

# LNPV

**L**aboratoire

**N**ational de la

**P**rotection des

**V**égétaux

Mise en évidence

d' *Erwinia amylovora*

à partir de végétal symptomatique

par isolement

et identification de la souche

Réf.: Méthode **BL/05/07** version a

**Laboratoire national de la protection des végétaux, unité bactériologie**  
7 rue Jean Dixméras  
49044 ANGERS cedex 01  
Tél : 02 41 72 32 40

Mars 2005

# MISE EN EVIDENCE D'*Erwinia amylovora*

## A PARTIR DE VETEGAL SYMPTOMATIQUE

### PAR ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE LA SOUCHE

---

#### **Précautions de sécurité.**

La bactérie *Erwinia amylovora* n'est pas connue pour être pathogène pour l'homme. Sa manipulation ne requiert donc pas de précautions particulières en termes d'hygiène et de sécurité des opérateurs.

Par contre, il s'agit d'une bactérie de quarantaine pour l'Union Européenne et de nombreux autres pays. En France, en application de la directive 95/44/CE, sa détention et sa manipulation exigent des précautions en terme de confinement et est soumise à autorisation préfectoral préalable.

Comme pour toute autre manipulation d'agents phytopathogènes, on veillera en particulier à inactiver les bactéries présentes dans les végétaux, extraits végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une méthode appropriée.

#### **0. Introduction.**

*Erwinia amylovora* est la bactérie responsable du feu bactérien chez la plupart des espèces végétales appartenant à la sous-famille des *Maloideae* au sein de la famille des *Rosaceae*. Le feu bactérien est probablement la plus grave maladie affectant les poiriers et pommiers dans de nombreux pays. La bactérie est notamment disséminée sur de longues distances par les plantes hôtes qu'elle infecte de façon latente.

#### **1. Objet.**

La méthode utilisée permet l'isolement direct de la bactérie en boîte de Petri sur milieux nutritifs généralistes ou semi-sélectifs. Les colonies suspectes sont identifiées au moyen de différents tests et, si nécessaire, cette identification est confirmée par test du pouvoir pathogène sur jeune plant de pommier.

#### **2. Domaine d'application.**

Cette méthode qualitative s'applique à la mise en évidence d'*Erwinia amylovora* sur végétal présentant des symptômes. Elle est à utiliser pour toutes les analyses réglementaires.

Statut réglementaire d'*Erwinia amylovora*: cette bactérie figure dans les annexes II, IV A et IV B de l'arrêté du 22 novembre 2002 modifié, transposant la directive 2000/29/CE. Elle fait partie de la liste des organismes nuisibles dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les Etats membres de l'union européenne s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux, présents dans l'Union Européenne mais importants pour cette dernière.

### 3. Références.

La méthode décrite ici est extraite du protocole de diagnostic pour les organismes réglementés de l'Organisation Européenne et méditerranéenne de Protection des Plantes. Elle a été préparée et validée par un groupe d'experts et a été publiée en 2004 au bulletin OEPP, volume 34, pages 159-171.

### 4. Définitions.

<b>KB:</b>	milieu de culture B de King
<b>LEVANE :</b>	milieu de culture levane
<b>CCT:</b>	milieu de culture CCT
<b>EPN :</b>	eau peptonée nitratée
<b>ARJ :</b>	milieu Ayers, Rupps et Johnson
<b>PBS :</b>	tampon phosphate salin

Voir compositions de ces milieux en annexe.

### 5. Principe.

L'utilisation de milieux nutritifs généralistes favorise le développement des bactéries en général et d'*Erwinia amylovora*, l'utilisation de milieux semi-sélectifs limite la croissance des autres bactéries habituellement présentes sur les végétaux. Après **une extraction** (par macération) des bactéries à partir de végétal, **un isolement** est pratiqué sur boîtes de Petri, puis **l'identification** se fait par des tests biochimiques et sérologiques. Dans le cas d'une demande de **confirmation**, un test du pouvoir pathogène sur jeunes plantes est réalisé et la souche bactérienne conservée en collection.

### 6. Réactifs et produits.

Leurs composition, préparation et conditions d'emploi sont données en annexe.

