МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO 21149— 2020**

# ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ

## Микробиология. Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных бактерий

**(ISO 21149:2017, Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria, IDT)**

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2021

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 результатам голосования в АИС МГС (протокол от 30 января 2020 г. № 126-П)

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 |
|---|---|---|
| Армения | AM | ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения |
| 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 24 августа 2021 г. № 760-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 21149—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2022 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21149:2017 «Косметика. Микробиология. Подсчет и обнаружение мезофильных аэробных бактерий» («Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для увязки с наименованиями, принятыми в существующем комплексе межгосударственных стандартов.

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

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

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 21149—2013

*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, 2017
© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2021

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

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 бактерий

Perfume and cosmetic prodacts. Microbiology Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria

**Дата введения — 2022—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методу обнаружения и подсчета мезофильных аэробных бактерий, содержащихся в парфюмерно-косметической продукции:

- путем подсчета колоний на агаризованной среде после инкубации в аэробных условиях или
- путем контроля 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). Можно применять другие методы (например, автоматизированные) вместо приведенных тестов при условии, что должным образом была доказана их равнозначность или подтверждена пригодность.

При необходимости подсчитанные и обнаруженные микроорганизмы могут быть идентифицированы с помощью соответствующих идентификационных тестов, установленных в стандартах, перечисленных в библиографии.

Чтобы обеспечить качество и безопасность продукции для потребителя, рекомендуется проводить соответствующий анализ микробиологического риска (см. ISO 29621) с целью определения видов парфюмерно-косметической продукции, к которой применим настоящий стандарт. К продукции с низкой степенью микробиологического риска относится продукция с низкой активностью воды, продукция на водно-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 его изменения)]:

ISO 21148:2017, Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination (Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю)

EN 12353, Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Консервация тест-микроорганизмов, используемых для определения бактерицидной (включая микроорганизмы Legionella), микобактерицидной, спорицидной, фунгицидной и вируцидной (включая бактериофаги) активности)

**Издание официальное**

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

В целях стандартизации ISO и IEC предоставляют терминологические базы данных по следующим ссылкам:

- электропедия IEC: gost.e-ecolog.ru ;
- онлайн-библиотека стандартов ISO: gost.e-ecolog.ru

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

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

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

3.3 **проба** (sample): Часть продукции (см. 3.2) в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$, которая используется при проведении испытаний для приготовления исходной суспензии (см. 3.4).

3.4 **исходная суспензия** (initial suspension): Суспензия (или раствор) пробы (см. 3.3) в определенном объеме соответствующей жидкости (разбавителе, нейтрализаторе, бульоне или их смеси).

3.5 **разведение пробы** (sample dilution): Разбавление исходной суспензии (см. 3.4).

## 4 Сущность метода

### 4.1 Общие положения

Данный метод предусматривает подсчет колоний на неселективной агаризованной среде или определение наличия или отсутствия бактериального роста после обогащения. Возможное ингибирование микробного роста пробой должно быть нейтрализовано, чтобы можно было обнаружить все жизнеспособные микроорганизмы [7]. Во всех случаях и независимо от применяемой методики нейтрализация антимикробных свойств продукции должна быть проверена и подтверждена (см. раздел 13) [8]—[10].

### 4.2 Подсчет чашечным методом

Подсчет чашечным методом включает следующие этапы:

a) подготовка чашек Петри для глубинного или поверхностного посева с использованием конкретной питательной среды и посев определенного количества исходной суспензии или разведения продукции;

b) инкубация чашек Петри в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °C в течение (72 ± 6) ч;

c) подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и вычисление количества мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм продукции.

### 4.3 Мембранная фильтрация

Мембранная фильтрация включает следующие этапы:

a) перенос соответствующего количества пробы, приготовленной в соответствии с разделом 13, в фильтровальный аппарат, смоченный небольшим объемом соответствующего стерильного разбавителя, немедленное фильтрование и промывание согласно установленной методике (см. 13.3.4). Перенос мембранного фильтра на поверхность определенной агаризованной среды — согласно ISO 21148;

b) инкубацию мембранных фильтров в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °C в течение (72 ± 6) ч;

c) подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и вычисление количества мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм продукции.

### 4.4 Обнаружение бактерий с предварительным обогащением

Обнаружение бактерий с предварительным обогащением включает следующие этапы:

a) инкубацию при температуре (32.5 ± 2,5) °C в течение не менее 20 ч определенного количества исходной суспензии в неселективной жидкой среде, содержащей соответствующие нейтрализаторы и/или диспергирующие вещества;

b) перенос определенного количества обогащенной суспензии на неселективную агаризованную среду;

c) инкубацию в аэробных условиях при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 48—72 ч;

d) учет выросших колоний и представление результатов как «присутствие/отсутствие» мезофильных аэробных бактерий в пробе *S* продукции.

