МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 21149— 2013

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных микроорганизмов

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

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол от 7 июня 2013 г. № 43)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 июня 2016 г. № 613-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 21149—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21149:2006 «Косметика. Микробиология. Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных бактерий» («Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria», IDT).

Международный стандарт ISO 21149:2006 разработан Техническим комитетом ISO/TC 217 «Косметика» Международной организации по стандартизации (ISO).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2006 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 1
4 Сущность метода . . . 2
4.1 Общие положения . . . 2
4.2 Подсчет микроорганизмов чашечным методом . . . 2
4.3 Мембранная фильтрация . . . 2
4.4 Обнаружение бактерий с предварительным обогащением . . . 2
5 Разбавители, нейтрализаторы и питательные среды . . . 2
5.1 Общие положения . . . 2
5.2 Разбавители и нейтрализующие разбавители . . . 2
5.3 Разбавитель для бактериальной суспензии (раствор хлорида натрия с триптоном) . . . 3
5.4 Питательные среды . . . 3
6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда . . . 5
7 Штаммы микроорганизмов . . . 5
8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами . . . 5
9 Методика . . . 5
9.1 Общие рекомендации . . . 5
9.2 Приготовление исходной суспензии . . . 5
9.3 Методы подсчета . . . 6
9.4 Обогащение . . . 6
10 Подсчет колоний (чашечным методом и методом мембранной фильтрации) . . . 7
11 Обнаружение роста (с использованием обогащения) . . . 7
12 Обработка результатов . . . 7
12.1 Определение количества микроорганизмов при посеве чашечным методом . . . 7
12.2 Интерпретация результатов . . . 8
12.3 Примеры . . . 8
12.4 Обнаружение после обогащения . . . 9
13 Нейтрализация антимикробных свойств продукции . . . 10
13.1 Общие положения . . . 10
13.2 Приготовление инокулята . . . 10
13.3 Валидация метода глубинного посева . . . 10
13.4 Валидация метода обнаружения микроорганизмов с использованием обогащения . . . 11
13.5 Интерпретация результатов валидации . . . 11
14 Протокол испытания . . . 12
Приложение А (справочное) Прочие нейтрализирующие разбавители . . . 13
Приложение В (справочное) Прочие разбавители . . . 14
Приложение С (справочное) Прочие питательные среды . . . 15
Приложение D (справочное) Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывных жидкостей . . . 17
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам . . . 18
Библиография . . . 19

Поправка к ГОСТ ISO 21149—2013 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных микроорганизмов

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных микроорганизмов

Perfumery and cosmetic products. Microbiology.
Enumeration and detection of aerobic mesophilic microorganisms

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методу обнаружения и подсчету мезофильных аэробных микроорганизмов, присутствующих в парфюмерно-косметической продукции, путем подсчета колоний на агаризованной среде после инкубации в аэробных условиях или путем проверки отсутствия бактериального роста после обогащения.

Из-за большого разнообразия парфюмерно-косметической продукции в рассматриваемой области применения отдельные детали данного метода могут быть непригодными для некоторых видов продукции (например, для нерастворимой в воде продукции). Другие методы (например, автоматизированные) могут заменить метод, представленный в настоящем стандарте, при условии, что продемонстрирована их равнозначность или что альтернативный метод валидирован иным образом.

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

Чтобы обеспечить качество и безопасность продукции для потребителя, рекомендуется проводить соответствующий анализ микробиологического риска с целью определения типов парфюмерно-косметической продукции, к которой применим настоящий стандарт. К продукции с низкой степенью микробиологического риска относится продукция с низкой водной активностью, продукция на спиртовой основе, продукция с крайними значениями pH и т. д.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения):

ISO 21148:2005[1)], *Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination (Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю)*

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **мезофильные аэробные микроорганизмы** (aerobic mesophilic bacteria): Мезофильные микроорганизмы, способные к росту в аэробных условиях, установленных в настоящем стандарте.

Примечание — В указанных условиях могут быть обнаружены другие типы микроорганизмов (например, дрожжи, плесень).

3.2 **продукция** (product): Часть идентифицированной парфюмерно-косметической продукции, полученная лабораторией для испытания (анализа).

3.3 **проба** (sample): Часть продукции в количестве не менее 1 г или 1 см^3, которая используется при проведении испытаний для приготовления исходной суспензии.

[1)] Действует ISO 21148:2017.

Издание официальное

3.4 **исходная суспензия** (initial suspension): Суспензия (или раствор) пробы в определенном объеме соответствующей жидкости (разбавитель, нейтрализатор, бульон или их сочетания).

3.5 **разведение пробы** (sample dilution): Разведение исходной суспензии.

4 Сущность метода

4.1 Общие положения

Данный метод касается подсчета колоний на неселективной агаризованной среде или определения наличия или отсутствия бактериального роста после обогащения. Вероятное ингибирование микробного роста пробой должно быть нейтрализовано, чтобы можно было обнаружить все жизнеспособные микроорганизмы [1]. Во всех случаях и независимо от применяемой методики нейтрализация антимикробных свойств продукции должна быть проверена и валидирована [2]–[4].

4.2 Подсчет микроорганизмов чашечным методом

Подсчет микроорганизмов чашечным методом состоит из следующих стадий:

- подготовка чашек Петри для культивирования определенного объема исходной суспензии или разведений пробы в соответствующей питательной среде;
- инкубация чашек Петри в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение (72 ± 6) ч;
- подсчет числа колониеобразующих единиц (colony forming units) (КОЕ) и расчет количества мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм продукции.

4.3 Мембранная фильтрация

Мембранная фильтрация состоит из следующих стадий:

- внесение соответствующего количества пробы, установленного путем валидации, в фильтровальный аппарат, смоченный небольшим количеством соответствующего стерильного разбавителя, немедленное фильтрование и промывка в соответствии с валидированной методикой (см. 13.3.4). Затем мембранный фильтр переносится на поверхность определенной агаризованной среды согласно ISO 21148;
- инкубация мембранных фильтров в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение (72 ± 6) ч;
- подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и расчет количества мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм продукции.

