

DIN EN ISO 21149

ICS 07.100.99; 71.100.70

**Kosmetik –
Mikrobiologie –
Zählung und Nachweis von aeroben mesophilen Bakterien
(ISO 21149:2006);
Deutsche Fassung EN ISO 21149:2009**

Cosmetics –
Microbiology –
Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria (ISO 21149:2006);
German version EN ISO 21149:2009

Cosmétiques –
Microbiologie –
Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles (ISO 21149:2006);
Version allemande EN ISO 21149:2009

Gesamtumfang 30 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21149:2009) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom ISIRI (Iran) gehalten wird, und wurde vom Technischen Komitee CEN/SS H99 übernommen.

Eine Mitarbeit des DIN im ISO/TC 217 erfolgt derzeit nicht, da von Seiten der betroffenen Wirtschaftskreise kein Interesse an diesen Normungsarbeiten bekundet wird. Thematisch zuständig ist der Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

Die Gleichungen in 12.3.3 und 12.3.6 sind in der Deutschen Fassung gegenüber dem ISO-Originaldokument durch Klammersetzung (im Zähler) korrigiert worden.

Das Literaturverzeichnis ist in der Deutschen Fassung gegenüber dem ISO-Originaldokument um den aktuellen Veröffentlichungsstand ergänzt worden.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 18416	siehe DIN EN ISO 18416
ISO 21148	siehe DIN EN ISO 21148
ISO 22717	siehe DIN EN ISO 22717
ISO 22718	siehe DIN EN ISO 22718

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 18416, *Kosmetik — Mikrobiologie — Nachweis von Candida albicans*

DIN EN ISO 21148, *Kosmetik — Mikrobiologie — Allgemeine Anleitungen zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 22717, *Kosmetik — Mikrobiologie — Nachweis von Pseudomonas aeruginosa*

DIN EN ISO 22718, *Kosmetik — Mikrobiologie — Nachweis von Staphylococcus aureus*

Deutsche Fassung

**Kosmetik —
Mikrobiologie —
Zählung und Nachweis von aeroben mesophilen Bakterien
(ISO 21149:2006)**

Cosmetics —
Microbiology —
Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
(ISO 21149:2006)

Cosmétiques —
Microbiologie —
Dénombrement et détection des bactéries aérobies
mésophiles (ISO 21149:2006)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 23. Mai 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	5
4.1 Allgemeines	5
4.2 Plattenzählung	5
4.3 Membranfiltration	5
4.4 Nachweis von Bakterien durch Anreicherung	5
5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährböden	6
5.1 Allgemeines	6
5.2 Neutralisierungs- und Verdünnungsmittel	6
5.3 Verdünnungsmittel für die Bakteriensuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)	7
5.4 Nährmedien	7
6 Geräte und Glasgeräte	9
7 Mikroorganismenstämme	10
8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben	10
9 Durchführung	10
9.1 Allgemeine Empfehlungen	10
9.2 Herstellung der Erstverdünnung	10
9.3 Zählverfahren	11
9.4 Anreicherung	12
10 Zählen von Kolonien (Gussplatten- und Membranfiltrationsverfahren)	12
11 Nachweis von Wachstum (Anreicherungsverfahren)	13
12 Angabe der Ergebnisse	13
12.1 Berechnungsverfahren für die Plattenzählung	13
12.2 Interpretation	14
12.3 Beispiele	15
12.4 Nachweis nach Anreicherung	17
13 Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts	17
13.1 Allgemeines	17
13.2 Herstellung des Inokulums	17
13.3 Validierung von Zählverfahren	17
13.4 Validierung des Nachweisverfahrens durch Anreicherung	18
13.5 Interpretation von Validierungsergebnissen	19
14 Untersuchungsbericht	19
Anhang A (informativ) Weitere neutralisierende Verdünnungsmittel	20
Anhang B (informativ) Weitere Verdünnungsmittel	22
Anhang C (informativ) Weitere Nährmedien	23
Anhang D (informativ) Neutralisierungsmittel für die antimikrobielle Wirkung von Konservierungsmitteln und Spülflüssigkeiten	27
Literaturhinweise	28

Vorwort

Der Text von ISO 21149:2006 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 21149:2009 durch das Technische Komitee CEN/SS H99 „Produkte für die Verwendung im Haushalt und in der Freizeit — Unbestimmt“ übernommen, dessen Sekretariat vom CMC gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21149:2006 wurde vom CEN als EN ISO 21149:2009 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm gibt allgemeine Anleitungen für die Zählung und zum Nachweis von in Kosmetika vorhandenen mesophilen aeroben Bakterien,

- durch Zählen der Kolonien auf einem Agarmedium nach aerober Bebrütung oder
- durch Überprüfen des Ausbleibens von bakteriellem Wachstum nach Anreicherung.

