



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**“APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL PROCESO DE
BIOCONVERSIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS CON LARVAS
DE *Hermetia illucens*, Y SU IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE HARINA
DE LARVA”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Magister en Biociencias Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento**

**Presentado por:
Martha Beatriz Sumba Zhongor**

Guayaquil – Ecuador, 2021

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi luz y fuente de vida.

A mis padres por todo su amor y apoyo incondicional.

A la ESPOL por la ayuda económica otorgada para el desarrollo de la maestría.

A mi tutor el Ph.D. Eduardo Álava y a mi cotutora la Ph.D. Johana Ortiz por su valiosa aportación en el desarrollo de este trabajo.

A la Ph.D. Daynet Sosa por haberme permitido realizar el estudio preliminar en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Al PhD. Luis Galarza y al MSc. Marcos Vera por su direccionamiento en esta parte del estudio.

Al Ph.D. Eduardo Chávez por haberme permitido realizar los análisis químicos en el Laboratorio de Suelos.

A mi tía Blanca por facilitarme el pie de cría para el establecimiento de la colonia.

A mi tía Rosa Elena, a mis hermanos y amigos que de alguna u otra forma me han apoyado y con quienes he compartido valiosos momentos.

DEDICATORIA

A mis amados padres quienes me han transferido el amor por la vida y el trabajo.

En honor a la abuela Eloísa, mujer valiente, humilde y generosa, que siempre llevaré en mi corazón.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Eduardo Álava Hidalgo, Ph.D.

DIRECTOR

Johana Ortiz Ulloa, Ph.D.

CODIRECTORA

Maria Isabel Jiménez, Ph.D.

VOCAL PRINCIPAL

Eduardo Chica Martínez, Ph.D.

VOCAL PRINCIPAL

Julia Nieto Wigby, Ph.D.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

Martha Beatriz Sumba Zhongor

RESUMEN

Hermetia illucens es un insecto de gran importancia en el manejo de residuos sólidos agroindustriales y producción de proteína para alimentación animal. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de la inoculación de *Trichoderma reesei* C2A, *Pleurotus* sp., *Bacillus subtilis* DSO3, *Pseudomonas* sp. y un probiótico comercial en la bioconversión de afrecho de cervecería (AC). Los experimentos se realizaron en 100 g de AC al 70% humedad inoculado con la suspensión microbiana (1×10^8 UFC/ml) o agua destilada (control). *T. reesei* C2A y *Pleurotus* sp. fueron inoculados 7 días antes de la siembra de larvas, mientras que *B. subtilis* DSO3 y el probiótico se agregaron el mismo día. En cada unidad experimental se sembraron 100 larvas de *H. illucens* con 6 días de edad. Al final del proceso se determinaron los parámetros de procesamiento y cuantificó el contenido de proteína de la harina de larva. Se determinaron también las características fisicoquímicas de los residuos del proceso. Con el pretratamiento de *T. reesei* C2A hubo mayor reducción del sustrato (46.3%), aunque el peso de la harina fue menor (1.79 g) que en el control C1 (3.04 g). El tratamiento con *Pleurotus* sp. fue suspendido debido a que el desarrollo larval fue limitado. La inoculación con *B. subtilis* DSO3 resultó en larvas con peso promedio (33.0 mg/ larva) mayor a las del control C2 (30.1 mg/larva), aunque el peso de la harina fueros similar en ambos. Finalmente, con el probiótico no se evidenciaron efectos significativos en la bioconversión de AC en biomasa larval, pero si se presentó mayor reducción de N total. En conclusión, los microorganismos evaluados en este estudio no mejoraron la bioconversión de AC en términos de producción de biomasa larval y proteína, pero si hubo efectos positivos en la reducción del sustrato y de su contenido de N. En futuros estudios se sugiere estudiar la aplicabilidad de *T. reesei* C2A y otras cepas como pretratamiento de residuos lignocelulósicos de bajo valor nutricional.

Palabras claves: Mosca soldado negra, proteína, afrecho de cervecería, *Trichoderma*

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	IV
DECLARACIÓN EXPRESA.....	V
RESUMEN	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS.....	IX
SIMBOLOGÍA	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
<i>1.1. Antecedentes y justificación.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Objetivo general.....</i>	<i>2</i>
<i>1.3. Objetivos específicos.....</i>	<i>2</i>
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	4
<i>2.1. Biología y ecología de Hermetia illucens.....</i>	<i>4</i>
<i>2.2. Condiciones de crianza de Hermetia illucens.....</i>	<i>5</i>
<i>2.3. Importancia económica de Hermetia illucens.....</i>	<i>6</i>
<i>2.4. Biomasa lignocelulósica.....</i>	<i>7</i>
<i>2.5. Afrecho de cervecería.....</i>	<i>8</i>
<i>2.6. Pretratamientos.....</i>	<i>8</i>
<i>2.7. Trichoderma sp.....</i>	<i>11</i>
<i>2.8. Bacillus subtilis.....</i>	<i>12</i>
<i>2.9. Pleurotus sp.....</i>	<i>13</i>
CAPITULO III. METODOLOGÍA	15
<i>3.1. Ensayos preliminares.....</i>	<i>15</i>

3.2.	<i>Producción de larvas de Hermetia illucens</i>	16
3.3.	<i>Preparación del sustrato</i>	17
3.4.	<i>Cultivo de microorganismos</i>	17
3.5.	<i>Diseño experimental</i>	19
3.6.	<i>Parámetros de procesamiento y desarrollo larval</i>	20
3.7.	<i>Perfil nutricional de la harina de larva</i>	21
3.8.	<i>Análisis del sustrato y los residuos</i>	21
3.9.	<i>Análisis estadístico</i>	21
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		23
4.1.	<i>Ensayos preliminares</i>	23
4.2.	<i>Desarrollo larval y Bioconversión del sustrato</i>	25
4.3.	<i>Composición nutricional de la harina de larva</i>	32
4.4.	<i>Propiedades químicas del sustrato y los residuos</i>	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		35
BIBLIOGRAFÍA		36
ANEXOS		50

ABREVIATURAS

pH	Potencial de hidrógeno
m	Metros
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros
mg	Miligramos
Kg	Kilogramos
ml	Mililitros
min	Minutos
h	Horas
d	Días
HR	Humedad relativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
AC	Afrecho de cervecería
td	Tiempo de desarrollo
BLC	Biomasa lignocelulósica
RS	Reducción del sustrato
PDA	Papa dextrosa agar
BCR	Bioconversión
PC	Proteína cruda

SIMBOLOGÍA

Ø	Diámetro
°C	Grados centígrados
>	Mayor que
<	Menor que
%	Porcentaje
UFC	Unidades formadoras de colonia
As	Arsénico
Cr	Cromo
Hg	Mercurio
Ni	Níquel
Pb	Plomo
Cd	Cadmio
C/ N	Relación Carbono: Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HNO ₃	Ácido nítrico
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	hidróxido de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
NH ₃	Amoniaco
Ca(OH) ₂	Hidróxido de calcio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PBS	Buffer fosfato salino

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>H. illucens</i> . Elaboración propia. Fuentes: Diener et al. (2015); Tomberlin et al. (2009).	5
Figura 2. Unidades experimentales establecidas en los ensayos preliminares.....	16
Figura 3. Vista externa e interna del moscario donde se mantuvo a la colonia de <i>H. illucens</i> para la producción de huevos. Sitio FCV- ESPOL.....	17
Figura 4. Crecimiento micelial y observaciones microscópicas de <i>T. reesei</i> C2A (a, b, c) y <i>Pleurotus</i> sp. (d, e, f) previo a la preparación de suspensiones microbianas.....	19
Figura 5. Larvas de seis días de edad empleadas en el experimento.	20
Figura 6. Efecto de la inclusión de larvas y esterilización del sustrato sobre la reducción del sustrato (RS, %). S: Sustrato no esterilizado, SE: Sustrato esterilizado, L: larvas. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas según prueba de Tukey ($P < 0.05$).	23
Figura 7. Crecimiento fúngico en sustrato no esterilizado.....	24
Figura 8. Tasa de crecimiento larval (TC), Eficiencia de la bioconversión (BCR) y reducción del sustrato (RS) del ensayo con hongos. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas para cada parámetro (Test de Tukey o *Dunn, $P < 0.05$).	29
Figura 9. Tasa de crecimiento larval (TC), Eficiencia de la bioconversión (BCR) y reducción del sustrato (RS) del ensayo con bacterias ($P > 0.05$).	31
Figura 10. Peso de la harina de larva y su contenido de proteína cruda (PC) obtenidos de los ensayos con (a) hongos y (b) bacterias $n=4$. $PC, \% = N \times 4.76$. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas según prueba de Tukey ($P < 0.05$).	33
Figura 11. Procesamiento de larvas postcosecha durante el estudio preliminar.	50
Figura 12. AC pretratado con <i>T. reesei</i> C2A antes (izquierda) y después del proceso de bioconversión (centro). Larvas obtenidas del tratamiento (derecha).	50
Figura 13. AC pretratado con <i>Pleurotus</i> sp. después del proceso de bioconversión (izquierda) y larvas obtenidas de ese tratamiento (derecha).	50
Figura 14. Muestras de harina de larva (izquierda) y AC (derecha) después de la molienda.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Resumen del peso larval (Pl) inicial y final, tasa de sobrevivencia, tiempo de desarrollo (td), y tasa de crecimiento larval de los ensayos preliminares (n=3, media \pm error estándar)* .	25
Tabla II. Resumen del peso larval inicial y final, tiempo de desarrollo (td), tasas de sobrevivencia y crecimiento larval (n=4, media \pm error estándar).....	31
Tabla III. Propiedades químicas del sustrato AC y los residuos del proceso de bioconversión (n=4, media \pm error estándar)*	34

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Antecedentes y justificación

El crecimiento poblacional está generando cambios importantes en la demanda de alimentos y en la generación de desechos. Según datos de la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura, para satisfacer la demanda de alimentos de una población creciente al 2050 tendremos que aumentar en un 58% la producción de carne (FAO, 2009). Para superar este desafío es necesario incrementar también la producción de materia prima que se emplea en la elaboración de piensos y balanceados. Tradicionalmente las fuentes proteicas más utilizadas en alimentación animal son la harina de soya y harina de pescado. Sin embargo, la alta dependencia de estas materias primas repercute en problemas ambientales como deforestación por expansión del área agrícola, alto consumo de recursos hídricos y sobreexplotación de recursos pesqueros (Sánchez-Muros et al., 2014; van Huis, 2013). Por los motivos expuestos es crucial mejorar la productividad agropecuaria utilizando estrategias de producción más eficientes y de menor impacto ambiental.

Una de las estrategias de mayor interés para la economía circular es la bioconversión con larvas de *Hermetia illucens*. Del proceso de bioconversión se obtiene el producto principal que es la biomasa larval (harina de larva) que posee alto contenido de proteína (37 - 63%) y grasa (7 - 39%) (K.B. Barragan-Fonseca et al., 2017). La harina de larva reducida en grasa (<15% de grasa) puede ser utilizada como sustituto parcial de la harina de soya y harina de pescado en dietas de aves (Cullere et al., 2016; Leiber et al., 2017) y peces (S. Li et al., 2017; Stamer et al., 2014) sin comprometer su desarrollo.

H. illucens es un insecto saprófago, en su hábitat natural se alimenta de materia orgánica en descomposición. Su capacidad para alimentarse sobre diferentes tipos de sustratos es favorecida por microorganismos del medio exterior que inician el proceso de descomposición, y por simbiosis del tracto gastrointestinal en donde se ha detectado una alta actividad de enzimas proteasas, amilasas y lipasas (Callegari et al., 2020; Gold et al., 2018; Zhineng et al., 2021). Sin embargo, una de las desventajas del insecto es que con ciertas biomasas lignocelulósicas el proceso de bioconversión es extenso y se obtiene una baja producción de biomasa larval. Por ejemplo, con pulpa de remolacha se obtuvo un rendimiento de 34 g/ kg en contraste con el uso de salvado de trigo con el cual se obtuvo 145 g/ kg de alimento (Karagodin et al., 2018). En otros casos se ha visto que la larva no puede consumir sustratos con alta presencia de fibra y bajo contenido de proteína como la panca de maíz a menos que haya recibido un tratamiento previo como se observó en el estudio de Gao et al. (2019).