4.4 Обнаружение бактерий с предварительным обогащением

Обнаружение бактерий с предварительным обогащением состоит из следующих стадий:

- инкубация при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение не менее 20 ч определенного количества исходной суспензии в неселективной жидкой среде, содержащей соответствующие нейтрализаторы и/или диспергирующие агенты;
- перенос определенного количества обогащенной суспензии на неселективную агаризованную среду;
- инкубация в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 48–72 ч;
- учет выросших колоний и выражение результатов как «присутствие/отсутствие» мезофильных аэробных микроорганизмов в определенной навеске *S* пробы продукции.

5 Разбавители, нейтрализаторы и питательные среды

5.1 Общие положения

Общие требования приведены в ISO 21148. Если в настоящем стандарте упоминается вода, то это означает, что применяют дистиллированную или очищенную воду, как установлено в ISO 21148.

Следующие разбавители, нейтрализаторы и питательные среды пригодны для обнаружения и подсчета мезофильных аэробных микроорганизмов. Допускается использовать другие разбавители, нейтрализаторы и питательные среды, если была продемонстрирована их пригодность.

5.2 Разбавители и нейтрализующие разбавители

5.2.1 Общие положения

Разбавитель используется для диспергирования пробы. Он может содержать нейтрализаторы, если тестируемая проба обладает антимикробными свойствами. Эффективность нейтрализации должна

быть доказана перед подсчетом количества микроорганизмов (см. раздел 13). Информация относительно применяемых нейтрализаторов приведена в приложении D.

5.2.2 Нейтрализующие разбавители

5.2.2.1 Жидкая среда с гидролизатом казеина, соевым лецитином и полисорбатом 20 (SCDLP 20 бульон)

5.2.2.1.1 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 20,0 г;
- соевый летицин — 5,0 г;
- полисорбат 20 — 40,0 см^3;
- вода — 960,0 см^3.

5.2.2.1.2 Приготовление

Растворяют полисорбат 20 в 960 см^3 воды, помешивая при нагревании, на водяной бане при температуре (49 ± 2) °С. Добавляют панкреатический гидролизат казеина и соевый лецитин. Нагревают приблизительно 30 мин до полного растворения. Перемешивают и разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 7,3 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.2.2.2 Прочие нейтрализирующие агенты

При необходимости могут использоваться другие нейтрализующие агенты (см. приложения A и D).

5.2.3 Разбавитель

5.2.3.1 Жидкость А

5.2.3.1.1 Состав

- пептический гидролизат животной ткани — 1,0 г;
- вода — 1000 см^3.

5.2.3.1.2 Приготовление

Растворяют 1 г пептона в 1 дм^3 воды. Нагревают при интенсивном перемешивании. Разливают в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH раствора должен быть равен 7,1 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.2.3.2 Другие разбавители

Могут использоваться другие подходящие нейтрализаторы (см. приложение B).

5.3 Разбавитель для бактериальной суспензии (раствор хлорида натрия с триптоном)

5.3.1 Состав

- триптон, панкреатический гидрализат казеина — 1,0 г;
- хлорид натрия — 8,5 г;
- вода — 1000 см^3.

5.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, помешивая при нагревании. Разливают в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH раствора должен быть равен 7,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.4 Питательные среды

5.4.1 Общие положения

Питательные среды могут быть приготовлены способом, описанным ниже, или из готовых сухих питательных сред согласно инструкциям изготовителя. Готовые к использованию среды могут применяться, если их состав и/или ростовые свойства соответствуют требованиям настоящего стандарта.

5.4.2 Питательные среды для подсчета микроорганизмов

5.4.2.1 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г;
- папаический гидролизат соевой муки — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 см^3.

5.4.2.1.1 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую сухую питательную среду в воде, помешивая при нагревании. Разливают в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С

в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,3 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.4.2.2 Другие среды для подсчета микроорганизмов

Могут использоваться другие подходящие среды (см. приложение С).

5.4.3 Питательные среды для обнаружения микроорганизмов

5.4.3.1 Общие положения

Для обнаружения микроорганизмов могут быть использованы агаризованная среда или бульон для обогащения.

Бульон для обогащения используется для диспергирования пробы и увеличения исходной концентрации микроорганизмов. Он может содержать нейтрализаторы, если проба, подлежащая испытанию, обладает антимикробными свойствами.

5.4.3.2 Бульон для обогащения: бульон Eugon LT 100

5.4.3.2.1 Общие положения

Данная среда содержит ингредиенты: лецитин и полисорбат 80, которые нейтрализуют ингибиторы, присутствующие в пробе, а также диспергирующий агент — октоксинол 9.

5.4.3.2.2 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г;
- папаический гидролизат соевой муки — 5,0 г;
- L-цистин — 0,7 г;
- хлорид натрия — 4,0 г;
- сульфит натрия — 0,2 г;
- глюкоза — 5,5 г;
- яичный лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- октоксинол 9 — 1,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

5.4.3.2.3 Приготовление

Растворяют последовательно полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин в кипящей воде до их полного растворения. Растворяют остальные компоненты в воде, перемешивая их при нагревании. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.4.3.3 Агаризованная среда для обнаружения микроорганизмов

5.4.3.3.1 Агаризованная среда Eugon LT 100

5.4.3.3.1.1 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г;
- папаический гидролизат соевой муки — 5,0 г;
- L-цистин — 0,7 г;
- хлорид натрия — 4,0 г;
- сульфит натрия — 0,2 г;
- глюкоза — 5,5 г;
- яичный лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- октоксинол 9 — 1,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

5.4.3.3.1.2 Приготовление

Растворяют последовательно полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин в кипящей воде до полного их растворения. Растворяют остальные компоненты, перемешивая их при нагревании. Перемешивают осторожно во избежание пенообразования. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.4.3.3.2 Прочие агаризованные среды для обнаружения микроорганизмов

Могут использоваться другие подходящие среды (см. приложение С).

