

DIN EN ISO 16212

ICS 07.100.40

Einsprüche bis 2017-02-16
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 16212:2011-08

Entwurf

**Kosmetische Mittel –
Mikrobiologie –
Zählung von Hefen und Schimmelpilzen (ISO/FDIS 16212:2017);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 16212:2017**

Cosmetics –
Microbiology –
Enumeration of yeast and mould (ISO/FDIS 16212:2017);
German and English version FprEN ISO 16212:2017

Cosmétiques –
Microbiologie –
Dénombrement des levures et des moisissures (ISO/FDIS 16212:2017);
Version allemande et anglaise FprEN ISO 16212:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-12-16 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 16212:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ (Sekretariat: ISIRI, Iran) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-07-01 AA „Kosmetische Mittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung des FprEN ISO 16212:2016 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 18415	siehe	DIN EN ISO 18415
ISO 18416	siehe	DIN EN ISO 18416
ISO 21148	siehe	DIN EN ISO 21148

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 16212:2011-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Normative Verweisungen aktualisiert;
- b) die Benennung „Validierung“ wurde im gesamten Dokument durch die Benennung „Eignung“ ersetzt;
- c) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 18415, *Kosmetik — Mikrobiologie — Nachweis von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen*

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

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

Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Zählung von Hefen und Schimmelpilzen (ISO/FDIS 16212:2017)

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement des levures et des moisissures (ISO/FDIS 16212:2017)

Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould (ISO/FDIS 16212:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt

Dokumentsprache: D

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Plattenzählung	7
4.3 Membranfiltration	7
5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Neutralisierungs- und Verdünnungsmittel	8
5.2.1 Allgemeines	8
5.2.2 Neutralisierungsmittel	8
5.2.3 Verdünnungsmittel	9
5.3 Verdünnungsmittel für die Hefesuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)	9
5.3.1 Zusammensetzung	9
5.3.2 Herstellung	9
5.4 Nährmedien	9
5.4.1 Allgemeines	9
5.4.2 Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar (SDCA)	9
5.4.3 Weitere Medien	10
5.4.4 Agarmedium zur Kultivierung von Referenzstämmen: Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)	10
6 Geräte und Glasgeräte	10
7 Mikroorganismenstämme	10
8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben	11
9 Durchführung	11
9.1 Allgemeine Empfehlungen	11
9.2 Herstellung der Erstverdünnung	11
9.2.1 Allgemeines	11
9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte	11
9.2.3 Mit Wasser nicht mischbare Produkte	11
9.3 Zählverfahren	12
9.3.1 Verdünnungen für Zählverfahren	12
9.3.2 Plattenzählverfahren	12
10 Zählen von Kolonien (Gussplatten- und Membranfiltrationsverfahren)	13
11 Auswertung der Ergebnisse	13
11.1 Berechnungsverfahren für die Plattenzählung	13
11.2 Interpretation	14
12 Neutralisierung der fungiziden Eigenschaften des Produkts	16
12.1 Allgemeines	16
12.2 Herstellung des Inokulums	16

12.3	Eignung von Zählverfahren	16
12.3.1	Kurzbeschreibung	16
12.3.2	Eignungsprüfung des Gussplattenverfahrens	17
12.3.3	Eignung des Oberflächenausstrichverfahrens (Spatelplattenverfahrens)	17
12.3.4	Eignung des Membranfiltrationsverfahrens	17
13	Prüfbericht	18
Anhang A (informativ) Weitere Neutralisierungsmittel		19
A.1	Allgemeines	19
A.2	Eugon LT 100-Flüssigbouillon	19
A.2.1	Allgemeines	19
A.2.2	Zusammensetzung	19
A.2.3	Herstellung	19
A.3	Verdünnungsmittel Lecithin-Polysorbat (LP)	20
A.3.1	Zusammensetzung	20
A.3.2	Herstellung	20
Anhang B (informativ) Weitere Verdünnungsmittel		21
B.1	Allgemeines	21
B.2	Gepufferte Peptonlösung (pH-Wert 7)	21
B.2.1	Zusammensetzung	21
B.2.2	Herstellung	21
B.3	Phosphatpufferlösung (pH-Wert 7,2)	21
B.3.1	Zusammensetzung	21
B.3.2	Herstellung	21
Anhang C (informativ) Weitere Nährmedien		22
C.1	Allgemeines	22
C.2	Agarmedium zur Zählung	22
C.2.1	Kartoffel-Dextrose-Agar mit Antibiotika	22
C.2.2	Glucose-Pepton-Agar (GP-Agar) mit Antibiotika	22
C.3	Malzextrakt-Nährmedium	23
C.3.1	Zusammensetzung	23
C.3.2	Herstellung	23
Anhang D (informativ) Neutralisierungsmittel für die fungizide Wirkung von Konservierungsmitteln und Spülflüssigkeiten		24
Literaturhinweise		25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16212:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 *Cosmetics* in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 392 *Kosmetische Mittel* erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 16212:2010 ersetzen.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 16212:2017 wurde vom CEN als FprEN ISO 16212:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 217, *Cosmetics*.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 16212:2008), welche in Form einer Minor Revision mit folgenden Änderungen überarbeitet wurde:

