ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОСМЕТИКА

Микробиология

Подсчет количества дрожжей и плесени

СТ РК ИСО 16212-2011

(ISO 16212:2008 Cosmetics – Microbiology – Enumeration of yeast and mould, IDT)

Издание официальное

Комитет технического регулирования и метрологии
Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан
(Госстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета технического регулирования и метрологии и техническим комитетом по стандартизации № 72 «Нанотехнологии»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан от «11» октября 2011 года № 535 - од

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 16212:2008 Cosmetics. Microbiology. Enumeration of yeast and mould (Косметика. Микробиология. Подсчет количества дрожжей и плесени).

Международный стандарт ISO 16212 разработан Техническим комитетом ISO TC 217, Косметика

Перевод с английского языка (en).

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам, приведены в дополнительном Приложении D.A.

Степень соответствия – идентичная (IDT).

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2017 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Государственные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Государственные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОСМЕТИКА
Микробиология
Подсчет количества дрожжей и плесени

Дата введения 2012-07-01

1 Область применения

Настоящий Стандарт устанавливает принципы для подсчета количества дрожжей и плесени, присутствующих в косметике путем подсчета колоний на селективной агаровой среде после аэробной инкубации.

В целях обеспечения качества и безопасности продукции для потребителей, целесообразно выполнять соответствующие микробиологические анализы риска, чтобы определить типы косметической продукции, к которой данный стандарт применим. Анализируемый продукт, представляющий низкий микробиологический риск, включает низкую активность воды, водно-спиртовые продукты, продукты с экстремальными значениями pH и т. д.

Настоящий метод не может быть применим к некоторым продуктам в каждой детали (например, некоторые несмешивающиеся с водой продукты) из-за большого разнообразия косметических продуктов в данной области применения. Другие методы (например, автоматизированные) могут быть использованы для определения представленных здесь видов продукции при условии, что их эквивалентность была продемонстрирована или метод был проверен.

Подсчитанное количество дрожжей может быть идентифицировано с помощью соответствующих испытаний идентификации, например, испытания, описанные в стандартах, перечисленных в библиографии. Подсчитанное количество плесени могут быть определены другими соответствующими методами по мере необходимости.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения):

СТ РК 1.9-2007 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов иностранных государств, других нормативных документов по стандартизации в Республике Казахстан.

ISO 21148 – 2005* Cosmetics. Microbiology. General instructions for microbiological examination (Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю)

EN 12353 - 2007* Chemical disinfectants and antiseptics – Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal and fungicidal activity (Дезинфицирующие химические средства и антисептики. Сохранение микробных штаммов, используемых для определения бактерицидной, микобактерицидной, спороцидной и фунгицидной активности)

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Указатель нормативных документов по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 Дрожжи (yeast): Одноклеточный гриб, который размножается вегетативно в основном почкованием, способный расти в условиях испытаний, указанных в настоящем стандарте

3.2 Плесень (mould): Мицелия, образующийся микроскопическими грибками, в том числе споры и конидии, способные расти в условиях испытаний, указанных в настоящем стандарте

3.3 Продукт (product): Часть определенного косметического продукта, полученного в лаборатории для тестирования

3.4 Образец (sample): Часть продукта (по меньшей мере, 1 г или 1 мл), которая используется в тестировании для подготовки исходной суспензии

3.5 Исходная суспензия (initial suspension): Суспензия (или раствор) образца в определенном объеме подходящей жидкости (разбавитель, нейтрализатор, жидкая среда или сочетание всех компонентов).

3.6 Разведение образца (sample dilution) (s): Разбавление исходной суспензии

4 Принципы

4.1 Общие положения

Данный метод рассматривает подсчет количества колоний в селективной агаровой среде. Замедление роста гриба образцом должно быть

*Применяется в соответствии с СТ РК 1.9

нейтрализовано с целью обнаружения жизнеспособных микроорганизмов [2]. Во всех случаях и независимо от методологии, нейтрализация антифунгицидных свойств продукта должна быть проверена и утверждена [3], [5], [6].

4.2 Определение количества микроорганизмов посевом на чашках Петри

Определение количества микроорганизмов посевом на чашках Петри состоит из следующих этапов.

a) Подготовка чашек со слоем агары или распределительных пластин, используя указанную питательную среду, и инокуляция пластины, используя определенное количество исходной суспензии или раствор продукта;

b) Аэробные инкубации пластин при температуре (25 ± 2,5) °C в течение 3 - 5 дней.

c) Подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и количества дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм продукта.

ПРИМЕЧАНИЕ Альтернативные условия для инкубации при температуре (22,5 ± 2,5)°C в течение 5-7 дней с использованием культуральной среды без антибиотика.

