

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación de un método enzimático de detección presuntiva de *Morganella spp.* y *Providencia spp.* en huevecillo y larvas de *Ceratitis capitata* <sup>(-invD53)/Toliman 99</sup> de planta de producción de insecto estéril

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Carmen María Papa Loaiza  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019



Validación de un método enzimático de detección presuntiva de  
*Morganella spp.* y *Providencia spp.* en huevecillo y larvas de  
*Ceratitis capitata* <sup>(-invD53)/Toliman 99</sup> de planta de producción de  
insecto estéril

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Validación de un método enzimático de detección presuntiva de *Morganella spp.* y *Providencia spp.* en huevecillo y larvas de *Ceratitidis capitata* <sup>(-invD53)/Toliman 99</sup> de planta de producción de insecto estéril

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Carmen María Papa Loaiza  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología


Guatemala

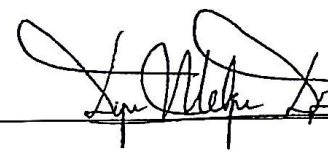
2019


Vo.Bo. :

(f)   
Dalia Lau-Bonilla, PhD.

Tribunal Examinador

(f)   
Dalia Lau-Bonilla, PhD.

(f)   
MSc. Dyna Melgar Dorigoni

(f)   
MA. Isabella García Caffaro

Fecha de aprobación: jueves 5 de diciembre, 2019.

## PREFACIO

Este trabajo lleva un agradecimiento a mis padres, quienes me brindaron todo su apoyo durante la carrera.

A las personas del programa MOSCAMED, en especial a Dyna Melgar por su asesoría y enseñanza acerca del proceso de cría masiva de insectos y a Pedro Rendón por permitirme realizar el análisis del método dentro de la planta.

A Pamela Pennington, por su apoyo y seguimiento del proceso del trabajo experimental.

A Dalia Lau-Bonilla por su asesoría durante la elaboración de mi tesis.

A Nohemy Zelada y Krizstina Rios por su apoyo en la proporción de reactivos y material de laboratorio necesario.

## ÍNDICE

Prefacio.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de cuadros.....	ix
Resumen.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. MOSCAMED.....	4
1. Historia del programa.....	4
2. Incidencia en Guatemala.....	5
B. <i>Ceratitis capitata</i> .....	5
1. Ciclo de vida.....	5
2. Producción del insecto estéril.....	7
3. Microbiota de la mosca.....	7
C. Tribu Proteae.....	8
1. Pruebas bioquímicas de identificación.....	9
2. Reacción de fenilalanina desaminasa.....	9
3. Agares diferenciales.....	10
D. Cuantificación de ácido fenil pirúvico.....	11
1. Cinética enzimática.....	11
E. Estándares de calidad colorimétricos.....	11
V. METODOLOGÍA.....	12
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
VII. CONCLUSIONES.....	26
VIII. RECOMENDACIONES.....	27
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	28
X. ANEXOS.....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1: Avance del mantenimiento de las áreas libres de mosca del Mediterráneo.....	4
Figura No. 2: Áreas de prevalencia de la mosca del Mediterráneo en Guatemala.....	5
Figura No. 3: Ciclo de vida de <i>Ceratitis capitata</i> .....	6
Figura No. 4: Árbol filogenético de la tribu Proteae a partir del gen rpoB.....	8
Figura No. 5: Reacción de la enzima fenilalanina desaminasa sobre fenilalanina.....	9
Figura No. 6: Reacción colorimétrica de ácido fenil pirúvico con ión férrico.....	10
Figura No. 7: Prueba del agar fenilalanina negativa vs positiva.....	10
Figura No. 8: Diagrama de prueba de acción de la enzima fenilalanina desaminasa.....	14
Figura No. 9: Diagrama general de pruebas espectrofotométricas con cloruro de hierro.....	14
Figura No. 10: Diagrama general de pruebas para la adecuación del agar.....	16
Figura No. 11: Diagrama del proceso de desinfección y siembra planta El Pino.....	17
Figura No. 12: Reacción de fenilalanina desaminasa en <i>Morganella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>E.coli</i> y <i>Providencia</i> .....	18
Figura No. 13: Diferencia de coloración entre <i>Klebsiella</i> y <i>Morganella</i> en caja Petri.....	20
Figura No. 14: Crecimiento de <i>Morganella</i> y <i>Klebsiella</i> a partir de un cultivo mixto.....	20
Figura No. 15: Crecimiento de <i>Bacillus</i> y <i>Morganella</i> en agar nutritivo con cristal violeta.....	22
Figura No. 16: Aislamiento por punteado de <i>Klebsiella</i> y <i>Morganella</i> .....	22
Figura No. 17: Pruebas de crecimiento de cepas Gram negativo.....	23
Figura No. 18: Porcentaje de bacterias Proteae de bacterias aisladas de interior de huevecillo y larvas.....	24
Figura No. 19: Crecimiento de <i>Klebsiella</i> vs <i>Morganella</i> en agar fenilalanina.....	31
Figura No. 20: Crecimiento de <i>Providencia</i> vs <i>Klebsiella</i> en agar fenilalanina.....	31
Figura No. 21: Réplicas de pruebas de crecimiento de cepas Gram negativo.....	35
Figura No. 22: Presencia de bacterias de Proteae en el interior de huevecillos.....	35
Figura No. 23: Presencia de bacterias de Proteae en superficie de huevecillos.....	36
Figura No. 24: Presencia de bacterias de Proteae en el interior de larvas primera colecta.....	36
Figura No. 25: Presencia de bacterias de Proteae en interior de larvas quinta colecta.....	37
Figura No. 26: Presencia de bacterias de Proteae en superficie de larvas quinta colecta.....	37

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias de la tribu Proteae.....	9
Cuadro 2: Variables .....	12
Cuadro 3: Resultados de crecimiento bacteriano a partir de huevecillo, larvas machos y larvas hembra.....	24
Cuadro 4: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en huevecillos.....	32
Cuadro 5: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en larvas hembra.....	33
Cuadro 6: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en larvas macho.....	34

## RESUMEN

La industria agrícola se ve afectada por la plaga de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis Capitata*, la cual oviposita dentro de las frutas y el desarrollo de las larvas acelera el proceso de deterioro, evita que esta pueda consumirse y exportarse. La planta El Pino, ubicada en Santa Rosa, Guatemala, se dedica a la cría masiva de machos estériles, con el objetivo de controlar la plaga en Guatemala y zonas de Norteamérica. El aumento de la presencia de las bacterias de la tribu Proteae (*Proteus*, *Morganella* y *Providencia*) implica un riesgo asociado a la salud de la cepa ocasionando un descenso en los parámetros de producción, además que la cantidad de biopelículas producida inhabilita la movilidad de las larvas, repercutiendo económicamente a la planta. Las condiciones de temperatura, nutrientes y pH provocan un aumento bacteriano en el proceso de cría, donde se encuentran estos tres géneros bacterianos. Debido a que en estos se ha reportado la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa, el objetivo de este trabajo fue desarrollar método de detección enzimática, optimizando el agar fenilalanina, para la detección de estas bacterias en huevo y estadíos larvales. Como resultado, se obtuvo un método que consiste en un agar capaz de aislar bacterias Gram negativo, el cual diferencia *Morganella* y *Providencia* de otras enterobacterias mediante la adición de cloruro férrico. Con las pruebas realizadas se encontró la presencia de *Morganella* y *Providencia* en el interior de larvas de distintas colectas. Con respecto a los huevos, se encontró una menor cantidad de incidencia de las bacterias en comparación con las larvas. No se encontraron bacterias de interés en la superficie de las larvas, pero se recomienda para un próximo estudio un análisis en mayor escala en diferentes etapas de la producción, para realizar una comparación estadística. También se recomienda realizar pruebas de resistencia a la colistina, para adicionarlo al agar y hacerlo selectivo.

## I. INTRODUCCIÓN

La técnica del insecto estéril es una técnica de control de plagas que se basa en la liberación de machos estériles con el objetivo de copular con las hembras del campo. De esta forma, los huevos no se desarrollan y la población del insecto disminuye en el transcurso del tiempo.

La planta El Pino, perteneciente al programa MOSCAMED, produce aproximadamente 1000 millones de machos estériles de la cepa de sexado genético *Ceratitis capitata* <sup>(-invD53)/Toliman 99</sup> por semana, los cuales son exportados en fase de pupa hacia Norteamérica y otros destinos (MOSCAMED, 2018). Una dificultad que se ha encontrado en el proceso de producción, son los brotes recurrentes de bacterias pertenecientes a la tribu Proteae (*Morganella*, *Proteus* y *Providencia*), que son patógenas para la mosca *Ceratitis capitata*, induciendo efectos detrimentales en los primeros instares (Augustinos *et al.*, 2015). El aumento de los niveles de estas bacterias implica un riesgo asociado a la salud de la cepa ocasionando un descenso en los parámetros de producción, repercutiendo económicamente a la planta.

Para mitigar este problema es necesario contar con pruebas de laboratorio reproducibles que permitan la detección e identificación de las especies de la tribu Proteae, en el menor tiempo posible, para permitir la aplicación de medidas correctivas oportunas. Es por ello que el objetivo principal del presente trabajo de graduación es la validación del uso del agar fenilalanina para la detección de estas tres especies, en la planta de El Pino, con el propósito de contribuir al manejo y control de brotes causados por bacterias de la tribu Proteae.

La prueba a validar se basa en que las tres especies de Proteae, a diferencia de otras enterobacterias, presentan la enzima fenilalanina desaminasa. Este hecho lleva a formular la hipótesis que la utilización de agar con fenilalanina puede ser una forma rápida y eficiente para la detección de estas especies bacterianas. Actualmente no existe en la planta una prueba específica para la detección de estas bacterias y el agar fenilalanina se ha utilizado únicamente en análisis clínicos para la detección de los microorganismos a partir de cultivos puros. En este trabajo se propone realizar la validación de la prueba utilizando muestras de agua provenientes de la suspensión de huevo de *C. capitata*, previo a la siembra en la dieta larval.

El resultado esperado en el estudio es contar con una prueba que permita la diferenciación mediante una reacción enzimática y cambio de color de las colonias de *Morganella* y *Providencia* de otras bacterias encontradas en el proceso de cría masiva y que los valores sean reproducibles y consistentes. Así, implementarlo como una metodología de rutina que forme parte del monitoreo de control de calidad microbiológico de la planta.

## II. OBJETIVOS

### A. General:

Validar un método enzimático para la detección presuntiva de *Morganella sp.* y *Providencia sp.*, mediante la enzima fenilalanina desaminasa en una planta de cría masiva de insectos.

### B. Específicos:

1. Optimizar el agar fenilalanina para la detección eficiente de las bacterias *Morganella sp.* y *Providencia sp.* en la planta.
2. Determinar la aplicabilidad del cloruro de hierro para realizar una prueba espectrofotométrica.

### III. JUSTIFICACIÓN

La mosca *Ceratitis capitata*, conocida como mosca del Mediterráneo, es una especie africana que se ha adaptado a las distintas temperaturas y está distribuida mundialmente. Dentro de su ciclo de vida, las hembras ovipositan sus huevos dentro de frutos, ocasionando que las larvas crezcan dentro de ellos. Esto genera pérdidas en la agricultura, ya que la fruta no es comestible. La técnica del insecto estéril en esta especie es aplicada en varias partes del mundo, en especial en Guatemala, donde se encuentra la planta de producción más grande del mundo (Planta de producción del insecto estéril, ubicada en El Pino, Santa Rosa, Guatemala) la cual forma parte del programa MOSCAMED.

El programa MOSCAMED produce alrededor de 1000 millones de insectos por semana, de los cuales una parte es exportada a Estados Unidos en fase de pupa, a México en forma de huevo y la otra parte es utilizada para liberación en Guatemala (MOSCAMED, 2019). El programa permite que la fruta producida en Guatemala sea exportada, ya que se cuenta con la garantía de que es producida en una zona libre de esta plaga.

La planta cuenta con un sistema de incubación de huevos en agua para colonias base a 25°C y machos a 34°C, condición que propicia el crecimiento de bacterias, entre ellas las de la tribu Proteae (*Morganella sp.*, *Proteus sp* y *Providencia sp.*) (MOSCAMED, 2019). Estas bacterias introducen efectos detrimentales en los distintos estadios del insecto, ya que son patógenas para varias especies de moscas de la fruta. Posteriormente cuando la bacteria crece produce biopelículas en la superficie de la larva (Augustinos *et al.*, 2015). La biopelícula reduce la movilidad de la larva, no salta al receptor de colecta, se adhiere a la bandeja y empupa en la superficie. Estos aspectos provocan pérdidas económicas en la producción, ya que debe incrementarse la siembra de dieta larval,

A pesar de utilizar el principio de restricción de pH en la dieta larval, las bacterias logran resistir pHs ácidos, siendo muy difícil inhibirlas o eliminarlas. Por esta razón, la detección en el estadio de huevo previo a la siembra es esencial, ya que se puede realizar un lavado con agua adicional previo a la siembra y disminuir la carga bacteriana. El desarrollo de una prueba específica facilitaría la identificación de estas bacterias patógenas evitando pérdidas, por lo que se espera con este trabajo encontrar una forma práctica de implementarla. Actualmente no se cuenta en la planta con un medio específico para el aislamiento de las bacterias de la tribu Proteae, por lo que el objetivo principal fue desarrollar un agar adecuado para su identificación.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. MOSCAMED

#### 1. Historia del programa

La mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) es una de las plagas de mayor importancia económica en el mundo debido a su alta reproducción en plantaciones de fruta (Vera, Rodriguez, Segura, Cladera, & Sutherst, 2002). El programa MOSCAMED en Guatemala está a cargo del control de esta plaga mediante la técnica del insecto estéril. Nació con la visión de ser el organismo internacional especializado en la prevención y erradicación de la plaga y ayudar a la economía guatemalteca. Actualmente, el programa cuenta con la planta de producción de la mosca estéril del Mediterráneo más grande, exportando adultos estériles a México y Estados Unidos. Durante los últimos años, como se puede ver en la Figura 1, ha ayudado a la erradicación de la mosca del Mediterráneo en ciertas áreas del país, ampliando el territorio libre de plaga (MOSCAMED, 2018).