## 5 Разбавители, нейтрализаторы и питательные среды

### 5.1 Общие положения

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

Приведенные ниже разбавители, нейтрализаторы и питательные среды пригодны для обнаружения и подсчета мезофильных аэробных бактерий. Можно использовать другие разбавители, нейтрализаторы и питательные среды, если была подтверждена их пригодность.

### 5.2 Разбавители и нейтрализующие разбавители

#### 5.2.1 Общие положения

Разбавитель используется для диспергирования пробы. Он может содержать нейтрализаторы, если испытуемая проба обладает антимикробными свойствами. Эффективность нейтрализации должна быть подтверждена до начала подсчета количества (см. раздел 13). Информация о пригодных для использования нейтрализаторах 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 лецитин — 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, перемешивая 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 при измерении при комнатной температуре.

5.2.2.2 Другие нейтрализирующие разбавители

При необходимости могут использоваться другие нейтрализующие вещества (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 — 1 000 см$^3$.

5.2.3.1.2 Приготовление

Растворяют 1 г пептона в воде и доводят объем до 1 дм$^3$. 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 при измерении при комнатной температуре.

5.2.3.2 Другие разбавители

Могут использоваться другие нейтрализаторы (см. приложение B).

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

#### 5.3.1 Состав

Триптон, панкреатический гидролизат казеина — 1,0 г.

Хлорид натрия — 8,5 г.

Вода — 1 000 см$^3$.

**5.3.2 Приготовление**

Растворяют компоненты в воде, перемешивая 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 при измерении при комнатной температуре.

**5.4 Питательные среды**

**5.4.1 Общие положения**

Питательные среды могут быть приготовлены способом, описанным ниже, или из сухих питательных сред согласно инструкциям изготовителя. Готовые к использованию среды могут применяться, если их состав и/или ростовые свойства являются подобными приведенным ниже средам.

**5.4.2 Питательные среды для подсчета**

5.4.2.1 Агаризованная среда с гидролизатами сои и казеина (SCDA) или триптон-соевый агар (TSA)

5.4.2.1.1 Состав

Панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г.

Папаический гидролизат соевой муки — 5,0 г.

Хлорид натрия — 5,0 г.

Агар — 15,0 г.

Вода — 1 000 $см^3$.

5.4.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую сухую питательную среду в воде, перемешивая 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 при измерении при комнатной температуре.

5.4.2.2 Другие среды для подсчета

Могут использоваться другие среды (см. приложение С).

**5.4.3 Питательные среды для обнаружения**

5.4.3.1 Общие положения

Для обнаружения бактерий 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:

- которые нейтрализуют ингибирующие вещества, присутствующие в пробе: лецитин и полисорбат 80; и
- диспергирующее вещество: 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 — 1 000 $см^3$.

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 при измерении при комнатной температуре.

5.4.3.3 Агаризованная среда для обнаружения

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 — 1 000 $см^3$.

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 при измерении при комнатной температуре.

5.4.3.3.2 Другие агаризованные среды для обнаружения

Могут использоваться другие среды (см. приложение С).

**5.4.4 Агаризованная среда для культивирования эталонных штаммов**

Используют агаризованную среду с гидролизатами сои и казеина (SCDA) или триптон-соевый агар (TSA) (см. 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 два штамма представителей грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [8], [11]:

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

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (эквивалентный штамм: CIP 4.83, или NCIMB 9518, или NBRC 13276, или KCTC 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).

Восстановление культуры должно осуществляться в соответствии с процедурами, установленными поставщиком эталонных штаммов.

Штаммы могут храниться в лаборатории в соответствии с EN 12353.

---

[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).

## 8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами

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

Отбор проб парфюмерно-косметической продукции, подлежащей испытанию, следует проводить в соответствии с ISO 21148. Испытывают пробы в соответствии с ISO 21148 и согласно методике, приведенной в разделе 9.

## 9 Методика

### 9.1 Общие рекомендации

Подготовку пробы, приготовление исходной суспензии и разведений выполняют с соблюдением правил асептики, используя стерильные материалы, оборудование. В случае приготовления исходной суспензии время между окончанием приготовления суспензии и моментом ее внесения в питательную среду не должно превышать 45 мин, если иное не установлено в утвержденных протоколах или документах.

