



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Determinación de la población microbiana mediante análisis metagenómico en frass no composteado de mosca soldado negro alimentada con diferentes dietas

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
M. en C. en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Alejandra Torres Lara

Dirigido por:

Dr. Juan Fernando García Trejo

Codirigido por:

Dr. Bruno Gómez Gil

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Ingeniería de Biosistemas

Determinación de la población microbiana mediante análisis metagenómico en frass no  
compostado de mosca soldado negro alimentada con diferentes dietas

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de M. en C. en Ingeniería de Biosistemas

**Presenta:**

Alejandra Torres Lara

**Dirigido por:**

Dr Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Bruno Gómez Gil

Copresidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Miguel Betancourt Lozano

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. María de la Luz Pérez Rea

Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Manuel Toledano Ayala

Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2024

## Resumen

*Hermetia illucens* conocida como mosca soldado negra (MSN), se caracteriza por su capacidad para la bioconversión de los residuos orgánicos en proteína y lípidos y frass. Sin embargo, aún no son suficientes los estudios que esclarezcan aspectos relacionados al impacto del microbioma de la larva expuesta a una dieta exclusiva durante la sucesión generacional, y como esto repercute sobre su desarrollo y bioconversión de residuos. Dado que, el microbioma del frass se ve reflejado en el intestino larval se determinó la composición y estructura de los consorcios microbianos presentes en el contenido intestinal de las larvas, por medio de análisis metagenómico del ARNr 16S. Se contrastó la estructura de los consorcios microbianos generados por la influencia de dietas que difieren en su composición nutricional, mango y tilapia durante tres generaciones empleando la dieta Gainesville como control. Se determinó que dietas restringidas repercuten sobre el desarrollo de las larvas y sus generaciones ya que los valores de bioconversión disminuyeron con cada generación. También se concluyó que la transmisión vertical no supone un factor determinante en la estructura de los consorcios microbianos que pudieran heredar las generaciones de larvas de MSN.

Palabras clave:

MSN, frass; microbioma; residuos orgánicos.

## Summary

*Hermetia illucens*, known as black soldier fly (BSF), is characterized by its ability to bioconversion of organic waste into protein, lipids and frass. However, there are still not enough studies that clarify aspects related to the impact of the microbiome of the larva exposed to an exclusive diet during generational succession, and how this affects its development and waste bioconversion. Since the microbiome of the frass is reflected in the larval intestine, the composition and structure of the microbial consortia present in the intestinal contents of the larvae was determined by 16S rRNA metagenomic analysis. The structure of the microbial consortia generated by the influence of diets differing in nutritional composition, mango and tilapia during three generations was contrasted using the Gainesville diet as a control. Bioconversion parameters were evaluated to correlate implicit aspects of the microbiome with larval performance. It was determined that restricted diets have an impact on the development of the larvae and their generations since the bioconversion values were lower in each generation. It was also concluded that vertical transmission is not a determining factor in the structure of the microbial consortia that could be inherited by generations of BSF larvae.

Keywords:

BSF; frass; microbiome; organic waste.

## **Agradecimientos**

A CONAHCyT, por la beca otorgada.

A mis sinodales de la UAQ el Dr. Fernando, la Dra. Gely y el Dr. Ramón por el asesoramiento durante la experimentación y desarrollo de la tesis.

Al Dr. Bruno y el Dr. Miguel del CIAD Mazatlán por el apoyo para realizar la metagenómica y el asesoramiento para realizar el análisis.

A mis compañeras de la maestría Mimi y Pili por brindarme su amistad.

A los compañeros del laboratorio de biosistemas, que hicieron más llevadero el desarrollo de la investigación, en especial a Isa por estar siempre disponible y toda su guía en cada duda y problema que me surgía.

A los profesores de la maestría que me ayudaron con mi formación en áreas muy nuevas para mí.

## **Dedicatoria**

A mi familia, mi pequeño Nilo, mi Armando, mis gatos y mis simbioses.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>i</b>
<b>Summary</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>iv</b>

## Capítulo I

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes científicos</b>	<b>3</b>
<b>Análisis microbianos en frass de MSN</b>	<b>3</b>
<b>Justificación</b>	<b>6</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>7</b>
<b>Objetivos</b>	<b>7</b>

## Capítulo II

<b>Marco teórico</b>	<b>8</b>
Biología de <i>Hermetia illucens</i>	8
Anatomía de la cabeza	9
Características del intestino de la larva de <i>H. illucens</i>	10
Composición nutrimental de la larva de MSN	13
Características del frass de MSN	14

## Capítulo III

<b>Metodología</b>	<b>15</b>
Manejo <i>H. illucens</i>	15
Tratamientos	16
Muestreo	17
Análisis bromatológicos	17
<b>Determinación del desempeño de las larvas de MSN</b>	<b>19</b>
Parámetros de bioconversión	19

<b>Análisis estadístico</b>	<b>22</b>
<b>Análisis de la estructura de las comunidades microbianas</b>	<b>22</b>
Extracción de ADN	22
Amplificación de ADN	23
Secuenciación	24
Análisis de la composición de la diversidad microbiana	24
<b>Determinación del impacto de la dieta</b>	<b>25</b>
Análisis de la influencia de la dieta sobre la composición del microbioma	25

### *Capítulo IV*

<b>Resultados y discusión</b>	<b>26</b>
Impacto de la dieta y la sucesión generacional sobre el desarrollo de las larvas	26
Determinación del desarrollo de las larvas de MSN por tratamiento	27
Comparación entre dieta molida y entera	32
Composición bromatológica de las dietas y la harina de larva	32
Composición y estructura de los consorcios microbianos por tratamiento	35
Análisis estadístico de las muestras	37
Composición del microbioma bacteriano de las larvas de MSN	37
Impacto de los tratamientos sobre la diversidad del microbioma de la larva de MSN	42
El impacto de la metamorfosis sobre el microbioma y su transmisión vertical	46
Microbioma núcleo	47
Microorganismos específicos al tipo de dieta	54

### *Capítulo V*

<b>Conclusión</b>	<b>57</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>59</b>
<b>Anexo</b>	<b>67</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	<b>Ciclo de vida de <i>H. illucens</i></b>	<b>1</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Vista de la cabeza de larva de MSN</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Regiones del intestino medio de larva de Mosca soldado negro</b>	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Curva de crecimiento de las larvas</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Cantidad total de huevo en gramos puesto por las moscas de <i>H. illucens</i> por cada tratamiento</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b>	<b>Composición proximal del contenido nutricional de las dietas</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b>	<b>Composición nutrimental de la harina de larva</b>	<b>34</b>
<b>Figura 8.</b>	<b>Anatomía de las regiones del intestino de la larva de mosca soldado negro en prepupa.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b>	<b>Comparación de los intestinos de larva de MSN por tratamiento en prepupa</b>	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b>	<b>Rarefacción del número de OTUs detectados por tratamiento</b>	<b>38</b>
<b>Figura 11.</b>	<b>Árbol filogenético marcado por los OTUS correspondientes a la dieta</b>	<b>39</b>
<b>Figura 12.</b>	<b>Abundancia relativa de los 10 phylums con mayor número de OTUs por tratamiento</b>	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b>	<b>Abundancia relativa de las 10 familias con mayor número de OTUs por tratamiento</b>	<b>40</b>
<b>Figura 14.</b>	<b>Presencia de los 20 OTUs más abundantes clasificados taxonómicamente a nivel de género</b>	<b>41</b>
<b>Figura 15.</b>	<b>ACP de la composición de los consorcios bacterianos agrupados por la condición de tamaño</b>	<b>44</b>
<b>Figura 16.</b>	<b>ACP para la abundancia y dispersión de OTUs</b>	<b>45</b>
<b>Figura 17.</b>	<b>Conjuntos de OTUs compartidos entre dietas</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18.</b>	<b>Índice de diversidad de Shannon</b>	<b>51</b>
<b>Figura 19.</b>	<b>Índices asociados a la <math>\alpha</math> diversidad</b>	<b>52</b>
<b>Figura. 20</b>	<b>Conjuntos de OTUs ordenados por NMDS</b>	<b>53</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	<b>Identificación de los tratamientos</b>	<b>16</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Valores obtenidos en los parámetros de bioconversión</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Diferencia significativa entre las dietas molida y entera</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b>	<b>Prueba de la Mediana de Mood para Peso por Tratamiento</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 5.</b>	<b>Porcentaje de abundancia relativa de los 5 phyllums con mayor dominancia.</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 6</b>	<b>Porcentaje de abundancia relativa de las 15 familias con mayor dominancia por tratamiento</b>	<b>55</b>

# Capítulo I

## Introducción

*Hermetia illucens* (Linnaeus 1758), es conocida como mosca soldado negra (MSN) pertenece al orden Diptera, familia Stratiomyidae. Es originaria de las zonas subtropicales de América, sin embargo, actualmente se encuentra ampliamente distribuida por el mundo debido a las actividades humanas. Es un insecto saprófago holometábolo, cuyo ciclo de vida se completa en un periodo de 40 - 45 días aproximadamente. El cual consta de 5 etapas (Figura 1): 1) huevo; 2) larva con 6 estadios larvales siendo el sexto la prepupa; 3) prepupa; 4) pupa; y 5) adulto (Lievens *et al.*, 2021). En los últimos años el uso de la MSN ha tomado relevancia, debido a las múltiples ventajas generadas a partir de su uso como tratamiento de residuos orgánicos (Surendra *et al.*, 2020).

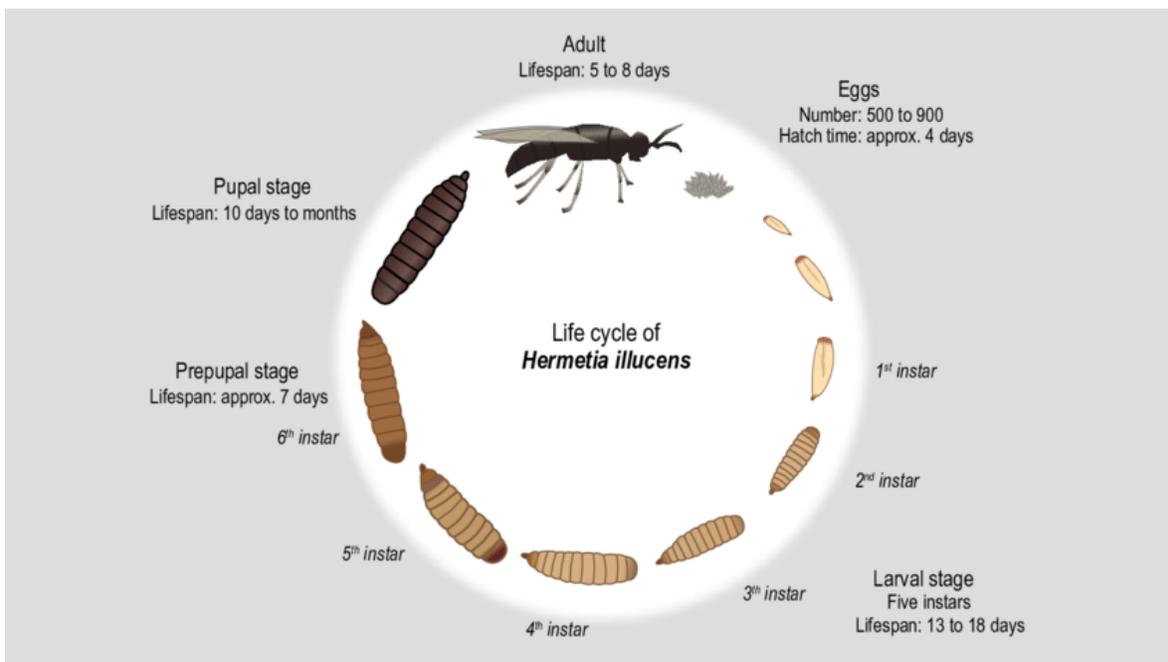


Figura 1 Ciclo de vida de *H. illucens* (De Smet *et al.*, 2018).

El desarrollo larval es el más relevante para su cultivo, ya que es en este donde la MSN es capaz de alimentarse de diversos sustratos orgánicos en descomposición, llevando a cabo el tratamiento de bioconversión de estos residuos. La bioconversión consiste en la capacidad de un organismo para transformar los residuos y a partir

de esto obtener otros productos. En el caso de la MSN se obtienen dos productos: una biomasa larval rica en proteínas y lípidos (Lalander *et al.*, 2019) la cual ha sido reportado ampliamente, como fuente de alimento para ganado, peces y aves de corral (Shumo *et al.*, 2019); y el residuo generado por el metabolismo de las larvas, llamado comúnmente frass, que muestra un gran potencial para ser empleado como fertilizante para múltiples fines (Menino *et al.*, 2021). La composición del alimento y la temperatura son factores que determinan la calidad de los productos finales (Gold *et al.*, 2020).

El frass es generado por la larva de MSN como excreta a partir de metabolizar los residuos orgánicos, donde se ha demostrado una reducción significativa en el volumen de los residuos de hasta el 79% (Lalander *et al.*, 2019). Este proceso depende de las características físico-químicas del residuo (Surendra *et al.*, 2020). Debido a esto, en algunos casos la bioconversión resulta ineficiente reflejándose en cantidades de material orgánico no consumido o no digerido. Por lo tanto, una producción efectiva de frass debe evaluarse junto con otros parámetros del proceso, como la eficiencia de bioconversión, la reducción de material y el peso final de las larvas, entre otros (Lopes *et al.*, 2022).

La industria de la MSN se ha ido expandiendo y la valoración del frass está adquiriendo un mayor peso económico y ecológico lo cual promueve la circularidad del sistema productivo de la MSN (Schmitt y de Vries, 2020). Diversos estudios comprueban la efectividad del frass como fertilizante orgánico para mejorar la salud de las plantas, aumentar el rendimiento de cultivos y la fertilidad del suelo (Tanga *et al.* 2021). Adicionalmente, se ha demostrado que el frass puede reducir la incidencia de patógenos y enfermedades en las plantas, debido al alto contenido de quitina (Van Huis, 2020).

Debido a que los valores de minerales presentes en el frass, así como su carga microbiana, están directamente relacionados al sustrato utilizado para la cría de larvas de MSN, estos pueden variar respecto al sustrato empleado. Por lo tanto, aún se requiere más investigación para determinar cuáles son los sustratos óptimos para

obtener la mejor calidad de frass, sin afectar el rendimiento y la rentabilidad en la producción de MSN (Gebremikael *et al.*, 2022).

### **Antecedentes científicos**

Los primeros artículos publicados acerca de *H. illucens* se enfocan en su importancia como indicador postmortem en la entomología forense (Lord *et al.*, 1994). Es hasta el 2002 que Sheppard y Tomberlin realizan estudios sobre su cultivo artificial debido a su capacidad para la bioconversión de residuos orgánicos y como potencial fuente de alimento para animales. Es a partir de esto, que fue incrementando el número de investigaciones enfocadas en el potencial de la MSN para el manejo de los residuos orgánicos, los parámetros de cultivo y el efecto de su uso como alimento y suplemento nutricional en diversas especies domésticos (Myers *et al.*, 2008; Tomberlin *et al.*, 2009; Diener *et al.*, 2009).

Del 2009 en adelante las investigaciones científicas aportan conocimiento sobre moléculas derivadas de su producción, tales como péptidos antimicrobianos, pigmentos, fertilizantes, bacterias anaerobias con potencial para birreactores y biodigestores (Xia *et al.*, 2021; Surendra *et al.*, 2020). Mientras a su vez, se exploran estrategias para intensificar la ovoposición tales como el control de diversos espectros de luz y rangos de temperatura, estandarización de dietas y tasas de suministro de alimentación (Zheng *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010; Singh y Kumari, 2019). Actualmente diversos estudios genómicos y microbianos de la MSN se enfocan en seleccionar microorganismos o genes de potencial aplicación para diversos aspectos productivos de impacto económico (Zhan *et al.*, 2024; De Filippis *et al.*, 2023; Kou *et al.*, 2023).

### **Análisis microbianos en frass de MSN**

Los aspectos de inocuidad relacionados con los productos procedentes de los procesos de bioconversión con la MSN son cruciales, especialmente cuando las

larvas de MSN se explotan para aplicaciones alimentarias y sus residuos como fertilizantes. Se sabe que la composición de microbiana de los suelos afecta la salud y el rendimiento de los cultivos vegetales. Las poblaciones de bacterias provenientes del frass son capaces de competir con patógenos o actuar como promotores del crecimiento vegetal lo cual podría potenciarse para mejorar el rendimiento vegetal (Basri *et al.*, 2022). Por lo tanto, un análisis más profundo sobre el contenido de microorganismos en los productos derivados de la MSN empleando tecnologías de mayor alcance, como es el caso de la metagenómica, puede ayudar a comprender diversos factores que intervienen durante la maduración del frass y la composición del microbioma de la larva.

En los primeros estudios de diversidad microbiana se empleaban métodos dependientes de cultivo, donde sólo se lograban estudiar aquellos microorganismos que se pudieran aislar en el laboratorio. Mediante el avance de las técnicas de biología molecular, como es el caso de la metagenómica, se ha logrado analizar la diversidad microbiana a través del uso de métodos independientes de cultivo, obteniendo información más precisa de los genomas microbianos (Cortes-López *et al.*, 2020). Basado en la amplificación de una región estandarizada del ADN por PCR. Con el paso de los años se han propuesto y estandarizado diversas regiones de secuencias conservadas. Siendo la más empleada para bacterias el ARNr 16S. Dicha región, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S. Poseen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos, y es posible diferenciar especies, cepas o variedades. (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los investigadores Jeon *et al.* (2011), realizaron el primer análisis de la comunidad bacteriana en el intestino de la larva de MSN mediante técnicas de metagenómica. Reportaron que tiene una amplia diversidad bacteriana la cual le es esencial para llevar a cabo la bioconversión de los residuos. Este microbioma se ve reflejado en el contenido final del frass y le brinda características propias dependiendo de la dieta que consume la larva (Gold *et al.*, 2020), debido a esto, los estudios de la

composición microbiana del frass se enfocan en explorar el intestino de la larva, ya que es ella quien determina la composición resultante del frass.

La importancia de los microorganismos (MOS) radica en su impacto sobre los cultivos de consumo agrícola, donde se pueden encontrar MOS beneficiosos, neutros o patógenos. Puesto que, los MOS benéficos presentes en los suelos son fundamentales para estimular la asimilación de nutrientes y promover el crecimiento vegetal, se busca producir un frass con un alto contenido de estos. Es debido a esto que, algunos autores se han centrado en ver el efecto de la dieta ofrecida a la larva para favorecer la presencia de estos en el frass. Por ejemplo, Yu *et al.* (2011), implementaron una dieta enriquecida con miembros del microbioma de la larva (*Bacillus natto*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus buchneri* y *Kocuria marina*) para incrementar el rendimiento y el contenido final de estos.

Sin embargo, aún no son suficientes los estudios que esclarezcan aspectos relacionados a la microbiología del frass, las variables que lo determinan, los cambios composicionales durante su estabilización como abono y las posibles alteraciones que puede generar sobre el suelo de cultivo y los beneficios directos en las plantas (Lopes *et al.*, 2022). Entre las caracterizaciones realizadas a la composición microbiológica del frass, Kawasaki *et al.* (2020), reportaron una abundancia mayor de MOS en el frass, comparada con abonos orgánicos empleados tradicionalmente, como el estiércol de caballo y de aves de corral. Señalando se encuentran en menor cantidad algunos MOS patógenos pertenecientes a la familia *Xanthomonadaceae* y los géneros *Sporosarcina* spp., *Corynebacterium* spp. y *Bacillus* spp. Entre algunas de las bacterias benéficas reportadas se encuentran *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Actinobacteria* spp., y *Pseudomonas* spp. (Gold *et al.*, 2020).

Por otra parte, Lopes *et al.* (2020), apuntan que la densidad poblacional de *Salmonella* spp. y *E. coli*, presentes en los residuos orgánicos durante el tratamiento con la larva de MSN se vieron significativamente inactivadas y menguadas, en el frass producido. Otros patógenos que se reportan tolerantes a la transformación con larva de MSN son los huevos de *Ascaris* spp. (Lalander *et al.*, 2013). Así como

también, se reportan aflatoxinas pertenecientes a hongos, las cuales se ven reducidas durante el tratamiento con la larva de MSN, sin embargo, permanecen aún en el frass y en la larva en cantidades menores (Bosch *et al.*, 2017), lo cual pudiera involucrar un riesgo para su uso. La literatura citada es un importante aporte inicial para abrir el panorama actual de la necesidad por determinar la composición microbiana del frass para poder establecer estrategias que permitan obtener un abono seguro y con alto contenido de microorganismos benéficos que promuevan el crecimiento vegetal.

### **Justificación**

El panorama global experimenta un constante incremento de demanda en la producción de cultivos, tanto para satisfacer las necesidades alimenticias de la población humana como del ganado, sin mencionar materia prima para diversas industrias (McKenzie y Williams, 2015). Esta demanda a su vez genera 106 523139 toneladas diarias de residuos sólidos urbanos en México (INEGI, 2020), que en su mayoría terminan en rellenos sanitarios contribuyendo a las emisiones de carbono y siendo potencialmente fuentes de infección (Koda *et al.*, 2017).

El cultivo de MSN, cuenta con el potencial para solucionar este paradigma, ya que es capaz de degradar los residuos orgánicos y a partir de estos generar un fertilizante orgánico altamente eficiente y biomasa larval con alto contenido nutricional para el ganado (Lalander *et al.*, 2019).

En la última década se ha profundizado en el contenido nutricional de la larva, sin embargo, aspectos relacionados a la dinámica microbológica durante: 1) el tratamiento de los residuos por la larva; 2) el impacto de una dieta restringida a lo largo de generaciones sobre la microbiota de la larva; y 3) la composición de MOS patógenos o benéficos, en los productos obtenidos para ser empleado como alimento y abono; se mantienen aún como interrogantes. Emplear técnicas metagenómicas para analizar la diversidad microbiana del frass reduce los tiempos

de análisis y el sesgo en la identificación taxonómica. Es importante tener definida la comunidad microbiológica y los factores que la determinan para poder desarrollar los productos derivados de la MSN de manera eficiente y segura para su consumo y aplicación en los cultivos.