4.3 Мембранная фильтрация

Мембранная фильтрация состоит из следующих этапов.

a) Перенос установленного количества образца, который был подготовлен данным методом, в фильтрационном аппарате, увлажненный небольшим объемом соответствующего стерильного растворителя. Немедленно выполнить фильтрацию и промывку в соответствии с данной методикой. Перенести мембранный фильтр на поверхность установленной агаровой среды, как указано в ISO 21148.

b) Аэробные инкубации мембран проводить при температуре (25 ± 2,5) °C в течение 3 - 5 дней.

c) Подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и расчет количества дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм продукта.

ПРИМЕЧАНИЕ Альтернативные условия для инкубации при температуре (22,5 ± 2,5)°C в течение 5-7 дней с использованием культуральной среды без антибиотика.

5 Разбавители, нейтрализаторы и питательная (культуральная) среда

5.1 Общие положения

Общие технические требования приведены в ISO 21148. При использовании воды в формуле, использовать дистиллированную или очищенную воду, как указано в ISO 21148.

Разбавители, нейтрализаторы и культуральная среда предназначены для подсчета количества дрожжей и плесени.

5.2 Нейтрализация разбавителей и растворителей

5.2.1 Общие положения

Разбавитель используют для дисперсии образца. Он может содержать нейтрализаторы, если испытуемый образец обладает антифунгицидными свойствами. Эффективность нейтрализации должна быть доказана до определения количества дрожжей и плесени (см. Раздел 12). Информация о подходящих нейтрализаторах приведена в Приложении D.

5.2.2 Нейтрализация разбавителя

5.2.2.1 Жидкая казеин-соевая питательная среда лецитин-полисорбата 20, средняя (питательная среда SCDLP 20)

5.2.2.1.1 Состав

- Панкреатический гидролизат казеина - 20,0 г
- Соевый лецитин - 5,0 г
- Полисорбат – от 20 мл до 40 мл
- Вода - 960 мл

5.2.2.1.2 Подготовка

Растворить полисорбат 20 мл в 960 мл воды, смешивая при нагревании в водяной бане при температуре (49 ± 2) °С. Добавить панкреатический гидролизат казеина и соевый лецитин. Нагреть до 30 минут до эффективности раствора. Смешать и распределить среду в соответствующие контейнеры. Простерилизовать в автоклаве при температуре 121 ° С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,3 ± 0,2) при выполнении измерения при комнатной температуре.

5.2.2.2 Другие нейтрализующие разбавители

Другие нейтрализующие разбавители могут быть использованы по мере необходимости (см. Приложение А и Приложение D).

5.2.3 Разбавитель

5.2.3.1 Жидкость А

5.2.3.1.1 Состав

- Пептический перевар животной ткани - 1,0 г
- Вода - 1 000 мл

5.2.3.1.2 Подготовка

Растворить 1 г пептона в воде до получения 1 л. Нагреть, часто помешивая. Распределить в соответствующие контейнеры. Простерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,1 ± 0,2) при выполнении измерения при комнатной температуре.

5.2.3.2 Другие разбавители

Другие разбавители могут быть использованы в соответствующих случаях (см. Приложение В).

5.3 Разбавитель для дрожжевой суспензии (раствор триптон хлорида натрия)

5.3.1 Состав

- Триптон, Панкреатический гидролизат казеина - 1,00 г
- Хлорид натрия - 8,50 г
- Вода - 1 000 мл

5.3.2 Подготовка

Растворить компоненты в воде, смешивая при нагревании. Внести в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,0 ± 0,2) при выполнении измерения при комнатной температуре.

5.4 Культуральная среда

5.4.1 Общие положения

Культуральная среда может быть подготовлена из обезвоженной культуральной среды в соответствии с инструкциями производителя. Готовые к использованию среды могут быть использованы при сопоставлении их состава и / или рост урожайности должен соответствовать формулам, указанным в настоящем стандарте.

5.4.2 Декстрозный агар Сабуро с хлорамфениколом (SDCA)

5.4.2.1 Состав

- Декстроза - 40,0 г
- Переваривание пепсином животной ткани - 5,0 г
- Панкреатический гидролизат казеина - 5,0 г
- Хлорамфеникол - 0,050 г
- Агара - 15,0 г
- Вода - 1 000 мл

5.4.2.2 Подготовка

Растворить компоненты (в том числе хлорамфеникол) или обезвоженную полную среду в воде, смешивая при нагревании. Внести среду в соответствующие контейнеры. Простерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (5,6 ± 0,2), при выполнении измерения при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЕ При известных и не загрязненных продуктах (с бактериями), среда используется без хлорамфеникола.

5.4.3 Другие среды

Могут быть использованы другие среды по мере необходимости (см. Приложение С).

5.4.4 Сабуровая агаровая среда декстрозы (SDA)

5.4.4.1 Состав

- Декстроза - 40,0 г
- Переваривание пепсином животной ткани - 5,0 г

- Панкреатический гидролизат казеина - 5,0 г
- Агара - 15,0 г
- Вода - 1 000 мл

5.4.4.2 Подготовка

Растворить компоненты или обезвоженную полную среду в воде путем смешивания при нагревании. Внести среды в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (5,6 ± 0,2), при проведении испытания при комнатной температуре.

