

MICROORGANISMOS INDICADORES

Milena Gómez

Sales Application Specialist

milena.gomez@merckgroup.com

MERCK

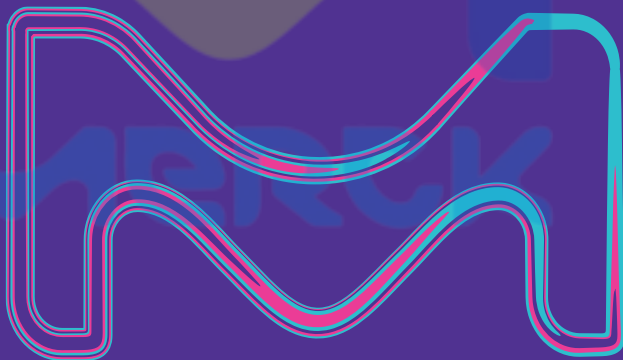


Tabla de contenido

1

Generalidades

2

Metodología Tradicional

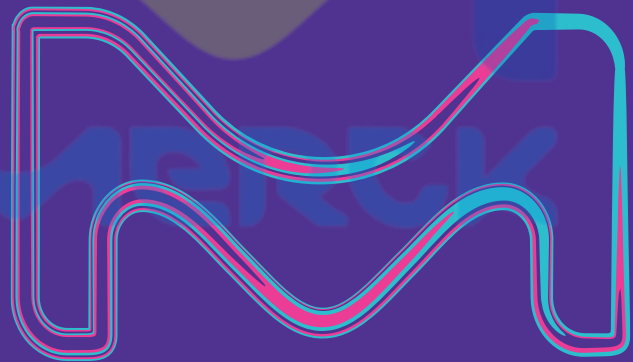
3

Mc Media PAD

4

Simplite

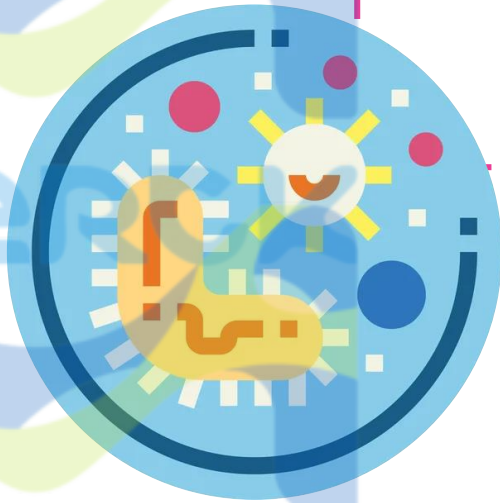
Generalidades



MERCK

¿QUÉ ES UN MICROORGANISMO INDICADOR?

Son organismos cuya presencia en los alimentos permite evaluar el proceso de fabricación y la calidad del alimento o determinar la vida útil del mismo.