## **Hipótesis**

La dieta restringida ofrecida a larvas de mosca soldado negra, durante tres generaciones, ocasiona un impacto sobre su desempeño en la bioconversión de residuos orgánicos, así como un efecto sobre la composición y estructura del microbioma intestinal de las larvas.

## **Objetivos**

### a. Objetivo general

Identificar la diversidad de microorganismos presentes en el frass de la larva de mosca soldado negra por medio de la secuenciación masiva de genes para evaluar la influencia de la composición de la dieta y la sucesión generacional sobre el microbioma.

### b. Objetivos específicos

1. Evaluar el desempeño de las larvas en cada tratamiento por generación.
2. Comparar la composición y estructura de los consorcios microbianos entre los tratamientos.
3. Determinar el impacto de la dieta y las sucesiones generacionales sobre la composición de microorganismos presentes en el intestino de las larvas.

## Capítulo II

### Marco teórico

#### Biología de *Hermetia illucens*

La larva de MSN se caracteriza por ser un insecto detritívoro generalista, es decir, se alimenta de la materia en descomposición proveniente de fuentes vegetales, tales como los residuos provenientes de la agricultura, restos de vegetales y animales, así como excretas y residuos orgánicos domésticos (Rehman *et al.*, 2022). En general, los sustratos ricos en proteínas y aceites, son más adecuados para su desarrollo, ya que requiere acumularlos para cumplir su ciclo de vida (Liu *et al.*, 2019). Es debido a su amplia variedad dietética que *H. illucens* se ha establecido exitosamente de manera silvestre en cualquier ambiente con clima tropical.

En la naturaleza, *H. illucens* pone sus huevos en áreas secas cerca de organismos húmedos y en descomposición. La temperatura, la humedad y la intensidad de la luz son los principales factores ambientales que afectan el apareamiento de los adultos y la puesta de huevos. El tiempo de incubación de los huevos suele ser de 4 a 14 días y varía según la estación, la región y la temperatura (Sheppard *et al.*, 2002).

Las etapas larvarias más aceptadas de la MSN son las descritas por Kim *et al.* (2010), mencionan seis estadios en la fase larvaria, y el tamaño de las larvas varía de 1,8 mm a 20 mm; las larvas de 20 mm se denominan larvas maduras. Recién eclosionan las larvas de MSN se dirigen a alguna fuente de alimentación, y las tasas de consumo aumentan considerablemente después del tercer estadio. Cuando las larvas alcanzan el sexto estadio, dejan de alimentarse e inician la pupa, convirtiéndose posteriormente en adultos. Las hembras adultas inician la puesta de huevos aproximadamente 2 a 3 días después del apareamiento, y pueden poner hasta 900 huevos (Zheng *et al.*, 2013).

## Anatomía de la cabeza

La capacidad de la larva de MSN para alimentarse de una gran variedad de sustratos es debido a su complejo aparato multifuncional adaptado a la ingesta de alimentos semilíquidos derivados de materia orgánica en descomposición, sin embargo, aún no se conoce el papel exacto de todas las piezas bucales en conjunto.

La morfología bucal de la larva de MSN fue descrita por Bruno *et al.* (2020), mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, donde analizan las diferentes piezas bucales y sus modificaciones durante el desarrollo larvario. Como se muestra en la Figura 2 la cabeza de *H. illucens* es extremadamente robusta y su interior está recubierto por una armadura quitinosa muy resistente. Tiene forma prognata y cónica, lo que le facilita penetrar en el sustrato del alimento gracias a la presión ejercida por el cuerpo larvario completo. La mandíbula maxilar está protegida por una almohadilla antenal robusta al nivel de la sutura clipeolabral la cual protege de daños a la cabeza cuando sobresale en el sustrato de alimentación.

En su cara ventral presenta una estructura predominantemente membranosa, la epifaringe, rica en espinas dirigidas hacia abajo y con un apéndice sensorial en su borde frontal. El aparato mandibular-maxilar representa la fusión de la mandíbula y el maxilar y se mueve principalmente en sentido vertical. Cuando el aparato está en aducción, todo el apéndice gira hacia abajo y los ganchos probablemente actúan como órganos excavadores. La parte inferior del aparato está compuesto por un cilindro membranoso grande e hinchado cubierto por una escobilla, que muele la comida en partículas más pequeñas. El extremo distal de los estípites lleva una galea equipada con siete abanicos de espinas en los últimos estadios pero con sólo tres en el primer estadio.

Estos autores, teorizan el funcionamiento de su aparato bucal basado en su morfología. Proponen que los ganchos del aparato mandibular-maxilar toman partículas del alimento para molerlo en partes más pequeñas con ayuda de los dientes lancinales. La comida es conducida hacia la boca y la hipofaringe junto con el septum quitinoso, donde separan las partículas gruesas de las más finas

expulsando ventralmente las más gruesas por contracciones. Las partículas seleccionadas entran en la faringe, donde ocurre un último tratamiento mecánico, serán trituradas una vez más. La percepción del alimento es guiado por los diversos apéndices sensoriales del peine epifaringeo (labral) que rodean la parte anterior de la hipofaringe.

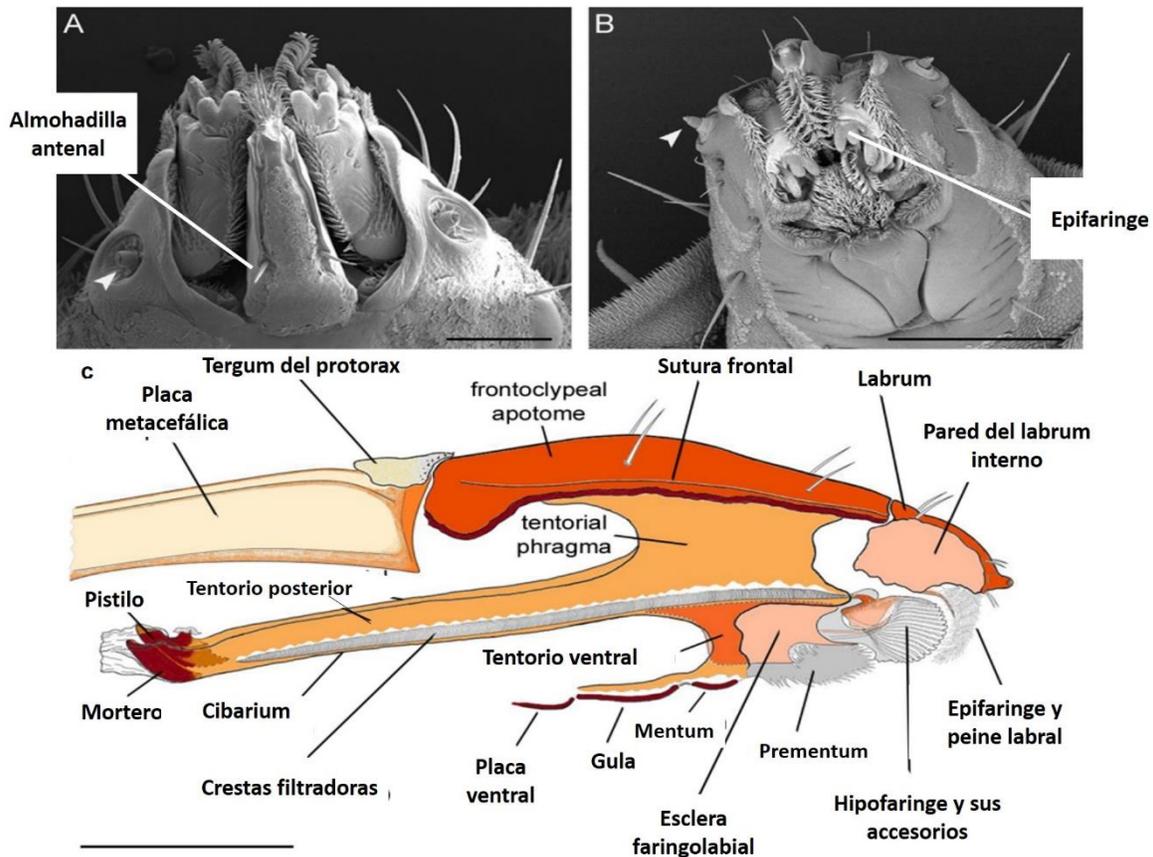


Figura 2 Vista de la cabeza de larva de MSN en prepupa con microscopio electrónico de barrido A: Vista dorsal de las partes bucales; B: Vista ventral de las partes bucales; C: Representación esquemática de la sección sagital de la cabeza (modificado de Bruno et al., 2020).

### Características del intestino de la larva de *H. illucens*

La segmentación del intestino en tres regiones de diferente origen embrionario es una característica común en todos los insectos (Nation, 2008). Este órgano desempeña un papel fundamental en la ingestión de alimentos, su digestión, la absorción de nutrientes y la eliminación de desechos. A diferencia de otras moscas

pertenecientes a la familia Brachycera (Dubreuil, 2004), el intestino larvario de *H. illucens* carece de ciego gástrico.

Bonelli *et al.* (2019), llevaron a cabo un análisis exhaustivo de la estructura y función del intestino de las larvas de MSN, identificando distintas regiones con propiedades específicas para funciones particulares. Según su estudio, el intestino medio, encargado de la producción y secreción de enzimas digestivas, así como de la absorción de nutrientes, constituye la parte más extensa del sistema digestivo (Figura 3). Observaron que el intestino medio de las larvas de *H. illucens* presenta regiones diferenciadas, cada una con un pH característico en su contenido luminal: el intestino medio anterior (IMA) con un pH de 5.9, el intestino medio medio (IMM) con un pH de 2.1 y el intestino medio posterior (IMP) con un pH de 8.3.

El revestimiento epitelial del intestino está compuesto principalmente por tres tipos de células: columnares, endocrinas y regenerativas. Sin embargo, cada región muestra una diferenciación significativa. El IMA exhibe una mayor presencia de retículos endoplasmáticos gruesos y numerosas mitocondrias. Por otro lado, el IMM contiene células especializadas de cobre, conocidas como células cuprófilas u oxínticas, junto con H<sup>+</sup> V-ATPasas asociadas, responsables de acidificar esta región. El IMP presenta un epitelio grueso con bordes en forma de cepillo (Bonelli *et al.*, 2019).

Estudios previos sugieren que las glándulas salivales de las larvas de *H. illucens* contribuyen mínimamente a la producción de enzimas digestivas, siendo el intestino medio el principal sitio de digestión (Kim, 2011). Bonelli *et al.* (2019) corroboraron este hallazgo al identificar la mayor actividad enzimática en el contenido luminal del IMP, indicando que esta región es crucial para la digestión de proteínas mediante endopeptidasas pertenecientes a la familia de las serina proteasas. Además, observaron una alta actividad de lisozimas en el IMM, las cuales pueden degradar los enlaces de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Lo cual sugiere la capacidad de las larvas para eliminar patógenos provenientes del sustrato de alimentación.

En cuanto a la función digestiva, el IMM se encarga de degradar polisacáridos mediante la secreción de amilasas, lipasas y lisozimas, a diferencia de la mosca doméstica, que produce amilasas en el intestino posterior, al igual que la mayoría de las enzimas (Pimentel, 2018). Por su parte, los lípidos son digeridos por el IMA y el IMP conjuntamente. Específicamente, el IMP está involucrado en la digestión de proteínas, donde endo y exopeptidasas realizan la hidrólisis de péptidos, liberando aminoácidos. Esta región exhibe una alta actividad de serina proteasas como la tripsina y quimiotripsina (Santa Ana *et al.*, 2017).

El análisis realizado por Bonelli *et al.* (2019) resalta la importancia del pH luminal en la función intestinal, ya que influye en la actividad enzimática, la solubilidad de nutrientes, la neutralización de agentes tóxicos y la configuración del microbioma intestinal. Además, señalan que la temperatura es un factor crítico para la actividad enzimática eficiente, con una temperatura óptima alrededor de los 45 °C. Este requisito enzimático, se refleja en el comportamiento de alimentación colectiva que se distingue por la tendencia de las larvas a agruparse, generando fricción con sus movimientos para aumentar la temperatura. Considerar estos aspectos relacionados con las funciones intestinales puede ser fundamental para el desarrollo de protocolos de cría que optimicen la capacidad de bioconversión y sus aplicaciones biotecnológicas.

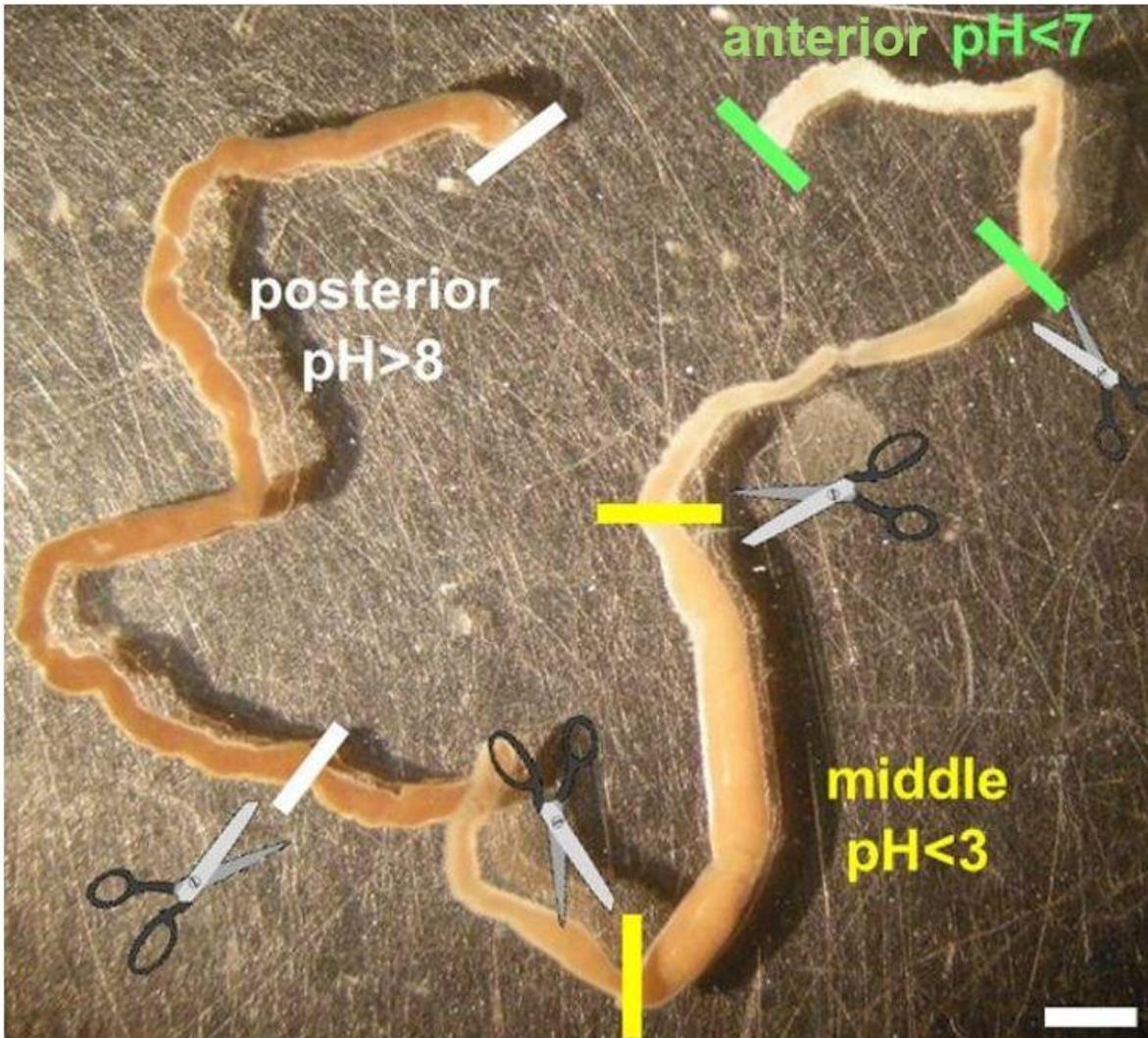


Figura 3 Regiones del intestino medio de larva de Mosca soldado negro en estadio de prepupa caracterizadas por la diferencia de pH en el contenido luminal. Modificado de Bruno et al. (2019).

### Composición nutrimental de la larva de MSN

Las etapas de larva y pupa son las más ricas en nutrientes y dependen en gran medida de la calidad de los alimentos, con alrededor de 18 a 33 % de grasa y 32 a 53 % de proteína, además de ser ricas en aminoácidos y minerales. El valor nutricional de las larvas varía según el tipo de desechos orgánicos con los que se alimentan (Wang y Shelomi 2017). Los aminoácidos esenciales abundan en la proteína obtenida de las larvas de MSN. En una comparación realizada por Lu *et al.*

(2022), encontraron que el contenido de leucina, isoleucina y valina del polvo de prepupa es mucho mayor que el de la harina de pescado, y el contenido de todos los demás aminoácidos, excepto el triptófano, es mayor en el polvo de prepupa que en la harina de soja. En cuanto al contenido de minerales, los contenidos de Fe, Mn y Al del polvo de prepupa son mucho mayores que los de la harina de pescado y la harina de soja. El contenido de algunos otros minerales (Na, Mg, Zn) también es mayor en el polvo de prepupa que en la harina de pescado y la harina de soja, pero los de K y Cu son ligeramente menores. En comparación con otros insectos, harina de soja y harina de pescado, el contenido de proteína bruta de las larvas y prepupas de *H. illucens* es ligeramente menor (Bulak *et al.*, 2020).

### **Características del frass de MSN**

El frass de larva de MSN está compuesto por una mezcla principalmente de heces de larva, residuos de sustrato y exoesqueletos desprendidos. Generalmente el frass se recolecta después de 9 a 23 días iniciada la cría de larvas de MSN, dependiendo del sustrato empleado. Adicionalmente, se suele recolectar una vez que del 40% al 90% de las larvas hallan pasado a la etapa de prepupa (Klammsteiner *et al.*, 2020). El frass cosechado puede encontrarse seco o húmedo. El frass seco se produce principalmente como una textura granular de color marrón oscuro y tiene un menor contenido de agua. Mientras tanto, el frass húmedo es denso, de color gris, tiene un alto contenido de humedad y tiene la consistencia de una arcilla espesa y húmeda (Alattar *et al.*, 2016). Lo ideal es obtener un frass seco ya que su transporte y embalaje se facilita, de igual manera no requiere un pre tratamiento, como el secado, antes de su estabilización (Basri *et al.*, 2022).

Diversos estudios señalan que a partir del sustrato ofrecido a las larvas como alimento durante el proceso de tratamiento con MSN pueden producir de un 25 % a 33 % de frass y entre 2 a 12,5 % de biomasa larval (Ravi *et al.*, 2020; Salomone *et al.*, 2017; Quilliam *et al.*, 2020). Al ser cosechado el frass este alcanza una temperatura de entre los 24 a 27 ° C. Debido a esto, el frass de MSN alcanza la fase

mesófila rápidamente. Mientras que, el pH del frass se suele encontrar entre 7.0 y 8.0, que es el rango óptimo para promover el crecimiento de las plantas y proporcionar un entorno propicio para las comunidades bacterianas beneficiosas en el frass (Surendra *et al.*, 2020). Estos resultados pueden variar ya sea por la calidad del sustrato como los parámetros ambientales de crianza.

## **Capítulo III**

### **Metodología**

Los experimentos de esta investigación se llevaron a cabo en las instalaciones de la planta piloto de mosca soldado negro, situada en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las larvas utilizadas fueron donadas por el pie de cría de la misma institución.

#### **Manejo *H. illucens***

Se llevaron a cabo tres réplicas de cada tratamiento, utilizando contenedores de plástico de 5.7 litros de capacidad de la marca Sterilite, con dimensiones de 34.6 x 21 x 12.4 cm. Cada contenedor se cargó con 200 gramos de alimento. Las dietas se administraron en dos dosis de 100 gramos cada una. La primera dosis se proporcionó al inicio, y la segunda al finalizar el alimento. Se emplearon 100 larvas por tratamiento y cada tratamiento se realizó por triplicado. Los contenedores fueron ubicados en el área designada para la cría en la planta Amazcala, donde se mantiene una temperatura controlada de 28°C y una humedad óptima de 70 ± 5% (Dortmans *et al.*, 2017).

Las líneas parentales se establecieron utilizando larvas de 5 a 7 días de vida (DOL por sus siglas en inglés days of living), obtenidas del proceso de cría en la planta piloto de mosca soldado negro de la UAQ. Una vez que las larvas alcanzaron el estadio de prepupa, se mantuvieron en oscuridad. Al observar la emergencia de moscas de su envoltura pupal, los contenedores de cría se colocaron dentro de jaulas de vuelo de acuerdo al tratamiento correspondiente, resultando en una

densidad de 300 moscas por jaula aproximadamente, esto considerando que cada tratamiento consistió en 100 larvas por triplicado. Se recolectaron los huevos, se pesaron y se colocaron en eclosión en sus respectivos tratamientos.

Entre los días 5 y 8, se seleccionaron aleatoriamente 100 larvas por tratamiento para mantener una densidad de dos larvas por gramo, la cual es la reportada con mayor eficiencia de bioconversión (Parodi *et al.*, 2021).

El ciclo de vida de las moscas, bajo las mismas condiciones dietéticas, se completó hasta alcanzar la tercera generación de *H. illucens*. Esto se hizo con el fin de asegurar que el microbioma heredado verticalmente se mantuviera constante debido al tratamiento (Hassan *et al.*, 2020; Lauzon *et al.*, 2009; Majumder *et al.*, 2019).

### Tratamientos

Para contrastar el impacto de la dieta ofrecida a las larvas en la composición microbiana del frass, se emplearon tres dietas que difieren en su contenido nutricional (Tabla 1). Además, se ofrecieron las dietas tanto enteras como molidas (tamaño de partícula menor a 0.065 pulgadas) con el fin de evaluar su influencia en el rendimiento de las larvas. La trituración de las dietas en una licuadora de cocina hace que el sustrato sea más palatable para las larvas de la mosca soldado negro, lo que favorece la cantidad de procesamiento (Dortmans *et al.*, 2017). Este aspecto se comparó con el uso de sustratos enteros.

