



Iron Sulphite Agar

Medium for detection and enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spp., according to ISO 15213-1.

DESCRIPTION

Iron Sulphite Agar is a medium used for the detection of sulphite-reducing *Clostridium* species by colony-count technique.

This medium complies with ISO 15213-1 and is intended for the examination of foods, animal feeding stuffs and environmental samples in the area of food production and handling.

| TYPICAL FORMULA* | (g/l) |
|---|-------|
| Enzymatic Digest of Casein | 15.0 |
| Enzymatic Digest of Soya | 5.0 |
| Yeast Extract | 5.0 |
| Sodium Disulfite (sodium metabisulfite) anhydrous | 0.5 |
| Iron(III) Ammonium Citrate | 1.0 |
| Agar | 15.0 |

Final pH 7.6 ± 0.2 at 25°C

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications;
Grams per litre of purified water.

METHOD PRINCIPLE

Enzymatic digest of casein and pancreatic digest of soya provide amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals for organisms growth. Yeast extract is a rich source of vitamins of B-group. Ferric ammonium citrate and sodium metabisulfite are H₂S indicators. Agar is the solidifying agent. *Clostridia* reduce sulfite to sulfide which reacts with iron to form a black iron sulfide precipitate.

PREPARATION

Dehydrated culture medium (DCM)

Suspend 41.5 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Heat shaking frequently until completely dissolved. Autoclave at 121°C for 15 minutes.

Medium in bottles

Melt the content of a bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool to 45-50°C, mix well avoiding foam formation before pouring.

TEST PROCEDURE

Following ISO 15213-1, inoculate Iron Sulphite Agar (ISA) using the pour plate method: Transfer 1 ml test sample or 1 ml initial suspension to duplicate plates, pour the medium (12-15 ml for 90 mm Petri dishes or 45-50 ml for 140 mm Petri dishes) molten and tempered at 44-47°C into each Petri dish. Carefully mix the inoculum with the medium. Repeat the procedure with further dilutions. After the agar has solidified, pour the ISA medium (5 ml for 90 mm Petri dishes or 10 ml for 140 mm Petri dishes) as overlay.

If the scope of the test is to count only spores, heat the decimal dilution series to 80°C in a water bath for 10 ± 1 min.

If 60 mm ready-to-use plates are used, inoculate the medium with the membrane filter technique.

Incubate the inoculated plates at 37 ± 1°C for 48 ± 2 hours under anaerobic atmosphere.

INTERPRETING RESULTS

Count all black or grey to yellow-brown colonies as presumptive sulphite-reducing *Clostridium* spp.

Confirmation suspect colonies by subculturing onto two non-selective blood agar plates (e.g. Columbia blood agar) or another nutrient-rich medium (e.g. Tryptone soya agar or Brain heart infusion agar). From each pair of plates, one is incubated aerobically and the other anaerobically at 37°C for 20 ± 2 h. Colonies belonging to the genus *Clostridia* will grow only on the agar plate incubated in an anaerobic atmosphere.

NOTE When no confirmation is performed, the results can be reported as “anaerobic sulphite-reducing bacteria”.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store prepared medium in bottles and plates at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 4 years.

Medium in bottles: 1 year.

Ready-to-use plates: 4 months.

QUALITY CONTROL

Appearance of Dehydrated Medium: Free-flowing, homogeneous, beige.

Appearance of Prepared Medium: Slightly opalescent, light amber.

Expected Cultural Response:

| Control strain | Inoculum | Incubation | Specification |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| <i>Clostridium perfringens</i> | WDCM 00007 (ATCC 13124; NCTC 8237) | 50-100 CFU | 48 ± 2 h/ 37 ± 1°C |
| <i>Escherichia coli</i> | WDCM 00012 (ATCC 8739; NCTC 12923) | 10 ³ -10 ⁴ CFU | anaerobic atmosphere |
| | | | Good growth, black colonies (P _R ≥ 0.5 on TSA) |
| | | | Weak to good growth, no blackening of colonies |

A productivity ratio (P_R) of 0.5 is equivalent to a recovery rate of 50%.

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis (CoA).

WARNING AND PRECAUTIONS

For professional use only. Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using this product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.

Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

The product is available in the configurations listed below. There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit liofilchem.com

| Product | Format | Packaging | Ref. |
|-----------------------------------|---------------------------|------------|--------|
| Iron Sulphite Agar ISO 15213-1 | 60 mm agar Plate | 20 plates | 163372 |
| | Bottle | 6 x 100 ml | 403180 |
| | Dehydrated Culture Medium | 100 g | 621401 |
| | Dehydrated Culture Medium | 500 g | 611401 |

Version History

| Revision | Release Date | Change Summary |
|----------|--------------|--|
| 0 | 2018-03-07 | Document creation. |
| 1 | 2023-03-29 | ISA composition, test procedure, result interpretation and QC updated according to ISO 15213-1. Preparation, storage, shelf life, and ordering info revised to include the DCM. |

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

liofilchem.com/ifu-sds



Iron Sulphite Agar

Terreno per ricerca e conteggio di *Clostridium* spp. solfito-riduttori, secondo ISO 15213-1.

Istruzioni per l'uso
ITALIANO

DESCRIZIONE

Iron Sulphite Agar è un terreno utilizzato per la ricerca dei clostridi solfito-riduttori con la tecnica di conteggio delle colonie su piastra.

Il terreno è conforme alla ISO 15213-1 ed è ideato per l'esame microbiologico di alimenti, mangimi e campioni ambientali nelle aree deputate alla produzione e manipolazione degli alimenti.

| FORMULA TIPICA* | (g/l) |
|---|-------|
| Digerito Enzimatico di Caseina | 15.0 |
| Digerito Enzimatico di Soia | 5.0 |
| Estratto di Lievito | 5.0 |
| Sodio Disolfito (sodio metabisolfito), anidro | 0.5 |
| Ferro(III) Ammonio Citrato | 1.0 |
| Agar | 15.0 |

pH Finale 7.6 ± 0.2 a 25°C

*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche di performance richieste;
Grammi per litro di acqua purificata.

PRINCIPIO DEL METODO

Digerito enzimatico di caseina e digerito pancreatico di soia forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita dei microrganismi. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, soprattutto del gruppo-B. Ferro ammonio citrato e metabisolfito di sodio sono indicatori di H₂S. L'agar è l'agente solidificante. I Clostridi riducono i solfiti a solfuri i quali reagiscono con il ferro per formare un precipitato nero di solfuro di ferro.

PREPARAZIONETerreno disidratato

Sospendere 41.5 g di polvere in 1 litro di acqua distillata o deionizzata sterile. Riscaldare agitando di frequente fino a completa dissoluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

Terreno in flaconi

Sciogliere il contenuto di un flacone in bagnomaria a 100°C (con i tappi leggermente svitati) fino a completa dissoluzione del terreno. Verificare, una volta fuso, la buona omogeneità del terreno capovolgendo il flacone dopo averne avvitato il tappo. Raffreddare a 45-50°C, mescolare bene senza formazione di bolle prima di versare il terreno.

PROCEDURA DEL TEST

Seguendo la norma ISO 15213-1, inoculare Iron Sulphite Agar (ISA) utilizzando il metodo di semina per inclusione: trasferire 1 ml del campione o 1 ml della sospensione iniziale in una serie di piastre (duplicato),

versare il terreno (12-15 ml per piastre Petri da 90 mm o 45-50 ml per piastre Petri da 140 mm) fuso e raffreddato a 44-47°C in ogni piastra Petri. Miscelare accuratamente l'inoculo con il terreno. Ripetere la procedura con le diluizioni successive. Aspettare che l'agar si solidifichi prima di versare nuovamente il terreno ISA (5 ml per piastre Petri da 90 mm o 10 ml per piastre Petri da 140 mm) per formare uno strato di copertura.