Microorganismos Indicadores



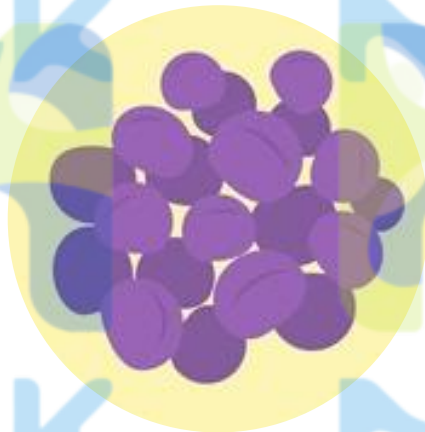
Mohos y Levaduras



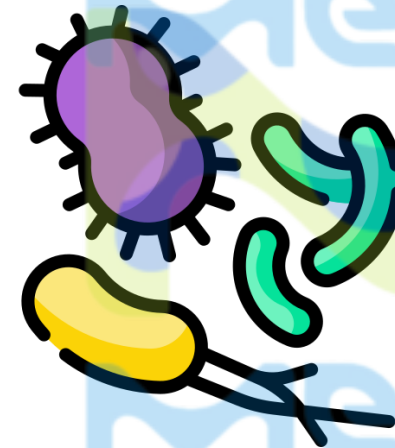
Mesofilos Aerobios



Bacillus cereus

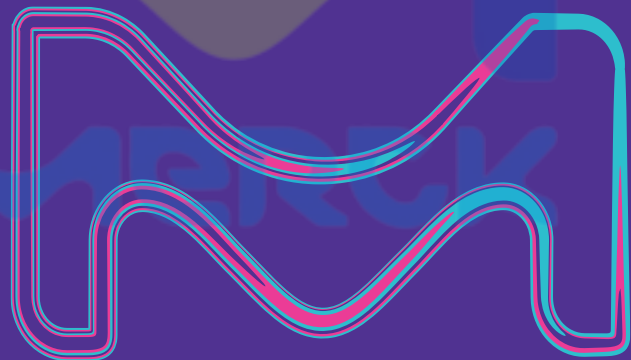


Staphylococcus aureus



Coliformes Totales y *E. coli*

Metodología Tradicional



MERCK

ISO 4833:2013

Recuento de Mesófilos aerobios

Pesaje de la muestra



Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

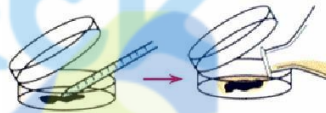


Dilución inicial



Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 90 ml de **Agua peptonada (1072280500)** o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

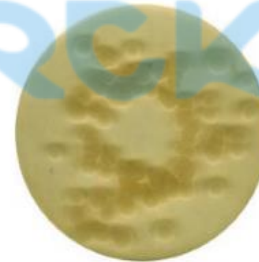
Siembra



Sembrar en profundidad (1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en dos cajas petri estériles y vacías, servir el **Agar plate count (1054630500)** fundido y homogeneizar.

Incubar a 30 °C durante 72 h

Recuento



ISO 21527:2008

Recuento de Mohos y levaduras

Pesaje de la muestra



Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

Dilución inicial

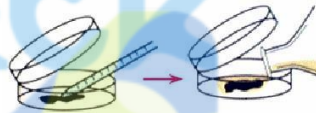


Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

AW > 0,95

AW ≤ 0,95

Siembra



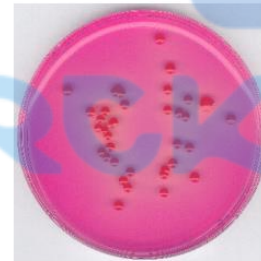
Sembrar en superficie (0,1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en **Agar DRBC** (**1004660500**)

Sembrar en superficie (0,1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en **Agar DG18** (**1004650500**)

Recuento



Saccharomyces cerevisiae
ATCC® 9763



Rhodotorula rubra DSM
70403



Mucor racemosus
ATCC® 42647

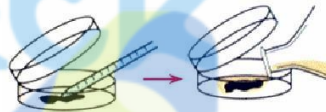


ISO 16649:2018**Recuento de *E. coli*****Pesaje de la muestra**

Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

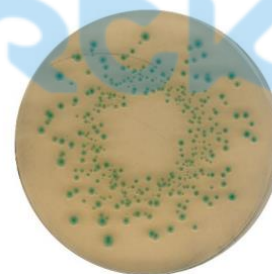
**Dilución inicial**

Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Siembra

Sembrar en profundidad (1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en dos cajas petri estériles y vacías, servir el **Agar TBX (1161220500)** fundido y homogeneizar.

Incubar a 44 °C durante 18-24 h

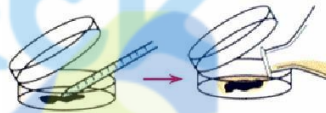
Recuento

ISO 4832:2006**Recuento de coliformes totales****Pesaje de la muestra**

Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

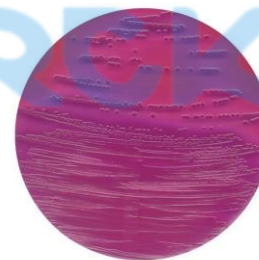
**Dilución inicial**

Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 90 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Siembra

Sembrar en profundidad (1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en dos cajas petri estériles y vacías, servir el **Agar VRBL (1014060500)** fundido y homogeneizar.

Incubar a 30-37 °C durante 24 h

Recuento

ISO 7932:2005 para *Bacillus cereus*

Pesaje de la muestra



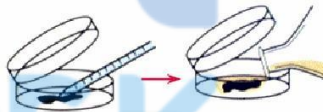
Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

Dilución inicial



Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 90 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Siembra



Sembrar en superficie (0,1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en dos cajas petri de **Agar MYP (1052670500)**.

