



REPERTOIRE DES RECETTES EN VIGUEUR AU LNPV

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
MOA REP 001 version 1a	Mai 2010	Août 2010		
MOA REP 001 version 2	Sans objet	Sans objet	Septembre 2010	

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
PREAMBULE.....	6
Objet des méthodes officielles.....	6
Glossaire, abréviations et documents connexes	6
Considérations d'ordre métrologique.....	6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification	7
ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS.....	8
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE	9
Modifications	9
Améliorations.....	9
DESCRIPTION DE LA METHODE.....	10
1. Objet.....	10
2. Domaine d'application.....	10
3. Exigences générales	10
3.1. Personnel, équipements et consommables	10
3.2. Pratiques pour le contrôle qualité.....	10
3.3. Le contrôle qualité des milieux	11
3.4. Les antibiotiques et assimilés	11
4. Le répertoire des recettes	11
4.1. Les tampons et solutions	12
Chloroforme : alcool isoamylique 24/1	15
densité 1,18.....	15
eau physiologique tamponnée	12
GEB	12
glycérine tamponnée	15
Lugol	12
MgSO ₄	15
PBS ELISA 1 N.....	13
PBS ELISA 5 N.....	14
PBS T 1 X	14
Solution d'iode de sodium (NaI) 6M	18
Solution de bleu d'Evans	14
Solution de KOH.....	12
Solution enzymatique.....	15
Suspension de silice.....	18

Tampon carbonate	12
Tampon conjugué.....	13
Tampon d'acide maléique	14
Tampon de broyage CTAB 3%	16
Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%).....	13
Tampon de broyage PBS-T-PVP	13
Tampon de broyage Vigne	13
Tampon de charge	16
Tampon de coating	13
Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde).....	14
Tampon de détection.....	14
Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde)	14
Tampon de lavage (pour ELISA).....	13
Tampon de macération anti-oxydant	18
Tampon de macération PVPP 1X	16
Tampon de macération	12
Tampon de reprise de culot	12
Tampon de rinçage	14
Tampon de saturation.....	14
Tampon Edwards	16
Tampon IF	15
Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2).....	12
Tampon substrat.....	14
Tampon TENPP.....	16
Tampon Tris 7-9	17
<i>Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X.....</i>	<i>17</i>
Tampon Tris EDTA (TE).....	17
Tampon Tris EDTA (TE).....	17
Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8).....	17
Tampon TRIS-PVP	19
TBST 10X	16
4.2. Les milieux de culture non sélectifs.....	20
Milieu d'isolement (mycologie).....	20
Milieu King B	20
Milieu LPG	20
Milieu LPGA	20
4.3. Les milieux de culture sélectifs.....	21
DCPA.....	21
Milieu Amidon.....	21
Milieu Arginine.....	21
Milieu ARJ.....	21
Milieu Citrate de Simmons	22
Milieu EPN	22
Milieu Esculine	22
Milieu gélatine de Frazier	22
Réactif de Frazier.....	22
Milieu gélose au lait.....	22
Milieu GYCA.....	22
Milieu KBCA.....	23
Milieu de Hugh et Leifson	23
NCTM4.....	24
Milieu PDA.....	24
Milieu SNA.....	25

Milieu Sutton	25
Milieu Urée-.....	26
Indole	26
4.4. Les milieux d'identification	27
Milieu BCYE	27
Milieu CCT.....	27
Milieu Kelman.....	27
Milieu King B "Pois"	28
Milieu LBCA	28
Milieu M2' de Luisetti	28
Milieu mCS20ABN	29
Milieu mFS	29
Milieu MNTA	30
Milieu NSCAA.....	30
Milieu PTSCA.....	30
Milieu SMSA modifié.....	31
Milieu SNA	31
Milieu SRS	31
Milieu Wilbrink	31
Milieu YDC	32
ANNEXE SOLUBILITE DES ANTIBIOTIQUES ET PRODUITS.....	33
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	34
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE.....	35

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'Agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	volume < à 10 mL : EMT = \pm 10% Volume \geq à 10 mL : EMT = \pm 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = \pm 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = \pm 4°C congélateur : \leq -18°C congélateur froid intense : \leq -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'Agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'Agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ». Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente méthode a été élaborée par le pôle « Développement de méthodes » du LNPV sur la base des publications internationales disponibles et des modes opératoires internes des différentes stations du LNPV.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

La présente version les modifications suivantes par rapport à la version 1a soumise à consultation publique :

- la durée de conservation des tampons est rendue plus flexible en laissant la possibilité de les conserver 1 mois et non 15 jours sous réserve que les témoins des analyses donnent les résultats attendus, ceci afin de mettre en cohérence avec la plupart des méthodes officielles spécifiques ;
- la possibilité d'une alternative à l'autoclavage systématique des tampons est offerte par l'utilisation d'eau distillée autoclavée, l'autoclavage des tampons pouvant, dans certains cas, altérer la qualité des composants chimiques ;
- ajouts de recettes pour la nématologie et d'autres analyses ;

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

L'objet de la présente méthode officielle est de donner la composition et le mode opératoire (« recette ») pour la fabrication des principaux tampons, solutions et milieux utilisés dans les analyses de détection ou identification d'organismes nuisibles dans le domaine de la phytopathologie.

Ce recueil a été élaboré en vue du regroupement des recettes des tampons, solutions et milieux pouvant être communs à plusieurs méthodes officielles, plusieurs organismes nuisibles. S'agissant des milieux, les différentes recettes ont été réparties en milieux non sélectifs, semi-sélectifs et sélectifs (voir explications ci-après) selon leur degré de sélection.

2. Domaine d'application.

La présente méthode s'applique communément à toutes les méthodes d'analyse officielles réalisées dans le domaine de la phytopathologie pour le compte du ministère chargé de l'Agriculture. Ces dernières renvoient systématiquement au présent répertoire sous la référence REP 001.

Bien que publiés comme méthode officielle et donc d'application obligatoire en vue d'une harmonisation des pratiques pour les analyses effectuées en vue de la détection des organismes nuisibles sur les végétaux, les milieux et tampons proposés ci-après les laboratoires peuvent, le cas échéant, être modifiés par les laboratoires pour autant :

- qu'ils soient en mesure de justifier soit d'une expérience significative avec le milieu modifié soit de publications scientifiques correspondantes ;
- qu'ils en aient informé le laboratoire national de référence.

Ils doivent en outre avoir obtenu des résultats satisfaisants aux essais d'aptitude.

3. Exigences générales

3.1. Personnel, équipements et consommables

Pour la fabrication des milieux, tampons, solutions,... le laboratoire doit faire appel à du personnel autorisé et des équipements et consommables appropriés.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, les produits et les consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs en ce qui concerne les conditions de stockage avant utilisation ainsi que les modalités de conservation en cours d'utilisation seront suivies. En l'absence de telles données, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

3.2. Pratiques pour le contrôle qualité

Les dispositions du point 4 de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000¹ (partie non reproduite) sont applicables pour la fabrication des milieux, tampons et solutions en ce qui concerne :

- la documentation (point 4.1 de ladite norme) ;
- la conservation (point 4.2 de la norme) à l'exception des éléments donnés ci-après ;
- la préparation des milieux en laboratoire (point 4.3 de la norme) ;
- la préparation avant utilisation (point 4.4 de la norme) ;
- la mise au rebut des milieux (point 4.5 de la norme).

¹ *Microbiologie des aliments – Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 1 : guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

S'agissant de la conservation des solutions et tampons, sauf indications contraires, une fois stérilisés, ils peuvent être conservés 6 mois dans un endroit sec et ventilé, à l'abri de la lumière et de la poussière. A l'ouverture, les flacons stérilisés sont à utiliser dans le mois. Cette durée peut être portée à 15 jours dans certains cas. Les flacons non autoclavés sont à utiliser au maximum dans un délai de 15 jours.

Il est préconisé de réaliser la stérilisation par autoclavage à environ 120°C pendant 20 min sauf indications contraires.

Les milieux de culture doivent quant à eux être utilisés dans un délai de 2 mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les deux mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu est réalisé. En cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou prolifération microbienne, il convient d'éliminer tout le lot de milieu.

3.3. Le contrôle qualité des milieux

Les milieux (cf. point 4.3) font l'objet de contrôle qualité physique et microbiologique conformément aux dispositions des points 5.1 et 5.2 de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000 (en ce qui concerne les contrôles qualitatifs).

En l'occurrence, chaque lot de fabrication² d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire) donnera lieu à une vérification sur au moins :

- 1 souche pour les milieux non sélectifs ou sélectifs ;
- 2 souches pour les milieux de différenciation : l'une devant être inhibée, la seconde ne devant pas l'être.

3.4. Les antibiotiques et assimilés

La pesée et de manière plus générale la manipulation des antibiotiques et assimilés est considérée comme critique lors de la fabrication des milieux sélectifs. Les laboratoires doivent mettre en œuvre des procédures adaptées pour la réalisation de ces tâches.

Ces procédures devront nécessairement intégrer les aspects liés à la sécurité des opérateurs.

4. Le répertoire des recettes

Pour le présent répertoire, « milieu non sélectif », « milieu d'isolement sélectif », « milieu de différenciation » s'entendent au sens de la norme ISO/TS 11133-1 : 2000 (respectivement points 3.3.4.5.2, 3.3.4.5.1 et 3.3.4.6).

Remarque 1 : s'agissant de l'eau, utilisée pour la fabrication de nombreux tampons, solutions et milieux, sauf indication contraire, l'eau distillée peut être remplacée par de l'eau déminéralisée, (bi)distillée ou osmosée (voir aussi point 4.3.2. de la norme précitée).

Remarque 2 : les laboratoires peuvent choisir d'autoclaver l'eau ou utiliser de l'eau autoclavée et non d'autoclaver les tampons préparés si la qualité des composants chimiques utilisés est susceptible d'être altérée. OK

² On entend par lot de fabrication l'ensemble des boîtes, tubes, flacons,... issus d'une même pesée par le même opérateur le même jour à partir des mêmes numéros de lots de fabrication des composants. Ex : si 2 litres de LPGA ont été fabriqués dans un même flacon de 2 L avec chacun des composants définis pour 1 litre x 2, autoclavé et réparti en boîte = 1 lot. Si 2 flacons ont été préparés, chacun ayant donné lieu à des pesées différentes, même s'il s'agit du même opérateur et que la préparation a été faite le même jour, il s'agira de 2 lots distincts.

4.1. Les tampons et solutions

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
GENÉRIQUE ³	<u>eau physiologique tamponnée</u>		Voir PBS (0,01 M, pH = 7,2)		
GENÉRIQUE	<u>Lugol</u>		Iode :5,0 g Iodure de potassium : 10,0 g Eau distillée 100 mL Utilisation en diluant au 1/5 ^{ème} dans de l'eau distillée	Conservation en bouteille en verre fumé	15
GENÉRIQUE	<u>Solution de KOH</u>	Potasse	Hydroxyde de potassium (KOH)3,0 g Eau distillée 100 mL		23)
GENÉRIQUE	<u>Tampon de reprise de culot</u>		Hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O)2,70 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O).....0,40 g Eau distillée 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENÉRIQUE	<u>Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2)</u>	eau physiologique tamponnée, tampon IF	Chlorure de sodium (NaCl).....8,0 g Hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O)2,7 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O)0,4 g Eau distillée 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENÉRIQUE	<u>Tampon de macération</u>		Hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O) 10,74 g Potassium phosphate, dibasique (KH ₂ PO ₄)2,72 g Eau distillée 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par autoclavage	1 et 4
ELISA	<u>GEB</u>		Sodium sulfite anhydre.....1,3 g Ovalbumine2 g PVP20 g Tween 20.....20,5 g PBS 1,0 L	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	<u>Tampon carbonate</u>	Tampon de coating	Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) 1,59 g Hydrogencarbonate de sodium (NaHCO ₃).....2,93 g Eau distillée 1000 mL pH = 9,6	Stériliser par autoclavage	

³ Générique : pouvant être utilisé dans des manipulations faisant appel à différentes techniques

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
ELISA	<u>Tampon conjugué</u>		Tampon PBS-T 10,0 mL Albumine sérique bovine (BSA) 0,02 g <i>Remarque : du PVP peut être ajouté selon les recommandations du fournisseur</i>	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage PBS-T-PVP</u>		Polyvinylpyrrolidone (PVP 25) 20 g PBS-T 1X 1000 mL	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%)</u>		Polyvinylpyrrolidone (PVP 40) 5 g Sulfite de sodium 0,325 g Albumine sérique bovine (BSA) 0,5 g Tween 20 5 g PBS-T 1X 100 mL pH = 8,0	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	<u>Tampon de broyage Vigne</u>		Trizma® Base (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃) 24,3 g Chlorure de sodium (NaCl) 8,0 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 40) 20,0 g Tween 20 0,5 mL Pour tampon 1X qsp 1000 mL Pour tampon 10X qsp 100mL pH = 8,0	Stériliser par autoclavage	
ELISA	<u>Tampon de coating</u>		Voir tampon carbonate		
ELISA	<u>Tampon de lavage (pour ELISA)</u>	PBS-T 1 X	Tween 20 0,5 mL PBS ELISA 1 N 1000 mL* pH = 7,4 <i>* ou 800 mL d'eau distillée + 200 mL de PBS ELISA 5N</i>	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	<u>PBS⁴ ELISA 1 N</u>	PBS 1X	Chlorure de sodium (NaCl) 8,0 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄) 0,2 g Hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O) 2,9 g (ou Na ₂ HPO ₄ anhydre 1,15 g) Chlorure de potassium (KCl) 0,2 g Eau distillée qsp 1000 mL pH = 7,4	Stériliser par autoclavage	

⁴ Phosphate Buffered Saline

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
ELISA	<u>PBS ELISA 5 N</u>		NaCl 40,0 g KH ₂ PO ₄ 1,0 g Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O 14,5 g KCl 1,0 g Eau distillée qsp 1000 mL pH = 7,4	Stériliser par autoclavage	
ELISA	<u>PBS T 1 X</u>	Tampon de lavage	Voir tampon de lavage pour ELISA		
ELISA	<u>Tampon substrat</u>	Tampon diéthanolamine	Diéthanolamine 97,0 mL Eau distillée qsp 1000 mL pH = 9,8 (à ajuster avec une solution HCl concentrée). <i>Certains fabricants préconisent également l'ajout de 0,1 g de MgCl</i>	Avant utilisation, dissoudre 1 mg de pNPP dans 1 mL de tampon substrat.	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon d'acide maléique</u>		Chlorure de sodium (NaCl) 17,5 g Acide maléique 23,2 g Eau distillée qsp 2000 mL pH = 7,5	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de saturation</u>	Tampon de "blocking"	Solution stock de blocking Reagent 10% 10 mL Tampon d'acide maléique 90 mL		
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de détection</u>		Tris 12,114 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,844 g Eau distillée qsp 1000 mL pH = 9,5	Ajuster le pH avec de l'HCl .	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde)</u>		SCC 20 X 180 mL Formaldéhyde à 37% 120 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde)</u>		SCC 20 X 8 mL Formaldéhyde à 37% 2 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	<u>Tampon de rinçage</u>		Tampon d'acide maléique 1000 mL Tween 20 3 mL		
IF	<u>Solution de bleu d'Evans</u>	Contre-marqueur	Bleu d'Evans 100 mg PBS (0,01 M, pH = 7,2) qsp 10 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C, à l'abri de la lumière	

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
IF	<u>glycérine tamponnée</u>		Hydrogénophosphate de disodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$) 3,2 g Dihydrogénophosphate de sodium ($\text{Na H}_2\text{PO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$) 0,195 g Glycérol (glycérine bidistillée) 50 mL Eau distillée 100 mL pH = 7,6	Aliquotage en microtube Stériliser par autoclavage Aliquots à usage unique	12
IF	<u>Tampon IF</u>	tampon PBS, eau physiologique tamponnée	Voir tampon de rinçage (PBS 0,01 M, pH = 7,2) - générique		
NEMATOLOGIE	<u>MgSO4 densité 1,18</u>	Liquide de séparation	MgSO4 environ 7,2 kg Eau (chaude) environ 12 L Ajuster la densité après mélange complet et refroidissement à 1.18 avec de l'eau ou du MgSO4	Après ajustement, Filtrer sur un tamis de 40 μm pour éliminer toute pollution et stocker la solution dans un fût en plastique à température ambiante. Maintenir la solution à l'abri de la lumière afin d'éviter le développement d'algues Matériel spécifique nécessaire : Fût de stockage, Cuvette, Récipient circulaire de plus de 15 L, en plastique (seau ou baignoire), Agitateur, Entonnoir, Epruvette graduée de grand volume, Tamis de 40 μm , densimètre	
NEMATOLOGIE	<u>Solution enzymatique</u>		Pectinase 15% 150 Cellulase 30% 300 mL Eau qsp 1 L	Mélanger jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Conserver la préparation au frais dans le réfrigérateur, pendant une durée maximale de 2 mois. En cas d'apparition de moisissures dans la bouteille, passer la préparation sur un filtre papier ou sur un tamis de 40 μm avant utilisation.	
PCR	<u>Chloroforme : alcool isoamylique 24/1</u>		Chloroforme 24 mL Alcool isoamylique 1 mL		

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
PCR	<u>TBST 10X</u>		NaCl80 g Na NO ₃2 g KCl2 g Tween 20..... 5 mL Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃).....24 g Eau distillée qsp 1 L pH = 7,4 pour solution 1 X		
PCR	<u>Tampon de broyage CTAB 3%</u>		CTAB30 g NaCl 81,81 g EDTA.....7,44 g Tris HCl ou Trizma® base..... 121,1 g Eau distillée 700 mL pH = 8,0 Eau distillée qsp1000 mL	Ajuster le pH avec environ 20 mL d'HCl concentré	7
PCR	<u>Tampon de charge</u>	Solution de bleu de charge	Bleu de bromophénol0,065 g Glycérine bidistillée stérile (glycérol).....7,5 g Eau ultra pure stérile 25 mL	La glycérine bidistillée est parfois remplacée par du saccharose, du xylène cyanol,... dans certaines compositions. La dilution se fait également parfois dans du TBE 0.5X ou du TE x1	
PCR	<u>Tampon Edwards</u>	tampon de lyse	Trizma® hydrochloride (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃ HCl) 1,58 g Chlorure de sodium (NaCl).....0,73 g EDTA, 2H ₂ O 0,46 g Dodecyl sulfate de sodium (SDS)..... 0,25 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 360) 1,0 g Eau distillée 50 mL	Stériliser par autoclavage possible	20
PCR	<u>Tampon de macération PVPP 1X</u>		Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 10,0 g Eau distillée 1000 mL	Stériliser par autoclavage possible	
PCR	<u>Tampon TENPP</u>	Tampon d'extraction d'ADN à partir de sol	Trizma Sigma 7-9®0,61 g EDTA.....0,75 g Chlorure de sodium (NaCl)..... 0,59 g Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)5,0 g Eau distillée 100 mL		14

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
PCR	<u>Tampon Tris 7-9</u>	Tampon d'extraction d'ADN à partir de sol	Trizma Sigma 7-9® 1,2 g Eau distillée 1000 mL		14
PCR	<u>Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X</u>		Trizma base (Tris[hydroxyméthyl] aminométhane (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃) 108 g Acide borique 55 g EDTA 0,5 mol.L ⁻¹ 40 mL Eau distillée 700 mL pH = 8,0 Eau distillée 1000 mL NB : la fabrication de TBE 5X est également possible. Adapter en conséquence les quantités	Il est recommandé de se procurer cette solution tampon toute prête à la concentration 10 X. Le TBE est ensuite dilué dans de l'eau osmosée à 0.5 X pour son utilisation pour la préparation des gels d'électrophorèse et du tampon d'électrophorèse. Il est toutefois envisageable de le fabriquer soi-même en l'autoclavant avant emploi.	
PCR	<u>Tampon Tris EDTA (TE)</u>		EDTA 50 mM Tris-HCl 10 mM pH = 8,0		
PCR	<u>Tampon Tris EDTA (TE)</u>		EDTA anhydre 0,34 g Tris 1,21 g Eau distillée 50 mL pH = 8,0 Eau distillée qsp 1000 mL	Selon exigences ISO 21571	
PCR	<u>Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8)</u>		Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃) 1,21 g HCl 25% Eau Ultra Pure 100 mL pH = 8,0	a) Préparer 1.21 g de Tris b) Ajouter 80 ml d'Eau Ultra Pure) Ajuster le pH à 8 en ajoutant goutte à goutte HCl à 25% Compléter 100 ml d'Eau Ultra Pure	

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
Spécifique	<u>Solution d'iodure de sodium (NaI) 6M</u>		Na ₂ SO ₃ 0,75 g NaI 45 g Eau distillée 40 mL	Dissoudre 0,75 g de Na ₂ SO ₃ dans 40 mL d'eau déminéralisée. Ajouter 45 g de NaI et agiter jusqu'à dissolution. Filtrer sur papier et stocker à l'obscurité à 5°C. Ne pas conserver si un précipité apparaît.	16)
Spécifique	<u>Suspension de silice</u>		silice 15 g eau ultra pure 2 x 100 mL HCl 1 N	Suspendre 15 g de silice dans 100 mL d'eau ultra pure dans une éprouvette graduée de 100 mL. Bien mélanger et laisser sédimenter pendant 24 heures à température ambiante. Aspirer 85 mL de surnageant et ajouter 100 mL d'eau ultra pure. Remettre en suspension la silice et laisser sédimenter pendant 5 heures. Aspirer 90 mL de surnageant. Ajuster à pH 2,0 avec du HCl 1 N Aliquoter en petit volume et stériliser par autoclavage. Stocker à 5°C.	16)
Spécifique	<u>Tampon de macération anti-oxydant</u>		PVP 10 (polyvinylpyrrolidone).....20,0 g D- mannitol 10,0 g Acide ascorbique..... 1,76 g Glutathion réduit.....3,0 g Tampon PBS ELISA 1N qsp 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par filtration (0.22µm). Conservation 6 mois, 2 mois après ouverture.	

<u>Technique</u>	<u>Nom du tampon ou de la solution</u>	<u>Synonyme (s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Réf.</u>
Spécifique	<u>Tampon TRIS-PVP</u>		Trizma® base (NH ₂ C-(CH ₂ OH) ₃)24,23 g NaCl8,0 g PVP4020,0 g Tween 200,5 mL Eau distillée qsp1,0 L pH = 8,0	Stériliser par autoclavage.	

4.2. Les milieux de culture non sélectifs

<u>Nom du milieu</u>	<u>Synonyme(s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Ref.</u>
<u>Milieu d'isolement (mycologie)</u>		Extrait de Malt 12 g Chloramphénicol (200 ppm)2 mL Agar Agar 15 g Eau osmosée 1000 mL		
<u>Milieu King B</u>	Milieu KB	Protéose - peptone n°320,0 g Glycérol (glycérine bidistillée)10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄)1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O).....1,50 g Agar bactériologique de type A15,0 g Eau distillée..... 1000 mL pH=7.2	Stériliser par autoclavage Avant de couler le milieu, il est recommandé d'incorporer stérilement 0,05 g de cycloheximide .	11)
<u>Milieu LPG</u>		Extrait de levure 5,0 g Peptone 5,0 g Glycérol (glycérine bidistillée) 150 mL Eau distillée..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage. Stocker les flacons à 4°C +/- 3°C. Prévoir de mettre le flacon à température ambiante 2 à 3 jours avant utilisation. Avant utilisation, vérifier l'absence de trouble dans le flacon.	
<u>Milieu LPGA</u>		Extrait de levure 5,0 g Peptone 5,0 g D(+) Glucose.....10,0 g Agar Bacto® Difco15,0 g Eau distillée..... 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par autoclavage. Avant de couler le milieu, il est recommandé d'incorporer stérilement 50 mg de cycloheximide .	12)

4.3. Les milieux de culture sélectifs

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>DCPA</u> (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)		Peptone bactériologique 15,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O) 0,5 g Chloramphénicol (solution éthanolique*) 2,0 mL Dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) (solution éthanolique**) 1,0 mL Crystal violet (solution aqueuse***) 1,0 ml Agar 15,0 g Eau distillée 1000 mL * : 10,0±0,1 g de chloramphenicol dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 3 mois. ** : 0,20±0,01 g de dichloran dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 6 mois. *** : 0,05±0,01 g de crystal violet dans 100±2 ml d'eau distillée ou osmosée, conservable à 5±3°C pendant 6 mois.	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.	5)
<u>Milieu Amidon</u>		Bouillon nutritif 8,0 g Amidon soluble de pomme de terre 10,0 g Agar Bacto® Difco 15,0 g Eau distillée 1000 mL	Stériliser par autoclavage	15)
<u>Milieu Arginine</u>	Thornley, ADH	Peptone 1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 0,3 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Rouge de phénol 0,01 g L(+) arginine (monohydrochloride) 10,0 g Agar bactériologique de type A 3,0 g Eau distillée 1000 mL pH = 7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	12)
<u>Milieu ARJ</u>	Milieu Ayers, Rupp et Johnson	Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH ₄ H ₂ PO ₄) 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O) 0,2 g Chlorure de potassium (KCl) 0,2 g Bleu de bromothymol 0,03 g Agar bactériologique de type A 6,0 g Eau distillée 1000 mL pH = 7 à 7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon (l'ajout d'agar est facultatif). Stériliser par autoclavage puis dissoudre la source carbonée et l'ajouter stérilement. Ajuster la couleur si nécessaire.	6)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu Citrate de Simmons</u>		Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH ₄ H ₂ PO ₄) 1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄)..... 1,0 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Bleu de bromothymol..... 0,15 g Citrate de sodium anhydre (C ₆ H ₇ NaO ₇) 2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)0,20 g Agar bactériologique de type A20,0 g Eau distillée..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage (Distribution en pente gélosée)	15)
<u>Milieu EPN</u>	Eau peptonée nitratée	Bactopeptone10,0 g Nitrate de potassium (KNO ₃) 1,0 g Eau distillée..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	8)
<u>Milieu Esculine</u>		Peptone10,0 g Citrate ammoniacal de fer III (Fe ₂ O ₃ , NH ₄)0,50 g Esculine 1,0 g Agar bactériologique de type A12,0 g Eau distillée..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	12)
<u>Milieu gélatine de Frazier</u>		Extrait de levure 3,0 g Peptone 5,0 g Gélatine40,0 g Agar bactériologique de type A15,0 g Eau distillée..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	8)
<u>Réactif de Frazier</u>		Sulfate de diammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄)76,0 g Eau distillée 100 mL	Ne pas autoclaver	21)
<u>Milieu gélose au lait</u>		<u>Préparation A</u> Extrait de levure 5,0 g Agar nutritif23,0 g Eau distillée..... 1000 mL <u>Préparation B</u> Lait écrémé en poudre.....10,0 g Eau distillée..... 100 mL	Préparer séparément les préparations A et B et les stériliser par autoclavage. les milieux sont laissés à refroidir suffisamment pour pouvoir les mélanger et répartir en boîtes de Petri.	15)
<u>Milieu GYCA</u>		D(+) glucose 2,5 g Extrait de levure 2,5 g Carbonate de calcium (CaCO ₃)20,0 g Agar bactériologique de type A 7,5 g Eau distillée..... 500 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir 100 mL en flacon de 250mL puis stériliser par autoclavage Bien agiter pour mettre en suspension le CaCO ₃ avant chaque répartition.	13)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu KBCA</u>		<u>Milieu de base = milieu King B</u> <u>Antibiotiques et autres produits</u> <ul style="list-style-type: none"> • céphalexine 40 mg/L • cycloheximide (Actidione) 50 mg/L 	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	11)
<u>Milieu de Hugh et Leifson</u>		Peptone de caséine 2,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 0,30 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Bleu de bromothymol 0,03 g D(+) glucose 10,0 g Agar bactériologique de type A 3,0 g Eau distillée 1000 mL pH= 7,1	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage Ajuster la couleur si nécessaire.	10)
<u>Milieu Levane</u>		Extrait de levure 2,0 g Peptone 5,0 g D(+) saccharose 50,0 g Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Agar bactériologique de type A 20,0 g Eau distillée 1000 mL pH=7,2	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	3)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>NCTM4</u>		<p><u>Milieu de base</u> -Extrait de levure : 7g -Peptone : 7g -D(+) glucose : 7g -Agar : 18g eau distillée ou osmosée 1000 mL</p> <p><u>Antibiotiques et autres produits</u> -Pivmécillinam :100mg -Céphalexine :50mg Triméthoprim :10mg -Néomycine :3mg -Propiconazole (20mg/L) : 80µL pH=7,2</p>	Après autoclavage à environ 120°C pendant 20 minutes et refroidissement à 50°C ± 5°C ajouter stérilement les antibiotiques et produits suivants à partir de solutions mères (filtrer les solutions mères (membrane 0,2µm) avant ajout).	19)
<u>Milieu PDA</u>	Potato Dextrose Agar	PDA en poudre (Difco) 39 g eau distillée ou osmosée 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
<u>Milieu SNA</u>	Spezieller Nährstoffärrme r Agar	Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄)..... 1,0 g Nitrate de potassium (KNO ₃) 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O) 0,5 g Chlorure de potassium (KCl) 0,5 g Glucose 0,20 g Saccharose 0,20 g Agar 2 g eau distillée ou osmosée 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe	9)
<u>Milieu Sutton</u>		Hydroxyde de sodium (NaOH 1 N)2,6 mL Solution de chlorure de calcium (CaCl ₂ , 2H ₂ O)) 1,0 g* Extrait de levure0,50 g Bleu de bromothymol.....0,008 g Eau distillée..... 100 mL Sels de sodium d'acide polygalacturonique..... 1,50 g** *dissoudre 1g dans 10 mL d'eau distillée, ajouter ensuite 1,2 de cette solution dans le milieu. **ajouter ce produit en dernier, si le milieu n'est pas suffisamment gélatineux , ajouter en plus jusqu'à 1,2 mL de la solution de chlorure de calcium	Placer le bêcher dans un bain marie à 100°C pendant environ 5 minutes en agitant de temps en temps. Recouvrir le bêcher de papier aluminium. Stériliser par autoclavage (Distribution en pente gélosée).	
<u>Milieu Tween 80</u>		<u>Milieu de base :</u> Peptone10,0 g Bromure de potassium (BrK)10,0 g Chlorure de calcium (CaCl ₂)0,34 g Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL <u>Antibiotiques et autres produits</u> Tween 80 stérile10,0 mL Cycloheximide75,0 mg Céphaléxine25,0 mg 5-Fluorouracil6,0 mg Tobramycine0,4 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	15)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
<u>Milieu Urée-Indole</u>	Urée Indole de Ferguson	L-tryptophane 0,3 g Dihydrogénophosphate de potassium(KH_2PO_4) 0,1 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4).....0,1 g Chlorure de sodium (NaCl)..... 0,5 g Urée..... 2,0 g Rouge de phénol (sol. à 1% dans éthanol) 0,25 mL Eau distillée..... 100 mL	Dissoudre le tryptophane dans l'eau chauffée à environ 80°C, laisser refroidir suffisamment pour pouvoir rajouter les autres produits. Après dissolution, stériliser le milieu par filtration.	8)