Tabla 1 Identificación de los tratamientos

<i>Dieta</i>	<i>Gainesville</i>	<i>Mango</i>	<i>Tilapia</i>
<i>Molida</i>	Control	M1	T1
<i>Entera</i>	-	M2	T2

La dieta Gainesville está compuesta por un 50 % de salvado de trigo, 30 % de harina de alfalfa y 20 % de harina de maíz, la cual se homogeniza con agua hasta alcanzar una humedad del 70 % (Hogsette, 1992).

Para la dieta Mango, se utilizó la variedad Ataulfo, la cual se obtuvo a partir de sobrantes de frutería.

En cuanto a las dietas M1 y M2, la cáscara y pulpa del mango fueron procesadas de dos formas diferentes. En M1, se trituraron en una licuadora, mientras que en M2, se recortaron con tijeras en trozos de aproximadamente 4 a 8 cm de diámetro.

La dieta Tilapia consiste en residuos de tilapia, incluyendo despojos y cadáveres de tilapia de diferentes edades, provenientes de la planta acuícola del campus Amazcala de la UAQ. Se ajustó la humedad de la dieta al 70 % mediante la adición de salvado de trigo.

Para T1, los despojos y cadáveres de tilapia fueron triturados en una licuadora hasta obtener una mezcla homogénea, sin tener en cuenta el tamaño de los restos de huesos triturados. Por otro lado, en T2, los despojos y cadáveres se ofrecieron tal como fueron recuperados.

Es importante destacar que la dieta Gainesville se ha utilizado en varios estudios como una dieta experimental estandarizada con los requisitos nutricionales básicos para dípteros, y se emplea como dieta de control en diversas investigaciones (Scala et al., 2020).

### **Muestreo**

El frass fue colectado en bolsas herméticas una vez se observaron larvas en el estadio de prepupa. Las bolsas de frass se mantuvieron refrigeradas hasta su posterior análisis.

Durante el estadio 5 (14 a 18 días) de cada generación, se recolectaron 10 larvas de cada réplica. Estas larvas fueron preservadas en tubos Falcon con etanol al 96 % a -40 °C hasta su procesamiento en las instalaciones del CIAD Mazatlán.

### **Análisis bromatológicos**

Para analizar las características bromatológicas del frass (compuesto por alimento no digerido, mudas de larva y excreta), se determinó su contenido de humedad,

ceniza y pH. La composición nutricional de la harina de larva, fue evaluada en la última generación de larvas en estadio de prepupa (F3 de tilapia y F1 de mango), las cuales fueron sacrificadas por congelamiento para posteriormente determinar, humedad, ceniza, proteína, lípidos y carbohidratos. Los mismos análisis fueron realizados a las dietas empleando los métodos descritos a continuación:

### **Cenizas**

En crisoles a peso constante se pesaron 2 gr de muestra. Se registró el peso de crisol + muestra húmeda. Se colocaron los crisoles en la mufla a 500 °C por 5 horas. Posteriormente se tomó el peso del crisol + muestra seca. El porcentaje de cenizas se determinó con la siguiente formula:

$$\% \text{ cenizas} = (P2 - P1) \times 100 / M$$

Dónde:

P2 = Peso del crisol con las cenizas en gramos.

P1 = Peso del crisol vacío en gramos.

M = Peso de la muestra en gramos.

(MX-F-607-NORMEX-2013).

### **Humedad**

En crisoles a peso constante se pesaron 2 gr de muestra. Se registró el peso de crisol + muestra húmeda. Colocó la muestra en un horno a 100 ± 2 °C de 4 a 12 horas. Se registró el peso de la charola + muestra seca. El porcentaje de humedad se determinó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de humedad} = 100 \times (P2 - P3 / P2 - P1)$$

Dónde: P1 = Peso de recipiente

P2 = Peso de recipiente más muestra húmeda

P3 = Peso de recipiente más muestra seca.

(NMX-f-083-1986)

## **pH**

La determinación del pH, se llevó a cabo en una solución 1:10 de muestra / agua destilada, obteniendo una solución sobrenadante de relación de muestra, medida por medio de un potenciómetro de acuerdo a la NOM-021-RECNAT—2000.

## **Proteína**

El contenido de proteína cruda de las muestras se calculó mediante el valor de nitrógeno total, determinado por el método Kjeldahl. Posteriormente, este valor se multiplicó por el factor de corrección para proteína: 6.25, siguiendo el protocolo descrito por la norma mexicana NMX-F-068-S-1980.

## **Lípidos**

El contenido de grasa cruda se llevó a cabo por el método de extracción por microondas (EPA 3546). Dicho procedimiento consistió en realizar la extracción de grasa de la muestra con agitación constante con presión y temperatura regulada. Posteriormente, la grasa presente se determina por gravimetría usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de grasa cruda} = 100 (P1 / P2)$$

Dónde:

%L = Porcentaje de grasa total

P1 = Peso de la grasa (g)

P2 = Peso de la muestra (g)

## **Determinación del desempeño de las larvas de MSN**

### **Parámetros de bioconversión**

Se midió el peso inicial promedio de las larvas, y cada tercer día tomó el peso promedio de las larvas, hasta llegar al estadio de prepupa (Tomberlin *et al.*, 2002).

Se realizó una curva de crecimiento para visualizar la ganancia de peso. Para valorar el desempeño de las larvas se consideraron las siguientes índices asociados a la bioconversión de residuos (Menenguz *et al.* 2018).

### **Peso ganado**

El peso ganado por las larvas se determinó mediante la diferencia del peso final de las larvas y el peso inicial de las larvas, empleando la ecuación 1.

(1)

$$PG = P1 - P2$$

Dónde:

PG = Peso ganado

P1 = Peso corporal final (g)

P2 = Peso corporal inicial (g)

### **Tasa de crecimiento absoluto**

La tasa de crecimiento absoluto de las larvas se calculó a través de la relación del peso ganado de las larvas y el número de días de cultivo, como lo muestra la ecuación 2.

(2)

$$TG = \left( \frac{P1 - P2}{T} \right)$$

Dónde:

TG = Tasa de crecimiento absoluto

P1 = Peso corporal final (g)

P2 = Peso corporal inicial (g)

T = Duración de la prueba (días)

### **Conversión alimenticia**

La conversión alimenticia se calculó usando la relación del alimento total agregado y la biomasa ganada de la larva mediante la ecuación 3.

(3)

$$CA = \frac{P1}{P2}$$

Dónde:

CA = Conversión alimenticia

P1 = Alimento agregado (g)

P2 = Biomasa total ganada (g)

### **Reducción de sustrato**

La reducción del sustrato se calculó mediante la relación del sustrato total añadido y el frass (excremento más alimento no consumido), por medio de la ecuación 4.

(4)

$$\%RS = \left(1 - \frac{PF}{PI}\right) \times 100$$

Dónde:

RS = Reducción del sustrato

PF = Peso del frass (g)

P2 = Peso del sustrato inicial (g)

### **Eficiencia de conversión de biomasa**

Se calculó a partir de la masa larval final y la masa inicial del sustrato aplicando la ecuación 5.

(5)

$$\%ECB = \left( \frac{ML}{MSI} \right) \times 100$$
$$\%ECB = BL(MSI - R) \times 100$$

Donde:

ECB = Eficiencia de conversión de biomasa

ML = Biomasa larval final (g)

MSI = Masa sustrato inicial (g)

### **Análisis estadístico**

Se analizaron los resultados en el programa Stathgraphics donde se empleó un ANOVA con prueba de Tukey con un 95 % de confiabilidad y un valor de  $p=0.05$  para determinar la diferencia significativa entre grupos y tratamiento.

### **Análisis de la estructura de las comunidades microbianas**

Para el análisis metagenómico, se utilizaron 5 larvas de cada tratamiento en cada generación durante el estadio 5. En total, se incluyeron 65 larvas, incluyendo el grupo de control alimentado con Gainesville.

La extracción del ADN, la amplificación y la secuenciación se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD Mazatlán).

### **Extracción de ADN**

Se registró peso y talla de cada larva de la cual se extrajo ADN. En condiciones estériles con ayuda de pinzas y estereoscopio se diseccionó el tracto digestivo de las larvas. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL para llevar a cabo la extracción de ADN por el método CTAB. El método consiste en agregar 480  $\mu$ L de EDTA 0.5 M y 120  $\mu$ L de lisozima, se incubó a 37 °C por 30

minutos, centrifugar a 15, 000 rpm por 2 minutos y decantar el sobrenadante. Posteriormente agregar 350  $\mu$ L de buffer CTAB y 20  $\mu$ L de proteinasa K, los tubos se dejaron en termoblock a 55 °C durante 24 horas para que los tejidos se digieran por completo. Al siguiente día se agregó 300  $\mu$ L de LiCl 5M, 2  $\mu$ L de RNAsa y 600  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 13, 000 rpm durante 15 minutos. De la fase acuosa se recuperó 500  $\mu$ L del centrifugado y se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. Se añadieron 50  $\mu$ L de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 1 mL de etanol al 100 % frio se agita y deja a -20 °C por una hora. Una vez concluido el tiempo de congelación se centrifugó durante 20 minutos a 13, 000 rpm y se retiró el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado, a este se agregan 750  $\mu$ L de etanol al 70 %, se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó nuevamente a 14, 000 rpm durante 5 minutos.

En la campana de flujo laminar se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar el pellet de ADN manteniendo los tubos abiertos durante 20 minutos. Una vez seco, se añadieron 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada libre de nucleasas para resuspender el pellet. Las muestras se guardaron a -20 °C durante 24 horas.

Se cuantificó el ADN por medio de la lectura de 1  $\mu$ L en el espectrofotómetro DeNovix DS 11.

### **Amplificación de ADN**

La microbiota bacteriana se caracterizó utilizando la región hipervariable V3 del rRNA 16S. Se emplearon los cebadores 338F Forward: 338F (ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG); y 533R Reverso: (TTA CCG CGG CTG CTG GCA C). Esperando bandas de amplificación de aproximadamente 1,500 pb.

Para la reacción de PCR se emplearon las siguientes concentraciones: 8.3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de grado molecular, 1.5  $\mu$ L de Buffer Taq DNA Polymerase (recombinant) de la marca Fisher  
Thermo

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EP0401>), 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.6 µL de dNTPs, 0.6 µL de cada cebador, 0.2 µL de la enzima Taq Polymerase y 1 µL de ADN. Se realizó la amplificación en el termociclador SimpliAmp de la marca Thermo Fisher. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial 95 °C x 3', 35 ciclos de desnaturalización 95 °C x 30", alineamiento 58 °C x 30", extensión 72 °C x 30" un ciclo de extensión final 72 °C x 5'. Los productos de amplificación fueron validados en geles de agarosa al 1% para observar la presencia de los productos de PCR.

### **Secuenciación**

Los amplicones fueron purificados empleando AMPure XP y perlas de cristal, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procesaron siguiendo el protocolo de metagenómica para el equipo Illumina MiniSeq.

Para esto se cuantificaron los amplicones con Broad-Range dDNA Quantification Assay Kit (Thermo scientific) por fluorometría en Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific), para ser ajustado a una disolución adecuada para la secuenciación en Illumina MiniSeq (Navarro-Barrón *et al.*, 2019).

### **Análisis de la composición de la diversidad microbiana**

Se empleó el pipeline del Laboratorio de Genómica Microbiana del CIAD para el análisis de secuencias metagenómicas dirigidas a amplicones del 16S:

- 1.- Las secuencias generadas por illumina en formato .fastq fueron descomprimidas, limpiadas, ensambladas y convertirlas a formato .fasta empleando el script *pair-end\_cleaner.sh*. Este script filtra las secuencias de acuerdo con el valor de calidad Phred>20 (este es un valor de medición del error en los pares de bases generados por la secuenciación, >20 es

aceptable, empleando el 99% de validez contra 1% de error). Elimina las “n” y las secuencias inferiores a 110 pb. Ensamblando las secuencias pareadas empleando PEAR.

2.- Se eliminaron secuencias quiméricas mediante el script *chimera\_detector.sh* que produce un reporte y nuevos archivos multifasta en los cuales ya se han eliminado las secuencias quiméricas. El script utiliza archivos multifasta en el directorio y genera nuevos archivos libres de quimeras, utiliza la base de datos SILVA\_128.dereplicated.fna. Si una secuencia de consulta tenía una coincidencia mayor al 97% de similitud en la base de datos, no se consideraba una quimera.

3.- Se asignó taxón a las secuencias limpias con el script *mg\_classifier.sh* empleando SILVA v132 como base de datos la cual clasifica hasta el nivel de género. La base de datos SILVA consta de 468 811 secuencias (386 418 bacterias, 20. 31 arqueas y 57 263 eucariotas).

Para determinar el porcentaje de géneros relacionados a cada Reino y Phylum se elaboraron gráficas dinámicas utilizando KronaTools. Esta herramienta permite explorar datos ordenados jerárquicamente haciendo acercamientos dentro de una gráfica de pastel con capas múltiples (Ondov *et al.*, 2011).

Para visualizar la distribución de OTUs se empleó el programa R Studio v 4.2 con las paqueterías ampvis2 la cual genera gráficos usando el paquete ggplot2.

Los OTUs relevantes se investigaron en la plataforma de BLAST para determinar su estatus como posibles microorganismos patógenos o beneficiosos, así como su función dentro del microbioma.

## **Determinación del impacto de la dieta**

### **Análisis de la influencia de la dieta sobre la composición del microbioma**

La diversidad alfa, es decir, la riqueza observada, el índice de Shannon y el índice de Simpson; y la diversidad beta, es decir, la escala multidimensional no métrica (NMDS), se calcularon con las paqueterías de phyloseq v 1.40 y vegan v 2.6.4 en R Studio (McMurdie y Holmes, 2013).

Para ilustrar la dinámica microbiológica de OTUs que representan la abundancia relativa en todas las muestras, considerando las distancias filogenéticas entre OTUs (Oksanen *et al.*, 2019), fue empleada la matriz de disimilitud de Bray-Curtis en el análisis de componentes principales y el método de UNIFRAC no ponderado en el NMDS, de esta manera se determinaron las correlaciones entre la composición nutricional de cada dieta empleada con la composición de OTUs (Gold *et al.*, 2020).

## **Capítulo IV**

### **Resultados y discusión**

#### **Impacto de la dieta y la sucesión generacional sobre el desarrollo de las larvas**

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de dos dietas diferentes en su composición mango y tilapia, comparadas con un control la dieta Gainesville, y su efecto sobre el desarrollo de las larvas de MSN, así como, el impacto de las dietas restringidas durante la sucesión de tres generaciones (parentales, F1, F2 y F3). Y a partir de esto, evaluar cambios temporales en la composición de sus comunidades microbianas intestinales, así como su capacidad para la bioconversión de los residuos orgánicos.

Las larvas de MSN alimentadas con los tratamientos de tilapia tuvieron un desarrollo similar al control con respecto al tiempo durante los estadios de su ciclo de vida (18 a 20 días de vida para llegar a pupa). Las larvas alimentadas con tilapia completaron su ciclo de vida hasta la tercera generación. Por otro lado, las larvas alimentadas con mango tuvieron estadios más largos (más de 28 días para pupa), en comparación con el control, a partir del día 22 en el estadio 5 comenzaron a reducir su peso y tamaño (Figura 4). Adicionalmente, las pupas del tratamiento con mango

no sincronizaron su eclosión a mosca, lo cual ocasionó una baja densidad de moscas en las jaulas de vuelo reduciendo las posibilidades de reproducción y por ende la disminución en la puesta de huevos (Figura 5). Debido a esto los tratamientos con mango se concluyeron hasta la generación 1. Los resultados obtenidos claramente indican que la composición de la dieta es un factor que repercute directamente sobre el desarrollo, ya que afecta el tiempo de los estadios larvarios y la ganancia de peso (Figura 4).

En ambos tratamientos las dietas ofrecidas enteras tuvieron valores ligeramente más altos en los parámetros de bioconversión (Tabla 2) y la duración de los estadios fue ligeramente menor, sin embargo, estadísticamente no muestran diferencia significativa. También, se observaron diferencias en el comportamiento de alimentación entre las larvas con dieta entera y molida. Las larvas que crecieron en las dietas enteras utilizaban trozos del sustrato para descansar o protegerse. Por ejemplo, al secarse las cascaras de mango se observó que algunas larvas se enrollaban con sus setas al iniciar el estadio de prepupa. Las larvas de los primeros estadios descansaban debajo de las semillas de mango, buscando refugio entre las cerdas de la semilla. Mientras que las larvas en la dieta de tilapia molida se escondían entre las agallas del pez. A diferencia de esto, las larvas alimentadas con dieta molida descansaban en las orillas de las cajas donde no había sustrato. Este comportamiento se ha descrito en larvas de diferentes insectos que al estar en una fase vulnerable tienden a buscar refugio entre las comisuras de sus alrededores para mantenerse protegidas de depredadores y las condiciones del ambiente (Marzouk, 2016).

### **Determinación del desarrollo de las larvas de MSN por tratamiento**

Los parámetros de bioconversión de cada tratamiento se ilustran en la Tabla 2. Los resultados indican, una diferencia notable entre la dieta de mango y la de tilapia. Ya que el peso de las larvas alimentadas con mango se vio considerablemente reducido en comparación con las alimentadas con tilapia y el control (dieta

Gainesville). Esto se confirma con una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento ( $p < 0.05$ ) lo que implica un impacto sustancial sobre el crecimiento y el resto de los parámetros de crecimiento de las larvas de MSN.

Asimismo, se observó que durante cada sucesión generacional las larvas van disminuyendo el peso final y los parámetros de bioconversión también se reducen. Lo anterior se puede visualizar en la Figura 4. Por ejemplo, con la dieta de tilapia a partir de la segunda generación hay una notable caída en el peso, los índices de crecimiento y la cantidad de huevo por grupo (Figura 5). De manera similar ocurrió en la primera generación de mango ya que las larvas disminuyeron su rendimiento significativamente.

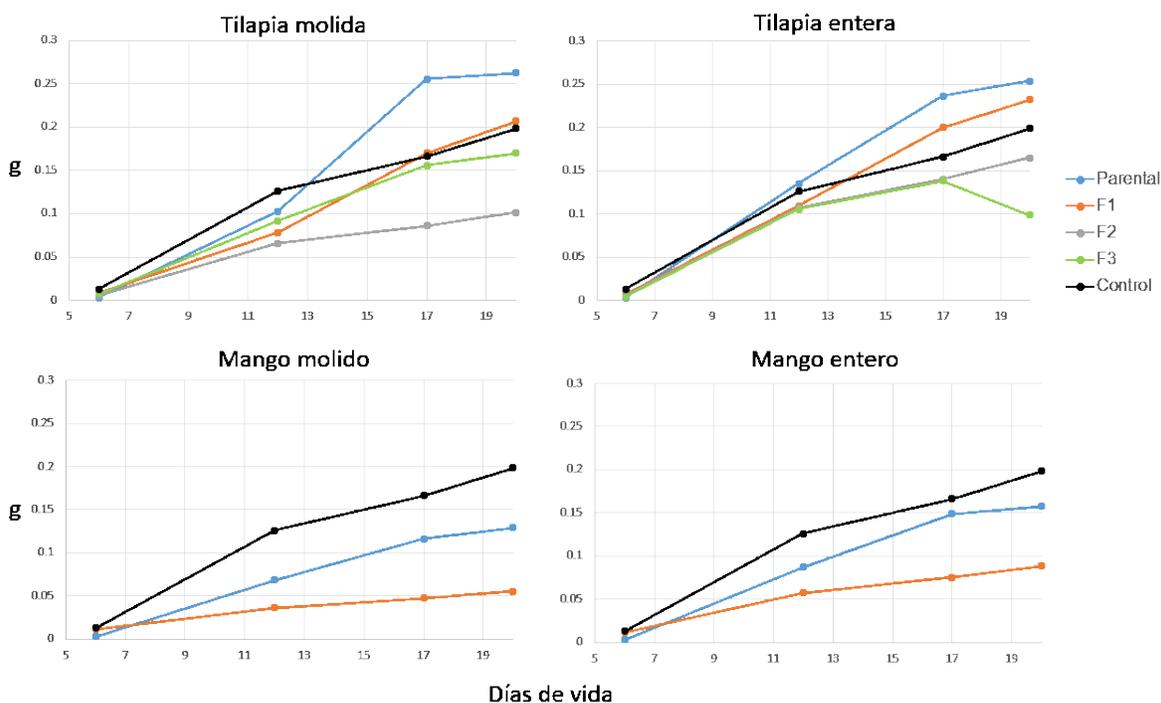


Figura 4. Curva de crecimiento de las larvas. F1, F2, y F3 corresponden a la generación 1, 2 y 3 respectivamente, para cada tratamiento. El peso en gramos fue calculado del promedio del peso fresco de 20 individuos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Valor de  $p = 0.0082$ . El primer registro de peso fue el quinto día de vida, al día 20 los tratamientos con tilapia y el control ya presentaban prepupas por lo cual se concluyeron las mediciones para la curva.

El efecto de la composición nutricional de las dietas indica que las larvas requieren de macro y micronutrientes lo cual es necesario para una alta eficiencia metabólica y en la ganancia de biomasa (Seyedalmoosav *et al.*, 2022), compuestos que se pueden encontrar en una dieta más variada y equilibrada que las ofrecidas como

tratamiento. Klammsteiner *et al.*, (2020), reportan que al ofrecerle a larvas de MSN una dieta basada en frutas y verduras (compuesta por pepino, tomate, naranja y manzana) obtuvieron en la reducción de sustrato y en el índice de eficiencia de conversión del alimento digerido, un valor similar al control (alimento comercial para gallina similar a Gainesville, compuesto por maíz, trigo, sorgo y centeno), sin embargo, una ganancia de peso menor, por lo que sugieren que una dieta basada en frutas y verduras tiene una fácil digestibilidad, por su composición alta en humedad y reducida en grasas (Figura 6), aunque una menor proporción de lo ingerido se convierte en biomasa y más bien se invierte en el metabolismo.

