
METODO ANALITICO PARA DIAGNOSTICO FITOSANITARIO

Clavibacter michiganense subsp. *sepedonicum*

Contenido

[Nombres Comunes](#)

[Hospederos principales y secundarios](#)

[Introducción](#)

[Inspección directa](#)

[Características Taxonómicas](#)

[Técnicas Analíticas](#)

[Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico](#)

[Referencias](#)

[Anexos](#)

Nombres comunes (10,7):

Podredumbre anular de la papa

Bacterial ring rot of potatoes

Arrizzimento batterico

Hospederos principales y secundarios (10,11,7):

Solanum tuberosum Papa

Alrededor de 30 otras especies de Solanáceas pueden ser infectadas artificialmente.

Introducción:

El agente causal de la podredumbre anular de la papa es un microorganismo considerado en los listados A1 de plagas y enfermedades cuarentenarias para la región del COSAVE. Afecta al cultivo de la papa causando los mayores daños en los tubérculos ya que éstos resultan comercialmente inservibles (3).

Su sobrevivencia de una temporada a otra es principalmente en tubérculos infectados, los cuales pueden manifestar síntomas o, por el contrario, presentar una apariencia totalmente normal (infección latente). También puede permanecer viable por nueve meses o más como mucosidad seca adherida a bolsas, canastos, etc. (10,7).

El agente causal es transmitido por el escarabajo de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera: Chrysomelidae) y por el pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae* Sulzer, Homoptera: Aphididae) (2).

Se encuentra distribuido en Estados Unidos, Canadá, Panamá, Costa Rica, Venezuela, Perú, Dinamarca, Finlandia, Suecia, Noruega, Polonia, Rusia, Alemania, Checoslovaquia, Camboya, Afganistan, Vietnam, Nepal, Formosa, Turquía, Líbano, Japón y Corea (7). Lingerfeld (11), indica que además han ocurrido reportes temporales para Francia, Grecia, Gran Bretaña, Holanda, Italia, Yugoslavia, Colombia, México, Malta, Austria, China, España, Rumania y Portugal.

Inspección Directa:

Las plantas pueden mostrar ciertos síntomas característicos, tales como marchitez de las hojas y tallos, a partir de la mitad del período vegetativo de la planta. Primero se marchitan las hojas inferiores, éstas se enrollan ligeramente en los márgenes hacia arriba y su interior, y adquieren un color verde pálido, luego se tornan amarillas, marrones y finalmente necróticas (10,7).

En los tallos se observa un marchitamiento ascendente, comenzando por la base, afectando a uno o varios tallos de la misma planta, e incluso a un solo sector del mismo tallo. Además en algunos casos se presenta una ligera decoloración del pie de las plantas (10,11,7).

En tubérculos, el síntoma más precoz es una ligera transparencia de los tejidos que rodean al sistema vascular, especialmente en la zona próxima al estolón. En un estado de infección más avanzado se observa una separación definitiva del anillo vascular y los tejidos adyacentes, al presionar ligeramente emergen fibras de los vasos del anillo y un exudado de los tejidos colindantes. Finalmente, el anillo vascular se oscurece y los tejidos adyacentes comienzan a descomponerse, llegando a veces a separarse de la corteza del tubérculo. Cuando la infección está muy avanzada las bacterias pueden salir de la región vascular al exterior del tubérculo, originando hinchamientos y deformaciones externas, a modo de hoyos y cráteres, fisuras y hendiduras irregulares, cuyos bordes adquieren una coloración rojiza, especialmente cerca de los ojos (10,11,7).

Características Taxonómicas:

La bacteria es Gram positiva, no móvil, su tamaño oscila entre 0,3 - 0,6 μm de ancho y 0,5 - 1,5 μm de largo. En la mayor parte de los medios de cultivo se presenta como bastones corineformes pleomórficos, capsulados o no (11,7).

El crecimiento de la bacteria es lento, aparece a los 5 - 30 días. Las colonias típicas son lisas, redondeadas, de color blanco-crema o marfil, de forma de cúpula convexa, con bordes nítidos, oscilando su tamaño de 1-3 mm de diámetro (11,7).