Wegen der großen Vielfalt an kosmetischen Mitteln innerhalb dieses Anwendungsbereiches braucht dieses Verfahren nicht zwangsläufig bis in alle Einzelheiten auf bestimmte Mittel anwendbar zu sein (z. B. bestimmte mit Wasser nicht mischbare Produkte). Ersatzweise können für die hier aufgeführten Untersuchungen andere Verfahren (z. B. automatisierte) zur Anwendung kommen, vorausgesetzt, dass deren Gleichwertigkeit nachgewiesen oder das Verfahren anderweitig validiert wurde.

Falls es erforderlich sein sollte, können ausgezählte oder nachgewiesene Mikroorganismen mit geeigneten Identifizierungsprüfungen bestimmt werden, die in den unter den Literaturhinweisen aufgeführten Normen beschrieben sind.

Um die Qualität des Produkts und die Sicherheit für Verbraucher sicherzustellen, ist es ratsam, eine geeignete mikrobiologische Risikoanalyse zur Bestimmung der Arten von kosmetischen Mitteln durchzuführen, für die diese Internationale Norm anwendbar ist. Produkte, die ein geringes mikrobiologisches Risiko darstellen, umfassen Produkte mit geringer Wasseraktivität, alkoholisch-wässrige Produkte, Produkte mit extremen pH-Werten usw.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 21148:2005, *Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1
aerobe mesophile Bakterien
mesophile Bakterien, die unter den in dieser Internationalen Norm festgelegten Bedingungen aerob wachsen

ANMERKUNG Unter den beschriebenen Bedingungen lassen sich andere Arten von Mikroorganismen (z. B. Hefen, Schimmel) nachweisen.

3.2
Produkt
Anteil eines bestimmten kosmetischen Mittels, das im Labor zur Untersuchung entgegengenommen wird

3.3
Probe
Anteil des Produkts (mindestens 1 g oder 1 ml), der bei der Untersuchung eingesetzt wird, um die Erstverdünnung herzustellen

3.4

Erstverdünnung

Suspension (oder Lösung) einer Probe in einem festgelegten Volumen einer geeigneten Flüssigkeit (Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel, Bouillon oder eine Kombination von denen)

3.5

Probenverdünnung

Verdünnung der Erstverdünnung

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren befasst sich mit der Zählung von Kolonien auf einem nicht selektiven Agarmedium oder mit dem Vorhandensein oder Ausbleiben von bakteriellem Wachstum nach Anreicherung. Um den Nachweis lebensfähiger Mikroorganismen [1] zu ermöglichen, muss die mögliche durch die Probe bewirkte Hemmung von mikrobiellem Wachstum neutralisiert werden. In allen Fällen und unabhängig von der Verfahrensweise muss die Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des kosmetischen Produkts überprüft und validiert werden [2] [3] [4].

4.2 Plattenzählung

Die Plattenzählung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- Herstellung von gegossenen Platten oder Ausstrichplatten mit einem vorgegebenen Nährmedium und Beimpfung der Platten mit einer genau festgelegten Menge der Erstverdünnung oder einer weiteren Verdünnung des Produkts.
- Aerobe Bebrütung der Platten für (72 ± 6) h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- Zählen der Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KBE) und Berechnung der Anzahl an aeroben mesophilen Bakterien je Milliliter oder Gramm des Produkts.

4.3 Membranfiltration

Die Membranfiltration setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- Überführen einer geeigneten Menge der nach validiertem Verfahren hergestellten Probe in das Filtriergerät, das mit einem geringen Volumen eines entsprechenden sterilen Verdünnungsmittels benetzt ist, sofortiges Filtrieren und Waschen entsprechend dem validierten Verfahren (siehe 13.3.4). Das Membranfilter ist, wie in ISO 21148 festgelegt, auf die Oberfläche des vorgegebenen Agarmediums zu überführen.
- Aerobe Bebrütung der Platten für (72 ± 6) h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- Zählen der Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KBE) und Berechnung der Anzahl an aeroben mesophilen Bakterien je Milliliter oder Gramm des Produkts.

