

DIN EN ISO 21149

ICS 07.100.40

Einsprüche bis 2017-02-16
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 21149:2009-10

Entwurf

**Kosmetische Mittel –
Mikrobiologie –
Zählung und Nachweis von aeroben mesophilen Bakterien
(ISO/FDIS 21149:2017);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 21149:2017**

Cosmetics –
Microbiology –
Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria (ISO/FDIS 21149:2017);
German and English version FprEN ISO 21149:2017

Cosmétiques –
Microbiologie –
Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles (ISO/FDIS 21149:2017);
Version allemande et anglaise FprEN ISO 21149:2017

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 64 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 21149:2017) 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 21149 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
ISO 21150	siehe	DIN EN ISO 21150
ISO 22717	siehe	DIN EN ISO 22717
ISO 22718	siehe	DIN EN ISO 22718

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 21149:2009-10 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*

DIN EN ISO 21150, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von Escherichia coli*

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

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

— Leerseite —

Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Zählung und Nachweis von aeroben mesophilen Bakterien (ISO/FDIS 21149:2017)

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles (ISO/FDIS 21149:2017)

Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria (ISO/FDIS 21149:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt

Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Plattenzählung	9
4.3 Membranfiltration	9
4.4 Nachweis von Bakterien durch Anreicherung	10
5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien	10
5.1 Allgemeines	10
5.2 Neutralisierungs- und Verdünnungsmittel	10
5.2.1 Allgemeines	10
5.2.2 Neutralisierungsmittel	10
5.2.3 Verdünnungsmittel	11
5.3 Verdünnungsmittel für die Bakteriensuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)	11
5.3.1 Zusammensetzung	11
5.3.2 Herstellung	11
5.4 Nährmedien	11
5.4.1 Allgemeines	11
5.4.2 Nährmedien zum Zählen	12
5.4.3 Nährmedien zum Nachweis	12
5.4.4 Agarmedium für die Kultivierung von Referenzstämmen	14
6 Geräte und Glasgeräte	14
7 Mikroorganismenstämmen	14
8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben	14
9 Durchführung	14
9.1 Allgemeine Empfehlungen	14
9.2 Herstellung der Erstverdünnung	15
9.2.1 Allgemeines	15
9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte	15
9.2.3 Mit Wasser nicht mischbare Produkte	15
9.3 Zählverfahren	15
9.3.1 Verdünnungen für Zählverfahren	15
9.3.2 Plattenzählverfahren	15
9.4 Anreicherung	16
9.4.1 Allgemeines	16
9.4.2 Bebrüten der Probe	16
10 Zählen von Kolonien (Gussplatten- und Membranfiltrationsverfahren)	17
11 Nachweis von Wachstum (Anreicherungsverfahren)	17
12 Auswertung der Ergebnisse	17