6 Приборы и стеклянная посуда

Использовать лабораторное оборудование, приборы и стеклянную посуду в соответствии с ИСО 21148.

ПРИМЕЧАНИЕ Применяемые средства измерений должны использоваться в соответствии с законодательством в области обеспечения единства измерений. Испытательное оборудование должно применяться в соответствии с нормативным документом по стандартизации устанавливающий порядок аттестации испытательного оборудования.

ПРИМЕЧАНИЕ Допускается применять другие средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

7 Штамм микроорганизмов

Для проверки эффективности нейтрализаторов, используют один эталонный штамм дрожжей.

Candida Albicans ATCC[1] 10231 или эквивалентная деформация (IP[2] 48.72 или NCPF[3] 3179 или NBRC[4] 1594 или KCTC[5] 17205 или TISTR[6] 5779) или другие эквивалентные национальные сборные штаммы дрожжей.

Анализируемые выбранные штаммы дрожжей, более восприимчивые к антифунгицидным активностям, чем формы, принятые в качестве представителя грибов (дрожжи и плесень) для проверки методологии. В случае конкретных потребностей, испытания на эффективность нейтрализаторов могут быть выполнены с помощью дополнительного контрольного штамма плесени, используя подходящий протокол для подготовки калибровочного посевного материала [11].

Культура должна быть восстановлена в соответствии с процедурами, предусмотренными поставщиком контрольного штамма дрожжей. Штамм дрожжей может храниться в лаборатории в соответствии с EN 12353.

---

1) ATCC - Американская коллекция типовых культур.

2) IP - Институт Пастера.

3) NCPF - Национальная коллекция патогенных грибов

4) NBRC - Национальный Центр биологических ресурсов.

5) KCTC - Корейская коллекция типовых культур.

6) TISTR - Таиландский институт по научным и техническим исследованиям.

8 Обработка косметической продукции и лабораторных проб

При необходимости, испытуемые продукты хранят при комнатной температуре.

Продукты (3.3) и образцы (3.4) до или после исследования не инкубируют, не охлаждают и не замораживают.

Отбор проб анализируемых косметических продуктов выполняют в соответствии с ИСО 21148. Исследуют образцы, как установлено в ИСО 21148, и в соответствии с процедурой, описанной в Разделе 9.

9 Процедура

9.1 Общие рекомендации

Использовать стерильные материалы, оборудования и асептические средства для подготовки образца, исходной суспензии и растворов. В случае подготовки исходной суспензии, время, которое проходит между окончанием подготовки и моментом посевного материала, вступающего в контакт с питательной средой, не должно превышать 45 минут, если иное не предусмотрено в протоколе или документации.

9.2 Получение исходной суспензии

9.2.1 Общие положения

Исходную суспензию получают из пробы не менее 1 г или 1 мл хорошо смешанного испытуемого продукта.

Обозначить S как точную массу или объем образца.

Исходная суспензия равна 1:10 раствора. Большие объемы разбавителя могут потребоваться, если ожидаются высокие уровни загрязнения и / или если присутствуют антифунгицидные свойства в 1:10 раствора.

9.2.2 Водорастворимые продукты

Передать образец S продукта в соответствующий объем (например, 9 мл) нейтрализации растворителя (см. 5.2.2) или разбавителя (см. 5.2.3).

Коэффициент разбавления обозначить d.

9.2.3 Водонерастворимые продукты

Поместить образец S продукта в соответствующий контейнер, содержащий соответствующее количество солюбилизирующего агента (например, полисорбат 80). Продиспергировать образец в солюбилизирующем агенте и добавить соответствующий объем (например, 9 мл) нейтрализующего растворителя (см. 5.2.2) или разбавителя (см. 5.2.3).

Коэффициент разбавления обозначить d.

9.3 Метод подсчета

9.3.1 Растворы для методов подсчета

Исходной суспензией является первый подсчитанный разбавитель. Могут быть использованы дополнительные серийные разбавители (например, 1:10 раствора) по исходной суспензии с использованием того же

разбавителя (в соответствии с ожидаемым уровнем загрязнения продукта).

Подсчет осуществляется с использованием не менее двух чашек Петри.

ПРИМЕЧАНИЕ Если используют только одну чашку Петри, или если подсчеты выполняются на последовательных разбавителях такого же образца, или в соответствии с предыдущими результатами.

9.3.2 Чашечный метод подсчета

9.3.2.1 Чашечный метод

В чашки Петри от 85 мм – до 100 мм в диаметре, добавить 1 мл исходной суспензии и / или разведения образцов, подготовленные в качестве проверочных образцов (см. Раздел 12) и залить от 15 мл до 20 мл жидкой агаровой среды (см. 5.4.2), которая хранилась в водяной бане при температуре не более 48 °С. Если используются большие чашки Петри, количество агаровой среды увеличится соответственно.

Смешать исходную суспензию и / или развести образцы с агаровой средой, тщательно взбалтывая или наклоняя чашки до полного диспергирования. Дать смеси в чашке Петри затвердеть на горизонтальной поверхности при комнатной температуре.