5.4.4 Агаризованная среда для культивирования эталонных штаммов

Используют агаризованную среду с соево-казеиновым гидролизатом (SCDA) или триптон-соевый агар (TSA) (5.4.2.1).

6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда

Лабораторное оборудование, инструменты и стеклянная посуда должны соответствовать ISO 21148.

7 Штаммы микроорганизмов

Для определения эффективности нейтрализаторов используют штаммы типичных представителей грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [2], [5].

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (эквивалентный штамм: CIP 82.118, или NCIMB 8626, или NBRC 13275, или KCTC 2513, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции);
- *Staphylococcus aureus* ATCC[1] 6538 (эквивалентный штамм: CIP[2] 4.83, или NCIMB[3] 9518, или NBRC[4] 13276, или KCTC[5] 1916, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции).

В качестве альтернативного грамотрицательного штамма могут использоваться: *Escherichia coli* ATCC 8739 (эквивалентный штамм: CIP 53.126, или NCIMB 8545, или NBRC 3972, или KCTC 2571, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции).

Культура должна быть восстановлена согласно методикам, предусмотренным поставщиком штаммов.

Штаммы могут храниться в лаборатории в соответствии с [13].

8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами

При необходимости продукцию, подлежащую испытаниям, хранят при комнатной температуре. Не следует выдерживать в термостате, охлаждать и замораживать продукцию (3.2) и пробы (3.3) ни до, ни после анализа.

Отбор проб парфюмерно-косметической продукции, подлежащей анализу, должен осуществляться согласно методике, приведенной в ISO 21148. Анализируют пробы в соответствии с ISO 21148 и нижеследующей методикой.

9 Методика

9.1 Общие рекомендации

Для подготовки пробы, приготовления исходной суспензии и разведений используют стерильные материалы, оборудование и асептические методы. В случае приготовления исходной суспензии в подходящем разбавителе время между окончанием приготовления суспензии и моментом ее внесения в бульон для обогащения не должно превышать 45 мин, если иное не оговорено в соответствующих протоколах или документах.

9.2 Приготовление исходной суспензии

9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию готовят из навески пробы (3.3) в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$ хорошо перемешанной анализируемой продукции (3.2).

Отмечают *S*, точную массу или точный объем пробы.

Исходная суспензия обычно представляет собой разведение 1 : 10. Могут потребоваться большие объемы разбавителя или бульона для обогащения, если предполагают высокие уровни контаминации продукции и/или антимикробные свойства все еще присутствуют в разведении 1 : 10.

---

[1] ATCC — American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур (микроорганизмов).

[2] CIP — Institut Pasteur Collection (Коллекция института Пастера).

[3] NCIMB — National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Национальная коллекция промышленных и морских бактерий).

[4] NBRC — National Biological Resource center (Национальный центр биологических исследований).

[5] KCTC — Korean Collection for type culture (Корейская коллекция типовых культур).

9.2.2 Водорастворимая продукция

Переносят навеску *S* пробы продукции в соответствующий объем (например, 9 см^3) нейтрализирующего разбавителя (5.2.2), или разбавителя (5.2.3), или бульона для обогащения (5.4.3.2) в зависимости от используемого метода (9.3 или 9.4).

Регистрируют степень разведения *d*.

9.2.3 Нерастворимая в воде продукция

Переносят навеску *S* пробы продукции в подходящую посуду, содержащую определенное количество солюбилизирующего компонента (например, полисорбат 80). Диспергируют пробу и добавляют соответствующий объем (например, 9 см^3) нейтрализирующего разбавителя (5.2.2), или разбавителя (5.2.3), или бульона для обогащения (5.4.3.2) в зависимости от используемого метода (9.3 или 9.4).

Регистрируют степень разведения *d*.

9.3 Методы подсчета

9.3.1 Разведения для методов подсчета

Обычно исходная суспензия является первым разведением (10^{-1}). При необходимости готовят дополнительный ряд десятикратных разведений (1 : 10) из исходной суспензии, используя тот же разбавитель (согласно ожидаемому уровню контаминации продукции).

Как правило, подсчет проводят, используя не менее двух параллельных чашек Петри. Но можно использовать и одну чашку Петри в случае использования общепринятой практики испытаний или если подсчет проводят на последовательных разведениях одной и той же пробы или в соответствии с ранее полученными результатами.

9.3.2 Чашечные методы

9.3.2.1 Метод с использованием глубинного посева

В чашки Петри диаметром 85—100 мм вносят 1 см^3 исходной суспензии и/или ее разведения, приготовленного соответствующим образом (см. раздел 13), и заливают 15—20 см^3 расплавленной агаризованной среды (5.4.2), которая поддерживалась в таком состоянии на водяной бане при температуре не более чем 48 °С. Если используются чашки Петри большего диаметра, соответственно увеличивается количество агаризованной среды на чашку.

Перемешивают исходную суспензию и/или ее разведение со средой, осторожно вращая чашки круговыми движениями для полного распределения пробы. Дают среде в чашках Петри застыть на горизонтальной поверхности при комнатной температуре.

9.3.2.2 Метод с использованием поверхностного посева

В чашки Петри диаметром 85—100 мм заливают по 15—20 см^3 расплавленной агаризованной среды (5.4.2), которая поддерживалась в таком состоянии на водяной бане при температуре не более чем 48 °С. Если применяются чашки Петри большего диаметра, соответственно увеличивается количество агаризованной среды на чашку. Дают среде застыть, например в ламинарном шкафу или в термостате. Шпателем распределяют по поверхности среды не менее 0,1 см^3 исходной суспензии и/или ее разведения, приготовленного соответствующим образом (см. раздел 13).

9.3.2.3 Метод мембранной фильтрации

Используют мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм.

Переносят соответствующее количество исходной суспензии или ее разведения, приготовленного соответствующим образом (предпочтительно не менее 1 г или 1 см^3 продукции) на мембранный фильтр. Фильтруют сразу же и промывают мембранный фильтр (следуя методике, разработанной в процессе валидации, см. раздел 13).