12.1	Berechnungsverfahren für die Plattenzählung.....	17
12.2	Interpretation.....	18
12.3	Beispiele	19
12.3.1	Beispiel 1: Zwei Petrischalen für eine Verdünnung	19
12.3.2	Beispiel 2: Eine Petrischale für eine Verdünnung.....	19
12.3.3	Beispiel 3: Zwei Petrischalen für zwei Verdünnungen.....	19
12.3.4	Beispiel 4: Zwei Membranfilter für eine Verdünnung	19
12.3.5	Beispiel 5: Ein Membranfilter für eine Verdünnung	20
12.3.6	Beispiel 6: Zwei Membranfilter für zwei Verdünnungen	20
12.3.7	Beispiel 7: Zwei Petrischalen für eine Verdünnung	20
12.3.8	Beispiel 8	20
12.3.9	Beispiel 9	20
12.4	Nachweis nach Anreicherung	21
13	Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts	21
13.1	Allgemeines	21
13.2	Herstellung des Inokulums.....	21
13.3	Eignung von Zählverfahren	21
13.3.1	Kurzbeschreibung.....	21
13.3.2	Eignung des Gussplattenverfahrens.....	22
13.3.3	Eignung des Oberflächenausstrichverfahrens (Spatelplattenverfahren)	22
13.3.4	Eignung des Membranfiltrationsverfahrens	22
13.4	Eignung des Nachweisverfahrens durch Anreicherung.....	23
13.4.1	Durchführung	23
13.4.2	Auswertung von Ergebnissen	23
13.5	Interpretation der Ergebnisse der Eignungsprüfung	23
14	Untersuchungsbericht	24
Anhang A (informativ) Weitere Neutralisierungsmittel.....		25
A.1	Allgemeine Änderung	25
A.2	Eugon LT 100-Flüssigbouillon	25
A.3	Verdünnungsmittel Lecithin-Polysorbat (LP)	25
A.3.1	Zusammensetzung	25
A.3.2	Herstellung	25
A.4	Modifizierte Letheen-Bouillon [11]	25
A.4.1	Zusammensetzung	25
A.4.2	Herstellung	26
Anhang B (informativ) Weitere Verdünnungsmittel		27
B.1	Allgemeines	27
B.2	Gepufferte Peptonlösung, pH-Wert 7.....	27
B.2.1	Zusammensetzung	27
B.2.2	Herstellung	27
Anhang C (informativ) Weitere Nährmedien.....		28
C.1	Allgemeines	28
C.2	Agarmedium zur Zählung.....	28
C.2.1	Eugon LT 100-Agarmedium.....	28
C.2.2	LT 100-Agar	28
C.2.3	Soja-Caseinpepton mit Agar (SCD-Bouillon mit Agar)	28
C.3	Anreicherungsbouillon	29
C.3.1	Modifizierte Letheen-Bouillon [11]	29
C.3.2	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Medium mit Lecithin und Polysorbat 80 (SCDLP 80-Bouillon).....	29
C.3.3	D/E-Neutralisierungs-Bouillon (Dey/Engley-Neutralisierungs-Bouillon) [11].....	30
C.4	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarmedium mit Lecithin und Polysorbat 80 (SCDLPA-Bouillon) zum Nachweis	30

C.4.1	Zusammensetzung	30
C.4.2	Herstellung.....	30
Anhang D (informativ) Neutralisierungsmittel für die antimikrobielle Wirkung von Konservierungsmitteln und Spülflüssigkeiten.....		31
Literaturhinweise.....		32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 21149:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 *Cosmetics* in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 329 *Kosmetische Mittel* erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 21149:2009 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 21149:2017 wurde vom CEN als FprEN ISO 21149:2017 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 21149:2006), welche in Form einer Minor Revision mit folgenden Änderungen überarbeitet wurde:

- in 4.1 wurde „validiert“ durch „nachgewiesen“ ersetzt;
- in 4.3 wurde „validiertem“ durch „beschriebenen“ ersetzt;
- in 9.3.2.1, 9.3.2.2 und 9.3.2.3 wurde „validiert“ durch „beschrieben“ ersetzt;
- in 9.3.2.3 wurde „bei der Validierung entwickelten Verfahrensweise“ durch „entsprechend der Verfahrensweise der Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in 9.4.1 wurde „Validierung“ durch „Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in 12.2.1 wurde „entsprechend dem ausgewählten Verfahren validiert“ durch „sich für das ausgewählte Verfahren als geeignet erwiesen haben“ ersetzt;
- in 13.3 und 13.4 wurde „Validierung“ durch „Eignung“ ersetzt;
- in 13.3.2, 13.3.3 und 13.3.4 wurde „Validierung“ durch „Eignung“ ersetzt;