4.4 Nachweis von Bakterien durch Anreicherung

Der Nachweis von Bakterien durch Anreicherung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- Bebrütung einer vorgegebenen Menge der Erstverdünnung für mindestens 20 h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C in einem nicht selektiven Flüssigmedium, das entsprechende Neutralisierungs- und/oder Dispergiermittel enthält.
- Überführen einer vorgegebenen Menge der vorhergehenden Erstverdünnung auf ein nicht selektives festes Agarmedium.

- Aerobe Bebrütung für 48 h bis 72 h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- Nachweis von Wachstum und Angabe der Ergebnisse als „Vorhandensein/Ausbleiben“ von aeroben mesophilen Bakterien je Probe *S* des Produkts.

5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährböden

5.1 Allgemeines

Allgemeine Ausführungen sind in ISO 21148 angegeben. Kommt in einer Zusammensetzung Wasser zur Anwendung, ist destilliertes oder gereinigtes Wasser zu verwenden, wie in ISO 21148 festgelegt.

Die folgenden Neutralisierungsmittel, Verdünnungsmittel und Nährmedien sind für die Zählung und den Nachweis von aeroben, mesophilen Bakterien geeignet. Andere Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien dürfen verwendet werden, wenn sie sich für die Anwendung als geeignet erwiesen haben.

5.2 Neutralisierungs- und Verdünnungsmittel

5.2.1 Allgemeines

Das Verdünnungsmittel wird zum Dispergieren der Probe verwendet. Es kann Neutralisierungsmittel enthalten, wenn die zu untersuchende Probe antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Vor der Bestimmung der Koloniezahl (siehe Abschnitt 13) muss die Wirksamkeit der Neutralisierung nachgewiesen werden. Angaben zu geeigneten Neutralisierungsmitteln sind Anhang D zu entnehmen.

5.2.2 Neutralisierungsmittel

5.2.2.1 Casein-Sojalecithin-Polysorbat 20-Flüssigmedium (SCDLP 20-Bouillon)

5.2.2.1.1 Zusammensetzung

Casein, pankreatisch verdaut	20,0 g
Sojalecithin	5,0 g
Polysorbat 20	40,0 ml
Wasser	960,0 ml

5.2.2.1.2 Herstellung

Das Polysorbat 20 wird in 960 ml Wasser durch Rühren unter Erwärmen in einem Wasserbad bei (49 ± 2) °C aufgelöst. Es werden pankreatisch verdautes Casein und Sojalecithin hinzugefügt. Es wird für 30 min erhitzt, damit eine Auflösung erfolgt. Das Medium wird durchgemischt und in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur gleich $7,3 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.2 Andere Neutralisierungsmittel

Falls erforderlich, dürfen andere Neutralisierungsmittel verwendet werden (siehe Anhang A und Anhang D).

5.2.3 Verdünnungsmittel

5.2.3.1 Flüssigkeit A

5.2.3.1.1 Zusammensetzung

Peptisch verdautes tierisches Gewebe (Pepton A)	1,0 g
Wasser	1 000 ml

5.2.3.1.2 Herstellung

1 g des Peptons wird in Wasser gelöst, und das Volumen wird auf 1 l aufgefüllt. Es wird unter häufigem Rühren erhitzt. Anschließend wird das Medium in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $7,1 \pm 0,2$ betragen.

5.2.3.2 Andere Verdünnungsmittel

Je nach Eignung können andere Verdünnungsmittel verwendet werden (siehe Anhang B).

5.3 Verdünnungsmittel für die Bakteriensuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)

5.3.1 Zusammensetzung

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	1,0 g
Natriumchlorid	8,5 g
Wasser	1 000 ml

5.3.2 Herstellung

Die Bestandteile werden durch Rühren unter Erwärmen in Wasser aufgelöst. Anschließend wird das Medium in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.4 Nährmedien

5.4.1 Allgemeines

Nährmedien lassen sich wie folgt oder aus wasserfreien Nährmedien nach den Anweisungen des Herstellers herstellen. Fertigmedien dürfen verwendet werden, wenn deren Zusammensetzung und/oder Wachstums-ertrag mit der hier angegebenen Zusammensetzung vergleichbare Ergebnisse liefern.

5.4.2 Nährmedien zum Zählen

5.4.2.1 Soja-Casein-Pepton-Agar (SCDA) oder oder Trypton-Soja-Agar (TSA)

5.4.2.1.1 Zusammensetzung

Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
Sojamehl (Pepton S), papainisch verdaut	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1 000 ml