### 9.2 Приготовление исходной суспензии

#### 9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию готовят из пробы в количестве не менее 1 г или 1 см$^3$ хорошо перемешанной испытываемой продукции.

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

Исходная суспензия обычно представляет собой разведение 1 : 10. Больший объем разбавителя может потребоваться, если предполагается высокий уровень контаминации продукции и/или в растворе с разведением 1 : 10 все еще проявляются антимикробные свойства.

#### 9.2.2 Водорастворимая продукция

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

Регистрируют коэффициент разведения *d*.

#### 9.2.3 Нерастворимая в воде продукция

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

Регистрируют коэффициент разведения *d*.

### 9.3 Методы подсчета

#### 9.3.1 Разведения для методов подсчета

Обычно исходная суспензия является первым разведением, в котором выполняется подсчет. При необходимости готовят серию десятикратных разведений (1 : 10) из исходной суспензии, используя тот же разбавитель (в зависимости от предполагаемого уровня контаминации продукции).

Как правило, подсчет проводят, используя не менее двух чашек Петри. Однако можно использовать и одну чашку Петри, если проводятся рутинные испытания или подсчет проводится на последовательных разведениях одной и той же пробы или исходя из ранее полученных результатов.

#### 9.3.2 Чашечные методы

9.3.2.1 Метод глубинного посева

В чашки Петри диаметром от 85 до 100 мм вносят 1 см$^3$ исходной суспензии и/или разведения пробы, приготовленного согласно разделу 13, и заливают от 15 до 20 см$^3$ расплавленной агаризованной среды (см. 5.4.2), которая выдерживалась на водяной бане при температуре, не превышающей 48 °С. Если используются чашки Петри большего диаметра, количество агаризованной среды соответственно увеличивается.

Перемешивают исходную суспензию и/или разведение пробы с питательной средой, осторожно вращая или наклоняя чашки для ее равномерного распределения. Дают среде в чашках Петри застыть на горизонтальной поверхности при комнатной температуре.

9.3.2.2 Метод поверхностного посева

В чашки Петри диаметром от 85 до 100 мм заливают от 15 до 20 см$^3$ расплавленной агаризованной среды (см. 5.4.2), которая выдерживалась на водяной бане при температуре, не превышающей 48 °С. Если используются чашки Петри большего диаметра, количество агаризованной среды соответственно увеличивается.

Дают чашкам охладиться, среде застыть в них, например поместив их в ламинарный шкаф или в термостат. Распределяют по поверхности среды не менее 0,1 см$^3$ исходной суспензии и/или разведения пробы, приготовленного в соответствии с разделом 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 разведения пробы, приготовленного в соответствии с разделом 13 (предпочтительно представительной в количестве не менее 1 г или 1 см$^3$ продукции), на мембранный фильтр. Фильтруют сразу же и промывают мембранный фильтр (в соответствии с методикой теста на пригодность (см. раздел 13)).

Переносят мембранный фильтр на поверхность агаризованной среды (см. 5.4.2).

9.3.2.4 Инкубация

Если не установлено иное, переворачивают инокулированные чашки вверх дном и помещают их в термостат, поддерживающий температуру (32,5 ± 2,5) °С, на (72 ± 6) ч. После инкубации чашек следует (по возможности) немедленно приступить к подсчету. В противном случае, если не установлено иное, они могут храниться в холодильнике не более 24 ч.

Примечание — В некоторых случаях, если существует вероятность того, что частицы продукции могут быть приняты за колонии, целесообразно приготовить дополнительные 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 (см. 5.4.3.2), выбранном согласно методике, отработанной во время проверки пригодности метода (см. раздел 13).

#### 9.4.2 Инкубация пробы

9.4.2.1 Общие положения

Инкубируют исходную суспензию, приготовленную в бульоне (см. 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 от 0,1 до 0,5 см$^3$ инкубированной суспензии на поверхность чашки Петри (диаметром от 85 до 100 мм), содержащей приблизительно от 15 до 20 см$^3$ соответствующей агаризованной среды (см. 5.4.2.1). Если используются чашки Петри большего диаметра, количество агаризованной среды соответственно увеличивается.

9.4.2.3 Инкубация субкультуры

Не переворачивают инокулированную чашку Петри (ожидают, пока инкубированная суспензия не впитается в агаризованную среду) и 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; если насчитывается менее 30 колоний — см. 12.2.3;
- на мембранных фильтрах, содержащих от 15 до 150 колоний; если насчитывается менее 15 колоний — см. 12.2.3.