Переносят мембранный фильтр на поверхность агаризованной среды (5.4.2).

9.3.2.4 Инкубация

Если не оговорено иное, переворачивают инокулированные чашки вверх дном и помещают их в термостат, поддерживающий температуру (32,5 ± 2,5) °С, на (72 ± 6) ч. После термостатирования, если это возможно, посевы сразу же исследуют. В противном случае их следует хранить в холодильнике не более 24 ч.

Примечание — В некоторых случаях, если существует вероятность того, что частицы продукции будут приняты за колонии, целесообразно приготовить дублирующие чашки, содержащие те же разведения пробы и агаризованную среду, которые хранят в холодильнике для сравнения с инкубированными чашками.

9.4 Обогащение

9.4.1 Общие положения

Исходную суспензию готовят (см. 9.2) в бульоне для обогащения (5.4.3.2), выбранном согласно методике, разработанной во время валидации (см. раздел 13).

9.4.2 Инкубация пробы

9.4.2.1 Общие положения

Инкубируют исходную суспензию, приготовленную в бульоне (5.4.3.2), при температуре (32,5 ± 2,5) °С не менее 20 ч.

9.4.2.2 Субкультура

С помощью стерильной пипетки переносят 0,1–0,5 см^3 инокулированной суспензии на поверхность чашки Петри (диаметром 85—100 мм), содержащей приблизительно 15—20 см^3 соответствующей агаризованной среды (5.4.2.1). Если используются большие чашки Петри, соответственно объем среды на чашку возрастает.

9.4.2.3 Инкубация субкультуры

Не переворачивают инокулированную чашку Петри до тех пор, пока агаризованная среда в ней не застынет, затем субкультуру инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 48—72 ч.

10 Подсчет колоний (чашечным методом и методом мембранной фильтрации)

После инкубации подсчитывают колонии:

- на чашках Петри, содержащих от 30 до 300 колоний; при подсчете менее чем 30 колоний см. 12.2.3;
- на мембранных фильтрах, содержащих от 15 до 150 колоний; при подсчете менее чем 15 колоний см. 12.2.3.

11 Обнаружение роста (с использованием обогащения)

После инкубирования субкультуры проверяют поверхность агара и регистрируют присутствие или отсутствие роста.

12 Обработка результатов

12.1 Определение количества микроорганизмов при посеве чашечным методом

Вычисляют число N микроорганизмов, присутствующих в пробе S, используя:

m — среднеарифметическое округленное число колоний из двух чашек Петри по формуле (1) ;

c — число колоний, подсчитанных на одной чашке по формуле (2), или

$\overline{x}_C$ — среднее взвешенное число колоний, полученное из двух последовательных разведений по формуле (3):

$$N = m/(V \cdot d), \tag{1}$$

$$N = c/(V \cdot d), \tag{2}$$

$$N = \overline{x}_C(V \cdot d), \tag{3}$$

где m — среднеарифметическое число колоний, полученное из двух чашек Петри;

V — объем инокулята, внесенного в каждую чашку, см^3;

d — коэффициент разведения, соответствующий разведению при приготовлении исходной суспензии (9.2) или при первом подсчитанном разведении;

c — число колоний, подсчитанных на одной чашке;

$\overline{x}_C$ — среднее число колоний, полученное из двух последовательных разведений и вычисленное следующим образом:

$$\overline{x}_C = \frac{\sum c}{n_1 + 0{,}1n_2}, \tag{4}$$

где $\sum c$ — сумма колоний, подсчитанных на всех чашках, выбранных для подсчета из двух последовательных разведений;

n_1 — количество чашек, использованное для подсчета количества микроорганизмов в исходной суспензии (или в первом из подсчитанных разведений);

n_2 — количество чашек, на которых подсчитано количество микроорганизмов для 10^{-1} разведения исходной суспензии (или для второго подсчитанного разведения).

Округляют вычисленный результат до двух значащих цифр. При этом, если последняя цифра менее 5, предшествующая цифра не изменяется; если последняя цифра 5 или более, предшествующую цифру увеличивают на единицу. Продолжают поэтапно до тех пор, пока две значащие цифры не будут получены. Отмечают полученное число *N*.

12.2 Интерпретация результатов

12.2.1 Принимают во внимание изменчивость, которая свойственна чашечным методам подсчета. Два результата должны рассматриваться как различные только тогда, когда разность превышает 50 % или когда эта разность, выраженная логарифмически, более 0,3.

Для более точного подсчета учитывают только чашки, на которых содержится от 30 до 300 колоний, и мембранные фильтры, содержащие от 15 до 150 колоний. Проверяют, чтобы подсчеты были получены из разведений, подтвержденных путем валидации выбранного метода (см. раздел 13).

12.2.2 Если число КОЕ более 30 и менее чем 300 на чашках или более чем 15 и менее чем 150 на мембранных фильтрах, где *S* — масса или объем пробы (9.2), результат выражают следующим образом:

- если *S* не менее 1 г или 1 см^3, а *V* не менее 1 см^3: количество мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы = *N*/S;
- если *S* менее 1 г или 1 см^3 и/или *V* менее 1 см^3: количество мезофильных аэробных микроорганизмов в пробе (отмечают тестирумое количество пробы, принимая во внимание *S* и *V*) = *N*.

Выражают результат как число между 1,0 и 9,9, умноженное на соответствующую степень 10 (см. примеры 1, 2, 3, 7).

12.2.3 Если КОЕ менее 30 на чашках или менее 15 на мембранных фильтрах, выражают результат следующим образом:

- если *S* не менее 1 г или 1 см^3 и/или *V* не менее 1 см^3: количество мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы = *N*/*S*;
- если *S* менее 1 г или 1 см^3 и/или *V* менее 1 см^3: количество мезофильных аэробных микроорганизмов в пробе = *N*,

где *S* — масса или объем пробы (9.2). Выражают результат как число между 1,0 и 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени (см. примеры 4—6).