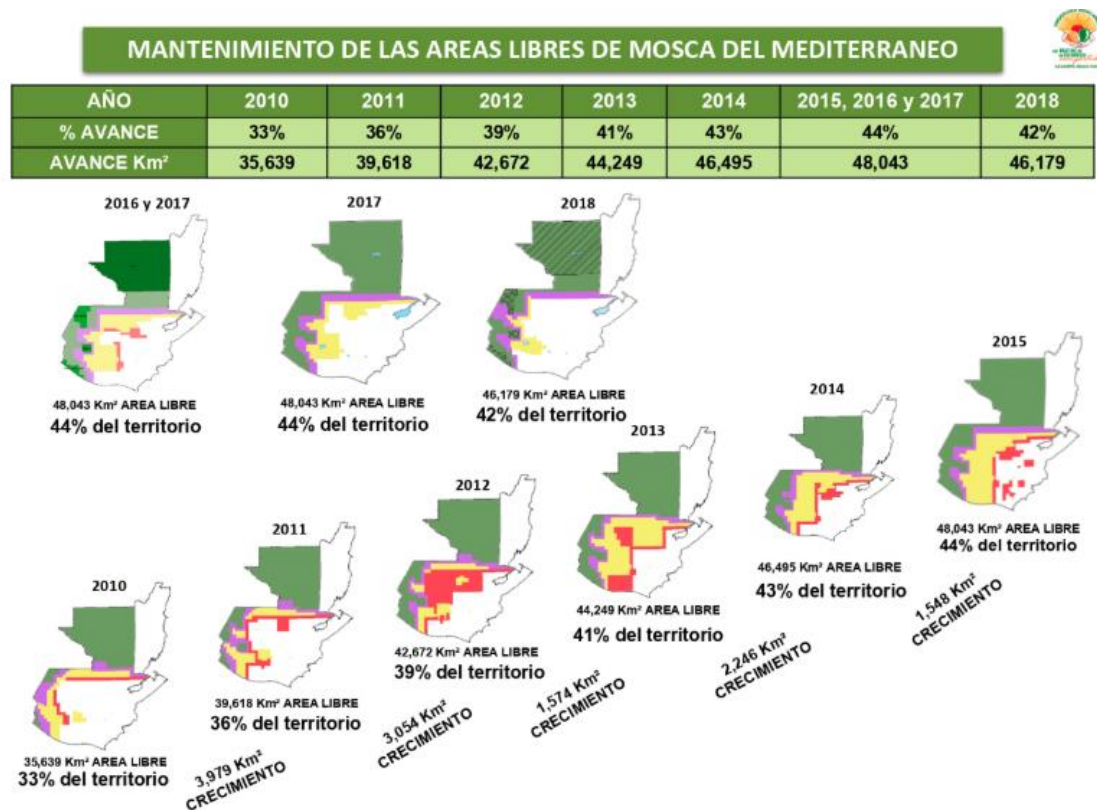


Figura No. 1: Avance del mantenimiento de las áreas libres de mosca del Mediterráneo (MOSCAMED, 2018).

## 2. Incidencia en Guatemala

El primer reporte de la mosca del Mediterráneo se dio en 1975. A partir de la creación del Programa MOSCAMED, se ha trabajado en distintas áreas del país para controlar y erradicar la plaga. Como se observa en el mapa de la Figura 2, actualmente se tienen tres áreas libres del insecto, las cuales son Los Huistas (Huhuetenango), Salcajá (Quetzaltenango) y Champerico (Retalhuleu). Se continúa trabajando a lo largo de la región para evitar que los insectos lleguen nuevamente a las zonas libres (MOSCAMED, 2018).

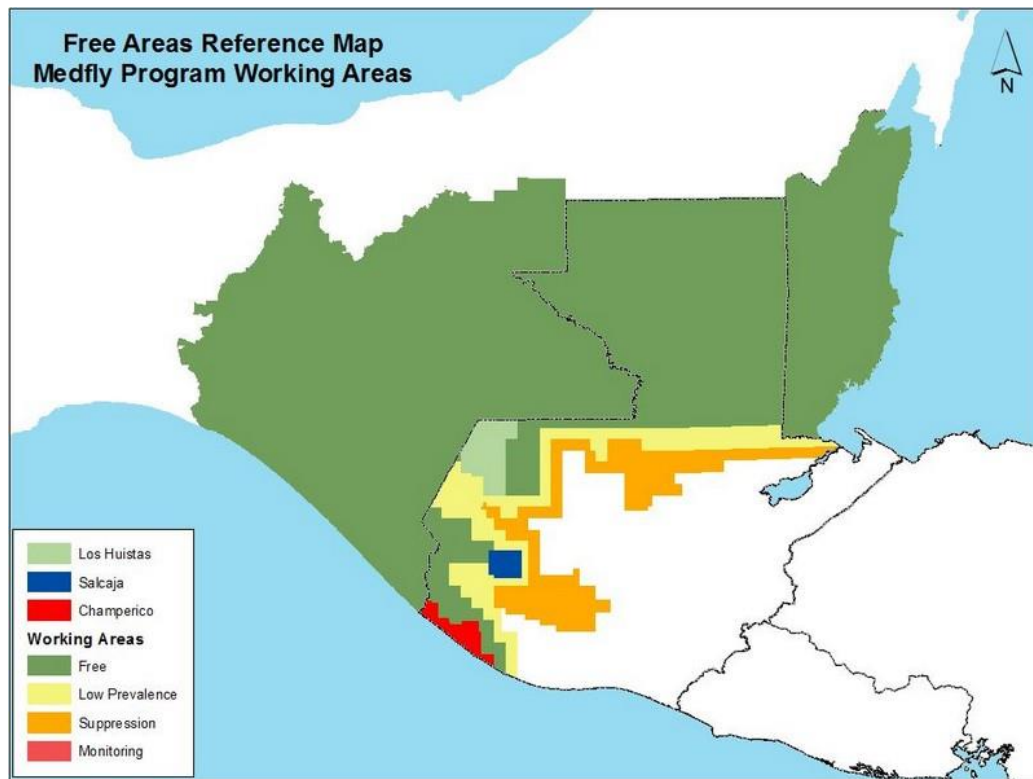


Figura No. 2: Áreas de prevalencia de la mosca del Mediterráneo en Guatemala (MOSCAMED, 2018).

### B. *Ceratitis capitata*

#### 1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de la mosca comienza con los huevos, los cuales son depositados en el interior de las frutas (Gómez *et al.*, 2008). Estos eclosionan entre dos y 7 días durante las épocas de verano y de 20 a 30 días en invierno. Las larvas comienzan a alimentarse de la fruta por 10 a 26 días, pasando por tres estadios larvales. Al estar en el último estado larval, estas saltan de la fruta y pupan en la tierra. Después de 6 a 13 días, los adultos emergen (MOSCAMED, 2018). En la Figura 3 se muestra una comparación aproximada de los tiempos del ciclo de vida en invierno y verano.

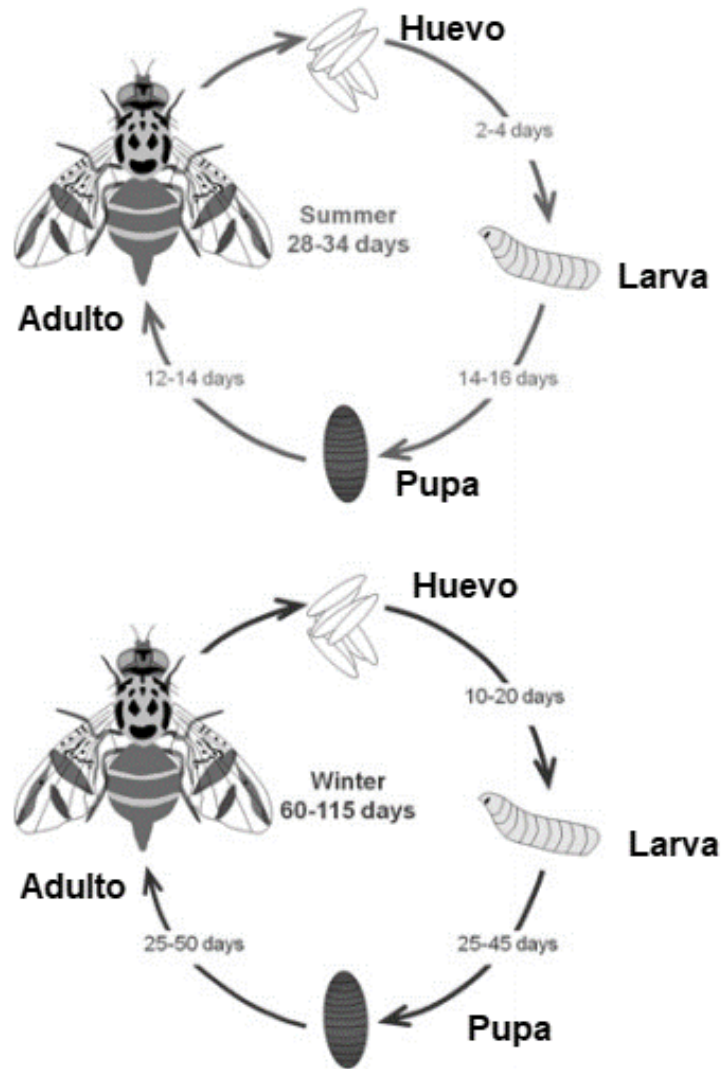


Figura No. 3: Ciclo de vida de *Ceratitis capitata*  
(Broughton, 2012.)

Los adultos machos se diferencian de las hembras al tener setas en forma de rombo. Una hembra comienza a producir huevos a los 7 o 9 días de haber emergido y en condiciones óptimas puede poner hasta 800 huevos a lo largo de su vida (MOSCAMED, 2018).

Los tiempos de desarrollo se ven afectados por condiciones ambientales como temperatura, humedad y tipo de fruta en el que se desarrollan (Gómez *et al.*, 2008).

## 2. Producción del insecto estéril

En la planta del Pino tiene como objetivo controlar las condiciones para obtener la mayor cantidad y calidad de insectos viables posible. Por este motivo, el proceso de limpieza y desinfección, temperatura, humedad, insumos de dieta y dieta larval es sumamente importante y continuamente controlado. La planta tiene áreas especializadas para cada tipo de actividad (MOSCAMED, 2018). La cepa utilizada por la planta es Genetic sexing strain (GSS), la cual contiene una mutación donde las hembras son homocigotas para un gen que no resiste altas temperaturas. Además, hace que las pupas tengan un color distinto al de los machos. Esta característica permite la separación de ambos sexos (Robinson, 2002). A continuación, se describen algunas de las áreas de producción de los adultos estériles.

- Área de reproductores: En esta área se encuentran machos y hembras fértiles en jaulas, en las cuales ocurre el apareamiento y la oviposición donde son producidos los huevos. Estos son recolectados para posteriormente someterlos a tratamiento térmico (MOSCAMED, 2018).
- Área de tratamiento térmico: En este proceso son eliminados todos los huevos que contengan embriones hembras al aplicar temperatura de 34°C, ya que esta sepa está modificada genéticamente para no poder resistir altas temperaturas. Los embriones machos sí logran sobrevivir y desarrollarse correctamente, lo que permite sexarlos durante el proceso. El proceso dura 12 horas para asegurarse que todos los insectos que se desarrollen serán machos (MOSCAMED, 2018).
- Desarrollo larval: En esta área se desarrollan las larvas, el huevo se deposita en dieta larval y pasa por tres estadios larvales alimentándose durante 7 días. Posteriormente las larvas son colectadas en agua y comienzan a empupar (MOSCAMED, 2018).
- Área de pupas: Las larvas son colocadas en aserrín por 12 días en oscuridad y bajas temperaturas. Las pupas son recolectadas 48 horas antes a su eclosión, son pintadas e irradiadas (MOSCAMED, 2018).
- Adulto frío: En esta área se colocan todas las pupas de machos estériles (irradiadas) en torres de emergencia. Los insectos se colocan a temperaturas de congelación hasta el momento de la liberación (MOSCAMED, 2018).