- in 13.3.2, 13.3.3 und 13.3.4 wurde „wenn die Zählung der Validierung mindestens 50 % (0,3 log) der Kontrollzählung“ durch „wenn die Keimzahl mindestens 50 % der Kontrolle“ ersetzt;
- in 13.4.1 wurde „Validierungsprüfung“ durch „Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in 13.4.2 wurde „Validierungsplatte“ durch „Platte für die Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in 13.5 wurde „von Validierungsergebnissen“ durch „der Ergebnisse der Eignungsprüfung“ und „Kontrollplatten“ durch „Platten der Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in 12.3.4 wurde „validiert“ durch „zufriedenstellend“ ersetzt;
- in 12.3.4 wurde „Validierung“ „Eignungsprüfung“ ersetzt;
- in Abschnitt 14 f) wurde „Validierung des Verfahrens“ durch „der Nachweis der Eignung“ ersetzt;
- in A.1, B.1 und C.1 wurde „validiert“ durch „sich als geeignet erwiesen hat“ ersetzt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument gibt allgemeine Anleitungen für die Zählung und zum Nachweis von in Kosmetischen Mitteln 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 kann dieses Verfahren nicht zwangsläufig bis in alle Einzelheiten auf bestimmte Mittel anwendbar sein (z. B. bestimmte mit Wasser nicht mischbare Produkte). Ersatzweise dürfen 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 erforderlich, dürfen 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 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.

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:—¹⁾, *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>

1) Veröffentlichung ausstehend.

3.1

aerobe mesophile Bakterien

mesophile Bakterien, die unter den in diesem Dokument festgelegten Bedingungen aerob wachsen

Anmerkung 1 zum Begriff: Unter den beschriebenen Bedingungen können andere Arten von Mikroorganismen (z. B. Hefen, Schimmelpilze) nachgewiesen werden.

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

3.5

Probenverdünnung

Verdünnung der Erstverdünnung

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren umfasst die Zählung von Kolonien auf einem nicht selektiven Agarmedium oder bei Vorhandensein oder Ausbleiben von bakteriellem Wachstum nach Anreicherung. Die mögliche Hemmungswirkung von mikrobiellem Wachstum durch die Probe muss neutralisiert werden, um den Nachweis von lebensfähigen Mikroorganismen [7] zu ermöglichen. In allen Fällen und unabhängig von der Verfahrensweise muss die Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts überprüft und nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 13) [8] [9] [10].

4.2 Plattenzählung

Die Plattenzählung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- 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.
- Aerobes Bebrüten der Platten für (72 ± 6) h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- Zählen der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) und Berechnen der Anzahl an aeroben mesophilen Bakterien je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

4.3 Membranfiltration

Die Membranfiltration setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

- Überführen einer geeigneten Menge der nach in Abschnitt 13 beschriebenen 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.

- b) Aerobes Bebrüten der Membranfilter für (72 ± 6) h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- c) Zählen der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) und Berechnen der Anzahl an aeroben mesophilen Bakterien je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

4.4 Nachweis von Bakterien durch Anreicherung

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

- a) Bebrüten 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.
- b) Überführen einer vorgegebenen Menge der vorhergehenden Erstverdünnung auf ein nicht selektives festes Agarmedium.
- c) Aerobes Bebrüten für 48 h bis 72 h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C.
- d) Nachweis von Wachstum und Angabe der Ergebnisse als „Vorhandensein/Ausbleiben“ von aeroben mesophilen Bakterien je Probe S des Produkts.

5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Allgemeine Ausführungen sind in ISO 21148 angegeben. Wenn in einer Formulierung Wasser zur Anwendung kommt, wird destilliertes oder gereinigtes Wasser verwendet, wie in ISO 21148 festgelegt.

Die folgenden Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel, 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 darf Neutralisierungsmittel enthalten, wenn die zu untersuchende Probe antimikrobielle Eigenschaften besitzt. Vor der Bestimmung der Keimzahl (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 Mischen unter Erwärmen in einem Wasserbad bei $(49 \pm 2)^\circ\text{C}$ gelöst. Pankreatisch verdautes Casein und Sojalecithin werden hinzugefügt. Es wird für 30 min erhitzt, damit eine Auflösung erfolgt. 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 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 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 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

5.4.2.1.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das wasserfreie Fertigmedium werden/wird 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 und Abkühlung muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,3 \pm 0,2$ betragen.