El afrecho de cervecería (AC) es un tipo biomasa lignocelulósica que se genera en gran volumen durante la producción de cerveza. Anualmente se generan en el mundo cerca de 30 millones de toneladas de AC (Fărcaș et al., 2017), y alrededor de 120 mil toneladas en Ecuador (Jurado, 2017). Este subproducto tiene un alto contenido de proteína (24.8 - 26.3%), un bajo contenido de grasa (6.6 - 7.9%) y alrededor de un 17% de fibra (12 - 28% de lignina, 22.9% de celulosa, 26.2% hemicelulosa) (PRODAL S.A.; FEDNA, n.d.). Mediante observaciones propias se ha notado que la porción fibrosa de AC no es ingerida por larva. La hipótesis de esta trabajo se basa en que la eficiencia del proceso de bioconversión de AC mejora con la aplicación individual de *Bacillus subtilis* DSO3, *Pseudomonas* sp., *Pleurotus* sp., *Trichoderma reesei* C2A, y Oxynova ®.

Se eligió trabajar con *B. subtilis*, *T. reesei*, y *Pleurotus* sp. porque son reconocidos por su capacidad de producción de enzimas extracelulares que favorecen la descomposición de biomasa lignocelulósicas (Sarsaiya et al., 2019; Sindhu et al., 2016). *Pleurotus* spp. es también un grupo de hongos comestibles reconocidos por su nivel de producción de enzimas que degradan lignina (Salmones, 2018). Algunos estudios han demostrado que un pretratamiento con *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *B. subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* mejoran la bioconversión de sustratos como panca de maíz (Gao et al., 2019), cáscara de banano (Isibika et al., 2019), estiércol de pollo (Yu et al., 2011), y pulpa de coco (Wong, Ho, et al., 2020), respectivamente. En estos estudios se mostró que la aplicación de estos microorganismos podía incrementar la eficiencia en la degradación del sustrato, el desarrollo larval y/o el contenido de proteína de la biomasa larval.

En referencia al sustrato utilizado en este estudio. AC es un material generalmente empleado en alimentación animal (Mussatto, 2014), sin embargo una parte del volumen generado aún es dispuesto en vertederos por lo que representa una fuente de contaminación ambiental. Considerando la abundancia de esta biomasa lignocelulósica generada en grandes volúmenes por la agroindustria, el desarrollo de pretratamientos podría mejorar la eficiencia del proceso de bioconversión para su aprovechamiento a nivel local

1.2. Objetivo general

El objetivo principal de este estudio fue analizar los efectos de la inoculación de microorganismos exógenos sobre el sustrato de crianza de *Hermetia illucens*, mediante la comparación de parámetros productivos y de bioconversión para la obtención de harina de larva.

1.3. Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de los microorganismos y el tiempo de inoculación sobre la bioconversión del sustrato mediante el uso de parámetros de procesamiento.

- Comparar el perfil nutricional de la harina obtenida después del proceso de bioconversión con microorganismos aplicados en diferentes tiempos.
- Contrastar las propiedades químicas del subproducto de la bioconversión con las propiedades químicas del sustrato original.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Biología y ecología de *Hermetia illucens*

H. illucens o mosca soldado negra, es una especie de distribución mundial. En ambientes naturales sus larvas habitan en restos de carroña; mientras que en zonas antropogénicas suele encontrarse en pilas de compost o contenedores de basura (Diclaro & Kaufman, 2012).

El insecto es de metamorfosis holometábola (completa); su ciclo de vida consta de las fases de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1). La hembra adulta suele depositar los huevos en masa en sitios secos cerca de la fuente de alimentación (C. Sheppard et al., 1994). Se ha reportado que una masa de huevos puede contener entre 500 a 1000 huevos, estos son de forma ovalada y miden cerca de 900 µm de longitud (Diclaro & Kaufman, 2012; Kim et al., 2008). Cuando los huevos son frescos tienen color blanquecino, pero a medida que se desarrollan van tomando una coloración amarilla. Bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad ambiental el tiempo de eclosión puede tomar entre tres y cuatro días (Chia et al., 2018; Holmes et al., 2012). Una vez que las larvas nacen, estas se mueven en busca de alimento que puede ser materia orgánica de origen animal, vegetal o humano. Bajo condiciones ambientales óptimas el tiempo de desarrollo larval puede durar alrededor de 15 días, pero en condiciones menos favorables la fase larval puede extenderse hasta por 7 meses (Ooninx et al., 2015).

Las larvas de *H. illucens* pasan por seis instares larvales, en el último instar mejor conocido como prepupa, ésta se torna de color café oscuro. En este punto ella deja de alimentarse y si el sustrato está todavía húmedo sale en búsqueda de un sitio seco donde pupar. Después de unos 14 días de haber formado las pupas, el insecto adulto emerge, el apareamiento ocurre un día después de la emergencia de los adultos pero alcanza un pico máximo al tercer día, la oviposición por su parte empieza dos días después del apareamiento y alcanza un pico máximo al cuarto día (Kim et al., 2008; Jeffrey K. Tomberlin & Sheppard, 2002). Los imagos o adultos no necesitan alimentarse, pueden llegar a sobrevivir hasta por 17 días a 27 °C y con suministro de agua (Jeffery K. Tomberlin et al., 2009).

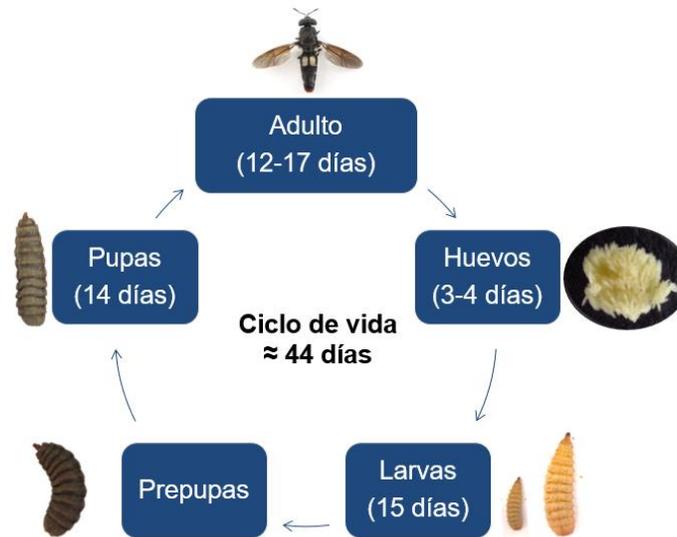


Figura 1. Ciclo biológico de *H. illucens*. Elaboración propia. Fuentes: Diener et al. (2015); Tomberlin et al. (2009).

2.2. Condiciones de crianza de *Hermetia illucens*

Varios son los factores que afectan el proceso de bioconversión con larvas de *H. illucens*. Considerando que la especie se alimenta solamente durante la fase larval, las condiciones de crianza deben ser en lo posible las óptimas a fin de que la producción comercial de proteína (harina de larva) sea económicamente viable y sustentable.

Factores como temperatura (Jeffery K. Tomberlin et al., 2009), humedad ambiental (Holmes et al., 2012), el contenido de humedad del sustrato (Cheng et al., 2017), la cantidad y calidad del sustrato (Karol B. Barragan-Fonseca et al., 2018) influyen directamente sobre el desarrollo larval y la eficiencia del proceso de bioconversión. Se ha determinado que las condiciones óptimas son: 26 - 30 °C, 60 - 70% de HR, y 52 - 7 % de humedad del sustrato (K.B. Barragan-Fonseca et al., 2017; Chia et al., 2018).

En cuanto a la cantidad y calidad de sustrato estos no solo influyen en el desarrollo larval sino también en su perfil nutricional de la harina (K.B. Barragan-Fonseca et al., 2017; Lalander et al., 2019). Por tanto, se considera que la formulación del sustrato debe elaborarse con residuos o subproductos agroindustriales de alta disponibilidad local y bajo costo que aporten al valor nutricional de la harina de larva. Adicionalmente, el uso de una dieta estándar durante los primeros cinco días de vida también es importante porque promueve una mayor tasa de sobrevivencia (Bosch et al., 2019) y probablemente un menor tiempo de desarrollo. En este aspecto, en el estudio de Oonincx et al. (2015) se observó

que el periodo larval llegaba a extenderse hasta 214 cuando recibían estiércol bovino en comparación con la dieta estándar (alimento para pollos). Esto se debió probablemente porque en el estudio las larvas neonatas fueron usadas directamente en los experimentos y/o porque las dietas de prueba fueron previamente sometidas a calor, lo que habría afectado las propiedades del sustrato (Ooninx et al., 2015). Por el contrario, en el estudio de Myers et al. (2008) el tiempo de desarrollo larval máximo fue de 30 días al usar el mismo tipo de dieta que en el trabajo de Ooninx et al. (2015). Por lo general las dietas estándar más usadas son la “Dieta Gainsville” compuesta por salvado de trigo (50%), harina de alfalfa (30%) y harina de maíz (20%) (Cammack & Tomberlin, 2017; Hogsette, 1992) y alimento para pollos (Dortmans et al., 2017).

Otra variable por considerar en este tipo de cultivo es la relación C/N. Aunque esta variable generalmente no es considerada en los estudios, es importante considerarla cuando se usa sustratos con alto contenido de fibra. En varios estudios se ha visto que un alto contenido de fibra limita el crecimiento y desarrollo de las larvas de *H. illucens*. Se ha observado que una reducción de la relación C/N de 49:1 a 32:1 bajo una temperatura constante de 28 °C mejora considerablemente el peso de larva a cosecha (5.4 a 9.7 mg/larva en base seca) al usar cáscaras de almendra como sustrato (Palma et al., 2019).

Otros factores como la densidad larval y la tasa de alimentación también influyen en el desarrollo larval. En un sistema de crianza de *H. illucens* la elección de ambos parámetros debe realizarse de forma conjunta. En el estudio de Parra Paz et al. (2015), se demostró que para un sustrato a base de frutas y vegetales la densidad de siembra puede elegirse entre 1.2 y 5 larvas/ cm² y la tasa de alimentación debe elegirse entre 95 y 163 mg/larva/día. Si el sustrato es balanceado como el alimento para pollos la tasa óptima de alimentación es de 100 mg/ larva/ día a una densidad de siembra de 2 larvas/ cm² (Stefan Diener et al., 2009). En el caso de sustratos altamente fibrosos la tasa de alimentación puede incrementarse para compensar el bajo valor nutricional del sustrato. En el estudio de Manurung et al. (2016) se mostró que una tasa de 200 mg de panca de arroz molido/larva/día permite una mayor producción de harina porque el peso larval y la sobrevivencia incrementan al duplicar la cantidad de sustrato.

2.3. Importancia económica de *Hermetia illucens*

H. illucens es una fuente alternativa de proteína que se produce a nivel industrial para la alimentación de animales destinados al consumo humano. Actualmente es cultivada con fines comerciales en Estados Unidos, Costa Rica, Sudáfrica y varios países europeos (Hauser, 2015).

El interés por este insecto radica principalmente en su perfil nutricional y en su hábito de alimentación. El contenido y la calidad proteica de la harina de larva (37 - 63% en base

seca) es semejante a la harina de soya (K.B. Barragan-Fonseca et al., 2017; Caligiani et al., 2018). Durante la fase larval es capaz de desarrollarse sobre una gran variedad de residuos orgánicos de origen vegetal y animal (Dobermann et al., 2019; Julita et al., 2018; Nguyen et al., 2015; Oonincx et al., 2015). Adicionalmente, del proceso de bioconversión se puede obtener otros productos como proteína, grasa, quitina y fertilizante (Müller et al., 2017; Putra et al., 2017; Setti et al., 2019). Mediante la extracción mayoritaria de la grasa es posible mejorar las propiedades y valor comercial de la harina de larva. De esta forma puede usarse como sustituto parcial de la harina de soya y harina de pescado en dietas de aves (Cullere et al., 2016; Leiber et al., 2017) y peces (S. Li et al., 2017; Stamer et al., 2014) sin afectar su desarrollo. El aceite de larva tiene potencial aplicación como biodiesel (W. Li et al., 2015), o como suplemento en la dieta de animales con efectos benéficos en el sistema inmune (Kumar et al., 2021). El estiércol de larva tiene uso potencial como fertilizante (Setti et al., 2019) y como suplemento alimenticio para peces (Yildirim-Aksoy et al., 2020). Una característica importante de *H. illucens* es su capacidad para reducir la carga microbiana de ciertos microorganismos patógenos (Awasthi et al., 2020) y la no acumulación de micotoxinas, metales pesados como As, Cr, Hg, Ni, y otros contaminantes específicos (Lalander et al., 2019; Purschke et al., 2017; Shumo et al., 2019). Cabe mencionar que la especie si acumula los metales Cd y Pb (Purschke et al., 2017; van der Fels-Klerx et al., 2016).