## 11 Обнаружение роста (метод обогащения)

После инкубации субкультуры проверяют поверхность агара и отмечают присутствие или отсутствие роста.

## 12 Представление результатов

### 12.1 Определение количества при посеве чашечным методом

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

$m$ — среднее арифметическое число колоний на двух чашках Петри (см. формулу (1));

$c$ — число колоний, подсчитанных на одной чашке (см. формулу (2)), или

$\bar{x}_c$ — среднее взвешенное число колоний, полученное на двух последовательных разведениях (см. формулу 3)):

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

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

$$N = \bar{x}_c/(V \times d), \quad (3)$$

где $m$ — среднее арифметическое число колоний, полученное на двух чашках Петри;

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

$d$ — коэффициент разведения, соответствующий разведению для приготовления исходной суспензии (см. 9.2) или для первого разведения, для которого выполняется подсчет;

$c$ — число колоний, подсчитанных на одной чашке;

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

$$\bar{x}_0 = \frac{\sum c}{n_1 + 0{,}1n_2},$$

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

$n_1$ — количество чашек, подсчитанное для исходной суспензии (или в первом разведении, для которого выполняется подсчет);

$n_2$ — количество чашек, подсчитанное для разбавления $10^{-1}$ исходной суспензии (или для второго разведения, для которого выполняется подсчет).

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 последовательно до получения двух значащих цифр. Регистрируют полученное число $N$.

### 12.2 Интерпретация результатов

12.2.1 Принимают во внимание вариабельность, которая свойственна чашечным методам подсчета. Два результата должны рассматриваться как различающиеся только тогда, когда расхождение превышает 50 % или когда это расхождение, выраженное 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, подтвердивших пригодность для выбранного метода (см. раздел 13).

12.2.2 Если количество КОЕ более 30 и менее 300 на чашках или более 15 и менее 150 на мембранных фильтрах, где $S$ — масса или объем пробы (см. 9.2), результат представляют следующим образом:

- если $S$ не менее 1 г или 1 см$^3$, а $V$ не менее 1 см$^3$ — количество мезофильных аэробных бактерий 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 бактерий в пробе (указывают испытуемое количество пробы, учитывая $S$ и $V$) = $N$.

Представляют результат в виде числа в интервале между 1,0 и 9,9, умноженного на 10 в соответствующей степени (см. примеры 1—3 и пример 7 в 12.3.1, 12.3.2, 12.3.3 и 12.3.7).

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

- если $S$ не менее 1 г или 1 см$^3$ и $V$ не менее 1 см$^3$ — расчетное количество мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм пробы = $N$ / $S$;
- если $S$ менее чем 1 г или 1 см$^3$ и/или $V$ менее чем 1 см$^3$ — расчетное количество мезофильных аэробных бактерий в пробе = $N$, где $S$ — масса или объем пробы (см. 9.2).

Представляют результат в виде числа в интервале между 1,0 и 9,9, умноженного на 10 в соответствующей степени (см. примеры 4—6 в 12.3.4, 12.3.5, 12.3.6).

12.2.4 Если колонии не обнаружены, результат представляют следующим образом:

- менее $1/d \times V \times S$ мезофильных аэробных бактерий на грамм или кубический сантиметр продукции ($S$ не менее 1 г или 1 см$^3$);
- менее $1/d \times V$ мезофильных аэробных бактерий в пробе $S$ (указывают испытуемое количество пробы, учитывая $S$ и $V$) ($S$ менее чем 1 г или 1 см$^3$), где $d$ — коэффициент разведения исходной суспензии (см. 9.2) и $V$ равен 1 (для метода глубинного посева и для мембранной фильтрации) или 0,1 (для метода поверхностного посева) (см. пример 8 в 12.3.8).

### 12.3 Примеры

#### 12.3.1 Пример 1. Две чашки для одного разведения

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 38 и 42.

Формула (1):

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

#### 12.3.2 Пример 2. Одна чашка для одного разведения

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 60.

Формула (2):

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

#### 12.3.3 Пример 3. Две чашки для двух разведений

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-2}$, — 235 и 282; для разведения $10^{-3}$ — 31 и 39.

Формула (3):

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

Округляя результат, как установлено выше, получаем 27 000, или $2{,}7 \times 10^4$ мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм пробы.

#### 12.3.4 Пример 4. Два мембранных фильтра для одного разведения

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 18 и 22.