9.3.2.2 Метод поверхностного распределения

В чашки Петри диаметром от 85 мм – до 100 мм в диаметре, добавить от 15 мл до 20 мл жидкой агаровой среды (см. 5.4.2), хранимой в водяной бане при температуре не более 48 °С. Если используются большие чашки Петри, количество агаровой среды увеличится соответственно.

Дать содержимому чашек охладиться и загустеть в микробиологическом инкубаторе. Распределить над поверхностью среды измеренный объем не менее 0,1 мл исходной суспензии и / или разведения образцов, подготовленного в качестве проверки (см. Раздел 12).

9.3.2.3 Метод мембранной фильтрации

Использовать мембрану с номинальным размером пор $\leq 0{,}45$ мкм.

Перенести соответствующее подходящее количество исходной суспензии или разведения образцов, подготовленное в качестве проверки (предпочтительно представляющих не менее 1 г или 1 мл продукта) на мембране.

Профильтровать и промыть мембраны (последующие процедуры, разработанные во время проверки, см. Раздел 12).

Перенести мембраны на поверхность агаровой среды (см. 5.4.2).

9.3.2.4 Инкубация

Инвертировать инокулированные чашки и поместить их в инкубатор при температуре (25 ± 2,5) °С в течение от 3 дней до 5 дней или использовать альтернативные условия (см. примечания в 4.2 и 4.3). После инкубации чашки, должны быть немедленно проверены. Они могут храниться до 24 часов в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 В некоторых случаях, где есть вероятность запутанных частиц из продукта с подсчитанными колониями, она может быть полезна для подготовки дубликатов чашек, содержащих такое же разведение образца и агаровую среду, которые хранятся в холодильнике для сравнения с инкубированными чашками.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Промежуточные проверки могут быть выполнены, когда содержание дрожжей и плесени вызывает неточность подсчета.

10 Подсчет колоний (метод чашечного подсчета и мембранной фильтрации)

После инкубации, подсчитать колонии:

- в чашках Петри, содержащих от 15 колоний до 150 колоний; если насчитывается менее 15 колоний, см. 11.2.3;
- на мембранах, содержащих от 15 колоний до 150 колоний, если насчитывается менее 15 колоний, см. 11.2.3;

11 Представление результатов

11.1 Метод вычисления чашечного подсчета

Число N микроорганизмов, присутствующих в образце S определяют по Формулам (1); (2); (3):

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

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

$$N = wm/(V \times d), \qquad (3)$$

где, m - средний арифметический подсчет, полученный из дубликатов (1);

V - объем посевного материала, применяемого к каждой чашке, в миллилитрах;

d - коэффициент разбавления, соответствующий разведению, приготовленный для исходной суспензии (см. 9.2) или для первого подсчитанного разбавления;

c - число колоний, подсчитанных на одной чашке (2);

wm - взвешенное среднее подсчетов, полученных из двух последовательных разведений (3).

Взвешенное среднее колонии, подсчитанное по двум последовательным разведениям, $\bar{x}_c$, вычисляется по Формуле (4):

$$\bar{x}_c = \frac{\sum c}{(n_1 + 0{,}1n_2)} \ , \qquad (4)$$

где, $\sum c$ - сумма колоний, подсчитанных на всех чашках, полученных из двух последовательных разведений;

n_1 - количество чашек, подсчитанных для исходной суспензии (или для

первого подсчитанного разведения);

n_2 - количество чашек, подсчитанных на 1:10 разведения исходной суспензии (или для второго подсчитанного разведения).

Округлить результат до двух значащих цифр. Для этого, если последняя цифра меньше 5, предыдущая цифра меняется; если последняя цифра превышает 5, предыдущая цифра увеличивается на одну единицу. Обратить внимание на полученное число N.

11.2 Интерпретация

11.2.1 Необходимо учесть присущую изменчивость при определении количества микроорганизмов посевом на чашках Петри. Оба результата следует рассматривать по-разному, если разница превышает 50% или, если они выражаются логарифмически, разница превышает 0,3 логарифма.

Для точного подсчета, должны быть учтены только чашки или мембраны с более чем 15 колоний и менее чем 150 колоний. Убедиться, что подсчет выполняется по разведениям, проверенным в соответствии с выбранным методом (см. Раздел 12).

11.2.2 Если число КОЕ более чем 15 и менее 150 на чашках или мембранах, выразить результат следующим образом:

- Если S составляет не менее 1 г или 1 мл, и V составляет 1 мл, количество дрожжей и плесени на миллилитр или за грамм образца равняется N/S;

- Если S меньше 1 г или 1 мл, и / или V составляет менее 1 мл, количество дрожжей и плесени в образце (обратить внимание на испытуемое количество образца с учетом S и V) равняется N;

где S является массой или объемом образца (см. 9.2).

Выразить результат как число между 1,0 и 9,9, умноженное на соответствующую степень 10 (см. примеры 1-8).