2.4. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica (BLC) es el recurso renovable más abundante en la naturaleza. El término hace referencia a la biomasa procedente de plantas, árboles, subproductos y residuos procedentes de la agroindustria. Si consideramos solo este último tipo de BLC hay una disponibilidad aproximada de 300 millones de toneladas a nivel mundial (Singhvi & Gokhale, 2019).

Las BLC's son de estructura celular y composición heterogénea. Sus paredes celulares están constituidas principalmente por celulosa (40 - 60%), hemicelulosa (20 - 40%) y lignina (10 - 24%) (Putro et al., 2016). Estos tres componentes de la pared celular están organizados en una red de microfibrillas donde la celulosa está protegida por la hemicelulosa y lignina (Sanderson, 2011). La celulosa es un homopolisacárido, un polímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas por enlaces β -(1,4)-glucosídicos; por su parte las hemicelulosas son heteropolisacáridos, polímeros ramificados compuestos por diferentes azúcares; y la lignina es un polímero complejo de composición variada y estructura amorfa basada en unidades fenilpropanoides (Anwar et al., 2014; Chávez-Sifontes & Domine, 2013; Sanderson, 2011).

2.5. Afrecho de cervecería

El afrecho de cervecería (AC) es un subproducto abundante a nivel mundial. Esto se debe a que la cerveza es una bebida de alto consumo y porque AC representa el 85% de todos los subproductos que genera la industria. Se estima que por cada hectolitro de cerveza elaborado se generan alrededor de 20 kg de AC (Jurado, 2017), por lo que Ecuador y el mundo generan alrededor de 120 mil y 30 millones de toneladas anuales de este material (Fărcaș et al., 2017), respectivamente.

AC es un subproducto de composición nutricional variable. Esto se debe a que en la producción de cerveza no solo se utiliza cebada como fuente de azúcares sino que en dependencia del tipo de cerveza a producir se pueden agregar al malteado otros cereales como arroz, maíz, avena, sorgo o centeno (Mussatto, 2014). Tanto la variación en la calidad de estas materias primas adjuntas, así como las condiciones de trabajo que se manejen durante las fases de malteado y maceración provocan variaciones en el valor nutricional de AC. Los componentes principales de este subproducto son agua (75 - 80%), proteína (20 - 30%), fibra (30 - 70%), lípidos (3.9 - 10%), y cenizas (2.5 - 4.5%), también contiene vitaminas, aminoácidos libres y compuestos fenólicos (Rachwał et al., 2020; Thiago et al., 2014). La fibra puede contener diferentes proporciones de celulosa (12 - 25%), hemicelulosa (28%) y lignina (12 - 28%) (Rachwał et al., 2020).

2.6. Pretratamientos

Varias BLC's resultan de interés para la obtención de bioproductos por su alta disponibilidad a nivel local. No obstante, una limitante en su aprovechamiento radica en su recalcitrancia. Dada la complejidad estructural y la naturaleza química de las BLC's, estas requieren de un pretratamiento que permita desenvolver o romper las microfibrillas de celulosa (Gupta et al., 2016; Jaramillo & Sanchez, 2018). Los pretratamientos existentes son de tipo físico (métodos mecánicos y térmicos), químico y biológico, la elección de cada uno o su combinación se realiza en base a las propiedades de la biomasa y del tipo de producto que se desea obtener.

En los pretratamientos químicos generalmente se utilizan compuestos altamente corrosivos. La biomasa es tratada con agentes ácidos (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HCl), alcalinos ($NaOH$, KOH , NH_3 , $Ca(OH)_2$) u oxidantes (H_2O_2), lo que permite romper los enlaces lignina-carbohidrato, descomponer la matriz cristalina de celulosa, o solubilizar la lignina y hemicelulosa (Paudel et al., 2017). De los compuestos mencionados anteriormente el $NaOH$, NH_3 y la Urea han sido generalmente utilizados en el pretratamiento de residuos agrícolas destinados a la alimentación de rumiantes (Castellanos et al., 2017; Hogsette, 1992; Sousa et al., 2019). Los efectos benéficos del pretratamiento se dan principalmente a nivel nutricional mediante el incremento de la

proteína y la digestibilidad de la BLC. Se ha demostrado por ejemplo que la amonificación de rastrojo de maíz con urea al 2% puede duplicar el contenido de PC en el sustrato pretratado (Sousa et al., 2019).

La aplicación de un pretratamiento químico combinando agentes alcalinos y oxidantes ha mostrado mejoras en la bioconversión con *H. illucens*. En el estudio de C. Liu et al. (2021) se observó que la aplicación de un pretratamiento con NaOH seguido de H₂O₂ al 30% provoca cambios favorables en la estructura y el valor nutricional de la panca de arroz. Adicionalmente, se reportó por primera vez que los efectos derivados del uso de la panca pretratada con estos compuestos químicos trascienden a nivel de la microbiota intestinal *H. illucens*. En el estudio se evidenciaron cambios en el perfil microbiano y en las funciones metabólicas asociadas a las bacterias simbiotas (C. Liu et al., 2021). A raíz de estos cambios se produjo incrementos en el peso larval y mejoras en la eficiencia de la bioconversión respecto al uso de sustrato no pretratado.

Los pretratamientos físicos consisten en someter a las biomásas a procesos de reducción de tamaño (molienda, trituración o picado), explosión con vapor, radiación o aplicación de agua caliente presurizada. La aplicación de estos métodos incrementa la permeabilidad de la biomasa mediante la expansión del área superficial accesible (Zoghلامي & Paës, 2019). En este sentido, los pretratamientos mecánicos son altamente recomendables en cultivos comerciales de *H. illucens*. De esta forma se asegura que la distribución del alimento sea homogénea y los nutrientes estén más accesibles tanto para las larvas como para los microorganismos simbiotas (Dortmans et al., 2017).

Los pretratamientos biológicos se basan en el uso de microorganismos capaces de producir enzimas hidrolíticas. Varias especies de bacterias y hongos han demostrado capacidad de degradar BLC's. Algunas especies como por ejemplo *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Humicola insolens* incluso son cultivados a nivel comercial para la producción de estas enzimas (Ovando-Chacón & Waliszewski, 2005; Sindhu et al., 2016). Otros hongos de tipo Basidiomicetes son de interés para el aprovechamiento de biomásas fibrosas porque producen enzimas ligninolíticas extracelulares (Cianchetta et al., 2014; Millati et al., 2011). Estas enzimas son las que permiten a estos hongos proliferar sobre madera ocasionando una pudrición blanca.

Durante la última década se ha empezado a desarrollar diferentes pretratamientos con el objetivo de mejorar la digestibilidad y bioconversión de varios BLC's. En este aspecto se han evaluado principalmente pretratamientos biológicos utilizando cepas bacterianas procedentes del microbioma de la larva, y otras cepas bacterianas y fúngicas que generalmente han sido reconocidas por su actividad enzimática. La aplicación de ciertos hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* ha permitido mejoras en el crecimiento larval y el perfil nutricional de la harina de *H. illucens*. En el estudio realizado por Gao et

al. (2019), se halló que el uso de panca de maíz fermentada (24 h) con dicho hongo permitía obtener harina de larva con 41.8% de proteína y 48.4% de reducción del sustrato. Estos resultados fueron hallados después de que los autores evaluaran cuatro tiempos de fermentación (24, 48, 732 y 96 h), cuatro microorganismos (*A. oryzae*, *Bacillus licheniformis*, *T. viride*, y *T. reesei*) y cuatro concentraciones del inoculo (1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000) (p/p) en la fermentación de rastrojos de maíz, arroz, y trigo.

La combinación adecuada de diferentes tipos de pretratamientos también ha mostrado mejoras en la eficiencia de la bioconversión. En el estudio realizado por Isibika et al. (2019) se halló que la aplicación de amoníaco (0.8% N) seguido de siete días de fermentación con *T. reesei*, *Rhizopus oligosporus* o con un complejo microbiano mejora la bioconversión de sustrato a base de cáscara de banano triturado. Con estos microorganismos los autores hallaron incrementos de 39 a 72% en el peso larval en comparación con el uso de sustrato no pretratado (Isibika et al., 2019). El mejor desempeño larval y la eficiencia más alta de la bioconversión fueron obtenidos con la fermentación (*R. oligosporus*, 14 días) y también con la combinación de amonificación (7 d) seguido de un periodo de fermentación con *R. oligosporus* por 7 d. Estos resultados fueron hallados después de varios experimentos en donde se aplicaron de forma individual y combinada pretratamientos de tipo físico, químico y biológico. Los efectos positivos estarían asociados a una mejora en la digestibilidad de los nutrientes.

La fermentación de sustrato llevada a cabo por complejos microbianos puede favorecer la ganancia de peso y modificar la población de posibles agentes patógenos. En el estudio de Wong, Lim, et al. (2020) se registraron incrementos en el peso larval de casi 300 mg cuando se usaron residuos de pulpa de coco fermentado por 14 días RID-X® al 0.5%. Este producto comercial es un consorcio de enzimas (celulasas, lipasas, proteasas y amilasas) y bacterias (no especificadas) que se comercializa para el tratamiento de fosas sépticas. En el estudio evaluaron cuatro concentraciones (0.02, 0.1, 0.5, y 2.5%) de RID-X y una vez definida la concentración óptima, fermentaron anaeróbicamente el sustrato por períodos de 7, 14, 21 y 28 días. Con ello se evidenció que el tiempo de fermentación anaeróbica influye sobre la población del sustrato que estaría asociado a un descenso drástico del pH, el cual inició en 6.5 y llegó a 3.5 al segundo día (Wong, Lim, et al., 2020). En el primer día de fermentación las bacterias coliformes fueron completamente inactivadas.

Cabe notar que, de los pretratamientos existentes, los procesos biológicos podrían resultar de mayor interés, ya que al no usar compuestos tóxicos tendrían un menor impacto ambiental. No obstante, se ha evidenciado que la combinación de pretratamientos físicos, químicos y biológicos pueden impulsar mejoras en varios parámetros de producción. Algo importante que se debería tener en cuenta en sistemas de crianza de *H. illucens* es el costo-beneficio de la aplicación de estos pretratamientos. Otra ruta más sencilla y menos costosa para mejorar la eficiencia de la bioconversión es mediante la diversificación del sustrato

larval. Por ejemplo en el estudio de Rehman et al. (2017) se mostró que al suplementar estiércol bovino con paja en una relación 40:60 (p/p), la biomasa larval incrementaba en un 80% respecto al uso de estiércol bovino solamente. En otros casos se ha visto que la fermentación con un consorcio microbiano puede potenciar la bioconversión de un residuo agrícola altamente fibroso como la paja de arroz. En el estudio de Zheng et al. (2012) se observó que este material podía ser ingerido al mezclarlo con desechos de restaurante en una relación 30:70 p/p. Con la aplicación de RID-X ® dirigido al sustrato la bioconversión de la celulosa, hemicelulosa, lignina y proteína del sustrato incrementó considerablemente a 65.5, 56.3, 8.8 y 91.6%, respectivamente. Con la aplicación de este consorcio microbiano y enzimático a una concentración de 0.35% fue posible maximizar la producción de biomasa larval y su contenido de grasa con el que obtuvieron biodiesel.

2.7. *Trichoderma sp.*

Trichoderma sp. es un género de hongos ascomicetos, aerobios que habitan de forma natural en el suelo, y son de gran interés agrícola y biotecnológico.