- in 4.1 wurde „validiert“ in „zufriedenstellend“ geändert;
- in 9.3.2.1 wurde „nach validierten Verfahren“ in „die sich als geeignet erwiesen hat“ geändert;
- in 9.3.2.3 wurde „nach validierten Verfahren“ in „die sich als geeignet erwiesen hat“ geändert;
- in 11.2.1 wurde „validiert wurden“ in „sich als geeignet erwiesen haben“ geändert;
- in 12.3 wurde „Validierung“ in „Eignung“ geändert;
- in 12.3.2 wurde „Validierung“ in „Eignungsprüfung“ geändert;
- in 12.3.3 wurde „Validierung“ einmal in „Eignung“ und einmal in „Eignungsprüfung“ geändert;
- in 12.3.4 wurde „Validierung“ in „Eignung“ geändert;
- in 12.3.4 wurde „validiert“ in „zufriedenstellend“ geändert;
- in 12.3.4 wurde „Validierung“ „Eignungsprüfung“ geändert;
- in Abschnitt 13 f) wurde „Validierung“ in „Eignung“ geändert.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument gibt allgemeine Anleitungen für die Zählung von in kosmetischen Mitteln vorhandenen Hefen und Schimmelpilzen durch Zählen der Kolonien auf einem selektiven Agarmedium nach aerober Bebrütung.

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 dieses Dokument anwendbar ist. Produkte, die ein geringes mikrobiologisches Risiko darstellen, umfassen jene mit geringer Wasseraktivität, alkoholisch-wässrige Produkte, Produkte mit extremen pH-Werten usw.

Wegen der großen Vielfalt an kosmetischen Mitteln innerhalb dieses Anwendungsbereichs, ist dieses Verfahren möglicherweise für einige Produkte nicht in allen Einzelheiten geeignet (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 sich das Verfahren anderweitig als geeignet erwiesen hat.

Ausgezählte Hefen können mit geeigneten Identifizierungsprüfungen bestimmt werden, zum Beispiel Prüfungen, die in den unter den Literaturhinweisen aufgeführten Normen beschrieben sind. Falls notwendig, können ausgezählte Schimmelpilze nach anderen geeigneten Verfahren identifiziert werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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, *Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination*

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC unterhalten terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen:

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Hefe

einzelliger Pilz, der sich hauptsächlich vegetativ durch Knospung (Sprossung) vermehrt und in der Lage ist, unter den in dem vorliegenden Dokument festgelegten Untersuchungsbedingungen zu wachsen

3.2

Schimmelpilz

myzelbildender mikroskopischer Pilz (Mikrofungus), einschließlich Sporen und Konidien, der in der Lage ist, unter den in dem vorliegenden Dokument festgelegten Untersuchungsbedingungen zu wachsen

3.3

Produkt

Anteil eines identifizierten kosmetischen Mittels, das im Labor zur Untersuchung entgegengenommen wird

3.4

Probe

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

3.5

Erstverdünnung

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

3.6

Probenverdünnung

Verdünnung der Erstverdünnung

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren umfasst die Zählung von Kolonien auf einem selektiven Agarmedium. Die mögliche Hemmungswirkung von Pilzwachstum durch die Probe muss neutralisiert werden, um den Nachweis von lebensfähigen Mikroorganismen zu ermöglichen (siehe [5]). In allen Fällen und unabhängig von der Verfahrensweise muss die Neutralisierung der antifungalen (fungiziden) Eigenschaften des Produkts überprüft werden und zufriedenstellend sein (siehe [6], [8] und [9]).