Les produits spécifiques pour la réalisation de cette méthode sont décrits ci-après.

#### 6.1. Milieux de culture :

**6.1.1.** pour l'isolement et le repiquage: utilisation du milieu KB principalement. L'utilisation des milieux levane et CCT est conseillée lorsque les échantillons ne sont pas dans des conditions optimales pour l'analyse: suspicion de faible contamination, présence importante de saprophytes.

**6.1.2.** pour les tests biochimiques: milieux KB, levane, Hugh et Leifson, EPN, citrate de Simmons, ARJ, urée-indole (Ferguson).

**6.2.** Réactif pour la mise en évidence d'une activité cytochrome C oxydase (solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N,N-diméthyl paraphénylène diamine) et papier filtre, ou réactifs prêts à l'emploi.

**6.3.** Solution de potasse (solution aqueuse à 3% de KOH).

**6.4.** Antiserum dirigé contre *Erwinia amylovora*.

**6.5.** Eau stérile.

## **7. Appareillage.**

Matériel courant de laboratoire de bactériologie et notamment :

- 7.1. lampe UV-A ou lampe de Wood (longueur d'onde 365 nm) ;
- 7.2. incubateur bactériologique assurant une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  ;
- 7.3. incubateur bactériologique assurant une température de  $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ;
- 7.5. enceinte réfrigérée à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  ;
- 7.6. système de production d'eau purifiée de qualité « laboratoire » courante ;
- 7.7. modules climatisés à  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  ou serres régulées autour de  $25^{\circ}\text{C}$  ;
- 7.8. autoclave ;
- 7.9. balance de classe I (avec une précision de lecture  $\leq$  à 0,1 mg) et éventuellement balance de classe II (précision de lecture  $\leq$  à 0,01 g)

## **8. Echantillon.**

### **8.1. Echantillon pour analyse sur matériel végétal avec symptômes.**

La méthode s'applique aux échantillons divers tels que feuilles, rameaux, tiges ou fleurs et fruits présentant des symptômes.

### **8.2. Prélèvement de l'échantillon pour analyse.**

Echantillon désigne ici la partie du végétal reçue au laboratoire à partir de laquelle l'extraction va être réalisée.

- Sélectionner les parties de végétal présentant des symptômes jeunes, les désinfecter superficiellement à l'aide de coton imbibé d'alcool (éthanol à  $70^{\circ}$ );
- prélever au scalpel un morceau de végétal en bordure de lésion et le placer dans une boîte de Petri stérile. Le végétal est écorcé si nécessaire. Flamber le scalpel entre chaque prélèvement.

## **9. Mode opératoire.**

### **9.1. Témoins d'analyse.**

Des souches témoins positifs sont utilisées lors de l'isolement et du test de pouvoir pathogène : souches d'*Erwinia amylovora* dont l'identité a été préalablement vérifiée sur milieu et le pouvoir pathogène contrôlé sur plants de pommier. Des souches satisfaisantes sont déposées à la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP - INRA –Rue Georges Morel – 49070 Beaucozéz) ou disponibles auprès d'autres collections de référence.

La manipulation de ces souches témoins doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

## 9.2. Déroulement du test.

### 9.2.1. Extraction.

- en conditions axénique, ajouter environ 2 mL d'eau stérile dans la boîte de Petri contenant le morceau de végétal prélevé;
- dilacérer finement le morceau de végétal à l'aide d'un scalpel;
- laisser macérer environ 10 minutes à température ambiante.

### 9.2.2. Isolement.

- réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs à l'aide d'anses stériles ou étaler un volume d'environ 100 µL sur toute la surface de la boîte de milieu à l'aide d'un étaloir sur une boîte de milieu KB et, si nécessaire, sur une boîte de milieu CCT et/ou une boîte de milieu levane. Les instruments sont préalablement désinfectés dans de l'alcool (éthanol à 70°) et flambés.

### 9.2.3. Incubation.

- incuber les boîtes de Petri à 25°C ± 3°C pendant au moins 72 h.

### 9.2.4. Lecture.

Observer les boîtes. Les colonies typiques ont les caractères décrits ci-après.