11.2.3 Если число КОЕ составляет менее 15 на чашках или мембранах, выразить результат необходимо следующим образом:

- Если S не менее 1 г или 1 мл, и V составляет 1 мл, оценочное число дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца равняется N / S;

- Если S менее 1 г или 1 мл, и / или V составляет менее 1 мл, оценочное число дрожжей и плесени в образце равняется N;

где S является массой или объемом образца (см. 9.2).

Выразить результат как число между 1,0 и 9,9, умноженное на соответствующую степень 10 (см. примеры 1-8).

11.2.4 В случае отсутствия колонии, результат выражается следующим образом:

- Менее чем $1/d \cdot V \cdot S$ дрожжей и плесени на грамм или мл продукта (S составляет 1 г или 1 мл);

- Менее чем $1/d \cdot V$ дрожжей и плесени в образце S (обратить внимание на испытуемое количество отбора проб с учетом S и V) (S менее 1 г или 1

мл);

где, d - коэффициент разбавления исходной суспензии (см. 9.2);

V - 1 (для подсчета чашечным методом и мембранной фильтрацией) или 0,1 (для чашечного метода) (см. примеры 1-8).

ПРИМЕР1 Две чашки на одно разведение

S = 1 g; V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 38 и 42

(1) $N = m/(V \cdot d) = 40/(1 \times 10^{-1}) = 40/0,1 = 400$ или 4×10^{-2} дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 2 Одна чашка на одно разведение

S = 1 g; V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}:60

(2) $N = c/(V \cdot d) = 60/(1 \times 10^{-1}) = 60/0,1 = 600$ или 6×10^{-2} дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 3 Две чашки для двух разведений

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-2}: 235 и 282; для разбавления 10^{-3}: 31 и 39

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

Округление результата, как указано выше, дает 27 000 или $2,7 \times 10^{4}$ дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 4 Два мембранных фильтра на одно разбавление

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 18 и 22

(1) $N = m/(V \cdot d) = 20/(1 \times 10^{-1}) = 20/0,1 = 200$ или 2×10^{2} дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 5 Один мембранный фильтр для одного разведения

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 65

(2) $N = c/(V \cdot d) = 65/(1 \times 10^{-1}) = 65/0,1 = 650$ или $6,5 \times 10^{2}$ аэробных дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 6 Два мембранных фильтра для двух разведений

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 121 и 105; для разведения 10^{-2}: 15 и 25

(3) $N = wm/(V \cdot d) = 121 \times 105 \times 15 \times 25/1(2 \times 0,1 \times 2) \times 10^{-1} = 266/0,22 = 1\ 209$.

Округление результата, как указано выше, дает 1 200 или 1,2 х 10^{3} дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 7 Две чашки на одно разведение

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 28 и 22

(1) $N = m/(V \cdot d) = 25/(1 \times 10^{-1}) = 25/0,1 = 250$ или $2,5 \times 10^{2}$ дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

Расчетное число составляет 250 или $2,5 \times 10^{2}$ дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

ПРИМЕР 8

S = 1 г, V = 1; подсчеты, полученные для разбавления 10^{-1}: 0 и 0

(1) $N = \leq 1/d \cdot V \cdot S, \leq (1/0,1) \times 1 \times 1 \leq 10$ дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

Расчетное число составляет менее 10 дрожжей и плесени на миллилитр или на грамм образца.

12 Нейтрализация антифунгицидных свойств продукта

12.1 Общие положения

Испытания, приведенные в 12.3, показывают, что микроорганизмы могут расти в условиях анализа.

12.2 Подготовка посевного материала

Перед испытанием, инокулируют поверхности неселективной агаровой среды, Сабуро декстрозы агар (СДА), с Candida Albicans. Инкубировать чашки при температуре (32,5 ± 2,5)°С в течение от 18 ч до 24 ч.

Для получения культуры, использовать стерильную петлю, полосу поверхности культуры и ресуспендировать в разбавителе (см. 5.2), чтобы получить калибровочную подвеску до 1×10^6 КОЕ / мл (определяется с помощью спектрофотометра), см. ISO 21148.

Использовать данные калибровочной подвески и ее разведения в течение 2 ч.

12.3 Проверка методов подсчета

12.3.1 Принцип

Смешать нейтрализованный образец (исходную суспензию или разведения образца в соответствии с антифунгицидной активностью или низкой растворимости продукта) с разбавлением эталонного штамма. Поместить на чашке Петри или фильтр на мембрану. После инкубации проверить характер колоний и сравнить подсчет с контрольным подсчетом (без образца).

Если количество составляет менее 50 % (0,3 логарифма) контрольного подсчета, изменить процедуру (разбавители, нейтрализующие агенты или их сочетание, см. Приложение D). Поврежденный посевной материал для выращивания является недействительным, испытание, вызывающее возможное загрязнение продукта данным микроорганизмом, является маловероятным.