4.2 Plattenzählung

Die Plattenzählung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

- a) Herstellen von gegossenen Platten oder Ausstrichplatten mit einem vorgegebenen Nährmedium und Beimpfen der Platten mit einer genau festgelegten Menge der Erstverdünnung oder einer Verdünnung des Produkts.
- b) Aerobes Bebrüten der Platten für 3 d bis 5 d bei $(25 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$.
- c) Zählen der Anzahl von koloniebildenden Einheiten (KBE) und Berechnen der Menge an Hefen und Schimmelpilzen je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

ANMERKUNG Eine alternative Bedingung für die Bebrütung ist $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ für 5 d bis 7 d, bei der Verwendung des Nährmediums ohne Antibiotikum.

4.3 Membranfiltration

Die Membranfiltration setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- a) Überführen einer geeigneten Menge der nach einem validierten Verfahren hergestellten Probe in das Filtriergerät, das mit einem geringen Volumen eines entsprechenden sterilen Verdünnungsmittels benetzt ist. Sofortiges Filtrieren und Waschen nach dem validierten Verfahren. Überführen des Membranfilters, wie in ISO 21148 festgelegt, auf die Oberfläche des vorgegebenen Agarmediums.
- b) Aerobes Bebrüten der Membranfilter für 3 d bis 5 d bei $(25 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$.

- c) Zählen der Anzahl von koloniebildenden Einheiten (KBE) und Berechnen der Menge an Hefen und Schimmelpilzen je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

ANMERKUNG Eine alternative Bedingung für die Bebrütung ist $(22,5 \pm 2,5)$ °C für 5 d bis 7 d, bei der Verwendung des Nährmediums ohne Antibiotikum.

5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Allgemeine Festlegungen sind in ISO 21148 angegeben. Wenn Wasser in einer Zusammensetzung erwähnt wird, wird destilliertes oder gereinigtes Wasser, wie in ISO 21148 festgelegt, verwendet.

Die folgenden Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien sind für die Zählung von Hefen und Schimmelpilzen geeignet. Andere Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien dürfen verwendet werden, wenn sie sich für die Anwendung nachweislich als geeignet erwiesen haben.

5.2 Neutralisierungs- und Verdünnungsmittel

5.2.1 Allgemeines

Das Verdünnungsmittel wird zum Dispergieren der Probe verwendet. Es darf Neutralisierungsmittel enthalten, wenn die zu untersuchende Probe fungizide Eigenschaften besitzt. Vor der Bestimmung der Koloniezahl (siehe Abschnitt 12) muss die Wirksamkeit der Neutralisierung nachgewiesen werden. Angaben zu geeigneten Neutralisierungsmitteln sind Anhang D zu entnehmen.

5.2.2 Neutralisierungsmittel

5.2.2.1 Caseinpepton-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 ml
— Wasser	960 ml

5.2.2.1.2 Herstellung

Das Polysorbat 20 wird in 960 ml Wasser durch Mischen unter Erwärmen in einem Wasserbad bei (49 ± 2) °C gelöst. Pankreatisch verdautes Casein und Sojalecithin werden hinzugefügt. Es wird für etwa 30 min erhitzt, um eine Auflösung zu bewirken. Das Medium wird gemischt und in geeignete Behälter gefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,3 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.2 Andere Neutralisierungsmittel

Andere Neutralisierungsmittel dürfen gegebenenfalls verwendet werden (siehe Anhang A und Anhang D).

5.2.3 Verdünnungsmittel

5.2.3.1 Flüssigkeit A

5.2.3.1.1 Zusammensetzung

— tierisches Gewebe, peptisch verdaut	1,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.2.3.1.2 Herstellung

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

5.2.3.2 Andere Verdünnungsmittel

Andere Verdünnungsmittel dürfen gegebenenfalls verwendet werden (siehe Anhang B).