- sur KB: les colonies apparaissent à 48 heures de couleur blanche, circulaires tendant à s'étaler et, non-fluorescentes (sous UV à 365 nm).
- sur levane : les colonies apparaissent à 48 heures blanchâtres, circulaires bombées ; lisses et muqueuses. Des colonies d'*Erwinia amylovora* levane négatives ont été observées (Bereswill *et al.*, 1997).
- sur CCT: les colonies apparaissent à 72 heures pâle-violet, circulaires, fortement convexes, voire bombées puis deviennent lisses et muqueuses. Leur croissance est plus lente que sur les milieux KB et levane. Le milieu CCT inhibe les *Pseudomonas* spp. mais pas *Pantoea agglomerans*.

### 9.2.5. Repiquage et identification

Repiquer une colonie typique par boîte de milieu sur KB pour confirmer les caractéristiques décrites plus haut. Pour compléter leur identification, les souches subiront les tests suivants :

- test à la potasse indicateur du GRAM (Suslow *et al.*, 1982): déposer une goutte d'une solution aqueuse à 3% de KOH sur une lame de microscopie. Faire une émulsion d'une anse de culture bactérienne âgée de 24 à 48 heures avec la solution. Le gram est considéré négatif si il y a formation de filament en soulevant l'anse. Le gram est considéré positif en l'absence de filament.
- test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase (Klement *et al.*, 1990): déposer une goutte d'une solution aqueuse à environ 1% d'oxalate de N,N, diméthyl paraphénylène diamine, préparée extemporanément, sur du papier buvard. Faire une émulsion immédiate d'une anse de culture sur le buvard imbibé. Il est également possible d'utiliser des réactifs prêts à l'emploi (Dry slide oxidase™ par exemple) ou un autre dispositif équivalent. L'apparition d'une coloration rose violacée atteste de l'activité de la cytochrome C oxydase. Dans ce cas le test est considéré positif. Le test est négatif en l'absence de coloration.

- test de fluorescence sur KB (Schaad *et al.*, 2001): prélever une colonie âgée de 24 à 72 heures. Ensemencer en stries une boîte de Petri contenant du milieu KB. Incuber pendant environ 48 heures à 25°C (+/- 3°C) et révéler l'éventuelle fluorescence en éclairant la boîte avec la lampe à UV dans une pièce noire. Le test est positif si apparition de fluorescence allant du vert au bleu. Il est négatif en l'absence de fluorescence.

- test d'hypersensibilité sur tabac (HST) (Schaad *et al.*, 2001): injecter une suspension bactérienne dense à environ 10<sup>9</sup> ufc/mL d'une culture jeune (24 à 48 heures) entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une jeune feuille de tabac à l'aide d'une seringue. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 heures, une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée. Le test est négatif si aucune réaction n'est observée.

- test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose (Hugh et Leifson, 1953): à l'aide d'un fil de platine stérilisé à la flamme, prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer deux tubes gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson par piqûre centrale. Mettre un des deux tubes en conditions d'anaérobiose en ajoutant une couche d'environ 1 cm d'huile de vaseline stérile à la surface du tube. Incuber pendant 48 à 72 heures à la température de 25°C (+/- 3°C).

- lorsque les deux tubes virent au jaune, la bactérie est dite "fermentative".
- la bactérie "oxydative" du glucose n'acidifie pas le tube en anaérobiose (absence de changement de couleur) alors qu'une acidification débute à la surface du tube en aérobiose (couleur jaune).
- les bactéries inertes ou inactives cultivent peu ou pas dans le tube en anaérobiose. En aérobiose, une culture est observée sans modification de pH ou avec une faible alcalinisation en surface (virage au bleu).

- test de mise en évidence de l'activité levane sucrase (Lelliott et Stead, 1987): prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer en stries une boîte de Petri contenant du milieu levane. Incuber pendant environ 48 heures à 25°C (+/- 3°C). L'apparition d'une culture abondante, bombée, muqueuse, blanche et brillante après 1 à 2 jours à 25°C ± 3°C, indique une activité levane sucrase (test positif). En l'absence de ces caractéristiques, le test est négatif.

