
RAPID'*B.cereus* Agar

User Guide

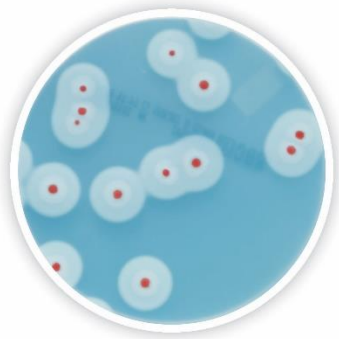
Chromogenic media for the detection and the enumeration of *Bacillus cereus* group (vegetative cells and spores) in human food products, animal feed and environmental samples at 30°C in 24 hr without confirmation

Catalog #12007304, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes

Catalog #12007305, Dehydrated, 500 g

Catalog #12007306, Supplement 1, liquid, 10 vials

Catalog #12007307, Supplement 2, freeze-dried, 10 vials



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Principle	1
Section 3	Theoretical Formula.....	1
Section 4	Shelf Life and Storage.....	1
Section 5	Materials Required but Not Supplied	2
	Equipment	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control	2
Section 7	Protocol	3
	Preparation of Dehydrated Medium.....	3
	Sample Preparation	4
	Inoculation and Plate Reading	4
Section 8	Confirmation of Positive Results	4
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	4
Section 10	Test Performance and Validations.....	5
Section 11	References	5
Section 12	Revision History	5

Section 1 Introduction

The *Bacillus cereus* group of organisms is widely distributed in the environment and eliminating it can present a challenge in food production, particularly with ready-to-eat and ready-to-reheat products. Different bacteriological characteristics, including biochemical characteristics, are shared by several species within the *Bacillus* genus, making differentiation of these organisms difficult. These spore-forming organisms have traditionally been controlled by the application of heat. However, the increasing demand for food with a fresh-like quality (texture, color, and aroma) and the desire to produce foods with functional ingredients have increased interest in the development of low-heat operations to either inactivate spores or to prevent their germination and growth.

Section 2 RAPID'*B.cereus* Principle

RAPID'*B.cereus* Agar is based on a chromogenic reaction and phospholipase activity. Typical *B. cereus* colonies develop a characteristic red color generally surrounded with an opaque halo. Some rare *B. cereus* do not express the phospholipase activity and aren't able to produce the opaque halo. The medium's selective mixture prevents the growth of the interfering flora and enables the analysis of a broad range of foods. The sensitivity of the medium has been specially optimized to allow growth of all pathogenic *Bacillus cereus* strains, even those that are difficult to culture, like *B. cytotoxicus*. The interpretation of RAPID'*B.cereus* Agar plates is further facilitated by the high level of contrast between the color of the colonies and the agar.

Section 3 Theoretical Formula

Peptones	13 g
Phospholipids	5 g
Selective agents	1.1 g
Chromogenic mix	0.01 g
Salt	10.5 g
Agar	15 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.0 ± 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar: 15–25°C in a carefully sealed package in a dry and dark place
- Supplements: 2–8°C in a dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

- Preprepared agar plates: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated agar: 1 month at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^\circ\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Diluent for enumeration: Buffered Peptone Water (BPW) (e.g. catalog #3554179, 225 ml x 6 bottles; 3564684, dehydrated, 500 g; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags); tryptone salt (e.g. catalog #3555754, 9 ml x 25 tubes; 3555756, 90 ml x 6 bottles; catalog #3564544, dehydrated, 500 g; catalog #3555796, 3 L x 4 bags)
- Inoculating loops
- Sterile petri dishes
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *Bacillus*
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations

Section 7 Protocol

- The time lapse between the end of preparation of the stock solution (or 10⁻¹ dilution in the case of a solid product) and when the dilutions come into contact with the culture medium must not exceed 45 min
- Plates should be pre-dried before use to ensure that they are free of excess moisture (EN ISO 7218). For example, plates can be dried by placing them with the agar surface facing upwards in a laminar-flow safety cabinet (at room temperature) for 20 to 30 minutes.

Limitations of Use

- A small percentage of *Bacillus cereus* strains do not express phospholipase activity (red colonies without opaque halo), especially when the pour plate protocol is used. These red colonies should be considered typical

Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit www.bio-rad.com

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 36.5 g of powder in 950 ml of distilled water, wait 5 min, then mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil.
4. Dispense 475 ml into two bottles.
5. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.
6. Cool the medium to 44–47°C.
7. Aseptically add 1 vial of Supplement 1.
8. Aseptically add 1 vial of Supplement 2 that has been reconstituted in 6 ml sterile water.
9. Mix well and pour into petri dishes or keep in bottles to use a pour plate inoculation method.
10. Complete medium prepared with supplements can be maintained at 44–47°C up to 8 hr before use.
11. One 500 g bottle of powder makes 13.8 L of medium.

Section 8 Confirmation of Positive Results

Sample Preparation

Prepare sample according to the standard applicable to the product concerned.

In the context of an NF Validation certified method, prepare the initial suspension and subsequent dilutions in accordance with ISO 6887-1 and the relevant parts of ISO 6887 that apply to the specific sample type.

Inoculation and Plate Reading

1. **Pour plate method:** Transfer 1 ml of sample and/or its decimal dilutions into an empty petri dish. Pour the melted medium, cooled to 44–47 °C, onto the sample and homogenize by swirling. Let solidify on a cool surface.
2. **Surface inoculation method:** Spread 0.1 ml of sample and/or its decimal dilutions on a petri dish. If it is necessary to estimate small numbers, spread 1 ml of sample over three 90 mm dishes (~0.33 ml/dish) or over one 140 mm dish.
3. For both methods, incubate plates facing down at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produces red colonies surrounded with an opaque halo or without halo in some rare cases. The aspect of strains belonging to the *B. cereus* group may be variable (rhizoidal aspect, rough colonies, variable diameter, etc.).
5. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation and expression of results. Enumeration using a single plate and a single dilution is an option certified under NF Validation by AFNOR Certification. In this context, the requirements of ISO 7218 concerning the use of two successive dilutions or two plates from the same dilution cannot be applied (see the sections "Inoculation" and "Calculations and Expression of Results").
6. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr for surface inoculation.


Section 8 Confirmation of Positive Results

Not applicable.

Section 9 Confirmation of Other Methods

Not applicable.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	All food products, animal feed, environmental samples	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD 07/26-03/19 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en Refer to the certificate available on the website mentioned above for the end of validity.</p>

Section 11 References

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain – General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
June 2025	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Document number change (previous version 10000127897 Ver C) - Extension of NF Validation for simple plate and single dilution protocol - Update of bibliographic references

Visit www.bio-rad.com/rapidmedia for more information on our complete range of RAPID chromogenic media

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

Guide d'utilisation

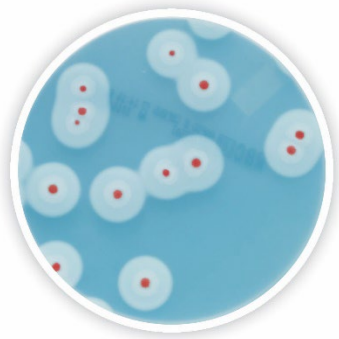
Milieu chromogène pour la détection et le dénombrement du groupe *Bacillus cereus* (cellules et spores végétatives) dans les produits d'alimentation humaine, animal et échantillons de l'environnement à 30 °C en 24 hr et sans confirmation

N° de référence 12007304, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes

N° de référence 12007305, base déshydratée, 500 g

N° de référence 12007306, Supplément 1, liquide, 10 flacons

N° de référence 12007307, Supplément 2, lyophilisé, 10 flacons



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>B.cereus</i> - Principe	1
Section 3	Formule théorique	1
Section 4	Durée de conservation et stockage	1
Section 5	Matériel requis non fourni	2
	Matériel.....	2
	Produits	2
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité	2
Section 7	Protocole	3
	Préparation du milieu de culture déshydraté	3
	Préparation des échantillons	4
	Inoculation et lecture.....	4
Section 8	Confirmation des résultats positifs	4
Section 9	Confirmation d'autres méthodes	4
Section 10	Performance du test et validations	4
Section 11	Références	5
Section 12	Historique des révisions	5

Section 1 Introduction

Bacillus cereus est un groupe de micro-organismes largement présents dans l'environnement. Leur élimination peut présenter un défi dans le domaine de la production alimentaire, notamment en ce qui concerne les aliments prêts-à-consommer et prêts-à-réchauffer. Différentes caractéristiques bactériologiques, y compris différentes caractéristiques biochimiques, sont partagées par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, ce qui rend la distinction difficile. Ces micro-organismes sporulants sont traditionnellement maîtrisés par l'application de chaleur. Toutefois, la demande croissante en produits avec une qualité de type « frais » (texture, couleur et arôme) et le souhait de produire des aliments à ingrédients fonctionnels font porter de l'intérêt aux procédés à faible chaleur, soit pour désactiver les spores, soit pour empêcher leur germination et leur développement.

Section 2 RAPID'*B.cereus* - Principe

La gélose RAPID'*B.cereus* est basée sur une réaction chromogène et sur l'activité de phospholipase. Les colonies de *B.cereus* typiques acquièrent une couleur rouge caractéristique, entourée d'un halo opaque. Certaines souches rares de *B. cereus* n'expriment pas d'activité de phospholipase et ne produisent pas de halo opaque. Le mélange sélectif du milieu empêche la croissance de la flore interférente et permet d'analyser une large gamme d'aliments. La sensibilité du milieu a été optimisée spécifiquement pour permettre la croissance de toutes les souches de *Bacillus cereus* pathogènes, y compris les souches difficiles à cultiver, comme *B.cytotoxicus*. En outre, l'interprétation des milieux de culture gélosés RAPID'*B.cereus* est facilitée par le niveau élevé de contraste (couleur des colonies/gélose).

Section 3 Formule théorique

Peptones	13 g
Phospholipides	5 g
Agents sélectifs	1,1 g
Mélange chromogène	0,01 g
Sel	10,5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,0 ± 0,2

Section 4 Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Suppléments : 2–8 °C à l'abri de la lumière

Section 5 Matériel requis non fourni

- Boîtes précoulées : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la gélose base déshydratée : 1 mois à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière

Section 5 Matériel requis non fourni

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Diluant pour le dénombrement : Buffered Peptone Water (BPW) (par exemple, n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3555790, 5 L x 2 poches ; 3555795, 3 L x 4 poches) ; tryptone-sel (par exemple, n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; 3555756, 90 ml x 6 flacons ; n° de référence 3564544, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3555796, 3 L x 4 poches)
- Öses d'inoculation
- Boîtes de Petri stériles
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *Bacillus*.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Le temps écoulé entre la fin de la préparation de la solution mère (ou dilution 10^{-1} dans le cas d'un produit solide) et le moment auquel les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas excéder 45 min.
- Avant utilisation, il convient que les boîtes soient préséchées pour garantir l'absence d'humidité excessive (EN ISO 7218). Par exemple, à cet effet, il est possible de placer les boîtes, surface gélosée positionnée vers le haut, dans une enceinte à flux laminaire (à température ambiante) pendant 20 à 30 min.

Limites d'utilisation

- Un petit pourcentage de souches de *Bacillus cereus* n'exprime pas d'activité de phospholipase (colonies rouges sans halo opaque), notamment lorsque le protocole du milieu coulé est utilisé. Il convient de considérer ces colonies rouges comme typiques.

Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter www.bio-rad.com

Section 7 Protocole

Préparation du milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 36,3 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée, attendre 5 min, puis mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition.
4. Distribuer 475 ml dans deux flacons.
5. Stériliser en autoclave à 121 °C pendant 15 min.
6. Refroidir le milieu de culture à 44–47 °C.
7. Dans des conditions stériles, ajouter 1 flacon de supplément 1.
8. Dans des conditions stériles, ajouter 1 flacon de supplément 2, préalablement reconstitué dans 6 ml d'eau stérile.
9. Bien mélanger et couler en boîtes de Petri ou conserver en flacons pour une utilisation avec la méthode d'inoculation du milieu coulé.
10. Le milieu complet préparé avec les suppléments peut être maintenu jusqu'à 8 hr à 44–47 °C avant utilisation.
11. 500 grammes de poudre permettent de reconstituer 13,8 L de milieu.

Préparation des échantillons

Préparer l'échantillon conformément à la norme applicable au produit concerné.

Dans le contexte d'une méthode certifiée NF Validation, préparer la suspension mère et les dilutions suivantes conformément à la norme ISO 6887-1 et aux parties de la norme ISO 6887 qui s'appliquent au type d'échantillon concerné

Inoculation et lecture

1. **Méthode du milieu coulé** : Transférer 1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales dans une boîte de Petri vide. Verser le milieu fondu, refroidi à 44–47 °C, sur l'échantillon et homogénéiser en mélangeant. Laisser solidifier sur une surface fraîche.
2. **Méthode d'inoculation de surface** : Étaler 0,1 ml de l'échantillon et/ou de ses dilutions décimales sur une boîte de Petri. S'il est nécessaire d'estimer de petits nombres, étaler 1 ml d'échantillon sur trois boîtes de Ø 90 mm (~ 0,33 ml/boîte) ou sur une boîte de Ø 140 mm.
3. Pour les deux méthodes, incuber les boîtes face vers le bas à 30 ± 1 °C pendant 24 ± 3 hr.
4. La bactérie *B.cereus* produit des colonies rouges entourées d'un halo opaque, ou sans halo dans de rares cas. L'aspect des souches appartenant au groupe *B. cereus* peut être variable (aspect rhizoïde, colonies irrégulières, diamètre variable, etc.).
5. Le dénombrement à l'aide d'une seule boîte et d'une seule dilution est une option certifiée NF Validation par AFNOR Certification. Dans ce contexte, il n'est pas possible d'appliquer les exigences de la norme ISO 7218 en ce qui concerne l'utilisation de deux dilutions successives ou de deux boîtes issues de la même dilution (voir les sections « Ensemencement » et « Calculs et expression des résultats »).
6. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr pour l'inoculation de surface.