Формула (1):

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

#### 12.3.5 Пример 5. Один мембранный фильтр для одного разведения

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 65.

Формула (2):

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

#### 12.3.6 Пример 6. Два мембранных фильтра для двух разведений

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 121 и 105; для разведения $10^{-2}$ — 15 и 25.

Формула (3):

$N = \overline{x}_c / (V \times d) = (121 + 105 + 15 + 25) / 1\,(2 + 0{,}1 \times 2) \times 10^{-1} = 266 / 0{,}22 = 1\,209$.

Округляя результат, как указано выше, получаем 1 200, или $1{,}2 \times 10^3$ мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм пробы.

#### 12.3.7 Пример 7. Две чашки для одного разведения

$S$ = 1 г или 1 см$^3$; $V$ = 1; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 28 и 22.

Формула (1):

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

Расчетное количество составляет 250, или $2,5 \times 10^2$ мезофильных аэробных бактерий на сантиметр кубический или грамм пробы.

**12.3.8 Пример 8**

$S = 1$ г или 1 см$^3$; $V = 1$; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 0 и 0.

Формула (1):

$N \leq 1 / (V \times d)$,

$\leq 1 / (1 \times 10^{-1})$,

$\leq 1 / 0,1$,

$\leq 10$.

Расчетное количество составляет менее чем 10 мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм пробы.

**12.3.9 Пример 9**

$S = 1$ г или 1 см$^3$; $V = 1$; результаты подсчета, полученные для разведения $10^{-1}$, — 0 и 3.

Формула (1):

$N \leq m (V \times d)$,

$\leq 1,5 / (1 \times 10^{-1})$,

$\leq 1,5 / 0,1$,

$\leq 15$.

Расчетное количество составляет менее чем 15 мезофильных аэробных бактерий на кубический сантиметр или грамм пробы.

### 12.4 Обнаружение после обогащения

В случае обнаружения роста (см. раздел 11) результат представляют как:

«Присутствие мезофильных аэробных бактерий в пробе *S*»

и продолжают подсчет, используя один из предлагаемых методов (см. 9.3).

Если рост не обнаружен (см. раздел 11), результаты представляют как:

«Отсутствие мезофильных аэробных бактерий в пробе *S*».

## 13 Нейтрализация антимикробных свойств продукции

### 13.1 Общие положения

Приведенные ниже методики подтверждают, что микроорганизмы могут расти в условиях проведения испытания.

Два штамма (см. раздел 7), используемые для подтверждения наличия данных свойств, обычно являются чувствительными к антимикробным веществам.

### 13.2 Приготовление инокулята

Перед проведением испытаний каждым штаммом засевают поверхность агазированной среды, содержащей гидролизаты сои и казеина (SCDA), или другой подходящей (неселективной и не оказывающей нейтрализующее действие) среды. Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18—24 ч. Собирают культуру стерильной петлей с поверхности среды и ресуспендируют ее в разбавителе для приготовления бактериальных суспензий (см. 5.3), чтобы получить стандартную суспензию с концентрацией около $1 \times 10^8$ КОЕ/см$^3$ [количество клеток можно измерить, используя спектрофотометр (см. ISO 21148:2017 (приложение С))]. Используют данную суспензию и ее разведения в течение 2 ч.

### 13.3 Пригодность методов подсчета

#### 13.3.1 Принцип выполнения

Для каждого штамма смешивают нейтрализованную пробу (исходную суспензию или разведение пробы в зависимости от антимикробной активности или растворимости продукции) с разведением культуры микроорганизма. Высевают на чашку Петри или фильтруют через мембранный фильтр. После инкубирования проверяют морфологию колоний и сравнивают полученное количество колоний с количеством колоний на контрольном посеве (без пробы).

Если количество микроорганизмов составляет менее 50 % (0,3 log) от количества на контрольном посеве, модифицируют методику (используя другие разбавители, нейтрализаторы или комбинацию того и другого (см. приложение D)). Необходимо принимать во внимание вариабельность, свойственную для чашечного метода подсчета. Два результата должны рассматриваться как различающиеся, если расхождение превышает 50 % или 0,3 — если выражены логарифмически. При отсутствии роста инокулята результаты испытаний признаются недействительными, если только контаминация продукции данным видом микроорганизмов не является маловероятной.

