; «validés» a été remplacé par «satisfaisants»;
- en [12.3.4](#), la première occurrence de «validation» a été remplacée par «applicabilité» et la deuxième occurrence a été remplacée par «essai d'applicabilité»; «validés» a été remplacé par «satisfaisants»;
- dans [l'Article 13](#) f), «validation» a été remplacé par «applicabilité»;
- en [A.1](#), [B.1](#), [C.1](#), «validé» a été remplacé par «démontré comme étant applicable».

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

[ISO 16212:2017](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>

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

ISO 16212:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>

# Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement des levures et des moisissures

## 1 Domaine d'application

Le présent document donne des lignes directrices générales pour le dénombrement des levures et des moisissures présentes dans les cosmétiques par dénombrement des colonies en milieu gélosé sélectif après une incubation aérobie.

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 du présent document. Les produits considérés comme présentant un faible risque microbiologique (voir l'ISO 29621) comprennent ceux ayant une faible activité de l'eau ou des valeurs de pH extrêmes, les produits hydro-alcooliques, etc.

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

Les levures dénombrées peuvent être identifiées à l'aide d'essais d'identification appropriés, par exemple ceux décrits dans les normes indiquées dans la Bibliographie. Les moisissures dénombrées peuvent être identifiées en utilisant d'autres méthodes appropriées, si nécessaire.

## 2 Références normatives

ISO 16212:2017  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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, *Cosmétiques — Microbiologie — Instructions générales pour les examens microbiologiques*

EN 12353, *Antiseptiques et désinfectants chimiques — Conservation des microorganismes d'essai utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide (Legionella incluses), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide (bactériophages inclus)*

## 3 Termes et définitions

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

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

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

### 3.1

#### levure

champignon unicellulaire qui se multiplie principalement de manière végétative en bourgeonnant, capable de se développer dans les conditions d'essais spécifiées dans le présent document

### 3.2

#### **moisissure**

mycélium formant des micromycètes, y compris les spores et les conidies, capable de se développer dans les conditions d'essai spécifiées dans le présent document

### 3.3

#### **produit**

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

### 3.4

#### **échantillon**

portion du *produit* (3.3) (au moins 1 g ou 1 ml) utilisée dans l'essai pour préparer la suspension initiale

### 3.5

#### **suspension initiale**

suspension (ou solution) de l'*échantillon* (3.4) dans un volume défini d'un bouillon d'enrichissement approprié

### 3.6

#### **dilution de l'échantillon**

dilution de la *suspension initiale* (3.5)

## 4 Principes

### 4.1 Généralités

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

La présente méthode implique le dénombrement des colonies dans un milieu gélosé sélectif. L'inhibition possible du développement fongique par l'échantillon doit être neutralisée pour permettre la détection des micro-organismes viables<sup>[5]</sup>. Dans tous les cas et quelle que soit la méthodologie, la neutralisation des propriétés fongicides du produit doit être vérifiée et démontrée<sup>[6] [8] [9]</sup>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/0000070-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>

### 4.2 Dénombrement sur gélose en boîtes de Petri

Le dénombrement sur gélose en boîtes de Petri comprend les étapes suivantes.

- Préparation des boîtes de géloses pour ensemencement en profondeur ou pour étalement en surface, au moyen d'un milieu de culture défini, et ensemencement des boîtes de gélose avec une quantité définie de la suspension initiale ou d'une dilution du produit.
- Incubation aérobie des géloses de 3 jours à 5 jours à 25 °C ± 2,5 °C.
- Dénombrement du nombre d'unités formant colonie (UFC) et dénombrement du nombre de levures et de moisissures par millilitre ou par gramme de produit.

NOTE Une condition d'incubation de 5 jours à 7 jours à 22,5 °C ± 2,5 °C en utilisant un milieu de culture sans antibiotique est également possible.

### 4.3 Filtration sur membrane

La filtration sur membrane comprend les étapes suivantes.