Section 8 Confirmation des résultats positifs


Sans objet.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Sans objet.

Section 10

Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	Tous les produits alimentaires, d'alimentation animal, échantillons de l'environnement	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD : 07/26-03/19 MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification https://nf-validation.afnor.org/ Se reporter au certificat disponible sur le site Web mentionné ci-dessus pour connaître la fin de validité</p>

Section 11

Références

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs — Technique par comptage des colonies à 30°C.

ISO 7218:2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Juin 2025	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modification du numéro de document (version précédente 10000127897 Ver C) - Extension de NF Validation au protocole à une seule boîte et une seule dilution - Mise à jour des références bibliographiques

Visitez www.bio-rad.com/rapidmedia pour obtenir plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

Anwenderhandbuch

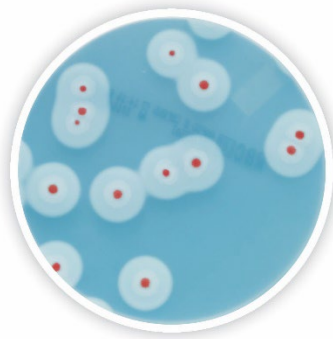
Chromogenes Medium zum Nachweis und zur Zählung von Keimen aus der *Bacillus cereus* Gruppe (vegetative Zellen und Sporen) in Produkte für den menschlichen Verzehr, Futtermittel und Umweltproben bei 30°C innerhalb von 24 hr ohne erforderliche Bestätigung

Katalog-Nr. 12007304, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm

Katalog-Nr. 12007305, dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 12007306, Supplement 1, flüssig, 10 Fläschchen

Katalog-Nr. 12007307, Supplement 2, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Testprinzip	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung	1
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle	2
Abschnitt 7	Protokoll	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	3
	Probenvorbereitung	4
	Beimpfung und Auswertung der Platten	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse	4
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden	4
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen	4
Abschnitt 11	Literatur	5
Abschnitt 12	Revisionshistorie	5

Abschnitt 1 Einleitung

Die *Bacillus cereus* Organismengruppe ist weit verbreitet, und ihre Bekämpfung kann vor allem bei der Lebensmittelproduktion eine Herausforderung darstellen, insbesondere bei verzehrfertigen und wiedererwärmbaren Erzeugnissen. Mehrere Spezies innerhalb der Gattung *Bacillus* haben unterschiedliche bakteriologische bzw. biochemische Eigenschaften gemeinsam, was ihre Differenzierung erschwert. Die herkömmliche Methode zur Kontrolle dieser sporenbildenden Organismen ist die Wärmebehandlung. Die steigende Nachfrage nach Lebensmitteln mit frischer Qualität (Textur, Farbe und Aroma) und nach Lebensmitteln mit funktionellen Inhaltsstoffen haben jedoch das Interesse an der Entwicklung von Niedrigtemperaturverfahren angefacht, um entweder Sporen zu inaktivieren oder deren Keimung und Wachstum zu verhindern.

Abschnitt 2 RAPID'*B.cereus* Testprinzip

RAPID'*B.cereus* Agar basiert auf einer chromogenen Reaktion und Phospholipaseaktivität. Charakteristisch für Kolonien von *B. cereus* sind ihre rote Farbe und der opake Hof. Einige seltene Stämme von *B. cereus* exprimieren keine Phospholipase und bilden keinen opaken Hof. Die selektive Mischung des Mediums verhindert das Wachstum der Begleitflora und ermöglicht die Analyse eines großen Spektrums von Lebensmitteln. Die Empfindlichkeit des Mediums wurde speziell optimiert, um das Wachstum aller pathogenen *Bacillus cereus*-Stämme zu ermöglichen, auch solcher, die schwer zu kultivieren sind, wie z. B. *B. cytotoxicus*. Die Auswertung von RAPID'*B.cereus* Agarplatten wird durch den hohen Kontrast zwischen der Koloniefarbe und dem Agar weiter erleichtert.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Peptone	13 g
Phospholipide	5 g
Selektive Agenzien	1,1 g
Chromogenes Substrat	0,01 g
Salz	10,5 g
Agar	15 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,0 ± 0,2

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar: Trocken und lichtgeschützt in einer sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- Supplements: Lichtgeschützt bei 2–8°C

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Medium hergestellte Agarplatten: 1 Monat bei 2–8°C bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in einer sorgfältig verschlossenen Packung

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Waage, Genauigkeit bis 0,1 g
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau
- Wasserbad

Zubehör

- Verdünnungsmittel zum Zählen: Buffered Peptone Water (BPW) (z. B. Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3564684, dehydriert, 500 g; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L); Tryptonsalz (z. B. Katalog-Nr. 3555754, 25 Röhrchen x 9 ml; 3555756, 6 Flaschen x 90 ml; Katalog-Nr. 3564544, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3555796, 4 Beutel x 3 L)
- Impfösen
- Sterile Petrischalen
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis einzuhalten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *Bacillus* sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen).
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Zwischen dem Ende der Herstellung der Stammlösung (bzw. der 10^{-1} -Verdünnung im Fall eines festen Produkts) und dem Inkontaktbringen der Verdünnungen mit dem Kulturmedium dürfen nicht mehr als 45 min verstreichen.

Abschnitt 7 Protokoll

- Die Platten sollten vor dem Gebrauch vorgetrocknet werden, um sicherzustellen, dass sie frei von überschüssiger Feuchtigkeit sind (EN ISO 7218). Dazu können die Platten zum Beispiel mit der Agaroberfläche nach oben für 20 bis 30 min in eine Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank (bei Raumtemperatur) gestellt werden.

Anwendungsbeschränkungen

- Ein kleiner Prozentsatz der *Bacillus cereus*-Stämme exprimiert keine Phospholipase (rote Kolonien ohne opaken Hof), insbesondere wenn das Protokoll zur Beimpfung einer gegossenen Platte durchgeführt wird. Diese roten Kolonien sind als typisch zu betrachten.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Dokumente im Zusammenhang mit der Herstellung und der Überprüfung jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 36,3 g Pulver in 950 ml destilliertem Wasser lösen, 5 min warten und dann zu einer homogenen Suspension mischen.
3. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen.
4. In zwei Behältern jeweils 475 ml geben.
5. In einem Autoklaven 15 min bei 121°C sterilisieren.
6. Das Medium auf 44–47°C abkühlen lassen.
7. Unter sterilen Konditionen 1 Fläschchen Supplement 1 zugeben.
8. Unter sterilen Konditionen 1 Fläschchen Supplement 2 zugeben, das in 6 ml sterilem Wasser rekonstituiert worden ist.
9. Gut mischen und in Petrischalen gießen oder in Behältern aufbewahren, um ein Protokoll zur Beimpfung einer gegossenen Platte zu befolgen.
10. Das Komplettmedium mit Supplements kann vor dem Gebrauch bis zu 8 hr bei 44–47°C aufbewahrt werden.
11. 500 g Pulver ergeben 13,8 L Medium.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

Probenvorbereitung

Die Probe nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten.

Im Rahmen der von NF Validation zertifizierten Methode die Erstverdünnung und Nachfolgeverdünnungen unter Einhaltung der ISO 6887-1 und der relevanten Teile der ISO 6887, die für den spezifischen Probentyp gelten, vorbereiten.

Beimpfung und Auswertung der Platten

1. **Beimpfung einer gegossenen Platte:** 1 ml Probe und/oder ihre Dezimalverdünnungen in eine leere Petrischale gießen. Das geschmolzene auf 44–47°C abgekühlte Medium auf die Probe gießen und durch Schwenken homogenisieren. Auf einer kühlen Fläche fest werden lassen.
2. **Oberflächenbeimpfung:** 0,1 ml Probe und/oder ihre Dezimalverdünnungen auf einer Agarplatte ausstreichen. Wenn die zu schätzende Keimzahl gering ist, 1 ml Probe auf drei Agarplatten mit 90 mm Durchmesser (~ 0,33 ml/Agarplatte) oder in einer Agarplatte mit 140 mm Durchmesser verteilen.
3. Bei beiden Methoden die Platten umgedreht bei $30 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 3 hr inkubieren.
4. *B. cereus* bildet rote Kolonien mit einem opaken Hof bzw. in einigen seltenen Fällen ohne Hof. Das Aussehen von Stämmen aus der *B. cereus*-Gruppe kann variieren (rhizoidales Aussehen, ungleichmäßige Kolonien, variabler Durchmesser usw.).
5. Die Zählung unter Verwendung einer einzelnen Platte und einer einzelnen Verdünnung ist eine nach NF Validation durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle zertifizierte Option. In diesem Zusammenhang können die Anforderungen der ISO 7218 bezüglich der Verwendung von zwei Nachfolgeverdünnungen bzw. zwei Platten aus der gleichen Verdünnung nicht angewendet werden (siehe Abschnitte „Inokulation“ und „Berechnung und Darstellung der Ergebnisse“).
6. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei 2–8°C zur Oberflächenbeimpfung gelagert werden.


Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

Nicht zutreffend

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Alle Lebensmittelerzeugnisse, Futtermittel, Umweltproben	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD 07/26-03/19 ALTERNATIVE ANALYSEMETHODEN FÜR DAS AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR- Zertifizierungsstelle http://nf- validation.afnor.org/en Das Gültigkeitsende entnehmen Sie bitte dem Zertifikat, das auf der oben genannten Website verfügbar ist.</p>

Abschnitt 11 Literatur

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* — Koloniezählverfahren bei 30 °C

ISO 7218:2024. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen – Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
Juni 2025	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Änderung der Dokumentnummer (vorhergehende Version 10000127897 Ver C) - Erweiterung der NF-Validierung für das Protokoll für eine einzelne Platte und einzelne Verdünnung - Aktualisierung der Literaturangaben

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf www.bio-rad.com/rapidmedia

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

Manuale utente

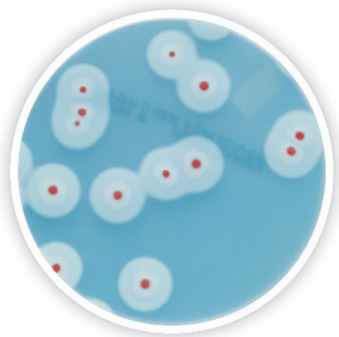
Terreno cromogenico per la rilevazione e l'enumerazione del gruppo *Bacillus cereus* (cellule vegetative e spore) in prodotti per il consumo umano, mangimi, campioni ambientali a 30°C, in 24 hr senza fase di conferma

Catalogo # 12007304, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre petri

Catalogo # 12007305, disidratato, 500 g

Catalogo #12007306, Supplemento 1, liquido, 10 flaconi

Catalogo #12007307, Supplemento 2, liofilizzato, 10 flaconi



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Principio di RAPID' <i>B.cereus</i>	1
Sezione 3	Formula teorica	1
Sezione 4	Durata e conservazione	1
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	2
Sezione 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità	2
Sezione 7	Protocollo	3
	Preparazione del terreno disidratato	3
	Preparazione dei campioni	4
	Inoculazione e lettura delle piastre	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	4
Sezione 9	Conferma di altri metodi	4
Sezione 10	Performance del test e validazioni	5
Sezione 11	Riferimenti	5
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	5

Sezione 1 Introduzione

Il gruppo di organismi *Bacillus cereus* è ampiamente diffuso nell'ambiente e la sua eliminazione può rappresentare una sfida nel settore della produzione alimentare, in particolare per i prodotti pronti al consumo e i prodotti pronti da riscaldare. La condivisione di varie caratteristiche batteriologiche, comprese quelle biochimiche, da parte di diverse specie del genere *Bacillus* rende difficoltosa la differenziazione di questi organismi. Questi organismi sporigeni vengono solitamente controllati attraverso l'applicazione del calore. Tuttavia, la domanda crescente di alimenti freschi di qualità (consistenza, colore e aroma) e il desiderio di produrre alimenti con ingredienti funzionali hanno aumentato l'interesse nello sviluppare operazioni a bassa temperatura per inattivare le spore o prevenirne la germinazione e la crescita.

Sezione 2 Principio di RAPID'*B.cereus*

Il terreno agar RAPID'*B.cereus* si basa su una reazione cromogenica e sull'attività fosfolipasica. Le colonie tipiche di *B. cereus* sviluppano un caratteristico colore rosso generalmente circondato da un alone opaco. Alcuni rari *B. cereus* non esprimono l'attività fosfolipasica e non sono in grado di produrre l'alone opaco. La miscela selettiva del terreno impedisce la crescita della flora interferente e consente l'analisi di un'ampia gamma di alimenti. La sensibilità del terreno è stata specificatamente ottimizzata per consentire la crescita di tutti i ceppi patogeni di *Bacillus cereus*, anche di quelli difficilmente coltivabili, come *B. cytotoxicus*. L'interpretazione delle piastre di agar RAPID'*B.cereus* è ulteriormente facilitata dall'elevato livello di contrasto tra il colore delle colonie e quello dell'agar.

Sezione 3 Formula teorica

Peptoni	13 g
Fosfolipidi	5 g
Agenti selettivi	1,1 g
Miscela cromogenica	0,01 g
Sale	10,5 g
Terreno di coltura agar	15 g
Acqua distillata	QSP 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,0 ± 0,2

Sezione 4 Durata e conservazione

- Terreno di coltura agar disidratato: 15-25°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio
- Supplementi: 2-8°C in un luogo buio

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

- Piastre di agar preparate: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata con il terreno di coltura disidratato: 1 mese a 2-8°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di $\pm 1^\circ\text{C}$
- Bagnomaria

Materiali

- Diluente per l'enumerazione: Acqua Peptonata Tamponata (APT) (es. catalogo #3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche); sale triptone (es. catalogo #3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 90 ml x 6 flaconi; catalogo #3564544, in forma disidratata, 500 g; catalogo #3555796, 3 L x 4 sacche)
- Anse per inoculazione
- Piastre petri sterili
- Pipette sterili
- Sacchi per pesata sterili con filtro

Sezione 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi quali *Bacillus*
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Il tempo che intercorre tra la fine della preparazione della soluzione concentrata (o della diluizione 10^{-1} in caso di prodotto solido) e il momento in cui le diluizioni entrano in contatto con il terreno di coltura non deve superare i 45 min

- Le piastre devono essere pre-asciugate prima dell'uso per assicurarsi che siano prive di umidità in eccesso (EN ISO 7218). Ad esempio, è possibile asciugare le piastre collocandole con la superficie dell'agar rivolta verso l'alto in una cabina di sicurezza a flusso laminare (a temperatura ambiente) per 20-30 min.

Limitazioni d'uso

- Una percentuale ridotta di ceppi di *Bacillus cereus* non esprime attività fosfolipasica (colonie rosse senza alone opaco), soprattutto quando si utilizza il protocollo di inclusione in piastra. Queste colonie rosse devono essere considerate tipiche

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. Tutta la documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito www.bio-rad.com

Sezione 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 36,3 g di polvere in 950 ml di acqua distillata, attendere 5 min, quindi miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione.
4. Dispensare 475 ml in due flaconi.
5. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
6. Raffreddare il terreno a 44–47°C.
7. Aggiungere in condizioni asettiche 1 flacone di Supplemento 1.
8. Aggiungere in condizioni asettiche 1 flacone di Supplemento 2 ricostituito in 6 ml di acqua sterile.
9. Miscelare accuratamente e versare nelle piastre petri o conservare nei flaconi per utilizzare il metodo di inclusione in piastra.
10. Il terreno completo preparato con i supplementi può essere mantenuto a 44–47°C fino a 8 hr prima dell'uso.
11. Un flacone di polvere da 500 g produce 13,8 L di terreno.

Preparazione dei campioni

Preparare il campione secondo lo standard applicabile al prodotto in questione.

Nel contesto di un metodo di certificazione NF, la sospensione iniziale e le successive diluizioni devono essere preparate in conformità alla norma ISO 6887-1 e alle parti pertinenti della norma ISO 6887 applicabili al tipo specifico di campione.

Inoculazione e lettura delle piastre

1. **Metodo di inclusione in piastra:** Trasferire 1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali in una piastra petri vuota. Versare il terreno fuso, raffreddato a 44–47°C, sul campione e omogeneizzare agitando. Lasciare solidificare su una superficie fredda.
2. **Metodo di inoculazione superficiale:** Distribuire 0,1 ml di campione e/o le sue diluizioni decimali su una piastra petri. Se è necessario stimare numeri ridotti, distribuire 1 ml di campione su tre piastre petri da 90 mm (~0,33 ml/piastra petri) o su una piastra petri da 140 mm.
3. Per entrambi i metodi, incubare le piastre rivolte verso il basso a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produce colonie rosse circondate da un alone opaco o senza alone in alcuni casi rari. L'aspetto dei ceppi appartenenti al gruppo *B. cereus* può essere variabile (aspetto rizoidale, colonie ruvide, diametro variabile, ecc.).
5. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati. L'enumerazione mediante una singola piastra e una singola diluizione è un'opzione certificata in base alla certificazione NF mediante certificazione AFNOR. In tale contesto non possono essere applicate le prescrizioni della norma ISO 7218 relative all'uso di due diluizioni successive o di due piastre della stessa diluizione (cfr. Le sezioni "inoculazione" e "calcoli ed espressione dei risultati").
6. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2–8°C per 72 hr per l'inoculazione superficiale.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi


Non applicabile.

Sezione 9

Conferma di altri metodi

Non applicabile.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
NF VALIDATION	Tutti i prodotti alimentari, mangimi, campioni ambientali	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26-03/19 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato da AFNOR Certificazione http://nf-validation.afnor.org/en Fare riferimento al certificato disponibile sul sito Web sopra indicato per la scadenza della validità.</p>

Sezione 11 Riferimenti

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Giugno 2025	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica del numero del documento (versione precedente 10000127897 Ver C) - Estensione della certificazione NF per piastra semplice e protocollo di diluizione singola - Aggiornamento dei riferimenti biografici

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID, visitare il sito www.bio-rad.com/rapidmedia

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

Guia do usuário

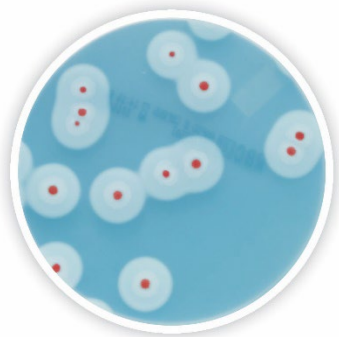
Meios cromogênicos para a detecção e enumeração do grupo *Bacillus cereus* (células vegetativas e esporos) em produtos para consumo humano, animal e amostras ambientais a 30°C em 24 hr sem confirmação

Nº do catálogo 12007304, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas

Nº do catálogo 12007305, Desidratado, 500 g

Nº do catálogo 12007306, Supplement 1, líquido, 10 ampolas

Nº do catálogo 12007307, Supplement 2, congelar seco, 10 ampolas



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	RAPID' <i>B.cereus</i> Princípio	1
Seção 3	Fórmula Teórica	1
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	1
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos	2
Seção 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade	2
Seção 7	Protocolo	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Preparação da amostra	4
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura	4
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	4
Seção 9	Confirmação de outros métodos	4
Seção 10	Desempenho e validação do teste	5
Seção 11	Referências	5
Seção 12	Histórico de Revisão	5

Seção 1 Introdução

O grupo de organismos *Bacillus cereus* é amplamente distribuído no ambiente e eliminá-lo pode representar um desafio na produção de alimentos, principalmente em produtos prontos e para reaquecer. Diferentes características bacteriológicas, incluindo características bioquímicas, são compartilhadas por várias espécies dentro do gênero *Bacillus*, tornando difícil a diferenciação destes organismos. Estes organismos formadores de esporos têm sido tradicionalmente controlados pela aplicação de calor. Entretanto, a crescente demanda por alimentos frescos (textura, cor e aroma) e o desejo de produzir alimentos com ingredientes funcionais tem aumentado o interesse no desenvolvimento de operações de baixo aquecimento para inativar esporos ou para evitar sua germinação e crescimento.

Seção 2 RAPID'*B.cereus* Princípio

RAPID'*B.cereus* Agar é baseado em uma reação cromogênica e na atividade de fosfolipase. Colônias de *B. cereus* típicas desenvolvem uma cor vermelha característica, geralmente rodeada por uma auréola opaca. Alguns raros *B. cereus* não expressam a atividade da fosfolipase e não são capazes de produzir a auréola opaca. A mistura seletiva do meio evita o crescimento da flora interferente e possibilita a análise de uma ampla gama de alimentos. A sensibilidade do meio foi especialmente otimizada para permitir o crescimento de todas as cepas patogênicas de *Bacillus cereus*, mesmo aquelas difíceis de cultivar, como *B. cytotoxicus*. A interpretação de placas RAPID'*B.cereus* Agar é ulteriormente facilitada pelo alto nível de contraste entre as cores das colônias e do ágar.

Seção 3 Fórmula Teórica

Peptonas	13 g
Fosfolípidos	5 g
Agentes seletivos	1,1 g
Mistura cromogênica	0,01 g
Sal	10,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,0 ± 0,2

Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado: 15–25°C em uma embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Suplemento: 2–8°C em local escuro

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Placas de ágar pré-distribuídas: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: 1 mês a 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Banho-maria

Suprimentos

- Diluente para enumeração: Água peptonada tamponada (BPW) (por ex., nº do catálogo 3554179, 6 frascos de 225 ml; 3564684, desidratado, 500 g; 3555790, 2 sacos de 5 L; 3555795, 4 sacos de 3 L); sal de triptona (por ex., nº do catálogo 3555754, 25 tubos de 9 ml; 3555756, 6 frascos de 90 ml; nº do catálogo 3564544, desidratado, 500 g; nº do catálogo 3555796, 4 sacos de 3 L)
- Inoculação de loops
- Placas de Petri estéreis
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Seção 6 Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *Bacillus*
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais

Seção 7 Protocolo

- O tempo entre o final do preparo da solução de reserva (ou diluição 10^{-1} no caso de um produto sólido) e quando as diluições entram em contato com o meio de cultura não deve exceder 45 min
- As placas devem ser pré-secadas antes do uso para garantir que não contenham excesso de umidade (EN ISO 7218). Por exemplo, as placas podem ser secas colocando-as com a superfície de ágar voltada para cima em uma cabine de segurança de fluxo laminar (à temperatura ambiente) por 20 a 30 minutos.

Limitações de uso

- Uma pequena porcentagem das cepas de *Bacillus cereus* não expressa a atividade da fosfolipase (colônias vermelhas sem auréola opaca), especialmente quando se usa o protocolo de incorporação. Essas colônias vermelhas devem ser consideradas típicas

Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite www.bio-rad.com

Seção 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 36,3 g de pó em 950 ml de água destilada, espere 5 min e, então, misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver.
4. Distribuir 475 ml em dois frascos.
5. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.
6. Resfrie o meio até 44–47°C.
7. Adicionar asepticamente 1 ampola de Supplement 1.
8. Adicionar asepticamente 1 ampola de Supplement 2 que foi reconstituído em 6 ml de água esterilizada.
9. Misture bem e despeje em placas de Petri ou mantenha em frascos para usar o método de inoculação por placa.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

10. O meio completo preparado com suplementos pode ser mantido a 44–47°C por até 8 hr antes do uso.
11. Um frasco de 500 g de pó produz 13,8 L de meio.

Preparação da amostra

Prepare a amostra de acordo com o padrão aplicável ao respectivo produto.

No contexto do método certificado NF Validation, prepare a suspensão inicial e as diluições subsequentes de acordo com a série de normas ISO 6887-1 e as partes relevantes da ISO 6887 que se aplicam ao tipo de amostra específico.

Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. **Método de placa de incorporação:** Transfira 1 ml de amostra e/ou suas diluições decimais em uma placa de Petri vazia. Coloque o meio derretido, resfriado a 44–47°C, sobre a amostra e uniformize, girando. Deixe solidificar em uma superfície fria.
2. **Método de inoculação de superfície:** Distribua 0,1 ml de amostra e/ou suas diluições decimais em uma placa de Petri. Se for necessário estimar números pequenos, espalhar 1 ml de amostra em três placas de 90 mm (~0,33 ml/placa) ou em um placa de 140 mm.
3. Para ambos os métodos, incubar placas viradas para baixo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 hr.
4. *B. cereus* produz colônias vermelhas com uma auréola opaca ao redor, ou sem auréola, em alguns casos raros. O aspecto das cepas pertencentes ao grupo *B. cereus* pode ser variável (aspecto rizoidal, colônias rudimentares, diâmetro variável, etc.).
5. Consulte a norma EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão de resultados. A enumeração utilizando uma única placa e uma única diluição é uma opção certificada pela AFNOR Certification sob a NF Validation. Neste contexto, os requisitos da ISO 7218 relativos à utilização de duas diluições sucessivas ou de duas placas da mesma diluição não podem ser aplicados (ver as secções "Inoculação" e "Cálculos e expressão de resultados").
6. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr para inoculação de superfície.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos


Não se aplica.

Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não se aplica.

Seção 10

Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Todos os produtos alimentares, produtos para consumo animal e amostras ambientais	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26-03/19 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela AFNOR Certificação http://nf-validation.afnor.org/en Consulte o certificado disponível no site mencionado acima para verificar a data de validade.</p>

Seção 11

Referências

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/AMD1: 2024. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Junho de 2025	10000251597 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Alteração do número do documento (versão anterior 10000127897 Ver C) - Extensão da NF Validation para protocolo de placa simples e diluição única - Atualização das referências bibliográficas

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

Manual del usuario

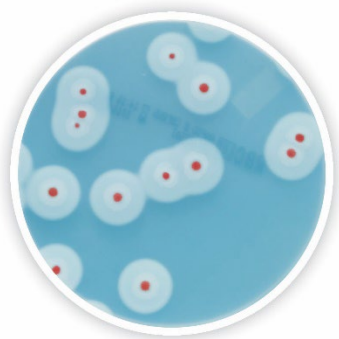
Medio cromogénico para la detección y el recuento del grupo *Bacillus cereus* (células vegetativas y esporas) en productos alimenticios para consumo humano, alimentos para animales y muestras ambientales a 30°C en 24 hr sin confirmación

Referencia #12007304, placas preparadas, placas de 90 mm x 20

Referencia #12007305, deshidratado, 500 g

Referencia #12007306, Supplement 1, líquido, 10 viales

Referencia #12007307, Supplement 2, liofilizado, 10 viales



BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio de RAPID' <i>B.cereus</i>	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y conservación	1
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados	2
	Equipamiento	2
	Fungibles	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad	2
Apartado 7	Protocolo	3
	Preparación del medio deshidratado	3
	Preparación de las muestras	4
	Inoculación y lectura de la placa	4
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	4
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	4
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	5
Apartado 11	Referencias	5
Apartado 12	Historial de revisiones	5

Apartado 1 Introducción

El grupo de organismos *Bacillus cereus* está ampliamente diseminado en el medio ambiente y su eliminación puede representar un desafío en el campo de la producción de alimentos, en particular con productos listos para el consumo y productos listos para calentar. Varias especies del género *Bacillus* comparten diferentes características bacteriológicas, incluidas las bioquímicas, dificultando la diferenciación de estos organismos. Estos organismos generadores de esporas han sido tradicionalmente controlados mediante la aplicación de calor. No obstante, la creciente demanda de alimentos de calidad similar a la de los alimentos frescos (textura, color y aroma) y el deseo de producir alimentos con ingredientes funcionales han aumentado el interés en el desarrollo de operaciones a baja temperatura para inactivar las esporas o impedir su germinación y crecimiento.

Apartado 2 Principio de RAPID'*B.cereus*

RAPID'*B.cereus* Agar se basa en una reacción cromogénica y en la actividad de la fosfolipasa. Las colonias de *B. cereus* típicas desarrollan un color rojo característico generalmente rodeado de un halo opaco. Algunas colonias poco comunes de *B. cereus* no manifiestan la actividad de la fosfolipasa y no son capaces de producir el halo opaco. La mezcla selectiva del medio impide el crecimiento de la flora interferente y permite el análisis de una amplia gama de alimentos. La sensibilidad del medio se ha optimizado específicamente para permitir el crecimiento de todas las cepas patógenas de *Bacillus cereus*, incluso las que son difíciles de cultivar, como el *B. cytotoxicus*. La interpretación de las placas de RAPID'*B.cereus* Agar resulta más fácil debido al alto nivel de contraste entre el color de las colonias y el agar.

Apartado 3 Fórmula teórica

Peptonas	13 g
Fosfolípidos	5 g
Agentes selectivos	1,1 g
Mezcla cromogénica	0,01 g
Sal	10,5 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

pH final a 25°C = 7,0 ± 0,2

Apartado 4 Vida útil y conservación

- Agar deshidratado: 15–25°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Suplementos: 2–8°C en un lugar oscuro

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

- Placas de agar preparadas: 2–8°C en un lugar oscuro
- Placa preparada desde agar deshidratado: 1 mes a 2–8°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual en laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada termostáticamente , con una precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Baño termostático

Fungibles

- Diluyente para recuento: Buffered Peptone Water (APT) (p. ej. referencia #3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, deshidratado, 500 g; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas); Sal Triptona (p. ej. referencia #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 90 ml x 6 frascos; referencia #3564544, deshidratado, 500 g; referencia #3555796, 3 L x 4 bolsas)
- Asas de siembra
- Placas de Petri estériles
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

Apartado 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *Bacillus*
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales

Apartado 7 Protocolo

- El tiempo que transcurre entre la finalización de la preparación de la solución de caldo (o la dilución 10^{-1} en el caso de un producto sólido) y el momento en que las diluciones entran en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 min.
- Las placas deben secarse previamente a su uso para asegurar que no tengan exceso de humedad (EN ISO 7218). Por ejemplo, las placas pueden secarse colocándolas con la superficie de agar hacia arriba en una cabina de seguridad de flujo laminar (a temperatura ambiente) durante 20 - 30 minutos.

Limitaciones de uso

- Un pequeño porcentaje de cepas de *Bacillus cereus* no manifiesta actividad de la fosfolipasa (colonias rojas sin halo opaco), especialmente cuando se utiliza el protocolo de vertido en placa o siembra en masa. Estas colonias rojas deben considerarse típicas

Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Cada lote de producto acabado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. Asimismo, se mantiene un registro de toda la documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote
- Para información de seguridad del producto SDS y del certificado de análisis, visite www.bio-rad.com

Apartado 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disuelva 36,3 g de polvo en 950 ml de agua destilada, espere 5 min. y mezcle hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Caliente suavemente, agitando frecuentemente, y luego lleve a ebullición.
4. Dispense 475 ml en dos frascos.
5. Esterilice en autoclave a 121 °C durante 15 min.
6. Enfríe el medio a 44–47°C.
7. Asépticamente, agregue 1 vial del Supplement 1.
8. Asépticamente, agregue 1 vial del Supplement 2 habiendo sido reconstituido en 6 ml de agua estéril.
9. Mezcle bien y viértalo en placas de Petri o consérvelo en frascos para su utilización con el método de inoculación por vertido en placa o siembra en masa.
10. El medio completo preparado con suplementos puede conservarse a 44–47°C hasta 8 hr antes de su uso.
11. Un frasco de 500 g de polvo permite obtener 13,8 L de medio.

Preparación de las muestras

Prepare la muestra según la norma estandarizada aplicable al producto en cuestión.

En el contexto de un método certificado por NF Validation, preparar la suspensión inicial y las diluciones posteriores de acuerdo con la norma ISO 6887-1 y las partes pertinentes de la norma ISO 6887 que se aplican al tipo de muestra específico.

Inoculación y lectura de la placa

1. Método de vertido en placa o siembra en masa: Dispense 1 ml de muestra y/o de sus diluciones decimales en una placa de Petri vacía. Vierta el medio fundido, enfriado a 44–47 °C, sobre la muestra y homogeneice con movimientos circulares. Deje solidificar en una superficie nivelada.
2. Método de siembra en superficie: Distribuya 0,1 ml de la muestra y/o de sus diluciones decimales en una placa de Petri. Si es necesario estimar bajas concentraciones, extienda 1 ml de muestra sobre tres placas de 90 mm (~0,33 ml/placa) o sobre una placa de 140 mm.
3. Para ambos métodos, incube las placas invertidas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 hr.
4. El grupo de organismos *B. cereus* produce colonias rojas rodeadas de un halo opaco o sin halo (casos poco frecuentes). El aspecto de las cepas pertenecientes al grupo *B. cereus* puede ser variable (aspecto rizoidal, colonias desiguales, diámetro variable, etc.).
5. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados. El recuento utilizando una sola placa y una sola dilución es una opción certificada por NF Validation por AFNOR Certification. En este contexto, no se pueden aplicar los requisitos de la norma ISO 7218 en relación con la utilización de dos diluciones sucesivas o dos placas de la misma dilución (véanse las secciones «Inoculación» y «Cálculos y expresión de los resultados»).
6. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2–8°C durante 72 hr para la siembra en superficie.

Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos


No aplicable.

Apartado 9 Confirmación de otros métodos

No aplicable.

Apartado 10

Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios, alimentos para animales, muestras ambientales	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 <p>BRD: 07/26-03/19 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado por AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en Para conocer la fecha de caducidad, consultar el certificado disponible en el sitio web mencionado anteriormente.</p>

Apartado 11

Referencias

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Junio de 2025	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Cambio en el número de documento (versión anterior 10000127897 Ver C) - Ampliación de NF Validation para el protocolo de placa simple y dilución única - Actualización de las referencias bibliográficas

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

RAPID'*B.cereus* Agar

用户指南

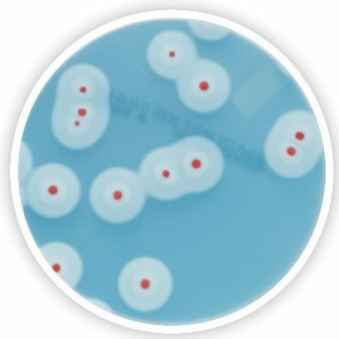
用于在 30°C 下 24 小时内对人类食品、动物饲料和环境样品中 *蜡样芽胞杆菌* (营养细胞和孢子) 进行检测和计数而无需确认的显色培养基