## 3. Microbiota de la mosca

Se han documentado los beneficios de la composición del microbioma como en los humanos, que las bacterias presentes en el tracto digestivo de la mosca benefician su crecimiento y ayudan a su correcto desarrollo (Kyritsis, Augustinos, Cáceres, & Bourtzis, 2017). En términos de producción, una mayor cantidad de larvas de colonias base (machos y hembras) viables son indicadores de cumplimiento de los volúmenes de producción y parámetros de calidad del insecto, por lo que la determinación de la composición del microbioma de las moscas es importante. Se han encontrado que varios géneros de enterobacterias habitan en *Ceratitis capitata*, entre estos *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Morganella* y *Citrobacter* (Augustinos et al., 2015). También se ha determinado que la microbiota cambia dependiendo de la etapa del ciclo de vida (Ami, Yuval, & Jurkevitch, 2010).

Aunque algunas de estas bacterias son beneficiosas para *Ceratitis capitata*, algunas de ellas son patógenas y aumentan la mortalidad en los diferentes instares de la producción. Se ha reportado por ejemplo que *Providencia rettgeri* está directamente relacionada con la baja eclosión de huevos de *Ceratitis capitata* (Msaad Guerfali et al., 2018). Además, produce cantidades considerables de biopelícula (Donlan & Costerton, 2002), lo que reduce la movilidad de las larvas en la dieta larval y su eficiente desempeño en el proceso de salto para colectarse.

La generación de biopelículas es un problema en la producción de *Ceratitis capitata*. Usualmente es controlado evitando el crecimiento bacteriano acidificando la dieta y el agua de la suspensión durante la incubación. Sin embargo, estas bacterias logran sobrevivir a pHs muy ácidos (Liu, Zhu, Hu, & Rao, 2016) por lo que resisten a los procedimientos de control establecidos.

### C. Tribu Proteae

Una tribu bacteriana es una clasificación taxonómica en medio de la familia y el género. Los géneros *Providencia*, *Morganella* y *Proteus* son agrupados en una tribu llamada Proteae. Estas bacterias se caracterizan por ser bacilos móviles Gram negativo no fermentadores (Malbrán, 2013). A continuación, se muestra un árbol filogenético de las especies de los tres géneros.

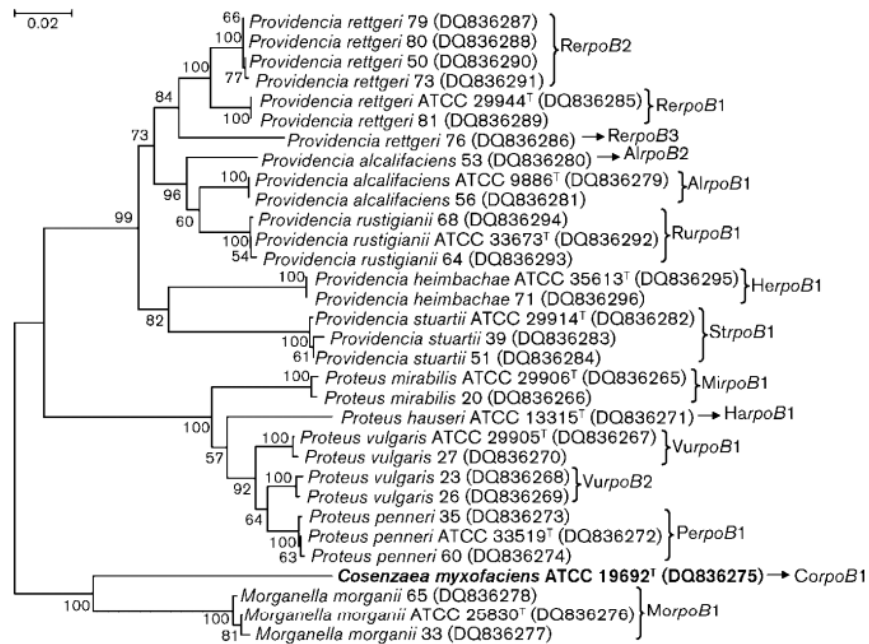


Figura No. 4: Árbol filogenético de la tribu Proteae a partir del gen *rpoB*

(Giammanco et al., 2011)

## 1. Pruebas bioquímicas de identificación

Los géneros presentes en la tribu Proteae se caracterizan por ser resistentes a la colistina, ausencia de decarboxilación de lisina, ausencia de fermentación de lactosa, rojo metilo y voges-proskauer negativos y desaminación de la fenilalanina (O'Hara, Brenner, & Miller, 2000). Esta última característica ha sido esencial para la identificación microbiológica de estos organismos, ya que son los únicos en el grupo de Enterobacterias que producen la enzima fenilalanina desaminasa. Dentro del grupo hay ciertas características que permiten diferenciar entre géneros. Entre estas pruebas se encuentran:

Cuadro No. 1: Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias de la tribu Proteae

	<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i>	<i>Providencia</i>
Ureasa	+	+	0/+
Acido sulfhídrico prod.	+(0)	0 (+20%)	0
Gelatinasa	+(0)	0	0
Citrato utilización	+(0)	0	+(0)
Manita	0	0	0/+
Indol producción	0/+	+	+
Ornitina decarboxilasa	0/+	+	0
Manosa	0	+	+
Movilidad superficial	+0	0	0

(Malbrán, 2013)

## 2. Reacción de fenilalanina desaminasa

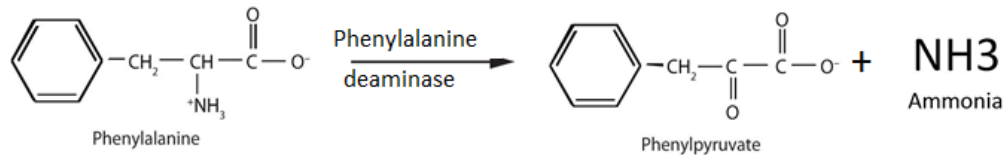


Figura No. 5: Reacción de la enzima fenilalanina desaminasa sobre fenilalanina.

(Acharya, 2016)

La reacción que se muestra en la Figura 5 consiste en la desaminación de la fenilalanina, produciendo ácido fenilpirúvico y amoníaco (Pałka & Kanska, 2012). El ácido fenilpirúvico es un ceto-acido intermediario del metabolismo de fenilalanina. El ácido tiene un leve olor a miel o dulce y es un compuesto cromogénico (European Bioinformatics Institute, 2016). La capacidad de producir un color del compuesto permite que este sea detectado en el medio como una coloración verde, al añadir cloruro férrico. Debido a que la reacción enzimática es reversible, el ácido no permanece mucho tiempo en el medio (Pałka & Kańska, 2012).

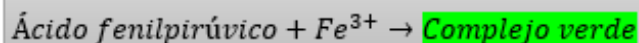


Figura No. 6: Reacción colorimétrica de ácido fenil pirúvico con ión férrico (Winn & Koneman, 2008)

### 3. Agares diferenciales

En 1938, Henriksen y Closs demostraron la capacidad que tenían las especies de *Proteus* para desaminar la fenilalanina. En 1957, Ewing y colaboradores formularon un medio para realizar esta prueba. Este agar se compone de extracto de levadura, DL-fenilalanina, fosfato disódico, cloruro de sodio y agar. El pH final del medio es de 7.3 (BBL, 2015). Este agar no es selectivo, por lo que debe utilizarse a partir de cultivos puros de enterobacterias. Al agregar cloruro férrico, las bacterias de la tribu Proteae producen una coloración verde durante el primer minuto. Un resultado negativo sería la permanencia del color amarillo de la solución de cloruro de hierro, luego de 5 minutos (ver Figura 7). La lectura del medio debe de efectuarse rápidamente, debido a que la reacción dura pocas horas y después se pierde la coloración (BBL, 2015).

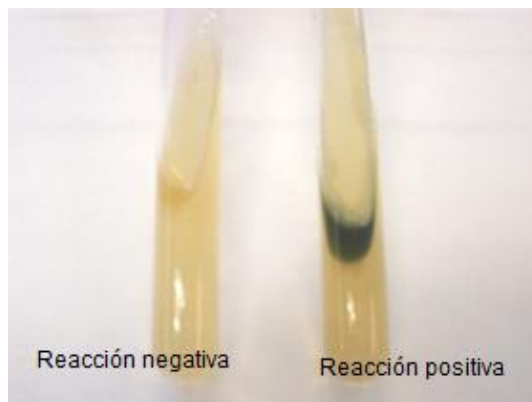


Figura No. 7: Prueba del agar fenilalanina negativa vs positiva (BBL, 2015).

Una de las limitaciones de este método de detección es que existen otras bacterias que producen la enzima fenilalanina desaminasa. Entre estas se encuentran: *Enterobacter agglomerans* (en un 20% de las cepas), *Enterobacter sakazakii* (en el 50% de las cepas), *Rahnella aquatilis* (95% de las cepas) y *Tatumella ptyseos* (90% de las cepas) (MacFaddin, 2000). Por esta razón, en microbiología clínica, es necesario partir de cultivos puros para realizar esta prueba.

## D. Cuantificación de ácido fenil pirúvico

En los humanos existe una enfermedad genética conocida como fenilcetonuria, que consiste en la ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa en el hígado. La ausencia evita que se procese por completo la fenilalanina, quedando como remanente ácido fenil pirúvico en sangre y orina ocasionando daños cerebrales (Rasner, *et,al*, 2014). Se han desarrollado varias metodologías para poder detectarlo. La más común es la cromatografía líquida (HPLC) (Nakahara, Ishida, Yamaguchi, & Nakamura, 1990). Normalmente la prueba consiste en determinar en la muestra de orina la presencia de ceto-ácidos. Al ser un compuesto cromóforo, la determinación por medio de espectrofotometría es posible, midiendo la absorbancia entre 570-690 nm (Escaf, 2003).

### 1. Cinética enzimática

## E. Estándares de calidad colorimétricos

En muchos análisis de control de calidad es necesario tener un estándar de referencia con el cual comparar el resultado del análisis de la muestra. Lo más conveniente es que se cuente con una solución del límite de la turbidez, tono o intensidad del color para que la comparación sea de forma rápida (Whitehead, 1984).

## V. METODOLOGÍA

### A. Sitio de estudio

Planta de producción de insecto estéril el Pino, km. 47.5 Carretera a El Salvador, Parque nacional laguna El Pino, Barberena, Santa Rosa, Guatemala.

### B. Sujetos de estudio

Aislamientos de *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proviencia stuartii* obtenidas en la suspensión de huevo para siembra de la cepa de sexado genético *Ceratitis capitata*<sup>(-invD53)/Toliman 99)</sup> de la planta El Pino de Programa MOSCAMED.

### C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Diseño transversal descriptivo, con enfoque experimental.

Tipo de investigación: Aplicada.

### D. Tipo y tamaño de muestra

Muestreo por conveniencia. Tamaño de muestra: tres réplicas por procedimiento de cada microorganismo.

### E. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluirán en el estudio las bacterias que se encuentren con mayor regularidad en el agua de las incubadoras de la planta y se excluirán las que no.

### F. Variables (conceptualización y operacionalización)

Cuadro No. 2: Variables

Nombre	Descripción	Naturaleza	Nivel de medición	Codificación
Concentración de cloruro férrico	Cantidad de cloruro férrico que se agregará al papel filtro	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Concentración de fenilalanina	Cantidad de fenilalanina que se agregará al medio	Cuantitativa	Continua	g/L
Tiempo de reacción con fenilalanina	El tiempo que se dejará la solución de bacterias en contacto con fenilalanina para generar una reacción.	Cuantitativa	Continua	Segundos/minutos
Tiempo de incubación de las bacterias	Horas que se dejará incubando la placa para presentar un crecimiento adecuado.	Cuantitativa	Continua	Horas

## G. Hipótesis

### Alternativa

La prueba de fenilalanina desaminasa podrá ser utilizada para desarrollar un método colorimétrico de identificación y cuantificación de las bacterias de la tribu Proteae en la planta El Pino.

### Nula

La prueba de fenilalanina desaminasa no servirá como método colorimétrico de identificación y cuantificación de las bacterias de la tribu Proteae en la planta El Pino.

## H. Instrumentos de medición

No se utilizará ningún instrumento para la colección de datos.

## I. Metodología

### 1. Pruebas previas de producción de enzima

#### a. Aislamiento de *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Providencia stuartii*

- 1) Se sembró cada una de las cepas en agar MacConkey.
- 2) Se incubaron por 24 horas a 37°C.
- 3) Fueron almacenadas en refrigeración hasta su uso.

#### b. Preparación de agar fenilalanina

- 1) Se siguió con la receta del agar fenilalanina de laboratorios Britania (BBL, 2015).
- 2) En un litro de agua destilada, se agregó 3.0 gramos de extracto de levadura, 2.0 gramos de DL-fenilalanina, 1.0 gramo de fosfato disódico, 5.0 gramos de cloruro de sodio y 12 gramos de agar.
- 3) Se calentó hasta ebullición para la disolución total.
- 4) Se agregó el medio hasta la mitad de los tubos de vidrio estériles y esterilizar en autoclave.
- 5) Se colocaron los tubos en posición inclinada hasta que solidificaran.
- 6) Se guardaron en refrigeración hasta su uso.

#### c. Prueba de fenilalanina desaminasa

- 1) Se verificó que las colonias reaisladas presenten actividad desaminasa.
- 2) Se tomó una colonia nueva (18 a 24 horas) con un asa y se sembró el inóculo estriando la superficie del medio.
- 3) Se incubó durante 24 horas a 37°C.
- 4) Se agregaron tres gotas de cloruro férrico 10%.
- 5) Se observó el cambio en la coloración.