12.3.2 Проверка чашечного метода

Смешать 9 мл исходной суспензии и / или разведения образцов в нейтрализующем разбавителе (или другие, см. 5.2) с 1 мл суспензии микроорганизмов содержащих 1 000 - 3 000 КОЕ / мл. Перенести 1 мл в чашки Петри (желательно в двух экземплярах) и залить 15 - 20 мл жидкой агаровой среды (см. 5.4.2), которая хранилась в водяной бане при температуре не более 48 °С. Параллельно подготовить и поместить

контрольный образец с использованием того же разбавителя и той же суспензии микроорганизмов, но без образца.

После инкубации в течение от 3 дней до 5 дней при температуре (25 ± 2,5) °С или используя альтернативные условия (см. Примечания к 4.2 и 4.3), подсчитать колонии на чашках и сравнить подсчет, полученный для испытаний и контроля. Разбавитель и метод подсчета проверяются при разбавлении 1:10 (при использовании 1 мл исходной суспензии), если проверка подсчета составляет не менее 50% (0,3 логарифма) контрольного подсчета.

12.3.3 Проверка метода распространения поверхности

Смешать 9 мл исходной суспензии в нейтрализующем разбавителе (или другие, см. 5.2) с 1 мл суспензии микроорганизмов содержащих от 10 000 КОЕ / мл до 30 000 КОЕ / мл (или меньше, если 0,5 мл или 1 мл распространяются). Распределить 0,1 мл на затвердевшей агаровой чашке (см. 5.4.2), в двух экземплярах. Одновременно подготовить и поместить пластину управления с использованием того же разбавителя и той же подвески микроорганизмов, но без образца. Одновременно, подготовить и поместить контрольный образец с использованием того же разбавителя и той же суспензии микроорганизмов, но без образца.

После инкубации в течение от 3 дней до 5 дней при температуре (25 ± 2,5) °С или используя альтернативные условия (см. Примечания к 4.2 и 4.3), подсчитать колонии на чашках и сравнить подсчет, полученный для испытаний и контроля. Разбавитель и метод подсчета проверяются при разбавлении 1:10 (при использовании 1 мл исходной суспензии), если проверка подсчета составляет не менее 50% (0,3 логарифма) контрольного подсчета.

12.3.4 Проверка метода мембранной фильтрации

Смешать в объеме исходной суспензии или разведения образцов, используемых в анализе (см. 9.3.2.3), соответствующее количество калиброванной подвески микроорганизмов, соответствующих примерно 100 КОЕ.

Профильтровать весь объем и промыть мембраны с помощью определенных объемов воды (см. 5.1), растворителя (см. 5.2.3) или нейтрализующего разбавителя (см. 5.2.2). Перенести мембраны на поверхности соответствующей агаровой среды (см. 5.4.2).

Одновременно, подготовить контрольный образец в тех же условиях, как указано выше, но без продуктов. Профильтровать и промыть под контролем в тех же условиях.

После инкубации в течение от 3 дней до 5 дней при температуре (25 ± 2,5) °С или используя альтернативные условия (см. примечания в 4.2 и 4.3), подсчитать колонии на чашках и сравнить подсчет, полученный для испытаний и контроля. Разбавитель и метод подсчета проверяются при разбавлении 1:10 (при использовании 1 мл исходной суспензии), если

проверка подсчета составляет не менее 50% (0,3 логарифма) контрольного подсчета.

13 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать следующее:

a) все сведения, необходимые для полной идентификации продукта;

b) используемый метод;

c) полученные результаты;

d) все операционные детали для подготовки исходной суспензии;

e) описание метода с помощью используемых нейтрализаторов и сред;

f) проверки метода, даже если тест был проведен отдельно;

g) любые сведения, не указанные в настоящем стандарте, или рассматривающиеся как дополнительные, а также подробную информацию о любых факторах, которые могут повлиять на результаты.

Приложение А
(информацинное)

Другие нейтрализующие разбавители

А.1 Общие положения

Любой нейтрализующий разбавитель может быть использован для подготовки исходной суспензии, если он был проверен и подтвержден. Следующие нейтрализующие разбавители служат примером соответствующих формул. Общая информация о нейтрализации приводится в Приложении D.

А.2 Жидкая питательная среда Eugon LT100

А.2.1 Общие положения

Жидкая питательная среда содержит компоненты, которые нейтрализуют угнетающие вещества, присутствующие в образце (лецитин и полисорбат 80); и диспергатор (октоксинол 9).

А.2.2 Состав

- Панкреатический гидролизат казеина - 15,0 г
- Папаиновый гидролизат соевой муки - 5,0 г
- L-цистин - 0,7 г
- Натрия хлорид - 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 мл

А.2.3 Подготовка

Растворить последовательно в горячей воде: полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин до их полного растворения. Растворить другие компоненты, смешивая при нагревании. Распределить среды в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С до 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,0 ± 0,2), при измерении при комнатной температуре.