Varias especies y cepas de *Trichoderma* han sido ampliamente utilizadas en el control biológico de hongos fitopatógenos. Las cepas de una misma especie presentan diferentes niveles de efectividad debido a diferencias en sus modos de acción. Se ha registrado por ejemplo mecanismos directos en los cuales el hongo ante la presencia de organismos patógenos secreta antibióticos, libera enzimas hidrolíticas de tipo quitinasas, glucanasas y proteasas que destruyen la pared celular de hongos patógenos, y/o compiten con ellos por espacio y nutrientes (Martínez et al., 2013; Rebolledo-Prudencio et al., 2020). Adicionalmente, varias especies de *Trichoderma* han mostrado capacidad para establecer una relación simbiótica con interacciones en su mayoría positivas para la planta huésped. Mediante la colonización de las raíces el hongo es capaz de modular la síntesis y acumulación de fitohormonas, promover el crecimiento de raíces secundarias mejorando así la absorción de nutrientes y fomentando el crecimiento de la planta (Rebolledo-Prudencio et al., 2020). De esta forma el hongo otorga tolerancia a enfermedades o a diferentes tipos de estrés (Gomes et al., 2017; Silva et al., 2019). Por tales motivos, algunas especies y cepas de *Trichoderma* son ampliamente utilizadas en la elaboración de biofungicidas y bioestimulantes.

Por otro lado, especies de *Trichoderma* son de especial interés por su capacidad de producir enzimas celulasas y hemicelulasas extracelulares. Estas enzimas tienen alto potencial para aplicarse en la obtención de biocombustibles, mejorar la digestibilidad de residuos agrícolas usados en alimentación animal entre otras aplicaciones (Sood et al., 2020). En un estudio realizado por Sijinamanoj et al. (2021) se encontró que una cepa de *Trichoderma harzianum* mostraba incluso capacidad para degradar lignina. La cepa aislada de un “panal” de hongos asociados a la termita *Odontotermes obesus* fue capaz de

descomponer grandes proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (93.8, 81.8 y 65%, respectivamente) después de una fase de fermentación por 45 días con *T. harsianum* (Sijinamanoj et al., 2021).

Con relación al cultivo del hongo, *Trichoderma* spp. no es exigente en nutrientes, prolifera bien en sustratos lignocelulósicos con alta relación C/N, una baja concentración de compuestos nitrogenados, bajo contenido de vitaminas y minerales, el contenido de humedad puede estar entre 30 y 75%, la temperatura entre 15 y 30 °C, y el pH puede tener una acidez moderada o ligera (Pineda-Insuasti et al., 2017). No obstante, la producción de enzimas puede variar en dependencia de la interacción de factores como el pH, la temperatura y la fuente de carbono (Sijinamanoj et al., 2021).

2.8. *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria aeróbica Gram positiva que se encuentra generalmente en suelos, fuentes de agua y en asociación con plantas y animales. Una característica importante de la especie es que bajo condiciones ambientales desfavorables diversifica su metabolismo produciendo enzimas, antibióticos, e incluso llega a formar endosporas que son resistentes a la irradiación, desecación y a ciertos compuestos químicos lo que le permite reestablecer su crecimiento cuando las condiciones mejoran (Kunst et al., 1997; Piggot & Hilbert, 2004). Al igual que *Trichoderma*, esta bacteria también es de interés agrícola y biotecnológico. *B. subtilis* es utilizada principalmente como controlador biológico de fitopatógenos por su efectividad en la producción de compuestos antibióticos y antifúngicos, su alta capacidad de colonización de la rizosfera, una rápida asimilación de nutrientes y por la secreción de enzimas (quitinasas, celulasas, proteasas y glucanasas) que actúan directamente sobre microorganismos patógenos (Díaz Almeida, 2020).

B. subtilis es también de gran importancia por sus propiedades como probiótico. Debido a su capacidad para formar esporas ha sido utilizada en la formulación de probióticos comerciales de uso humano y veterinario (Cutting, 2011). En varias ocasiones el uso de esta bacteria como parte de la dieta ha demostrado tener diversos beneficios para el huésped. En producción acuícola se ha demostrado que su aplicación en la dieta confiere diversos beneficios en el crecimiento y salud de peces y camarones. Esto se debe a que tras su consumo pueden darse mejoras en la ganancia de peso, reducción de estrés y enfermedades, y en la calidad del agua (El-Saadony et al., 2021). En producción avícola se ha evidenciado que la inclusión de esta bacteria en la dieta de pollos broiler provoca principalmente incrementos en el peso del ave, y en ocasiones se ha evidenciado también resistencia a enfermedades, reducción en niveles de aflatoxinas, y mejoras en la conversión alimenticia (Ramlucken et al., 2020). Los incrementos en el peso de pollos se dan por mejoras en la digestión y absorción de nutrientes que son atribuidos a la secreción de

enzimas por parte de la bacteria y por un mayor crecimiento de las vellosidades intestinales que esta provoca (Ramlucken et al., 2020).

Algunas cepas de *B. subtilis* también han mostrado efectos benéficos en el proceso de bioconversión con *H. illucens*. En el estudio de Yu et al. (2011) se mostró por primera vez que la co-inoculación de microorganismos y larvas de *H. illucens* podía promover el desarrollo del insecto. En el estudio hicieron aplicaciones individuales de tres cepas de *B. subtilis* aisladas del intestino de la larva y otra cepa aislada del sustrato, sobre estiércol de pollo no estéril, con lo que obtuvieron incrementos de hasta 22% en el peso larval (Yu et al., 2011). Mas tarde en otro estudio realizado por Xiao et al. (2018)(Xiao et al., 2018) se encontró que la co-inoculación de otra cepa de *B. subtilis* aislada del intestino de la larva, producía incrementos de 15.9, 12.7 y 13.4% en el peso de larval, la eficiencia de la bioconversión y la tasa de reducción del sustrato, respectivamente (estiércol de pollos), respectivamente (Xiao et al., 2018). Otras cepas de *Bacillus* sp. ha mostrado mejoras en la bioconversión de sustrato a base de estiércol bovino con pollinaza. En el estudio de Rehman et al. (2019) una cepa de *Bacillus* que fue co-inoculada con las larvas de *H. illucens* produjo incrementos de 58.5 % en la eficiencia de la bioconversión, adicionalmente se evidenció que la reducción de los contenidos de celulosa, hemicelulosa, y lignina incrementaron en un 47.2, 24.4, 37 y 16%, respectivamente en comparación con el uso de sustrato que no fue inoculado con bacterias (Rehman et al., 2019). Los estudios anteriores muestran diferencias en los niveles de efectividad entre cepas de *B. subtilis* que no necesariamente están ligadas a la procedencia de la cepa.

Durante la aplicación de esta bacteria en sistema de crianza de *H. illucens* las condiciones de trabajo deben adecuarse en lo posible a los requerimientos de los dos organismos. En general *B. subtilis* se desarrolla bien a temperaturas de 15 -37 °C, y algunas cepas resisten hasta 55 °C, en cuanto al pH es bastante amplio pudiendo desarrollarse en rangos de pH de moderadamente ácidos a ligeramente alcalinos (Hamdache et al., 2012; Piggot & Hilbert, 2004).

2.9. *Pleurotus* sp.

Pleurotus sp. es un grupo de hongos basidiomicetos responsables de la pudrición blanca en madera. Estos hongos comestibles son ampliamente cultivados en varias partes del mundo, especialmente en Asia en donde se produce casi el 99% de toda la producción mundial (Salmones, 2018). *Pleurotus* spp. posee propiedades nutraceuticas, se ha demostrado que produce diversas moléculas con actividad antioxidante, antibacteriana, antibiótica, antiviral, antitumoral, inmunomodulatoria y con capacidad para inhibir la absorción colesterol (Cohen et al., 2002). Otro aspecto importante de este género de hongos radica en su nivel de producción de enzimas ligninolíticas, mismas que pueden ser aplicadas en el tratamiento de sustratos lignocelulósicos destinados a la alimentación

animal y a la producción de bioproductos (Cohen et al., 2002). La proliferación de *Pleurotus* sobre varias BLC's se da gracias a la producción de enzimas que degradan la celulosa, hemicelulosa y lignina. Se han identificado varios residuos agroindustriales como paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, tusa de maíz, aserrín, cáscara de papa y restos de cultivos florícolas que pueden ser utilizados para la producción de enzimas lignocelulósicas con *Pleurotus* sp. (Ozcirak Ergun & Ozturk Urek, 2017; Quevedo-Hidalgo et al., 2015)

El cultivo de *Pleurotus* sp. es relativamente fácil, se pueden llevar a cabo en bolsas de polipropileno incubándolas en un sitio con temperatura entre 20 y 30 °C y humedad ambiental entre 80 a 90% por un periodo aproximado de tres a cuatro semanas (Alananbeh et al., 2014; Tsegaye & Tefera, 2018). Después de este tiempo se procede a inducir la fructificación mediante suministración de luz y ventilación (Bánfi et al., 2015).

Existe un solo reporte en el cual se ha utilizado los residuos del cultivo de *Pleurotus* sp. como sustrato para *H. illucens*. Se ha visto que la larva del insecto puede desarrollarse sobre este material, sin embargo, se destaca la importancia de verificar la calidad e inocuidad de la harina obtenida ya que la larva puede acumular ciertos metales pesados como As y Pb (T. H. Li et al., 2021).

CAPITULO III. METODOLOGÍA

En el presente trabajo se realizaron ensayos preliminares para evaluar si los microorganismos elegidos para el estudio podían coexistir con las larvas de *H. illucens*. Así también se evaluaron los efectos de la inclusión de larvas en el proceso y los efectos de la esterilización del sustrato. Se realizó un total de tres ensayos preliminares bajo un diseño completamente aleatorio (DCA) con un arreglo factorial. Posteriormente se realizaron dos ensayos adicionales con varios ajustes en los protocolos de cultivo del insecto y en el procesamiento postcosecha que se detallan en las secciones 3.2. en adelante.

3.1. Ensayos preliminares

Se realizaron tres ensayos bajo un DCA con un arreglo de tres factores: aplicación de microorganismos, esterilización de sustrato e inclusión de larvas. Los ensayos se realizaron en diferentes tiempos. En el primer ensayo se trabajó con *B. subtilis* DSO3, *T. reesei* C2A y el probiótico; en el segundo ensayo con *Pleurotus* sp.; y en el tercer ensayo con *Pseudomonas* sp.

Para el cultivo se utilizaron frascos de vidrio estériles, en donde se colocaron 30 g de sustrato AC preparado al 60% de humedad (9 g de afrecho de cebada + 21 ml de agua). Una vez distribuido el sustrato en los frascos se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. *Pleurotus* sp. y *T. reesei* C2A fueron inoculados tres días antes de la siembra de larvas de *H. illucens*, mientras que *B. subtilis* DSO3 y *Pseudomonas* sp. fueron inoculados el mismo día. En los tratamientos con inclusión de larvas se sembraron 10 larvas silvestres con peso promedio individual de 50 mg (rango de pesos: 32 - 74 mg). Los envases se taparon con un tapón de algodón y gasa estéril, sujetándolo con cinta transparente para evitar en lo posible la contaminación del sustrato y la fuga de larvas (Figura 2). Los frascos con los cultivos se llevaron a la incubadora a 30 °C. Cuando se observó la presencia de prepupas se procedió a cosechar la unidad respectiva. El tratamiento postcosecha consistió en un lavado con agua potable para retirar los residuos de AC, un secado sobre papel y pesaje de larvas en base fresca (Figura 11). Las variables evaluadas en estos ensayos fueron: tiempo de desarrollo (td, d), tasa de sobrevivencia (%), peso final total de larvas (mg en base fresca), tasa de crecimiento (mg día⁻¹) y reducción del sustrato (RS, %).



Figura 2. Unidades experimentales establecidas en los ensayos preliminares.

A continuación, se presenta la metodología llevada a cabo para los ensayos posteriores:

3.2. Producción de larvas de *Hermetia illucens*

Para la producción de larvas se procedió a establecer una colonia del insecto en la Facultad de Ciencias de la Vida de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (FCV - ESPOL). Para ello primero se recolectaron especímenes silvestres en un sector urbano de la ciudad de Guayaquil, provincia del Guayas. La crianza y reproducción del insecto se realizó siguiendo la metodología de D. C. Sheppard et al. (2002) con algunas modificaciones. Los imagos se mantuvieron dentro de una estructura metálica de dimensiones 0.75 x 0.75 x 1.5 m forrada con tela mosquitera (Figura 3), esto fue mantenido bajo condiciones ambientales naturales. Sobre la jaula se colocó una cubierta transparente para proteger a los insectos de la lluvia, y dentro de ella se colocó una bandeja con fruta fermentada como sustrato atrayente, y piezas de cartón corrugado de 5 x 3 cm para la oviposición. Los huevos se recolectaron a diario y colocaron en tarrinas plásticas hasta su eclosión, la cual ocurrió entre el tercer y cuarto día.