12.2.4 Если на чашках отсутствует рост, результат выражают следующим образом:

- менее чем $1/d \cdot V \cdot S$ мезофильных аэробных микроорганизмов на грамм или кубический сантиметр продукции (*S* не менее 1 г или 1 см^3);
- менее чем $1/d \cdot V$ мезофильных аэробных микроорганизмов в пробе *S* (отмечают исследуемое количество пробы, принимая во внимание *S* и *V*) *(S* менее 1 г или 1 см^3),

где *d* — коэффициент разведения исходной суспензии (9.2) и *V* равен 1 (для метода с использованием глубинного посева и для мембранной фильтрации) или 0,1 (для метода с использованием поверхностного посева) (см. пример 8).

12.3 Примеры

12.3.1 Пример 1. Учет по двум чашкам одного разведения

S = 1 г или 1 см^3; *V* = 1; полученные подсчеты: для разведения 10^{-1} — 38 и 42.

Для формулы (1):

$N = m / (V \cdot d) = 40 / (1 \cdot 10^{-1}) = 40 / 0{,}1 = 400$ или 4 10^2 мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.2 Пример 2. Учет по одной чашке

S = 1 г или 1 см^3; *V* = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 60.

Для формулы (2):

$N = c / (V \cdot d) = 60 / (1 \cdot 10^{-1}) = 60 / 0{,}1 = 600$ или $6 \cdot 10^2$ мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.3 Пример 3. Учет по двум чашкам двух последовательных разведений

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-2} — 235 и 282; для разведения 10^{-3} — 31 и 39.

Для формулы (3):

$N = \overline{x}_C / (V \cdot d) = 235 + 282 + 31 + 39 / 1(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-2} = 587 / 0{,}022 = 26\,682$.

Округляя результат, как установлено выше, получаем 27000, или $2{,}7 \cdot 10^4$ мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.4 Пример 4. Учет по двум мембранным фильтрам одного разведения

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 18 и 22.

Для формулы (1):

$N = m / (V \cdot d) = 20 / (1 \cdot 10^{-1}) = 20 / 0{,}1 = 200$ или $2 \cdot 10^2$ мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.5 Пример 5. Учет по одному мембранному фильтру

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 65.

Для формулы (2):

$N = c / (V \cdot d) = 65 / (1 \cdot 10^{-1}) = 65 / 0{,}1 = 650$, или $6{,}5 \cdot 10^2$ мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.6 Пример 6. Учет по двум мембранным фильтрам из двух последовательных разведений

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} —121 и 105; для разведения 10^{-2} — 15 и 25.

Для формулы (3):

$N = \overline{x}_C / (V \cdot d) = 121 + 105 + 15 + 25 / 1\,(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-1} = 266 / 0{,}22 = 1209$.

Округляя результат, как указано выше, получаем 1200, или $1{,}2 \cdot 10^3$ мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.7 Пример 7. Учет по двум чашкам одного разведения

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 28 и 22.

Для формулы (1):

$N = m / (V \cdot d) = 25 / (1 \cdot 10^{-1}) = 25 / 0{,}1 = 250$.

Полученное число равно 250, или $2{,}5 \cdot 10^2$ мезофильных аэробных микроорганизмов на сантиметр кубический или грамм пробы.

12.3.8 Пример 8

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 0 и 0 (отсутствие роста на двух чашках).

Для формулы (1):

$N \le 1 / (V \cdot d)$,

$\le 1 / (1 \cdot 10^{-1})$,

$\le 1 / 0{,}1$,

≤ 10.

Полученное число равно менее чем 10 мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.3.9 Пример 9

S = 1 г или 1 см^3; V = 1; полученный подсчет: для разведения 10^{-1} — 0 и 3.

Для формулы (1):

$N \le m (V \cdot d)$,

$\le 1{,}5 / (1 \cdot 10^{-1})$,

$\le 1{,}5 / 0{,}1$,

≤ 15.

Полученное число менее чем 15 мезофильных аэробных микроорганизмов на кубический сантиметр или грамм пробы.

12.4 Обнаружение после обогащения

В случае обнаружения роста (см. раздел 11) результат представляют как: мезофильные аэробные микроорганизмы обнаружены в навеске S пробы, и продолжают подсчет, используя один из предлагаемых методов (см. 9.3). Если рост не обнаружен (см. раздел 11), результаты представляют как: мезофильные аэробные микроорганизмы не обнаружены в навеске S пробы.

13 Нейтрализация антимикробных свойств продукции

13.1 Общие положения

Описанные ниже процедуры демонстрируют, что микроорганизмы могут расти в условиях проведения анализа.

Два штамма (см. раздел 7), используемые для подтверждения этих свойств, обычно чувствительны к антимикробным агентам.

13.2 Приготовление инокулята

Перед проведением испытаний (для каждого штамма) засевают поверхность агаризованной среды, содержащей соево-казеиновый гидролизат (SCDA), или другой соответствующей (неселективной, ненейтрализирующей) среды. Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18—24 ч. Кончиком стерильной петли отбирают часть культуры и ресуспендируют ее в разбавителе для приготовления бактериальных суспензий (5.3), чтобы получить калиброванную суспензию с количеством клеток около $1 \cdot 10^8$ КОЕ/см^3 [например, количество клеток можно измерить, используя спектрофотометр, по ISO 21148 (приложение С)]. Используют данную суспензию и ее разведения в течение 2 ч.

13.3 Валидация метода глубинного посева

13.3.1 Сущность метода

Для каждого штамма смешивают нейтрализованную пробу (исходную суспензию или ее разведение в соответствии с антимикробной активностью или низкой растворимостью продукции) с разведением культуры микроорганизма. Высевают на чашку Петри или фильтруют через мембранный фильтр. После инкубирования проверяют морфологию колоний и сравнивают полученное число колоний с контрольным (без пробы).