Incubar a 30-37 °C durante 24 h

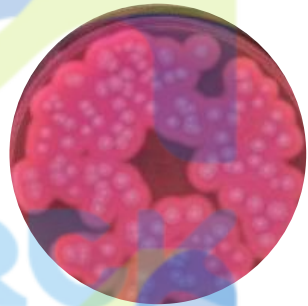
Recuento

Se realiza el recuento en placas que contengan menos de 150 colonias típicas (grandes, de color rosa, con halo de precipitación).

Confirmación

Tomar 5 colonias presuntivas de *Bacillus cereus* y sembrar en **Agar Nutritivo (1114710500)** y Se incuban las placas a 30°C durante 24 h ± 2 h.

Verificar pruebas Bioquímicas.



ISO 6888 – 1/2: 2018 para *Staphylococcus aureus*

Pesaje de la muestra



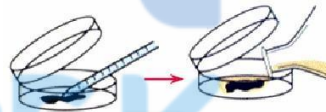
Pesar 10 g o 10 ml de la muestra

Dilución inicial



Preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 90 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Siembra

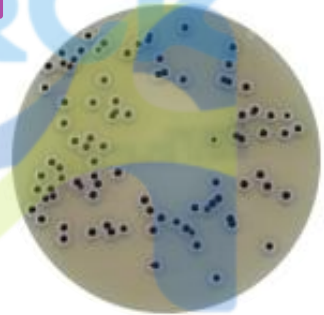


Sembrar en superficie (0,1 ml) dos diluciones seriadas base 10 en dos cajas petri de **Agar Baird Parker (1054060500)**.

Incubar de 34°C a 38°C, durante 24 ± 2 h.

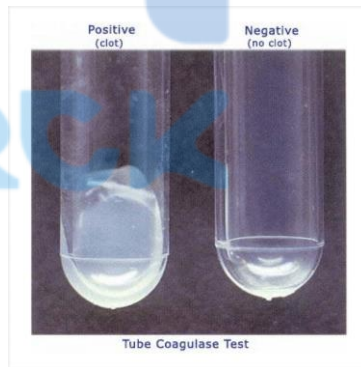
Recuento

Se examinan las placas con colonias características (negras, brillantes, convexas y con halo claro).



Apartir de las colonias típicas se prepara un Inoculo en **Caldo BHI (1104930500)** y se incuba a Incubar de 34°C a 38°C durante 24 ± 2 h.

Confirmación

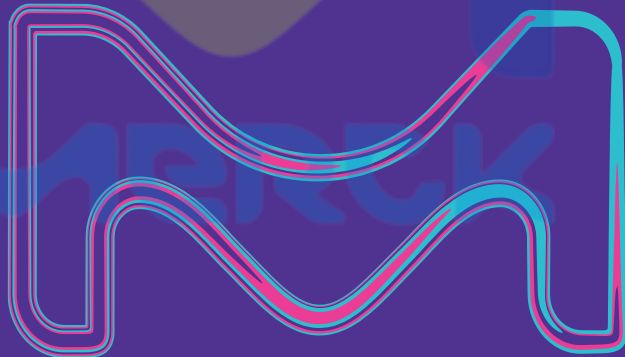


Se añaden 0,1 ml de cada tubo a 0,3 mL de plasma de conejo. Examinar tras 5 ± 1 h. Se considera positivo si se observa un gran coagulo.





MC Media PAD



MERCK

Un método fácil y validado para el recuento de microorganismos indicadores



CERTIFICATE OF COMPLIANCE LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE

hereby declares that the certification assessment has demonstrated that

MC-Media Pad™ ACplus

Manufactured and supplied by:
JNC Corporation
2-2-1 Otemachi
Chiyoda-ku
Tokyo
Japan, 100-8105

Production site:
JNC Corporation
Yokohama Research Center
5-1, Ookawa
Kanazawa-ku
Yokohama
Japan, 236-8605

has been validated and revealed to be at least equivalent to the reference method as demonstrated by the validation study report. The summary of the validation report is available on the MicroVal website: www.microval.org

Reference method: ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique

Scope: A broad range of foods

The validation and certification has been performed in accordance with EN ISO 16140-2: 2016 and the MicroVal Rules and Certification Scheme version 8.

This certificate is valid only in association with the certificate schedule bearing the same number on which the distributor applicable to this approval is listed.

Certificate no.: 2015LR52

First approval date: 29 January 2018
Expiry date: 28 January 2022



CERTIFICATION

AOAC® Performance TestedSM

Certificate No.
070901

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit known as:

MC-Media Pad *E. coli* & Coliform Sheet Medium

manufactured by
JNC Corporation
2-1, Otenachi 2-chome
Chiyoda-ku Tokyo 100-8105
Japan

This method has been evaluated in the AOAC® Performance Tested MethodsSM Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Performance TestedSM certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (June 23, 2017 - December 31, 2017). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.