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

5.3.1 Zusammensetzung

— Trypton, pankreatisch verdautes Casein	1,00 g
— Natriumchlorid	8,50 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.2 Herstellung

Die Bestandteile werden durch Mischen unter Erwärmen in Wasser gelöst. Es wird in geeignete Behälter gefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.4 Nährmedien

5.4.1 Allgemeines

Nährmedien dürfen wie folgt oder aus wasserfreien Nährmedien, nach den Anweisungen des Herstellers, hergestellt werden. Fertigmedien dürfen verwendet werden, wenn deren Zusammensetzung und/oder Wachstumsertrag mit der hier angegebenen Zusammensetzung vergleichbar ist.

5.4.2 Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar (SDCA)

5.4.2.1 Zusammensetzung

— Dextrose	40,0 g
— tierisches Gewebe, peptisch verdaut	5,0 g
— Casein, pankreatisch verdaut	5,0 g
— Chloramphenicol	0,050 g
— Agar	15,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.4.2.2 Herstellung

Die Bestandteile (einschließlich des Chloramphenicol) oder das wasserfreie Fertigmedium werden/wird durch Mischen unter Erwärmen in Wasser gelöst. Das Medium wird in geeignete Behälter gefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $5,6 \pm 0,2$ betragen.

ANMERKUNG Bei bekannten und nicht (mit Bakterien) kontaminierten Produkten werden die Medien ohne Chloramphenicol verwendet.

5.4.3 Weitere Medien

Weitere Medien dürfen gegebenenfalls verwendet werden (siehe Anhang C).

5.4.4 Agarmedium zur Kultivierung von Referenzstämmen: Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)

5.4.4.1 Zusammensetzung

— Dextrose	40,0 g
— tierisches Gewebe, peptisch verdaut	5,0 g
— Casein, pankreatisch verdaut	5,0 g
— Agar	15,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.4.4.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das wasserfreie Fertigmedium werden/wird durch Mischen unter Erwärmen in Wasser gelöst. Das Medium wird in geeignete Behälter gefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $5,6 \pm 0,2$ betragen.

6 Geräte und Glasgeräte

Die Laborausrüstung, Geräte und Glasgeräte sind in ISO 21148 beschrieben.

7 Mikroorganismenstämme

Zur Prüfung der Wirksamkeit von Neutralisierungsmitteln wird ein Referenzstamm von Hefe verwendet:

- *Candida albicans* ATCC¹⁾ 10231 oder ein gleichwertiger Stamm (IP²⁾ 48.72, NCPF³⁾ 3179, NBRC⁴⁾ 1594, KCTC⁵⁾ 17205 oder TISTR⁶⁾ 5779) oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung.

1) ATCC = American Type Culture Collection.

2) IP = Institut Pasteur.

3) NCPF = National Collection of Pathogenic Fungi.

4) NBRC = Biological Resource Center, NITE.

5) KCTC = Korean Collection for Type Cultures.

6) TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research.

Der ausgewählte Hefestamm, der als viel empfindlicher gegenüber der fungiziden Wirkung angesehen wird als Schimmelpilze, darf zur Validierung der Verfahrensweise als repräsentativ für Pilze (Hefen und Schimmelpilze) angenommen werden. Im Fall spezieller Erfordernisse darf die Prüfung zur Wirksamkeit von Neutralisierungsmitteln jedoch unter Anwendung einer geeigneten Vorschrift zur Herstellung eines kalibrierten Inokulums (z. B. siehe EN 13624:2003 [3], 5.4.1.4) mit einem zusätzlichen Referenzstamm von Schimmelpilzen durchgeführt werden.

Die Kultur sollte nach den vom Lieferanten des Referenzstammes angegebenen Verfahrensweisen rekonstituiert werden.

Der Stamm darf nach EN 12353 im Labor aufbewahrt werden.

8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben

Falls erforderlich werden die zu untersuchenden Produkte bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vor oder nach der Untersuchung dürfen die Produkte (3.3) und Proben (3.4) nicht bebrütet, gekühlt oder eingefroren werden.