- test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase (Freney *et al.*, 1992) : prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures) à l'aide d'une anse. Ensemencer largement dans le milieu EPN. Incuber environ 24 à 72 heures à 25°C (+/- 3°C).

- ajouter quelques gouttes de réactif de Griess (V/V). L'apparition d'une coloration rouge dans le milieu atteste de la présence de la nitrate-réductase ; les nitrates sont réduits en nitrites : le test est positif.
- en l'absence de coloration, ajouter une pincée de poudre de Zinc et agiter. L'apparition d'une coloration rouge brun atteste de la présence de nitrates, par conséquent de l'absence de la nitrate-réductase : le test est considéré négatif.
- si le milieu reste incolore après addition de la poudre de Zinc, la bactérie est considérée "nitrite positive" : elle avait réduit les nitrates au stade nitrites.

- test d'utilisation du citrate (Schaad *et al.*, 2001): prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures) au moyen d'une anse stérilisée à la flamme. Ensemencer la pente gélosée contenant le milieu citrate de Simmons par strie et incuber à la température optimale de croissance de la bactérie (25°C +/- 3°C). Les bactéries "citrate-positives" poussent sur le milieu de Simmons

en provoquant une alcalinisation du milieu (virage au bleu de la coloration du tube). Les bactéries "citrate- négatives" ne croissent pas sur le milieu.

- test d'assimilation du saccharose (Ayers *et al.*, 1919: à l'aide d'une anse stérilisée à la flamme, prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures). Ensemencer par piqûre un tube gélosé contenant le milieu ARJ additionné de saccharose à une concentration de 0,2%. Incuber environ jusqu'à 5 jours à 25°C (+/- 3°C) en lisant le résultat chaque jour à compter du second. Lorsque l'indicateur coloré vire au jaune, attestant de l'assimilation du saccharose, le test est considéré positif. Le test est négatif en l'absence de coloration.

- test de croissance à 39°C (Schaad *et al.*, 2001): préparer dans un tube de milieu liquide 523 une suspension légère à partir de culture bactérienne. Incuber pendant environ 24 à 72 heures à 39°C (+/- 3°C) sous agitation. Le test est positif si un développement de la bactérie est observé (apparition d'un trouble). A l'inverse, il est négatif.

- test de mise en évidence d'une activité uréase (Freney *et al.*, 1992) : prélever une colonie (âgée de 24 à 72 heures) à l'aide d'une anse. Ensemencer largement le milieu urée-indole. Incuber pendant environ 24 à 72 heures à 25°C (+/- 3°C). Les bactéries présentant une activité uréase font virer la couleur de l'indicateur au rouge violacé en 2 à 4 heures. Le test est négatif en l'absence de coloration.

- test d'utilisation de l'indole (Freney *et al.*, 1992) : ensemencer un tube de milieu urée-indole à l'aide d'une culture jeune. Incuber pendant 24 à 48 heures à 25°C (+/- 3°C). Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs. La réaction positive se caractérise par la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu. Le test est négatif en l'absence de coloration.

- test de séro agglutination (Anonymous, 2004) : à l'aide d'une anse, émulsionner la culture bactérienne dans une goutte d'antisérum spécifique d'*Erwinia amylovora* dilué dans le tampon PBS (environ à 5 ou 10%) sur une lame de microscope en verre. L'observation visuelle d'un précipité atteste d'un résultat positif. L'émulsion reste homogène dans les cas négatifs.

Les lots des milieux ou réactifs utilisés pour ces tests sont vérifiés avant utilisation à l'aide de souches bactériennes témoins.

*Résultats attendus pour les tests d'identification:*

Test	Résultat attendu
- test à la potasse indicateur du GRAM	-
- test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase	-
- test de fluorescence sur KB	-
- test d'hypersensibilité sur tabac (HST)	+
- test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose	fermentatif lent
- test de mise en évidence de l'activité levane sucrase	+
- test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase	-
- test d'utilisation du citrate	+
- test d'assimilation du saccharose	+
- test de croissance à 39°C	-
- test de mise en évidence d'une activité uréase	-
- test d'utilisation de l'indole	-
- test de séro agglutination	+

### 9.2.6. Test du pouvoir pathogène

La confirmation de l'identification d'*Erwinia amylovora* est obtenue par la vérification du pouvoir pathogène sur des jeunes plants de pommiers de variétés sensibles. Trois à cinq plants sont utilisés par souche à tester ainsi que pour le témoin positif et le témoin eau stérile.