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 18 y 21 C, y su máxima alrededor de 30 C. Sus requerimientos nutricionales son una fuente de carbón (glucosa o sacarosa), una fuente de nitrógeno en forma de dos aminoácidos (metionina y asparagina), sales (Mn, Fe, Mg) y vitaminas en un medio tamponado (pH 6,5 a 7,2) (11,7).

Las principales características bioquímicas de la bacteria son oxidasa negativa; catalasa positiva; negativa a la reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina, actividad de la ureasa, producción de SH₂, utilización de citrato, crecimiento a 37 C y CINa al 7 %, producción de indol; oxidación/fermentación inerte o débilmente oxidativa; hidrólisis del almidón negativa o débil; hidrólisis de la esculina positiva; ácido procedente de glicerol, ramnosa y salicina, negativo (7).

Técnicas Analíticas:

A continuación se describen algunos métodos de diagnóstico utilizados para la detección de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* en plantas y tubérculos.

1- Tinción de Gram:

La ejecución de la técnica (anexo 1) no requiere el aislamiento previo de la bacteria y tiene un umbral de detección de entre 10² y 10⁴ ufc/ml (7).

En caso de tubérculos sospechosos extraer fragmentos del margen del tejido enfermo y mecerar con un diluyente no tóxico para la bacteria (tampón fosfato salino PBS 0,05 mol/l, pH 7.0, anexo 2.1). Luego se centrifuga a no más de 180 g por 10 minutos. Centrifugar el sobrenadante a no menos de 4.000 g por 10 minutos. Decantar y descartar el sobrenadante. Suspender el precipitado en tampón fosfato 0.01 mol/l, pH 7.2 (anexo 2.2) hasta completar un volumen de 1 ml (7).

Preparar la coloración Gram para la dilución, y observar células Gram positivas típicamente corineformes (3).

2-. Aislamiento directo del patógeno:

Al aislar a partir de tallos y tubérculos que muestren síntomas iniciales de la enfermedad, éstos se cortan longitudinalmente y se separan porciones de haces vasculares que presenten coloración. Y en los casos de posible infección latente se extrae la zona del anillo próxima al estolón (7).

Los fragmentos se colocan en una placa Petri estéril, se trozan con un escalpelo y se dejan en maceración en 1 ml de agua estéril durante 30 minutos. Una gota del extracto se extiende sobre un medio de cultivo apropiado (YGM modificado ó NCP-88) y se incuba a 21-25 C (7).

YGM modificado (14)

Este medio se obtuvo tomando como base el YGM (anexo 3.2) más la combinación de inhibidores adicionados al medio. Las colonias son visibles a los 4 a 6 días, éstas son pequeñas, ligeramente plateadas, con una leve apariencia azulada.

NCP-88 (4)

El medio selectivo y sus inhibidores se indican en el anexo 3.3. A 25 C las colonias son visibles a los 5 días, llegando a un diámetro de 0,5 - 1,5 mm. A los 7 a 10 días estas colonias son redondeadas a irregulares, con márgenes enteros, de color blanco a crema, levantadas, y usualmente mucoides y brillantes. Después de 10 a 12 días las colonias toman un color amarillo pálido.

3-. Test de aglutinación pasiva al látex (7):

El test es aplicable tanto a tubérculos como a tallos y su realización es como sigue:

- tomar una pequeña parte del tejido vascular del tubérculo o del tejido del tallo, añadir tampón TBS (anexo 2.6) en solución con NaCl 0,85 % y 0,1% de azida de sodio. Triturar.
- colocar en cada pocillo de la placa 0,1 ml de las diferentes soluciones antigénicas a testar, incluyendo un testigo sano.
- añadir 0,05 ml de conjugado suero-latex.
- colocar por 30 minutos en agitador de vaivén.
- dejar reposar una hora.