Если количество микроорганизмов составляет менее 50 % (0,3 log) от количества в контрольной пробе, модифицируют методику (используя другие разбавители, средства для нейтрализации или сочетания того и другого, см. приложение D). Необходимо принимать во внимание изменчивость, свойственную для чашечного метода подсчета. Два результата должны рассматриваться как различные, только если разность превышает 50 %, или, будучи выражена логарифмически, превышает 0,3. Отсутствие роста инокулята делает испытание недействительным, если только не учитывать контаминацию продукции этим микроорганизмом как маловероятную.

13.3.2 Валидация глубинного метода посева

Смешивают 9 см^3 исходной суспензии и/или ее разведения (разведений) в нейтрализирующем разбавителе (или в другом, см. 5.2) с 1 см^3 суспензии микроорганизмов, содержащих от 1000 до 3000 КОЕ/см^3. Переносят 1 см^3 в чашку Петри (предпочтительно в две параллельные чашки) и заливают 15—20 см^3 расплавленной агаризованной среды (5.4.2), выдержанной на водяной бане при температуре не выше чем 48 °С. Параллельно приготавливают и делают контрольный посев, используя тот же самый разбавитель и ту же самую суспензию микроорганизмов, но без пробы.

После инкубации в течение 24—72 ч при температуре (32,5 ± 2,5) °С подсчитывают колонии на чашках и сравнивают с результатами, полученными при испытании, и результатами контрольного испытания. Разбавитель и метод подсчета считают подходящими при разведении 1 . 10 (когда используется 1 см^3 исходной суспензии), если количество микроорганизмов составляет не менее 50 % (0,3 log) от количества микроорганизмов в контрольном посеве.

13.3.3 Валидация поверхностного метода посева

Смешивают 9 см^3 исходной суспензии и/или ее разведения (разведений) в нейтрализирующем разбавителе (или в другом, см. 5.1) с 1 см^3 суспензии микроорганизмов, содержащих от 10000 до 30000 КОЕ/см^3 клеток (или менее, если распределяют 0,5 см^3 или 1 см^3). Распределяют не менее 0,1 см^3 по поверхности твердой агаризованной среды (5.4.2) (предпочтительно в две параллельные чашки). Параллельно приготавливают и делают контрольный посев, используя тот же самый разбавитель и ту же самую суспензию микроорганизмов, но без пробы.

После инкубации в течение 24—72 ч при температуре (32,5 ± 2,5) °С подсчитывают колонии на чашках и сравнивают с результатами, полученными при испытании, и результатами контрольного испытания. Разбавитель и метод подсчета считают действительными при разведении 1 : 10 (когда используется 1 см^3 исходной суспензии), если количество микроорганизмов составляет не менее 50 % (0,3 log) от количества микроорганизмов в контрольном посеве.

13.3.4 Валидация метода мембранной фильтрации

Смешивают соответствующее количество исходной суспензии пробы или ее разведения, использованного в испытании (см. 9.3.2.3), и соответствующее количество калиброванной суспензии микроорганизмов, количество клеток в которой соответствует приблизительно 100 КОЕ/см^3.

Фильтруют сразу же весь объем и промывают мембранный фильтр, используя необходимые объемы воды (5.1), разбавителя (5.2.3) или нейтрализатора (5.2.2). Переносят мембранный фильтр на поверхность соответствующей агаризованной среды (5.4.2).

Параллельно готовят контрольный посев при условиях, описанных выше, но без пробы продукции. Фильтруют и промывают контроль при тех же условиях.

После инкубации в течение 24—72 ч при температуре (32,5 ± 2,5) °С подсчитывают колонии на мембранных фильтрах и сравнивают с результатами, полученными при испытании, и результатами контрольного испытания. Метод мембранной фильтрации и разбавитель считают подходящими, если количество микроорганизмов составляет по крайней мере 50 % (0,3 log) от количества микроорганизмов в контрольной пробе.

13.4 Валидация метода обнаружения микроорганизмов с использованием обогащения

13.4.1 Проведение испытания

В пробирках, содержащих по 9 см^3 разбавителя для бактериальных суспензий (5.3), готовят ряд разведений штамма каждой калиброванной суспензии, для того чтобы получить количество клеток от 100 до 500 КОЕ/см^3. Для подсчета окончательной концентрации жизнеспособных микроорганизмов в стандартной суспензии переносят 1 см^3 суспензии в чашку Петри и заливают 15—20 см^3 расплавленной агаризованной среды (5.4.2), выдержанной на водяной бане при температуре не выше 48 °С.

Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

Выполняют два параллельных приготовления (две повторности) исходной суспензии пробы (3.3) в условиях, выбранных для анализа [не менее 1 г или 1 см^3 продукции, определенный объем бульона для обогащения (5.4.3.2)], используя пробирки или колбы. В одну пробирку (испытание на подтверждение) асептически вносят 0,1 см^3 стандартной суспензии микроорганизмов. Смешивают, затем инкубируют каждую пробирку (тестирование на валидацию и контроль) при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

Используя стерильную пипетку, из каждой пробирки или колбы переносят по 0,1—0,5 см^3 (при тех же условиях, что и в испытании) инкубированной смеси на поверхность чашки Петри (диаметром 85—100 мм), содержащей приблизительно 15—20 см^3 соответствующей агаризованной среды.

Инкубируют чашки при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 24—72 ч.

13.4.2 Интерпретация результатов

В отношении каждого штамма проверяют, чтобы стандартная суспензия микроорганизмов содержала от 100 до 500 КОЕ/см^3.

Нейтрализация и метод обнаружения валидируются, если детектируется характерный рост микроорганизмов, такой как:

- для *Staphylococcus aureus:* культура пигментирована в желтый цвет;
- для *Pseudomonas aeruginosa:* зеленовато-желтая культура.

Культура инокулированного микроорганизма отмечается на чашке для подтверждения, рост на контрольной чашке не отмечается.

Когда рост отмечается на контрольной чашке (контаминированная продукция), нейтрализация и метод обнаружения подтверждаются в случае, если инокулированный микроорганизм был выделен на валидационной чашке.