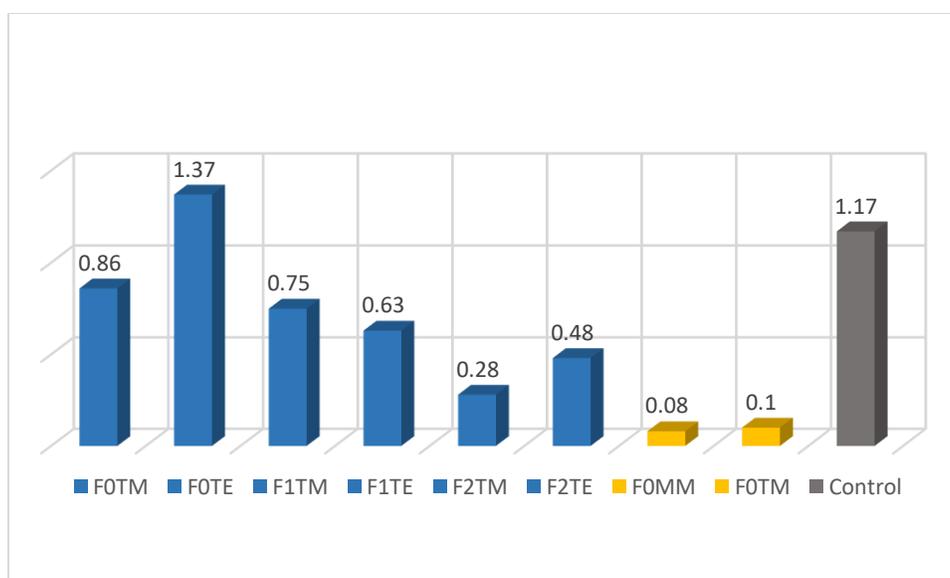


Figura 5 Cantidad total de huevo en gramos puesto por las moscas de *H. illucens* por cada tratamiento. Se monitoreo durante 8 días las jaulas de reproducción. Fueron realizadas dos colectas, el día 3 y 6. Cada jaula de vuelo contenía una densidad de 300 pupas aproximadamente. F0 = parentales, F1, F2 y F3 = generación 1, 2 y 3 respectivamente. TE = tilapia entera; TM= tilapia molida; ME= mango entero; MM = mango molido

La conversión alimenticia representa la relación entre el alimento consumido por las larvas de MSN y el peso ganado durante el proceso de conversión. Particularmente, la dieta de mango tuvo un mayor impacto sobre los valores de la conversión alimenticia (CA) con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la tilapia. Las larvas parentales alimentadas con mango tuvieron hasta un valor de 40 en el parámetro de CA, mientras que en la primer generación del tratamiento con mango se redujo a un 25, sin embargo, estos valores siguen siendo altos en comparación con el tratamiento de tilapia ya que ninguna de las generaciones del

tratamiento alcanzo un valor por encima de 20 en CA. Lo anterior indica, que a pesar de que la dieta de mango no favorece la ganancia de peso en las larvas es altamente digerible para ellas, lo mismo se corrobora con el alto índice de RS con mango (de 88 a 91 %). Paralelo a esto, el bajo índice de ECB (de 2 a 4, mientras que con la dieta de tilapia y el control los valores son < 7) en los tratamientos con mango sugiere que aun siendo digerible la composición del mango no les brinda los requerimientos necesarios para la ganancia de peso, es decir, redujeron y metabolizaron una mayor proporción de sustrato pero desarrollaron menor biomasa, [entrada total – (biomasa salida + residuos total) = metabolismo total].

Por otra parte, la dieta de tilapia resulta ser más compleja de digerir (CA de 8 a 14), a pesar de ello, genera mayor ganancia de peso, mayor TCA y por ende mayor ECB. La composición nutricional (Figura 6), de la dieta de tilapia parece brindar los requerimientos mínimos necesarios para el desarrollo de *H. illucens*, ya que se pudieron obtener las tres generaciones, a diferencia de la dieta de mango que parece limitar su desarrollo.

A pesar de no haber estudios que exploren el efecto de una dieta restringida sobre las larvas de moscas en diversas generaciones Klamstein *et al.*, 2020, han ahondado en un experimento donde se les alimenta con frutas donde concluyen que *H. illucens* al ser un insecto detritívoro polífago una dieta restringida a un alimento exclusivo pudiera presentar deficiencias nutricionales las cuales podrían ocasionarle dificultades para completar su ciclo de vida. Los resultados observados en el presente experimento indican que dichas deficiencias parecen tener un efecto sobre la siguiente generación ya que la tasa de crecimiento absoluto, el tamaño y peso de las larvas se vio reducido conforme la sucesión de generaciones avanzó (Tabla 2).

Por otra parte, Zhan *et al.*, (2024), reportan que una dieta homogénea compuesta por carne, es decir carente de ingredientes vegetales, repercute en el desarrollo larval generando una alta incidencia de mortalidad y deficiencias. De igual manera, se reduce la plasticidad fenotípica de las larvas, según los autores esto refiere a la

capacidad de adaptarse metabólicamente a las características de su dieta y ambiente que este mismo proporciona. Lo anterior, puede explicar la disminución en la tasa de crecimiento absoluto conforme sucesión generacional (Tabla 4).

Tabla 2 Valores obtenidos en los parámetros de bioconversión

	Generación	Dieta				
		Tilapia		Mango		Gainesville
		Molido	Entera	Molido	Entero	Control
Peso ganado (g)	Parental	0.2592 ± 0.0 *	0.2504 ± 0.05 *	0.1336 ± 0.01 *	0.1492 ± 0.02	0.1456 ± 0.0
	1	0.216 ± 0.03 *	0.2334 ± 0.06 *	0.0748 ± 0.01	0.1152 ± 0.01	
	2	0.1151 ± 0.01	0.1674 ± 0.05			
	3	0.1125 ± 0.0	0.1127 ± 0.01			
Tasa de crecimiento absoluto (g / día)	Parental	0.0199459 ± 0.0 *	0.0192639 ± 0.0 *	0.00607412 ± 0.0	0.00678624 ± 0.0	0.00910089 ± 0.0
	1	0.0135037 ± 0.0 *	0.0145908 ± 0.0 *	0.0021374 ± 0.0 *	0.00329378 ± 0.0 *	
	2	0.00575882 ± 0.0 *	0.00837327 ± 0.0			
	3	0.0070351 ± 0.0	0.007047 ± 0.0			
Conversión alimenticia	Parental	11.2884 ± 0.80	7.22782 ± 0.77	46.1063 ± 0.27 *	42.7718 ± 0.68 *	12.5892 ± 0.48
	1	12.0534 ± 0.28	10.1209 ± 0.49	25.9397 ± 0.58 *	14.6127 ± 0.81	
	2	8.71752 ± 0.91	7.72883 ± 0.67			
	3	14.2172 ± 0.11	12.1988 ± 0.37			
Reducción de sustrato (%)	Parental	22.7997 ± 1.90 *	24.6062 ± 2.53 *	91.704 ± 1.96	88.552 ± 0.50	87.3972 ± 0.64
	1	69.1846 ± 3.08 *	60.9411 ± 4.98 *	90.3425 ± 0.79	91.8515 ± 0.64	
	2	79.2386 ± 1.49 *	79.1953 ± 2.31 *			
	3	84.5332 ± 2.17 *	77.2881 ± 1.26 *			
Eficiencia de conversión de biomasa	Parental	9.30383 ± 1.43	13.9382 ± 1.68 *	2.176 ± 0.14 *	2.39733 ± 0.43 *	7.95095 ± 0.29
	1	8.85924 ± 2.53	10.7311 ± 2.76	3.98749 ± 0.92 *	4.03283 ± 1.48	
	2	12.2494 ± 3.50 *	14.0524 ± 3.93 *			
	3	7.06363 ± 0.57	8.26879 ± 0.95			

Valores promedio, ± desviación estándar, obtenidos a partir de muestras frescas de larva y frass, con una n =3. En rojo se indican los valores más altos de cada parámetro. Valor estadístico de  $p = 0.000$ . Se indica con \* los tratamientos que tuvieron una diferencia estadísticamente significativa a la media del control.

## Comparación entre dieta molida y entera

El método empleado para discriminar entre las medias de las dietas enteras o molidas fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

En la Tabla 3 se indican los parámetros de bioconversión el tratamiento de la dieta molida o entera tuvo diferencia significativa y sobre que generación en particular. Únicamente, se observó la diferencia en cinco ocasiones. Al no ser recurrente la diferencia entre esta variable se descarta el hecho de que la dieta ofrecida molida o entera tenga un impacto significativo sobre los parámetros de bioconversión y el desarrollo de *H. illucens*.

Tabla 3 Diferencia significativa entre las dietas molida y entera en los dos sustratos

Parámetro	Tratamientos que presentan diferencia entre la dieta molida y entera	Valor de DMS de diferencia
Biomasa larval	Parental tilapia	9.26877
Peso ganado	Generación 1 de tilapia	4.0867
Conversión alimenticia	Generación 1 mango	-11.3269
Reducción de sustrato	Generación 3 tilapia	-7.24512
Eficiencia de conversión de biomasa	Parental tilapia	4.63438

Mientras el valor de DMS se aleja más del cero mayor es la diferencia entre los valores de la dieta molida y entera para el parámetro indicado. No se detectaron diferencias entre sustrato molido y entero entre ninguno de los dos sustratos.

## Composición bromatológica de las dietas y la harina de larva

Los resultados del análisis bromatológico de las dietas empleadas como tratamiento se muestran en la Figura 6. La dieta control Gainesville es referida como una dieta balanceada y que cuenta con los micro y macronutrientes requeridos para el desarrollo óptimo de *H. illucens* de manera productiva. Por su parte, la dieta de mango consiste en un alto contenido de agua (83 %), un contenido considerablemente más alto de azúcares (12 %), así como, una porción reducida

de grasas (2 %) y proteína (3 %). Mientras que, la dieta de tilapia tiene una composición ligeramente similar al control, pero particularmente con mayor contenido de grasa (8 %) y proteínas (32 %), al igual que la porción de cenizas (3 %) que corresponde al contenido mineral. El contenido calórico por gramo en orden descendente fue: mango = 4580.8993, control = 4371.2207, tilapia = 3983.3489 Kcal / gr.

La composición bromatológica de la harina de larva por tratamiento, representada en la Figura 7, a pesar, que las larvas alimentadas con mango cuentan con un ligero aumento en la porción de grasa, el ANOVA no indicó una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 2.5743$ ), entre las muestras. Adicionalmente, la composición de la harina de larva concuerda con la reportada por otros autores. Wang y Shalom (2017), indican que una larva de calidad varía entre el 18 a 33 % de grasa y 32 a 53 % de proteína. El contenido calórico por gramo, en orden descendente fue: tilapia entera = 6245.7593, tilapia molida = 5623.6181, control = 5133.1601, mango entero = 5183.8997 y mango molido = 4897.4939 Kcal / gr.

De acuerdo con Seyedalmoosav *et al.* (2022), sustratos con mayor contenido de proteínas (> 22 %) en comparación con aquellos con bajo contenido de proteínas (< 13 %) generan un mayor peso larvario, una mejor bioconversión y tasa de conversión alimenticia, así como estadios reducidos. Por otra parte, las dieta bajas en proteínas y lípidos pero altas en carbohidratos (como frutas), generan un incremento en el contenido de lípidos hasta 1.4 veces más en comparación que con las larvas alimentadas con mayor proteína, pero el desarrollo de los estadios larvales conlleva más tiempo (37 días en lugar de 21 días). Lo anterior coincide con los resultados presentados en la Figura 7, donde se puede distinguir, que el contenido de lípidos en la harina de larvas alimentadas con mango fue mayor al de las larvas alimentadas con tilapia o el control.

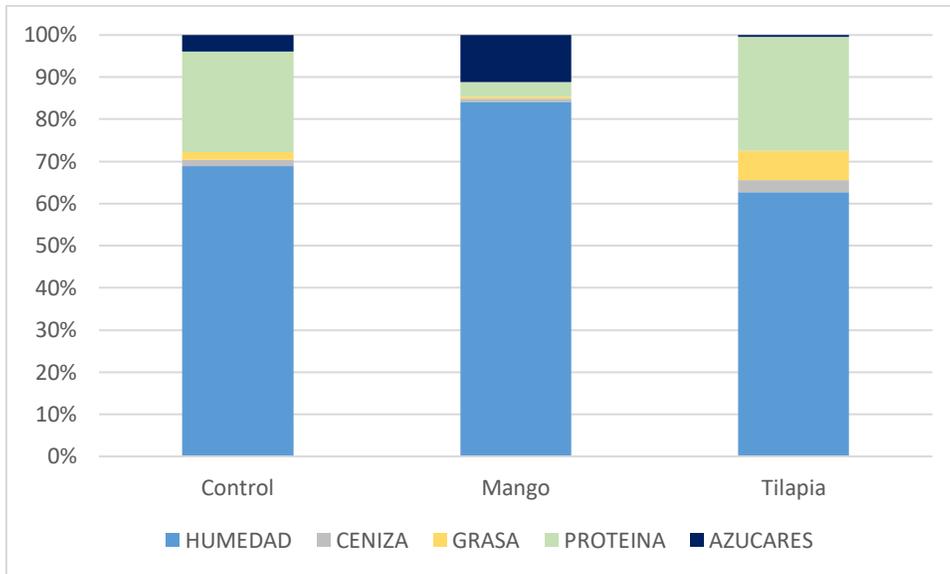


Figura 6. Composición proximal del contenido nutricional de las dietas ofrecidas como tratamiento n=3. Valor de  $p= 0.0026$

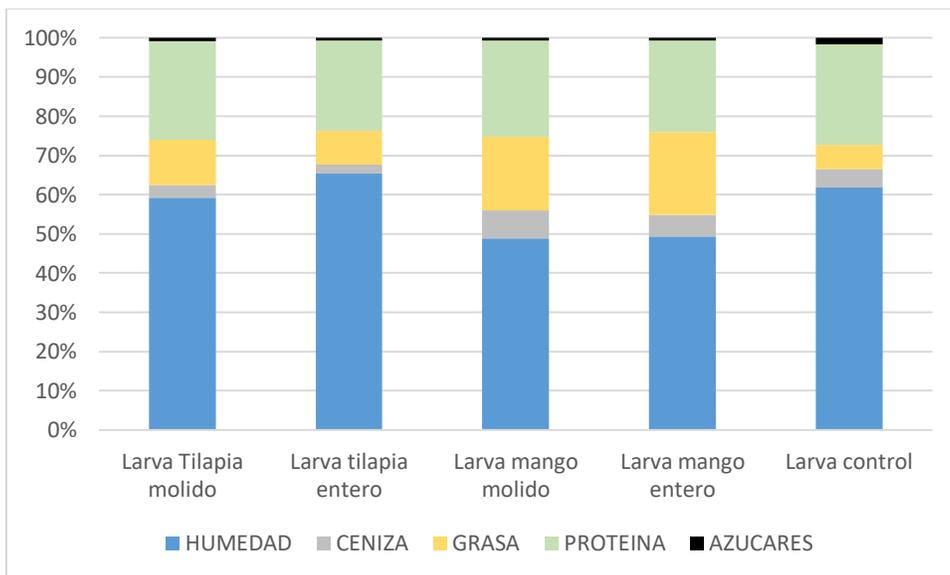


Figura 7. Composición nutrimental de la harina de larva procedente de cada tratamiento. n = 3. Valor de  $p = 2.574$ .

## Composición y estructura de los consorcios microbianos por tratamiento

Conforme al objetivo 2 de este estudio, se muestreo el gen 16S del ARNr en intestinos de larvas en estadio de prepupa, puesto que, se ha comprobado que es está la etapa en la que cuentan con una mayor diversidad y riqueza microbiológica (Looveren *et al.*, 2024). Esto debido a que, han sido colonizadas por los microorganismos del sustrato y en el transcurso de sus estadios larvarios lo han modulado según sus requerimientos y capacidades. Adicionalmente, es el estadio con mayor interés comercial debido a que es el estadio donde adquieren un mayor contenido de lípidos y proteínas.

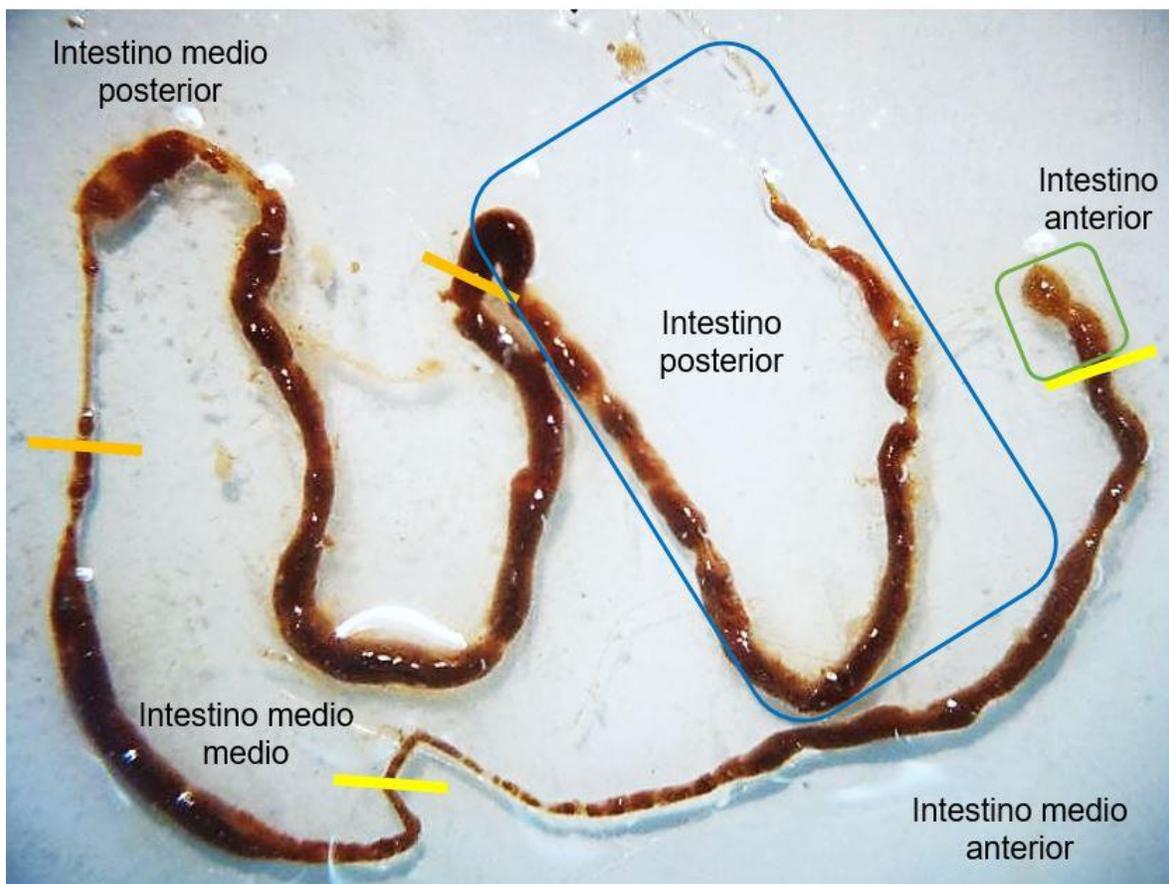


Figura 8. Anatomía de las regiones del intestino de la larva de mosca soldado negro en prepupa.

En las instalaciones del CIAD se realizaron las disecciones del intestino completo a 5 larvas de cada tratamiento en el estadio de prepupa, teniendo un total de 65 muestras. En las Figura 8 se muestra la morfología del intestino de las larvas, y en

la Figura 9 se muestran intestinos de las larvas alimentadas con cada una de los tratamientos, donde se puede observar la diferencia de pigmentación debido a la dieta. Las larvas alimentadas con mango muestran un intestino de color rosado-amarillo, de menor largo y grosor, mientras que el intestino de las larvas alimentadas con tilapia muestran una pigmentación oscura, así como un mayor tamaño.