Deborah McKenzie

Deborah McKenzie, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

June 23, 2017
Date

2275 Research Blvd., Ste. 200, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoacri@aoac.org World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

Validaciones y Certificaciones Respecto a Métodos Normalizados

Nombre	Descripción	Normas internacionales	Código de color	Cantidad
MC-Media Pad Recuento rápido de aerobios	Medios de cultivo para el recuento rápido de microorganismos aerobios	AOAC-PTM Microval CC según ISO 11133		100
MC-Media Pad Coliformes	Medios de cultivo para el recuento de bacterias coliformes	AOAC-PTM CC según ISO 11133		100
MC-Media Pad E. coli y coliformes	Medios de cultivo para el recuento simultáneo de <i>Escherichia coli</i> y bacterias coliformes	AOAC-PTM CC según ISO 11133		100
MC-Media Pad Levaduras y hongos	Medios de cultivo para el recuento de levaduras totales y de hongos	AOAC-PTM Microval CC según ISO 11133		100

Fundamento

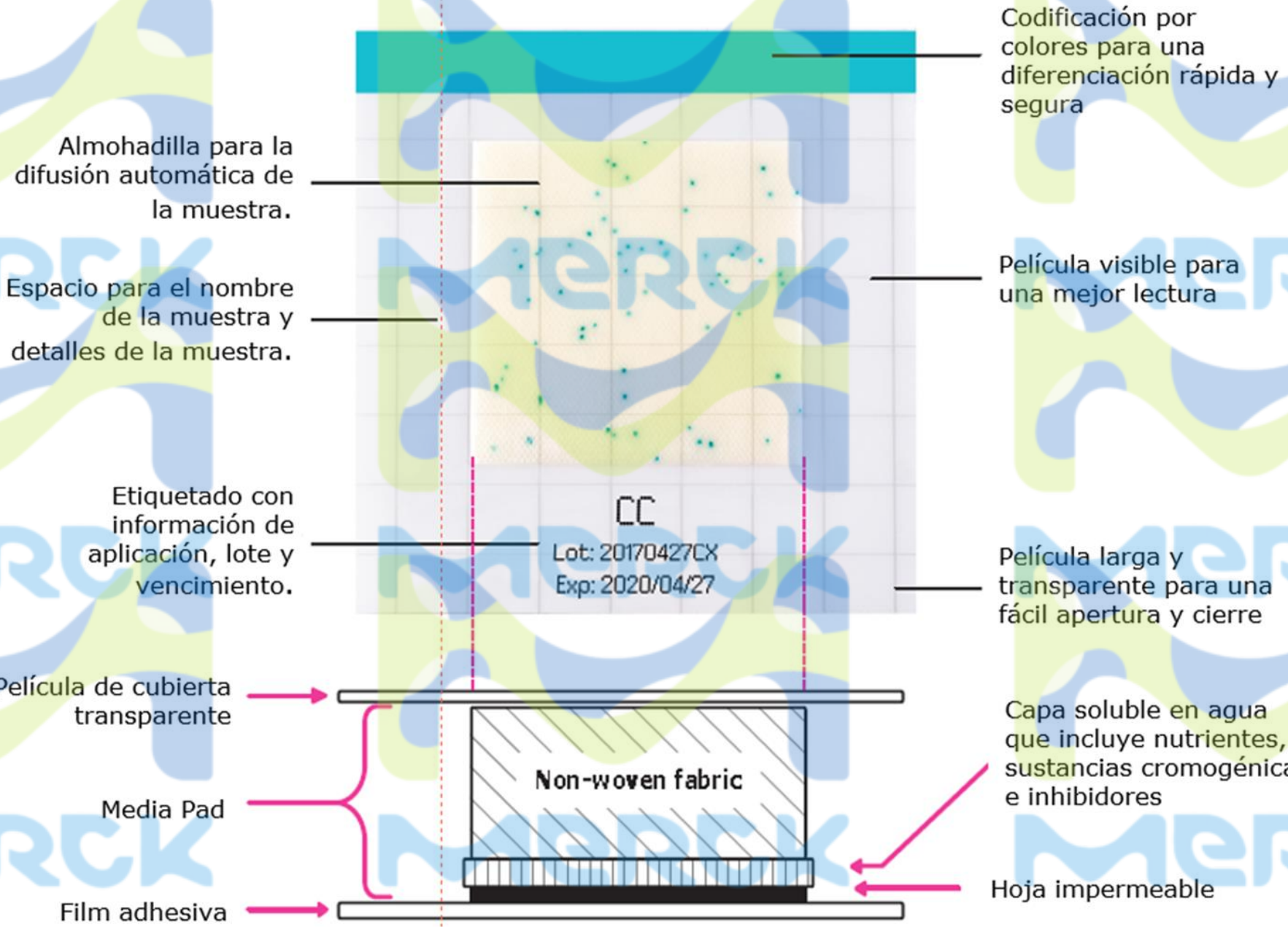


Las almohadillas están recubiertas con un medio de crecimiento y **sustratos cromogénicos** para la detección específica para obtener **resultados más rápidos y lecturas mejoradas.**

Cuando **la muestra** se aplica al líquido **se extiende** uniformemente sobre la almohadilla **por acción capilar.**

No se requieren pasos de trabajo adicionales, mejorando el flujo de trabajo **reduciendo el riesgo de contaminación.**

Diseño innovador



WORKFLOW



Abrir

Levantar la cubierta diagonalmente,



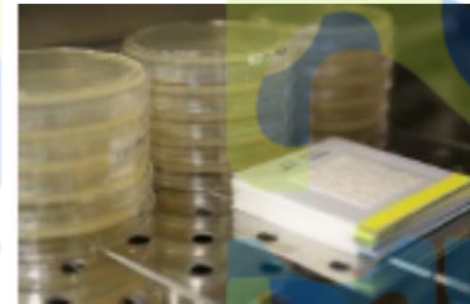
Inocular 1ml

Inocular la muestra en el centro la almohadilla, se difunde automáticamente



Cerrar

Cerrar la cubierta



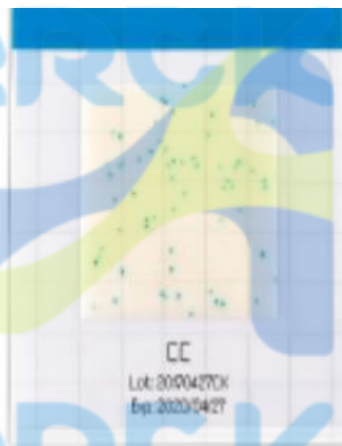
Incubar

Incubar de acuerdo a las condiciones particulares de la aplicación



Contar

Contar



Coliformes

24hs - 35 °C



**Aerobios
Mesófilos**

24hs - 35 °C



**Coliformes Totales
y E. coli**

24hs - 35 °C



**Mohos y
Levaduras**
48-72hs - 25 °C

WORKFLOW





Certificate of Analysis