13.5 Интерпретация результатов валидации

Отсутствие роста на валидационных чашках Петри указывает на то, что антимикробная активность по-прежнему присутствует и делает необходимым изменение условий данного метода. Это может быть достигнуто увеличением объема питательного бульона (количество продукции остается одинаковым), или введением достаточного количества инактивирующего агента в питательный бульон, или соответствующей комбинацией изменений, для того чтобы обеспечить рост микроорганизмов.

Если, несмотря на введение соответствующих инактивирующих агентов и значительное увеличение объема бульона, все еще невозможно регенерировать жизнеспособные культуры, как описано выше, это указывает на то, что данная продукция, вероятно, не может быть контаминирована определенным видом микроорганизма.

14 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать следующее:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации продукции;

b) используемый метод;

c) полученные результаты;

d) все детали приготовления исходной суспензии;

e) описание метода с используемыми нейтрализаторами и питательными средами;

f) подтверждение метода, даже если испытание проводилось отдельно;

g) любые моменты, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с деталями, которые могут повлиять на полученные результаты.

Приложение А
(справочное)

Прочие нейтрализирующие разбавители

А.1 Общие положения

Любой нейтрализующий разбавитель может использоваться для приготовления исходной суспензии, если он будет проверен и подтвержден. Нижеприведенные разбавители являются примерами соответствующих растворов требуемого состава. Общая информация по нейтрализации приводится в приложении D.

А.2 Жидкий бульон Eugon LT 100

См. 5.4.3.2.

А.3 Лецитин — полисорбатный (LP) разбавитель

А.3.1 Состав

- полипептон — 1,0 г;
- яичный лецитин — 0,7 г;
- полисорбат 80 — 20,0 г;
- вода — 980 см^3.

А.3.2 Приготовление

Растворяют ингредиенты путем перемешивания при нагревании. Охлаждают до температуры 25 °С перед тем, как разлить раствор в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH раствора должен быть равен 7,2 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.4 Модифицированный бульон Letheen [5]

А.4.1 Состав

- пептический гидрализат мяса — 20,0 г;
- панкреатический гидрализат казеина — 5,0 г;
- мясной экстракт — 5,0 г;
- дрожжевой экстракт — 2,0 г;
- лецитин — 0,7 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- бисульфит натрия — 0,1 г;
- вода — 1000 см^3.

А.4.2 Приготовление

Растворяют полисорбат 80 и лецитин последовательно в кипящей воде до их полного растворения. Растворяют другие компоненты путем перемешивания при нагревании. Растворяют осторожно во избежание пенообразования. Разливают полученную среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 7,2 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

Приложение В
(справочное)

Прочие разбавители

В.1 Общие положения

Любой нейтрализующий разбавитель может использоваться для приготовления исходной суспензии, если он будет проверен и подтвержден. Нижеприведенный разбавитель является примером раствора требуемого состава.

В.2 Забуференная пептонная вода (pH 7)

В.2.1 Состав

- мясной пептон — 1,0 г;
- хлорид натрия — 4,3 г;
- однозамещенный фосфорнокислый калий — 3,6 г;
- двузамещенный фосфорнокислый натрий — 7,2 г;
- вода — 1000 $см^3$.

В.2.2 Приготовление

Растворяют ингредиенты в кипящей воде. Перемешивают. Охлаждают до температуры 25 °С, перед тем как разлить раствор в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH раствора должен быть равен 7,1 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

Приложение С
(справочное)

Прочие питательные среды

С.1 Общие положения

Любая питательная среда может использоваться, если она проверена и валидирована. Нижеприведенные среды являются примерами сред требуемого состава.

С.2 Агаризованные среды для подсчета

С.2.1 Eugon LT 100 агаризованная среда

См. 5.4.3.3.1.

С.2.2 Агар LT 100

С.2.2.1 Состав

- панкреатический гидрализат казеина — 15,0 г;
- папаиновый гидрализат соевой муки — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- яичный лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- октоксинол 9 — 1,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

С.2.2.2 Приготовление

Растворяют полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин последовательно в кипящей воде до их полного растворения. Растворяют оставшиеся компоненты, перемешивая при нагревании. Перемешивают осторожно во избежание пенообразования. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

С.2.3 Агаризованная среда с соево-казеиновым гидрализатом (бульон SCD с добавлением агара)

С.2.3.1 Состав

- казеиновый пептон — 17,0 г;
- соевый пептон — 3,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- двузамещенный фосфорнокислый калий — 2,5 г;
- глюкоза — 2,5 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

С.2.3.2 Приготовление

Последовательно растворяют все компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,2 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

С.3 Бульоны для обогащения

С.3.1 Модифицированный бульон Letheen [5]

См. А.4.

С.3.2 Среда с соей, казеином, гидрализатом, лецитином и полисорбатом 80 (бульон SCDLP 80)

С.3.2.1 Состав

- казеиновый пептон — 17,0 г;
- соевый пептон — 3,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- двузамещенный фосфорнокислый калий — 2,5 г;
- глюкоза — 2,5 г;
- лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 7,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

С.3.2.2 Приготовление

Последовательно растворяют все компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре

121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,2 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

С.3.3 D/E-нейтрализирующий бульон (Dey/Engley-нейтрализирующий бульон) [5]

С.3.3.1 Состав

- глюкоза — 10,0 г;
- соевый лецитин — 7,0 г;
- $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ — 6,0 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- панкреатический гидрализат казеина — 5,0 г;
- $NaHSO_3$ — 2,5 г;
- дрожжевой экстракт — 2,5 г;
- тиогликолят натрия — 1,0 г;
- бромкрезоловый пурпурный — 0,02 г;
- вода — 1000 $см^3$.