Se lo scopo del test è contare solo le spore, riscaldare la serie di diluizioni decimali in un bagno termostatico a 80°C per 10 ± 1 min.

Se si utilizzano le piastre da 60 mm pronte all'uso, inoculare il terreno con la tecnica della filtrazione su membrana.

Incubare le piastre inoculate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore in atmosfera anaerobica.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Contare tutte le colonie nere o da grigio a giallo-marrone come clostridi solfito-riduttori presuntivi.

Confermare le colonie sospette mediante subcoltura su due piastre di agar sangue non selettivo (es. Columbia blood agar) o un altro terreno ricco di sostanze nutritive (es. Tryptone soya agar o Brain heart infusion agar). Di ciascuna coppia di piastre, una viene incubata in aerobiosi e l'altra in anaerobiosi a 37°C per 20 ± 2 ore. Le colonie appartenenti al genere *Clostridia* cresceranno solo sulla piastra di agar incubata in atmosfera anaerobica.

NOTA Nel caso in cui non vengano eseguiti i test di conferma, i risultati possono essere refertati come "batteri anaerobi solfito-riduttori".

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare a $10-30^\circ\text{C}$, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale chiuso ermeticamente. Conservare il terreno preparato in flaconi e piastre a $10-25^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

VALIDITÀ

Terreno disidratato: 4 anni.

Terreno in flaconi: 1 anno.

Piastre pronte all'uso: 4 mesi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Aspetto del Terreno Disidratato: Omogeneo, granulometria fine, beige.

Aspetto del Terreno Preparato: Ambra chiaro, leggermente opalescente.

Risultati Attesi dei Test Culturali:

| Ceppi di controllo | Inoculo | Incubazione | Specifiche |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------|---|
| <i>Clostridium perfringens</i> | WDCM 00007 (ATCC 13124; NCTC 8237) | 50-100 CFU | 48 ± 2 h/ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ |
| <i>Escherichia coli</i> | WDCM 00012 (ATCC 8739; NCTC 12923) | 10^3-10^4 CFU | atmosfera anaerobica |
| | | | Crescita buona colonie nere ($P_R \geq 0.5$ su TSA) |
| | | | Crescita debole o buona, nessun annerimento delle colonie |

Un rapporto di produttività (P_R) di 0.5% è equivalente ad un tasso di recupero del 50%.

Fare riferimento al certificato di analisi (CoA) relativo al lotto effettivo.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Esclusivamente per uso professionale. Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza nei metodi di laboratorio. Si prega di legger attentamente le istruzioni prima di utilizzare questo prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita se ci sono deviazioni dalle istruzioni riportate in questo documento.

Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle modalità di manipolazione sicure.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

BIBLIOGRAFIA

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

TABELLA DEI SIMBOLI

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

Per le configurazioni disponibili di questo prodotto vedere l'elenco nella lingua inglese.












Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online:

liofilchem.com/ifu-sds

References / Bibliografia

1. ISO 15213-1:2023. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. – Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique
2. EN ISO 11133:2014+Amd1:2018+Amd2:2020. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
3. Public Health England. (2016). Identification of *Clostridium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 8 Issue 4.1. <https://www.gov.uk/guidance/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
4. Mossel, D.A.A., Golstein Brouwers G.W.M.V. and De Bruin A.S. (1959). J. Path. Bact. 78: 290-291.
5. Tanner, F.W. (1944). The microbiology of foods, 2nd ed, p. 11.

Table of Symbols / Tabella dei Simboli

| | |
|---|---|
|  | Batch code / Codice del lotto |
|  | Catalogue number / Numero di catalogo |
|  | Manufacturer / Fabbricante |
|  | Use by / Utilizzare entro |
|  | Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura |
|  | Temperature limitation / Limiti di temperatura |
|  | Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi |
|  | Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | Do not reuse / Non riutilizzare |
|  | Keep away from sunlight / Tenere al riparo dalla luce solare |
|  | Warning / Avvertimento |



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.com

liofilchem@liofilchem.com