А.3 Разбавитель полисорбата лецитина (LP)

А.3.1 Состав

- Полипептон - 1,0 г
- Яичный лецитин - 0,7 г
- Полисорбат 80 - 20,0 г
- Вода - 980 мл

А.3.2 Подготовка

Смешать и растворить ингредиенты путем нагревания. Охладить до 25 °С до распределения раствора в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,2 ± 0,2), при измерении в комнатной температуре.

Приложение В
(информационное)

Другие разбавители

В.1 Общие положения

Другие разбавители могут быть использованы для подготовки исходной суспензии, если они были проверены и подтверждены. Следующий разбавитель является примером соответствующей формулы.

В.2 Буферный пептоновый раствор (pH 7)

В.2.1 Состав

- Пептон - 1,0 г
- Натрия хлорид - 4,3 г
- Монокалийфосфат - 3,6 г
- Динатрия фосфат дигидрат - 7,2 г
- Вода - 1 000 мл

В.2.2 Подготовка

Растворить компоненты в горячей воде. Смешать и охладить до температуры 25 °С до распределения раствора в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (7,1 ± 0,2), при измерении при комнатной температуре.

В.3 Фосфатный буфер (pH 7,2)

В.3.1 Состав

- Калия дигидрофосфат - 34 г
- Вода - 500 мл

В.3.2 Подготовка

Растворить ингредиенты в воде в 1000 мл мерной колбе. Отрегулировать значение pH до (7,2 ± 0,1) с 175 мл гидроксида натрия (4,3 г/100 мл). Затем добавить воду до конечного объема в 1 000 мл. Конечная концентрация раствора 0,05 моль / л. Полученный основной раствор хранить в холодильнике.

Перед использованием разбавить исходный раствор с водой в соотношении 1:800 и стерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Приложение С
(информационное)

Другие питательные среды

С.1 Общие положения

Может быть использована любая питательная среда, если она была проверена и подтверждена. Следующие среды являются примерами соответствующих формул.

С.2 Агар для подсчета

С.2.1 Среда катрофельной агары с декстрозой и антибиотиками

С.2.1.1 Состав

- Картофельный экстракт - 4,0 г
- Глюкоза - 20,0 г
- Агара - 15,0 г
- Хлорамфеникол - 0,05 г
- Вода - 1 000 мл

С.2.1.2 Подготовка

Смешать все компоненты и распределить среды в соответствующие контейнеры. Простерилизовать в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения, pH должен быть эквивалентным (5,6 ± 0,2), при измерении при комнатной температуре.

Кроме того, хлорамфеникол может быть заменен с использованием 0,10 г бензилпенициллина калия и 0,10 г тетрациклина на литр среды, добавленный как стерильный раствор, только перед использованием.

С.2.2 Глюкоза-пептоновая (ГП) агаровая среда с антибиотиками

С.2.2.1 Состав

- Глюкоза - 20,0 г
- Дрожжевой экстракт - 2,0 г
- Сульфат магния - 0,5 г
- Пептон - 5,0 г
- Одноосновной фосфат калия - 1,0 г
- Агара - 15,0 г
- Хлорамфеникол - 0,05 г
- Вода - 1 000 мл

С.2.2.2 Подготовка

Смешать все компоненты и распределить среды в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 121 ° С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения, pH должен быть эквивалентным (5,7 ± 0,1), при измерении при комнатной температуре.

Хлорамфеникол может быть заменен с использованием 0,10 г бензилпенициллина калия и 0,10 г тетрациклина на литр среды, добавленные как стерильный раствор, только перед использованием.

С.3 Среда из солодового экстракта

С.3.1 Состав

- Солодовый экстракт - 30,0 г
- Соевый пептон, папаиновый гидролизат соевой муки - 3,0 г
- Агара - 15,0 г
- Хлорамфеникол - 0,05 г
- Вода - 1 000 мл

С.3.2 Подготовка

Растворить компоненты (в том числе хлорамфеникол) или обезвоженную готовую среду в воде при нагревании. Внести готовые среды в соответствующие контейнеры. Стерилизовать в автоклаве при температуре 115 ° С в течение 10 мин. После стерилизации pH должно быть эквивалентно (5,6 ± 0,2), при измерении при комнатной температуре.

Приложение D
(информационное)

Нейтрализаторы антифунгицидной активности консервантов и ополаскиватели для тканей