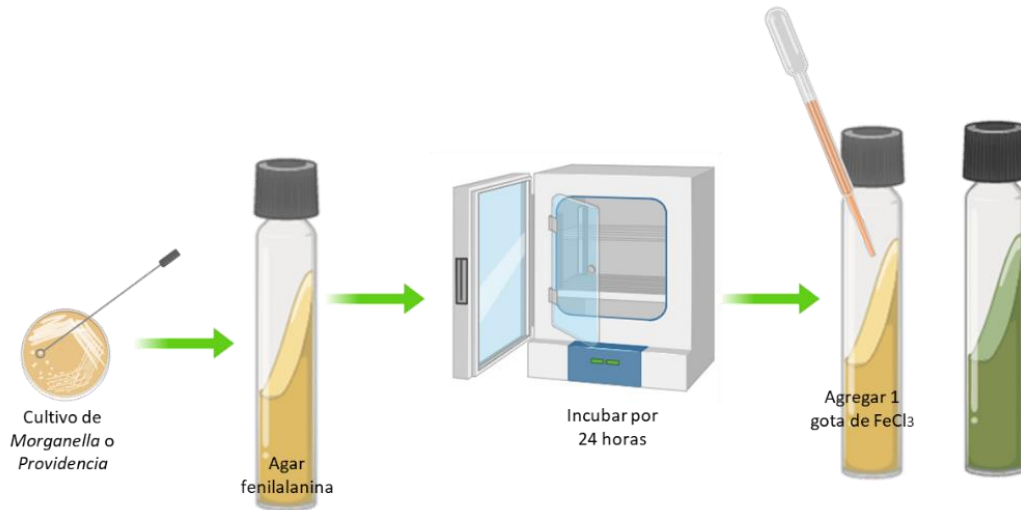


Figura No. 8: Diagrama de prueba de acción de la enzima fenilalanina desaminasa

2. Determinación de la aplicabilidad del cloruro de hierro para realizar una prueba espectrofotométrica.

a. Reacción con bacterias

- 1) Se preparó caldo fenilalanina, siguiendo la receta de agar Britannia (BBL, 2015) (3.0 gramos de extracto de levadura, 2.0 gramos de DL-fenilalanina, 1.0 gramo de fosfato disódico, 5.0 gramos de cloruro de sodio) sin agregar agar.
- 2) Se tomó una colonia de *Morganella morganii* y se incubó por 24 horas en 5 mL de caldo.
- 3) Se le agregó una gota de cloruro férrico al 10 %.
- 4) Se observó si se producía una coloración verde.

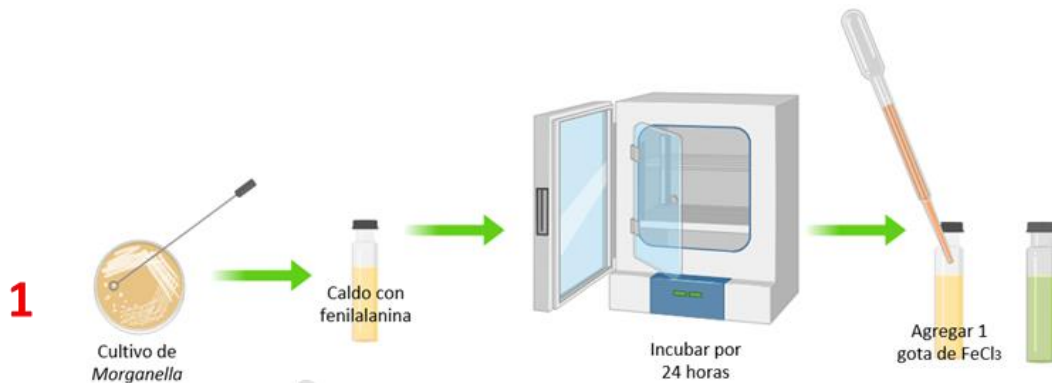


Figura No. 9: Diagrama general de pruebas espectrofotométricas con cloruro de hierro.

3. Optimización el agar fenilalanina para la detección eficiente de las bacterias *Morganella sp.* y *Providencia sp.* en la planta.
  - a. Pruebas en cajas Petri con el agar fenilalanina
    - 1) Se colocó el agar fenilalanina en cajas Petri y se sembraron las dos cepas (*Morganella morganii* y *Providencia sp.*) y como control negativo *Klebsiella pneumoniae*. (Cada una en triplicado).
    - 2) Se incubaron por 24 horas a 37°C, y se observó el crecimiento en las placas
    - 3) Se les agregó cloruro férrico al 10% y se observó la reacción.
  - b. Pruebas de cultivos mixtos con *Klebsiella pneumoniae*
    - 1) En 20 mL de agua de peptona se inoculó *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* a partir de una placa. En otro tubo, se hizo la inoculación de *Providencia sp.* y *Klebsiella pneumoniae*.
    - 2) Se incubaron en agitación a 37°C por 24 horas.
    - 3) Se realizaron diluciones seriadas a partir de la muestra, agregando 0.1 mL en 9.9 mL de caldo estéril hasta obtener dilución  $1 \times 10^{-8}$ .
    - 4) Se sembraron las diluciones de  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-8}$  en placas de agar fenilalanina.
    - 5) Se incubaron por 24 horas a 37 °C.
    - 6) Se pinchó cada colonia con solución de cloruro férrico y se observó la reacción.
  - c. Preparación de papel filtro con solución de fenilalanina
    - 1) Se preparó con agua destilada, 20 mL de solución de fenilalanina de 1.0 g/L, 2.0 g/L y 4.0 g/L. Se esterilizó en autoclave todas las soluciones.
    - 2) Se añadió la solución a papel filtro estériles, previamente cortados del tamaño de una caja Petri hasta que se saturaron.
    - 3) Se esperó a que se secaran, calentándola sobre estufa a baja temperatura en vidrio de reloj.
  - d. Pruebas de cultivo con papel filtro de fenilalanina en agar nutritivo
    - 1) Se sembró 100 µL de diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  en agar nutritivo de cultivos mixtos de *Morganella sp.* y *Klebsiella sp.* y de *Klebsiella sp.* y *Providencia sp.*
    - 2) Se esparció por la placa de agar hasta que quedó uniforme.
    - 3) Se colocó en la placa el papel filtro con la solución de fenilalanina y se incubó por 24 horas a 37°C.
    - 4) Se observó si hubo crecimiento debajo o encima del papel filtro y se le agregó solución de cloruro férrico al 10% con pipeta Pasteur.
  - e. Preparación de papel filtro con cloruro férrico
    - 1) Se cortó el papel filtro del tamaño de una caja Petri.
    - 2) Se añadió la solución de coluro férrico al 10% hasta que se saturara.
    - 3) Se esperó a que se secase a temperatura ambiente.
  - f. Pruebas de diferenciación de colonias
    - 1) En una caja Petri con agar fenilalanina, se marcaron puntos con dos colores distintos, distribuidos aleatoriamente por la placa.
    - 2) Se pinchó una colonia aislada de *Morganella sp.* con asa estéril y se colocó en los puntos marcados con color verde.
    - 3) Se realizó el mismo procedimiento con *Klebsiella sp.*, colocándola en los puntos de color negro.
    - 4) Se incubaron a 37°C por 24 horas.
    - 5) Se colocó el papel filtro y se observó el cambio de coloración en las colonias de *Morganella sp.*
  - g. Pruebas de vertido en placa en agar
    - 1) Se sembraron 100 µL de diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  en agar fenilalanina, cultivos mixtos de *Morganella sp.* y *Klebsiella sp.* y de *Morganella sp.* y *Providencia sp.*
    - 2) Se colocó papel filtro de cloruro férrico y se observó si ocurrió reacción.
    - 3) Se realizó el mismo procedimiento que en el inciso g, utilizando esta vez el método por vertido.

h. Selectividad del medio

- 1) Se agregó 0.0001 g/L de cristal violeta a agar fenilalanina.
- 2) Se sembró Bacilo Gram + por medio de estriado.
- 3) Se sembró *Morganella sp.* y *Providencia sp.* en otras dos cajas.
- 4) Se incubó 37°C por 24 horas y observar si hubo o no crecimiento.

i. Reacción de fenilalanina desaminasa en agar con Cristal violeta

- 1) Se adicionó 0.0002 g/L de cristal violeta al agar fenilalanina.
- 2) Se sembraron 100 µL de diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  de cultivos mixtos de *Morganella sp.* y *Klebsiella sp.* y de *Klebsiella sp.* y *Providencia sp.*
- 3) Se sembraron como control diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  de las tres cepas por separado. *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.* y *Providencia sp.*
- 4) Se colocó el papel filtro de cloruro férrico y se observó si ocurría reacción en las placas.

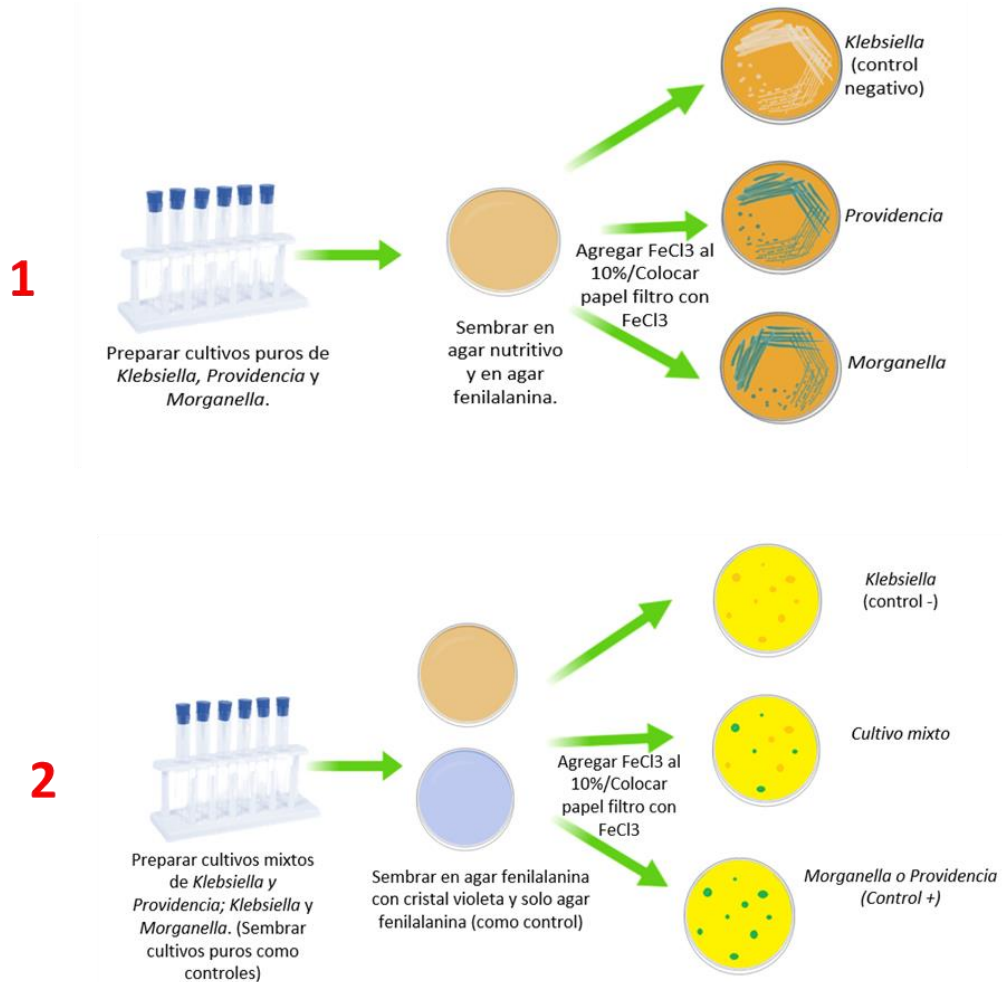


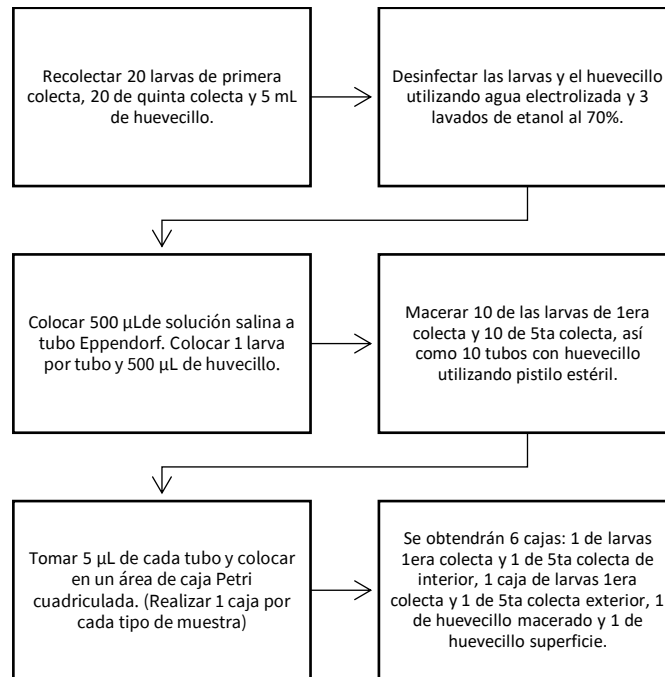
Figura No. 10: Diagrama general de pruebas para la adecuación del agar.

j. Pruebas de crecimiento de especies de Gram negativo en agar fenilalanina

- 1) Se utilizaron caldos con 7 diferentes bacterias (*Pseudomona aeruginosa*, *Shigella sp.*, *Salmonella typhi*, *Esterichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis*).
- 2) Se sembraron en una caja cuadriculada en duplicado, junto con un control positivo de *Morganella sp.* y otro de *Providencia*.
- 3) Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C.
- 4) Se colocó el papel filtro de cloruro férrico y se observó si ocurría reacción en las placas.

k. Detección de *Morganella sp.* y *Providencia sp.* en la planta El Pino

- 1) Se siguió la metodología de la planta El Pino de la siembra de huevo y larva (superficie/interior), utilizando el agar nutritivo y de fenilalanina siguiendo el procedimiento descrito a continuación:



- 2) Se incubaron las cajas a 34°C por 24 horas.
- 3) Se colocó papel filtro para observar coloración.