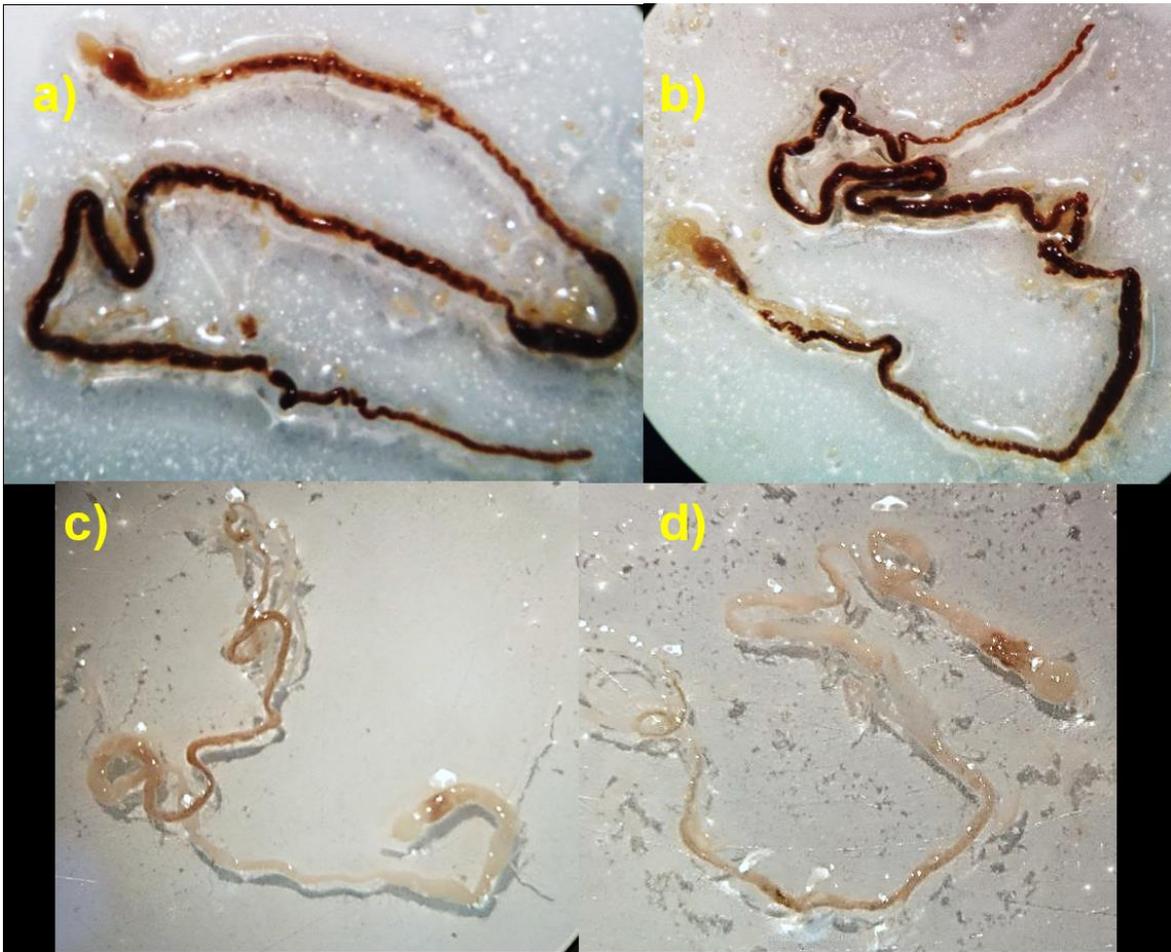


Figura 9. Comparación de los intestinos de larva de MSN por tratamiento en prepupa. Vista en estereoscopio. Larva alimentada con: a) tilapia molida; b) tilapia entera; c) mango molido y d) mango entero.

En este estudio, la composición microbiana sólo se determinó en el microbioma intestinal larval y no fue monitoreado del sustrato en las cajas de crianza durante el experimento. Sin embargo, en diversos artículos (Loveeren *et al.*, 2024; Gold *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2019), donde fue explorada, tanto la comunidad bacteriana de la dieta inicial, como la comunidad bacteriana del sustrato final (compuesto por la excreta, mudas y comida no digerida). Se ha corroborado, en dichos artículos, que

las larvas no solo enriquecen sino moldean a cierto grado la comunidad bacteriana, lo que lleva a un microbioma similar en el intestino de las larvas y su entorno a lo largo del tiempo. Esto les permite a las larvas asegurar una rápida adaptación al entorno de cría, lo que sugiere que la principal transmisión del microbioma es horizontal

### Análisis estadístico de las muestras

Empleando un análisis de la mediana de los pesos se categorizaron las larvas por tratamiento en tamaño corporal como bajo, medio y alto (Tabla 4).

Tabla 4. Prueba de la Mediana de Mood para Peso por Tratamiento

Grupo	Medio	Bajo	Alto
	Mediana	LC inferior 95.0%	LC superior 95.0%
Parental mango entero	171.5	121.0	185.0
Parental mango molido	103.0	79.0	152.0
Generación 1 mango entero	80.0	72.0	103.0
Generación 1 mango molida	62.0	49.0	70.0
Parental tilapia entero	132.0	70.0	152.0
Parental tilapia molido	60.0	42.0	83.0
Generación 1 tilapia entero	181.0	150.0	247.0
Generación 1 tilapia molido	205.0	121.0	213.0
Generación 2 tilapia entero	50.0	30.0	135.0
Generación 2 tilapia molido	39.0	29.0	67.0
Generación 3 tilapia entero	80.0	62.0	108.0
Generación 3 tilapia molido	158.0	83.0	194.0
Control	175.0	150.0	230.0

Valor de  $p = 0.0000388802$ .  $n = 5$  por grupo.

### Composición del microbioma bacteriano de las larvas de MSN

Número total de secuencias fastq: 3 184 123. Número total de secuencias ensambladas: 2 607 536 de las cuales 1 938 080 secuencias se encontraron libres de quimeras (74 %). Total OTUs asignados a Bacteria 4052. Número total de phyllums encontrados: 18, número total de diferentes familias: 338, número total de diferentes géneros encontrados: 824. Como resultados complementarios, en la sección de [anexos](#) se encuentra la liga con acceso a las gráficas dinámicas de KronaTools.

En la Figura 10, se muestra el esfuerzo de secuenciación por grupo de tratamiento, donde las curvas de rarefacción más altas indican una mayor diversidad de OTU's que al aplanarse indica que se alcanzó el tope de lecturas asignadas a OTU. Se observa que el control, cuenta con la curva más alta por encima de las 600 observaciones, mientras que, los tratamientos con mango presentan menor número de observaciones. En la Figura 11, se muestra el árbol filogenético de los OTUs asignados, donde se indica por color los taxones de acuerdo a la dieta, se observa que la dieta de tilapia presenta una mayor diversidad de taxones dominantes.

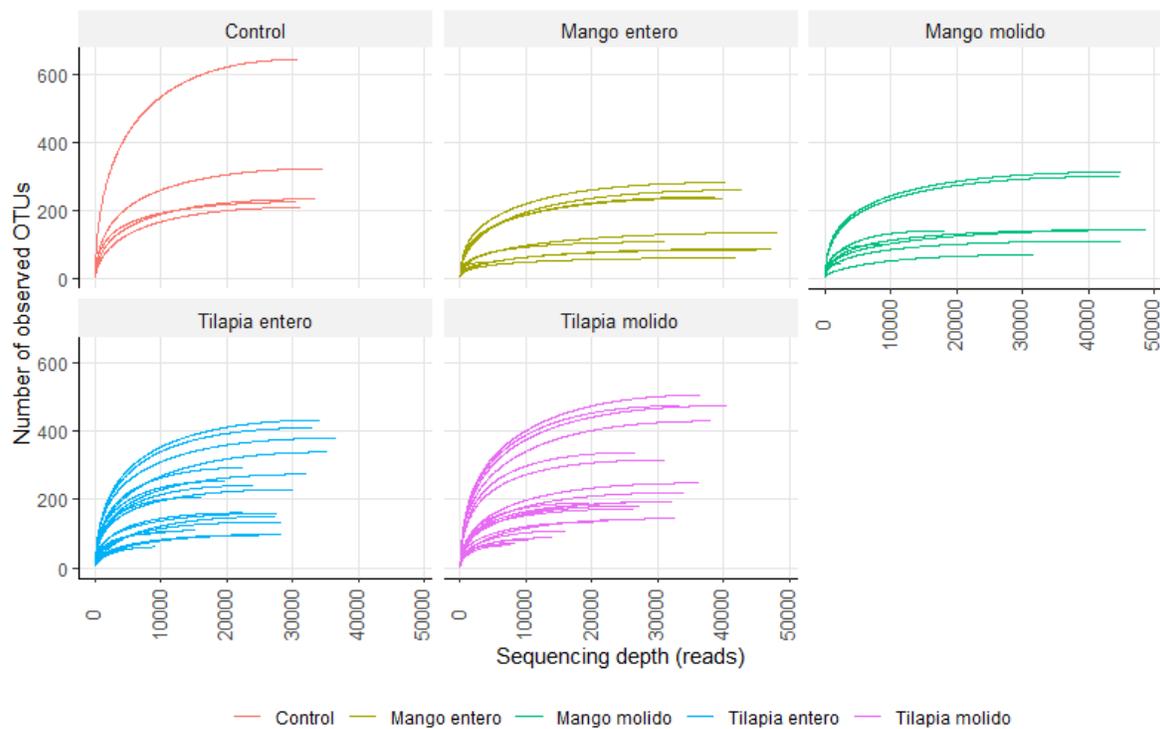


Figura 10. Rarefacción del número de OTUs detectados por tratamiento



Figura 11. Árbol filogenético marcado por los OTUS correspondientes a la dieta

La abundancia relativa de OTUs asignados a los niveles taxonómicos de phylum y familia correspondientes al tratamiento se muestra en las figuras 12 y 13.

El phylum más dominante en todos los tratamientos es Proteobacteria seguido de Firmicutes, Bacteroidota, y Actinobacteriota. Se observó una particular dominancia en las muestras de tilapia y el control correspondiente a Bacteroidota, Actinobacteria, Acidobacteria, Por su parte, en el tratamiento de mango se encontró Cyanobacteria como único phylum exclusivo.

La familia más predominante presente en todos los tratamientos fue Enterococcaceae seguido de Morganellaceae y Enterobacteriaceae. Familias con alta abundancia representada en las muestras de tilapia fue Wohlfahrtiimonadaceae, seguido de Rhizobiaceae, Flavobacteriaceae, Actinomycetaceae, y tres familias de Firmicutes no clasificadas. Familias encontradas en alta abundancia en las muestras de mango son Acetobacteraceae y Orbaceae.

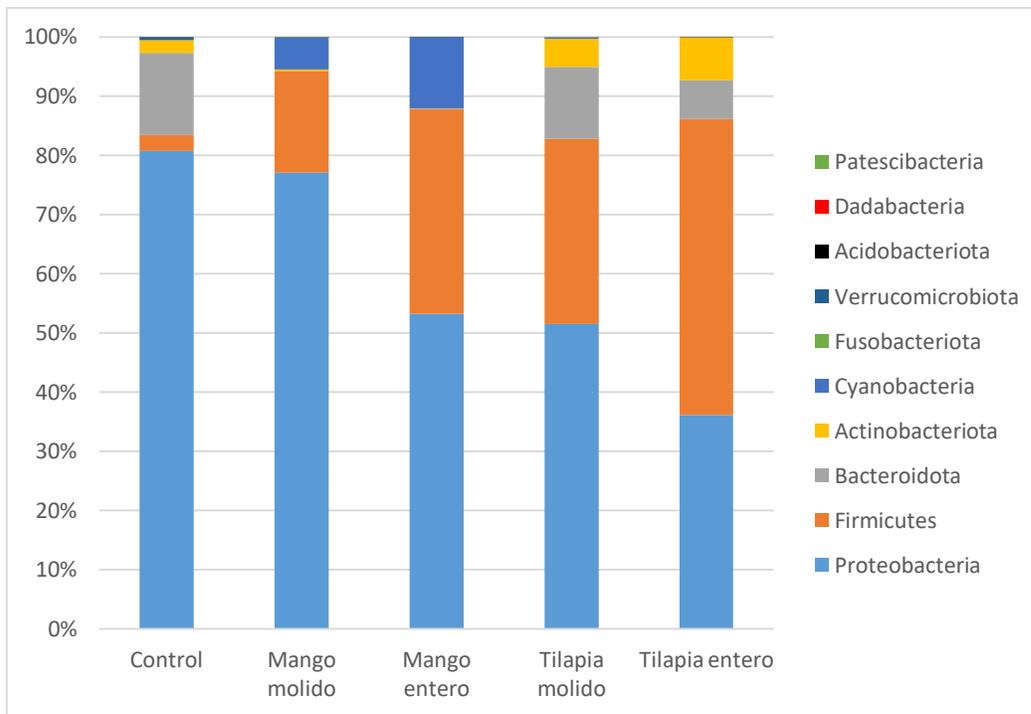


Figura 12. Abundancia relativa de los 10 phylums con mayor número de OTUs por tratamiento.

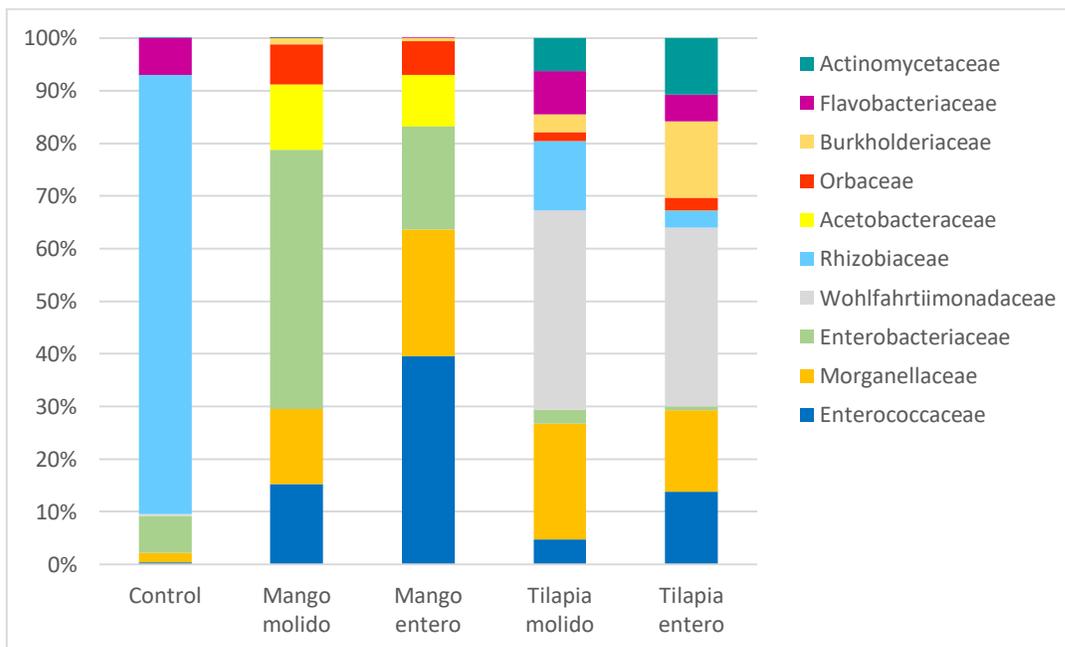
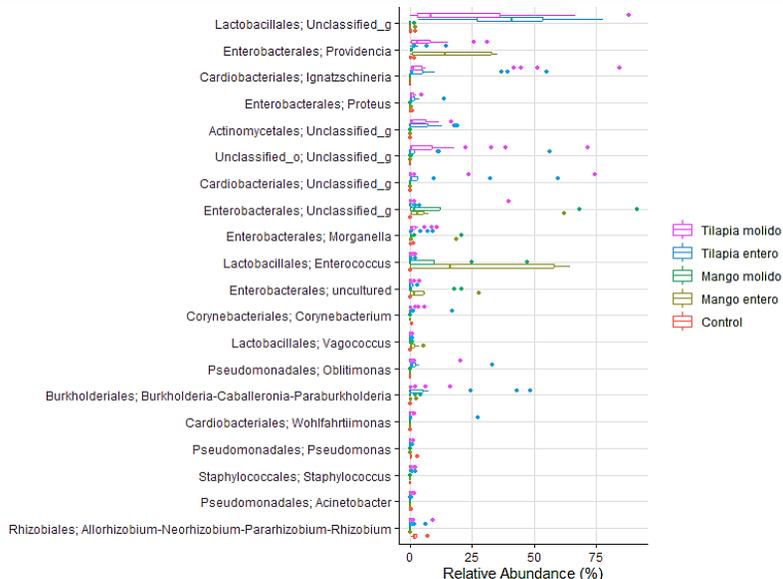


Figura 13. Abundancia relativa de las 10 familias con mayor número de OTUs por tratamiento

a)



b)

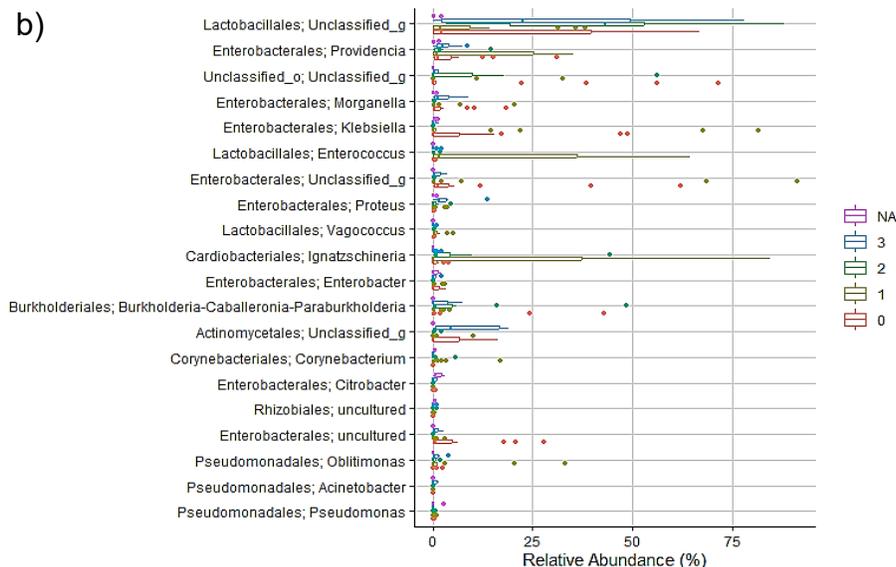


Figura 14. Presencia de los 20 OTUs más abundantes clasificados taxonómicamente a nivel de género, correspondientes a: a) dieta de las larvas; b) sucesión generacional. NA es la dieta control; 0 son los parentales; 1, 2 y 3 corresponde a la generación 1, 2 y 3 respectivamente.

En la Figura 14 se muestra por dieta y generación de larvas, los 20 OTUs asignados a género, con mayor abundancia relativa. Estas gráficas permiten visualizar fácilmente la distribución de los OTUs, agrupados por una variable particular. Se observa que, Lactobacillus (50 %) tiene una fuerte presencia en la dieta tilapia;

seguido tenemos *Providencia* (aproximadamente 30 %). Por su parte, *Enterococcus* (55 %) se encuentra más representativo en el intestino de las larvas alimentadas con mango entero. Paralelo a esto, en la Figura 14 b), condicionadas por la generación predominan en el intestino de las larvas parentales los Actinomiceliales en un 20 %, Lactobacillales con 35 % y Enterobacteriales como *Kleibsbella* con 10 %. En la generación 1 la presencia de los Actinomycetales se reduce y en cambio sobresale la abundancia relativa de los Cardiobacteriales con un 70 % y Lactobacillales como *Enterococcus* con 30 %. En la segunda Enterobacteriales como *Providencia* con 30 %. En la segunda y tercer generación que corresponden a la dieta de tilapia dominan los Lactobacillales (aproximadamente en un 50 %).

La abundancia relativa de los phyllums bacterianos descritos en este estudio fue similar a los reportados por otros autores (Yu *et al.*, 2023; Zheng *et al.*, 2014; Jeon *et al.*, 2011; Klammsteiner *et al.*, 2020; Gorrens *et al.* 2022), con la región V3-V4 del ARNr 16S. Dichos resultados, corresponden a la presencia de Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria siendo este último el más dominante en el intestino de las larvas de MSN. Sin embargo, Khamis *et al.* (2020), encontraron ciertas diferencias en la variabilidad genética y la diversidad microbiana entre poblaciones de MSN de diferentes ubicaciones geográficas del mundo, comparado con sus resultados, el presentado en este estudio fue similar a los maestreados en larvas de MSN provenientes de Costa Rica y Estado Unidos. De igual manera, refieren que, Enterobacteriaceae, Dysgonomonadaceae, Wohlfahrtiimonadaceae y Enterococcaceae, son las familias con mayor abundancia encontradas en la mayoría de las regiones geográficas. Lo cual coincide con los resultados de esta investigación, sin embargo, Dysgonomonadaceae no fue encontrada como una familia representativa de las larvas muestreadas en este estudio.

### **Impacto de los tratamientos sobre la diversidad del microbioma de la larva de MSN**

Para explorar el impacto de la dieta y las generaciones sobre las comunidades bacterianas se realizaron análisis de componentes principales (ACP por sus siglas

en inglés) y escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS, por sus siglas en inglés). Ambos estudios son empleados para representar la diversidad beta, y que representan gráficamente la dinámica de las comunidades microbianas afectadas por los tratamientos. Los ACP consisten en la proyección de los datos presentados en términos de mínimos cuadrados. Esta convierte un conjunto de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un conjunto de valores de variables sin correlación lineal llamadas componentes principales.

Con un ACP realizado para la variable de tamaño (Figura 15), descrita en la Tabla 4, se puede inferir que el tamaño corporal de las larvas no genera algún efecto determinante sobre la composición de los consorcios. Esto debido a que los conjuntos correspondientes a las tres variables de tamaño están sobrepuestas, es decir, hay una ausencia de conjuntos correlacionados al tamaño corporal. Esto sugiere, que el tamaño corporal en las larvas de MSN no tiene implicaciones relacionadas a la estructura de los consorcios microbioanos, sino a factores asociados a la constitución genética que repercuten en cuestiones enzimáticas u hormonales.

En la Figura 16 se pueden observar las tendencias de agrupamiento de los OTUs influenciados por el efecto de las dietas. En a) se distingue a los conjuntos de tilapia sobrepuestos siendo tilapia molida de mayor extensión, además, se mantienen distanciadas de los conjuntos respectivos de los tratamientos de mango, los cuales también se solapan siendo el mango entero de mayor dimensión. Por su parte, el control abarca un pequeño conjunto cercano a los grupos de tilapia. De esta manera, se observa claramente que cada dieta genera agrupaciones delimitadas y distanciadas por la composición nutricional. Esto nos indica que la dieta es un factor con un impacto relevante sobre la agrupación de comunidades bacterianas del intestino que parecen modularse debido a la composición de la dieta ofrecida a la larva.