Die Probenahme der zu untersuchenden kosmetischen Mittel sollte wie in ISO 21148 beschrieben erfolgen. Die Proben werden wie in ISO 21148 beschrieben und nach dem in Abschnitt 9 beschriebenen Verfahren untersucht.

9 Durchführung

9.1 Allgemeine Empfehlungen

Zur Herstellung der Probe, Erstverdünnung und weiterer Verdünnungen werden steriles Material, Geräte und aseptische Arbeitstechniken verwendet. Bei der Herstellung der Erstverdünnung darf die Zeitspanne zwischen dem Ende der Herstellung und dem Zeitpunkt, zu dem das Inokulum in Kontakt mit dem Nährmedium kommt, 45 min nicht überschreiten, sofern es nicht in den bestehenden Unterlagen oder Dokumenten ausdrücklich angegeben ist.

9.2 Herstellung der Erstverdünnung

9.2.1 Allgemeines

Die Erstverdünnung wird aus einer Probe von mindestens 1 g oder 1 ml des gut gemischten, zu untersuchenden Produkts hergestellt.

Die genaue Masse oder das genaue Volumen der Probe S wird aufgezeichnet.

Die Erstverdünnung ist gewöhnlich eine Verdünnung von 1:10. Größere Volumina an Verdünnungsmittel können erforderlich sein, wenn hohe Grade der Kontamination anzunehmen sind und/oder in einer 1:10-Verdünnung noch fungizide Eigenschaften vorliegen.

9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte

Die Probe S des Produkts wird in ein entsprechendes Volumen (z. B. 9 ml) Neutralisierungsmittel (5.2.2) oder Verdünnungsmittel (5.2.3) überführt.

Der Verdünnungsfaktor d wird aufgezeichnet.

9.2.3 Mit Wasser nicht mischbare Produkte

Die Probe S des Produkts wird in einen geeigneten Behälter überführt, der eine geeignete Menge Lösungsvermittler (z. B. Polysorbat 80-Lösung) enthält. Die Probe wird im Lösungsvermittler dispergiert und ein

angemessenes Volumen (z. B. 9 ml) an Neutralisierungsmittel (5.2.2) oder Verdünnungsmittel (5.2.3) wird hinzugefügt.

Der Verdünnungsfaktor d wird aufgezeichnet.

9.3 Zählverfahren

9.3.1 Verdünnungen für Zählverfahren

Gewöhnlich ist die Erstverdünnung die erste ausgezählte Verdünnung. Falls nötig, dürfen aus der Erstverdünnung weitere Reihenverdünnungen (z. B. 1:10-Verdünnung) mit demselben Verdünnungsmittel (nach dem erwarteten Grad der Kontamination des Produkts) vorgenommen werden.

Gewöhnlich wird die Zählung mit mindestens zwei Petrischalen durchgeführt; bei einer Routineuntersuchung, oder wenn Zählungen an aufeinanderfolgenden Verdünnungen derselben Probe oder nach vorausgegangenen Ergebnissen vorgenommen werden, ist es jedoch auch möglich, nur eine einzige Petrischale zu verwenden.

9.3.2 Plattenzählverfahren

9.3.2.1 Gussplattenverfahren

In Petrischalen von 85 mm bis 100 mm Durchmesser wird/werden 1 ml der Erstverdünnung und/oder die hergestellte Probenverdünnung die sich als geeignet erwiesen hat (siehe Abschnitt 12) hinzugefügt, und es werden 15 ml bis 20 ml von dem geschmolzenen, in einem Wasserbad bei nicht mehr als 48 °C aufbewahrten Agarmedium (5.4.2) zugegossen. Wenn größere Petrischalen verwendet werden, ist die Menge des Agarmediums entsprechend zu vergrößern.

Die Erstverdünnung und/oder die Probenverdünnung wird/werden mit dem Medium durch vorsichtige, drehende Bewegung oder ausreichende Neigung der Platten durchmischt. Das Gemisch in den Petrischalen ist auf einer horizontalen Oberfläche bei Raumtemperatur verfestigen zu lassen.