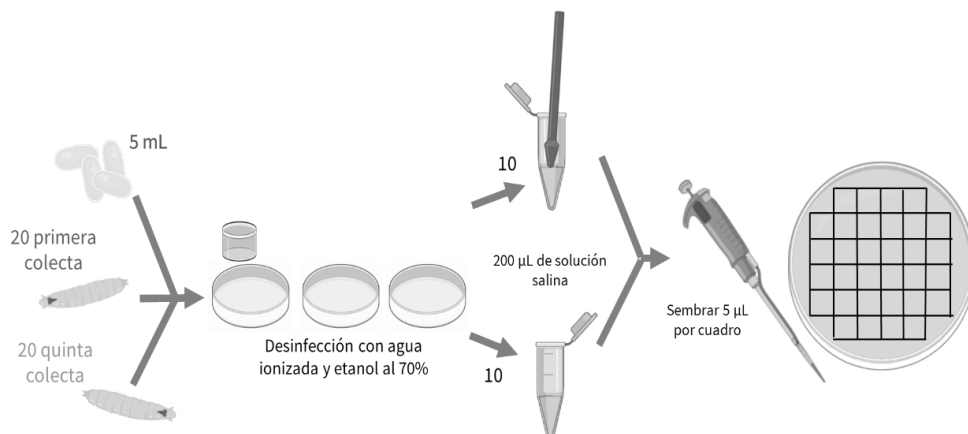


Figura No. 11: Diagrama del proceso de desinfección y siembra planta El Pino

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Pruebas de agar fenilalanina

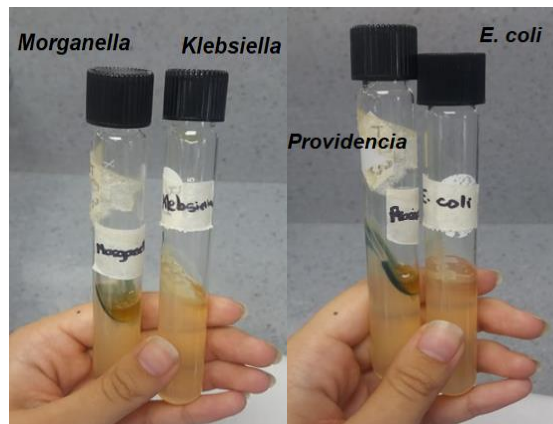


Figura 12: Reacción de fenilalanina desaminasa en *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Providencia sp.* aisladas de planta El Pino.

Las dos cepas utilizadas, *Morganella morganii* y *Providencia sp.* fueron positivas para la prueba de fenilalanina desaminasa a las 24 horas de incubación. Como se puede observar en la Figura 12, la coloración verde era bastante intensa y fácil de distinguir en comparación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Estos resultados concuerdan con los datos reportados de las especies de estos géneros, las cuales tienen la enzima fenilalanina desaminasa (BBL, 2015). Debido a que las muestras provienen de ambiente y no una muestra clínica, era necesario corroborar la capacidad de la producción de la enzima. Al obtener un resultado positivo, se logró proseguir con las modificaciones para lograr obtener un método de detección mediante la reacción de fenilalanina desaminasa.

### B. Pruebas en caldo

La primera etapa de la determinación bacteriana por medio de espectrofotometría consistió en realizar caldo de fenilalanina y observar si se producía el ácido fenil pirúvico a partir de enzima secretada por las bacterias. Sin embargo, luego de 24 horas de incubación, al agregar cloruro férrico, no se produjo ninguna coloración en el medio. Aunque se consideró disminuir la cantidad del medio a 1.0 mL de caldo, la posibilidad de detección bacteriana a partir de muestras puras de agua sería nula. La cantidad de ácido fenil pirúvico a partir de colonias puras no fue suficiente para producir una cantidad distinguible de ácido fenil pirúvico en el medio líquido. Debido a la acidez de la solución de cloruro férrico, las sales en el medio precipitaron, formando una mezcla espesa que impedía observar cualquier indicio de coloración verde. Se realizó otra prueba reduciendo la cantidad de cloruro férrico, pero se obtuvo el mismo resultado, por lo que no fue posible seguir las etapas posteriores de la metodología de determinación por espectrofotometría. Debido a que no era detectable en el agua, tomaría más tiempo tomar bacterias aisladas 24 horas antes y luego sembrarlas en caldo. Por lo tanto, la optimización del agar se consideró una mejor opción para la detección y cuantificación de las bacterias de interés.

## C. Adecuación de agar en placa

El medio fenilalanina en placa fue probado al igual que en los tubos, sembrando *Providencia* y *Morganella sp.* en cajas separadas y *E. coli* y *Klebsiella sp.* como control negativo. Al momento de la preparación del agar, fue evidente que este se tardaba un poco más en ebullición que otros medios. Por esta razón, fue necesario dejar el medio un poco más de tiempo en la estufa, ya que si se retiraba al momento de ebullición, este aún precipitaba. Se recomienda al realizar el agar, ponerlo a ebullición, dejarlo reposar 5 minutos y si se observa turbidez, calentarlo hasta ebullición nuevamente.

El crecimiento se dio a las 24 horas, donde las colonias presentaban una apariencia mucosa. La reacción provocó una coloración bastante fuerte a los 10 segundos de la adición de la solución de cloruro férrico que se intensificó en el primer minuto. Las colonias de *E. coli* y *Klebsiella sp.* permanecieron amarillas como se esperaba en cajas aisladas. El siguiente paso consistió en observar la reacción a partir de un cultivo mixto y si el ácido fenil pirúvico se esparcía por el medio dando falsos positivos. Las primeras pruebas realizadas fueron de punteado, para saber exactamente qué colonias eran de *Klebsiella sp.* y cuáles de *Morganella sp.* La adición de cloruro férrico fue poco práctica debido a que debía agregarse gota a gota sobre las colonias. Se agregó la mínima cantidad de solución para evitar que se esparciera en el medio y la coloración afectara a las otras colonias que no presentaban la enzima. Sin embargo, a pesar de estar compartiendo el agar y estar muy cercanas, las colonias de *Morganella sp.* se colorearon completamente de un color verde intenso y las de *Klebsiella sp.* no. Este resultado permitió comprobar que la diferenciación sería posible, ya que aunque un poco de la solución coloreada estuviera alrededor de una colonia que no fuera de Proteae, esta sería diferenciada por no presentar coloración en el centro. Respecto a las pruebas de vertido, no fue posible realizar el método de esta forma, ya que las colonias quedaban dentro del agar y la solución de cloruro no llegaba a ellas. Por lo tanto, se prosiguió únicamente aislando bacterias por método de esparcido.

## D. Papel filtro

Debido a que se encontró que en placa era poco práctico agregar la solución de cloruro férrico, ya que esta se esparcía por todo el medio, se experimentó con cloruro férrico en papel filtro para que este reaccionara únicamente con las colonias que producían eficientemente ácido fenil pirúvico. Se decidió utilizar la misma concentración de cloruro férrico que la solución, y observar si se obtenía un resultado positivo. De no ser así, se probaría aumentar la concentración.

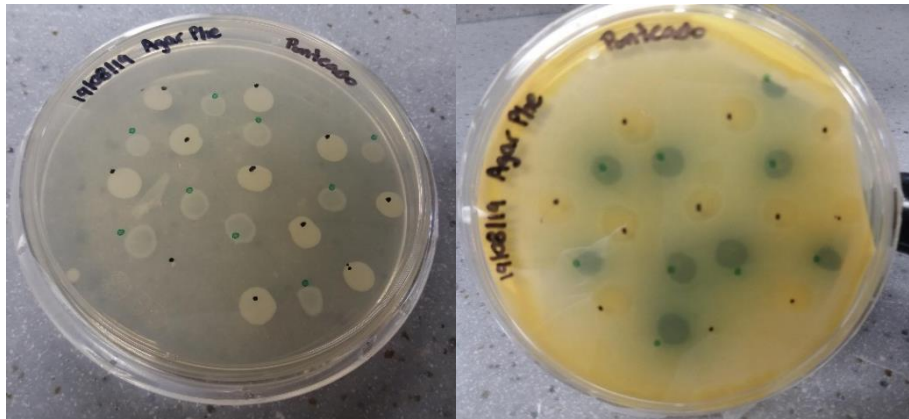


Figura 13: Diferencia de coloración entre *Klebsiella sp.* y *Morganella sp.* en caja Petri . A) Crecimiento luego de 24 horas de incubación. Los puntos negros corresponden a *Klebsiella sp.* y los verdes a *Morganella sp.* B) Prueba de fenilalanina desaminasa utilizando papel filtro. Se puede notar la coloración verde de *Morganella*.

Como resultado se obtuvo una coloración única de las colonias, dejando el fondo de la placa amarilla. Los resultados fueron mejores a los esperados, por lo que no se intentó con otras concentraciones. La reacción fue mucho más eficiente y práctica que al agregar la solución líquida, ya que la utilización del papel permitía obtener resultados de todas las colonias en la placa en menos de un minuto.

#### E. Pruebas con diluciones mixtas de *Proteae* y *Klebsiella pneumoniae*

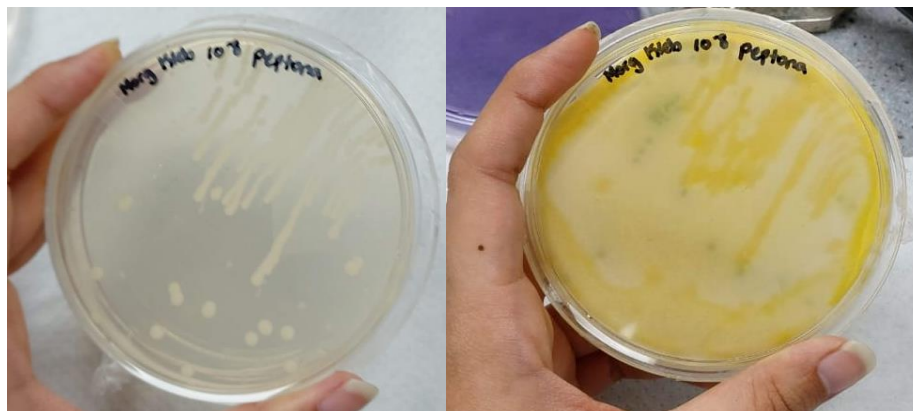


Figura 14: Crecimiento de *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* a partir de un cultivo mixto. A) Crecimiento luego de 24 horas de incubación. B) Prueba de fenilalanina desaminasa utilizando papel filtro.

Se puede notar la coloración verde de *Morganella morganii*, las cuales tiene una morfología bastante pequeña en comparación de las de *Klebsiella pneumoniae*.

En las pruebas con diluciones seriadas, se distinguió a simple vista el crecimiento de *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* (ver Figura 19 en anexos). Las colonias de *Klebsiella* son más grandes y mucosas, mientras que *Morganella morganii* y *Providencia sp.* son opacas y transparentes. El proceso de obtención de colonias aisladas fue difícil debido al tiempo de replicación de cada una de las cepas. *Klebsiella* crece más rápido que *Morganella* y *Providencia*, por lo que se utilizó solamente 50 µL del cultivo puro de *Klebsiella* y 100 µL de *Morganella* o *Providencia*. Con esta proporción se logró obtener colonias aisladas de ambas bacterias, siendo equitativo el crecimiento en solución salina y el agua de peptona.

A pesar de provenir de un cultivo mixto y estar las colonias cercanas, fue posible distinguir la coloración verde al colocar el papel filtro. Además, como se muestra en la Figura 18 de anexos, es difícil observar las colonias de *Morganella morganii* pero al colocar el papel filtro las colonias fueron evidentes. Con estos resultados se logró establecer que el método sirve para distinguir bacterias de Proteae a partir de aislamientos de enterobacterias mixtas.