Con el fin de evitar una posible contaminación cruzada se realizó un ensayo con hongos y luego otro ensayo con bacterias en tiempos diferentes. Para el ensayo con hongos las larvas neonatas fueron alimentadas *ad libitum* con afrecho de cervecería durante los primeros 5 días de vida, mientras que para el ensayo con bacterias se suministró alimento para pollos Nutril® (proteína, 20 - 21%, grasa: 5%, fibra: 3%) (experimento con bacterias) preparado al 60 % de humedad. Al sexto día las larvas fueron separadas del alimento con ayuda de un pincel pequeño, y utilizadas en el estudio. Las larvas que se emplearon correspondían a la progenie de la primera y segunda generación. El resto de las larvas fueron alimentadas con restos de varias frutas y vegetales, y reservadas para el mantenimiento de la colonia.



Figura 3. Vista externa e interna del moscario donde se mantuvo a la colonia de *H. illucens* para la producción de huevos. Sitio FCV- ESPOL.

3.3. Preparación del sustrato

El afrecho de cervecera deshidratado fue proporcionado por la Procesadora de alimentos S.A. PRODAL. De acuerdo con los análisis provistos por la empresa, el material contenía 24.76% de proteína, 6.55% de grasa y 16.9% de fibra en base seca. Para cada unidad se prepararon 100 g del sustrato que consistieron en 30 g de afrecho seco mezclado con 70 ml de agua potable. El sustrato fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min, y luego almacenado a 4 °C hasta su aplicación.

3.4. Cultivo de microorganismos

B. subtilis DSO3, *Pleurotus* sp., y *T. reesei* C2A fueron suministrados por el Banco de Microorganismos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). El cultivo y las suspensiones de células se preparó de la siguiente forma:

B. subtilis fue cultivado en medio Luria Bertani Agar (Difco®). El medio fue esterilizado a 121 °C por 15 min, y luego dispensado sobre cajas Petri estériles, en donde se sembró la bacteria con ayuda de un asa de platino. La incubación se realizó a 37 °C por 24 h. El cultivo y la suspensión de células se realizaron según la metodología descrita por Rehman et al. (2019) con algunas modificaciones. Se lavó el cultivo con buffer fosfato salino

(PBS, pH 7.4), y se hicieron diluciones necesarias con agua destilada hasta obtener una concentración de 1×10^8 UFC/ml. El conteo de células se realizó en cámara de Neubauer.

Pseudomonas sp. fue cultivado en caldo nutritivo e incubado a 28 °C por 21 h con agitación constante a 110 r.p.m. Después del período de incubación se realizó la dilución con el mismo medio líquido hasta que se alcanzó la concentración deseada utilizando un densímetro (Densimat BioMérieux) y la escala McFarland No 0.5 a una longitud de onda de 550 nm (OD550) que equivale a 1.5×10^8 (BIOMÉRIEUX, 2007). Se optó por este método porque la transparencia de las células de esta bacteria que dificultó su conteo en cámara de Neubauer. El cultivo y la suspensión de células fueron realizados acorde a los protocolos del CIBE.

T. reesei fue cultivado en medio papa dextrosa agar (PDA) y *Pleurotus* sp. fue cultivado en medio PDA (39 g por litro de agua destilada) suplementado con extracto malto agar (30 g de extracto de malta, 5 g de peptona micológica y 15 g de agar por litro de agua destilada) (Figura 4). El medio fue esterilizado a 121 °C por 15 min y dispensado en cajas Petri estériles. Los hongos fueron sembrados con ayuda de un bisturí. La incubación se realizó a 28 °C por siete días. La cosecha de esporas se realizó según la metodología descrita por Isibika et al. (2019). Se utilizó una solución salina estéril al 0.9% NaCl para humedecer el micelio, luego, la solución de esporas fue transferida a un tubo de ensayo de 14 ml en donde se agregó la solución salina hasta obtener la concentración deseada de 1×10^8 UFC/ml. El conteo de esporas se realizó en cámara de Neubauer.

El Probiótico Oxynova® se preparó a la dosis comercial recomendada de 50 mg/ 100 ml de agua destilada. El producto está formulado a base de enzimas (amilasas, proteasas, celulasas, pectinasas, xilanasas y fitasas) y bacterias benéficas (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*) microencapsuladas a una concentración de 1×10^9 UFC/g.

Todas las suspensiones preparadas fueron almacenadas en tubos cónicos de 15 ml, y refrigeradas a 4 °C hasta su aplicación.

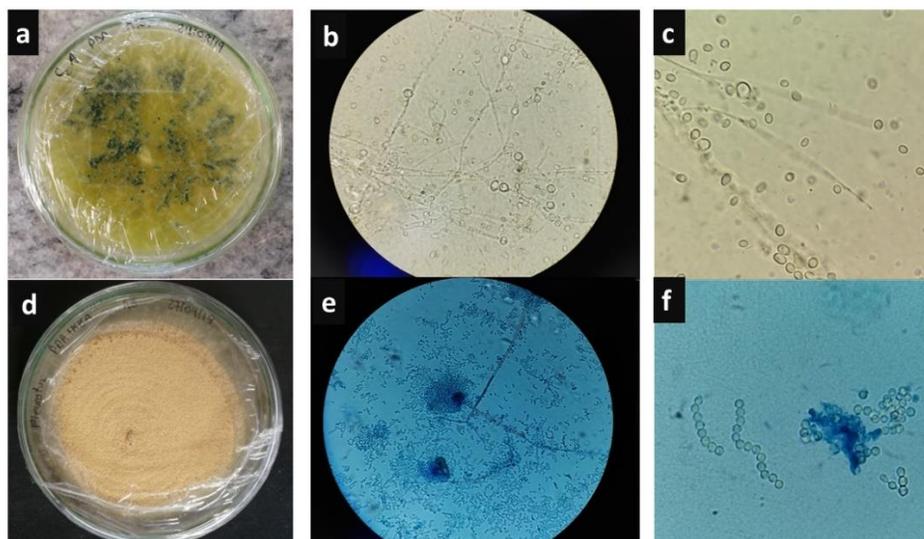


Figura 4. Crecimiento micelial y observaciones microscópicas de *T. reesei* C2A (a, b, c) y *Pleurotus* sp. (d, e, f) previo a la preparación de suspensiones microbianas.

3.5. Diseño experimental

Los experimentos posteriores se desarrollaron durante los meses de octubre 2019 a marzo 2020 en los laboratorios de la FCV. Los experimentos se desarrollaron bajo un diseño completamente aleatorio, y consistieron en la aplicación de cuatro tratamientos (microorganismos) dirigidos al sustrato. En un estudio preliminar se determinó que *Pseudomonas* sp. no tuvo efectos sobre los parámetros de procesamiento por lo que fue descartado de esta parte del estudio. Los microorganismos que se evaluaron finalmente fueron *T. reesei* C2A, *Pleurotus* sp., *B. subtilis* DSO3, y el probiótico. Estos tratamientos fueron comparados con un control el cual solo recibió agua destilada. El experimento estuvo replicado cuatro veces.

Las unidades experimentales se prepararon en bandejas plásticas ($\Phi=10$ cm, $h=6$ cm) con 100 g de sustrato esterilizado (humedad 70%) más un ml de la solución de microorganismos o agua destilada (control). *T. reesei* C2A y *Pleurotus* sp. fueron inoculados siete días antes que las larvas, por su parte *B. subtilis* DSO3 y el probiótico se inocularon el mismo día. En cada unidad se sembraron 100 larvas de 5 a 6 días de edad (Figura 5) (Stefan Diener et al., 2011; Julita et al., 2018), con peso promedio individual de 5.6 mg (2.7 - 8.7 mg), a una densidad de 1.27 larvas/cm². Las bandejas con los tratamientos se cubrieron con una tapa a la cual se adaptó un retazo de tela mosquitera (0.5 mm de abertura). La incubación se realizó a 28 °C sin suplementación de luz, con revisiones regulares de una sola réplica por cada tratamiento. La cosecha se realizó de forma similar

que en el trabajo de Miranda et al. (2020), esto es con la primera aparición de prepupas. Con ayuda de una pinza entomológica, las larvas fueron separadas de los residuos del sustrato y guardadas hasta el día siguiente en la incubadora para que vaciaran su tracto intestinal (Somroo et al., 2019). Después de este tiempo se procedió a lavarlas con agua potable para retirar los residuos del sustrato y sus excrementos (Figura 11). Una vez limpias y secas, se contó el número de larvas vivas y registró el peso larval final en base fresca. En seguida las larvas fueron inactivadas en estufa a 105 °C durante 10 min, y luego secadas a 60 °C por dos días (Gao et al., 2019).



Figura 5. Larvas de seis días de edad empleadas en el experimento.

3.6. Parámetros de procesamiento y desarrollo larval

Con los datos registrados se calcularon los parámetros de procesamiento sugeridos por Bosch et al. (2019) utilizando las siguientes fórmulas:

$$TC, \text{ mg d}^{-1} = \frac{Pl \text{ final} - Pl \text{ inicial}}{\text{Tiempo de crianza}} \quad (1)$$

$$\text{Sobrevivencia, \%} = \frac{\text{Total de larvas vivas a cosecha}}{\text{Total de larvas sembradas}} * 100 \quad (2)$$

$$RS, \% = \frac{S - R}{S} * 100 \quad (3)$$

$$\text{Bioconversión (BCR, \%)} = \frac{L_f - L_i}{S - R} * 100 \quad (4)$$

Donde: **TC** =Tasa de crecimiento larval, **RS** = Tasa de reducción del sustrato, **S**=Peso del sustrato suministrado al inicio del ensayo, **R** = Peso total de los residuos del proceso conformado por el estiércol larval y parte del sustrato no consumido por la larva, **PI** = Peso larval promedio medido al inicio y al final del experimento, y **BCR** = Tasa de bioconversión. Todos los cálculos se realizaron con datos medidos en base seca.

3.7. Perfil nutricional de la harina de larva

La biomasa larval fue deshidratada en la estufa a 60 °C por dos días (Gao et al., 2019). Luego, las muestras fueron trituradas en un molino de café (Krupps ® F203) por dos ciclos de 10 s. La cuantificación de N se realizó por el método de combustión también conocido como método de Dumas (Stefan Diener et al., 2009; Gerhardt, 2021). Para ello se pesaron entre 50 a 60 mg de muestra, éstas se envolvieron en estaño y luego fueron sometidas a combustión en un analizador elemental orgánico (Elementar ® Vario MACRO cube). El contenido total de N obtenido fue multiplicado por el factor de conversión a proteína (4.76) propuesto por Janssen et al. (2017) .

3.8. Análisis del sustrato y los residuos

El sustrato y los residuos fueron secados en estufa a 60 °C por dos días. Luego fueron trituradas en el molino de café (Krupps ® F203). El contenido total de carbono, nitrógeno y la relación C/N fue determinado con el analizador elemental orgánico (Elementar ® Vario MACRO cube). Para la medición del pH se preparó una suspensión del sustrato molido mezclándolo con agua destilada a una concentración de 1:5 (p/v). La suspensión fue agitada a 180 r.p.m. x 30 min, y el pH medido con un potenciómetro (Thermo Scientific ® ORION STAR A215).