目录 #12007304, 即用型平板, 90 mm x 20 个培养皿

目录 #12007305, 干粉, 500 g

目录 #12007306, 添加剂 1, 液体, 10 小瓶

目录 #12007307, 添加剂 2, 冻干, 10 小瓶



BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	RAPID' <i>B.cereus</i> 原理	1
第 3 部分	理论配方	1
第 4 部分	保质期及储存条件	2
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材	2
	仪器	2
	试剂和耗材	2
第 6 部分	预防措施、使用限制和质量控制	3
第 7 部分	操作流程	3
	干粉培养基的制备	3
	样品准备	4
	接种和平板读数	4
第 8 部分	阳性结果的确认	4
第 9 部分	其他方法的确认	4
第 10 部分	测试性能和验证	5
第 11 部分	参考资料	5
第 12 部分	修订记录	5

第 1 部分

简介

第 1 部分

简介

蜡样芽孢杆菌生物群在环境中广泛分布，消除它可能会给食品生产带来挑战，特别是即食和即热产品。芽孢杆菌属内的几个菌种共有不同的细菌学特征，包括生化特征，因此很难区分这些生物体。这些形成孢子的生物体传统上是通过加热来控制的。然而，随着对享用新鲜品质（质地、色泽和香味）的食品的需求不断增加，以及渴望生产具有功能性成分的食品，人们对开发出灭活孢子或防止其发芽和生长的低热操作兴趣日益增加。

第 2 部分

RAPID'*B.cereus* 原理

RAPID'*B.cereus* 是一种基于显色反应和磷脂酶活性显色培养基。典型的蜡样芽孢杆菌菌落呈现出特有的红色，周围一般有不透明的光晕。一些罕见的蜡样芽孢杆菌不表达磷脂酶活性，不产生不透明的光晕。该培养基的选择性混合物能防止干扰菌群的生长，并能对广泛的食品进行分析。已特别优化该培养基的敏感性，允许所有的致病性蜡样芽孢杆菌菌株生长，甚至是那些难以培养的菌株，如细胞毒性芽孢杆菌。通过菌落颜色和平板之间的高对比度进一步加强了 RAPID'*B.cereus* 培养基的优点。

第 3 部分

理论配方

蛋白胨	13 g
磷脂	5 g
选择性制剂	1.1 g
显色混合物	0.01 g
盐	10.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

25°C 时的最终 pH 值 = 7.0 ± 0.2

第 4 部分

保质期及储存条件

第 4 部分

保质期及储存条件

- 干粉培养基：在 15–25°C 下妥善密封包装，置于干燥避光处
- 添加剂：2–8°C 避光处
- 预备平板：2–8°C 避光处
- 干粉平板的制备：在 2–8°C 下妥善密封包装，置于干燥、避光处储存 1 个月

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 热平板
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到 $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 水浴

试剂和耗材

- 计数稀释剂：缓冲蛋白胨水 (BPW) (例如目录 #3554179, 225 ml x 6 瓶; 3564684, 干粉, 500 g; 3555790, 5 L x 2 袋; 3555795, 3 L x 4 袋) ; 胰蛋白胨盐 (例如目录 #3555754, 9 ml x 25 管; 3555756, 90 ml x 6 瓶; 目录 #3564544, 干粉, 500 g; 目录 #3555796, 3 L x 4 袋)
- 接种环
- 无菌培养皿
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理 *芽孢杆菌* 等具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 从制备原液（或固体产品的十分之一稀释液）结束到稀释液与培养基接触之间的时间间隔不得超过 45 分钟
- 平板在使用前应进行预干燥，以确保其没有多余的水分 (EN ISO 7218)。例如，可以通过将平板的培养基表面朝上放在层流安全柜中（室温下）干燥 20 至 30 分钟。

使用限制

- 一小部分 *蜡样芽孢杆菌* 菌株不表达磷脂酶活性（红色菌落无不透明的光晕），特别是在使用倾注平板方案时。这些红色菌落应被认为是典型的菌落

质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品，从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制，只有满足验收标准才能上市。与每批次的生产和质量控制有关的文件均进行存档
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 www.bio-rad.com。

第 7 部分

操作流程

干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 36.3 g 粉末溶解在 950 ml 蒸馏水中，等待 5 分钟，然后进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 缓慢加热，不断搅拌，然后煮沸。
4. 将 475 ml 分装到两个瓶子里。
5. 121°C 高压灭菌 15 分钟。
6. 冷却培养基至 44-47°C。
7. 在无菌条件下添加 1 小瓶添加剂 1。
8. 在无菌条件下加入 1 瓶已在 6 ml 无菌水中溶解的添加剂 2。

第 8 部分

阳性结果的确认

9. 搅拌均匀，倒入培养皿中，或储存在瓶子中，使用倾注平板接种法。
10. 用添加剂配制的完全培养基可以在使用前保持在 44-47°C，最长 8 小时。
11. 一瓶 500 g 粉末可制成 13.8 L 培养基。

样品准备

按照适用于相关产品的标准制备样品。

在 NF 验证认证方法框架内，按照 ISO 6887-1 及适用于相应样品类型的 ISO 6887 相关部分的要求，制备初始悬浮液及其后续稀释液。

接种和平板读数

1. **倾注平板法：**将 1 ml 样品和/或其十分之一稀释液转移到空的培养皿中。将冷却到 44-47°C 的融化培养基倒在样品上，并通过搅拌使之均匀。让其在阴凉的表面上凝固。
2. **表面接种法：**将 0.1 ml 样品和/或其十分之一稀释液涂抹在培养皿中。
如果需要估计少量样本，请将 1 ml 样品涂抹在三个 90 mm 培养皿（~0.33 ml/培养皿）或一个 140 mm 培养皿上。
3. 对于这两种方法，将平板朝下在 30±1°C 下培养 24±3 小时。
4. *蜡样芽孢杆菌*产生红色菌落，周围有不透明的光晕，或在一些罕见的情况下没有光晕。属于*蜡样芽孢杆菌*组的菌株的外观可能发生变化（根状方面、粗糙的菌落、可变直径等）。
5. 关于接种、菌落计数、计算和结果表达，请参考 EN ISO 7218 标准。采用单个平板和单一稀释度进行计数的方案是 NF 验证认证方法，已通过 AFNOR 认证。在此情况下，ISO 7218 中关于使用两个连续稀释度或同一稀释度的两块平板的要求不适用（参见章节“接种”及“计算和结果表达”）。
6. 培养步骤结束后，平板可以在 2-8°C 下储存 72 小时，用于表面接种。

第 8 部分

阳性结果的确认

不适用。

第 9 部分

其他方法的确认

不适用。

第 10 部分

测试性能和验证

第 10 部分

测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
NF 验证	所有食品、动物饲料、 环境样品	EN ISO 16140-2	ISO 7932	 BRD: 07/26-03/19 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 http://nf-validation.afnor.org/en 有关认证有效期截止日期，请参考 上述网站上提供的证书。

第 11 部分

参考资料

ISO 7932:2004/AMD 1:2020 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain – General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017 /AMD1: 2024. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2025 年 6 月	10000251397 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- 文件编号变更（先前版本 10000127897 版本 C）- 针对简单平板和单稀释度方案的 NF 验证扩展部分- 更新文献参考

请访问 www.bio-rad.com/rapidmedia, 了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

*Life Science
Group*

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23