С.3.3.2 Приготовление

Последовательно растворяют все компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,6 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

С.4 Агаризованная среда с соей, казеином, гидрализатом, лецитином и полисорбатом 80 (SCDLPA) для обнаружения микроорганизмов

С.4.1 Состав

- казеиновый пептон — 15,0 г;
- соевый пептон — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- яичный лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 7,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

С.4.2 Приготовление

Смешивают и растворяют ингредиенты путем нагревания. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

Приложение D
(справочное)

Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывных жидкостей

Консерванты	Химические вещества, способные нейтрализовать антимикробную активность консервантов	Примеры подходящих нейтрализаторов и промывных жидкостей (для методов мембранной фильтрации)
Фенольные соединения: - парабены; - феноксиэтанол; - фенилэтанол и др. Анилиды	Лецитин Полисорбат 80 Конденсат этиленоксида жирного спирта Неионогенные поверхностно-активные вещества	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + лецитин, 3 г/дм^3 Конденсат этиленоксида жирного спирта, 7 г/дм^3, + лецитин, 20 г/дм^3, + полисорбат 80, 4 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон [a)] Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Четвертичные аммониевые соединения Катионогенные поверхностно-активные вещества	Лецитин, сапонин, полисорбат 80, додецил сульфат натрия Конденсат этиленоксида жирного спирта	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + додецил сульфат натрия, 4 г/дм^3, + лецитин, 3 г/дм^3 Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон [a)] Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Альдегиды Вещества, выделяющие формальдегид	Глицин, гистидин	Лецитин, 3 г/дм^3, + полисорбат 80, 30 г/дм^3, + + L-гистидин, 1 г/дм^3 Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + L-гистидин, 1 г/дм^3, + L-цистеин, 1 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон [a)] Промывная жидкость: полисорбат 80, 3 г/дм^3, + L-гистидин, 0,5 г/дм^3
Окисляющие соединения	Тиосульфат натрия	Тиосульфат натрия, 5 г/дм^3 Промывочная жидкость: тиосульфат натрия, 3 г/дм^3
Изотиазолиноны, имидазолы	Лецитин, сапонин Амины, сульфаты, меркаптаны, бисульфит натрия, тиогликолят натрия	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 Промывная жидкость: триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Бигуаниды	Лецитин, сапонин, полисорбат 80	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 Промывная жидкость: триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Соли металлов (Cu, Zn, Hg) Ртуть-органические соединения	Бисульфит натрия, L-цистеин Сульфгидрильные соединения, тиогликолевая кислота	Тиогликолят натрия, 0,5 г/дм^3 или 5 г/дм^3 L-цистеин, 0,8 г/дм^3 или 1,5 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон [a)] Промывная жидкость: тиогликолят натрия, 0,5 г/дм^3

[a)] D/E-нейтрализующий бульон (Dey/Engley-нейтрализующий бульон), см. приложение А.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 21148:2005	IDT	ГОСТ ISO 21148—2013 «Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю»
Примечание — В настоящей таблице использовано условное обозначение степени соответствия стандарта: - IDT — идентичный стандарт		

Библиография

[1] CTFA, Microbiology Guidelines, pub. Cosmetic, Toiletry and Fragrance Assn., ISBN 1-88261-32-8, 2001
(Руководство по микробиологии)

[2] EP, Microbiological examination of non-sterile products, 4th ed., 2002 published by the European Pharmacopoeia
(Микробиологическая экспертиза нестерильной продукции)

[3] J.P 14, General tests — Microbial limit test, 2001 published by the Japanese Pharmacopoeia
(Общие испытания. Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[4] USP 28, Microbial limit test (61), 2005 published by the U.S. Pharmacopoeia
(Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[5] FDA, Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, 1995 published by the U.S. Food and Drug Administration,
gost.e-ecolog.ru
(Руководство по бактериологическому анализу)

[6] SINGER, S., The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. Cosmetics and Toiletries, 102, December 1987. P. 55
(Применение нейтрализаторов консервантов в разбавителях и средах для чашек Петри, косметике и парфюмерии)

[7] EN 1040:2006 Chemical disinfectants and antiseptics — Basic bactericidal activity — Test method and requirements (phase 1)
(Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Количественное испытание суспензии для оценки основной бактерицидной активности химических дезинфицирующих и антисептических средств. Метод испытания и требования (фаза 1)

[8] ISO 18415:2007[1)] Cosmetics — Microbiology — Detection of specified microorganisms (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans) and non-specified microorganisms
(Косметика. Микробиология. Обнаружение специфических и неспецифических микроорганизмов)

[9] ISO 18416:2007[2)] Cosmetics — Microbiology — Detection of Candida albicans
(Косметика. Микробиология. Обнаружение Candida albicans)

[10] ISO 21150:2006[3)] Cosmetics — Microbiology — Detection of Escherichia coli
(Косметика. Микробиология. Обнаружение Escherichia coli)

[11] ISO 22717:2006[4)] Cosmetics — Microbiology — Detection of Pseudomonas aeruginosa
(Косметика. Микробиология. Обнаружение синегнойной палочки Pseudomonas aeruginosa)

[12] ISO 22718:2006[5)] Cosmetics — Microbiology — Detection of Staphylococcus aureus
(Косметика. Микробиология. Обнаружение Staphylococcus aureus)

[13] EN 12353 Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of microbial strains used for the determination of bactericidal and fungicidal activity
(Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Сохранение микроорганизмов для испытаний, используемых для определения бактерицидной, микобактерицидной, спорицидной и фунгицидной активности)

[14] COLIPA, Guidelines on Microbial Quality Management, 1997 published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA)
(Руководство по менеджменту качества в микробиологии)

[15] Atlas, R.M. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, ISBN 0-8493-2944-2, 1993
(Справочник по микробиологическим средам)

[1)] Действует ISO 18415:2017.

[2)] Действует ISO 18416:2015.

[3)] Действует ISO 21150:2015.

[4)] Действует ISO 22717:2015.

[5)] Действует ISO 22718:2015.

УДК 665.57/.58:579.2.2:006.354 МКС 07.100.99; 71.100.70

Ключевые слова: продукция парфюмерно-косметическая, микробиологические исследования, контроль, микроорганизмы, разбавители, питательные среды, штаммы микроорганизмов

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 03.04.2019. Подписано в печать 20.05 2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,23.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ ISO 21149—2013 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных микроорганизмов

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

gost.e-ecolog.ru