**13.3.2 Тест на пригодность метода глубинного посева**

Смешивают 9 см$^3$ исходной суспензии и/или разведения (й) пробы в нейтрализирующем разбавителе (или в другом (см. 5.2)) с 1 см$^3$ суспензии микроорганизмов концентрацией от 1 000 до 3 000 КОЕ/см$^3$. Переносят 1 см$^3$ в чашку Петри (предпочтительно в две чашки) и заливают от 15 до 20 см$^3$ расплавленной агаризованной среды (см. 5.4.2), выдержанной на водяной бане при температуре, не превышающей 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 результаты, полученные при испытании и на контрольном посеве. Разбавитель и метод подсчета считают удовлетворяющими требованиям при разведении 1 : 10 (когда используется 1 см$^3$ исходной суспензии), если количество микроорганизмов, подсчитанных в тесте на пригодность, составляет не менее 50 % от количества микроорганизмов на контрольном посеве.

**13.3.3 Тест на пригодность метода поверхностного посева**

Смешивают 9 см$^3$ исходной суспензии в нейтрализирующем разбавителе (или в другом (см. 5.1)) с 1 см$^3$ суспензии микроорганизмов концентрацией от 10 000 до 30 000 КОЕ/см$^3$ (или менее, если распределяется 0,5 или 1 см$^3$). Распределяют не менее 0,1 см$^3$ суспензии по поверхности твердой агаризованной среды (см. 5.4.2) (предпочтительно в двух чашках). 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 результаты, полученные при испытании и на контрольном посеве. Разбавитель и метод подсчета считают удовлетворяющими требованиям при разведении 1:10 (когда используется 1 см$^3$ исходной суспензии), если количество микроорганизмов, подсчитанных в тесте на пригодность, составляет не менее 50 % от количества микроорганизмов на контрольном посеве.

**13.3.4 Тест на пригодность метода мембранной фильтрации**

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

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

Параллельно готовят контрольный посев при условиях, описанных выше, но без пробы продукции. Фильтрование и промывание в случае контрольного посева проводят в аналогичных условиях.

После инкубации в течение 24—72 ч при температуре (32,5 ± 2,5) °С подсчитывают колонии на мембранных фильтрах и сравнивают результаты, полученные при испытании и на контрольном посеве. Метод мембранной фильтрации и разбавитель считают удовлетворяющими требованиям, если количество микроорганизмов, подсчитанных в тесте на пригодность, составляет не менее 50 % от количества микроорганизмов на контрольном посеве.

**13.4 Тест на пригодность метода обнаружения с использованием обогащения**

**13.4.1 Методика**

В пробирках, содержащих по 9 см$^3$ разбавителя для бактериальных суспензий (см. 5.3), готовят разведение стандартной суспензии каждого штамма, для получения конечной концентрации от 100 до 500 КОЕ/см$^3$. Для подсчета конечной концентрации жизнеспособных микроорганизмов в стандартной суспензии переносят 1 см$^3$ суспензии в чашку Петри и заливают от 15 до 20 см$^3$ расплавленной агаризованной среды (см. 5.4.2), выдержанной на водяной бане при температуре, не превышающей 48 °С.

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

Приготавливают в двух повторностях исходную суспензию пробы (см. 3.3), соблюдая условия, выбранные для испытания (не менее 1 г или 1 см$^3$ продукции, определенный объем бульона для обогащения (см. 5.4.3.2), в пробирках или колбах). В одну пробирку (тест на пригодность) в асептических условиях вносят 0,1 см$^3$ стандартной суспензии микроорганизмов. Перемешивают, затем инкубируют каждую пробирку (тест на пригодность и контрольный посев) при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

Используя стерильную пипетку, из каждой пробирки или колбы переносят от 0,1 до 0,5 см$^3$ (при тех же условиях, что и в испытании) инкубированной смеси на поверхность чашки Петри (диаметром от 85 до 100 мм), содержащей приблизительно от 15 до 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**

Для каждого штамма удостоверяются, что стандартная суспензия бактерий содержит от 100 до 500 КОЕ/см$^3$.

Нейтрализация и метод обнаружения удовлетворяют требованиями, если наблюдается характерный рост микроорганизмов, такой как:

- для *Staphylococcus aureus:* колонии окрашены в желтый цвет; и
- для *Pseudomonas aeruginosa:* колонии от зеленоватого до желтоватого цвета инокулированного микроорганизма наблюдаются в чашке в тесте на пригодность и не наблюдается рост на контрольной чашке.

Если рост наблюдается в контрольной чашке (контаминированная продукция), нейтрализация и метод обнаружения удовлетворяют требованиям, если инокулированный микроорганизм был выделен в чашке в тесте на пригодность.