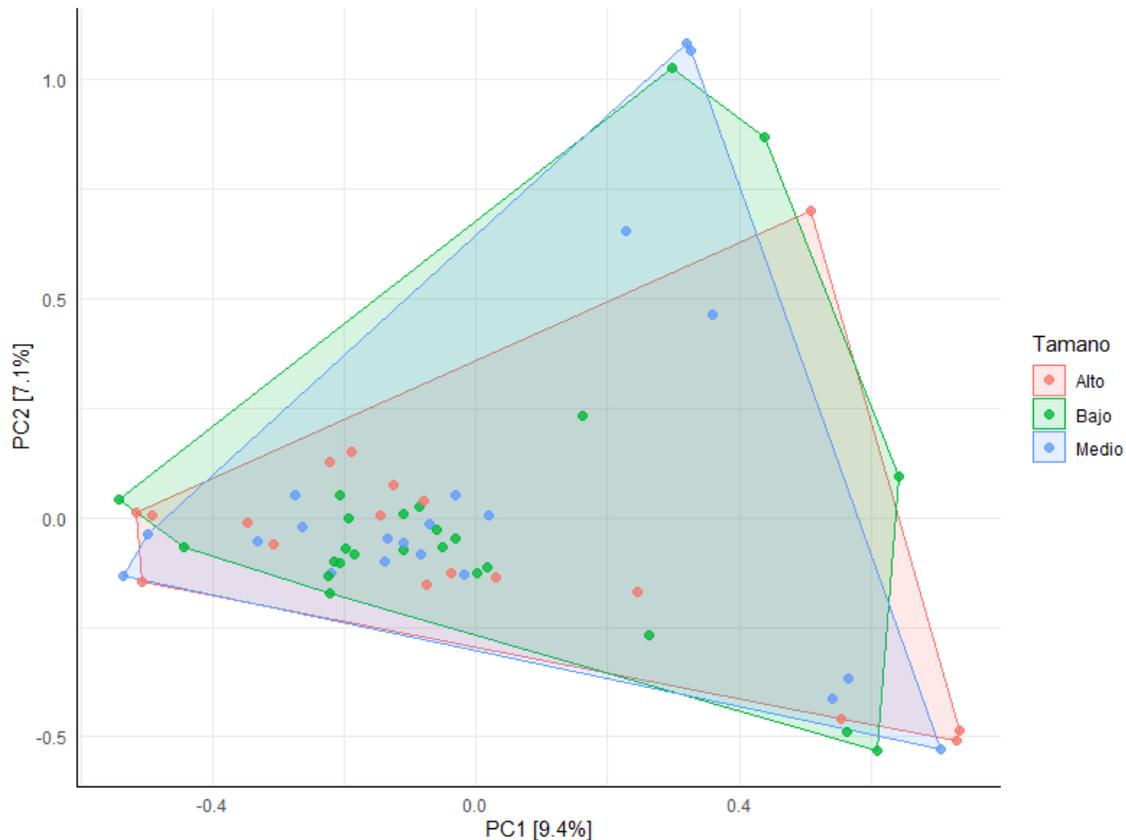
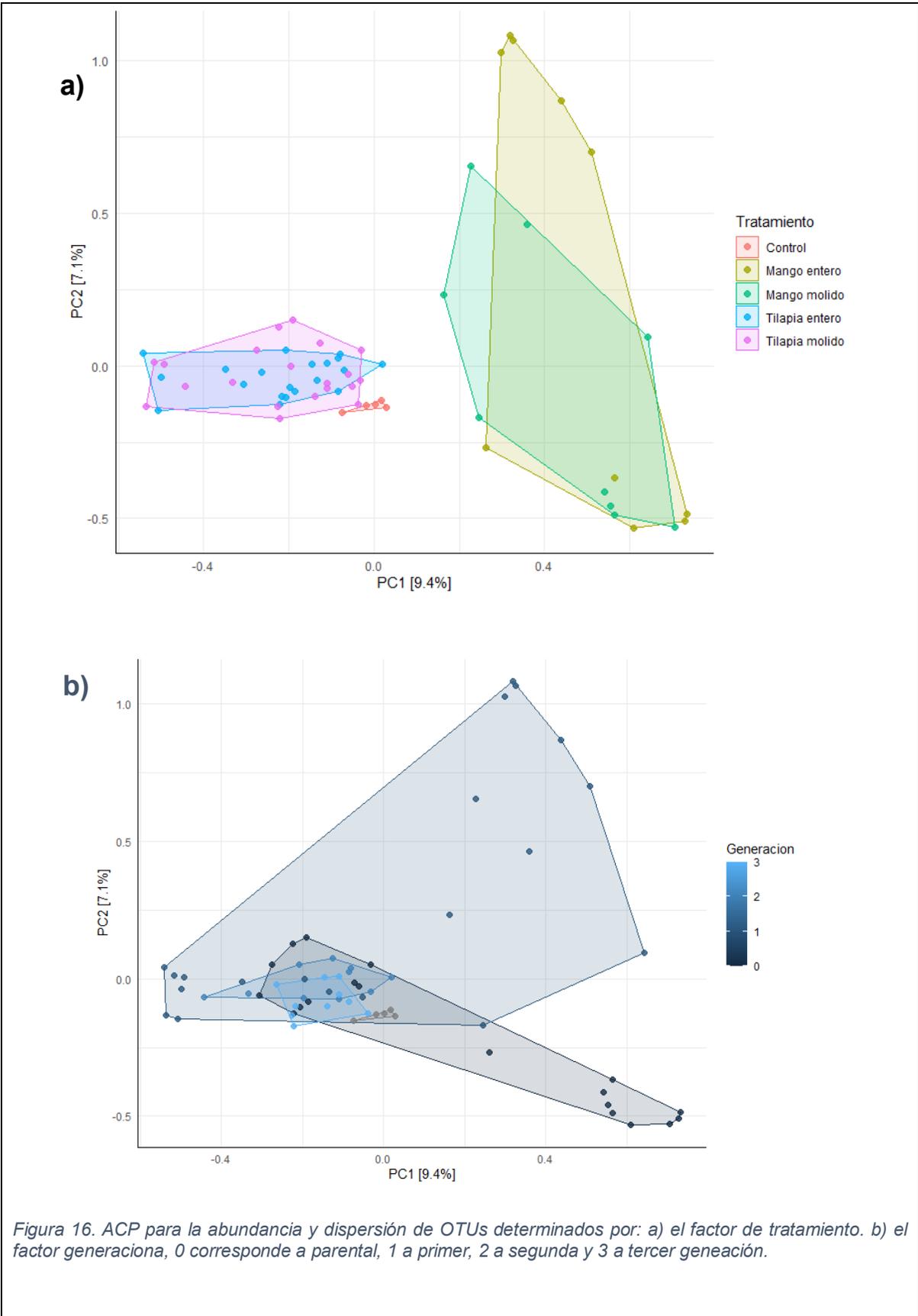


Figura 15. ACP de la composición de los consorcios bacterianos agrupados por la condición de tamaño.

En el ACP referente de la sucesión generaciones de larvas (Figura 16 b), se observa que, los 4 conjuntos se superponen cercanos al centro, siendo los parentales y la generación 1 el conjunto con mayor dimensión, mientras que la generación 2 y 3 es más compacta. Es importante recordar que las generaciones 2 y 3 corresponden únicamente a la dieta de tilapia, como se observa en la Figura 15 a), estos conjuntos corresponden a los OTUs correlacionados por la dieta de tilapia. Se corrobora esto, al apreciar que el conjunto de los parentales y generación 1 abarcan lo que sería el grupo de OTUs determinados por la dieta mango. Por lo que, se puede inferir que la sucesión generacional no parece tener efecto sobre la estructura de las comunidades. Lo anterior se puede corroborar en la Figura 14 b) y 18 b) ya que tampoco muestran un impacto evidente.



En un artículo Bahrndorff *et al.* (2016), argumentan que debido a que el microbioma intestinal de la MSN silvestre no ha sido estudiado aún, se limita la posibilidad de comparar poblaciones de laboratorio con poblaciones de moscas acostumbradas a una dieta inconstante a lo largo de numerosas generaciones. Larvas derivadas de una población de laboratorio y, por lo tanto, adaptadas a una dieta y condiciones estables, podría ser menos flexibles a la exposición de alimentos transitorios y la colonización de microorganismos diferentes que llegan a su intestino. Por lo que Klammsteiner *et al.* (2020), refieren que una observación de los efectos de la dieta durante un período de tiempo de múltiples generaciones de *H. illucens* podría ser necesario para ilustrar un conocimiento completo de la dinámica del microbioma intestinal. Reiterando la importancia del esfuerzo de exploración realizado en la investigación presente.

### **El impacto de la metamorfosis sobre el microbioma y su transmisión vertical**

En un estudio llevado a cabo por Looveren *et al.* (2024), inocularon los sustratos de cría de *H. illucens* con una cepa de *E. coli* resistente a la kanamicina, con el fin de elucidar la dinámica de la transmisión vertical del microbioma durante todo el ciclo de vida. Estos investigadores concluyen que, la transmisión vertical no fue perceptible ya que el conteo de esta cepa no fue persistente durante los estadios larvarios inclusive no tuvo ningún impacto sobre el microbioma y se mostró consistentemente por debajo del límite de detección de 1,0 log ufc / g para todas las muestras. Paralelamente a esto, reportan un desacoplamiento de la comunidad bacteriana entre las etapas larvarias y la etapa de mosca, siendo esta última poseedora de una significativa diversidad  $\alpha$ . Lo anterior se puede atribuir al proceso de metamorfosis que sufre *H. illucens*.

La metamorfosis de los insectos holometábolos se caracteriza por ser un proceso marcado por la remodelación del intestino impulsada por los diferentes requisitos digestivos entre la etapa larvaria y adulta. Consiste en un proceso complejo en el cual la acción de hormonas lipófilas juveniles y ecdisteroides, neuropéptidos, así como péptidos similares a la insulina (ILP) coordinan un re-estructuramiento

corporal mediante el equilibrio estrictamente regulado entre la muerte celular de los tejidos juveniles y la proliferación de los adultos mediante hidrólisis y fagocitosis (Lenaerts *et al.*, 2018). Lo cual en consecuencia conlleva un recambio de la comunidad microbiana intestinal concurrente con este proceso de remodelación (Bruno *et al.*, 2019; Manthey *et al.*, 2022). Una vez alcanzada la etapa adulta se produce un nuevo aumento de recuentos microbianos, debido a la remodelación de la microbiota intestinal. Esta recolonización de microorganismos sucede inmediatamente después de su emergencia como adultos, cuando comienzan a volar y tienen contacto con superficies, agua y las pupas restantes.

Al plantearse esto, los resultados mostrados en la presente tesis coinciden con el hecho de que la sucesión generacional no repercute como factor determinante para modelar el microbioma por bacterias transmitidas verticalmente. Puesto que, no se observó una correlación directa en la composición de las comunidades a lo largo de las generaciones (Figura 16 b). No obstante, el efecto de una dieta poco variada, como las aplicadas como tratamiento para esta tesis, durante generaciones pudiera generar consecuencias debido al déficit nutrimental, dado que *H. illucens* destaca por la cualidad de ser polífago, una dieta restringida posiblemente no satisface sus requerimientos nutricionales. Esto se puede apreciar en la disminución de la capacidad metabólica (ECD) en conjunto con la capacidad de aumentar de peso, asimismo (ver Tabla 2), el rezago durante los estadios del ciclo de vida (Figura 4). Es crucial un análisis que profundice en las alteraciones metabólicas o genéticas adquiridas por una dieta exclusiva a lo largo de las generaciones en *H. illucens*, lo cual ayudaría a corroborar dichas aseveraciones.

### **Microbioma núcleo**

Se representa gráficamente en un diagrama de Venn, Figura 17, los conjuntos que muestran la proporción de OTUs que en el 80 % de todas las muestras intestinales, se consideraron miembros exclusivos por el tipo de dieta, compartidos entre dietas y miembros núcleo. De esta manera, la dieta control cuenta con la mayor proporción

de familias exclusivas. Mientras que, el microbioma núcleo corresponde a una proporción reducida, similar al conjunto compartido entre el control y la dieta de mango. Con las Figuras 12, 13 y 14, se puede dilucidar a que familias corresponden: representantes en *Enterococcaceae*, dentro de *Morganellaceae* están los géneros *Morganella* y *Providencia*; y otras familias dentro de *Enterobacteriaceae*.

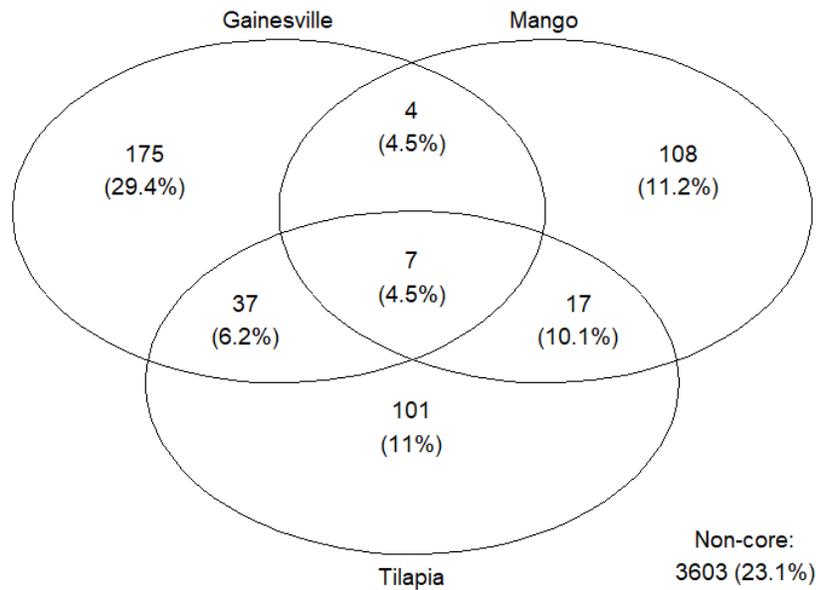


Figura 17. Conjuntos de OTUs compartidos entre dietas. El porcentaje se refiere a la proporción relativa, el número arriba del porcentaje corresponde a OTUs asignados al nivel de Familia. Non-core son los OTUs excluidos del análisis que no tenían presencia en un mínimo del 80 % de todas las muestras intestinales.

De Smet *et al.* (2018) y Wynants *et al.* (2019), basados en los OTUs reportados en el intestino de larvas de MSN expuestas a diferentes dietas en múltiples artículos, proponen que las larvas de *H. illucens* tienen establecido un microbioma bacteriano núcleo, aunque todavía se debate sobre una definición clara de este término en curso (Gorrens *et al.*, 2022). El cual aún se muestra susceptible a la colonización microbiana de su entorno, descrito como "house flora" (microbioma del hogar). Estos autores sugieren, que las larvas al estar expuestas a múltiples patógenos propios de la naturaleza de su nicho como degradadores de la materia orgánica, cuentan con un mecanismo de defensa inherente al microbioma intestinal que

permanece estable, lo cual que les permite tener una dieta flexible en diferentes ambientes.

En el presente estudio se identificaron ciertas familias de bacterias presentes en al menos un 80 % de las muestras: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Morganellaceae*, *Sphingobacteriaceae* y *Actinomycetaceae*. Las cuales componen lo que sería el microbioma núcleo maestreado en este experimento. Estos grupos de bacterias han sido reportadas en el intestino de insectos con diferentes roles y funciones metabólicas (Engel y Moran, 2013; Eke *et al.*, 2023).

Entre los géneros a menudo incluidos en el microbioma núcleo está *Morganella* y *Providencia*. Ambos géneros incluyen especies específicas, como *P. rettgeri* y *M. morganii*, que producen enzimas extracelulares con efecto bacteriolítico contra *E. coli* degradando compuestos de la pared celular bacteriana (Tegtmeier *et al.*, 2021).

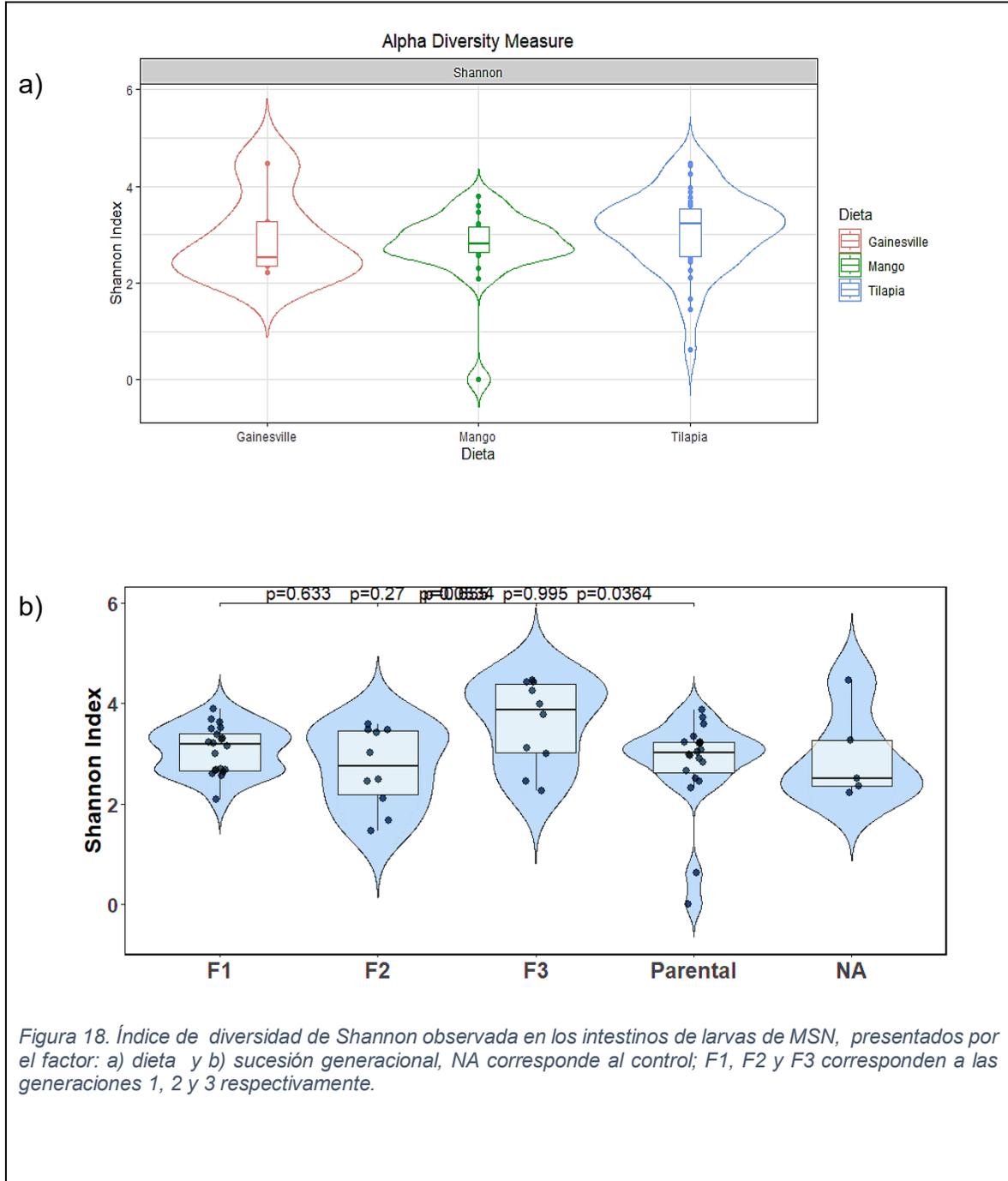
Se ha detectado a los *Actinomyces* sp. como microorganismos comensales capaces de romper las cadenas de lignina y quitina favoreciendo la digestión de residuos provenientes de la agroindustria. También, son capaces de producir un amplio repertorio de antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, lo cual puede representar un beneficio para las larvas (Barragan-Fonseca *et al.*, 2022).

En otros insectos, como *Galleria mellonella*, los *Enterococcus* se han identificado como parte del microbioma núcleo del estadio larvario, promoviendo la salud del intestino de su huésped al proveerle inmunidad relacionada a péptidos antimicrobianos (Krams *et al.*, 2017). Sin embargo, algunos miembros de *Enterococcus* son identificados como patógenos para el ser humano, como *E. faecalis* y *E. faecium* (Hanchi *et al.*, 2021), particularmente la dieta de tilapia presentó a las familias *Sphingomonadaceae* y *Wohlfahrtiimonadaceae*, que también contienen miembros patógenos. En base a este inconveniente, en particular, si el frass estuviera destinado a ser utilizado como fertilizante para plantas o mejorador del suelo, debe ser indispensable un tratamiento térmico como el compostaje asegurándose de alcanzar la temperatura de 55 a 65 °C durante tres días consecutivos como lo indica la norma mexicana NMX-AA-180-SCFI-2018.

Por otro lado, ciertos miembros de los géneros identificados en la comunidad bacteriana, como los miembros de los géneros *Bacillus*, algunos *Enterococcus* y *Lactobacillus*, así como la familia *Rhizobiaceae* con una alta presencia en el intestino de las larvas control, son reconocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, que contribuyen a mejorar la productividad de los cultivos, estimulando el crecimiento de las plantas y la supresión de patógenos (Barragan-Fonseca *et al.*, 2022; Green, 2023).