## F. Adición de fenilalanina a agar nutritivo

Debido a que se buscaba obtener un agar fácil de producir se adicionó fenilalanina al agar nutritivo. Sin embargo, el resultado fue negativo y la coloración de la solución no cambió. Por esta razón, no se hicieron más pruebas con el agar nutritivo. La diferencia principal entre ambos agares es la fuente de nutrientes, donde el nutritivo se compone de extracto de carne y el fenilalanina de extracto de levadura. La composición del extracto de carne incluye una gran cantidad de distintos aminoácidos y minerales, incluyendo fenilalanina en (Cote, 1999). Por esta razón, no es aconsejable para el medio la adición de extracto de carne. Adicionalmente, el agar nutritivo contiene glucosa y en 1995 Massad y colaboradores determinaron que la actividad de la fenilalanina desaminasa se veía inhibida al agregar glucosa. Las pruebas de papel filtro con solución de fenilalanina no mostraron ningún crecimiento, debido a que el papel inhibía el crecimiento de las colonias.

## G. Adición de cristal violeta

Durante la experimentación se produjo una contaminación con un bacilo Gram positivo esporulador en una de las cajas Petri que contenía *Providencia sp.* Al realizar la prueba, estas colonias se tornaron verdes, indicando que presentaba capacidad de desaminar la fenilalanina. En 1994, Brearley *et al.* publicó el descubrimiento de un bacilo aislado de suelo que presentaba la capacidad de producir fenilalanina desaminasa y lo identificó como *Bacillus carototarum*. Debido a que la prueba fenilalanina desaminasa es utilizada en clínica a partir de cultivos de enterobacterias aisladas, no es común realizar la prueba de fenilalanina desaminasa a bacterias Gram positivo. Aunque las colonias no tenían la misma intensidad de color que las colonias de *Providencia*, lo mejor era inhibir cualquier crecimiento de bacilos Gram positivo que pudiera dar falsos positivos. Adicionalmente, la reducción de carga microbiana también sería útil para la detección de las bacterias de los géneros de interés.

Se consideró como opción para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivo la utilización de sales biliares o cristal violeta que son los compuestos selectivos en agar MacConkey (BBL, 2015). Debido a la disponibilidad, y que es un colorante que se agrega en cantidades muy pequeñas, se seleccionó este último para realizar pruebas de inhibición. Una saturación de sales biliares en el medio pudo haber interferido con su consistencia, produciendo precipitaciones ya que la concentración de sales en el medio sin modificaciones es bastante alta. Se seleccionó la cantidad de cristal violeta con el que se prepara el agar MacConkey 0.001 g/L para determinar si era suficiente para evitar el crecimiento de bacterias Gram positivo.

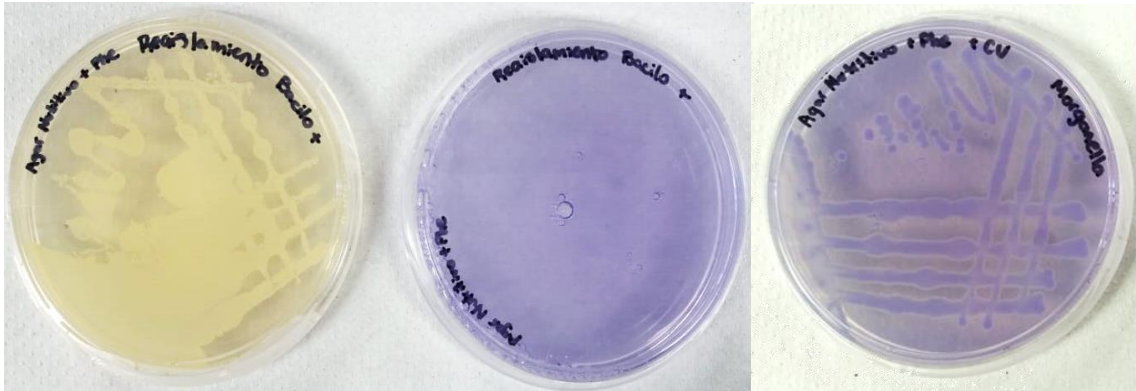


Figura 15: Crecimiento de *Bacillus sp.* y *Morganella morganii* en agar nutritivo con cristal violeta. A) Reaislamiento de *Bacillus sp.* en agar nutritivo sin cristal violeta. B) Aislamiento de *Bacillus sp.* en agar nutritivo con cristal violeta. C) Aislamiento de *Morganella morganii* en Agar nutritivo con cristal violeta Como resultado, se encontró que esta concentración inhibió por completo el crecimiento del bacilo antes descrito. Se realizó la prueba en agar nutritivo y en agar fenilalanina y en ambos se obtuvo el mismo resultado.

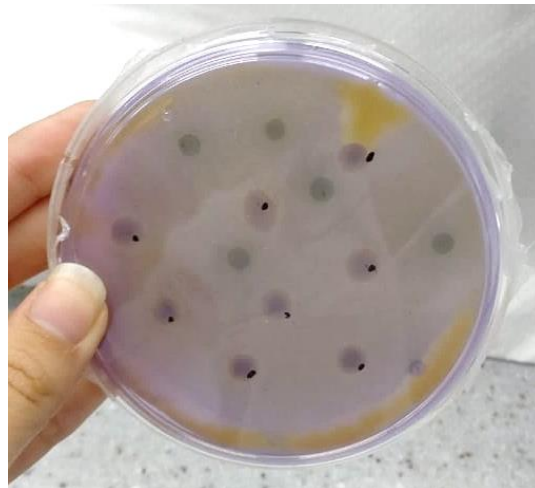


Figura 16: Aislamiento por punteado de *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii*

Una de las incógnitas al agregar cristal violeta al agar fue si la intensidad de la coloración verde sería observable o si interferiría con la reacción. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 16, aunque la tonalidad fue menos evidente que en el medio original, fue posible distinguir sin problemas la coloración de las colonias, ya que el medio aún era bastante transparente. Por esta razón, se consideró no realizar pruebas con mayor concentración de cristal violeta, ya que funcionó adecuadamente al inhibir Gram positivo.

## H. Pruebas con otras bacterias Gram negativo

A pesar de que en literatura no hay un reporte de la capacidad de las bacterias Gram negativo utilizadas en la prueba produzcan la enzima fenilalanina desaminasa, se quiso verificar experimentalmente con el medio modificado. Las cepas utilizadas se encuentran regularmente en la microbiota de *C. capitata* y se ha reportado que ciertas cepas de *Enterobacter* la producen. Por esta razón se utilizaron estas 6 cepas de bacilos Gram negativo para asegurar que la reacción no diera falsos positivos. Adicionalmente, se utilizó a *Bacillus thuringiensis* como control positivo.

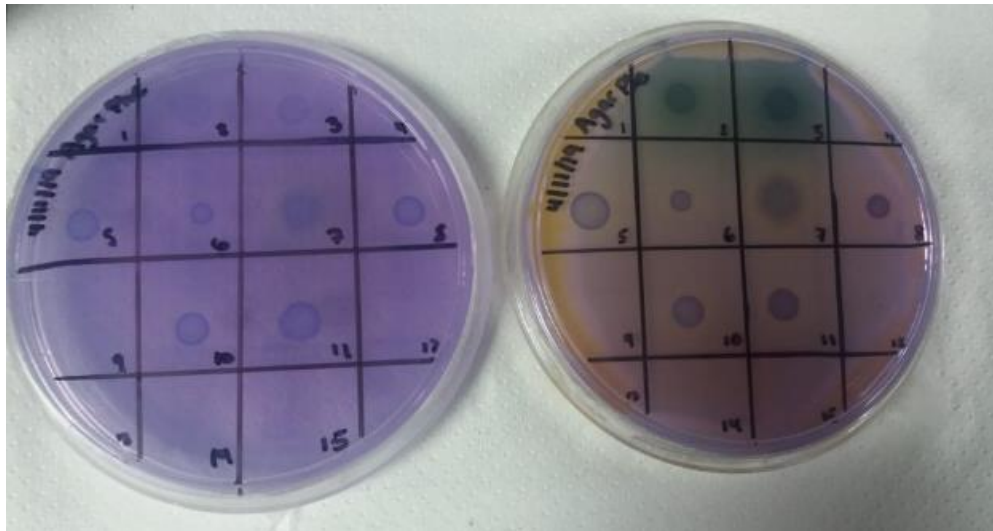


Figura 17: Pruebas de crecimiento de cepas Gram negativo. A) Réplica 1 antes de observar reacción con  $\text{FeCl}_3$ . B) Réplica 2 después de la reacción con  $\text{FeCl}_3$ . Los números corresponden a: 2=*Morganella morganii*, 3=*Providencia sp.*, 5=*Escherichia coli*, 6=*Salmonella typhi*, 7=*Pseudomonas aeruginosa*, 8=*Serratia marcescens*, 10=*Shigella sonnei*, 11=*Enterobacter aerogenes*, 12=*Bacillus thuringiensis*. Los números no mencionados no contienen bacteria.

Como se puede observar en la imagen, el Bacilo Gram positivo no creció en ninguna de las dos réplicas, mientras que las otras 8 bacterias sí. La reacción ocurrió rápidamente como se esperaba en las cepas de *Providencia sp.* y *Morganella morganii*, y fue negativa para las otras 6 cepas. *Pseudomonas aeruginosa* presenta normalmente un color verde a causa de la formación de picocianina, alrededor de la colonia y como se puede observar en la imagen, en ambas réplicas existió un halo de color verde. Sin embargo, las colonias son fácilmente diferenciables de Proteae, ya que no se tiñen por completo y el color es menos intenso.

Se recomienda realizar el mismo análisis con bacterias aisladas y correctamente identificadas dentro de la planta para observar si las cepas de *Enterobacter sp.* presentes contienen la enzima. Así mismo, analizar molecularmente la secuencia de la producción de la enzima para poder realizar una comparación del genoma con bases de datos de otras bacterias y establecer el alcance que tiene el método.

## I. Pruebas en larvas y huevecillo

Cuadro 3: Resultados de crecimiento bacteriano a partir de huevecillo, larvas de primera y quinta colecta.

		Huevecillo (Réplicas)	1era colecta (Réplicas)	5ta colecta (Réplicas)
<b>Exterior</b>	Crecimiento total	0	0	10
	Proteae	0	0	0
<b>Interior</b>	Crecimiento total	7	10	10
	Proteae	3	7	10

Se muestran los resultados de crecimiento bacteriano a partir de 10 réplicas de cada una de las categorías.

Crecimiento total se refiere si hubo o no crecimiento a partir de la siembra de cualquiera de los 10 individuos. Proteae se refiere a las réplicas que fueron positivas para la prueba de fenilalanina desaminasa.

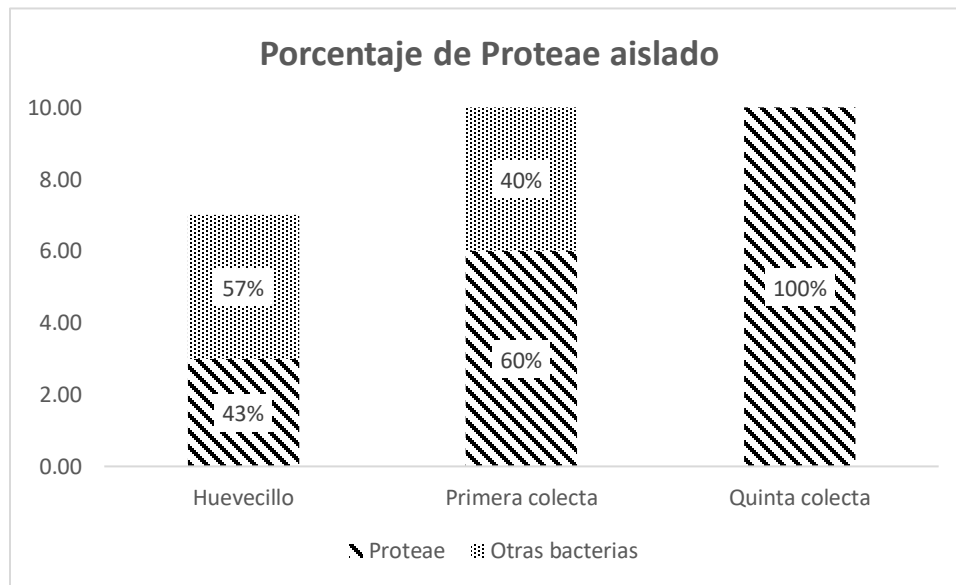


Figura 18: Porcentaje de bacterias Proteae de bacterias aisladas de interior de huevecillo, y larvas de primera y quinta colecta.

Las larvas fueron sometidas a un proceso de desinfección con agua electrolizada y etanol, con el objetivo de eliminar la carga microbiana en la superficie y evaluar la presencia del grupo Proteae en la parte interna. El grupo Proteae se distribuyó de la siguiente manera: en el huevo fue el 43%, en la primera colecta el 60% y en la quinta colecta fue el 100% como se observa en la Figura 18. Esto se debe a que el proceso de colecta de colonias de la cepa de sexado genético *Ceratitis capitata* (-invD53)/Toliman 99 está distribuido en 6 colectas durante un período de 5 días, la prueba de coloración de pupario (macho: café, hembra: blanco) que se hace después del periodo de pupación determina el porcentaje de machos y hembras, estas últimas tienden a salir en diferentes proporciones a partir de la cuarta colecta, lo que permite establecer que las últimas colectas están más expuestas a mayores concentraciones del grupo Proteae, lo que podría suponer un mayor crecimiento de las mismas por condiciones favorables presentes por la descomposición de la dieta larval.