3.9. Análisis estadístico

El cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos fue comprobado con las pruebas de Shapiro-Wilks, Levene y Durbin-Watson, respectivamente. Se realizó una prueba t basada en dos muestras, para comparar los parámetros de procesamiento en dependencia del grupo de hongos y del grupo de bacterias utilizadas en el estudio. Todas las variables a excepción del contenido proteico de la harina presentaron diferencias significativas entre ensayos, por ello los datos se analizaron de forma separada por cada ensayo. Ante el cumplimiento de los tres supuestos, se realizó un análisis de varianza (Anova) de una vía, seguido de la prueba de Tukey HSD con un nivel de significancia de 0.05 ($P < 0.05$). En los casos en que no se

cumplió el supuesto de normalidad, los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y cuando se evidenciaron diferencias significativas se aplicó la prueba de Dunn. En aquellos casos en que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas se aplicó un Anova con la corrección de Welch. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software R versión 4.0.2.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos preliminares

Se detectó un efecto significativo de interacción entre los factores de inoculación de larvas y de esterilización del sustrato sobre RS ($P < 0.0001$). La inclusión de larvas condujo a una mayor RS en comparación con aquellos tratamientos que no fueron cultivados con larvas de *H. illucens*. El porcentaje más alto de RS fue obtenido en el sustrato no esterilizado con inclusión de larvas (S:CL) (Figura 6). El porcentaje más bajo de RS se obtuvo con sustrato estéril en ausencia de larvas (SE:SL) ($18.1 \pm 1.9\%$) (Figura 6). La diferencia observada entre los tratamientos SE:SL y S:SL (ambos en ausencia de larvas) podría ser explicada por el crecimiento fúngico observado en el sustrato no esterilizado (Figura 7), lo que habría provocado la degradación del sustrato y por ende una mayor reducción del material.

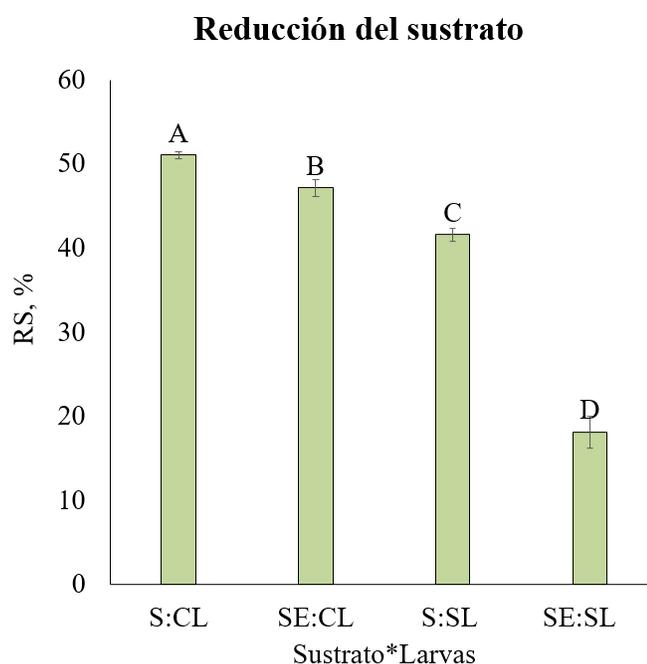


Figura 6. Efecto de la inclusión de larvas y esterilización del sustrato sobre la reducción del sustrato (RS, %). S: Sustrato no esterilizado, SE: Sustrato esterilizado, L: larvas. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas según prueba de Tukey ($P < 0.05$).



Figura 7. Crecimiento fúngico en sustrato no esterilizado.

El factor de esterilización del sustrato no tuvo efectos sobre los parámetros de peso larval (PI) final ($P = 0.3531$) y tasa de sobrevivencia ($P = 0.0889$). El factor de aplicación de microorganismos tampoco tuvo efectos sobre estos dos parámetros ($P = 0.9015$ y 0.3157 , respectivamente), pero sí hubo una variación significativa del PI final entre ensayos ($P = 0.0051$). Esto muy probablemente se debe a que el PI inicial entre ensayos también fue significativamente diferente ($P < 0.001$). Cuando los datos fueron analizados por cada ensayo, los factores de esterilización del sustrato, y la aplicación de microorganismos no tuvieron efectos sobre PI final, tasa de sobrevivencia, ni en la tasa de crecimiento (TC) ($P > 0.05$). Entre cada ensayo, tampoco se detectaron efectos significativos de interacción entre los dos factores ($P > 0.05$). Salvo en el ensayo con *Pleurotus* sp. hubo efectos significativos del factor esterilización del sustrato en el PI final ($P = 0.0065$). Con sustrato no esterilizado hubo mayor peso larval que con sustrato esterilizado (197.5 ± 2.9 vs 175.8 ± 4.5 mg).

Al comparar los resultados de la experimentación preliminar con los obtenidos en el estudio posterior, se observó que el PI final fresco fue mucho mayor al alcanzado en estudios posteriores (peso promedio 187.8 vs 105.5 mg). Esta diferencia en los PI finales podría deberse principalmente a que en los ensayos preliminares se trabajó con un PI inicial, temperatura y porcentaje de materia seca de AC mayores (50 mg, 30 °C, 40% , respectivamente) que en los ensayos posteriores (5.6 mg, 28 °C, 30% , respectivamente). El uso de larvas más pesadas y grandes se debió a que aún no se tenía establecida una colonia del insecto por lo que se usaron larvas silvestres. Es posible que las larvas silvestres hayan tenido un mejor comportamiento porque en su hábitat natural (compostera) se alimentaban de varios residuos orgánicos de origen vegetal. Se ha demostrado que ante una dieta baja en nutrientes el intestino de la larva presenta adaptaciones que mejoran la digestión y absorción de nutrientes (Bonelli et al., 2020). En cuanto a la preparación del sustrato, se decidió prepararlo con menor contenido de materia seca para evaluar si de esta forma aumentaba el consumo de AC por parte de las larvas. Respecto a la temperatura, se

ha determinado que 30 °C es más favorable para el crecimiento de larvas (Chia et al., 2018), lo que podría explicar que se obtuvieran larvas más pesadas que en el estudio posterior.

Tabla I. Resumen del peso larval (Pl) inicial y final, tasa de sobrevivencia, tiempo de desarrollo (td), y tasa de crecimiento larval de los ensayos preliminares (n=3, media \pm error estándar) *.

Tratamiento	Pl inicial (mg larva ⁻¹)*	Pl final (mg larva ⁻¹)*	Sobrevivencia (%)	Td (días)	TC (mg día ⁻¹)
Ensayo 1					
C1**	49.7 \pm 2.9	206.1 \pm 9.3	95.0 \pm 3.4	14	0.09 \pm 0.01
<i>B. subtilis</i> DSO3	52.5 \pm 3.3	184.8 \pm 5.8	100	14	0.10 \pm 0.01
<i>T. reesei</i> C2A	55.0 \pm 1.5	182.2 \pm 2.3	98.3 \pm 1.7	14	0.08 \pm 0.01
Probiótico	51.5 \pm 3.1	185.5 \pm 5.3	100	14	0.10 \pm 0.01
Ensayo 2					
C2**	62.0 \pm 5.4	184.8 \pm 5.3	100	6	0.21 \pm 0.01
<i>Pleurotus</i> sp.	58.9 \pm 2.6.	187.8 \pm 6.9	100	6	0.22 \pm 0.01
Ensayo 3					
C3**	39.2 \pm 1.4	178.2 \pm 12.3	96.7 \pm 3.3	6	0.26 \pm 0.01
<i>Pseudomonas</i> sp.	36.5 \pm 1.5	198.8 \pm 6.6	98.3 \pm 1.7	6	0.27 \pm 0.01

*Valores medidos en base fresca.

**Controles, sin adición de microorganismos.

4.2. Desarrollo larval y Bioconversión del sustrato

Cuatro microorganismos y una fórmula comercial de probióticos y enzimas fueron evaluados en el estudio como posibles (pre) tratamientos de AC. La cepa de *Pseudomonas* sp. fue descartada de los estudios posteriores por no presentar ningún efecto durante los ensayos preliminares.

En los ensayos preliminares se observó que las larvas que recibieron AC pretratado por tres días con *Pleurotus* sp., completaron su fase larval con una alta tasa de sobrevivencia (100%) (Tabla I). En cambio, en los experimentos posteriores se obtuvo resultados contrarios con el mismo hongo. Es posible que estos resultados opuestos se deban principalmente a que en los primeros ensayos se utilizaron larvas con mayor peso inicial, y/ o porque AC fue pretratado con *Pleurotus* sp. por menos tiempo (tres vs siete días). Se ha determinado que en siete días algunas especies de *Pleurotus* alcanzan un crecimiento

micelial de entre 2.5 y 4.2 cm en medio PDA (Khan et al., 2011). En otro estudio, *P. ostreatus* alcanzó un crecimiento de 2 cm en 6 días en un sustrato que incluía 10% de AC (Gregori et al., 2008). En este trabajo se observó que a los 7 días el micelio del hongo había colonizado completamente el sustrato, y se veía cohesionado y con menos humedad que al inicio del experimento. El hecho de cultivar las larvas en sustrato fermentado con *Pleurotus* sp. por 3 días habría dado tiempo a las larvas de consumir el sustrato antes que sea colonizado completamente por el micelio del hongo. Aunque AC pretratado con este hongo al parecer no pudo ser consumido por la larva. En un estudio reciente se encontró que los residuos de un sustrato cultivado con *Pleurotus* sp. si se pueden usarse en la dieta de *H. illucens* (T. H. Li et al., 2021). Sin embargo, se destaca la importancia de verificar la calidad de la harina obtenida ya que los autores determinaron un incremento en el contenido de ciertos metales pesados y en la población de microorganismos indicadores.

De los resultados obtenidos, se encontró que las larvas cultivadas en AC sin inoculación de microorganismos alcanzaron un PI final entre 106 a 110 mg larva⁻¹ medido en base fresca. Estos rangos de pesos se asemejan a lo reportado por Bava et al. (2019) (98 mg larva⁻¹) quienes usaron AC de menor contenido proteico pero que fue suministrado *ad libitum* por lo que las larvas habrían tenido suficiente cantidad de nutrientes disponibles para llegar al último estadio de la fase larval (prepupas). En otro estudio realizado por Nyakeri et al. (2017) se reporta un PI final (78 mg larva⁻¹) menor al de nuestro estudio pero con similar contenido proteico de la harina larval. Por su parte el peso de la harina obtenida en nuestro estudio fue mucho menor al reportado por Liu et al. (2018) (30.50 ± 0.50 vs 45.48 ± 0.67 mg) en donde utilizaron el mismo tipo de sustrato. La marcada diferencia en el peso larval muy probablemente se deba a que la cantidad de sustrato que suministraron en aquel estudio fue mucho mayor a la de nuestro estudio (200 vs 100 mg larva⁻¹ día⁻¹). En general con AC se han obtenido altas tasas de sobrevivencia en este y otros estudios (>96 %) (Bava et al., 2019; Z. Liu et al., 2018). Respecto al tiempo de desarrollo los autores Z. Liu et al. (2018); Nyakeri et al. (2017) reportan valores similares al de este estudio. Hasta el momento solo en el estudio de Bava et al. (2019) se reporta una extensión del tiempo de desarrollo a 22 d. Esto probablemente se debe a que en dicho estudio se realizó una cosecha tardía esto es cuando cerca del 90% de larvas habían llegado al último estadio larval (prepupa). La tasa de crecimiento (GR) observada en AC se asemejan a los valores reportados por Liu et al. (2018) para AC y harinilla de trigo.

En lo que respecta a la reducción del sustrato, el rango de RS obtenido en este estudio (37.8 - 47.8%) es comparable a lo encontrado en el estudio de Nyakeri et al. (2017) (44.7%) para el mismo tipo de sustrato. En referencia a la BCR obtenida en este estudio fue menor a (9.89 - 10.12%) a lo publicado en el trabajo de Nyakeri et al. (2017) (16.6%) pese a que en ambos trabajos el parámetro fue calculado con la misma fórmula y en base a una misma tasa de alimentación de 100 mg larva⁻¹ día⁻¹. Es posible que la diferencia de BCR se deba entonces a que en el estudio de Nyakeri et al. (2017) se trabajó con larvas silvestres.

4.2.1. *T. reesei* y *Pleurotus* sp.