- Transfert d'une quantité adaptée d'échantillon préparé tel que décrit dans l'[Article 12](#) dans l'appareil de filtration humidifié à l'aide d'un faible volume de diluant approprié stérile, filtration immédiate et lavage selon le mode opératoire décrit (voir [12.3.4](#)). Transfert de la membrane de filtration à la surface du milieu gélosé spécifié, comme indiqué dans l'ISO 21148;
- Incubation aérobie des membranes de 3 jours à 5 jours à 25 °C ± 2,5 °C.
- Dénombrement du nombre d'unités formant colonie (UFC) et dénombrement du nombre de levures et de moisissures par millilitre ou par gramme de produit.



NOTE Une condition d'incubation de 5 jours à 7 jours à  $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  en utilisant un milieu de culture sans antibiotique est également possible.

## 5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture

### 5.1 Généralités

Les instructions générales sont indiquées dans l'ISO 21148. Lorsque de l'eau est mentionnée dans ce document, utiliser de l'eau distillée ou purifiée tel qu'indiqué dans l'ISO 21148.

Les diluants, agents neutralisants et milieux de culture suivants conviennent pour le dénombrement des levures et des moisissures. D'autres diluants, agents neutralisants et milieux de culture peuvent être utilisés s'il a été démontré qu'ils sont applicables pour cet emploi.

### 5.2 Diluants neutralisants et diluants

#### 5.2.1 Généralités

Le diluant est utilisé pour disperser l'échantillon. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai a des propriétés fongicides. L'efficacité de la neutralisation doit être démontrée avant la détermination de la concentration en micro-organismes (voir [Article 12](#)). Des informations relatives à des agents neutralisants appropriés sont fournies dans l'[Annexe D](#).

#### 5.2.2 Diluant neutralisant

##### 5.2.2.1 Milieu aux hydrolysats de caséine-lécithine de soja-polysorbate 20 (bouillon SCDLP 20)

###### 5.2.2.1.1 Composition

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

###### 5.2.2.1.2 Préparation

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

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

##### 5.2.3.1.2 Préparation

Dissoudre 1 g d'hydrolysats pepsique de tissus animaux 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 la stérilisation, le pH doit être de  $7,1 \pm 0,2$ , le mesurage étant effectué à 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 de levure (solution tryptone sel)

#### 5.3.1 Composition

Tryptone, hydrolysats pancréatiques de caséine	1,00 g
Chlorure de sodium	8,50 g
Eau	1 000 ml

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bb6ee898-757b-4e3a-96ab-40e9691f1708/iso-16212-2017>

#### 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  $7,0 \pm 0,2$ , le mesurage étant effectué à la température ambiante.

### 5.4 Milieux de culture

#### 5.4.1 Généralités

Les milieux de culture peuvent être préparés comme indiqué ci-dessous ou à partir de milieux de culture déshydratés conformément aux 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 Milieu gélosé Sabouraud au dextrose et chloramphénicol (SDCA)

##### 5.4.2.1 Composition

Dextrose	40,0 g
Hydrolysats pepsique de tissus animaux	5,0 g
Hydrolysats pancréatiques de caséine	5,0 g

Chloramphénicol	0 050 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

#### 5.4.2.2 Préparation

Dissoudre les composants (y compris le chloramphénicol) ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en mélangeant pendant le chauffage. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de  $5,6 \pm 0,2$ , le mesurage étant effectué à température ambiante.

NOTE Pour les produits connus et non contaminés (par des bactéries) le milieu sera utilisé sans chloramphénicol.

#### 5.4.3 Autres médias

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

#### 5.4.4 Milieu gélosé pour la culture de la souche de référence: Milieu gélosé Sabouraud au dextrose (SDA)

##### 5.4.4.1 Composition

Dextrose	40,0 g
Hydrolysats peptique de tissus animaux	5,0 g
Hydrolysats pancréatique de caséine	5,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

##### 5.4.4.2 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 la stérilisation, le pH doit être de  $5,6 \pm 0,2$ , le mesurage étant effectué à température ambiante.

## 6 Matériel et verrerie

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