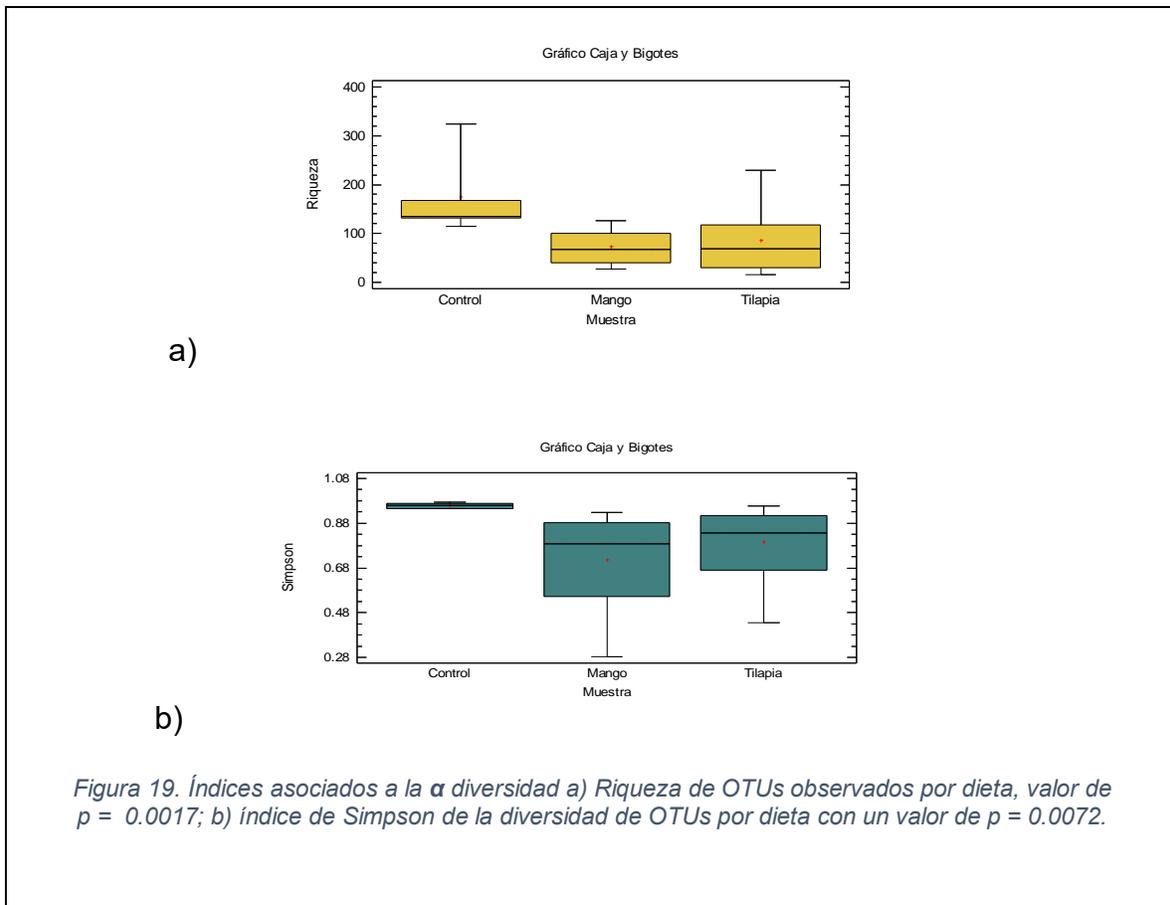
En cuanto a la exploración de la diversidad  $\alpha$ , en la Figura 18 a, en graficas de violín, se visualiza un impacto general de la dieta sobre las bacterias del intestino basado en el índice de diversidad de shannon ( $p < 0.05$ ). Se encontró que el índice fue menor en las larvas alimentadas con tilapia y mango, mientras que la dieta control, cuenta con una mayor diversidad  $\alpha$ . Paralelo a esto, en la Figura 18 b) se representa el índice de shannon correspondiente al factor de la sucesión generacional. El valor estadístico de  $p = 0.0364$  en la dieta control (marcado como NA en la gráfica), indica que fue la única muestra diferente. Por su parte, la composición de los parentales y el resto de las generaciones fueron estilísticamente similares ( $p < 0.05$ ).

Todos los tratamientos, incluyendo el control se caracterizaron por poseer una diversidad alfa relativamente baja (1.9 en mango, 2.3 tilapia y 3.8 control) y notoriamente dominante, ya que el índice de Simpson (0.77 mango, 0.77 tilapia y 0.95 en control) en todas las muestras fue cercano al valor de 1. Esto coincide con lo reportado por otros autores (Klammsteiner *et al.*, 2020; Gold *et al* 2020; Gorrens *et al.*, 2022). En el caso de las larvas alimentadas con mango la riqueza observada, y el valor del índice de Shannon fue bastante inferior, esto puede atribuirse al agotamiento de los nutrientes de la dieta, lo cual está relacionado con la producción de compuestos antimicrobianos por parte de las larvas en crecimiento que se encuentran bajo estrés (Yang *et al.*, 2021).



Otros estimadores de la diversidad  $\alpha$  son la riqueza observada y el índice de Simpson, representados en la Figura 19. Donde, el control muestra una mayor riqueza de OTUs observados (174.8), así como un índice de Simpson (0.95), más

cercano al valor de 1. Por otro lado, las muestras provenientes de los tratamientos con mango y tilapia tuvieron valores similares en ambos índices, una riqueza promedio menor (mango = 69, tilapia = 83), y un índice de Simpson (mango 0.71, = tilapia = 0.77), menor al control, sin embargo también cercano a 1. El índice de Simpson refiere que dentro de la riqueza de OTUs observados la probabilidad de que dos individuos, dentro de una muestra, seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. En resumen, existe una mayor dominancia, lo cual se puede corroborar en la Figura 12 y 13, donde se muestra, en el control una alta dominancia de la familia *Rhizobiaceae* perteneciente al phylum *Proteobacteria*. Similar a esto, en las dietas de mango y tilapia los phyllums *Proteobacteria* y *Firmicutes*, con las familias *Enterococcaceae*, *Morganellaceae* y *Enterobacteriaceae* presentan una alta dominancia en los intestinos de las larvas.



Para el análisis NMDS se empleó la distancia UniFrac (abreviatura de métrica de fracción única), este método incorpora información sobre la relativa relación de los miembros de la comunidad al incorporar distancias filogenéticas entre los organismos observados. Al ser unweighted (no ponderado), considera solo la información de presencia y ausencia de especies y cuenta la fracción de la longitud de la rama única para cada comunidad. La distancia entre puntos ilustra su similitud: cuanto menor es la distancia entre puntos, más similar es su comunidad bacteriana

En la Figura 20 se puede observar el análisis de NMDS, donde el conjunto determinado por la dieta control representa la comunidad inicial antes de ser sometida a los tratamientos de mango y tilapia. Al estar ubicadas cercanas al centro de la superposición (en color rojo) forman un punto de partida para el desarrollo divergente de las comunidades intestinales. La dieta control consta de una comunidad bien definida caracterizada por grupos dominantes, por su parte las dietas mango y tilapia muestran una amplia nube de conjuntos indicando que sus consorcios pudieran no estar definidos por un reducido número de familias dominantes.

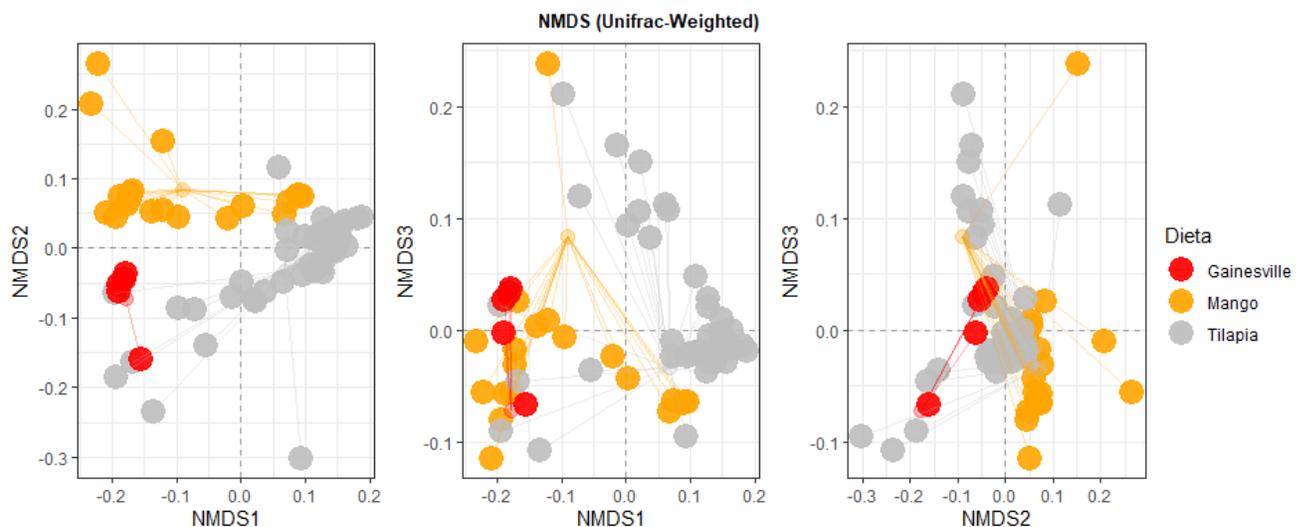


Figura. 20 Conjuntos de OTUs ordenados por NMDS por el método de unifrac correspondiente al efecto de la dieta.  $K=3$  nivel de entres = 0.62.

### Microorganismos específicos al tipo de dieta

En la Tabla 5, se muestra el porcentaje de phyllums con mayor dominancia por tratamiento, mientras que, en la Tabla 6 se muestran por familia. Los phyllums más abundantes son *Proteobacteria* en todos los tratamientos seguido por *Firmicutes* que en el control es muy reducido.

Tabla 5. Porcentaje de abundancia relativa de los 5 phyllums con mayor dominancia.

Phylum	Dieta				
	Control	Mango molido	Mango entero	Tilapia molido	Tilapia entero
Proteobacteria	80.77 %	77.06 %	53.23 %	51.47 %	36.14 %
Firmicutes	2.66 %	17.14 %	34.66 %	31.37 %	49.98 %
Bacteroidota	13.93 %	0.03 %	0.02 %	12.15 %	6.58 %
Actinobacteriota	2.12 %	0.27 %	0.01 %	4.69 %	7.19 %
Cyanobacteria	-	5.45 %	12.06 %	0.27 %	0.01 %

Porcentaje promediado de la abundancia de los OTUs en todas las muestras de cada tratamiento. n= 5.

En la dieta de mango se observaron 2 familias particulares *Orbaceae* y *Cyanobacteria*.

La familia *Orbaceae* se ha reportado ampliamente como un representante del microbioma núcleo de *Apis mellifera*, es una bacteria estrechamente correlacionada con la presencia de *Lactobacillaceae*. Brinda inmunidad a las abejas contribuyendo con la estimulación de la producción de péptidos antimicrobianos inhibitorios de *Enterobacteriaceae* (Kwong *et al.*, 2017). Es posible que la dieta de mango, alta en azúcares, haya favorecido la colonización y crecimiento de esta familia en el intestino de las larvas. Por su parte, Yu *et al.*, (2023), a partir de una predicción funcional del microbioma de MSN, encontraron que *Orbus* sp., perteneciente a la familia *Orbaceae*, está fuertemente correlacionado con el metabolismo de aminoácidos no proteicos y que es probable que estén involucrados en el metabolismo de los procesos de aminoácidos no proteicos con el anfitrión.

La presencia de Cyanobacterias es reportada por primera vez en el intestino de larvas de MSN como parte del microbioma adquirido por el ambiente y no inducido. Recientemente, se han descubierto Cyanobacterias no fotosintéticas como *Melainabacteria* en ambientes afóticos, es decir carentes de luz, como sedimentos lacustres e intestinos de diversos animales no acuáticos incluyendo el humano. Lo cual abre el paradigma de la redefinición de las Cyanobacterias y su relevancia ecológica, ya que se desconoce, hasta cierto punto la función que cumplen como simbioses.

En el 2018 Utama *et al.* rastrearon la presencia de *Melainabacteria* en el intestino de termitas. Al analizar el genoma de *Melainabacteria*, encontraron que Tpq-Mel-01 que codifica la mayoría de los genes implicados en las vías de glucólisis y gluconeogénesis, poseía vías fermentativas que posiblemente utilizaban azúcares y quitobiosas como fuentes de carbono y energía, mientras que no se encontraron vías para la fotosíntesis y la fijación del carbono. Sin embargo, no se ha comprobado su participación directa en la degradación de celulosa como mutualista con sus huéspedes, hasta ahora, solo se identifica su rol como comensalista en el intestino de las termitas. Lo cual sugiere, que la presencia de las Cyanobacterias en los intestinos de las larvas alimentadas con mango no implica una relación necesariamente mutualista, es probable que la composición del mango favoreció su colonización.

Tabla 6 Porcentaje de abundancia relativa de las 15 familias con mayor dominancia por tratamiento

Familia	Dieta				
	Contro I	Mango molido	Mango entero	Tilapia molido	Tilapia entero
Enterococcaceae	0.23 %	15.27 %	39.55 %	2.98 %	6.85 %
Morganellaceae	1.29 %	14.25 %	24.08 %	13.97 %	7.73 %
Enterobacteriaceae	4.69 %	49.18 %	19.59 %	1.70 %	0.33 %
Wohlfahrtiimonadaceae	0.25 %	-	-	23.98 %	16.95 %
Firmicutes-uncultured	0.38 %	0.03 %	0.0037 %	14.47 %	18.39 %

Firmicutes-Unclassified_f	0.01 %	-	-	3.30 %	25.40 %
Rhizobiaceae	56.1 %	0.03 %	0.01 %	8.33 %	1.60 %
Acetobacteraceae	-	12.48 %	9.76 %	-	0.01 %
Proteobacteria- Unclassified_f	22.5 %	-	0.01 %	5.50 %	0.87 %
Sphingobacteriaceae	9.76 %	0.01 %	0.0013 %	7.70 %	0.84 %
Orbaceae	0.01 %	7.57 %	6.40 %	1.11 %	1.19 %
Firmicutes-Unclassified_f	-	-	0.0013 %	5.66 %	4.74 %
Burkholderiaceae	0.01 %	1.17 %	0.59 %	2.11 %	7.26 %
Flavobacteriaceae	4.65 %	-	-	5.25 %	2.52 %
Actinomycetaceae	0.02 %	0.01 %	-	3.94 %	5.33 %

Porcentaje promediado de la abundancia de los OTUs en todas las muestras de cada tratamiento. n= 5. Los valores inferiores a 0.01 fueron omitidos.

Por otra parte, en el intestino de las larvas alimentadas con la dieta de tilapia, se encontró en abundancia a la familia *Wohlfahrtiimonadaceae*. Dentro de esta familia se encuentra el género la cual consiste en una sola especie, *W. chitinoclastica*. Esta especie está asociada a la infección zoonótica recientemente publicada como su primer caso de sepsis (Kopf *et al.*, 2024). La familia *Wohlfahrtiimonadaceae* ya se ha reportado en el microbioma de larvas de MSN alimentadas con residuos provenientes de peces (Khamis *et al.*, 2020), lo cual representa un riesgo tanto para el humano como para otras especies. Debido a esto, se sugiere un manejo cauteloso de *H. illucens* empleada para la bioconversión de estos residuos, y se sugiere que la biomasa larval sea empleada para la extracción de lípidos y no directamente como alimento.

Otra familia característica del tratamiento con tilapia fue *Ignatzschineriaceae* que por una parte comprende un repertorio de géneros con la capacidad de producir metabolitos secundarios promotores del crecimiento vegetal y antagonistas de fitopatógenos, pero por otra parte, se encontró una relación entre la presencia de

*Ignatzschineria* sp. en adultos de MSN y la reducción en la cantidad de huevos durante la ovoposición (De Smet *et al.*, 2018).

## Capítulo V

### Conclusión

Los resultados presentados indican que la dieta de tilapia favorece la ganancia de peso, sin embargo, con el avance de las generaciones se reduce esta capacidad metabólica, debido a que se fue reduciendo la ECB. Es necesario, un análisis a nivel genético que involucrara la sucesión de generaciones de larvas alimentadas con la misma dieta, ya que ayudaría a comprobar si efectivamente la dieta restringida ocasiona deficiencias que pudieran repercutir generacionalmente.

A diferencia de esto, la dieta Gainesville, similar en su composición al alimento comercial para gallinas (chickenfeed) ofrecida comúnmente en diversos artículos como control o dieta estándar; no genera deficiencias en las generaciones sucesivas, ya que cuenta con los requerimientos necesarios de micro y macro nutrientes para el ciclo de MSN (Klammsteiner *et al.*, 2020). Por ejemplo, en las larvas empleadas para esta investigación ya que provienen de un pie de cría mantenido exclusivamente con Gainesville desde el 2018, se caracterizan por ser una población estandarizada con valores continuos en su composición de lípidos y proteínas en su estadio larval, así como, la duración de cada estadio y la cantidad de gramos en la puesta de huevo.

Por otro lado, la dieta de mango no se recomienda como alimento exclusivo para larvas de MSN ya que no beneficia ningún aspecto de su desarrollo. Sería conveniente explorar la fracción de mango adecuada para ser adicionada al sustrato Gainesville que promueva el desarrollo de MSN.

También, se demostró que no existe diferencia significativa entre la dieta molida y entera sobre los parámetros de crecimiento y la diversidad o composición microbiana de las larvas. Lo que descarta que la consistencia de la dieta tenga algún impacto sobre el rendimiento productivo y desarrollo de la MSN.

Los datos presentados, indican que la dieta ofrecida a las larvas de MSN tiene un impacto directo sobre el microbioma. Debido a que, no solo puede modular la diversidad, también la interacción entre las comunidades microbianas simbióticas de las larvas. La composición nutricional de la dieta repercute en el desarrollo del crecimiento de la larva ya que afecta a su capacidad metabólica, tanto los nutrientes como por los recursos (prebióticos y microorganismos) que fomentan la colonización del intestino de las larvas, condicionando de esta manera la capacidad de las larvas para progresar en sus estadios larvarios y la etapa de reproducción teniendo un alto impacto sobre la metamorfosis y puesta de huevos.

El análisis metagenómico de la región V3 del ARN ribosomal 16S proveniente del intestino de las larvas muestreadas coincidió con el reportado por otros autores. Ya que, fueron identificados ciertos OTUs correspondientes a grupos taxonómicos propuestos como microbioma núcleo. Los cuales, corresponden a *Morganella*, *Providencia*, *Enterococcus*, *Bacillota* y *Pseudomonadota*. Ya que, a pesar de encontrarse en cantidades menores, estuvieron presentes en al menos 80 % de los individuos muestreados. Se propone que estas bacterias constituyen parte del sistema inmune de las larvas dentro del intestino, ya que estos grupos bacterianos están implicados en la producción de diversos péptidos antimicrobianos. Además, de promover la digestión de compuestos de origen vegetal secretando enzimas que rompen la hemicelulosa y lignina.

También, fueron encontradas algunas bacterias patógenas para el humano y animales, como *E. faecalis* y *E. faecium*, en particular presentes en la dieta de tilapia. Por lo que, se sugiere llevar a cabo un proceso de compostaje estricto al frass si este se piensa destinar como abono.

Conforme a los resultados de la sucesión de generaciones de MSN, se determinó que la transmisión vertical no supone un determinante en la estructura de los consorcios microbianos que pudieran heredar las generaciones de larvas de MSN. Al ser un insecto holometábolo sus etapas larvarias se enfocan al consumo de sustrato para su crecimiento, preparación de reservas y nutrientes para su correcta metamorfosis. Se ha observado en *D. melanogaster* que el microbioma presente en

el estadio de pupa se caracteriza por bacterias con actividad microbiana que les brinde cierta inmunidad contra patógenos que pudieran aprovecharse de su condición vulnerable, tales como hongos u otras bacterias (Lenaerts *et al.*, 2018). El proceso de metamorfosis altera la estructura del intestino y su revestimiento repercutiendo sobre la composición del microbioma adquirido durante la etapa larvaria, por lo cual ocurre una discontinuidad del microbioma entre larva y mosca. Las moscas hembra al ovopositar posiblemente inoculan ciertas bacterias sobre los huevos, sin embargo, al entrar en contacto con el sustrato de inoculación estos adquieren y modifican su microbioma para adaptarse a la composición del sustrato, sus requerimiento degradatorios y asimilativos para su digestión total o parcial.

Los objetivos propuestos en esta tesis fueron explorados y concretados. Se analizó cada resultado en base a dichos objetivos. La hipótesis planteada fue aceptada, se evidenció y sustentó conforme lo reportado por otros autores que la transmisión vertical del microbioma no es determinante, para la composición de los consorcios microbianos de las larvas de MSN. Sin embargo, la sucesión generacional de larvas alimentadas con dietas de composición restringida si genera un impacto en el desarrollo de los estadios, así como posibles deficiencias, las cuales se requiere profundizar a nivel genético si son heredables.

La información presentada en esta investigación aporta evidencia útil que apoya el esfuerzo científico para profundizar en el comprendimiento de *H. illucens* y su eficiente producción para el manejo de residuos, así como, el aprovechamiento de los productos derivados de esto. Permitiendo diseñar métodos y estrategias que integren la conclusión de esta investigación.

## **Bibliografía**

Alattar M.A., Alattar F.N., Popa R. 2016. Effects of microaerobic fermentation and black soldier fly larvae food scrap processing residues on the growth of corn plants (*Zea mays*) Plant Sci. Today. 3:57–62.

- Attia, Y. A., Bovera, F., Asiry, K. A., Alqurashi, S., Alrefaei, M. S. 2023. Fish and Black Soldier Fly Meals as Partial Replacements for Soybean Meal Can Affect Sustainability of Productive Performance, Blood Constituents, Gut Microbiota, and Nutrien
- Backer, R. Rokem, S. Ilangumaran, G. Lamon, J. Praslickova, D. Ricci, E. Subramanian, S. y Smith, D. 2018. Plant GrowthPromoting Rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1473
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55: 541-555.
- Banavar, A. Amirkolaei, S.K. Duscher, L. Khairunisa, B.H. Mukhopadhyay, B. Schwarz, M. Urick, S. Ovissipour, R. 2022.
- Barragan-Fonseca K. Nurfikari A. van de Zande E. Wantulla M. van Loon J. de Boer W. Dicke M. 2022. Insect frass and exuviae to promote plant growth and health. *Trends Plant Sci.* 2022;27:646–54.
- Basri NEA, Azman NA, Ahmad IK, Suja F, Jalil NA, Amrul NF. 2022. Potential Applications of Frass Derived from Black Soldier Fly Larvae Treatment of Food Waste: A Review. *Foods*;11(17):2664.
- Beesigamukama, B. Mochoge, N.K. Korir, K.K.M. Fiaboe, D. Nakimbugwe, F.M. Khamis, S. Subramanian, M.M. Wangu,
- Bonelli M, Bruno D, Brillì M, Gianfranceschi N, Tian L, Tettamanti G, Caccia S, Casartelli M. 2020. Black soldier fly larvae adapt to different food substrates through morphological and functional responses of the midgut. *Int. J. Mol. Sci.* 21:4955.
- Bonelli M. Bruno D. Caccia S. Sgambetterra G. Cappellozza S. Jucker C. Tettamanti G. Casartelli M. 2019. Structural and Functional Characterization of *Hermetia illucens* Larval Midgut. *Front Physiol.* 8;10:204.
- Bosch, G., Fels-Klerx, H., Rijk, T., Oonincx, D. 2017. Aflatoxin B1 Tolerance and Accumulation in Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Yellow Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Toxins*, 9(6), 185.
- Bruno D. Bonacci T. Reguzzoni M. Casartelli M. Grimaldi A. Tettamanti G. Brandmayr, P. 2020. An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Arthropod Structure & Development*, 58, 100969.
- Bruno, D., Bonelli, M., De Filippis, F., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Casartelli, M. 2019. The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e01864-18.
- Bulak P., Wiącek D., Bieganski A. 2020. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements-Implications for feed and food production. *Sci. Total Environ.* 723:138125.
- Chen, D. Hou, W. Pang, E.E. Nowar, J.K. Tomberlin, R. Hu, H. Chen, J. Xie, J. Zhang, Z. Yu, Q. Li. 2019. Effect of moisture content on greenhouse gas and NH<sub>3</sub> emissions from pig manure converted by black soldier fly. *Sci. Total Environ.*, 697 (2019), p. 133840,
- Chia S.Y., Tanga C.M., Osuga I.M., Cheseto X., Ekesi S., Dicke M., Van Loon J.J.A. 2020. Nutritional composition of Black Soldier Fly larvae feeding on agro-industrial by-products. *Entomol. Exp. Appl.* 2020;168:472–481.
- Chiam, Z., Lee, J. T. E., Tan, J. K. N., Song, S., Arora, S., Tong, Y. W., Tan, H. T. W. 2021. Evaluating the potential of okara-derived black soldier fly larval frass as a soil amendment. *Journal of Environmental Management*, 286, 112163.