Los resultados del análisis de varianza con la corrección de Welch mostraron efectos significativos de los pretratamientos con hongos en el PI final medido en base fresca ($P = 1 \times 10^{-7}$) y en el peso de la harina larval ($P = 5.7 \times 10^{-8}$). El PI final que fue registrado después de que las larvas consumieran sustrato pretratado con *T. reesei* C2A fue menor que cuando el sustrato no fue inoculado con hongos (18.23 ± 0.30 vs 30.50 ± 0.50 mg larva⁻¹) (Tabla II). Así también la cantidad de harina producida debido a la aplicación de este hongo fue menor que con el control (1.79 ± 0.03 vs 3.04 ± 0.04 g) (Tabla II). Adicionalmente, los resultados del análisis no paramétrico de Kruskal Wallis mostraron efectos significativos en la sobrevivencia de larvas ($P = 0.01738$). El porcentaje de sobrevivencia más bajo fue obtenido con *Pleurotus* sp. (70.3%). La experimentación con este hongo fue suspendida al décimo día debido a que las larvas no mostraron progreso en el desarrollo, el PI final fue similar al PI inicial (7.93 ± 0.78 and 8.0 ± 0.20 mg larva⁻¹, respectivamente) (Tabla II). Al analizar la tasa de crecimiento se verificó que no hubo crecimiento de las larvas (-0.03 mg/día) (Figura 8). En contraste, con *T. reesei* C2A la tasa de sobrevivencia fue similar al del control C1 (98.3 ± 1.4 y $99.5 \pm 0.5\%$, respectivamente) (Tabla II). Respecto al tiempo de desarrollo larval, este fue generalmente de 10 días, con excepción del control el cual fue cosechado a los 8 días cuando había alcanzado un promedio de 10% de prepupas (Tabla II).

En lo que respecta a los parámetros de eficiencia del proceso, también se detectaron efectos significativos en la tasa de reducción del sustrato (RS) ($P = 4.0 \times 10^{-5}$) y la tasa de bioconversión (BCR) ($P < 5.7 \times 10^{-8}$). Con *T. reesei* C2A se registró la tasa más alta de RS ($46.3 \pm 0.9\%$) (Figura 8), sin embargo, la cantidad de sustrato que fue reducida probablemente no fue consumida por las larvas de *H. illucens*. La BCR con este hongo fue menor a lo determinado en el control ($6.0 \pm 0.1\%$ vs $10.1 \pm 0.3\%$) (Figura 8). La eficiencia obtenida del pretratamiento con *T. reesei* y del control fueron similares a lo reportado con estiércol bovino y residuos del cuajo de soya, respectivamente (Rehman, Rehman, et al., 2017). Con *Pleurotus* sp. se obtuvo la tasa más baja de BCR. Un comportamiento similar a BCR fue observado en el parámetro de crecimiento larval (TC). Los resultados del Anova con la corrección de Welch mostraron efectos significativos en este parámetro ($P = 2.4 \times 10^{-8}$). La TC en el control fue significativamente mayor al de *T. reesei* C2A, y este a su vez fue mayor a la de *Pleurotus* sp (Figura 8).

Respecto a la aplicación del hongo *T. reesei* C2A como pretratamiento de AC, este condujo a un menor peso larval que el control, no obstante, la sobrevivencia de larvas y su contenido proteico fueron similares. Este comportamiento del parámetro PI final difiere de lo hallado en el estudio de Isibika et al. (2019) en donde se observaron mejoras en el peso larval de *H. illucens* en respuesta al uso de cáscara de banano pretratada con *T. reesei*. En el estudio de Isibika et al. (2019) se evidenció que el pretratamiento de la cáscara de banano con *T.*

reesei provocó mayor PI final (>150 mg larva⁻¹) que cuando se suministró sustrato no pretratado (134 mg larva⁻¹) indiferente de si el tiempo de fermentación era de 7, 14 o 21 d. Es posible que la diferencia en el peso larval en estos dos estudios se deba principalmente a la diferencia en el perfil nutricional de ambos RSA usados como sustratos, en especial su contenido de proteína y fibra. La cáscara de banano tiene alrededor de 5.5% de PC (Isibika et al., 2019) mientras que en AC puede llegar hasta un 30% (Rachwał et al., 2020). Se ha demostrado que el desarrollo larval se correlaciona de forma positiva con el contenido de proteína, mientras que un mayor porcentaje de fibra específicamente de lignina tiene efectos negativos en la ganancia de peso (Z. Liu et al., 2018; Ooninx et al., 2015). De hecho, en el estudio de Nyakeri et al. (2017) se evidenció que el peso larval FLW y el rendimiento de la harina con cáscara de banano fueron significativamente inferiores a los rendimientos obtenidos con AC (55 vs 78 mg, 108 vs 154 g, respectivamente).

Respecto a la aplicación del hongo filamentoso *T. reesei* es de gran interés por su nivel de producción de enzimas celulasas, hemicelulasas y proteasas extracelulares que actúan sobre la descomposición de residuos orgánicos fibrosos (Gomes et al., 2017; Hernández-Melchor et al., 2019; Silva et al., 2019). En este sentido, es probable que, en el caso de la cáscara de banano, un mayor tiempo de fermentación haya favorecido la digestibilidad del sustrato. En cambio, para el sustrato AC es posible que al dejarlo fermentar por 7 días el hongo haya consumido parte de los nutrientes, o que en su defecto parte de la proteína hidrolizada se haya perdido por volatilización. En este último aspecto durante el experimento se percibió un olor intenso a amoníaco, por lo que se debía abrir diariamente la incubadora para disipar el olor. En otro estudio realizado por Mulyono et al. (2019) en el cual se fermentó la harina de *H. illucens* con *T. reesei* por un periodo de 72 h, se determinó que el contenido de PC disminuía significativamente de 40.2% a 39.1% ($P = 0.011$). En este sentido, la inclusión de *T. reesei* tal vez no sea necesaria en sustratos con alto contenido de proteína. Bajo tiempos de fermentación similares (siete días) con el hongo filamentoso *T. reesei*, la sobrevivencia larval en este estudio fue ligeramente mayor que el trabajo de Isibika et al. (2019) (98.3 vs 90.8 %).

Respecto a la aplicación de *Pleurotus* sp., durante el experimento se observó un comportamiento anormal en la actividad de las larvas, ya que éstas no se desplazaban entre el sustrato, sino que más bien permanecían mayoritariamente en el perímetro de la bandeja. Este tratamiento fue suspendido al décimo día, en este punto ninguna de las larvas había alcanzado la fase de prepupa. Cabe destacar que, en los ensayos preliminares se observó que larvas de *H. illucens* (de mayor edad) consumieron AC pretratado por 3 días con *Pleurotus* sp. y completaron su fase larval con una alta tasa de sobrevivencia (100%). Es posible que el cultivo de las larvas bajo esas condiciones haya dado tiempo de que consuman el sustrato antes que este sea completamente colonizado por el micelio del hongo. Este es el primer estudio donde se reporta los efectos de un co-cultivo de *Pleurotus*

sp.y *Hermetia illucens* usando AC como sustrato. En otro estudio reciente de Li et al. (2021) se reportó el uso de los residuos de un sustrato cultivado con cuatro especies de hongos comestibles entre ellas *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Auricularia heimuer* y *Lentinus edodes*. Los autores reportaron menor peso larval con los residuos del cultivo de *P. eryngii* en comparación con *L. edodes* (38.3 y 68.8 mg, respectivamente). De acuerdo con lo observado en dicho estudio se destaca la importancia de verificar la inocuidad de la harina de larva debido a una tendencia en la acumulación de ciertos metales pesados y el incremento de la población de microorganismos indicadores con ese tipo de sustrato. Esto pese a que en dicho estudio los valores se mantuvieron por debajo de los límites máximos permitidos.

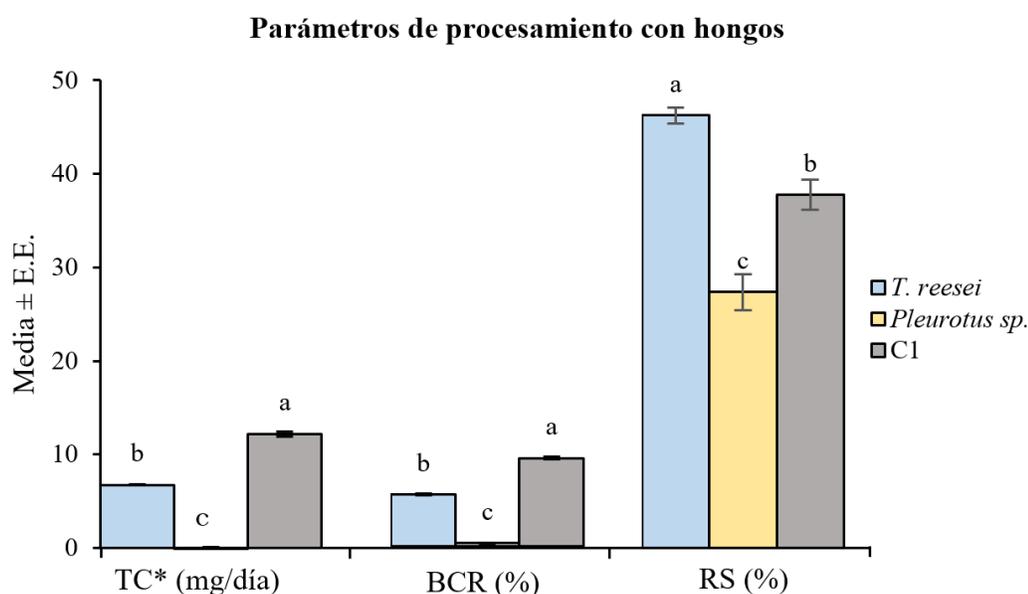


Figura 8. Tasa de crecimiento larval (TC), Eficiencia de la bioconversión (BCR) y reducción del sustrato (RS) del ensayo con hongos. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas para cada parámetro (Test de Tukey o *Dunn, $P < 0.05$).

4.2.2. *B. subtilis* y Probiótico Oxynova ®

Los resultados del Anova mostraron diferencias significativas en el PI inicial ($P = 0.0195$) y el PI final medido en base fresca ($P = 0.0195$). No se evidenciaron efectos significativos en los demás parámetros de desarrollo ($P > 0.05$) (Tabla II). Con el probiótico y el control C2 se obtuvieron PI finales similares (30.48 ± 0.50 y 30.13 ± 0.33 mg larva⁻¹, respectivamente) (Tabla II). Por su parte con *B. subtilis* DSO3 se registró el peso promedio más alto en este ensayo (32.98 ± 1.09 mg larva⁻¹) (Tabla II), esto se debe a que el PI inicial fue significativamente mayor en este tratamiento. Esto fue comprobado al detectar una

correlación positiva entre estos dos parámetros (Coeficiente de Pearson 0.65, $P = 0.02245$). La sobrevivencia larval en el ensayo con bacterias fue mayor a 95%. Adicionalmente, de los 30 g de AC en base seca que se usaron para el cultivo de *H. illucens* se obtuvo un promedio de 3.01 g de harina de larva. Esto se traduce en un rendimiento del 10% de harina de larva en base seca.

En lo que respecta a los parámetros BCR ($P = 0.114$) y SR ($P = 0.254$) no se evidenciaron efectos de la aplicación de *B. subtilis* DSO3 y el probiótico formulado a base de bacterias y enzimas (Figura 9). Con *B. subtilis* DSO3 se obtuvo el valor más alto de BCR (10.6%) aunque este no fue significativamente diferente del control (Figura 9). La co-inoculación de la cepa *B. subtilis* DSO3 produjo larvas ligeramente más pesadas que aquellas que fueron cultivadas en ausencia de esta cepa (Tabla II), sin embargo, al analizar el peso de la biomasa larval total (harina) de dicho tratamiento no se evidenció efecto alguno (Figura 10). Una posible explicación de estos resultados podría ser debido a la efectividad de la cepa bacteriana para facilitar la descomposición de nutrientes, aunque no se evaluó la actividad enzimática de la cepa para poder confirmar este supuesto, se sabe de otras cepas de *B. subtilis* que han mejorado principalmente el peso larval y el porcentaje de RS, con diferentes niveles de efectividad. Por ejemplo, Yu et al. (2011) observaron que el peso larval de *H. illucens* incrementaba hasta en un 22% al utilizar estiércol de pollos coinoculado con tres cepas individuales de *B. subtilis* aisladas del intestino de la larva. El peso larval incrementó hasta un 9.42% con la cepa *B. natto* D (Yu et al., 2011)¹. Así también en el estudio de Xiao et al. (2018) utilizando estiércol de pollos y otra cepa de *B. subtilis* aislada del intestino de la larva se registró un incremento de 15.9 % y 12.7% en el peso larval y el porcentaje de RS, respectivamente.