#### Technique

- Inoculer chaque plant en coupant le limbe de deux feuilles jusqu'à la nervure principale avec des ciseaux trempés dans une suspension bactérienne dense (environ  $10^9$  ufc/mL) de chaque souche isolée, préparée dans du tampon PBS. La suspension bactérienne est préparée juste avant l'inoculation.
- maintenir les plants à 22°C +/- 3°C en conditions humides, pendant 3 à 15 jours, de préférence avec 16 heures de lumière +/- 30 minutes par jour.

#### Lecture

Le test est positif si des symptômes typiques apparaissent au plus après 15 jours (flétrissement, décoloration, nécrose des tissus, production d'exsudat) et si l'isolement sur milieu KB réalisé sur les plantes tests présentant ces symptômes conduit à l'apparition de colonies typiques, selon les indications du paragraphe 9.2.2.

### **9.3. Interprétation.**

L'interprétation des résultats ne peut être validée que si les différents témoins donnent les résultats négatifs et positifs attendus. Dans ces conditions,

- lorsque les tests d'identification sont comparables à ceux des souches de référence, le résultat de l'analyse de détection sur symptômes est considéré comme positif.
- lorsque le test de pouvoir pathogène est positif, l'identité des souches est confirmée comme étant *Erwinia amylovora*.

## **10. Expression des résultats.**

Cette méthode étant qualitative, le résultat sera donné de la façon suivante :

⇒ lorsque le résultat de l'analyse de mise en évidence est négatif :

“ La bactérie *Erwinia amylovora* **n'a pas été mise en évidence** par isolement ”.

⇒ lorsque le résultat de l'analyse de mise en évidence est positif :

“ La bactérie *Erwinia amylovora* **a été mise en évidence** par isolement dans l'échantillon analysé”.

⇒ lorsque le résultat du test de pouvoir pathogène est négatif malgré des tests présomptifs concluants :

“ *La présence d'Erwinia amylovora n'est pas confirmée*”.

⇒ lorsque le résultat du test du pouvoir pathogène est positif :

“ *La présence d'Erwinia amylovora est confirmée*”.

## **11. Bibliographie**

Ayers, S.H., Rupp, P. & Johnson, W.T. (1919) A study of the alkali forming bacteria in milk. *United States Department of Agriculture Bulletin* **782**. Washington (US).

Anonymous (2004) Diagnostic protocols for regulated pests. *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 159-171.

Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. & Bollet, C. (1992) *Manuel de bactériologie clinique ELSEVIER Collection Option Bio* Volume 1, 79-143.

Hugh, R. & Leifson, E.(1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology* **66**, 24-26.

King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**, 301-307.

Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. (1990) *Methods in phytobacteriology*. *Akademiai Kiad* 568p. Budapest (HG).

Lelliott, R.A. & Stead, D.E., (1987) *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. *Blackwell Scientific Publications* Volume 2. Oxford (GB).

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. Third edition 373p. St Paul, Minnesota (US).

Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Isaka M. (1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* **72**, 917-918.

## ANNEXE

### Exigences générales:

Les milieux seront coulés en boîtes de Petri stériles.

Les milieux en boîtes de Petri doivent être utilisés dans un délai d'un mois au plus après fabrication si le milieu contient des antibiotiques et deux mois au plus si le milieu n'en contient pas. Le stockage des milieux est réalisé à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

**Les compositions sont données pour 1 litre  $\pm$  5% de milieu à réaliser avec de l'eau à l'exception du milieu urée-indole pour lequel elles sont données pour 100 mL**

L'éthanol utilisé pour la préparation des milieux est titré à environ 95°.