El agar, al ser inhibidor de crecimiento de Gram positivo, disminuye la carga bacteriana aumentando la capacidad de crecimiento de las bacterias de Proteae. La prueba de fenilalanina desaminasa fue negativa para todas las réplicas de superficie de larvas de la quinta colecta, indicando que podría tratarse de algún otro bacilo Gram negativo. En el caso de la primera colecta, el análisis fue negativo debido a que no hubo crecimiento de ninguna colonia. Los controles positivos presentes en ambas cajas mostraron los resultados esperados al virar a color verde, lo que indica que para el presente estudio no se detectó la presencia del grupo Proteae en la superficie de la larva de ambas colectas.

Se pudo comprobar la utilidad del método al realizar la prueba con el interior de las larvas. En el caso de las larvas recolectadas de la quinta colecta, las 10 réplicas presentaron crecimiento y fueron positivas para fenilalanina desaminasa. En el caso de larvas de la primera colecta, 7 de las 10 colonias que crecieron presentaron coloración verde. Adicionalmente se colocó en la placa una muestra de la superficie de larva, donde hubo crecimiento, pero la prueba fue negativa. Este dato fue complementario a las 10 réplicas de la superficie de las larvas, por lo que se llegó a la conclusión que las bacterias de la tribu Proteae solamente se encuentran dentro de las larvas y no en la superficie.

En el caso de los huevos macerados se encontró un porcentaje menor de positivos, siendo únicamente tres de las 7 colonias que crecieron. Este valor podría indicar que la concentración presente en el huevo aumenta a medida que la larva va desarrollándose y madurando en la dieta larval y la presencia de productos de excreción de la larva como ácido úrico promuevan la proliferación del grupo Proteae. Debido a que este fue un análisis cualitativo del funcionamiento del agar, no se utilizó ninguna prueba estadística que indicara una diferencia significativa entre la presencia bacteriana entre las distintas colectas. Se recomienda realizar un monitoreo de cada colecta para observar el aumento en las bacterias de Proteae mediante la cuantificación de UFC en las larvas.

## VII. CONCLUSIONES

Se logró modificar el agar fenilalanina para el aislamiento de *Providencia sp.* y *Morganella morganii*. Se encontró la presencia de bacterias positivas para fenilalanina en el interior de larvas y huevecillo, las cuales podrían clasificarse pertenecientes a la tribu Proteae. No hubo presencia de bacterias con actividad sobre la fenilalanina en la superficie de las larvas, a pesar de que hubo crecimiento bacteriano. Con estos resultados fue posible verificar que el método de detección sirve para la distinción de bacterias de Proteae de otras bacterias Gram negativo.

Se determinó que la prueba espectrofotométrica para la detección bacteriana no era viable, debido a que se produce muy poca cantidad de ácido fenil pirúvico para formar el complejo verde con cloruro férrico. Debido al bajo pH de la solución de cloruro férrico, el caldo precipitaba e imposibilitaba ver alguna coloración. Además, era un proceso más tardado realizar esta prueba a partir de colonias puras, ya que no era posible observarlo directamente a partir de agua de huevo.

## VIII. RECOMENDACIONES

Durante las pruebas de verificación en la planta se encontró que el método podría ser utilizado para cuantificar las bacterias dentro de las larvas, realizando diluciones. Se recomienda realizar un análisis en el que se cuantifique UFC a partir de larvas de distintas colectas y de huevecillo. Así mismo, aumentar la cantidad de larvas analizadas para poder realizar un análisis comparativo del aumento de las bacterias de Proteae en cada colecta.

Se recomienda realizar una prueba de crecimiento de *Proteus sp.* para verificar que se produce la reacción en el medio.

Debido a que el aumento de UFC se dio en larvas, se recomienda cuantificar por este método las UFC del agua y la dieta para determinar en qué punto de la producción se da el aumento de *Providencia* y *Morganella* y poder tomar medidas correctivas.

Se sugiere realizar pruebas de crecimiento con las bacterias de la planta para asegurar que ninguna de las especies, en especial de *Enterobacter* presenten la enzima fenilalanina desaminasa. También se recomienda buscar los genes de producción de la enzima, para comparar con otros genomas secuenciados y encontrar la enzima en otras bacterias que podrían provocar un falso positivo.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, T. (2016). Phenylalanine Deaminase Test : Principle, Procedure, Results and Uses -. Retrieved March 31, 2019, from <https://microbeonline.com/phenylalanine-deaminase-test-principle-procedure-results-uses/>
- Ami, E. Ben, Yuval, B., & Jurkevitch, E. (2010). Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance. *The ISME Journal*, 4(1), 28–37. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.82>
- Augustinos, A. A., Kyritsis, G. A., Papadopoulos, N. T., Abd-Alla, A. M. M., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2015). Exploitation of the Medfly Gut Microbiota for the Enhancement of Sterile Insect Technique: Use of *Enterobacter* sp. in Larval Diet-Based Probiotic Applications. *PLOS ONE*, 10(9), e0136459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136459>
- Becton Dickinson GmbH (BBL). (2015). BD MacConkey II Agar. En: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=32292>
- Becton Dickinson GmbH (BBL). (2015). *Phenylalanine Agar Slants*. En: [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007487\(08\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007487(08).pdf)
- Brearley, G.M., Price, C.P., Atkinson, T. *et al.* Appl Microbiol Biotechnol (1994) 41: 670. <https://doi.org/10.1007/BF00167283>
- Broughton, S. (2012). *Managing Mediterranean fruit fly in backyards*. Retrieved from [www.agric.wa.gov.au](http://www.agric.wa.gov.au)
- Cote. 1999. Media composition, microbial, laboratory scale. In Flickinger and Drew (ed.), *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Cremers, C. M., Knoefler, D., Vitvitsky, V., Banerjee, R., & Jakob, U. (2014). Bile salts act as effective protein-unfolding agents and instigators of disulfide stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), E1610–E1619. doi:10.1073/pnas.1401941111
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Engelking, L. R. (2015). Enzyme Kinetics - an overview | ScienceDirect Topics. Retrieved March 31, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/enzyme-kinetics>
- Escaf, M. (2003). Fenilcetonuria e hiperfenilalaninemia en recién nacidos. *Salud Uninorte*, (17), 36–39. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/817/81701705/>
- European Bioinformatics Institute, C. (2016). keto-phenylpyruvic acid (CHEBI:30851). Retrieved March 31, 2019, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:30851>
- Ewing, W. H., Davis, B. R. and Reavis, R. W. 1957. Phenylalanine and malonate medium and their use in Enteric Bacteriology. Public Health Lab. (Bull. Conf. St. prov. public Health Lab. Dir., Burlington, Vt.) **15** 153–167.
- Fung, D. & Miller, R. (1973). Effect on Dyes on Bacterial growth. *Applied Microbiology*. May 1973, p. 793-799.
- Giammanco, G. M., Grimont, P. A. D., Grimont, F., Lefevre, M., Giammanco, G., & Pignato, S. (2011). Phylogenetic analysis of the genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* by comparison of rpoB gene sequences of type and clinical strains suggests the reclassification of *Proteus myxofaciens* in a new genus, *Cosenzaea* gen. nov., as *Cosenzaea myxofaciens* comb. nov. *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology*, 61, 1638–1644. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.021964-0>
- Gómez, M., Paranhos, B. J., Damasceno, I., Castro, R., Campo, D., Andrade, K., ... Malavasi, A. (2008). 8 *CitriFrut CitriFrut CitriFrut CitriFrut CitriFrut*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Marcio\\_Silva17/publication/289673712\\_Biologia\\_de\\_la\\_mosca\\_del\\_mediterraneo\\_Ceratitis\\_capitata\\_Wiedemann\\_Diptera\\_Tephritidae\\_en\\_dos\\_variedades\\_de\\_uva\\_de\\_mesa\\_Vitis\\_vinifera\\_L\\_en\\_el\\_Nordeste\\_brasileno/links/5691904c08ae0](https://www.researchgate.net/profile/Marcio_Silva17/publication/289673712_Biologia_de_la_mosca_del_mediterraneo_Ceratitis_capitata_Wiedemann_Diptera_Tephritidae_en_dos_variedades_de_uva_de_mesa_Vitis_vinifera_L_en_el_Nordeste_brasileno/links/5691904c08ae0)
- Henrikson, S.D. 1950. A comparative of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of proteus from other enteric organisms. *J.Bacteriol*, 60: 255-231.
- Johansson, L. H., & Håkan Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 174(1), 331–336. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90554-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4)
- Koneman, E. ; Allan, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis. Ed. Médica Panamericana. 1691 pp.
- Kyritsis, G. A., Augustinos, A. A., Cáceres, C., & Bourtzis, K. (2017). Medfly Gut Microbiota and Enhancement of the Sterile Insect Technique: Similarities and Differences of *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter sp.* AA26 Probiotics during the Larval and Adult Stages of the VIENNA 8D53+ Genetic Sexing Strain. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02064>
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.IJID.2016.07.006>
- MacFaddin. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Malbrán, C. G. (2013). *Identificación microorganismos de la Tribu Proteae*. Buenos Aires. Retrieved from <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/TRIBU-PROTEAE.pdf>
- Massad, G; Zhao, H; Mobley, H. (1995). *Proteus mirabilis* Amino Acid Deaminase: Cloning, Nucleotide Sequence, and Characterization of aad. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Oct. 1995, p. 5878–5883
- Msaad Guerfali, M., Djobbi, W., Charaabi, K., Hamden, H., Fadhl, S., Marzouki, W., ... Chevrier, C. (2018). Evaluation of *Providencia rettgeri* pathogenicity against laboratory Mediterranean fruit fly strain (*Ceratitis capitata*). *PLOS ONE*, 13(5), e0196343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196343>
- MOSCAMED, 2018. Biología de la mosca del Mediterraneo. En: <http://moscamed-guatemala.org.gt/>
- MOSCAMED, 2018. Producción de la mosca del Mediterraneo. En: [http://moscamed-guatemala.org.gt/?page\\_id=93&secc=Control](http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=93&secc=Control)
- MOSCAMED, 2018. Ciclo biológico. En [http://moscamed-guatemala.org.gt/?page\\_id=158](http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=158).
- MOSCAMED, 2018. Áreas libres de plaga. En: [http://moscamed-guatemala.org.gt/?page\\_id=338&secc=Inicio](http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=338&secc=Inicio)
- MOSCAMED, 2018. Avance del crecimiento de áreas libres de plaga. En: [http://moscamed-guatemala.org.gt/?page\\_id=758&secc=Inicio](http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=758&secc=Inicio)
- MOSCAMED, 2018. Objetivos del programa MOSCAMED. En: [http://moscamed-guatemala.org.gt/?page\\_id=318&secc=Inicio](http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=318&secc=Inicio)
- Nakahara, T., Ishida, J., Yamaguchi, M., & Nakamura, M. (1990). Determination of  $\alpha$ -keto acids including phenylpyruvic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, 190(2), 309–313. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90199-J](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90199-J)
- O’Hara, C. M., Brenner, F. W., & Miller, J. M. (2000). Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 534–546. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.534-546.2000>
- Pałka, K., & Kańska, M. (2012). *Enzymatic reductive amination of p-hydroxyand phenylpyruvic acids as a*

- method of synthesis of L-tyrosine and L-phenylalanine labelled with deuterium and tritium*. Retrieved from [http://www.nukleonika.pl/www/back/full/vol57\\_2012/v57n3p383f.pdf](http://www.nukleonika.pl/www/back/full/vol57_2012/v57n3p383f.pdf)
- Rasner, M; Vomero, A; Varacchi, C; Peluffo, G; Giachetto, G; Kanopa, V. 2014. Fenilcetonuria. Arch Pediatr Uruguay, 2014; 85(1): 28-33
- Rivera González, E. (2016). *Cinética Enzimática*. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CineticaEnzimatica-EnriqueRivera\\_32548.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CineticaEnzimatica-EnriqueRivera_32548.pdf)
- Robinson, AS. 2002. Genetic Sexing Strains in Medfly, *Ceratitis Capitata*, Sterile Insect Technique Programmes. Kluwer Academic Publishers. Genetica 116: 5-13, 2002
- Vera, M. T., Rodriguez, R., Segura, D. F., Cladera, J. L., & Sutherst, R. W. (2002). Potential Geographical Distribution of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with Emphasis on Argentina and Australia. *Environmental Entomology*, 31(6), 1009–1022. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.6.1009>
- Whitehead, T. P. (1984). *Principios de Control de Calidad (LAB/76.1)*. Retrieved from [http://www.seqc.es/download/revista/723/1731/22130974/1024/cms/Quimica Clinica 1984;3 \(1\) 53-78.pdf/](http://www.seqc.es/download/revista/723/1731/22130974/1024/cms/Quimica Clinica 1984;3 (1) 53-78.pdf/)
- Winn, W. C., & Koneman, E. W. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color*. Editorial Médica Panamericana. Retrieved from [https://books.google.com.gt/books?id=jyVQueKro88C&dq=fenilalanina+%2B+fenilalanina+desaminasa+reacción&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.gt/books?id=jyVQueKro88C&dq=fenilalanina+%2B+fenilalanina+desaminasa+reacción&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