5.4.2.2 Andere Medien für die Zählung

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

5.4.3 Nährmedien zum Nachweis

5.4.3.1 Allgemeines

Für den Bakteriennachweis sind nach der getroffenen Wahl eine Anreicherungsbouillon und ein Agarmedium zu verwenden.

Die Anreicherungsbouillon wird zum Dispergieren der Probe und zur Vergrößerung der mikrobiellen Population verwendet. Sie darf Neutralisierungsmittel enthalten, wenn die zu untersuchende Probe antimikrobielle Eigenschaften besitzt.

5.4.3.2 Anreicherungsbouillon: Eugon LT 100-Bouillon

5.4.3.2.1 Allgemeines

Dieses Medium enthält Bestandteile,

- die die in der Probe vorhandenen Inhibitoren neutralisieren: Lecithin und Polysorbat 80 und
- Dispergiermittel: Octoxynol 9.

5.4.3.2.2 Zusammensetzung

Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
Sojamehl, papainisch verdaut	5,0 g
L-Cystin	0,7 g
Natriumchlorid	4,0 g
Natriumsulfit	0,2 g

Glukose	5,5 g
Ei-Lecithin	1,0 g
Polysorbat 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Wasser	1 000 ml

5.4.3.2.3 Herstellung

Nacheinander werden Polysorbat 80, Octoxynol 9 und Ei-Lecithin in siedendem Wasser bis zu deren vollständiger Auflösung aufgelöst. Die übrigen Bestandteile werden durch Rühren unter Erwärmen 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, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.4.3.3 Agarmedium zum Nachweis

5.4.3.3.1 Eugon LT 100-Agarmedium

5.4.3.3.1.1 Zusammensetzung

Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
Sojamehl, papainisch verdaut	5,0 g
L-Cystin	0,7 g
Natriumchlorid	4,0 g
Natriumsulfit	0,2 g
Glukose	5,5 g
Ei-Lecithin	1,0 g
Polysorbat 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1 000 ml

5.4.3.3.1.2 Herstellung

Nacheinander werden Polysorbat 80, Octoxynol 9 und Ei-Lecithin bis zu deren vollständiger Auflösung in siedendem Wasser aufgelöst. Die übrigen Bestandteile werden durch Rühren unter Erwärmen gelöst. Zur Vermeidung von Schaum, wird vorsichtig gerührt. Das Medium wird in geeignete Behälter gefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation und Abkühlung muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.4.3.3.2 Andere Agarmedien zum Nachweis

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

5.4.4 Agarmedium für die Kultivierung von Referenzstämmen

Es wird Soja-Casein-Pepton-Agar (SCDA) oder oder Trypton-Soja-Agar (TSA) (5.4.2.1) verwendet.

6 Geräte und Glasgeräte

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

7 Mikroorganismenstämme

Zur Prüfung der Wirksamkeit von Neutralisierungsmitteln werden zwei entsprechend repräsentative Stämme gramnegativer und grampositiver Mikroorganismen [8] [11] verwendet:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC²⁾ 9027 (gleichwertiger Stamm: CIP³⁾ 82.118 oder NCIMB⁴⁾ 8626 oder NBRC⁵⁾ 13275 oder KCTC⁶⁾ 2513 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung);
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (gleichwertiger Stamm: CIP 4.83 oder NCIMB 9518 oder NBRC 13276 oder KCTC 1916 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung).

Eine Alternative für den gramnegativen Stamm kann sein: *Escherichia coli* ATCC 8739 (gleichwertiger Stamm: CIP 53.126 oder NCIMB 8545 oder NBRC 3972 oder KCTC 2571 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung).

Die Kultur sollte nach den Verfahrensweisen wiederhergestellt werden, die vom Lieferanten des Referenzstammes bereitgestellt werden.

Die Stämme dürfen 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 (3.2) und Proben (3.3) nicht bebrütet, gekühlt oder eingefroren werden.