El precipitado es de forma granular, no floculante, en forma de suspensión que se aglomera en estrías irregulares, empezando a ubicarse en la periferia de los pocillos de la placa, normalmente formando un anillo. Las reacciones negativas aparecen formando un punto blanco grueso en el fondo del pocillo.

4-. Test ELISA (7):

El método ELISA Sandwich consta de las siguientes etapas:

- sensibilización de las placas. Depositar 200 ul de solución de gammaglobulinas en tampón carbonato pH 9,6 (anexo 2.3) en cada pocillo de la placa, taparla herméticamente e incubarla durante 5 horas a 37 C.
- lavado de pocillos. Lavar con PBS-Tween (anexo 2.5) dejando reposar durante 3 minutos. Repetir el lavado 3 veces, vaciando la placa.
- depositar en cada pocillo 200 ul de las muestras y testigo en tampón PBS (anexo 2.4). Tapar la placa herméticamente e incubarla 16 horas a 28 C. Si los antígenos a testar proceden de cultivos puros se colocan las bacterias en suspensión en tampón E (anexo 2.7) a una concentración aproximada de 3×10^8 ufc/ml. En cambio si estos antígenos proceden de muestras vegetales, se colocan trozos de anillo vascular de tubérculos o tallos en maceración con tampón E en la proporción 1:5 (p/v) durante 16 horas a 4 C. El test deberá disponer de un control positivo (antígeno catalogado y conocido) y uno negativo (muestra vegetal sana) como elementos de juicio comparativos.

- lavado de pocillos.
- adición del conjugado, depositar en cada pocillo 200 ul del conjugado gammaglobulina-enzima en tampón PBS + 0,4 % albúmina de huevo. Tapar la placa herméticamente e incubar 4 horas a 37 C.
- lavado de pocillos.
- adición del sustrato. Depositar 200 ul del sustrato preparado en el mismo momento de su uso, en cada pocillo de la placa. Tapar la placa herméticamente e incubar a temperatura ambiente durante una hora al abrigo de la luz solar directa. El sustrato empleado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenil fosfato que se utiliza en la proporción de 0,8 mg/ml del tampón sustrato (anexo 2.8).
- lectura por evaluación visual o por evaluación fotométrica, mediante la medición de la extinción a 405 nm. Las reacciones positivas producen coloración amarillo intensa.

5-. Test de inmunofluorescencia (7):

Inmunofluorescencia directa:

El anticuerpo marcado se aplica directamente sobre el antígeno y se deja 30 minutos en cámara húmeda. A continuación se lava la lámina y se observa al microscopio.

Inmunofluorescencia indirecta:

- obtener los extractos bacterianos a partir de la zona del estolón, macerando en un disolvente no tóxico (anexo 2.1) por treinta minutos. Filtrar utilizando una bomba de vacío, centrifugar a 4.000 g/20 min y agregar tampón fosfato 0,01 M pH 7,2 (anexo 2.2) hasta un volumen de 1 ml.
- depositar un volumen calibrado de las diferentes diluciones antigénicas (101, 102, 103) sobre los círculos marcados de un portaobjetos. Dejar secar los portaobjetos.
- proceder a la fijación de las suspensiones bacterianas. Una de las formas de fijación consiste en cubrir los portaobjetos con alcohol de 95 grados durante 10 min, al cabo de los cuales se tira el exceso de alcohol y se pasan por la llama con precaución.
- depositar sobre los círculos una gota gruesa de suero inmunológico no marcado, a la dilución elegida, exceptuando uno que va a servir como control y que se recubre con tampón fosfato 0,01 M pH 7,2 (anexo 2.2). Se deja reposar la gota cubriendo como siempre la totalidad del círculo durante 30 min.
- lavado : eliminar el suero con tampón fosfato procurando no insidir directamente sobre el círculo. Evitar que el suero arrastrado caiga sobre el círculo control. Luego introducir el portaobjetos en un baño con tampón fosfato durante 5 min, proceso a repetir dos veces.
- secar con cuidado y rapidez todo el portaobjeto a excepción del interior de los círculos.
- depositar sobre cada uno de los círculos una gota de suero fluorescente a la dilución escogida. La gota deberá cubrir totalmente los círculos durante 30 minutos.
- lavado : igual al anterior.
- secar el portaobjetos, excepto el interior de los círculos.
- depositar una gota de glicerina tamponada 0,1 M pH 7,6 (anexo 2.9) en el centro de cada círculo o sobre la superficie del cubreobjetos.
- si hay células fluorescentes en gran número, el test IF se considerará como potencialmente positivo.
- la presencia de células fluorescentes de bacterias corineformes saprófitas se considera un hecho normal. Sin embargo, si el número de bacterias fluorescentes en el precipitado excede a 106 bacterias/ml, probablemente existe la bacteria causal de la podredumbre anular. Cuando la población es menor a 103 bact/ml, las muestras son normalmente negativas, pero podrían ser consideradas como sospechosas.

Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico:

El aislamiento directo del patógeno con medios selectivos presenta inconvenientes tales como crecimiento muy lento, por tal motivo, en caso de estar en baja concentración, otros microorganismos en el huésped pueden enmascarar su detección. Sin embargo, presenta la ventaja que detecta bacterias viables, ya que sólo éstas pueden formar colonias. El nivel mínimo de detección estimado es de 10⁴ y 10⁵ ufc/g de tejido fresco (4,14).

McDonald y Borrel (13) destacan que en Canadá se comenzó a utilizar como método de diagnóstico de certificación la inmunofluorescencia (IF) ya que esta metodología ha mejorado considerablemente al emplear el anticuerpo monoclonal 9A1, desarrollado por el Dr. Solke De Baer de la estación experimental de Vancouver. El método hasta el momento utilizado era tinción Gram - Aglutinación látex.

De Boer (5), al realizar un estudio comparativo entre IF y ELISA, indica que la IF con anticuerpos monoclonales es la prueba serológica más sensible para detectar especies de bacterias específicas. Sin embargo, ELISA tiene la ventaja que puede aplicarse conjuntamente a un número alto de muestras en un menor tiempo y los resultados pueden ser cuantificados con facilidad. El ELISA más indicado para *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* es el de sandwich indirecto, con una sensibilidad de 10⁶ ufc/ml, la cual es mayor si se considera que detecta antígenos solubles en la planta.

Gudmestad et al (9) en un estudio realizado en plantas de papa, determinaron que los procedimientos serológicos ELISA e IF son altamente sensibles para detectar la bacteria en la ausencia de expresión de síntomas, poblaciones menores a 10⁶ ufc/g pueden ser detectadas con una sensibilidad relativa de 50 a 75 %. Comparando los dos métodos, ELISA fue generalmente más sensible que IF para detectar la bacteria en tallos de papa (10⁵ ufc/g de tejido pueden ser detectadas con una sensibilidad de 72 %). Los resultados demuestran la facilidad de utilizar procedimientos serológicos para detectar infecciones durante la estación de crecimiento, lo difícil es llegar a determinarla en lotes de tubérculo de papa.

Westra et al (15) al comparar métodos de diagnóstico, llegaron a establecer que combinaciones de tinción de Gram con LAT (aglutinación látex) o ELISA resultan ser más efectivas que cada una por sí sola. De ambas combinaciones, la mejor resultó ser, aunque no estadísticamente, tinción de Gram - LAT, método que generalmente se prefiere en los laboratorios debido a que los ensayos pueden ser corridos simultáneamente y el diagnóstico puede ser hecho en 15 a 30 minutos.

Al respecto De Boer et al (6) al evaluar lotes de plantas y de papa semilla, utilizando muestras compuestas de 200 tallos o de 200 tubérculos, mediante los test serológicos ELISA e IF, sugieren que la combinación de IF y ELISA es una proposición efectiva para testar muestras compuestas y que la probabilidad de detección de la bacteria depende del tamaño de la muestra, la representatividad de la muestra y la incidencia de infección. Esta proposición de utilizar IF y ELISA se destaca aún más si consideramos que Baer y Gudmestad (1) determinaron que razas no mucoides de la bacteria no producen suficiente polisacárido extracelular (EPS) o el EPS es diferente y no son detectables por ELISA cuando se utilizan anticuerpos hechos para razas mucoides. Razas intermedias sin embargo, son detectadas usando ELISA. Si bien se observó que las poblaciones no mucoides fueron bajas, igual son un problema ya que los anticuerpos utilizados en ELISA, comerciales o privados, son producidos a partir de razas mucoides. Por lo tanto, el método serológico capaz de determinar razas mucoides y no mucoides con un nivel de sensibilidad equivalente es IF.