1.32302.0001 MC-Media Pad Rapid Aerobic Count Convenient culture media for rapid enumeration of aerobic microbial contamination in food and beverages
 Batch 20171221RA

Spec. Values	Batch Values
Inoculum on reference medium (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003))	50
Inoculum on reference medium (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032))	64
Inoculum on reference medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	59
Inoculum on reference medium (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025))	13
Colony count (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003))	106
Colony count (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032))	59
Colony count (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	69
Colony count (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025))	18
Recovery on test medium (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003))	≥ 70 % 212
Recovery on test medium (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032))	≥ 70 % 92
Recovery on test medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	≥ 70 % 117

Colony count (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025))
 Recovery on test medium (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003)) ≥ 70 %
 Recovery on test medium (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032)) ≥ 70 %
 Recovery on test medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012)) ≥ 70 %
 Recovery on test medium (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)) ≥ 70 %
 Colonies (Bacillus subtilis ATCC 6633 (WDCM 00003)) red
 Colonies (Staphylococcus aureus ATCC 6538 (WDCM 00032)) red
 Colonies (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012)) red
 Colonies (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)) yellowish-brown to red

18
 212 %
 92 %
 117 %
 138 %
 passes test
 passes test
 passes test
 passes test

Incubation: 24 hours at 35 °C, aerobic

Strain selection in accordance with the current version of DIN EN ISO 11133. Test method according to independent validation.