Die Probenahme der zu untersuchenden kosmetischen Mittel sollte wie in ISO 21148 beschrieben erfolgen. Die Proben werden nach den Festlegungen in ISO 21148 und nach folgendem 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 Zeitdauer 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.

2) ACCT = American Type Culture Collection.

3) CIP = Institut Pasteur Collection.

4) NCIMB = National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria.

5) NBRC = Biological Resource Center, NITE.

6) KCTC = Korean Collection for Type Cultures.

9.2 Herstellung der Erstverdünnung

9.2.1 Allgemeines

Die Erstverdünnung wird aus einer Probe (3.3) von mindestens 1 g oder 1 ml des gut gemischten, zu untersuchenden Produkts (3.2) hergestellt.

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

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

9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte

Abhängig vom angewendeten Verfahren (siehe 9.3 oder 9.4) wird die Probe S des Produkts in ein entsprechendes Volumen (z. B. 9 ml) Neutralisierungsmittel (5.2.2) oder Verdünnungsmittel (5.2.3) oder Anreicherungsbouillon (5.4.3.2) 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) enthält. Die Probe wird im Lösungsvermittler dispergiert, und in Abhängigkeit vom angewendeten Verfahren (siehe 9.3 oder 9.4) wird ein angemessenes Volumen (z. B. 9 ml) an Neutralisierungsmittel (5.2.2) oder Verdünnungsmittel (5.2.3) oder Anreicherungsbouillon (5.4.3.2) 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 an 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 wie in Abschnitt 13 beschrieben hergestellte Probenverdünnung 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 13 beschrieben, ausgestrichen.

9.3.2.3 Membranfiltrationsverfahren

Es werden Membranfilter mit einer Nennporenweite nicht größer als 0,45 µm verwendet.

Eine angemessene Menge der Erstverdünnung oder der, wie in Abschnitt 13 beschrieben, hergestellten Probenverdünnung (die möglichst mindestens 1 g oder 1 ml des Produkts repräsentiert) wird auf das Membranfilter überführt. Es wird sofort filtriert und das Membranfilter gewaschen (entsprechend der Verfahrensweise der Eignungsprüfung, siehe Abschnitt 13).

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 (72 ± 6) h in den auf $(32,5 \pm 2,5)$ °C eingestellten Brutschrank gestellt. Nach dem Bebrüten müssen die Petrischalen, wenn möglich sofort untersucht werden. Andernfalls dürfen sie, sofern nicht anders festgelegt, für maximal bis zu 24 h im Kühlschrank gelagert werden.

ANMERKUNG 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.

9.4 Anreicherung

9.4.1 Allgemeines

Die Erstverdünnung wird in der ausgewählten Anreicherungsbouillon (5.4.3.2) hergestellt (siehe 9.2), wobei die während der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 13) entwickelte Verfahrensweise zu befolgen ist.

9.4.2 Bebrüten der Probe

9.4.2.1 Allgemeines

Die in der Anreicherungsbouillon (5.4.3.2) hergestellte Erstverdünnung wird für mindestens 20 h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C bebrütet.

9.4.2.2 Subkultur

Mit einer sterilen Pipette werden 0,1 ml bis 0,5 ml der bebrüteten Erstverdünnung auf die Oberfläche einer Petrischale (Durchmesser 85 mm bis 100 mm) überführt, die etwa 15 ml bis 20 ml eines geeigneten Agarmediums zum Nachweis (5.4.2.1) enthält. Wenn größere Petrischalen verwendet werden, ist die Menge des Agarmediums dementsprechend zu vergrößern.

9.4.2.3 Bebrüten der Subkultur

Die beimpfte Platte ist nicht umzudrehen (oder es ist zu warten, bis die beimpfte Erstverdünnung vor dem Umdrehen absorbiert wurde), und sie ist für 48 h bis 72 h bei $(32,5 \pm 2,5)$ °C zu bebrüten.