Консервант	**Химические соединения, способные нейтрализовать антифунгицидную активность**	**Примеры деятельности подходящих нейтрализаторов и ополаскивателей для тканей (Для мембранных методов фильтрации)**
Фенольных соединений: Фенольные соединения: парабены, феноксиэтанол, фенилэтанол, анилиды	Лецитин Полисорбат 80 Конденсат окиси этилена жирного спирта Неионогенный поверхностно-активный полисорбат	Полисорбат 80, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. Конденсат окиси этилена жирного спирта, 7 g/l + лецитин, 20 г/Iл+ полисорбат 80, 4 г/л Нейтрализующая питательная среда D/E Промывочная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/л + NaCl, 9 г/л; полисорбат 80, 5 г/л.
Четвертичные соединения аммония Катионные ПАВ	Лецитин Полисорбат сапонин 80 Сульфат натрия додецила Конденсат окиси этилена жирного спирта	Полисорбат 80, 30 г/л + Сульфат натрия додецила, 4 г/л + лецитин, 3 г/л. Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. Нейтрализующая питательная среда D/E Промывочная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/л + NaCl, 9 г/л; полисорбат 80, 5 г/л.
Альдегиды Формальдегид-релиз агенты	Глицин, гистидин	Лецитин, 3 г/Il + полисорбат 80, 30 г/л + L-гистидин, 1 г/л. Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + L-гистидин, 1 г/л + L-цистеин, 1 г/л. Нейтрализующая питательная среда D/E Промывочная жидкость: полисорбат 80, 3 г/л + L-гистидин 0,5 г/л.
Окисляющие соединения	натрия тиосульфата	Натрия тиосульфата, 5 г/л. Промывочная жидкость: тиосульфата натрия, 3 г/л.
Изотиазолины, имидазолы	Лецитин, сапонин, амины, сульфаты, меркаптанов, бисульфита натрия, бисульфат натрия, тиоглисоллат натрия	Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. Промывочная жидкость: триптон, 1 г/л + NaCl, 9 г/л; полисорбат 80, 5 г/л.
Бигуаниды	Лецитин, сапонин, Полисорбат 80	Полисорбат 80, 30 г/л + сапонин, 30 г/л + лецитин, 3 г/л. Промывочная жидкость: триптон, 1 г/л + NaCl, 9 г/л; полисорбат 80, 5 г/л.
Соли металлов (Cu, Zn, Hg) Ртуть-органические соединения	Бисульфат натрия, L-цистеин, сульфгидрильные соединения,	Тиогликоллат натрия, 0,5 г/л или 5 г/л. L-цистеин, 0,8 г / л или 1,5 г / л Нейтрализующая питательная среда D/E Промывочная жидкость: Тиогликоллат натрия 0,5 г/л.
ПРИМЕЧАНИЕ В соответствии с pH косметического продукта, pH нейтрализатора можно отрегулировать при соответствующем значении.		

Библиография

[1] COLIPA, Руководство по микробному менеджменту качества, Европейская косметика, Парфюмерно-косметическая Ассоциация (КОЛИПА), 1997 (COLIPA, Guidelines on Microbial Quality Management, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), 1997).

[2] CTFA, Руководящие принципы по микробиологии, Парфюмерно-косметическая Ассоциация, ISBN 1-882621-32-8, 2001 (CTFA, Microbiology Guidelines, Toiletry and Fragrance Association, ISBN 1-882621-32-8, 2001).

[3] E., Микробиологическое исследование нестерильных продуктов, 4-е издание, Европейской Фармакопеи, 2002 (EP, Microbiological Examination of Non-Sterile Products, 4th edition, European Pharmacopoeia, 2002).

[4] FDA, Бактериологическое Аналитическое Руководство, 8-е издание, Администрация по контролю за продуктами питания и лекарствами, 1995, gost.e-ecolog.ru ~ ebam/bam-23.html (FDA, Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, U.S. Food and Drug Administration, 1995).

[5] JP 14, General Tests — Microbial Limit Test, Japanese Pharmacopoeia, 2001 (Общие Тесты. Микробное испытание на предельное содержание, Японская фармакопея, 2001).

[6] USP 28, Микробное испытание на предельное содержание (61), Фармакопеи США, 2005 (USP 28, Microbial Limit Test (61), U.S. Pharmacopoeia, 2005)

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

[8] Сингер, С., Использование защитных нейтрализаторов в Разбавителях и среда для чашек Петри , Косметики и туалетные принадлежности, 102, стр. 55 декабря 1987 (SINGER, S., The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media, Cosmetics and Toiletries, 102, p. 55, December 1987).

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

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

[11] EN 13624:2003, Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area Test method and requirements (phase 2, step 1) (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Количественное испытание суспензии для оценки фунгицидного действия химических дезинфицирующих средств на медицинские инструменты. Метод испытания и требования (фаза 2, ступень 1)).

Приложение D.A
(информационное)

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в Таблице D.A.1.

Таблица D.A.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего государственного стандарта
ISO 21148 Cosmetics. Microbiology. General instructions for microbiological examination (Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю)	IDT	СТ РК ИСО 21148-2008 Косметика. Микробиология. Общие указания, касающиеся микробиологического исследования

УДК 579.844 **МКС** 71.100.70

Ключевые слова: кометика, дрожжи, плесень, продукт, образец, исходная суспензия, разведения образца

Басуға _____ж. қол қойылды. Пішімі 60х84 1/16 Қағазы офсеттік.
Қаріп түрі «Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана.
Тапсырыс ____ _____
«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты» республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы Орынбор көшесі, 11 үй
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8(7172) 240074, 793324

gost.e-ecolog.ru