Reference media: Tryptic Soy Agar

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.03.2018

Expiry date (DD.MM.YYYY) 21.01.2020

Stefanie Fischer
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

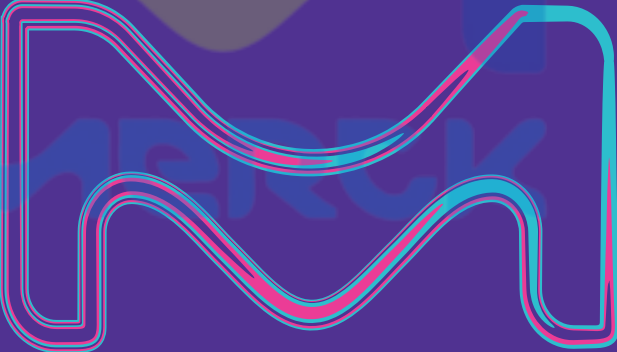
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321
 SALSA Version 692173 /990000516743/ Date: 07.03.2018





simplat

MERCK



Mesofilos aerobios

El método **SimPlate® PC (66003-100)** se utiliza para la detección y cuantificación de la actividad aeróbica total de microorganismos en los alimentos.

Pesar 50 gr de muestra y preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 450 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Preparación de la Muestra

WORKFLOW



Figura 1.

Para iniciar verter la muestra/medio u mezcla sobre el centro de la lámina.



Figura 2.

Para múltiples pruebas pipetear en el centro del plato. Añadir medio rehidratado y hacer un volumen final de $10 \pm 0,2$ ml.



Figura 3.

Coloque la Placa de cubierta y agite suavemente para distribuir la muestra en todos los pozos



Figura 4.

Coloque la Placa de grifo SUAVEMENTE en una superficie dura ayuda a eliminar el aire o burbujas



Figura 5.

Incubar en la oscuridad a 24 a 28 h a 35 ± 1 oC (32 ± 1 oC para productos lácteos).

Confirmación

Después de la incubación, cuente el número de pocillos que muestran fluorescencia azul sosteniendo una luz ultravioleta (366 nm) aproximadamente 15 a 30 cm (6 a 12 pulgadas) por encima del dispositivo SimPlate®.



El método **SimPlate® YM (66004-100)** para levaduras y mohos (YM) se utiliza para la detección y cuantificación de levaduras y mohos en los alimentos.

Preparación de la Muestra

Pesar 50 gr de muestra y preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 450 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Mohos y Levaduras

WORKFLOW



Figura 1.

Para iniciar verter la muestra/medio u mezcla sobre el centro de la lámina.



Figura 2.

Para múltiples pruebas pipetear en el centro del plato. Añadir medio rehidratado y hacer un volumen final de $10 \pm 0,2$ ml.



Figura 3.

Colocar Placa de cubierta, agite suavemente para distribuir la muestra en todos los pozos



Figura 4.

Incubar en la oscuridad a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h o a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 ± 2 h.

Confirmación

Después de la incubación, cuente el número de pocillos que muestran fluorescencia azul sosteniendo una luz ultravioleta (366 nm) aproximadamente 15 a 30 cm (6 a 12 pulgadas) por encima del dispositivo SimPlate®.

COLIFORMES / E. coli

El método SimPlate® (66008-100) para indicador de color de coliformes totales y E. coli (CEc-CI) se utiliza para la detección y cuantificación de las poblaciones de coliformes totales y E. coli.



Pesar 50 gr de muestra y preparar una dilución 1:10 usando como diluyente 450 ml de Agua peptonada al 0,1% (**1072280500**) o el diluyente correspondiente a la matriz de acuerdo con ISO 6887-1:2017

Preparación de la Muestra

WORKFLOW



Figura 1.

Para iniciar verter la muestra/medio u mezcla sobre el centro de la lámina.



Figura 2.

Para múltiples pruebas pipetear en el centro del plato. Añadir medio rehidratado y hacer un volumen final de $10 \pm 0,2$ ml.



Figura 3.

Colocar Placa de cubierta, agite suavemente para distribuir la muestra en todos los pozos



Figura 4.

Colocar la Placa de grifo SUAVEMENTE en una superficie dura ayuda a eliminar el aire o burbujas



Figura 5.

Incubar en la oscuridad a 24 a 28 h a 35 ± 1 °.

Confirmación

Después de la incubación, observe el cambio de color del líquido en los pocillos. Un cambio de color del color de fondo. pozos con corresponde a la presencia de Coliformes Totales. Mostrando fluorescencia al sostener una luz ultravioleta (366 nm) de 15 a 30 cm (6 a 12 pulgadas) por encima de estos pocillos corresponden a la presencia de E. coli.

