

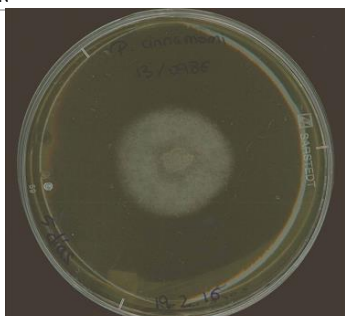


DENOMINACIÓN	V8-PARPBH				MC-2
DETECCIÓN DE	<i>Phytophthora</i> spp.				Código
CONSERVACIÓN	2-8 °C	CADUCIDAD	7 días - 1 mes	PRECAUCIONES	Proteger de la luz

ALCANCE / REFERENCIA	Medio semiselectivo especialmente desarrollado para el aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp. a partir de material vegetal (raicillas, madera, hojas, ...) o trampas vegetales.
----------------------	--

INGREDIENTES	REFERENCIA	UBICACIÓN / CÓDIGO	CANTIDAD
<u>Medio Base</u>			
Zumo multifrutas (Granini) o de vegetales (Hipercor)			100 mL
CaCO ₃	Merck 1.02074		2 g
Agar	Pronadisa 1800.05		16 g
Agua destilada hasta			1L
<u>Solución inhibidora</u>			
Pimaricina (Natamicina 2,5%)	Sigma P0440		10 mg
Ampicilina (Ampicilina trihidrato >96%)	Sigma A6140		200 mg
Rifampicina	Sigma R3501		10 mg
PCNB	Sigma P8556		100 mg
Benomilo	Aldrich 38, 158-6		20 mg
Himexazol	VWR 44450		25 ó 50 ⁽⁵⁾ mg

PREPARACIÓN
<u>Medio Base</u> Clarificar zumo (Opcional: ver procedimiento detrás). Añadir a 100 mL de zumo clarificado el agar. Esterilizar a 121°C durante 15 min. No es necesario ajustar el pH.
<u>Solución inhibidora</u> <i>Preparar:</i> Pimaricina ⁽¹⁾ : 400 µL de pimaricina 2,5 % Ampicilina ⁽²⁾ : pesar y disolver en 5 mL de NaOH 0,1M (no se disuelve bien en etanol). Rifampicina: pesar y disolver en 2 mL de etanol 70%. PCNB ⁽³⁾ : pesar y disolver en 5 mL de etanol absoluto. Benomilo ⁽⁴⁾ : pesar y disolver en 2 mL de etanol absoluto. Deshacer grumos pipeteando con micropipeta de 1 mL. Himexazol ⁽⁵⁾ : pesar y disolver en 2 ó 4 mL de agua destilada estéril. Si se utiliza Tachigaren 36%: 69,4 ó 138,8 µL. <i>Añadir al medio base:</i> Dejar enfriar el medio base por debajo de 50°C, manteniéndolo en agitación suave. Añadir los inhibidores, de uno en uno, en cabina de flujo laminar. No es necesario esterilizar por filtración (0,45 µm)

CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO	IMAGEN
<i>Control de crecimiento:</i> comprobar el crecimiento y morfología de una cepa de referencia. <i>Control de inhibición:</i> comprobar que otro hongo distinto de <i>Phytophthora</i> y alguna bacteria, no es capaz de crecer. IMAGEN: cultivo de <i>P. cinnamomi</i> a los 5d a 25 °C en PARPBH ₅₀ -V8 "Clarificado".	



OBSERVACIONES

- Atención a las referencias de los productos: puede haber diferencias en las concentraciones de la materia activa, así como el solvente a utilizar en el caso de presentaciones en polvo que no sean solubles en agua.

(1)Pimaricina: se degrada con la luz, por lo que se debe proteger de su exposición lo máximo posible. Atención a la concentración de su materia activa (Natamicina).

(2)Ampicilina: existen distintas referencias en las que utilizan 150 mg (Laboratorio de Referencia), 200 mg (jung, *et al*) y 250 mg (Juana Isabel Páez).

(3)PCNB: Muy tóxico, manejar con cuidado.

(4)Benomilo: Muy tóxico, manejar con cuidado.

(5)Himexazol: inhibe a *Pythium* y a dosis por encima de 25 mg puede inhibir algunas *Phytophthoras*.

PROBLEMA: el producto Tachigaren (36% v/v) ya no se comercializa en España. Se propone Referencia VWR 44450 disponible en presentaciones de 5 g, 25 g y 100 g.

CLARIFICAR ZUMO

- Mezclar 1L de zumo con los 20 g de CaCO_3 y mantener en agitación durante 10 - 15 minutos.

- Dispensar en botes de centrifuga y centrifugar a 5000 rpm durante 20 min.

- Opcional: filtrar el sobrenadante al vacío (embudo de Bücher y matraz de kitasato) a través de un papel de filtro Whatman nº1.

- Alicuotar el sobrenadante, filtrado o no, en volúmenes de 100 mL y guardar congelado (-20 °C) hasta su uso.