**13.5 Интерпретация результатов теста на пригодность**

Отсутствие роста на чашках Петри в тесте на пригодность указывает на то, что антимикробная активность по-прежнему присутствует и требуется изменение условий данного метода. Это может быть достигнуто путем увеличения объема питательного бульона при том количестве продукции, или введения достаточного количества инактивирующего вещества в питательный бульон, или соответствующей комбинации изменений, которые позволят обеспечить рост бактерий.

Если, несмотря на введение соответствующих инактивирующих веществ и значительное увеличение объема бульона, выделить жизнеспособную культуру описанным способом не удается, указывают, что контаминация продукции данным видом микроорганизма маловероятна.

## 14 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации продукции;

b) примененный метод;

c) полученные результаты;

d) все подробности приготовления исходной суспензии;

e) описание метода с указанием использованных нейтрализаторов и питательных сред;

f) сведения о пригодности метода, даже если испытание проводилось отдельно;

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

**Приложение А**
**(справочное)**

## Другие нейтрализующие разбавители

### А.1 Общие положения

Любой нейтрализующий разбавитель может использоваться для приготовления исходной суспензии, если он будет проверен и его пригодность будет подтверждена. Нижеприведенные нейтрализующие разбавители являются примерами соответствующих составов. Общая информация по нейтрализации приведена в приложении D.

### А.2 Жидкий бульон Eugon LT100

См. 5.4.3.2.

### А.3 Лецитин — полисорбатный разбавитель (LP)

#### 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

Смешивают и растворяют компоненты, перемешивая 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 [11]

#### А.4.1 Состав

Пептический гидролизат мяса — 20,0 г.
Панкреатический гидролизат 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 — 1 000 см$^3$.

#### А.4.2 Приготовление

Последовательно растворяют полисорбат 80 и лецитин в кипящей воде до их полного растворения. Растворяют другие компоненты путем перемешивания при нагревании. Перемешивают 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 при измерении при комнатной температуре.

## Приложение В
## (справочное)

## Другие разбавители

### В.1 Общие положения

Любой разбавитель может использоваться для приготовления исходной суспензии, если он будет проверен и его пригодность будет подтверждена. Нижеприведенный разбавитель является примером соответствующего 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 — 1 000 $см^3$.

#### 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)

## Другие питательные среды

### С.1 Общие положения

Любая питательная среда может использоваться, если она проверена и ее пригодность подтверждена. Нижеприведенные среды являются примерами сред соответствующего состава.

### С.2 Агаризованные среды для подсчета

#### С.2.1 Агаризованная среда Eugon LT 100

См. 5.4.3.3.1.

#### С.2.2 Агар LT 100

С.2.2.1 Состав

Панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г.
Папаиновый гидролизат 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 — 1 000 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 гидролизатами сои и казеина (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 — 1 000 см$^3$.

С.2.3.2 Приготовление

Растворяют последовательно 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 [11]

См. А.4.

#### С.3.2 Среда с гидролизатами сои и казеина, 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 — 1 000 см$^3$.

С.3.2.2 Приготовление

Растворяют последовательно 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 Нейтрализующий бульон D/E (нейтрализующий бульон по Ди-Ингли) [11]**

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 гидролизат 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 — 1 000 $см^3$.

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 гидролизатами сои и казеина, 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 — 1 000 $см^3$.