Finalmente, métodos más sensibles para la detección de esta bacteria se encuentran aún en etapa de investigación. Es el caso de la selección de partidores específicos para PCR que hasta el momento ha dado resultados muy auspiciosos (12).

Referencias:

1. BAER, D. ; GUDMESTAD, N. 1993. Serological Detection of Nonmucoid Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* in potato. *Phitopathology* 83(2): 157-163.
2. CHRISTIE, R. ; SUMALDE, A.; SCHULZ, J.; GUDMESTAD, N. 1991. Insect Transmission of the Bacterial Ring Rot Pathogen. *American Potato Journal* 68 (6): 363-372.
3. COSAVE. 1991. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*, método cuarentenario N°1. In : Procedimientos y métodos analíticos para materiales de propagación. Montevideo, Uruguay.
4. CRUZ, A. DE LA; WIESE, M.; SCHAAD, N. 1992. A Semiselective Agar Medium for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* from Potato Tissues. *Plant Disease* 76(8): 830-834.
5. DE BOER, S. 1991. Current Status and Future Prospects of Bacterial ring Rot Testing. *American Potato Journal*. 68 (2): 107-113.
6. _____; STEAD, D.; ALIVIZATOS, A.; JANSE, J.; DE HAAN, T.; VAN VAERENBERGH, J.; MAWHINNEY, J. 1994. Evaluation of Serological Test for Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* in Composite Potato Stem and Tuber Samples. *Plant Disease* 78 (7): 725-729.

7. ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION 1987. *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. y Kotth) Skapt y Burkh. Agente productor de la podredumbre anular de la patata. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 86 p.
8. _____. 1991. Manual Laboratorio: diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 485 p.
9. GUDMESTAD, N. ; BAER, D. ; KUROWSKI, C. 1991. Validating Immunoassay Test Performance in the Detection of *Corynebacterium sepedonicum* During the Growing Season. *Phytopathology* 81(4): 475-480.
10. ICOCHEA, T. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Perú, Centro Internacional de la Papa. 166 p.
11. LANGERFELD, E. 1992. Bacterial Ring Rot of potatoes (*C. m. subsp. sepedonicus* (spieck. et Kotth) Davis et al.) from the biological, epidemiological, ecological and economic angle: a survey of the literature. *Plant Research and Development* (Germany) (35): 93-109.
12. LI, X.; WARD, L.; DE BOER, S. 1994. Selection of specific PCR primers for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *American Potato Journal* 71(10):682.
13. McDONALD, J.; BORREL, B. 1991. Development of post harvest testing in Canada. *Am. Potato Journal* 68 (2): 115-121.
14. ROOZEN, N. ; VAN VUURDE, J. 1991. Development of a semiselective medium and immunofluorescence colony - staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97(5): 321-334.
15. WESTRA, A.; SLACK, S.; DRENNAN, J. 1994. Comparison of some diagnostic assays for bacterial ring rot of potato: a case study. *American Potato Journal* 71(9): 557-565.

ANEXOS

Anexo 1:

1-. Tinción de Gram (modificación de Hucker, Doetsch 1981) (3, 7):

Solución A:

Disolver 2 g cristal violeta en 20 ml etanol 95%. Disolver 0,8 g oxalato amónico en 80 ml de agua destilada. Mezclar ambas soluciones.

Solución B:

Triturar en un mortero 1 g yodo y 2 g yoduro potásico. Añadir 300 ml de agua destilada y agitar hasta disolución.