### 1. Milieu King B (King *et al.*, 1954) :

- Protéose - peptone n°3 (Difco) .....20,0 g
- Glycérol.....10,0 g
- Phosphate de potassium dibasique .....1,50 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté .....1,50 g
- Agar bactériologique.....15,0 g

Après autoclavage à une température  $\geq$  à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir être coulé en boîtes de Petri. Avant de couler le milieu, incorporer 0,05 g de cycloheximide dissout dans de l'éthanol et stérilisé par filtration.

### 2. Milieu levane (Anonymous, 2004)

- Extrait de levure ..... 2,0 g
- Bactopeptone (Difco)..... 5,0 g
- Saccharose..... 50,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Agar bactériologique ..... 20,0 g

Ajuster le pH à 7,2. Après autoclavage à une température  $\geq$  à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Petri.

### 3. Milieu CCT(Ishimaru & Klos, 1984)

- Saccharose..... 100,0 g
- Sorbitol..... 10,0 g
- Alkyl sodium sulfate surfactant.....1,2 mL
- Agar nutritif..... 23,0 g
- Crystal Violet (solution 0,1% dans éthanol) 2,0 mL

Ajuster le pH entre 7.0-7.2. Après autoclavage à une température  $\geq$  à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Petri. Avant de couler le milieu, préparer, stériliser par filtration et ajouter au milieu :

- Nitrate de thallium(solution 0,1% dans eau) 2,0 mL
- Cycloheximide ..... 0,05 g

#### **4. Milieu de Hugh et Leifson (Hugh & Leifson, 1953)**

- Bacto tryptone ..... 2,0 g
- Phosphate de potassium dibasique ..... 0,3 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Bleu de bromothymol ..... 0,03 g
- D(+)-glucose ..... 10,0 g
- Agar bactériologique type A ..... 3,0 g

Après autoclavage à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

#### **5. Milieu EPN (Freney *et al.*, 1992)**

- Bactopeptone ..... 10,0 g
- Nitrate de potassium ..... 1,0 g

Après autoclavage à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

#### **6. Milieu citrate de Simmons (Schaad *et al.*, 2001)**

- Dihydrogénophosphate d'ammonium ..... 1,0 g
- Phosphate de potassium dibasique ..... 1,0 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Bleu de bromothymol ..... 0,08 g
- Citrate de sodium ..... 2,0 g
- Sulfate de magnésium ..... 0,2 g
- Agar bactériologique type A ..... 20,0 g

Après autoclavage à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

#### **7. Milieu ARJ (Ayers, Rupp & Johnson, 1919)**

- Dihydrogénophosphate d'ammonium ..... 1,0 g
- Sulfate de magnésium ..... 0,2 g
- Chlorure de potassium ..... 0,2 g
- Bleu de bromothymol ..... 0,03 g
- Agar bactériologique type A ..... 6,0 g

Faire fondre le milieu puis autoclaver à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes. Le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes. L'ajout d'agar est facultatif (milieu semi-gélosé ou milieu liquide)

### **8. Milieu urée-indole (Ferguson) (Freney *et al.*, 1992)**

- L-tryptophane..... 0,3 g
- Dihydrogénophosphate de potassium ..... 0,1 g
- Hydrogénophosphate de dipotassium ..... 0,1 g
- Chlorure de sodium..... 0,5 g
- Urée..... 2,0 g
- Rouge de phénol (sol. à 1% dans éthanol) 0,25 g

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.

### **9. Milieu liquide 523 (Schaad *et al.*, 1992)**

- Saccharose..... 10,0 g
- Caséine..... 8,0 g
- Extrait de levure ..... 4,0 g
- Phosphate de potassium dibasique .... 2,0 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté .... 0,3 g\*

\*Dissoudre séparément dans 50 mL d'eau distillée et ajouter préalablement à l'autoclavage. Après autoclavage à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

### **10. Tampon PBS (Anonymous, 2004)**

- Chlorure de sodium..... 8,0 g
- Chlorure de potassium ..... 0,2 g
- Hydrogénophosphate de disodium..... 2,9 g
- Dihydrogénophosphate de potassium.. 0,2 g

Le tampon est autoclavé à une température  $\geq$  à 121°C pendant environ 20 minutes.