**С.4.2 Приготовление**

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

**Приложение D**
**(справочное)**

## Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывные жидкости

Таблица D.1

| Консерванты | Химические вещества, способные нейтрализовать антимикробную активность консервантов | Примеры подходящих нейтрализаторов и промывных жидкостей [6], [12] (для методов мембранной фильтрации) |
|---|---|---|
| Фенольные соединения:<br>- парабены;<br>- феноксиэтанол;<br>- фенилэтанол и др.<br>Анилиды | Лецитин<br><br>Полисорбат 80<br><br>Конденсат этиленоксида жирных спиртов<br><br>Неионогенные поверхностно-активные вещества | Полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + лецитин, 3 г/дм$^3$.<br>Конденсат этиленоксида жирных спиртов, 7 г/дм$^3$, + лецитин, 20 г/дм$^3$, + полисорбат 80, 4 г/дм$^3$.<br>D/E-нейтрализующий бульон [a].<br>Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм$^3$, + NaCl, 9 г/дм$^3$;<br>полисорбат 80, 5 г/дм$^3$ |
| Четвертичные аммониевые соединения<br><br>Катионные поверхностно-активные вещества | Лецитин, сапонин, полисорбат 80, додецилсульфат натрия<br><br>Конденсат этиленоксида жирных спиртов | Полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + додецилсульфат натрия, 4 г/дм$^3$, + лецитин, 3 г/дм$^3$.<br>Полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + сапонин, 30 г/дм$^3$, + лецитин, 3 г/дм$^3$.<br>D/E-нейтрализующий бульон [a].<br>Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм$^3$, + NaCl, 9 г/дм$^3$;<br>полисорбат 80, 5 г/дм$^3$ |
| Альдегиды<br><br>Вещества, выделяющие формальдегид | Глицин, гистидин | Лецитин, 3 г/дм$^3$, + полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + + L-гистидин, 1 г/дм$^3$.<br>Полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + сапонин, 30 г/дм$^3$, + + L-гистидин, 1 г/дм$^3$, + L-цистеин, 1 г/дм$^3$.<br>D/E-нейтрализующий бульон [a].<br>Промывная жидкость: полисорбат 80, 3 г/дм$^3$, + + L-гистидин, 0,5 г/дм$^3$ |
| Окисляющие соединения | Тиосульфат натрия | Тиосульфат натрия, 5 г/дм$^3$.<br>Промывная жидкость: тиосульфат натрия, 3 г/дм$^3$ |
| Изотиазолиноны, имидазолы | Лецитин, сапонин<br><br>Амины, сульфаты, меркаптаны, бисульфит натрия, тиогликолят натрия | Полисорбат 80, 30 г/дм$^3$, + сапонин, 30 г/дм$^3$, + + лецитин, 3 г/дм$^3$.<br>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$^3$.<br>Промывная жидкость: триптон, 1 г/дм$^3$, + NaCl, 9 г/дм$^3$; полисорбат 80, 5 г/дм$^3$ |
| Соли металлов (Cu, Zn, Hg)<br>Ртутьорганические соединения | Бисульфат натрия, L-цистеин<br><br>Сульфгидрильные соединения, тиогликолевая кислота | Тиогликолят натрия, 0,5 г/дм$^3$ или 5 г/дм$^3$.<br>L-цистеин, 0,8 г/дм$^3$ или 1,5 г/дм$^3$.<br>D/E-нейтрализующий бульон [a].<br>Промывная жидкость: тиогликолят натрия, 0,5 г/дм$^3$ |

[a] Нейтрализующий бульон D/E (нейтрализующий бульон по Ди-Ингли) (см. приложение С).

**Приложение ДА**
**(справочное)**

## Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение ссылочного международного (европейского) стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 21148:2017 | IDT | ГОСТ ISO 21148—2020 «Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю» |
| EN 12353 | IDT | ГОСТ EN 12353—2016 «Средства химические дезинфицирующие и антисептические. Консервация тест-организмов, используемых для определения бактерицидной (включая Legionella), микобактерицидной, спорицидной, фунгицидной и вируцидной (включая бактериофаги) активности (EN 12353:2013)» |
| Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:<br>- IDT — идентичные стандарты. | | |

## Библиография


[1] ISO 18415 Cosmetics — Microbiology — Detection of specified and non-specified microorganisms (Косметика. Микробиология. Обнаружение специфических и неспецифических микроорганизмов)

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

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

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

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

[6] EN 1040 Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics — Test method and requirements (phase 1) (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Количественный суспензионный метод испытания для оценки основной бактерицидной активности химических дезинфицирующих и антисептических средств. Метод испытания и требования (фаза 1))

[7] CTFA, Microbiology Guidelines, pub. Cosmetic, Toiletry and Fragrance Assn., ISBN 1-882621-32-8, 2001 (Руководство по микробиологии)

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

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

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

[11] FDA. Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, 1995 published by the U.S. Food and Drug Administration, http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm (Руководство по бактериологическому анализу)

[12] Singer S. The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. Cosmetics and Toiletries. 1987, 102 (December), p. 55 (Применение нейтрализаторов консервантов в разбавителях и средах для чашек Петри. Косметика и туалетные принадлежности)

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

[14] Atlas, R.M. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, 1993 (Справочник по микробиологическим средам)

[15] ISO 29621 Cosmetics — Microbiology — Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products (Косметика. Микробиология. Руководящие указания по оценке риска и идентификации продуктов с микробиологически низким риском)

УДК 665.57/.58:579.252.083.12(083.74)(476) МКС 07.100.99; 71.100.70

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

Редактор *В.Н. Шмельков*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 25.08.2021. Подписано в печать 02.09.2021. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru