



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

Keimzahlbestimmung bei rezepturmäßig hergestellten Cremes und Hydrogelen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Engineering
(B.Eng.)

Durchgeführt von:	Jingjing Qiao
Matrikelnummer:	4051417
Studiengang:	Pharmatechnik
1.Gutachter:	Herr Prof. Dr. Georg Heun
2.Gutachter:	Herr Prof. Dr. Joachim Breme

Köthen, August 2014

Dankesagung

Danken möchte ich in erster Linie meinem Betreuer, Herrn Prof. Georg Heun, für seine ausgiebige Unterstützung. Dank seiner herausragenden Expertise konnte er mich immer wieder in meiner Recherche und bei meinen Fragen unterstützen.

Auch möchte ich mich bei Frau Anja Röder und Herr Ronny Holländer für die Unterstützung während meines Bachelor-Praktikums bedanken.

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Theoretische Grundlagen.....	4
	2.1 Definition der Keimzahl.....	4
	2.2 Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte.....	4
	2.3 Keimzählmethoden.....	5
	2.3.1 Membranfiltration.....	7
	2.3.2 Auszählen auf Agarplatten.....	8
	2.3.3 MPN-Methode(Mehrfachsatz).....	9
	2.4 Auswahl von Methoden.....	10
	2.5 Probenvorbereitung.....	11
	2.6 Verdünnungsreihe.....	13
	2.7 Berechnung des Keimgehaltes.....	14
	2.8 Konservierungsstoffe für kosmetische Mittel.....	16
3	Praktischer Teil.....	17
	3.1 Materialien.....	17
	3.2 Chemikalien.....	18
	3.3 Geräte.....	19
	3.4 Herstellung von Cremes und Gelen.....	20
	3.4.1 Herstellungsgruppen.....	20
	3.4.2 Herstellung der Creme A.....	21
	3.4.3 Herstellung der Creme B.....	22
	3.4.4 Herstellung des Gels A.....	23
	3.4.5 Herstellung des Gels B.....	24
	3.5 Analysenmethoden.....	26
	3.5.1 Herstellung von Agarplatten.....	26
	3.5.2 Herstellung von Pufferlösung.....	28
	3.5.3 Herstellung von Verdünnungsreihe der Proben.....	28
	3.5.4 Pipettieren der Proben auf die Agarplatten.....	31

3.5.5 Inkubieren der Agarplatten.....	32
4 Ergebnisse und Auswertung.....	33
4.1 Auszählen auf Agarplatte.....	33
4.2 Keimgehalte.....	38
5 Diskussion.....	40
6 Zusammenfassung.....	42
7 Abbildungsverzeichnis.....	43
8 Tabellenverzeichnis.....	44
9 Literaturverzeichnis.....	45
10 Abkürzungsverzeichnis.....	46
11 Eidesstattliche Erklärung.....	47

1 Einleitung

Mikrobielle Kontamination in der Kosmetik kann zum Verderb des Produktes führen, und, falls pathogen, ein hohes Gesundheitsrisiko für die Verbraucher darstellen. Die Umsetzung der guten Herstellungspraxis war in den letzten 30 Jahren die Grundlage für die Verbesserung der industriellen Qualitätskontrolle und –analysen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Keimzahl von Mikroorganismen eingesetzt. Das Amerikanische Arzneibuch gibt vier bakterielle Indikatoren (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*) an.(USP) Weiterhin enthält das Europäische Arzneibuch eine zusätzliche Analyse zur Ermittlung des Niveaus von Enterobakterien. Trotz dieser Leitlinien ist die Mikrobielle Kontamination immer noch weltweit eine der Hauptursachen für Rückrufaktionen von Kosmetik, insbesondere in tropischen Entwicklungsländern. Daher ist die Verbesserung des Konservierungsmittelsystems wichtig: um das Wachstum von kontaminierenden Mikroorganismen während der Herstellung, Lagerung und Verwendung durch Verbrauchern, auch bei Verwendung nicht-invasiver Verpackungen zu hemmen. [1]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Methoden zur Bestimmung der Keimzahl in der Kosmetik kennenzulernen und mit einer ausgewählte Methode die Keimzahl in rezepturmäßig hergestellten Cremes und Hydrogelen zu überprüfen. In dieser Arbeit wurden die Keimzahlen in den Cremes und Hydrogelen, die in verschiedenen Herstellungsumgebungen hergestellt wurden, bestimmt, um die Herstellungsumgebung im Labor und die Wirksamkeit von den in den Cremes und Gelen eingesetzten Konservierungsstoffen zu kontrollieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Definition der Keimzahl

Keimzahl oder auch Keimgehalt ist in der Mikrobiologie der Gehalt eines Materials an Mikroorganismen, und zwar ihre Anzahl im Verhältnis zum Volumen oder zur Masse des Materials, die Maßeinheit ist meistens ml^{-1} bzw. g^{-1} (Bezugsgröße 1 Milliliter bzw. 1 Gramm). [2]

Die Keimzahlen werden meistens durch die Koloniezahl bestimmt. Um alle Mikroorganismen einzeln vorliegen zu haben, verteilt man eine bestimmte Menge des Materials in einem Agarnährboden und bebrütet den Nährboden unter geeigneten Bedingungen. Anschließend zählt man die gebildeten Mikroorganismen-Kolonien.

2.2 Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte [3]

Die vermehrungsfähigen Mikroorganismen in nicht sterilen Produkten werden gezählt. Das quantitative Auszählen mesophiler Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) , die unter aeroben Bedingungen wachsen, wird nach den nachfolgenden vorgestellten Methoden durchgeführt.

Eine Substanz oder eine Zubereitung wird in Bezug auf die mikrobiologische Qualität nach den Methoden geprüft, die den festgelegten Spezifikationen entsprechen. "Zu diesem Zweck sind die nachfolgend aufgeführten Vorschriften einschließlich der Anzahl zu entnehmender Proben einzuhalten und die Ergebnisse sind wie nachfolgend angegeben auszuwerten. „[3]

Die Vorsichtsmaßnahmen werden getroffen, um die mikrobielle Kontamination des zu prüfenden Produkts durch äußere Einflüsse zu vermeiden. Wenn man die antimikrobielle Aktivität des zu prüfenden Produkts aufweisen möchte, muss diese so weitgehend wie möglich entfernt oder neutralisieren werden.

Wenn oberflächenaktive Substanzen für die Herstellung der Proben verwendet werden, müssen die Nachweise der Nichttoxizität der Substanzen gegenüber den betreffenden Mikroorganismen und der Kompatibilität der Substanzen mit den inaktivierenden Substanzen durchgeführt werden.

2.3 Keimzählmethoden [3]

Im Ph.Eur. werden drei Methoden (Membtanfiltration, Auszählen auf Agarplatten, MPN-Methode) zur Bestimmung der Keimzahl in nicht sterilen Produkten vorgestellt. Wenn die Äquivalenz mit der Arzneibuchmethode von anderen mikrobiologische Methoden nachgewiesen wurde, können die Methoden auch angewendet werden.

Die gesamten vermehrungsfähigen aeroben Keime können entweder mit der vorgeschriebenen Membranfilter-Methode oder durch Auszählen auf Agarplatten bestimmt werden. Die MPN-Methode zur Bestimmung der Keimzahl ist im Allgemeinen weniger exakt im Vergleich zu anderen mikrobiellen Zählmethoden. Aber die MPN-Methode eignet sich besonders gut für bestimmte Produktgruppen mit einer sehr geringen mikrobiellen Ausgangsbelastung.

Für jeden in Tab.1 genannten Mikroorganismus werden getrennte Prüfungen durchgeführt.

Mikroorganismus	Zubereitung des Teststamms	Wirksamkeit der Nährmedien		Anwendbarkeit der Zählmethode in Gegenwart des Produkts	
		Gesamtanzahl aerober Keime	Gesamtanzahl an Hefen und Schimmelpilzen	Gesamtanzahl aerober Keime	Gesamtanzahl an Hefen und Schimmelpilzen
<i>Staphylococcus aureus</i> , zum Beispiel: ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton 30 bis 35 °C 18 bis 24 h	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤3 Tage		Agarmedium mit Casein- und Sojapepton/ MPN: flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤3 Tage	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , zum Beispiel: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton 30 bis 35 °C 18 bis 24 h	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤3 Tage		Agarmedium mit Casein- und Sojapepton/ MPN: flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤3 Tage	
<i>Bacillus subtilis</i> , zum Beispiel: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton 30 bis 35 °C 18 bis 24 h	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C, ≤3 Tage		Agarmedium mit Casein- und Sojapepton/ MPN: flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C, ≤3 Tage	
<i>Candida albicans</i> , zum Beispiel: ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Sabouraud-Glucose-Agarmedium oder flüssiges Sabouraud-Glucose-Nährmedium 20 bis 25 °C 2 bis 3 Tage	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤5 Tage	Sabouraud-Glucose-Agarmedium ≤100 KBE 20 bis 25 °C ≤5 Tage	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤5 Tage MPN: nicht anwendbar	Sabouraud-Glucose-Agarmedium ≤100 KBE 20 bis 25 °C ≤5 Tage
<i>Aspergillus niger</i> , zum Beispiel: ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Sabouraud-Glucose-Agarmedium oder Agarmedium mit Glucose und Kartoffeln 20 bis 25 °C 5 bis 7 Tage oder bis zur ausreichenden Sporenbildung	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤5 Tage	Sabouraud-Glucose-Agarmedium ≤100 KBE 20 bis 25 °C ≤5 Tage	Agarmedium mit Casein- und Sojapepton ≤100 KBE 30 bis 35 °C ≤5 Tage MPN: nicht anwendbar	Sabouraud-Glucose-Agarmedium ≤100 KBE 20 bis 25 °C ≤5 Tage

Tab.1: Zubereitung und Verwendung von Testmikroorganismen

2.3.1 Membranfiltration

Bei dieser Methode werden die steril gelieferten Membranfilter auf die Filtrationsanlage gelegt. Die nominale Porengröße der verwendeten Membranfilters ist maximal 0,45 µm groß. Auf das Membranfilter wird eine geeignete Menge der gemäß den Schritten(Probenvorbereitung, Insulation, Verdünnung, Neutralisation/ Elimination der antimikrobiellen Aktivität) aufbereiteten Probe aufgebracht. Die Probe soll eine 1 g entsprechende Menge des Produkts oder eine geringere Menge sein, wenn angenommen werden kann, dass die Anzahl KBE erhöht sein wird. Das Filter wird nach der Filtration der Proben mit einem geeigneten Volumen des Verdünnungsmittels nachgewaschen. Die Bakterien bleiben auf der Membranoberfläche haften. Für das Auszählen der Gesamtanzahl wird das Membranfilter mit einer sterilen Pinzette auf den Agarmedium mit Casein- und Sojapepton gelegt. Für das Auszählen der Gesamtanzahl an Hefen und Schimmelpilzen (TYMC) wird das Membranfilter auf Sabouraud-Glucose-Agarmedium gelegt. Die Argarplatten werden mit dem Deckel nach unten gerichtet, wie in Tab.1 angegeben, inkubiert und die Kolonien ausgezählt.



Abb.1 : Membranfiltration [4]

2.3.2 Auszählen auf Agarplatten

Diese Methode basiert darauf, dass aus einem Keim oder einer Keimgruppe durch die Bebrütung nur eine Kolonie entsteht. Wie bei anderen Methoden muss die Probe entsprechend verdünnt werden, um eine auszählbare Keimzahl zu erreichen. Bei der Methode lassen sich zwei unterschiedliche Verfahren zur Beimpfung unterscheiden. Für jedes Nährmedium erfolgt das Auszählen auf Agarplatten im doppelten Ansatz, um einen Mittelwert zu erhalten.

Plattengussverfahren:

Die Methode ist ein Einmischverfahren. Man pipettiert zuerst 1 ml der Probe in die leere Petrischale von 9 cm und übergießt anschließend mit Casein- und Sojapepton oder Sabouraud-Glucose-Agarmedium von höchstens 45 °C. Die Petrischalen werden wie in Tab.1 angegeben inkubiert.

Diese Methode ist insbesondere für beweglichen Bakterien geeignet, sonst schwärmen die Bakterien an die Oberfläche und einzelne Kolonien sind schwer zu erkennen. Bei hoher Keimdichte der Proben bilden die eingeschlossenen Keime bei dieser Methode wesentlich kleinere und kompaktere Kolonien als auf der Oberfläche. Dadurch können die Kolonien erkennbar nebeneinander wachsen. [5]

Ausstrichverfahren:

Man gießt in Petrischalen von 9 cm Durchmesser jeweils 15 bis 20 ml Agarmedium mit Casein- und Sojapepton oder Sabouraud-Glucose-Agarmedium von höchstens 45 °C. Die Agarplatten werden zum Verfestigen stehengelassen und in einer Laminarflow-Bank oder in einem Inkubator trocknen gelassen. Anschließend wird ein abgemessenes Volumen von mindestens 0,1 ml der vorbereiteten Probe auf der Oberfläche des Agars

ausgestrichen.

“Diese Methode wird immer dann eingesetzt, wenn es sich um einen Indikator-Agar handelt, bei dem eine eindeutige Farbreaktion mit den Kolonien stattfinden muss. Abweichende Färbungen entstehen vor allem bei eingemischten Kolonien, da beispielsweise unter der Oberfläche andere Sauerstoffverhältnisse herrschen können. „[5]

2.3.3 MPN-Methode (Mehrfachsatz) [3] [5]

Die MPN-Methode ist eine Methode mit Hilfe von Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Keimzahl im Flüssigmedium, bei der das Bakterienwachstum im Mehrfachansatz bei verschiedenen Verdünnungen Rückschlüsse über die vermeintlich in der Probe enthaltene Keimzahl zulässt. Die Methode hat aber eine geringere Präzision und Richtigkeit als die Membranfilter-Methode oder das Auszählen auf Agarplatten. Insbesondere ist sie kaum geeignet für das quantitative Bestimmen von Schimmelpilzen. Aber es ist eine geeignete Methode für das Auszählen der gesamten aeroben Keime, wenn keine anderen Methoden verfügbar sind. [3]

“Die Grundlage des Verfahrens ist ein flüssiges Selektivnährmedium, in dem durch bestimmte Substrate bei Anwesenheit eines Bakteriums eine spezifische enzymatische Reaktion stattfindet, die zu einem optischen Erkennungsmerkmal führt. Dies kann zum Beispiel ein Farbumschlag der Nährlösung nach entsprechender Inkubationszeit oder ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt sein. „[5]

Die Durchführung besteht aus folgenden Schritten: Es werden mindestens 3 Verdünnungsstufen der Proben mit dem Faktor 10 durchgeführt. “ Von jeder Verdünnungsstufe wird 3-mal je 1 g oder 1 ml in ein Kulturröhrchen mit 9 bis 10 ml flüssigem Medium mit Casein- und Sojapepton gegeben, das, falls erforderlich, eine oberflächenaktive Substanz wie Polysorbat 80 oder ein Agens enthält, das die antimikrobielle Aktivität neutralisiert., [3] 9 Kulturröhrchen müssen für eine Reihe von 3 Verdünnungen folglich inokuliert werden. Die Kulturröhrchen werden alle höchstens 3 Tage lang bei 30 bis 35 °C inkubiert.

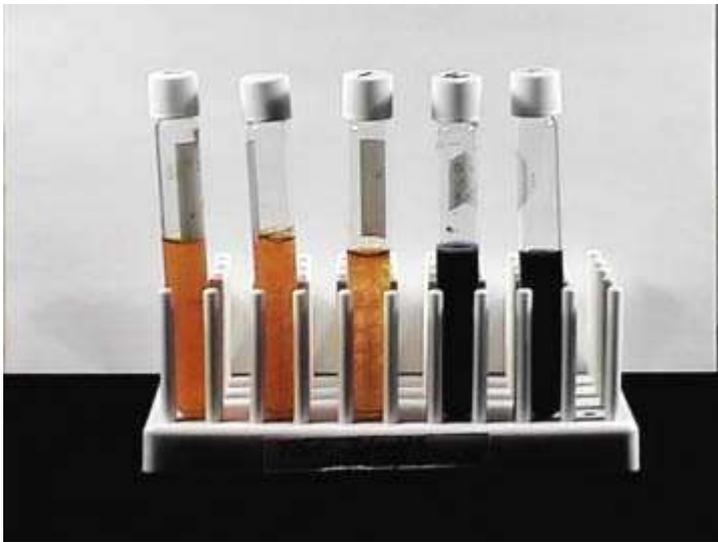


Abb.2 : MPN-Methode

2.4 Auswahl von Methoden[3]

Die Auswahl der Methoden ist abhängig von Faktoren wie der Art des Produkts und der für die Anzahl an Mikroorganismen festgelegten Grenzwerte.

Um die Konformität mit den Spezifikationen zu bewerten, muss die Prüfung mit der gewählten Methode an einer Probe ausreichender Größe durchgeführt werden.

2.5 Probenvorbereitung [3]

Die Probenvorbereitung ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften des zu prüfenden Produkts.

Wasserlösliche Produkte:

Das zu prüfende wasserlösliche Produkt wird im Lösungsmittel (Natriumchlorid-Pepton- Pufferlösung pH 7,0, Phosphat-Pufferlösung pH 7,2 oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton) gelöst oder mit damit verdünnt. Normalerweise wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Falls erforderlich, kann man die Lösung auf einen PH-Wert zwischen 6 und 8 einstellen. Die Lösung wird nach Bedarf weiter mit dem gleichen Verdünnungsmittel verdünnt.

Nicht fettartige, wasserunlösliche Produkte:

Das zu prüfende Nicht fettartige, wasserunlösliche Produkt wird in einem Lösungsmittel (Natriumchlorid-Pepton- Pufferlösung pH 7,0, Phosphat-Pufferlösung pH 7,2 oder flüssiges Nährmedium mit Casein- und Sojapepton) suspendiert. Normalerweise wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Um schwer benetzbare Substanzen leichter suspendieren zu können, kann eine geeignete, oberflächenaktive Substanz wie Polysorbat 80 (1 g · l⁻¹) der Suspension zugesetzt werden. Falls erforderlich, kann man die Suspension auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 einstellen. Die Suspension wird nach Bedarf weiter mit dem gleichen Verdünnungsmittel verdünnt.

Fettartige Produkte:

“Das zu prüfende Produkt wird in sterilfiltriertem Isopropylmyristat gelöst oder mit der eben erforderlichen Menge an sterilem Polysorbat 80 oder einer anderen sterilen, nicht wachstumshemmenden, oberflächenaktiven Substanz

gemischt. „[3] Falls erforderlich, kann man die Mischung auf höchstens 40 °C, in Ausnahmefällen auf höchstens 45 °C erwärmen. Die Suspension wird nach Bedarf weiter mit dem gleichen Verdünnungsmittel verdünnt. Die Mischung wird nach sorgfältigen Mischen nach Bedarf in einem Wasserbad bei der gewünschten Temperatur gehalten. Eine erforderliche Menge des ausgewählten, zuvor erwärmten Verdünnungsmittels wird der Mischung zugesetzt, um eine 1:10 Verdünnung des Ausgangsprodukts zu erhalten. Die Mischung wird gerade so lange bei gleichbleibender Temperatur sorgfältig gemischt, bis sich eine Emulsion gebildet hat. Anschließend wird die Mischung mit einem gewählten Verdünnungsmittel, das eine geeignete Menge an sterilem Polysorbat 80 oder einer anderen sterilen, nicht wachstumshemmenden, oberflächenaktiven Substanz enthält, verdünnt.

Flüssige und feste Produkte in Form von Aerosolen:

Die Produkte werden für die nachfolgende Probenahme unter aseptischen Bedingungen in eine Membranfiltereinheit oder in ein steriles Gefäß überführt. Der gesamte Inhalt oder bei Dosieraerosolen eine festgelegte Anzahl an Sprühstößen werden für jedes zu prüfende Behältnis verwendet.

Transdermale Pflaster:

Die Schutzfolien der Transdermalen Pflaster werden entfernt und die Pflaster mit der Haftschrift nach oben in sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff gebracht. Danach wird die Haftschrift mit einem porösen, sterilen Material wie steriler Gaze bedeckt, um das Verkleben der Transdermalen Pflaster zu verhindern. Die Pflaster werden in ein geeignetes Volumen eines ausgewählten Verdünnungsmittels, das inaktivierende Substanzen wie Polysorbat 80 und/oder Lecithin enthält, überführt. Die Pflaster müssen mit dem Lösungsmittel mindestens 30 min lang kräftig geschüttelt werden.

2.6 Verdünnungsreihe

Die Prüfung muss an der Probe durchgeführt werden, die mit dem kleinstmöglichen Verdünnungsfaktor hergestellt wurde, um die Bakterienkolonien zählen zu können. Man muss die Zahl der Bakterien in der Proben deutlich herunter verdünnen und mehrere Verdünnungsschritte hintereinander durchführen.

“Eine Verdünnungsreihe ist die Gesamtheit von Lösungen, die für einen bestimmten Zweck aus einer konzentrierten Ausgangslösung durch Verdünnen hergestellt wurden. Dabei unterscheiden sich die als Verdünnungsstufen bezeichneten Lösungen in ihrem Gehalt.(beispielsweise in der Stoffmengenkonzentration oder der Massenkonzentration) „[6]

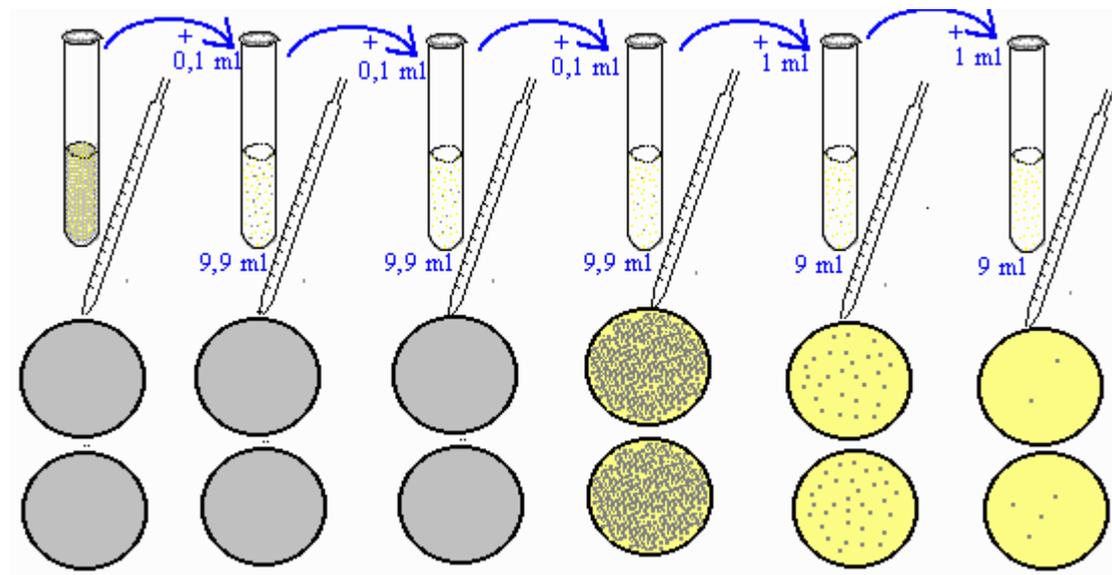


Abb.3 : Beispiel für eine Verdünnungsreihe [7]

2.7 Berechnung des Keimgehaltes^[8] ^[9]

Der Mittelwert der Keimzahl wird durch Parallelplattenzählung bestimmt. Die Keimzahl wird immer auf 1 ml oder 1 g der Probe bezogen. Zur Auszählung kamen Platten mit Koloniezahlen zwischen 10 und 300 KBE.

Farmiloe'sche Formel:

$$C = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0.1} \times d = \text{KBE/ml bzw. KBE/g}$$

c.....Anzahl der koloniebildenden Einheiten

$\sum c$Summe aller ausgezählten Kolonien

n_1Anzahl der Ansätze mit der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden

n_2Anzahl der Ansätze mit der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden

d.....Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe:
Hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

Werden weniger als 10 Kolonien auf der Platte gefunden → < 10xd

d ist der Faktor der niedrigsten Verdünnungsstufe.

Werden mehr als 300 Kolonien auf der Platte gefunden → „geschätzte Keimzahl je g oder ml“

Weitere Möglichkeit: 124000 → $1,2 \times 10^5$ K/ml oder K/g

“Das ermittelte Ergebnis wird mit lediglich 2 Stellen angegeben. Die 3. Stelle wird auf 0 gerundet. Beträgt sie 5, wird abgerundet, wenn die zweite Stelle eine gerade Zahl ist, und aufgerundet, wenn sie eine ungerade Zahl ist. „

Bsp.: 124→120

125→120

135→140

- Auswertung der cfu Bestimmung: es werden so genannte cfu – colony forming units – makroskopisch gezählt und auf einen ml hochgerechnet
- verwendet werden jene Platten, die zwischen 10 und 100 cfu aufweisen, hier werden alle Parallelen ausgezählt

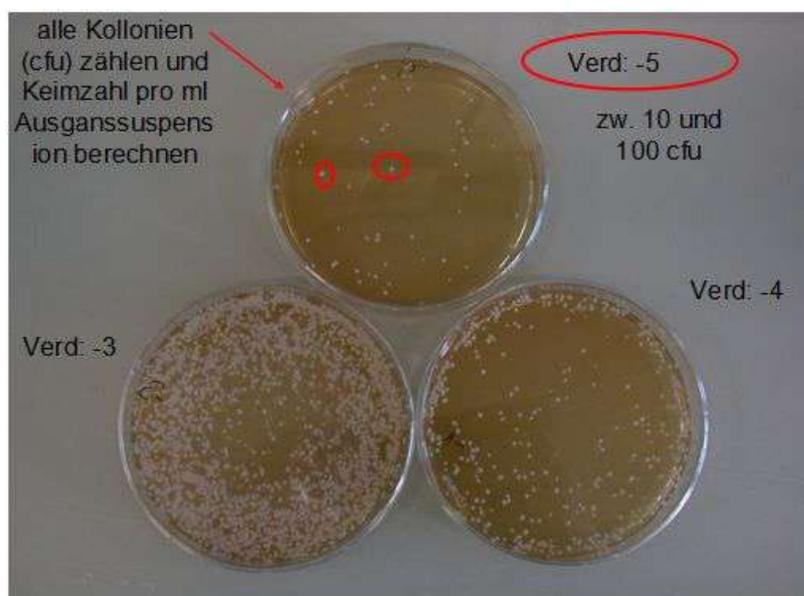


Abb.4: Kolonien auf die Agarplatten

- Rechenbeispiel:
 - es wurden 0,1 ml (100 µl) einer Suspension der Verdünnungsstufe 10^{-4} ausgespatelt
 - Verdünnungsstufe 10^{-4} ergibt: 14, 20 und 17 cfu je Parallelplatte (cfu: Koloniebildende Einheit)
 - Bildung des Mittelwertes: 17 (Mittelwert darf nur innerhalb von Parallelplatten, nicht aber zwischen Verdünnungsstufen gebildet werden (!!!!))
- Rechnung: $17 / 0,1 = 1,7 \cdot 10^2 / 10^{-4} = 1,7 \cdot 10^6$ cfu /ml

2.8 Konservierungsstoffe für kosmetische Mittel

“Konservierungsstoffe im Sinne dieser Verordnung sind Stoffe und Gemische, die kosmetischen Mitteln überwiegend zu dem Zweck hinzugefügt werden, die Entwicklung von Mikroorganismen in diesen Erzeugnissen zu hemmen.”[10]

“ Als Salze von Konservierungsstoffen gelten die Salze der Kationen Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Ammonium und Ethanolamin sowie die Salze der Anionen Chlorid, Bromid, Sulfat und Azetat. Als Ester von Konservierungsstoffen gelten Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl- und Phenylester.”[11]

Gebräuchliche Konservierungsstoffe für kosmetische Mittel sind Benzoesäure (Mundpflegemittel:2,5%), Propionsäure und ihre Salze, Formaldehyd und Paraformaldehyd (+)0,2% (ausgenommen Mundpflegemittel), 2,4-Hexadiensäure. Es gibt aber auch Kosmetikprogramme oder einzelne Produkte, die ohne Konservierungsstoffe auskommen. Viele Konservierungsmittel haben gesundheits- und umweltgefährdende Eigenschaften. Die verbreitete Anwendung bringt die große Gefahr mit sich, dass sich resistente Keime bilden, die dann nur noch schwer zu bekämpfen sind. Außerdem greifen die Konservierungsmittel auch den natürlichen Schutzmantel der Haut oder wichtige Bakterien in der Mundhöhle an, die den Körper vor gefährlichen Infektionen schützen. Zusätzlich sind viele Konservierungsmittel Allergene und können Dermatitis verursachen.

3 Praktischer Teil

3.1 Materialien

- Einweg-Wägeschalen
- Spateln
- Pistill
- Fantaschale
- Becherglas
- Glasstab
- Salbenkruken mit Schraubdeckel
- Messbecher
- autoklavierbare Reagenzflasche mit Kappe
- PH-Papier
- Petrischalen
- sterile Röhrchen
- Eppendorf Pipetten
- Eppendorf Küvetten
- Drigalskispatel
- Feuerzeug
- Reagenzglasen
- Röhrchenständer
- Markierstift

3.2 Chemikalien

Tab.2: Zusammensetzung der Tagescreme: 40 g

A. Cetareth	1,2 g
B. Cetylalkohol	1,2 g
C. Glycerolmonostearat	1,2 g
D. Octyldodecanol	1 g
E. Mittelkettige Triglyceride	1 g
F. Glycerol 85%	1,6 g
G. Gereinigtes Wasser	32 g
H. Natriumsorbat	0,08 g

Tab.3: Zusammensetzung des Hydrogels: 40 g

I. Methylhydroxypropylcellulose	1,2 g
J. Glycerin	2,8 g
K. Gereinigtes Wasser	36 g
L. Parfümöl	8-16 Tropfen

Tab.4: Zusammensetzung der Pepton-Pufferlösung: 500 ml

M. Trypton-Wasser	7,5 g
N. Dinatriumhydrogenphosphat	1,75 g
O. Kaliumdihydrogenphosphat	0,75 g
P. Aqua dest.	500ml

Tab.5: Zusammensetzung der Casein-Soja-Pepton-Agar:

Q. Caseinpepton	17 g
R. Sojapepton	3 g
S. Natriumchlorid	5 g
T. Kaliummono- hydrogenphosphat	2,5 g
U. Glucose-Monohydrat/ wasserfreie Glucose	2,5 / 2,3 g
V. Wasser R	1000ml

3.3 Geräte

- Wasserbad
- Mikrowelle
- Laborwaagen
- Heizrührer
- Autoklav
- Brutschrank
- Laborschüttler
- Laminar flow-Bank

3.4 Herstellung von Cremes und Gelen

3.4.1 Herstellungsgruppen

Die Proben wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Die Creme-Gruppe A ist die Gruppe, in welche kein Konservierungsstoff zugesetzt wurde. Im Gegensatz dazu wurde in die Creme-Gruppe B Konservierungsstoff zugesetzt. Es wurde in der Creme Natriumsorbit als Konservierungsmittel verwendet. Die Creme A bzw. Creme B wurden jeweils weiter in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Materialien zur Herstellung von Creme 1.1, 1.2, 1.3, 3.1, 3.2 und 3.3 wurden mit kochendem Wasser sterilisiert. Die Creme 2 und 4 wurden mit nicht sterilisierten Materialien hergestellt. 16 verschiedene Proben wurden in dieser Arbeit hergestellt. 1 Gramm von jeder Probe wurde mit Pufferlösung 3 mal verdünnt. (3 Verdünnungsstufen) Die drei verdünnte Proben wurden jeweils doppelt auf dem Agar ausgestrichen. In der Arbeit wurden insgesamt 96 Agarplatten verbraucht.

Cremes		Hydrogele	
Creme A. Ohne Konservierungsstoffe	Creme B. Mit Konservierungsstoffe	Hydrogel A. ohne Konservierungsstoffe	Hydrogel b. Mit Konservierungsstoffe
Creme 1.1: Materialien mit 100°C Wasser sterilisieren	Creme 3.1: Materialien mit 100°C Wasser sterilisieren	Hydrogel 1.1: Materialien mit 100°C Wasser sterilisieren	Hydrogel 3.1: Materialien mit 100°C Wasser sterilisieren
Creme 1.2: nicht gewaschener Finger angerührten Creme 1.1	Creme 3.2: nicht gewaschener Finger angerührten Creme 1.1	Hydrogel 1.2: nicht gewaschener Finger angerührten Hydrogel 1.1	Hydrogel 3.2: nicht gewaschener Finger angerührten Hydrogel 1.1
Creme 1.3: gewaschener Finger angerührten Creme 1.1	Creme 3.3: gewaschener Finger angerührten Creme 1.1	Hydrogel 1.3: gewaschener Finger angerührten Hydrogel 1.1	Hydrogel 3.3: gewaschener Finger angerührten Hydrogel 1.1
Creme 2: normale Materialien	Creme 4: normale Materialien	Hydrogel 2: normale Materialien	Hydrogel 4: normale Materialien

Tab.6: 16 Probengruppe

3.4.2 Herstellung der Creme A

Creme A ist eine konservierungsstofffreie Tagescreme, einschließlich Creme 1.1, Creme 1.2, Creme 1.3 und Creme 2.

Creme 1.1: 39,2 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit 100°C kochendem Wasser sterilisieren
- F und G in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale zusetzen und im Wasserbad auf ca.70°C erwärmen
- A bis E auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Lösung FG in Schmelze A-E zugeben und mit Pistill kalt rühren

Creme 1.2: 5,18 g

- 5 g von Creme 1.1 in eine Salbenkruke übertragen
- die Creme mit nicht gewaschenem Finger anrühren

Creme 1.3: 5,04 g

- 5 g von Creme 1.1 in eine Salbenkruke übertragen
- die Creme mit gewaschenem Finger anrühren

Creme 2: 13 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit Leistungswasser abwaschen
- F und G in einer mit Pistill und tarierten großen zusetzen und auf Wasserbad auf ca.70°C erwärmen
- A bis E auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Lösung FG in Schmelze A-E zugeben und mit Pistill bis kalt rühren

3.4.3 Herstellung der Creme B

Creme B ist eine konservierungsstoffhaltige Tagescreme, einschließlich Creme 3.1, Creme 3.2, Creme 3.3 und Creme 4.

Creme3.1: 40 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit 100°C kochendem Wasser sterilisieren
- 0,08 g H in G in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale lösen, F hinzuwiegen
- Lösung FGH auf ca.70°C erwärmen
- A bis E auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Lösung FGH in Schmelze A-E zugeben und mit Pistill kalt rühren

Creme3.2: 5,01 g

- 5 g von Creme 3.1 in eine Salbenkruke übertragen
- die Creme mit nicht gewaschenem Finger anrühren

Creme3.3: 5 g

- 5 g von Creme 3.1 in eine Salbenkruke übertragen
- die Creme mit gewaschenem Finger anrühren

Creme 4: 20 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit Leistungswasser abwaschen
- 0,04 g H in G in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale lösen, F hinzuwiegen
- Lösung FGH auf ca.70°C erwärmen

- A bis E auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Lösung FGH in Schmelze A-E zugeben und mit Pistill kalt rühren

3.4.4 Herstellung des Gels A

Gel A ist ein konservierungsstofffreies Hydrogel, einschließlich Gel 1.1, Gel 1.2, Gel 1.3 und Gel 2.

Hydrogel 1.1: 38,6 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit 100°C kochendem Wasser sterilisieren
- I und J in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale zusetzen und auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Gekochtes K in Schmelze IJ zugeben und mit Pistill kalt rühren

Hydrogel 1.2: 5,03 g

- 5 g von Hydrogel 1.1 in eine Salbenkruke übertragen
- das Hydrogel mit nicht gewaschenem Finger anrühren

Hydrogel 1.3: 5,04 g

- 5 g von Hydrogel 1.1 in eine Salbenkruke übertragen
- das Hydrogel mit gewaschenem Finger anrühren

Hydrogel 2: 16,42 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit Leistungswasser abwaschen
- I und J in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale zusetzen und auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen

- Gekochtes K in Schmelze IJ zugeben und mit Pistill kalt rühren

3.4.5 Herstellung des Gels B

Gel B ist ein konservierungsstoffhaltiges Hydrogel, einschließlich Gel 3.1, Gel 3.2, Gel 3.3 und Gel 4.

Hydrogel 3.1: 34,3 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit 100°C kochendem Wasser sterilisieren
- I und J in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale zusetzen und auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Gekochtes K in Schmelze IJ zugeben und mit Pistill kalt rühren
- 14 Tropfen L dazugeben und rühren

Hydrogel 3.2: 5,04 g

- 5 g von Hydrogel 3.1 in eine Salbenkruke übertragen
- das Hydrogel mit nicht gewaschenem Finger anrühren

Hydrogel 3.3: 5,05 g

- 5 g von Hydrogel 3.1 in eine Salbenkruke übertragen
- das Hydrogel mit gewaschenem Finger anrühren

Hydrogel 4: 18,06 g

- Pistill, Fantaschale, Becherglas, Glasstab mit Leistungswasser abwaschen
- I und J in einer mit Pistill und tarierten großen Fantaschale zusetzen und auf dem Wasserbad bei etwa 70°C schmelzen
- Gekochtes K in Schmelze IJ zugeben und mit Pistill kalt rühren

- das Hydrogel mit nicht gewaschenem Finger anrühren
- 7 Tropfen L dazugeben und rühren

Die 16 hergestellte Proben wurden in den Salbenkruken mit Schraubdeckel gefüllt und beschriftet.



Abb.5 : hergestellte Proben

3.5 Analysenmethoden

In dieser Arbeit wurde das Ausstrichverfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in den Cremes und Gelen gewählt.

3.5.1 Herstellung von Agarplatten

- Q-U in V geben und unter Erwärmen auf dem Heizrührer gut lösen
- die Q-V Lösung auf Raumtemperatur abkühlen
- PH-Wert von 7,1 bis 7,5 mit Natriumhydroxid-Lösung herstellen
- die hergestellte Lösung im Autoklav 4 Stunden sterilisieren
- die noch heiße Agar-Lösung in Petrischalen gießen (ca. 0,5 m dick) und Deckel darauf legen
- die Agarplatten in einer Laminarflow-Bank trocknen lassen

Die Schritte 5,6 wurden in einer Laminarflow-Bank durchgeführt.



Abb.6 : die vorbereitete Agarplatten



Abb.7 : Laminarflow-Bank

3.5.2 Herstellung von Pufferlösung

- M, N, O in 500 ml P Lösen, gut mischen und auf Gefäße verteilen.
- Die Lösung 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren



Abb. 8: hergestellte Pufferlösung

3.5.3 Herstellung von Verdünnungsreihe der Proben

Weil die Tagescreme und Hydrogele wasserlöslich sind, wurde die Herstellung der Verdünnungsreihen wie nachfolgend durchgeführt.

1. Verdünnungsstufe----1:10

- 1 g von jeder Probe mittels sterilisiertem Löffel in ein steriles Röhrchen übertragen
- 9ml sterilisierte Pepton-Pufferlösung mittels Eppendorf-Pipette dazugeben

- die hergestellte 0,1 g/ml Probe-Lösung mit Laborschüttler homogenisieren

2. Verdünnungsstufe----1:100

- 1 ml von 0,1g/ml Probe-Lösung (aus 1. Verdünnungsstufe) mittels Eppendorf-Pipette in ein sterilisiertes Glasröhrchen übertragen
- 9ml sterilisierte Pepton-Pufferlösung mittels Eppendorf-Pipette dazugeben
- die hergestellte 0,01 g/ml Probe-Lösung mit Laborschüttler homogenisieren

3. Verdünnungsstufe----1:1000

- 1 ml von 0,01g/ml Probe-Lösung (aus 2. Verdünnungsstufe) mittels Eppendorf-Pipette in ein sterilisiertes Glasröhrchen übertragen
- 9ml sterilisierte Pepton-Pufferlösung mittels Eppendorf-Pipette dazugeben
- die hergestellte 0,001 g/ml Probe-Lösung mit Laborschüttler homogenisieren

Um die Verdünnungsreihe zu vereinfachen, wurde die Pufferlösung vor dem Autoklavieren in mehreren Glasröhrchen verteilt. In jedes Röhrchen wurden 9 ml Pufferlösung verteilt. Die Glasröhrchen wurden komplett mit Deckel ummantelt und im Autoklav sterilisiert.

Alle 96 Röhrchen wurden anschließend deutlich beschriftet.



Abb. 9: die Emulsion der Tagescreme

Weil die Tagescreme und Pufferlösung eine Emulsion bildeten, musste man vor jedes Pipettieren die Emulsion gut schütteln.



Abb. 10: die Gellösung – verdünntes Hydrogel



Abb.11 : vorbereitete sterilisierte Pufferlösung

3.5.4 Pipettieren der Proben auf die Agarplatten

- den Drigalskispatel in Alkohol tauchen und kurz in die entleuchtete Flamme des Feuerzeug halten, bis der Alkohol abflammt.
- Jeweils 0,1 ml von aller 96 Proben mittels Eppendorf-Pipette auf die Agarplatten übertragen und mit sterilisiertem Drigalskispatel ausstreichen

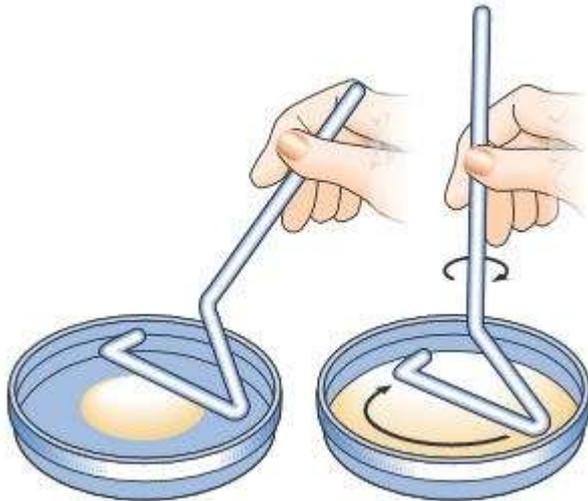


Abb.12 : Ausstreichen der Probe auf den Agarplatten

3.5.5 Inkubieren der Agarplatten

Die Agarplatten wurden bis zu 3 Tage bei 37°C umgedreht (Agarseite nach oben) im Brutschrank inkubiert.

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Auszählen auf Agarplatte

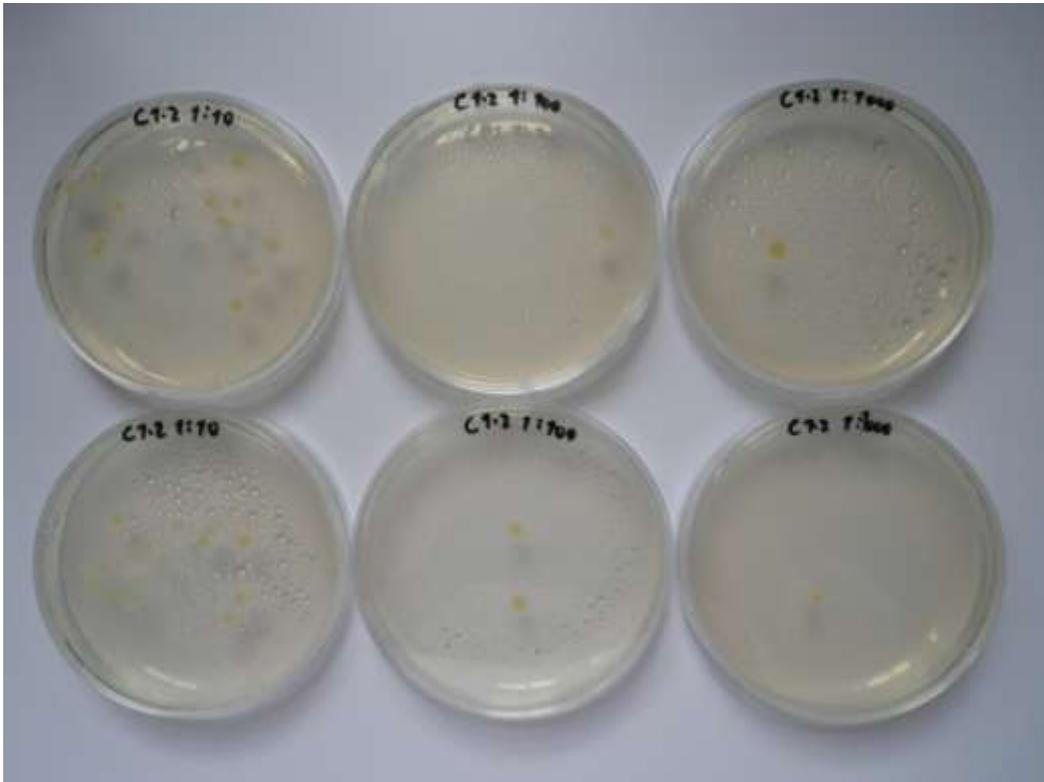


Abb. 13: gewachsene Kolonien in der Creme 1.2

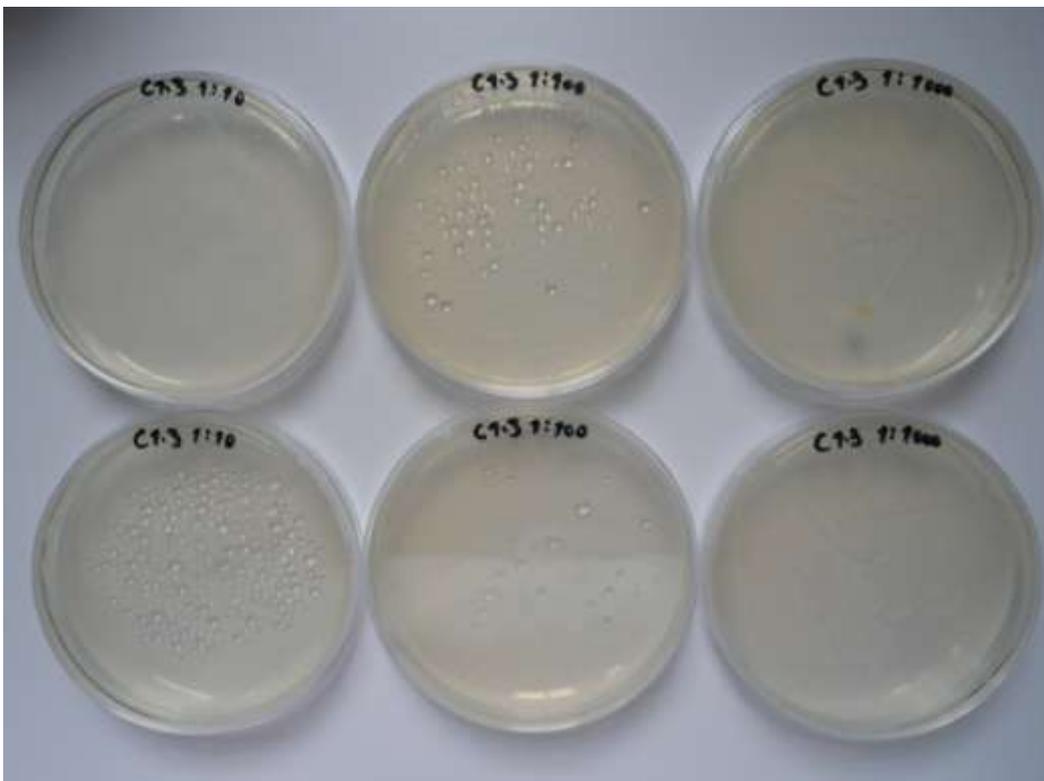


Abb.14 : gewachsene Kolonien in der Creme 1.3

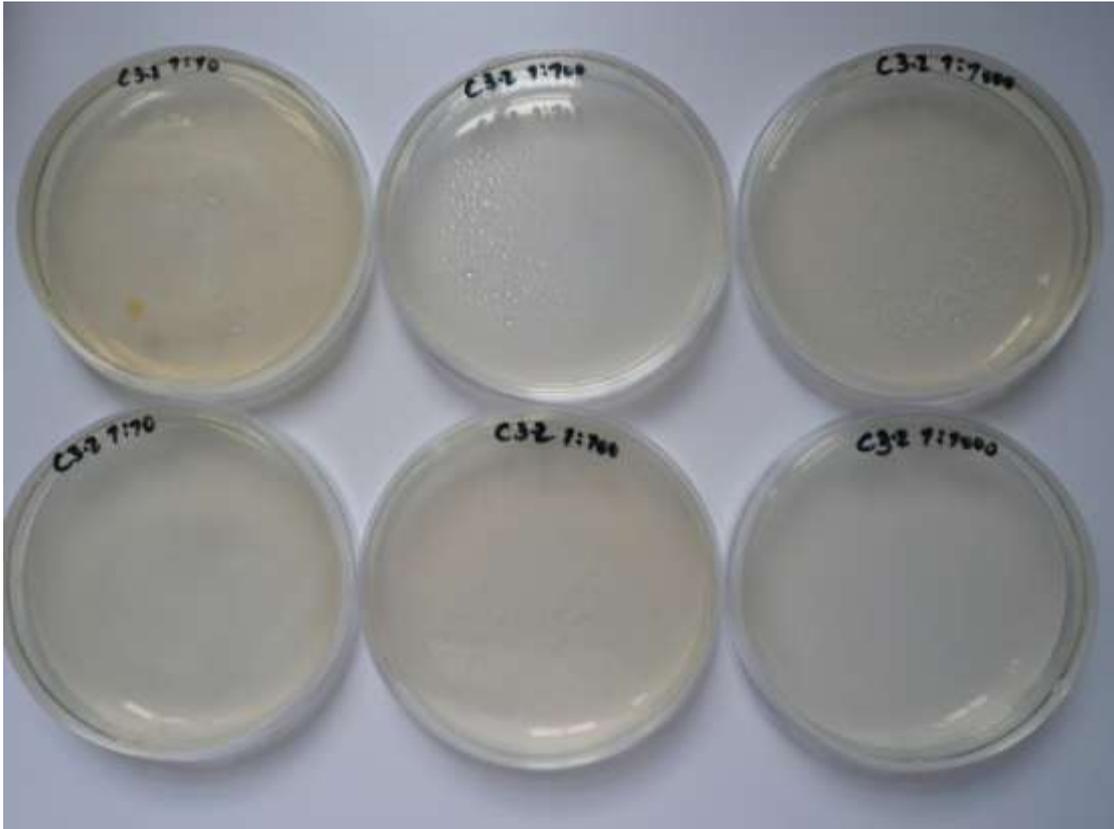


Abb.15 : gewachsene Kolonien in der Creme 3.2

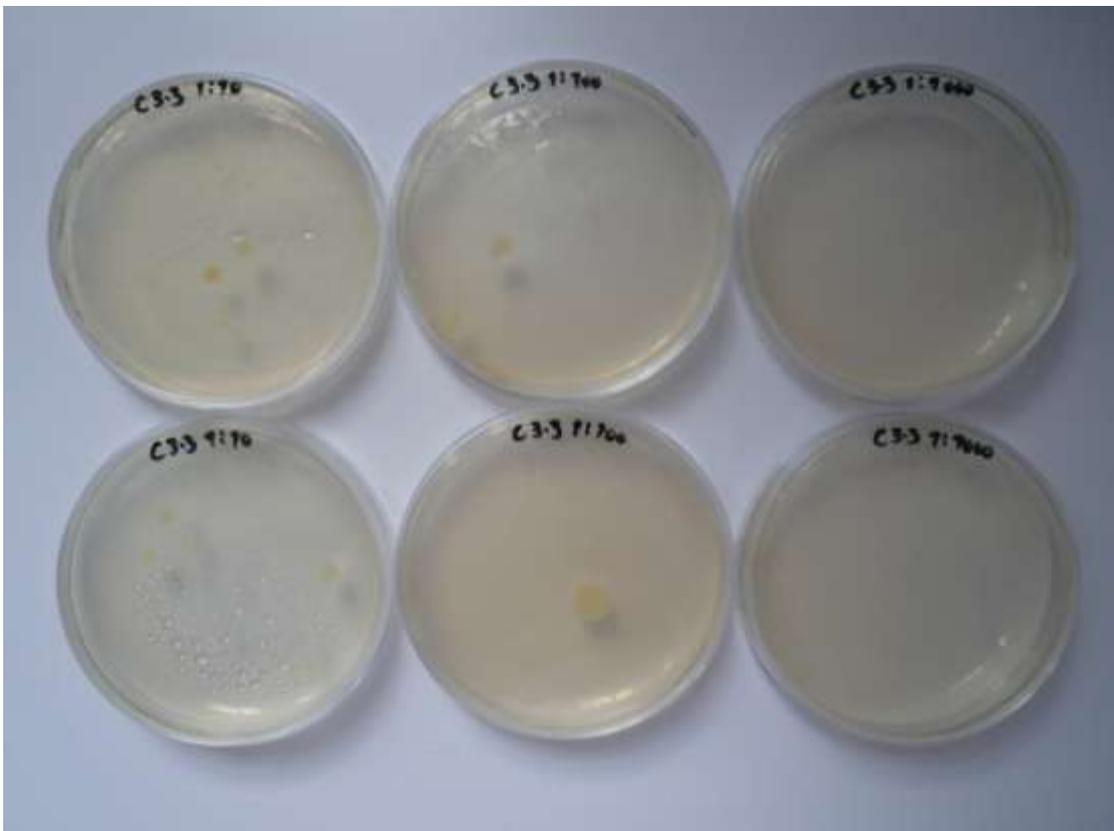


Abb. 16: gewachsene Kolonien in der Creme 3.3

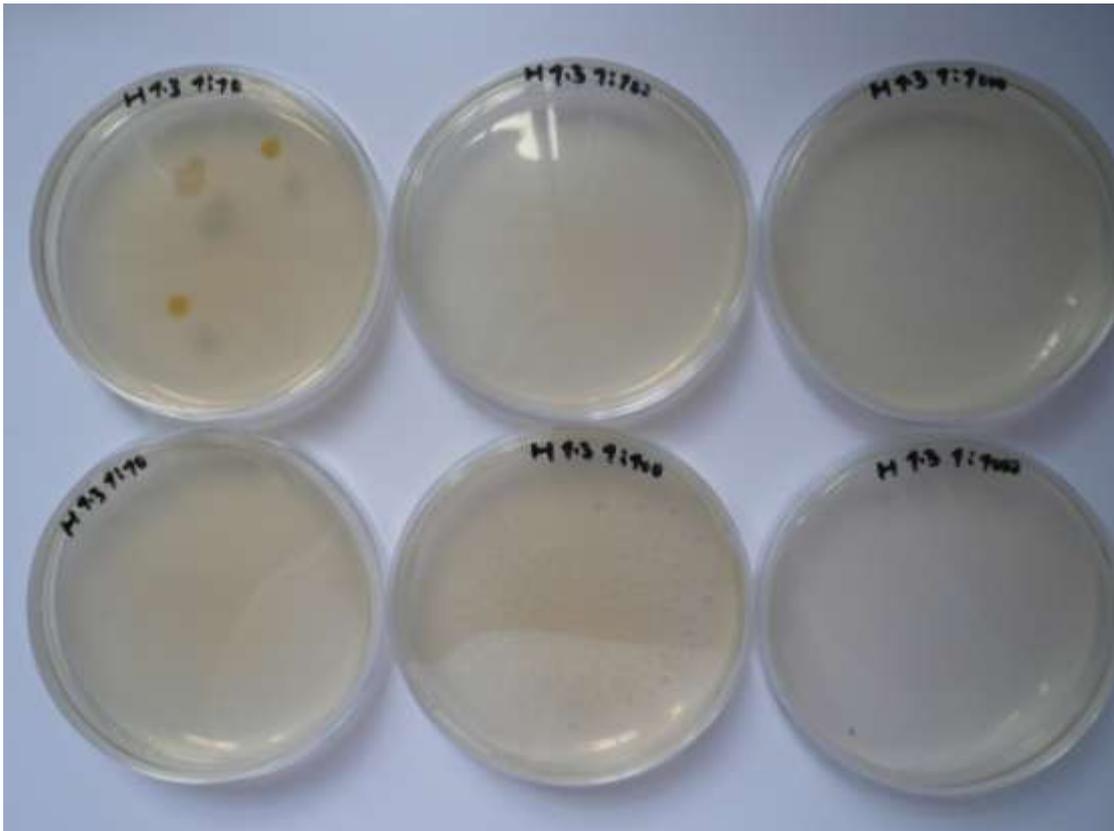
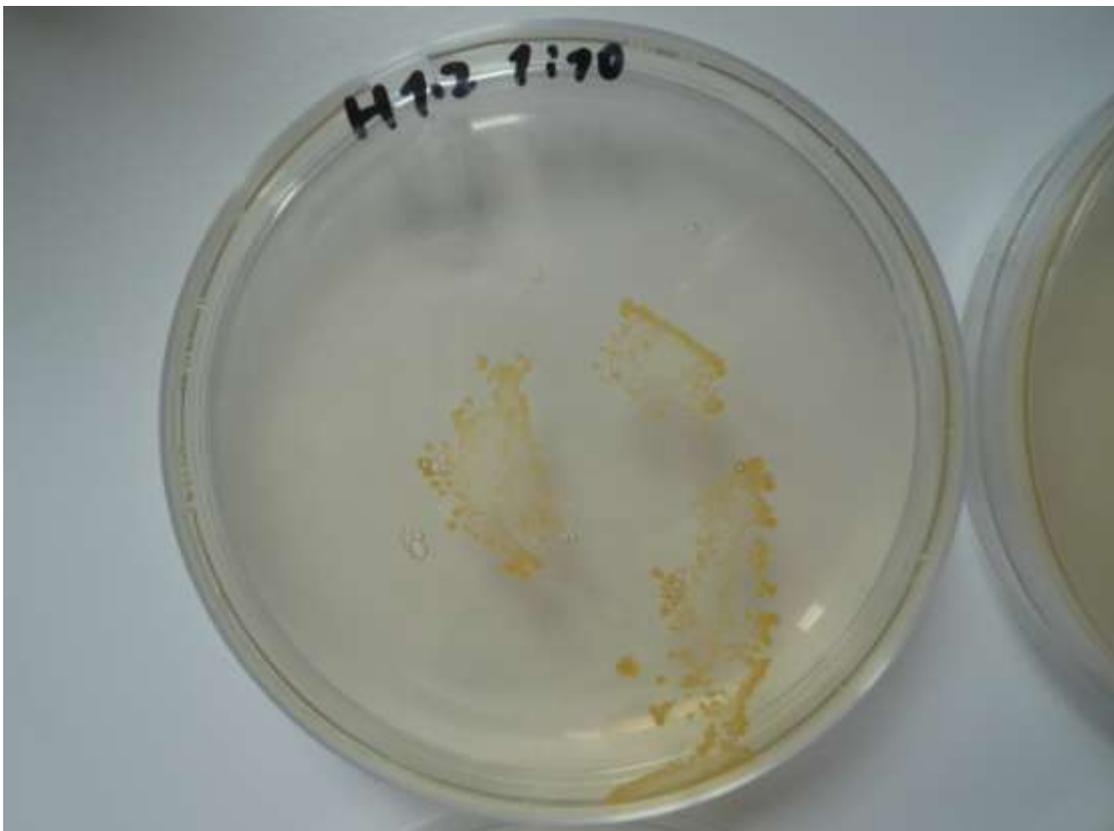


Abb.17 : gewachsene Kolonien im Hydrogel 1.3



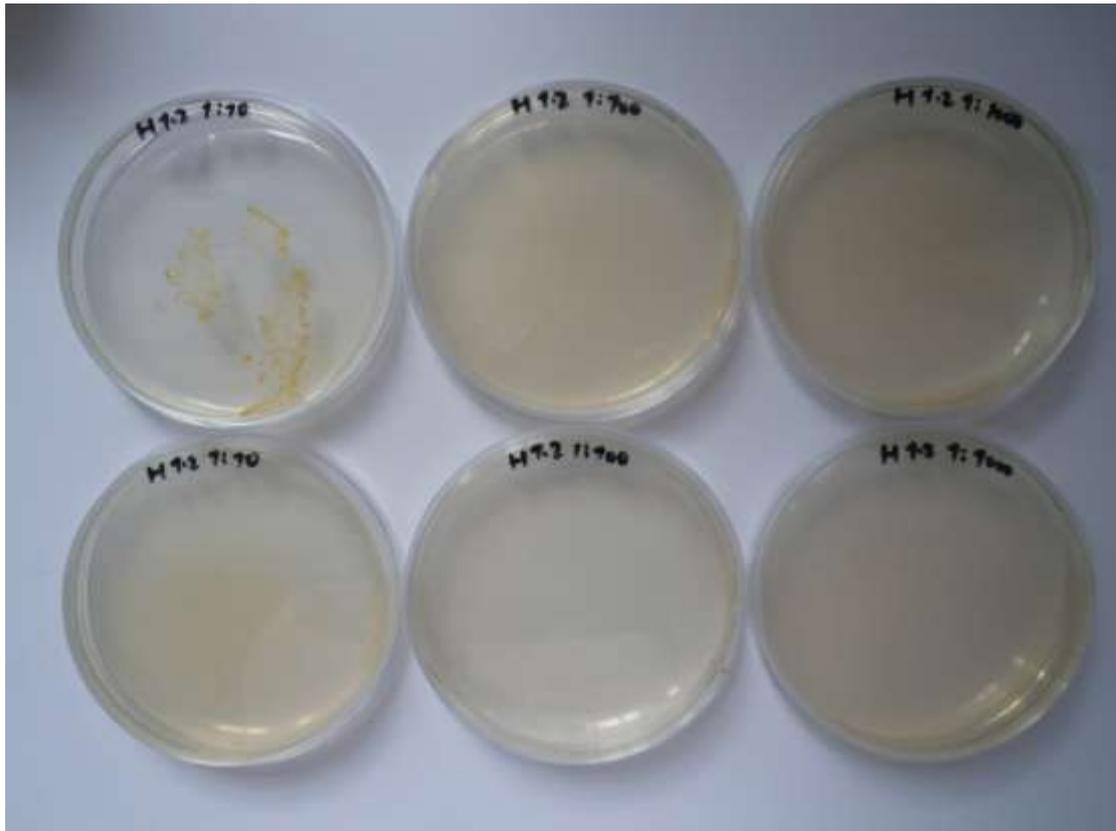


Abb.17,18 : negative kontaminierte Agarplatte H1.2 1:10.

Es gab nur auf einer der zwei Platten H1.2 1:10 unzählbare Kolonien. Könnte es sein, dass die Platte kontaminiert war. Die Koloniezahl darauf wurde nicht berücksichtigt.

	1:10 (0,1g/ml)	1:100 (0,01g/ml)	1:1000(0,001g/ml)
C 1.1	—	—	—
	—	—	—
C 1.2	18	1	1
	20	2	1
C 1.3	—	—	1
	—	—	—
C 2	—	—	—
	—	—	—
C 3.1	—	—	—

	—	—	—
C3.2	1	—	—
	—	—	—
C 3.3	4	5	—
	8	1	—
C 4	—	—	—
	—	—	—
H 1.1	—	—	—
	—	—	—
H 1.2	zu viel, kontaminiert	—	—
	—	—	—
H 1.3	4	—	—
	—	—	—
H 2	—	—	—
	—	—	—
H 3.1	—	—	—
	—	—	—
H 3.2	—	—	—
	—	—	—
H 3.3	—	zu viel, kontaminiert	—
	—	—	—
H 4	—	—	—
	—	—	—

Tab.7: Koloniezahl auf alle Agarplatten

4.2 Keimgehalte

	1:10 (0,1g/ml)	1:100 (0,01g/ml)	1:1000(0,001g/ml)
C 1.2	19	1,5	1
C 1.3	—	—	0,5
C 3.2	0,5	—	—
C 3.3	6	3	—
H 1.3	2	—	—

Tab.8: mittlere Koloniezahl auf die Agarplatten

Auswertung:

Wie in Abschnitt 2.7 beschrieben :

C1.2:

$$1:10 (0,1g/ml) : 19 \cdot 10 \cdot 10 = 1900 \approx 1,9 \cdot 10^3 \text{ KBE/g}$$

$$1:100 (0,01g/ml) : 1,5 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 = 1500 \approx 1,5 \cdot 10^3 \text{ KBE/g} \quad (1,5 < 10)$$

$$1:1000(0,001g/ml): 1 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 = 10000 \approx 1 \cdot 10^4 \text{ KBE/g} \quad (1 < 10)$$

Nur die Platte C1.2 hatte eine Kolonienanzahl zwischen 10 und 300. Die Keimzahl in der Creme 1.2 beträgt $1,9 \cdot 10^3$ KBE/g.

Die Kolonienanzahl der nachfolgenden Proben ist geringer als 10.

C1.3:

$$1:1000(0,001g/ml): 0,5 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 = 5000 \approx 5 \cdot 10^3 \text{ KBE/g} \quad (0,5 < 10)$$

C3.2:

$$1:10 (0,1g/ml) : 0,5 \cdot 10 \cdot 10 = 50 \approx 5 \cdot 10 \text{ KBE/g} \quad (0,5 < 10)$$

C3.3:

$$1:10 (0,1\text{g/ml}) : 6 \cdot 10 \cdot 10 = 600 \approx 6 \cdot 10^2 \text{ KBE/g} \quad (6 < 10)$$

$$1:100 (0,01\text{g/ml}) : 3 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 = 3000 \approx 3 \cdot 10^3 \text{ KBE/g} \quad (3 < 10)$$

H1.3:

$$1:10 (0,1\text{g/ml}) : 2 \cdot 10 \cdot 10 = 200 \approx 2 \cdot 10^2 \text{ KBE/g} \quad (2 < 10)$$

Cremes		Hydrogele	
Creme A. Ohne Konservierungsstoffe	Creme B. Mit Konservierungsstoffe	Hydrogel A. ohne Konservierungsstoffe	Hydrogel B. Mit Konservierungsstoffe
Creme 1.1: 0	Creme 3.1: 0	Hydrogel 1.1: 0	Hydrogel 3.1: 0
Creme 1.2: $1,9 \cdot 10^3 \text{ KBE/g}$	Creme 3.2: $5 \cdot 10 \text{ KBE/g}$	Hydrogel 1.2: kontaminiert	Hydrogel 3.2: 0
Creme 1.3: $5 \cdot 10^3 \text{ KBE/g}$	Creme 3.3: $6 \cdot 10^2 \text{ KBE/g}$	Hydrogel 1.3: $2 \cdot 10^2 \text{ KBE/g}$	Hydrogel 3.3: kontaminiert
Creme 2: 0	Creme 4: 0	Hydrogel 2: 0	Hydrogel 4: 0

Tab.8: Gesamtkeimzahl in allen 16 Proben

5 Diskussion

Es ist wünschenswert, dass die Keimgehalte in den Kosmetik- und Pflegeprodukten innerhalb 10^3 KBE/g oder KBE/ml während der Nutzung durch Verbraucher liegen. Solche Produkte sollten auch frei von potentiell pathogenen Organismen sein. Dieses Qualitätsniveau wird während der Verwendung der Produkte erwartet, trotz der unvermeidlichen Verunreinigungen durch den Verbrauchern. Die Konservierungsstoffe werden in der Kosmetik eingesetzt, um die längere Nutzung der Produkte zu erreichen. [12]

Als Konservierungsstoff wurde in dieser Arbeit Natriumsorbat in den Cremes eingesetzt. Wie die Tab.8 zeigt, sind die Keimgehalte in den Cremes 1.2 und 1.3 höher als 10^3 KBE/g und die in den Cremes 3.2 und 3.2 niedriger als 10^3 KBE/g. Die Wirksamkeit von Natriumsorbat wurde nachgewiesen. Die Cremes 1.2 und 3.2 wurden mit nicht gewaschenen Fingern angerührt. Nach dem Händewaschen wurden die Keimgehalte in den Cremes 1.3 und 3.3 unerwartet höher. Es kann sein, dass die Bakterien der Handtücher auf die Hände übertragen wurden. Deswegen ist es wichtig, dass man Handtücher regelmäßig gründlich wäscht. Die Anzahl an Bakterien in den konservierungsstofffreien Cremes 1,2 und 1,3 erhöht sich im Laufe der Zeit viel schneller und drastischer als bei den Cremes die Konservierungsstoffe enthalten. Jeweils eine Agarplatte der Hydrogele 1.2 und 3.3 wurden kontaminiert und sollten nicht berücksichtigt werden. Die Keimzahl dieser Platten wurde als 0 gezählt. Wie bei den Cremes waren die Keimgehalte der Hydrogele nach dem Händewaschen höher (verschmutztes Handtuch). In den Hydrogelen wurde Parfümöl als Konservierungsmittel eingesetzt. Es wurde in der Arbeit gezeigt, dass Parfümöl eine konservierende Wirkung besitzt. Es gab mehr Bakterien in den Cremes als in den Hydrogelen. Es kann sein, dass die

Cremes aus mehr Komponenten bestehen und die Herstellung der Cremes in einem Mehrschritt-Prozeß durchgeführt wurde, der die Kontaminationsrate erhöht .

Keine Bakterien wurden in der Creme 2, Hydrogel 4, Hydrogel 2, Creme 4, Creme 1.1, Creme 3.1, Hydrogel 1.1 und Hydrogel 3.1 gefunden. Es zeigt sich, dass die Herstellungsumgebung im Labor sauber ist. Es gibt nicht viele Bakterien auf den Materialien im Labor. Sterilisation der Materialien hatte keine Auswirkungen auf die Anzahl KBE.

6 Zusammenfassung

Die kontaminierte Kosmetik könnte im Extremfall zu einer ernsten Erkrankung führen. Das Niveau der mikrobiologischen Kontamination in nicht sterilen kosmetischen Produkten darf nicht von dem mikrobiellen begrenzten Standard abweichen. Bevor die Produkte vermarktet werden, wird das mikrobielle Wachstum durch die Zugabe eines geeigneten Konservierungsmittels in den Produkten gehemmt. [1]

Obwohl die Verunreinigungen durch den Benutzer unvermeidlich sind, sollten einige Faustregeln für den richtigen Umgang mit Kosmetik beachtet werden. Bevor man die Kosmetika benutzt, sollte man die Hände gründlich waschen. Die Handtücher, Pinsel und Schwämmchen etc sollten regelmäßig gereinigt werden. Die Kosmetika sollten vor starken Temperaturschwankungen und Sonnenlicht geschützt werden. Besonders Naturkosmetik ohne Konservierungsmittel sollte innerhalb weniger Monate aufgebraucht werden. Kosmetika mit feuchter Konsistenz ermöglichen ein besonders schnelles Wachstum der Bakterien.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1 : Membranfiltration

Abb.2 : MPN-Methode

Abb.3 : Beispiel für eine Verdünnungsreihe [5]

Abb.4 : Kolonien auf die Agarplatten

Abb.5 : hergestellte Proben

Abb 6 : die vorbereitete Agarplatten

Abb.7 : Laminarflow-Bank

Abb.8 : hergestellte Pufferlösung

Abb.9 : die Emulsion der Tagescreme

Abb.10 : die Gellösung – verdünntes Hydrogel

Abb.11 : vorbereitete sterilisierte Pufferlösun

Abb.12 : Ausstreichen der Probe auf die Agarplatten

Abb.13 : gewachsene Kolonien in der Creme 1.2

Abb.14 : gewachsene Kolonien in der Creme 1.3

Abb.15 : gewachsene Kolonien in der Creme 3.2

Abb.16 : gewachsene Kolonien in der Creme 3.3

Abb.17 : gewachsene Kolonien im Hydrogel 1.3

Abb.18 : negative kontaminierte Agarplatte H1.2 1:10.

Abb.19 : negative kontaminierte Agarplatte H1.2 1:10

8 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zubereitung und Verwendung von Testmikroorganismen

Tab.2: Zusammensetzung der Tagescreme: 40 g

Tab.3: Zusammensetzung des Hydrogels: 40 g

Tab.4: Zusammensetzung der Pepton-Pufferlösung: 500 ml

Tab.5: Zusammensetzung der Casein-Soja-Pepton-Agar:

Tab.6: 16 Probengruppe

Tab.7: Koloniezahl auf alle Agarplatten

Tab.8: mittlere Koloniezahl auf die Agarplatten

Tab.9: Gesamtkeimzahl in aller 16 Proben

9 Literaturverzeichnis

[1] R. Campana, C. Scesa, V. Patrone, et al. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. Journal compilation @ 2006 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 2006; 43: 301-306.

[2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Keimzahl>.Stand: 28. März 2014

[3]Europäisches Arzneibuch. 6. Ausgabe. Eschborn: Deutscher Apothekerverlag-Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, 2008.

[4]http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.hach-lange.at%2Fview%2FHIPDFDownloadController%3Bjsessionid%3DB088105DC96421BD81E53EB0E1BC1715.worker2%3FmediaCode%3D79198&ei=84z8U4WtC5H54QSB2IGACA&usg=AFQjCNFS2XJ1GHITByOKPJgzo__S7ldUsw&sig2=2baIV EEiIQ8DsLllo_FSxw

[5] Dzevrije Sabani Serani. Experimentelle Prüfung verschiedener Methoden der quantitativen Bestimmung gesamtcoliformer und fäkalcoliformer Bakterien (E. coli) für die qualitative Bewertung von Wasserproben. 21.02.2006
<http://www.hamburg.de/contentblob/110214/data/diplomarbeit-2006.pdf>.Stand: 21.02.2006

[6] <http://de.wikipedia.org/wiki/Verd%C3%BCnnungsreihe>.Stand: 13. Juli 2014

[7] <http://www.zum.de/Faecher/Bio/BW/bio/Repetito/Bbgenet.html>.

[8] Dr. NAGL. Bestimmung von keimgruppen(GKZ).
<http://nagl.netzreport.com/dokumente/mila4/07gkz.pdf>.

[9] Dr. NAGL.Kultivierung von Mikroorganismen.
<http://nagl.netzreport.com/dokumente/mila4/06kultivierung.pdf>

[10] <https://www.umwelt-online.de/recht/lebensmt/lebensmb.ges/kosm1.htm>.
Stand:01.08.2014.

[11] http://www.chemie-vorschrift.de/d_kosmv.html.Stand:25.01.2005

[12] I.N. Okeke¹ and A. Lamikanra. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. Journal of Applied Microbiology 2001; 91: 922+928.

10 Abkürzungsverzeichnis

USP.....	Pharmacopeial Convention
Ph.Eur.....	Europäisches Arzneibuch
MPN.....	Most probable number
KBE.....	Koloniebildende Einheit
TYMC.....	total combined yeasts/moulds count
Aqua dest.....	Destiliertes Wasser
Bsp.	Beispiele
etc.....	und so weiter

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift