INFORMATION

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE,
DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

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
Bureau des semences et de la santé des végétaux

Adresse : 251 rue de Vaugirard - 75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Olivier DUFOUR - Tél : 01 49 55 81 64
Courriel institutionnel : bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr
Réf. Interne : BSSV/ 2010-11-009
MOD10.21 D 22/09/10

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8316

Date: 17/11/2010

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	Sans objet
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse :	Sans objet
Nombre d'annexes :	1
Degré et période de confidentialité :	aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA REP 001 version 1b relative au répertoire des recettes en vigueur au laboratoire national de la protection des végétaux (LNPV)

Références : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA REP 001 version 1b relative au répertoire des recettes en vigueur au LNPV.

Mots-clés : Méthode officielle d'analyse – MOA - analyses – recettes - tampons - solutions – milieux – milieux sélectifs – détection – identification

Destinataires

Pour information :
- DRAAF-SRAL
- DAF-SPV
- LNPV
- Laboratoires agréés

Pour la mise en œuvre des analyses de détection, d'identification ou de confirmation des organismes phytopathogènes de quarantaine, les laboratoires peuvent acheter des réactifs et/ ou des kits commerciaux mais sont souvent amenés à préparer des milieux, solutions, tampons,... en complément, et ce pour presque toutes les techniques (ELISA, immunofluorescence, isolement sur mileu, PCR,...)

Dans le double objectif d'une part d'harmonisation des pratiques entre laboratoires et d'autre part de facilitation du recours à des milieux communs entre les différentes méthodes d'analyses, un document unique regroupant les tampons, solutions et milieux a été élaboré. Ce document, appelé dans l'ensemble des méthodes officielles sous le nom de « REP 001 » ou « répertoire des recettes » est donné en annexe en pièce jointe de la présente note.

La composition des recettes est celle en vigueur au sein du LNPV. Certaines compositions sont issues d'essais internes ayant abouti à l'optimisation de certains milieux (données non publiées). Tous les laboratoires agréés doivent prendre connaissance de son contenu. Si la mise en œuvre de ces recettes n'est pas impérative, en cas de divergence de composition avec les recettes qu'il utilise, le laboratoire est tenu de disposer :

- de publications scientifiques ;

- ou d'études comparatives prouvant l'absence d'incidence sur le résultat des analyses.

Ces écarts doivent être notifiés au laboratoire national de référence (LNR) pour la détection des organismes nuisibles lors des essais inter-laboratoires d'aptitude.

L'ingénieur en Chef des ponts, des eaux et des forêts,

Sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Robert TESSIER

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

REPERTOIRE DES RECETTES EN VIGUEUR AU LNPV

Réf. : MOA REP 001 version 1b



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	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	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 13
Chloroforme : alcool isoamylique 24/1 16
densité 1,18 16
eau physiologique tamponnée 13
GEB 13
glycérine tamponnée 16
Lugol 13
MgSO4 16
PBS ELISA 1 N 14
PBS ELISA 5 N 15
PBS T 1 X 15
Solution d'iodure de sodium (NaI) 6M 19

Solution de bleu d'Evans 15
Solution de KOH 13
Solution enzymatique 16
Suspension de silice 19
Tampon carbonate 13
Tampon conjugué 14
Tampon d'acide maléique 15
Tampon de broyage CTAB 3% 17
Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%) 14
Tampon de broyage PBS-T-PVP 14
Tampon de broyage Vigne 14
Tampon de charge 17
Tampon de coating 14
Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde) 15
Tampon de détection 15
Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde) 15
Tampon de lavage (pour ELISA) 14
Tampon de macération anti-oxydant 19
Tampon de macération PVPP 1X 17
Tampon de macération 13
Tampon de reprise de culot 13
Tampon de rinçage 15
Tampon de saturation 15
Tampon Edwards 17
Tampon IF 16
Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2) 13
Tampon substrat 15
Tampon TENPP 17
Tampon Tris 7-9 18
Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X 18
Tampon Tris EDTA (TE) 18
Tampon Tris EDTA (TE) 18
Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8) 18
Tampon TRIS-PVP 20
TBST 10X 17

4.2. Les milieux de culture non sélectifs 21
Milieu d'isolement (mycologie) 21
Milieu King B 21
Milieu LPG 21
Milieu LPGA 21

4.3. Les milieux de culture sélectifs 22
DCPA 22
Milieu Amidon 22
Milieu Arginine 22
Milieu ARJ 22
Milieu Citrate de Simmons 23
Milieu EPN 23
Milieu Esculine 23
Milieu gélatine de Frazier 23
Réactif de Frazier 23
Milieu gélose au lait 23
Milieu GYCA 23

Milieu KBCA 24
Milieu de Hugh et Leifson 24
NCTM4 25
Milieu PDA 25
Milieu SNA 26
Milieu Sutton 26
Milieu Urée- 27
Indole 27

4.4. Les milieux d'identification 28
Milieu BCYE 28
Milieu CCT 28
Milieu Kelman 28
Milieu King B "Pois" 29
Milieu LBCA 29
Milieu M2' de Luisetti 29
Milieu mCS20ABN 30
Milieu mFS 30
Milieu MNTA 31
Milieu NSCAA 31
Milieu PTSCA 31
Milieu SMSA modifié 32
Milieu SNA 32
Milieu SRS 32
Milieu Wilbrink 32
Milieu YDC 33

ANNEXE SOLUBILITE DES ANTIBIOTIQUES ET PRODUITS 34

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 35

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 36

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 = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤ -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 : 2000[1] (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) ;

[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*

- la préparation avant utilisation (point 4.4 de la norme) ;
- la mise au rebut des milieux (point 4.5 de la norme).

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 fabrication[2] 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).

[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.

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

4.1. Les tampons et solutions

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
GENERIQUE[3]	eau physiologique tamponnée		Voir PBS (0,01 M, pH = 7,2)		
GENERIQUE	Lugol		Iode : ..... 5,0 g Iodure de potassium :..... 10,0 g Eau distillée..... 100 mL Utilisation en diluant au 1/5ème dans de l'eau distillée	Conservation en bouteille en verre fumé	15
GENERIQUE	Solution de KOH	Potasse	Hydroxyde de potassium (KOH) ..... 3,0 g Eau distillée..... 100 mL		**23)**
GENERIQUE	Tampon de reprise de culot		Hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4, 12 H_2O) ..... 2,70 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4, 2 H_2O)..... 0,40 g Eau distillée..... 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENERIQUE	Tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2)	eau physiologique tamponnée, tampon IF	Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4, 12 H_2O)..... 2,7 g Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4 , 2 H_2O)..... 0,4 g Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2	Stériliser par autoclavage	1 et 4
GENERIQUE	Tampon de macération		Hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4, 12 H_2O)..... 10,74 g Potassium phosphate, dibasique (KH_2PO_4)..... 2,72 g Eau distillée..... 1000 mL pH = 7,0	Stériliser par autoclavage	1 et 4
ELISA	GEB		Sodium sulfite anhydre..... 1,3 g Ovalbumine ..... 2 g PVP ..... 20 g Tween 20 ..... 20,5 g PBS ..... 1,0 L	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	Tampon carbonate	Tampon de coating	Carbonate de sodium (Na_2CO_3)..... 1,59 g Hydrogénocarbonate 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

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
ELISA	Tampon conjugué		Tampon PBS-T ..... 10,0 mL Albumine sérique bovine (BSA) ..... 0,02 g *Remarque : du PVP peut être ajouté selon les recommandations du fournisseur*	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	Tampon de broyage PBS-T-PVP		Polyvynilpyrrolidone (PVP 25) ..... 20 g PBS-T 1X ..... 1000 mL	Préparation extemporanée, ne pas autoclaver.	
ELISA	Tampon de broyage PBS-T-PVP (20%)		Polyvynilpyrrolidone (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	Tampon de broyage Vigne		Trizma® Base (NH_2C-$(CH_2OH)_3$) ..... 24,3 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Polyvynilpyrrolidone (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	Tampon de coating		Voir tampon carbonate		
ELISA	Tampon de lavage (pour ELISA)	PBS-T 1 X	Tween 20 ..... 0,5 mL PBS ELISA 1 N ..... 1000 mL* pH = 7,4 ** ou 800 mL d'eau distillée + 200 mL de PBS ELISA 5N*	Stériliser par autoclavage.	
ELISA	PBS[4] ELISA 1 N	PBS 1X	Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,0 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) ..... 0,2 g Hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4, 12 H_2O) ..... 2,9 g (ou Na_2HPO_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	PBS ELISA 5 N		NaCl ..... 40,0 g KH_2PO_4 ..... 1,0 g Na_2HPO_4, 12 H_2O ..... 14,5 g KCl ..... 1,0 g Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 7,4	Stériliser par autoclavage	
ELISA	PBS T 1 X	Tampon de lavage	Voir tampon de lavage pour ELISA		
ELISA	Tampon substrat	Tampon diéthanolamine	Diéthanolamine ..... 97,0 mL Eau distillée ..... qsp 1000 mL pH = 9,8 (à ajuster avec une solution HCl concentrée). *Certains fabricants préconisent également l'ajout de 0,1 g de MgCl*	Avant utilisation, dissoudre 1 mg de pNPP dans 1 mL de tampon substrat.	
Hybridation moléculaire	Tampon d'acide maléique		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	Tampon de saturation	Tampon de "blocking"	Solution stock de blocking Reagent 10% ..... 10 mL Tampon d'acide maléique ..... 90 mL		
Hybridation moléculaire	Tampon de détection		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	Tampon de dénaturation (15% formaldéhyde)		SCC 20 X ..... 180 mL Formaldéhyde à 37% ..... 120 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	Tampon de dilution (7,5% formaldéhyde)		SCC 20 X ..... 8 mL Formaldéhyde à 37% ..... 2 mL	Conservation à 5°C +/- 4°C	
Hybridation moléculaire	Tampon de rinçage		Tampon d'acide maléique ..... 1000 mL Tween 20 ..... 3 mL		
IF	Solution de bleu d'Evans	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	glycérine tamponnée		Hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4 , 12 H_2O) ..... 3,2 g Dihydrogénophosphate de sodium (Na H_2PO_4, 2 H_2O) ..... 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	Tampon IF	tampon PBS, eau physiologique tamponnée	Voir tampon de rinçage (PBS 0,01 M, pH = 7,2) - générique		
NEMATO-LOGIE	MgSO4 densité 1,18	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 bassine), Agitateur, Entonnoir, Eprouvette graduée de grand volume, Tamis de 40 µm, densimètre	
NEMATO-LOGIE	Solution enzymatique		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	Chloroforme : alcool isoamylique 24/1		Chloroforme ..... 24 mL Alcool isoamylique ..... 1 mL		

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
PCR	TBST 10X		NaCl ..... 80 g Na NO_3 ..... 2 g KCl..... 2 g Tween 20 ..... 5 mL Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH_2C-$(CH_2OH)_3$) ..... 24 g Eau distillée..... qsp 1 L pH = 7,4 pour solution 1 X		
PCR	Tampon de broyage CTAB 3%		CTAB ..... 30 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	Tampon de charge	Solution de bleu de charge	Bleu de bromophénol..... 0,065 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	Tampon Edwards	tampon de lyse	Trizma® hydrochloride (NH_2C-$(CH_2OH)_3$ HCl)..... 1,58 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 0,73 g EDTA, $2H_2O$ ..... 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	Tampon de macération PVPP 1X		Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ..... 10,0 g Eau distillée..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage possible	
PCR	Tampon TENPP	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 Polyvynilpolypyrrolidone (PVPP) ..... 5,0 g Eau distillée ..... 100 mL		14

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
PCR	Tampon Tris 7-9	Tampon d'extraction d'ADN à partir de sol	Trizma Sigma 7-9® ..... 1,2 g Eau distillée ..... 1000 mL		14
PCR	*Tampon Tris borate EDTA (TBE) 10X*		*Trizma base (Tris[hydroxyméthyl] aminométhane (NH_2C-$(CH_2OH)_3$))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	Tampon Tris EDTA (TE)		EDTA ..... 50 mM Tris-HCl ..... 10 mM pH = 8,0		
PCR	Tampon Tris EDTA (TE)		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	Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8)		Tris [hydroxyméthyl] aminométhane (NH_2C-$(CH_2OH)_3$) ..... 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%d) Compléter 100 ml d'Eau Ultra Pure	

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
Spécifique	Solution d'iodure de sodium (NaI) 6M		Na_2SO_3 0.75 g NaI 45 g Eau distillée 40 mL	Dissoudre 0,75 g de Na2SO3 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	Suspension de silice		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	Tampon de macération anti-oxydant		PVP 10 (polyvynilpyrrolidone) ..... 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.	

Technique	Nom du tampon ou de la solution	Synonyme (s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
Spécifique	Tampon TRIS-PVP		Trizma® base (NH2C-(CH2OH)3) ..... 24,23 g NaCl ..... 8,0 g PVP40 ..... 20,0 g Tween 20..... 0,5 mL Eau distillée ..... qsp1,0 L pH = 8,0	Stériliser par autoclavage.	

4.2. Les milieux de culture non sélectifs

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
Milieu d'isolement (mycologie)		Extrait de Malt ..... 12 g Chloramphénicol (200 ppm) ..... 2 mL Agar Agar ..... 15 g Eau osmosée ..... 1000 mL		
Milieu King B	Milieu KB	Protéose - peptone n°3 ..... 20,0 g Glycérol (glycérine bidistillée) ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$) ..... 1,50 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 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)
Milieu LPG		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.	
Milieu LPGA		Extrait de levure ..... 5,0 g Peptone ..... 5,0 g D(+) Glucose ..... 10,0 g Agar Bacto® Difco ..... 15,0 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.
DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)		Peptone bactériologique .....15,0 g Potassium phosphate, dibasique (K2HPO4) ..... 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO4, 7H2O) ..... 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)
Milieu Amidon		Bouillon nutritif ..... Amidon soluble de pomme de terre ..... Agar Bacto® Difco ..... Eau distillée	Stériliser par autoclavage	15)
Milieu Arginine	Thornley, ADH	Peptone .....1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K2HPO4) ..... 0,3 g Chlorure de sodium (NaCl) .....5,0 g Rouge de phénol .....0,01 g L(+) arginine (monohydroclhoride) .....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)
Milieu ARJ	Milieu Ayers, Rupp et Johnson	Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH4H2PO4) .....1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO4, 7H2O) .....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.
Milieu Citrate de Simmons		Dihydrogénophosphate d'ammonium ($NH_4H_2PO_4$) ..... 1,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 1,0 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5,0 g Bleu de bromothymol ..... 0,15 g Citrate de sodium anhydre ($C_6H_7NaO_7$) ..... 2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO4, $7H_2O$) ..... 0,20 g Agar bactériologique de type A ..... 20,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage (Distribution en pente gélosée)	15)
Milieu EPN	Eau peptonée nitratée	Bactopeptone ..... 10,0 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)
Milieu Esculine		Peptone ..... 10,0 g Citrate ammoniacal de fer III (Fe_2O_3, NH_4) ..... 0,50 g Esculine ..... 1,0 g Agar bactériologique de type A ..... 12,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	12)
Milieu gélatine de Frazier		Extrait de levure ..... 3,0 g Peptone ..... 5,0 g Gélatine ..... 40,0 g Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Faire fondre le milieu avant de le répartir en flacon puis stériliser par autoclavage	8)
Réactif de Frazier		Sulfate de diammonium ($(NH_4)_2$ SO_4) ..... 76,0 g Eau distillée ..... 100 mL	Ne pas autoclaver	21)
Milieu gélose au lait		Préparation A Extrait de levure ..... 5,0 g Agar nutritif ..... …23,0 g Eau distillée ..... …1000 mL Préparation B 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)
Milieu GYCA		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.
Milieu KBCA		Milieu de base = milieu King B Antibiotiques et autres produits • céphalexine ..... 40 mg/L • cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	11)
Milieu de Hugh et Leifson		Peptone de caséine ..... 2,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_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)
Milieu Levane		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.
NCTM4		Milieu de base -Extrait de levure : .....7g -Peptone : ..... 7g -D(+) glucose : .....7g -Agar : .....18g eau distillée ou osmosée ..... 1000 mL Antibiotiques et autres produits -Pivmécillinam : .....100mg -Céphalexine : .....50mg Triméthoprime : .....10mg -Néomycine : .....3mg -Propiconazole (20mg/L) : .....80µL pH=7,2	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)
Milieu PDA	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.
Milieu SNA	Spezieller Nährstoffärmer Agar	Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 1,0 g Nitrate de potassium (KNO_3) ..... 1,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO4, $7H_2O$) ..... 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)
Milieu Sutton		Hydroxyde de sodium (NaOH 1 N) ..... 2,6 mL Solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$, $2H_2O$)) ..... 1,0 g* Extrait de levure ..... 0,50 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).	
Milieu Tween 80		Milieu de base : Peptone ..... 10,0 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 Antibiotiques et autres produits Tween 80 stérile ..... 10,0 mL Cycloheximide ..... 75,0 mg Céphaléxine ..... 25,0 mg 5-Fluorouracil ..... 6,0 mg Tobramycine ..... 0,4 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	15)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Réf.
Milieu Urée-Indole	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.
Milieu BCYE		ACES ($C_4H_{10}N_2O_4S$) 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 Produits 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)**
Milieu CCT		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 Antibiotiques 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)
Milieu Kelman	Milieu TTC (triphenyl tetrazolium salt)	Hydrolysat acide de caséine (casamino acid) .1,0 g D (+) glucose …5,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)…… … 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.
Milieu King B "Pois"	Milieu KBBCA	Protéose - peptone n°3 (Difco) ..... 20,0 g Glycérine bidistillée (Glycérol) ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) .....1,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)….. ..... 1,50 g Acide borique….. ..... 1,50 g Agar bactériologique de type A..... 15,0 g Eau distillée..... 1000 mL Antibiotiques céphalexine ..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
Milieu LBCA	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 Antibiotiques céphalexine ..... 40 mg/L cycloheximide (Actidione)..... 50 mg/L	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
Milieu M2' de Luisetti		Hydrolysat acide de caséine (casamino acid) ..... .10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) .....…2,0 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)…… ... 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 ($(NH4)_2$ HPO_4) ..... 0,80 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO4, 7H_2O$) ..... 0,40 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_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 Antibiotiques 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_2PO_4) ..... 0,80 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 0,80 g Nitrate de potassium (KNO_3) ..... 0,50 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO4, 7H_2O$) ..... 0,10 g Methyl green (solution aqueuse 1%) ..... 1,50 mL Agar bactériologique de type A ..... 15,0 g Eau distillée ..... 1000 mL Antibiotiques et autres produits 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.
Milieu MNTA		Milieu de base Extrait de levure ..... 2,0 g D(-) mannitol ..... 2.5 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 0,25 g Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) ..... 0,25 g Chlorure de sodium (NaCl) ..... 0,05 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$) ..... 0,10 g Agar bactériologique de type A ..... 16,0 g Sulfate de manganèse ($MnSO_4$, H_2O) ..... 15 **mg** Sulfate de fer ($FeSO_4$, H_2O) ..... 5 **mg** Eau distillée ..... 1000 mL pH = 7,2 Antibiotiques et autres produits acide nalidixique (sol à 1%) ..... 2 mL amphotéricine B ..... 10 mg trimethoprime 60 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	**4**
Milieu NSCAA	Nutrient Starch Cycloheximide Antibiotic Agar	Agar nutritif ..... 23,0 g Amidon soluble ..... 25,0 g (ou amidon de Pomme de terre ..... 15,0 g) Eau distillée ..... 1000 mL Antibiotiques: cycloheximide 200 mg nitrofurantoïne 10 mg* vancomycine (sol à 2 mg/mL) ..... 250 µL	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	
Milieu PTSCA		Bactopeptone ..... 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 Antibiotiques et autres produits céphalexine 40 mg cycloheximide (Actidione) ..... 50 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre les antibiotiques et les ajouter stérilement.	

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
Milieu SMSA modifié		Hydrolysat acide 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 Antibiotiques et autres produits 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.	1
Milieu SNA	Spezieller Nährstoffärmer Agar	K2HPO4 ..... 1.0 g KNO3 ..... 1.0 g MgSO4.7H2O ..... 0.5 g KCl ..... 0.5 g Glucose ..... 0,20 g Saccharose ..... 0,20 g Agar ..... 2 g H2O 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	
Milieu SRS (Klément Z *et al*. 1990)		Extrait de boeuf ..... 5,0 g Bactopeptone ..... 10,0 g D(+) saccharose ..... 40,0 g Eau distillée ..... 1000 mL	Stériliser par autoclavage	
Milieu Wilbrink		Protéose peptone n°3 ..... 5,0 g Saccharose ..... 10,0 g Potassium phosphate, dibasique (K_2HPO_4) ..... 0,5 g Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$) ..... 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 Antibiotiques cycloheximide ..... 250 mg	Stériliser par autoclavage puis dissoudre l' antibiotique et l ajouter stérilement.	22)

Nom du milieu	Synonyme(s)	Composition	Mode opératoire / précisions	Ref.
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 CaCO3 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
Cyclohéximide	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. Milteilungen 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 edition.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. Milteilungen 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 differenciation 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.