## X. ANEXOS

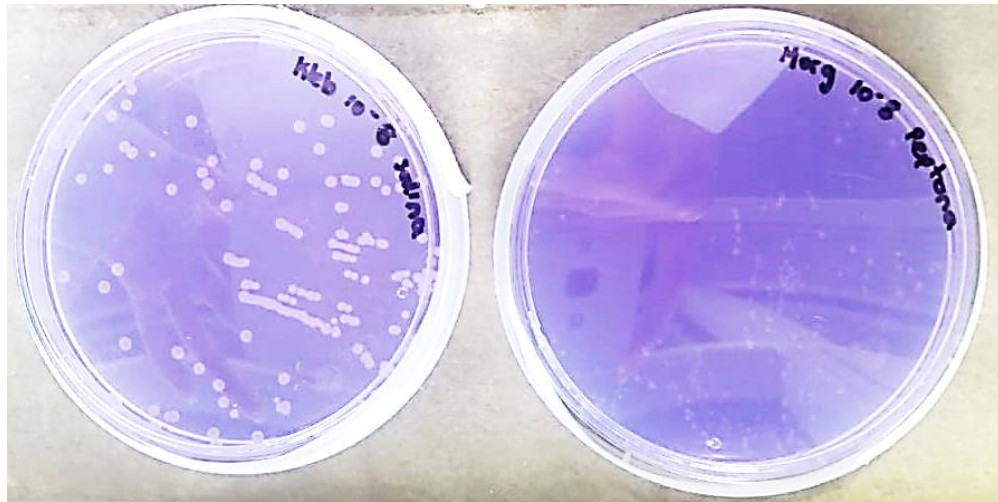


Figura 19: Crecimiento de *Klebsiella* vs *Morganella* en agar fenilalanina



Figura 20: Crecimiento de *Providencia* vs *Klebsiella* en agar fenilalanina

Cuadro No. 4: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en huevecillo

Huevecillo	Réplica	Crecimiento	Presencia de coloración
Exterior	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	-	-
	2	+	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	+	-
	8	-	-
9	+	-	
10	-	-	
Interior	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	+	+
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	+
	5	+	-
	6	-	-
	7	+	+
	8	+	-
9	-	-	
10	+	-	

Donde + = Positivo; - = Negativo

Cuadro No. 5: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en larvas de quinta colecta

	<b>Réplica</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Presencia de coloración</b>
<b>Exterior</b>	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
	6	+	-
	7	+	-
	8	+	-
<b>Interior</b>	9	+	-
	10	+	-
	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	+	-
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
7	+	+	
8	+	+	
9	+	+	
10	+	+	

Donde + = Positivo; - = Negativo

Cuadro No. 6: Crecimiento bacteriano e identificación de Proteae en larvas de primera colecta

	<b>Réplica</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Presencia de coloración</b>
<b>Exterior</b>	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
<b>Interior</b>	Control <i>Morganella</i>	+	+
	Control <i>Providencia</i>	+	+
	1	+	+
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	+	-
	8	+	+
	9	+	-
	10	+	+

Donde + = Positivo; - = Negativo

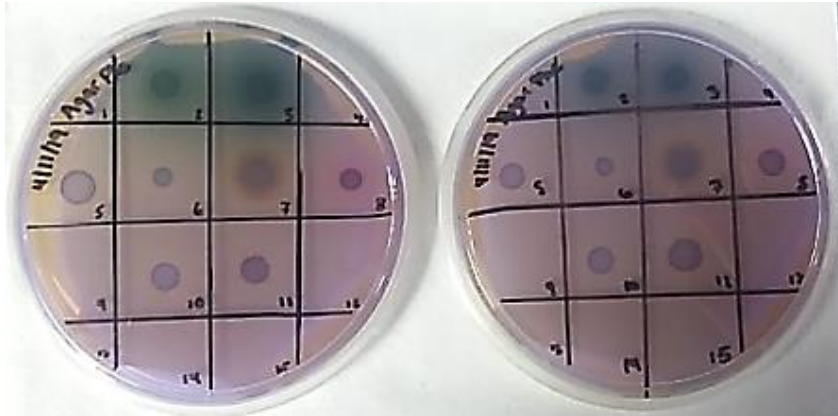


Figura 21: Réplicas de pruebas de crecimiento de cepas Gram negativo. A) Réplica 1 después de reacción con  $\text{FeCl}_3$ . B) Réplica 2 después de la reacción con  $\text{FeCl}_3$ . Los números corresponden a: 2=*Morganella morganii*, 3=*Providencia sp.*, 5=*E. coli*, 6=*Salmonella typhi*, 7=*Pseudomona aeruginosa*, 8=*Serratia marcescens*, 10=*Shigella sp.*, 11=*Enterobacter aerogenes*, 12=*Bacillus thuringensis*. Los números no mencionados no contienen bacteria.

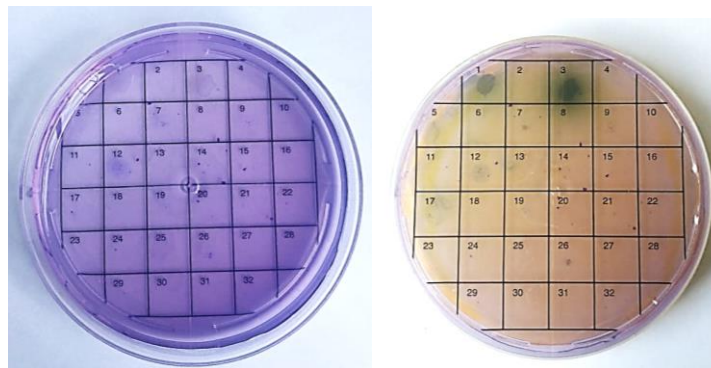


Figura 22: Presencia de bacterias de Proteae en huevecillos macerados. A) Crecimiento de bacterias totales en huevecillo macerado. B) Prueba de fenilalanina desaminasa en colonias de huevo macerado

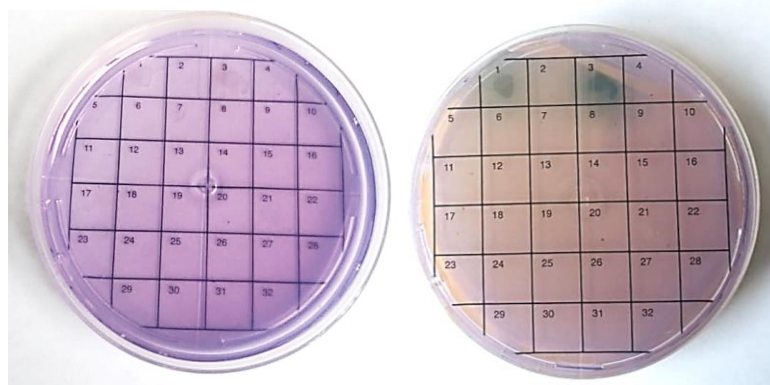


Figura 23: Presencia de bacterias de Proteae en superficie de huevecillos. A) Crecimiento de bacterias totales en superficie de huevecillos. B) Prueba de fenilalanina desaminasa en colonias de superficie de huevecillo

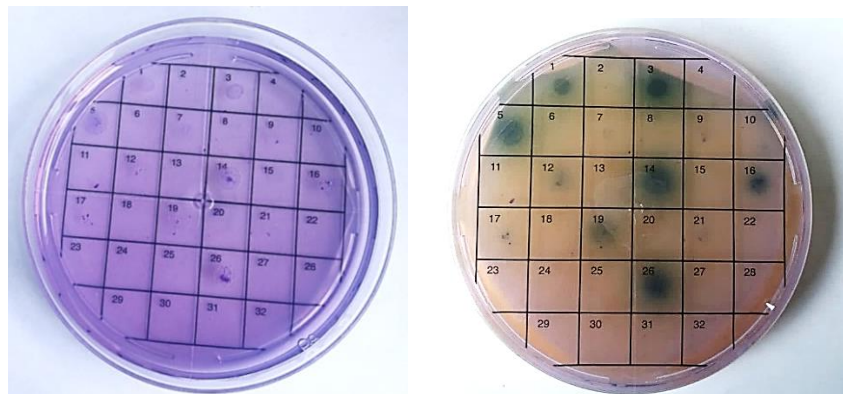


Figura 24: Presencia de bacterias de Proteae en el interior de larvas de primera colecta. A) Crecimiento de bacterias totales en el interior de larvas de primera colecta. B) Prueba de fenilalanina desaminasa en colonias del interior de larvas de primera colecta

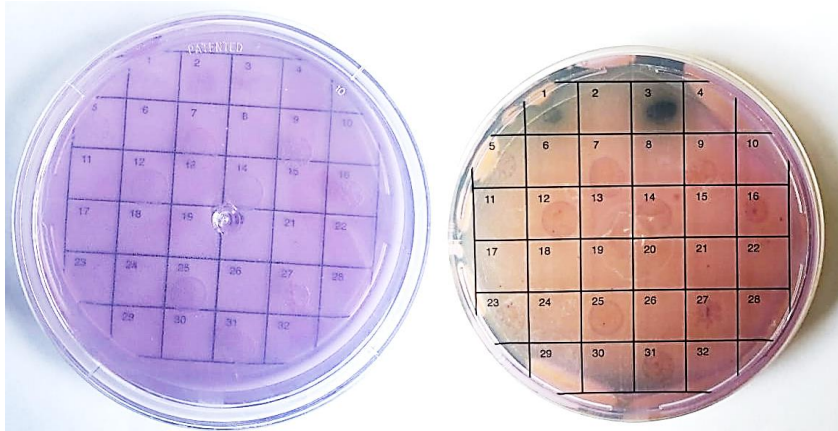


Figura 25: Presencia de bacterias de Proteae en la superficie de larvas de quinta colecta. A) Crecimiento de bacterias totales en la superficie de larvas de quinta colecta. B) Prueba de fenilalanina desaminasa en colonias de superficie de larvas de quinta colecta

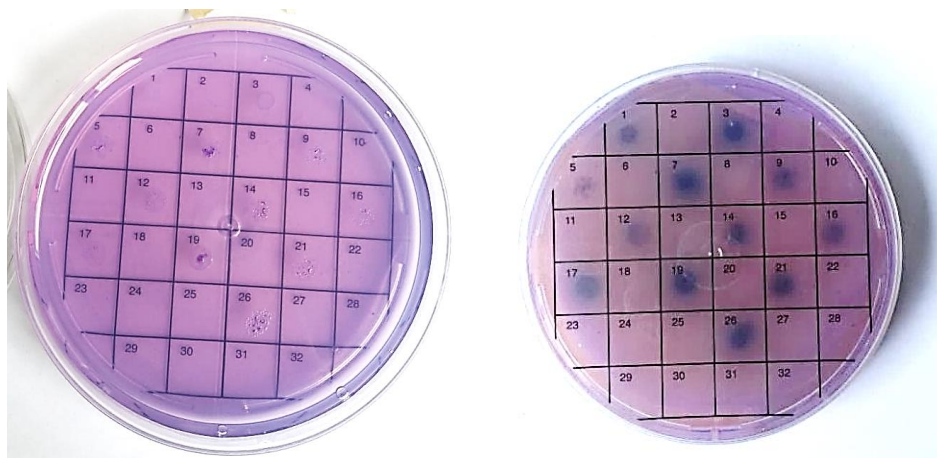


Figura 26: Presencia de bacterias de Proteae en el interior de larvas de quinta colecta. A) Crecimiento de bacterias totales en el interior de larvas de quinta colecta B) Prueba de fenilalanina desaminasa en colonias del interior de larvas de quinta colecta

# AGAR FENILALANINA

## Uso

Diferenciación de bacterias de la tribu Proteae (*Proteus sp.*, *Providencia sp.* y *Morganella sp.*) de otras bacterias. El agar es selectivo para bacterias Gram negativo debido a la concentración de colorante cristal violeta. La adición de fenilalanina permite evidenciar a los organismos que producen la enzima fenilalanina desaminasa, mediante la lectura con los papeles de cloruro férrico.

## Composición

Extracto de levadura.....	3.0 g/L
L-Fenilalanina.....	2.0 g/L
Fosfato disódico.....	1.0 g/L
Cloruro de sodio.....	5.0 g/L
Cristal violeta.....	0.0002 g/L
Agar.....	15.0 g/L

## Preparación

Disolver el contenido en 1.0 L de agua y adicionar 700 µL de cristal violeta. Calentar hasta ebullición por 5 segundos. Si se observa turbidez en el medio luego de dos minutos, volver a colocar hasta ebullición por 5 segundos más. Esterilizar en autoclave por 20 minutos.

## Siembra e incubación

Sembrar 100 µL de la dilución de interés y esparcir uniformemente con esparcidor por toda la placa. Incubar a 37°C por 24 horas y realizar la lectura.

## Interpretación de resultados

Colocar luego de la incubación un papel de cloruro férrico sobre la placa. Esperar un minuto y observar si ocurre cambio en la coloración de las colonias. La formación de color verde indica positivo para Proteae.

Microorganismo	Crecimiento	Reacción
<i>Morganella morganii</i>	Positivo	Positiva
<i>Providencia sp.</i>	Positivo	Positiva
<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Negativo
<i>Salmonella typhi</i>	Positivo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Positivo	Negativo
<i>Serratia marcescens</i>	Positivo	Negativo
<i>Shigella sonnei</i>	Positivo	Negativo
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Positivo	Negativo
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Negativo	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	.