- Chiam, Z., Lee, J. T. E., Tan, J. K. N., Song, S., Arora, S., Tong, Y. W., Tan, H. T. W. 2021. Evaluating the potential of okara-derived black soldier fly larval frass as a soil amendment. *Journal of Environmental Management*, 286, 112163.
- Comisión Europea. 2017. Reglamento (UE) 2017/893 que modifica los anexos I y IV del Reglamento (CE) n.o 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo y los anexos X, XIV y XV del Reglamento (UE) n.o 142/2011 de la Comisión por lo que se refiere a las disposiciones sobre proteína animal transformada. Consultado diciembre del 2023. Disponible en línea: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0893&from=RO>
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., Domínguez-Viveros, J. 2020. Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150–1173.
- De Filippis F, Bonelli M, Bruno D, Sequino G, Montali A, Reguzzoni M, Sequino. G. Montali, A. Reguzzoni, M. Pasoli, E. Savy, D. Cangemi, S. Cozzolino, V. Tettamanti, G. Ercolini, D. Casarteli, M. Caccia, S. 2023. Plastics shape the black soldier fly larvae gut microbiome and select for biodegrading functions. *Microbiome*. 2023;11:1–18.
- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., van Campenhout, L. 2018. Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9).
- Derrien, C. and Boccuni, A. 2018. Current Status of the Insect Producing Industry in Europe.. Eds., *Edible Insects in Sustainable Food Systems*, Springer Publishing, New York, 471-479.
- Diener S, Zurbrügg C, Tockner K. 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag Res*. 27(6):603-10
- Dortmans, B., Diener, S., Verstappen, B.M., Zurbrügg, C., 2017. Black Soldier Fly Biowaste Processing – A Step-by-Step Guide. In: Eawag (Ed.).
- Dubois, S. Ekesi, C.M. Tanga. 2021. Lo-cost technology for recycling agro-industrial waste into nutrient-rich organic fertilizer using black soldier fly *Waste Manage.*, 119 (2021), pp. 183-194,
- Dubreuil R. R. (2004). Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36 742–752. 10.1016
- Eke] M., Tougeron, K., Hamidovic, A. et al. Deciphering the functional diversity of the gut microbiota of the black soldier fly (*Hermetia illucens*): recent advances and future challenges. *anim microbiome* 5, 40
- Engel P., Moran N. A. 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37:699–735
- Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. 2015. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet.* 17;6:348.
- García-Sifuentes, Celia Olivia, Scheuren-Acevedo, Susana Maria, y Zamorano-Apodaca, Julio Cesar. 2020. Explorando diferentes subproductos considerados como residuos por la industria pesquera en México. *Biotechnia*, 22(2), 61-69.
- Gasco, L., Acuti, G., Bani, P., Dalle Zotte, A., Danieli, P. P., De Angelis, A., Roncarati, A. 2020. Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 360-372.
- Gebremikael, M. T., Wickeren, N., Hosseini, P. S., De Neve, S. 2022. The Impacts of Black Soldier Fly Frass on Nitrogen Availability, Microbial Activities, C Sequestration, and Plant Growth. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 6: 795950

- Gold M, von Allmen F, Zurbrügg C, Zhang J, Mathys A. 2020. Identification of bacteria in two food waste black soldier fly larvae rearing residues. *Front Microbiol.* 2020;11:1–19.
- Gold, F. Von Allmen, C. Zurbrügg, J. Zhang, A. Mathys. 2020. Identification of bacteria in two food waste black soldier fly larvae rearing residues. *Front. Microbiol.*, 11 (2020), p. 582867.
- Gorrens E. De Smet J. Vandeweyer D. Bossaert S. Crauwels S. Lievens B, Lievens B. Van Campenhout L. 2022. The bacterial communities of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) during consecutive, industrial rearing cycles. *J Insects as Food Feed.* 2022;8:1061–76
- Green T. A biochemical analysis of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larval frass plant growth promoting activity. *PLoS ONE.* 2023;18:1–11.
- Gupta, A. K., Nayduch, D., Verma, P., Shah, B., Ghate, H. V., Patole, M. S., et al. 2012. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 581–593.
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. 2018. The genus *Enterococcus* between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front Microbiol.* 2018;9:1–16.
- Hassan Babar, Siddiqui Junaid Ali, Xu Yijuan. 2020. Vertically Transmitted Gut Bacteria and Nutrition Influence the Immunity and Fitness of *Bactrocera dorsalis* Larvae. *Frontiers in Microbiology.* Vol 11.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. (B)* 270: 313-321.
- Hogsette JA. 1992. New diets for production of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in the laboratory. *J Econ Entomol.*
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Tappu, R. 2016. *MEGAN Community Edition* -
- INEGI, 2020. Comunicado De Prensa Núm. 310/22 De Junio De 2022. Pp: ¼. [https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP\\_MedAmb22.pdf](https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_MedAmb22.pdf)
- Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, 12(6), 1–12.
- Jeon H, Park S, Choi J, Jeong G, Lee S, Choi Y, Lee S. 2011. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Curr Microbiol.* 62(5):1390-9.
- Jiang CL, Jin WZ, Tao XH, Zhang Q, Zhu J, Feng SY, et al. Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) strengthen the metabolic function of food waste biodegradation by gut microbiome. *Microb Biotechnol.* 2019;12:528–43
- Jiang, C. L., Jin, W. Z., Tao, X. H., Zhang, Q., Zhu, J., Feng, S. Y. 2019. Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) strengthen the metabolic function of food waste biodegradation by gut microbiome. *Microb. Biotechnol.* 12, 528–543.
- Kawasaki, T. Kawasaki, H. Hirayasu, Y. Matsumoto, Y. Fujitani. 2020. Evaluation of fertilizer value of residues obtained after processing household organic waste with black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Sustainability*, 12 (2020), Pp. 4920.
- Khamis F. M, Ombura F. L., Akutse K. S, Subramanian S., Mohamed S. A., Fiaboe K. Saijuntha W, Van Loon J., Dicke M., Dubois T, Ekesi S. Tanga C. 2020. Insights in the Global Genetics and Gut Microbiome of Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*: Implications for Animal Feed Safety Control. *Front. Microbiol.* 11:1538.

- Kim, W. Bae, S. Park, K. Lee, S. Choi, Y. Han, S. Koh, Y. 2011. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Vol 14, (1), 11-14.
- Kim, W.T., Bae, S.W., Park, H.C., Park, K.H., Lee, S.B., Choi, Y.C., Han, S.M., Koh, Y.H. 2010. The larval age and mouth morphology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Int. J. Ind. Entomol.* 21, 185e187.
- Kinasih, I., Putra, R. E., Permana, A. D., Gusmara, F. F., Nurhadi, M. Y., Anitasari, R. A. 2018. Growth performance of
- Klammsteiner T., Turan V., Juárez M.F.-D., Oberegger S., Insam H. 2020. Suitability of Black Soldier Fly Frass as Soil Amendment and Implication for Organic Waste Hygienization. *Agronomy*. 10:1578.
- Koda, E., Miszkowska, A., Sieczka, A. 2017. Levels of Organic Pollution Indicators in Groundwater at the Old Landfill and Waste Management Site. *Applied Sciences*, 7(6), 638.
- Kopf A. Bunk B. Riedel T. Schröttner P. 2024. The zoonotic pathogen *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* – current findings from a clinical and genomic perspective. *BMC Microbiology* 24 (3) 2866.
- Kou Z. Lou X. Jiang Y. Chen B. Song Y. Wang Y. Xu J. Tomberlin K. Huang Y. 2023. Establishment of highly efficient transgenic system for black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Insect sci.* 30. (4). 888-900.
- Krams I. Kecko S. Jöers P. Trakimas G. Elferts D. Krams R. Luoto S. Rantala M. Inashkina I. Gudrā D. Fridmanis D. Contreras-Garduño J. Grantiņa-Ieviņa L. Krama T. 2017. Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. *J Exp Biol.* 2017;220:4204–12.
- Kwong W.K., Mancenido A.L., Moran N.A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci.* 2017;4:170003.
- Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing KW, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA. 2017. Dynamic microbiome evolution in social bees. *Sci Adv.* 29;3(3):e1600513
- Lalander, C., Diener, S., Magri, M. E., Zurbrügg, C., Lindström, A., Vinnerås, B. 2013. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) — From a hygiene aspect. *Science of The Total Environment*, 458-460, 312–318.
- Lalander, C., Diener, S., Zurbrügg, C., Vinnerås, B. 2019. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Cleaner Production*, 208, 211–219.
- Lauzon, S D McCombs, S E Potter, N C Peabody, 2009. Establishment and Vertical Passage of *Enterobacter* (*Pantoea*) Agglomerans and *Klebsiella pneumoniae* through All Life Stages of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), *Annals of the Entomological Society of America*, Voll 102, (1), 85–95.
- Lenaerts, C. Vanden B. Marchal, E. 2018. Puberty & Metamorphosis Related to Reproduction: Metamorphosis, *Insects*. *Encyclopedia of Reproduction*, 430–435
- Lievens, S., Poma, G., de Smet, J., van Campenhout, L., Covaci, A., van der Borght, M. 2021. Chemical safety of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*), knowledge gaps and recommendations for future research: a critical review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1–14
- Liu, C. Wang, C. Yao, H. 2019. Comprehensive Resource Utilization of Waste Using the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae). *Animals* 2019, 9, 349.

- Liu, M.K. Awasthi, S.K. Awasthi, Y. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang. 2020. Impact of the addition of black soldier fly larvae on humification and speciation of trace elements during manure composting. *Ind. Crop. Prod.*, 154, p. 112657,
- Looveren, V. IJdema, F. Heijden, N. Borght, N. Vandeweyer, D. 2024. Microbial dynamics and vertical transmission of *Escherichia coli* across consecutive life stages of the black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Animal Microbiome*. 6:29
- Lopes, I. G., Lalander, C., Vidotti, R. M., Vinnerås, B. 2020. Using *Hermetia illucens* larvae to process biowaste from aquaculture production. *Journal of Cleaner Production*, 251, 119753.
- Lopes, I. G., Yong, J. W., Lalander, C. 2022. Frass derived from black soldier fly larvae treatment of biodegradable wastes. A critical review and future perspectives. *Waste Management*, 142, 65–76.
- Lord WD, Goff ML, Adkins TR, Haskell NH. 1994. The black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) as a potential measure of human postmortem interval: observations and case histories. *J Forensic Sci* 39:215–222.
- Lu S, Taethaisong N, Meethip W, Surakhunthod J, Sinpru B, Sroichak T, Archa P, Thongpea S, Paengkoum S, Purba RAP, Paengkoum P. 2022. Nutritional Composition of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens* L.) and Its Potential Uses as Alternative Protein Sources in Animal Diets: A Review. *Insects*. 13(9):831
- Majumder, R., Sutcliffe, B., Taylor, P.W. 2019. Next-Generation Sequencing reveals relationship between the larval microbiome and food substrate in the polyphagous Queensland fruit fly. *Sci Rep* 9, 14292.
- Manthey C. Johnston P. Nakagawa S, Rolff J. 2022. Complete metamorphosis and microbiota turnover in insects. *Mol Ecol*. 2022;32:1–9
- Marzouk, S. 2016. Physiological, ethological and ecological features of *Hermetia illucens*, Chicago: University of Chicago Laboratory Schools. 10.7287/PEERJ.PREPRINTS.2436.
- McKenzie, F. C., Williams, J. 2015. Sustainable food production: constraints, challenges and choices by 2050. *Food Security*, 7(2), 221–233.
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217.
- Meneguz, M.; Schiavone, A.; Gai, F.; Dama, A.; Lussiana, C.; Renna, M.; Gasco, L. 2018. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric*. 98, 5776–5784.
- Menino, F. Felizes, M.A. Castelo-Branco, P. Fareleira, O. Moreira, R. Nunes, D. Murta 2021. Agricultural value of black soldier fly larvae frass as organic fertilizer on ryegrass. *Heliyon*, 7 (1), p. e05855
- Myers HM, Tomberlin JK, Lambert BD, Kattes D. 2008. Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure. *Environ Entomol*. 37(1):11-5
- Nation, J. L. 2022. *Insect Physiology and Biochemistry*, 4th Edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Navarro-Barrón E., Hernández C., Llera-Herrera R., García-Gasca A., y Gómez-Gil B. 2019. Overfeeding a High-Fat Diet Promotes Sex-Specific Alterations on the Gut Microbiota of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 2019 16:3, 268-279.
- NMX-AA-180-SCFI-2018. Métodos y procedimientos para el tratamiento aerobio de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y de manejo especial, así como la información comercial y de sus parámetros de calidad de los productos finales.

<https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/PPD1/NMX-AA-180-SCFI-2018.pdf>

- NMX-f-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Foods. Moisture in food products determination. Normas mexicanas. Dirección general de normas. NOM-086-ssa1-199.
- NMX-F-607-NORMEX-2013. Alimentos-Determinación de Cenizas en Alimentos-Método de prueba. Foods-Determination of Ash in Foods-Test Method.
- Oksanen, J. F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D. 2019. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5–6.
- Ondov, B. Bergman, N. Phillippy, A. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser: BMC Bioinformatics 12:3850.
- Parodi, I.M. De Boer, W.J. Gerrits, J.J. Van Loon, M.J. Heetkamp, J.V. Schelt, J.E. Bolhuis, H.H. Van Zanten. 2020. Bioconversion efficiencies, greenhouse gas and ammonia emissions during black soldier fly rearing - a mass balance approach. J. Clean. Prod., 27, Article 122488.
- Pimentel A. Montali A. Bruno D. Tettamanti G. 2017. Metabolic adjustment of the larval fat body in *Hermetia illucens* to dietary conditions. J. Asia Pac. Entomol. 20, 1307e1313.
- Quilliam R., Nuku-Adeku C., Maquart P.O., Little D., Newton R., Murray F. 2020. Integrating insect frass biofertilisers into sustainable peri-urban agro-food systems. J. Insects Food Feed. 6:315–322.
- Ravi H., Degrou A., Costil J., Trespeuch C., Chemat F., Vian M. 2020. Larvae Mediated Valorization of Industrial, Agriculture and Food Wastes: Biorefinery Concept through Bioconversion, Processes, Procedures, and Products. Processes. 2020;8:857.
- Rehman KU, Hollah C, Wiesotzki K, Rehman RU, Rehman AU, Zhang J, Zheng L, Nienaber T, Heinz V, Aganovic K. 2023. Black soldier fly, *Hermetia illucens* as a potential innovative and environmentally friendly tool for organic waste management: A mini-review. Waste Manag Res. 41(1):81-97.
- Rodicio M. R, Mendoza M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22: 238-245.
- Salomone R., Saija G., Mondello G., Giannetto A., Fasulo S., Savastano D. 2017. Environmental impact of food waste bioconversion by insects: Application of Life Cycle Assessment to process using *Hermetia illucens*. J. Clean. Prod;140:890–905.
- Scala A., Cammack J.A., Salvia R., Scieuzo C., Franco A., Bufo S.A., Tomberlin J.K., Falabella P. 2020. Rearing substrate impacts growth and macronutrient composition of *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) larvae produced at an industrial scale. Sci. Rep. 2020;10:19448
- Schmitt, E y W. de Vries. 2020. Potential benefits of using *Hermetia illucens* frass as a soil amendment on food production and for environmental impact reduction. Curr. Opin. Green Sustain. Sci., 25. p. 100335
- Seyedalmoosavi, M.M., Mielenz, M., Veldkamp, T. Das G. Metges C. 2022. Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. J Animal Sci Biotechnol 13, 31
- Sheppard D. Tomberlin J. Joyce J. Kiser B. Sumner S. 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). J Med Entomol. 39(4):695-8.

- Shumo, M., Osuga, I. M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. M., Subramanian, S., Ekesi, S., van Huis, A., Borgemeister, C. 2019. The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. *Scientific Reports*, 9(1).
- Singh A, y Kumari K. 2019. An inclusive approach for organic waste treatment and valorisation using Black Soldier Fly larvae: A review. *J Environ Manage.* 1;251:109569.
- Surendra K. Tomberlin J. Huis A. Cammack J. Heckmann L. Khanal S. 2020. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Management.* 117. 58-80.
- Surendra K. Tomberlin J.K., van Huis A., Cammack J.A., Heckmann L.H.L., Khanal S.K. 2020. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF) *Waste Manag.* 117:58–80.
- Tanga, C. Beesigamukama, D., Kassie, M., Egonyu, P.J. Ghemoh, C.J, Nkoba, K., Subramanian, S., Anyega, A.O., Ekesi, S. 2021. Performance of black soldier fly frass fertiliser on maize (*Zea mays* L.) growth, yield, nutritional quality, and economic returns. *Journal of Insects as Food and Feed*, 8 (2) 185 – 196.
- Tegtmeier D. Hurka S, Klüber P, Brinkrolf K, Heise P, Vilcinskas A. 2021. Cottonseed press cake as a potential diet for industrially farmed black soldier fly larvae triggers adaptations of their bacterial and fungal gut microbiota. *Front Microbiol.* 2021;12:1–16.
- Tomberlin J. Adler PH, Myers HM. 2009. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environ Entomol.* 38(3):930-4.
- Tomberlin, J. D Craig Sheppard, John A Joyce. 2002. Selected Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets, *Annals of the Entomological Society of America*, Vol. 95, (3), 1 May 2002, Pp 379–386
- Utami Y. Kuwahara H. Murakami T, Morikawa T, Sugaya K, Kihara K, Yuki M, Lo N, Deevong P, Hasin S, Boonriam W, Inoue T, Yamada A, Ohkuma M, Hongoh Y. 2018. Phylogenetic Diversity and Single-Cell Genome Analysis of "Melainabacteria", a Non-Photosynthetic Cyanobacterial Group, in the Termite Gut. *Microbes Environ.* Mar 29;33(1):50-57.
- Van Huis, A. 2020. Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1): 27-44.
- Wang Y. Shelomi M. 2017. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* 6:91
- Wynants E. Froninckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrock, C. 2019. Assessing the microbiota of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on organic waste streams on four different locations at laboratory and large scale. *Microb. Ecol.* 77, 913–930.
- Xia J. Ge C, Yao H. 2021. Antimicrobial Peptides from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Potential Antimicrobial Factors Representing an Alternative to Antibiotics in Livestock Farming. *Animals (Basel)*. 2021 Jun 29;11(7):1937.
- Yang F. Tomberlin, J. K., Jordan, H. R. 2021. Starvation alters gut microbiome in black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Front. Microbiol.* 12, 601253
- Yu Y. Zhang J. Zhu F. Fan M. Zheng J. Cai M. Zheng L. Huang F. Yu Z. Zhang J. 2023. Enhanced protein degradation by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its gut microbes. *Front. Microbiol.* 13:1095025
- Yu G. Cheng P. Chen, Y., Li, Y., Yang, Z., Chen, Y. 2011. Inoculating poultry manure with companion bacteria influences growth and development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environ. Entomol.* 40, 30–35.

- Zhang Q. Silvaraju S. Unadirekkul P. Lim N. Miu H. Puniamoorthy N. 2023. Laboratory-adapted and wild-type black soldier flies express differential plasticity in bioconversion and nutrition when reared on urban food waste streams. *J. Sci Food and Agri.* 114. (3) 1521-1530.
- Zhang J. Ling H. Jin H. Tomberlin J. Jianhong L. Chaoliang L. Ming S. Ziduo L. Ziniu Y. 2010. An Artificial Light Source Influences Mating and Oviposition of Black Soldier Flies, *Hermetia illucens*. *J. Insect Sci.* 10.202.: 1-7.
- Zheng L. Crippen T. Singh B. Tarone A. Dowd S. Yu Z. Wood T. Tomberlin J. 2013. A survey of bacterial diversity from successive life stages of black soldier fly (diptera: Stratiomyidae) by using 16S rDNA pyrosequencing. *J Med Entomol.* 2013;50:647–58.
- Zheng L. Crippen T. Holmes L. Singh B. Pimsler M. Benbow M. Tarone A. Dowd S. Yu Z. Vanlaerhoven S. Wood T. Tomberlin J. 2013. Bacteria mediate oviposition by the black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). *Sci Rep.* 3:2563.

## **Anexo**

Gráficas dinámicas de KronaTools generadas para cada muestra de intestino:

[https://drive.google.com/drive/folders/1b-02qdToDMbiCVgBNxBxNzyKvZCIKnj-  
?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1b-02qdToDMbiCVgBNxBxNzyKvZCIKnj-?usp=sharing)