
BOUILLON DE GIOLITTI ET CANTONI AVEC TWEEN 80 (BASE)

ENRICHISSEMENT ET DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon de Giolitti et Cantoni avec Tween 80 est un milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive en faible nombre dans les produits alimentaires. Le milieu est utilisé en méthode NPP.

La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF EN ISO 6888-3.

2 HISTORIQUE

Mossel, Harrewijn et Elzebroek ont recommandé le milieu précédemment formulé par Giolitti et Cantoni en 1966 pour la mise en évidence de *Staphylococcus aureus* dans les poudres de lait et les aliments infantiles. La formule actuelle, supplémentée avec du Tween 80 a été recommandée par Chopin *et al.* (en 1985) afin d'augmenter la productivité du milieu.

3 PRINCIPES

Le pyruvate, la glycine et surtout le mannitol favorisent le développement des staphylocoques.

Les germes à Gram négatif sont inhibés par le chlorure de lithium.

Le tellurite de potassium inhibe les microorganismes à Gram positif.

L'environnement anaérobie supprime la croissance des microcoques.

Le Tween 80 agit comme dispersant.

Le développement des staphylocoques se manifeste par l'apparition d'une coloration noire qui est due à la réduction du tellurite en tellure métallique.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu de base (sans tellurite de potassium) :

- Tryptone	10,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Extrait de levure	5,0 g
- Glycine	1,2 g
- Mannitol.....	20,0 g
- Pyruvate de sodium	3,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Chlorure de lithium.....	5,0 g
- Tween 80.....	1,0 g
- tellurite de potassium (*)	0,1 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 6,9 ± 0,2.

(*) : Le tellurite de potassium ne fait pas partie de la base déshydratée proposée et doit être ajouté juste avant l'ensemencement.

5 PREPARATION

Préparation de la solution de tellurite de potassium

- Mettre en suspension 1 g de tellurite de potassium dans 100 mL d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Filtrer sur une membrane de 0,22 µm de porosité et récupérer dans un flacon stérile.

Préparation du milieu simple concentration :

- Mettre en suspension 55,2 g de milieu déshydraté (BK159) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes à raison de 10 mL par tube 16*160 mm.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
55,2 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Préparation du milieu double concentration :

- Pour le bouillon double concentration, mettre en suspension 110,4 g de milieu déshydraté (BK159) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes à raison de 10 mL par tube 20*200 mm.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
110,4 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation des milieux prêts-à-l'emploi

- Lorsqu'ils ont été préparés à l'avance ou utilisés en milieux prêts-à-l'emploi (BM110 et BM111), désaérer les milieux de base simple et double concentration par un chauffage de 15 minutes à 95-100 °C, juste avant l'emploi.
- Refroidir et maintenir les milieux à température ambiante.

Préparation de la gélose blanche

- Mettre en suspension 15 à 20 g d'agar (A1010 ou A1012) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons
- Autoclaver 15 min à 121 °C
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C

6 MODE D'EMPLOI

Milieu double concentration :

- Ajouter 0,2 mL de la solution stérile de tellurite de potassium à 1 % dans chaque tube.
- Transférer 10 mL d'inoculum dans chaque tube de bouillon double concentration.

✓ **Ensemencement :**
- Ajout tellurite
- Simple concentration : 1 mL
- Double concentration : 10 mL

Milieu simple concentration :

- Ajouter 0,1 mL de la solution stérile de tellurite de potassium à 1 % dans chaque tube nécessaire.
- Transférer 1 mL d'inoculum et de ses dilutions décimales successives dans chaque tube de bouillon simple concentration.
- Bien mélanger tous les tubes par retournement en évitant l'incorporation d'air.
- Couler un bouchon de gélose blanche stérile maintenue à 44-47 °C
- Laisser refroidir et incuber pendant 24 h à 37 °C.
- Si le tube ne présente pas de noircissement ou de précipité, prolonger l'incubation de 24 h.

✓ **Incubation :**
24 h et 48 h à 37 °C

7 LECTURE

Repiquer les tubes présentant un noircissement ou un précipité noir après 24 h d'incubation sur une gélose de Baird-Parker au jaune d'œuf tellurite (BM018) ou sur des boîtes de gélose de Baird-Parker RPF pré-coulées (BM067).
Après 48 heures d'incubation, repiquer tous les autres tubes.
Incuber toutes les boîtes pendant 48 heures à 37 °C.

La présence de colonies caractéristiques confirme la présence de Staphylocoque à coagulase positive dans les tubes. En déduire le Nombre le Plus Probable ou la présence du germe spécifié.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre beige clair, fluide et homogène.

Milieux préparés : solution ambrée, limpide.

Réponse culturale après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 37 °C, puis subcultures (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00034 WDCM 00013	> 10 colonies caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	Inhibée

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Milieux de base prêts-à-l'emploi (simple et double concentration) en tubes : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieux de base préparés en tubes (*): 180 jours à 2-8 °C.

Milieux complets préparés en tubes avec tellurite (*) : utiliser le jour de la préparation.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté (sans tellurite de potassium) :

Flacon de 500 g BK159HA

Milieu de base prêt-à-l'emploi (sans tellurite de potassium) :

Coffret de 50 tubes de 10 mL (milieu simple concentration) BM11008

Coffret de 50 tubes de 10 mL (milieu double concentration) BM11108

Agar américain :

Flacon de 500 g A1010HA

Agar européen :

Flacon de 500 g A1012HA

11 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Giolitti, G., and Cantoni, C.. 1966. A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. Journal of Applied Bacteriology, **29** : 395-398.

NF EN ISO 6888-3. Juin 2003. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 3 : Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BOUILLON GIOLITTI CANTONI_FR_V8.

Date création : 01-2004

Date de révision : 03-2016

Motif de révision : Révision générale.