4.4. Les milieux d'identification

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu BCYE</u>		ACES (C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₄ S) 5,0 g Extrait de levure..... 5,0 g Charbon actif..... 1,0 g Agar Bacto® Difco 8,5 g Eau distillée qsp 500 mL pH = 6,9 <u>Produits</u> L- cystéine HCl 200 mg Pyrophosphate de fer soluble..... 125 mg	Diluer l'ACES dans environ 250 mL d'eau distillée et le dissoudre à environ 50°C Ajouter les autres produits , et ajuster le pH Stériliser par autoclavage puis dissoudre les produits indiqués et les ajouter stérilement.	15)
<u>Milieu CCT</u>		Saccharose 100,0 g Sorbitol 10,0 g Sodium tetradecyl sulfate (Niaproof) 1,2 mL Agar nutritif 23,0 g Crystal Violet (solution 0,1% dans éthanol) 2,0 mL pH= entre 7 et 7,2 <u>Antibiotiques</u> Nitrate de thallium (solution 0,1% dans eau) 2,0 mL Cycloheximide 0,05 g	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	17)
<u>Milieu Kelman</u>	Milieu TTC (triphenyl tetrazolium salt)	Hydrolysate acide de caséine (casamino acid) 1,0 g D (+) glucose 5,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)..... 0,10 g Saccharose 10,0 g Gélatine en poudre 30,0 g Agar bactériologique de type A 16,0 g pH=6,8		15)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu King B</u> <u>"Pois"</u>	Milieu KBBCA	Protéose - peptone n°3 (Difco) 20,0 g Glycérine bidistillée (Glycérol) 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)..... 1,50 g Acide borique..... 1,50 g Agar bactériologique de type A 15,0 g Eau distillée 1000 mL <u>Antibiotiques</u> céphalexine..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione) 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu LBCA</u>	Milieu levane borate cycloheximide céphalexine	Saccharose 50,0 g Extrait de levure..... 2,0 g Bactopeptone..... 5,0 g Acide borique..... 1,5 g Soude (NaOH) 2,0 ml Agar bactériologique de type A 15,0 g Eau distillée 1000 mL <u>Antibiotiques</u> céphalexine..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione)..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu M2' de Luisetti</u>		Hydrolysate acide de caséine (casamino acid) 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)..... 0,10 g Saccharose 10,0 g Gélatine en poudre 30,0 g Agar bactériologique de type A 16,0 g pH=6,8	Stériliser par autoclavage	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
Milieu mCS20ABN		Peptone de soja 2,0 g Bacto tryptone.....2,0 g Hydrogénophosphate de diammonium ((NH ₄) ₂ HPO ₄)..... 0,80 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)..... 0,40 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)..... 1,0 g L-glutamine 6,0 g L-histidine 1,0 g D(+) Glucose 1,0 g Amidon soluble 25,0 g (ou amidon de pomme de terre 15,0 g) Agar bactériologique de type A 15,0 g Eau distillée 1000 mL pH=6,5 <u>Antibiotiques</u> cycloheximide 200 mg bacitracine 100 mg neomycine sulfate 40 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
Milieu mFS	modified Fieldhouse- Sasser agar	Amidon soluble 25,0 g (ou amidon de Pomme de terre)..... 15,0 g) Extrait de levure 0,10 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)..... 0,80 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 0,80 g Nitrate de potassium (KNO ₃) 0,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)..... 0,10 g Methyl green (solution aqueuse 1%) 1,50 mL Agar bactériologique de type A 15,0 g Eau distillée 1000 mL <u>Antibiotiques et autres produits</u> cycloheximide 200 mg D- Méthionine (sol à 1%)..... 3 mL pyridoxine HCl (sol à 1%) 1 mL cephalexine 50 mg trimethoprime 30 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu MNTA</u>		<p><u>Milieu de base</u> Extrait de levure 2,0 g D(-) mannitol 2.5 g Potassium phosphate, dibasique (K₂HPO₄) 0,25 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) 0,25 g Chlorure de sodium (NaCl) 0,05 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO₄, 7H₂O) 0,10 g Agar bactériologique de type A 16,0 g Sulfate de manganèse (MnSO₄, H₂O) 15 mg Sulfate de fer (FeSO₄, H₂O) 5 mg Eau distillée 1000 mL pH = 7,2</p> <p><u>Antibiotiques et autres produits</u> acide nalidixique (sol à 1%) 2 mL amphotéricine B 10 mg trimethoprime 60 mg</p>	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	<u>4</u>
<u>Milieu NSCAA</u>	Nutrient Starch Cycloheximide Antibiotic Agar	<p>Agar nutritif 23,0 g Amidon soluble 25,0 g (ou amidon de Pomme de terre 15,0 g) Eau distillée 1000 mL</p> <p><u>Antibiotiques:</u> cycloheximide 200 mg nitrofurantoïne 10 mg* vancomycine (sol à 2 mg/mL) 250 µL</p>	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
<u>Milieu PTSCA</u>		<p>Bactopectone 10,0 g L-tyrosine 1,0 g Amidon de pomme de terre insoluble 4,0 g (soluble : 15,0g) Chlorure de sodium (NaCl) 5,0 g Agar Bacto® Difco 15,0 g Eau distillée 1000 mL</p> <p><u>Antibiotiques et autres produits</u> céphalexine 40 mg cycloheximide (Actidione) 50 mg</p>	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
<u>Milieu SMSA modifié</u>		Hydrolysate de caséine (casamino acid) 1,0 g Glycérine bidistillée (glycérol) 5,0 mL Peptone 10,0 g Agar Bacto® Difco 15,0 g Eau distillée 1000 mL pH = 6,5 <u>Antibiotiques et autres produits</u> crystal violet 5 mg sulfate de polymyxine B (env 600 000 U) 78 mg* bacitracine (env 1250 U) 18 mg* sels de tétrazolium (TZC) 50 mg pénicilline G (env 825 U) 0,5 mg* chloramphénicol 5 mg *vérifier selon fournisseur et le lot la quantité à peser	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	<u>1</u>
<u>Milieu SNA</u>	Spezieller Nährstoffärmer Agar	K ₂ HPO ₄ 1.0 g KNO ₃ 1.0 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g KCl 0.5 g Glucose 0,20 g Saccharose 0,20 g Agar 2 g H ₂ O distillée ou osmosée qsp 1000 mL	Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe	
<u>Milieu SRS (Klément Z et al. 1990)</u>		Extrait de boeuf 5,0 g Bactopeptone 10,0 g D(+) saccharose 40,0 g Eau distillée 1000 mL	Stériliser par autoclavage	
<u>Milieu Wilbrink</u>		Protéose peptone n°3 5,0 g Saccharose 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K ₂ HPO ₄) 0,5 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O) 0,25 g Nitrate de sodium (NaNO ₃) 0,25 g Agar bactériologique de type A 15,0 g Eau distillée 1000 mL pH entre 7 et 7,2 <u>Antibiotiques</u> cycloheximide 250 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre l'antibiotique et l'ajouter stérilement.	<u>22)</u>

<u>Nom du milieu</u>	<u>Synonyme(s)</u>	<u>Composition</u>	<u>Mode opératoire / précisions</u>	<u>Ref.</u>
Milieu YDC		Extrait de levure..... 10,0 g Glucose 20,0 g CaCO ₃ 20,0 g Agar bactériologique de type A 15,0 g	Autoclaver 15 minutes à environ 120°C. Bien agiter au préalable pour mettre en suspension le CaCO ₃ et utiliser en tube en pente gélosée ou en boîte de Pétri	

ANNEXE SOLUBILITE DES ANTIBIOTIQUES ET PRODUITS

(liste non exhaustive)

Nom Produit	Solvant
Acide nalidixique	soude
Amoxicilline	éthanol
Amphotéricine B	éthanol
Ampicilline	eau
Bacitracine	eau, éthanol
Carbenicilline	eau
Céfopérazone	eau
Céphalexine	soude
Céphalothine	eau
Chloramphénicol	éthanol
Crystal violet	éthanol
Cycloheximide	éthanol
L-Cystéine	eau
Erythromycine	eau ou éthanol
Gentamycine sulfate	eau
Kanamycine sulfate	eau
D méthionine	eau
Néomycine sulfate	eau
Nitrofurantoïne	eau
Novobiocine	eau
Pénicilline G	eau
Pipéracilline	eau
Polymyxine B sulfate	eau
Pyridoxine/HCl	eau
Pyrophosphate de fer	eau
Rifampicine	éthanol
Rifamycine	éthanol
sels de tétrazolium (TZC)	éthanol
Streptomycine sulfate	eau
Sulfadiazine	eau ou NaOH
Tétracycline	eau
Tobramycine	eau
Triméthoprime	éthanol
Tyrothricine	eau
Vancomycine	eau
5-Fluorouracyl	eau

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

- 1) Anonyme. Directive 2006/63/CE de la commission du 14 juillet 2006 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*
- 2) Anonyme. 2000. Norme ISO/TS 11133-1. Microbiologie des aliments – Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 1 : guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire.
- 3) Anonyme, 2004. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. **34**, 159-171
- 4) Anonyme. Directive 2006/56/CEE de la commission du 12 juin 2006 relatif à la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).
- 5) Andrews S., Pitt J., 1986. Selection medium for Fusarium species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. Appl. Environ. Microb.. 51 (6). 1235-1238. (milieu adapté par B. Cahagnier, INRA Nantes, comm. Pers.)
- 6) Ayers S.H., Rupp P., Johnson W.T., 1919. A study of the alkali forming bacteria in milk. USDA Bull., 782.
- 7) Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- 8) Freney *et al.* 1992. Manuel de bactériologie clinique volume 1. Collection optionBio Elsevier edition.
- 9) Gerlach, W. Nirenberg, H. 1982 The genus Fusarium-a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406. Links
- 10) Hugh, R., Leifson, E. 1953 The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 66, 24.)
- 11) King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D .E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301.
- 12) Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987) Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants - Methods in Plant Pathology vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).
- 13) Méthode Bhs/99/02 version b ces de haricot. Détection de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolica* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* par isolement sur milieux nutritifs.
- 14) Poussier, S., and J. Luisetti. 2000. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by nested-PCR-RFLP. Eur. J. Plant Pathol. 106:255–265.
- 15) Schaad *et al*, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria.APS Press. 3rd édition.373 p. Saint paul, Minnesota (US)
- 16) Ausubel *et al.*, 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, New York .
- 17) Ishimaru, C. et E.J. Klos. 1984. New medium for detecting *Ewinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74: 1342-1345.
- 18) Gerlach, W. Nirenberg, H. 1982 The genus Fusarium-a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 209, 1–406. Links

19) Laurent 2009

20) Manceau et al., 2005. Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. Bulletin OEPP/EPPO bulletin 35, 55-60

21) Kalys, Life science products manual 4th edition, p 160

22) Anonymous, 2003. OEPP/EPPO 03/10275-Diagnostic protocols for organisms harmful to plants
Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*

23) Suslow T.V. et al. 1983. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72:917-918.

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr**

Ce document est édité par :

**Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.