Solución C:

Mezclar 2,5 g de safranina y 100 ml de etanol al 95 % y guardar. Diluir la solución a 1/10 para trabajar.

Proceso de tinción:

- preparar en los portaobjetos las extensiones, secar al aire y fijar con calor.

- cubrir con solución A por 1 min y lavar brevemente.
 - cubrir con la solución B por 1 min, lavar y escurrir.
 - decolorar con etanol al 95% durante 30 seg, lavar y secar.
 - cubrir con solución C por 10 seg, lavar y secar.
 - las bacterias Gram-positivas se tiñen azul-violeta y la negativas rosado-rojo.
-

Anexo 2:

1-. Tampones (3,7):

PBS 0,05 mol/l, pH 7,0:

Este buffer es usado para la maceración del tejido del tubérculo.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,00 g
Agua destilada	1,00 l

PBS 0,01 mol/l, pH 7,2:

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,7 g
Na ₂ H ₂ PO ₄	0,4 g
NaCl	8,0 g
Agua destilada	1,0 l

Tampón carbonato pH 7,6:

CO ₃ Na ₂	1,59 g
CO ₃ HNa	2,93 g
NaN ₃	0,20 g (optativo)
Agua destilada	1,00 l

Llevar a pH 9,6 con HCl 1 N ó con NaOH 1 N. Conservar a 4 C.

Tampón fosfato pH 7,4 (PBS):

NaCl	3,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 g (optativo)
Agua destilada	1,0 l

Tampón PBS - Tween:

Tween 20	0,5 ml
PBS	999,5 ml (anexo 2.4)

Tampón TBS:

Tris	6,05 g
Agua destilada	800,00 ml

Mezclar y llevarlo a pH 7,4 con HCl 0,1 M.

Tampón E:

NaCl	8,0 g
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,7 g
NaN ₃	0,2 g
Agua destilada	1,0 l

Llevar a pH 7,4 con HCl 1 N o con NaOH 1 N. Conservar a 4 C.

Tampón substrato:

Dietanolamina	9,7 ml
Agua destilada	700,0 ml
NaN ₃	0,2 g

Llevar a pH 9,8 con HCl 1 N. Completar a 1 litro.

Glicerina tamponada 0,1 M:

Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	3,20 g
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50,00 ml
H ₂ O destilada	100,00 ml

Anexo 3:

1-. Medios de cultivo selectivos:

Medio Extracto Levadura-Sales Minerales (YGM) (7,8):

Extracto de levadura	2,000 g
D(+)Glucosa x H ₂ O	2,500 g
K ₂ HPO ₄	0,250 g
KH ₂ PO ₄	0,250 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,100 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,050 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,005 g
Agar Oxid N°3	15,000 g

Llevar a un litro con agua dest. Esterilizar a 121 C/15 min.

YGM Modificado (14):

Al medio YGM ya indicado se adicionan los siguientes inhibidores:

Polymyxin B sulfato (SIGMA P-1004)	30 mg/l
Acido nalidixico (SIGMA N-8874)	2 mg/l
S-0208 (Sumuto no Chen Co. Osaka Japón)	125 mg/l

Disolver el ácido nalidixico en NaOH, diluido 100 veces en agua destilada. Los inhibidores se aplican por filtración (0,45 μ m) a 50 C (t C media) separadamente, en un volumen de 0,5 % del volumen final del medio.

NCP-88 (4):

Agar nutriente Difco	23,00 g
Extracto de levadura	2,00 g
K ₂ HPO ₄	2,00 g
KH ₂ PO ₄	0,50 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g
D-manitol	5,00 g

Autoclavar y enfriar a 50 C para aplicar por filtración los siguientes inhibidores (por litro): 300 μ l de polymyxin B-sulfato stock (7.900 U por mg, 10 mg/ml stock); 800 μ l de ácido nalidixico stock (sal de Na, disuelto en 10 mM NaOH, 10 mg/ml stock), y 2,0 ml de cycloheximida stock (disuelto en 47,5% de etanol, 100 mg/ml stock).