9.3.2.2 Spatelplattenverfahren (Ausstreichverfahren)

In Petrischalen von 85 mm bis 100 mm Durchmesser werden 15 ml bis 20 ml von dem geschmolzenen, in einem Wasserbad bei nicht mehr als 48 °C aufbewahrten Agarmedium (5.4.2) eingebracht. Wenn größere Petrischalen verwendet werden, ist die Menge des Agarmediums entsprechend zu vergrößern.

Die Platten sind abkühlen und verfestigen zu lassen, z. B. in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank oder in einem Brutschrank. Über die Oberfläche des Mediums wird/werden ein abgemessenes Volumen von mindestens 0,1 ml Erstverdünnung und/oder eine Probenverdünnung, hergestellt wie in Abschnitt 12 beschrieben, ausgestrichen.

9.3.2.3 Membranfiltrationsverfahren

Es wird ein Membranfilter mit einer Nennporenweite $\leq 0,45 \mu\text{m}$ verwendet.

Eine angemessene Menge der Erstverdünnung oder der Probenverdünnung, die sich als geeignet erwiesen hat (die möglichst mindestens 1 g oder 1 ml des Produkts repräsentiert) wird auf das Membranfilter überführt.

Es wird sofort filtriert und das Membranfilter gewaschen (entsprechendem dem geeigneten Untersuchungsverfahren, siehe Abschnitt 12).

Das Membranfilter wird auf die Oberfläche des Agarmediums (5.4.2) überführt.

9.3.2.4 Bebrütung

Sofern nicht anders festgelegt, werden die beimpften Petrischalen umgedreht und für 3 d bis 5 d in den auf $(25 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ eingestellten Brutschrank gestellt oder es werden die alternativen Bedingungen angewendet (siehe Anmerkungen in 4.2 und 4.3). Nach dem Bebrüten müssen die Petrischalen, wenn möglich, sofort untersucht werden. Andernfalls dürfen sie, sofern nicht anders festgelegt, für maximal bis zu 24 h bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gelagert werden.

ANMERKUNG 1 In bestimmten Fällen, wenn die Möglichkeit der Verwechslung von Partikeln aus dem Produkt mit ausgezählten Kolonien besteht, kann es sinnvoll sein, Petrischalen in doppelter Ausführung mit denselben Probenverdünnungen und demselben Agarmedium herzustellen, die zum Vergleich mit den bebrüteten Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

ANMERKUNG 2 Wenn sowohl Hefen als auch Schimmelpilze vermutet werden, kann eine Zwischenprüfung durchgeführt werden.

10 Zählen von Kolonien (Gussplatten- und Membranfiltrationsverfahren)

Nach der Bebrütung werden die Kolonien gezählt

- in Petrischalen mit 15 Kolonien bis 150 Kolonien; wenn weniger als 15 Kolonien gezählt werden, siehe 11.2.3;
- auf Membranfiltern mit 15 Kolonien bis 150 Kolonien; wenn weniger als 15 Kolonien gezählt werden, siehe 11.2.3.

11 Auswertung der Ergebnisse

11.1 Berechnungsverfahren für die Plattenzählung

Die Anzahl N der in der Probe S vorhandenen Mikroorganismen wird berechnet mit:

- m , dem arithmetischen Mittelwert der aus den zweifachen Ausführungen erhaltenen Keimzahlen (Koloniezahlen) [Gleichung (1)];
- c , der Anzahl der auf einer einzelnen Platte gezählten Kolonien [Gleichung (2)] oder
- wm , dem gewichteten Mittelwert der aus zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen erhaltenen Keimzahlen [Gleichung (3)];

nach den folgenden Gleichungen:

$$N = m/(V \cdot d) \quad (1)$$

$$N = c/(V \cdot d) \quad (2)$$

$$N = wm/(V \cdot d) \quad (3)$$

Dabei ist

- m der arithmetische Mittelwert der aus den zweifachen Ausführungen erhaltenen Keimzahlen;
- V das auf jede Petrischale aufgebrauchte Volumen des Inokulums, in Milliliter;
- d der Verdünnungsfaktor entsprechend der vorgenommenen Verdünnung für die Herstellung der Erstverdünnung (siehe 9.2) oder der ersten ausgezählten (weiteren) Verdünnung;