En el caso del probiótico Oxynova® no se evidenció efectos significativos sobre los parámetros evaluados. Es posible que los resultados obtenidos con el producto se deban a la concentración que se utilizó en el tratamiento (0.002% p/p). Esta dosis fue utilizada en base a las indicaciones de la casa comercial, sin embargo esta concentración es muy baja en comparación con la utilizada en el estudio de Zheng et al. (2012) quienes utilizaron el producto Rid-X ® formulado a base de enzimas y bacterias. Aunque no se provee más información sobre la composición exacta del producto, los autores determinaron que 0.4% (p/p) era la concentración óptima para producir mayor cantidad de biodiesel. La dosis reportada es mucho mayor a la aplicada en nuestro estudio por lo que sería necesario determinar una concentración óptima de aplicación acorde al tipo de sustrato.

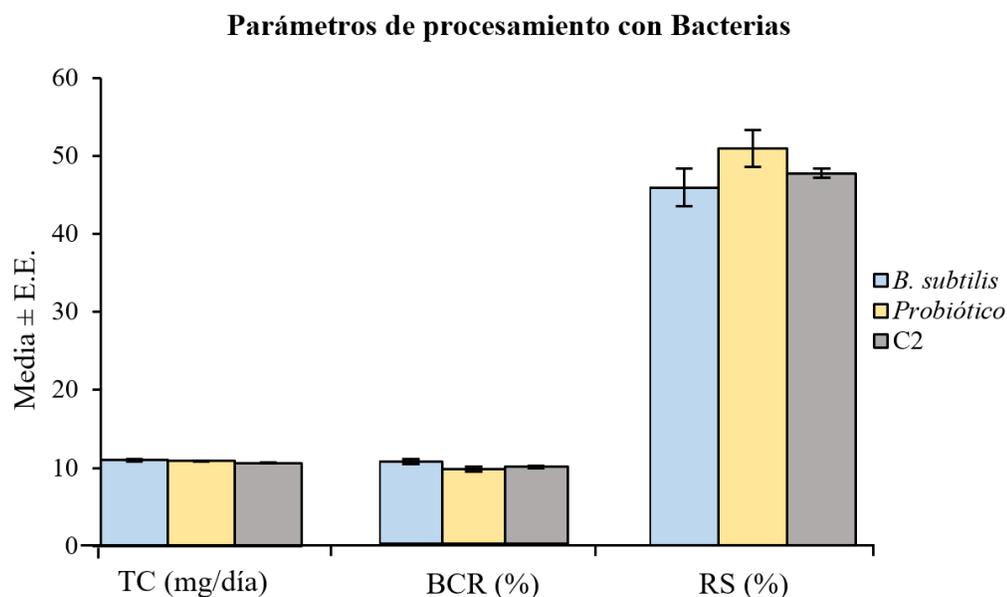


Figura 9. Tasa de crecimiento larval (TC), Eficiencia de la bioconversión (BCR) y reducción del sustrato (RS) del ensayo con bacterias ($P > 0.05$).

Tabla II. Resumen del peso larval inicial y final, tiempo de desarrollo (td), tasas de sobrevivencia y crecimiento larval ($n=4$, media \pm error estándar).

Tratamiento	PI inicial MF (mg larva ⁻¹)	PI final MF (mg larva ⁻¹)	PI final MS (mg larva ⁻¹)	Td (días)	Sobrevivencia (%)	Prepupas (%)
Ensayo 1						
C1*	8.08 \pm 0.18	105.49 \pm 2.09 ^A	30.50 \pm 0.52 ^A	8	99.5 \pm 0.5 ^A	9.8 \pm 4.0
<i>T. reesei</i> C2A	8.28 \pm 0.14	75.75 \pm 0.61 ^B	18.23 \pm 0.3 ^B	10	98.3 \pm 1.4 ^A	1.3 \pm 0.5
<i>Pleurotus sp.</i>	8.00 \pm 0.20	7.93 \pm 0.78 ^C	1.58 \pm 0.14 ^C	10	70.3 \pm 8.7 ^B	0
Ensayo 2						
C2*	3.03 \pm 0.05 ^{AB}	109.58 \pm 0.91	30.13 \pm 0.33 ^B	10	98.5 \pm 0.5	0
<i>B. subtilis</i> DSO3	3.10 \pm 0.01 ^A	113.08 \pm 1.56	32.98 \pm 1.09 ^A	10	96.0 \pm 0.4	0
Probiótico	2.88 \pm 0.06 ^B	111.78 \pm 0.50	30.48 \pm 0.50 ^B	10	95.0 \pm 3.8	0.3 \pm 0.3

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas para cada ensayo ($P < 0.05$).

*Controles, MF: peso en base fresca, MS: peso en base seca

4.3. Composición nutricional de la harina de larva

De acuerdo con los resultados obtenidos, no hubo diferencias significativas en el contenido de proteína cruda (PC) de la harina de larva ($P = 0.0536$). En este estudio hubo ligeramente menos proteína con *B. subtilis* DSO3 ($41.7 \pm 0.3\%$) que con el control ($43.0 \pm 0.3\%$), respectivamente) aunque estos no fueron significativamente diferentes (Figura 10). Los resultados del contenido de PC de la harina de larva difieren entre estudios. La PC en el control fue similar al reportado por Nyakeri et al. (2017) pero menor al hallado por Liu et al. (2018) (43.0 ± 0.3 , 43.0 ± 1.0 , y $49.9 \pm 0.21\%$, respectivamente) con el mismo tipo de sustrato. Se ha reportado que otras cepas de *B. subtilis* DSO3 que han presentado efectos benéficos en el desarrollo de larvas (Xiao et al., 2018; Yu et al., 2011), sin embargo no se ha reportado que la inclusión de estas cepas pueda tener algún efecto sobre el valor nutricional de la biomasa larval.

Una posible explicación a las variaciones en el contenido de CP entre estudios usando sustrato AC, podría ser debido a varias diferencias observadas en la metodología usada respecto a la edad de cosecha, el procesamiento postcosecha y el factor usado para cuantificar el contenido de proteína. Respecto a la edad de cosecha, en este estudio se decidió cosechar con la primera aparición de prepupas sin embargo la frecuencia con que se realizaron los monitoreos no permitió cumplir este parámetro cabalmente. En contraste en el estudio de Z. Liu et al. (2018) la cosecha la realizaron de forma paulatina, es decir cada vez que las larvas llegaban al último estadio larval (prepupas). El hecho de que todas las larvas hayan alcanzado el estadio de prepupas para el análisis químico podría explicar que en el estudio hayan obtenido biomasa larval con mayor contenido de proteína, pues se ha reportado que los nutrientes alcanzan su máxima acumulación en el estadio de prepupas (X. Liu et al., 2017). Por otro lado, se puede notar diferencias en cuanto a las condiciones de secado de la biomasa larval. En este estudio las larvas fueron inactivadas a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y luego secadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acuerdo a la metodología seguida por Gao et al. (2019). Esto difiere del trabajo de Z. Liu et al. (2018) en el que las larvas fueron secadas a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ y del trabajo de Nyakeri et al. (2017) en el cual se secó por solarización. En lo que concierne a la cuantificación de proteína, en el estudio de Nyakeri et al. (2017) el contenido total de N lo multiplicaron por 6.25, sin embargo como se explica en el trabajo de Janssen et al. (2017) el uso de este factor puede sobreestimar el contenido de proteína porque los insectos contienen otras fuentes de N no proteico como la quitina. En el presente estudio se usó el factor de conversión de 4.76 propuesto por Janssen et al. (2017). Un factor adicional a los tres mencionados podría ser la variación nutricional de AC que fue discutida en el objetivo anterior.

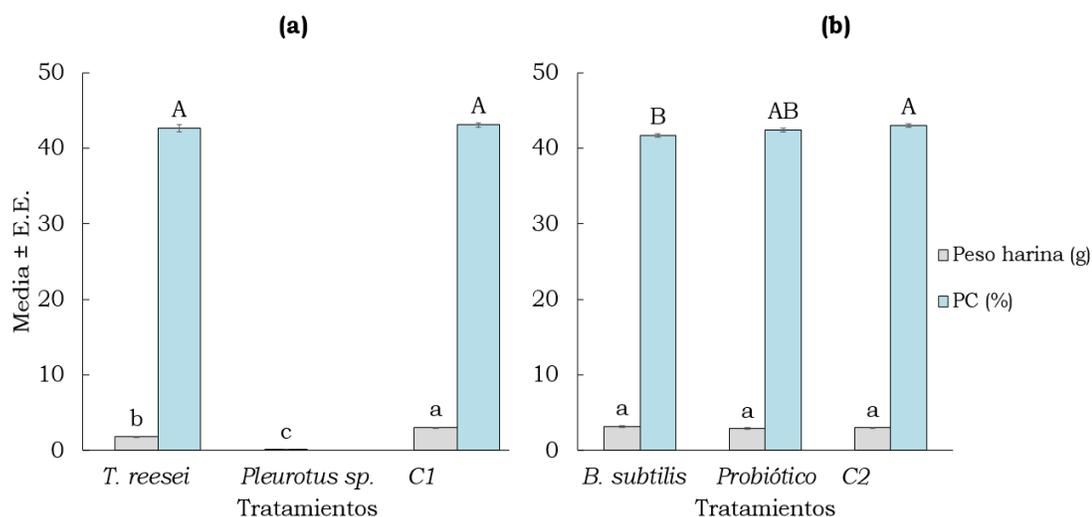


Figura 10. Peso de la harina de larva y su contenido de proteína cruda (PC) obtenidos de los ensayos con (a) hongos y (b) bacterias $n=4$. PC, % = $N \times 4.76$. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas según prueba de Tukey ($P < 0.05$).

4.4. Propiedades químicas del sustrato y los residuos

El contenido total de C del sustrato no varió después del proceso de bioconversión aún con la aplicación de los microorganismos ($P = 0.1983$). Este resultado es contrario a lo reportado por Rehman et al. (2017) quienes detectaron reducciones del contenido de C entre 50 a 60% al usar como sustrato estiércol bovino y pollinaza.

Por su parte, el contenido de N una vez finalizado el proceso si presentó una reducción significativa tanto en los tratamientos como en los controles ($P < 0.0001$). Se identificó una mayor reducción de N cuando se aplicó el probiótico comercial (4.2 ± 0.1 y $2.3 \pm 0.1\%$, respectivamente). Sin embargo, el contenido de N registrado en este tratamiento no se diferenció de su respectivo control (Tabla III). Por tanto, la reducción de N podría atribuirse a la inclusión de larvas en especial a la actividad de la microbiota presente a nivel del intestino larval en donde se ha demostrado que existe alta actividad enzimática. En el estudio de Callegari et al. (2020) lograron aislar 193 bacterias del intestino larval de *H. illucens* y se demostró que 17% de ellas presentaban actividad enzimática para hidrolizar proteína, adicionalmente un 33% y un 16% de las bacterias mostraron capacidad para reciclar el N procedente de la urea y ácido úrico del estiércol larval. El contenido de N determinado en este estudio fue inferior a lo reportado por Bava et al. (2019) (2.3 y 3.3%, respectivamente) para el mismo tipo de sustrato sin la adición de microorganismos exógenos. Esta diferencia en la reducción de N entre estudios podría

ser explicada por la plasticidad del insecto. En el estudio de Zhou et al. (2013) se mostró que *H. illucens* presenta esta característica, al determinar que tres cepas del insecto provenientes de Texas y China (Wuhan y Guangzhou) presentaban diferente comportamientos en cuanto a la reducción de N y del sustrato.

La relación C/N incrementó considerablemente en comparación con el sustrato antes del experimento. Este indicador es de interés porque permite inferir sobre la madurez de los abonos. Un compost maduro debe tener una relación C/N entre 10 y 15, si la relación es mayor o igual a 20 significa que el abono aún no está listo, hay todavía alto contenido de C y por tanto el N será liberado lentamente si es incorporado al suelo, en cambio si la relación es menor a 10 se entiende que hay una alta fracción de N (Garro, 2016; Román et al., 2013). En este último aspecto, si un material con alto contenido de N como AC es incorporado al suelo, el exceso de nitrógeno puede perderse por infiltración o volatilización lo que provoca contaminación del ambiente (Román et al., 2013). Los residuos obtenidos del tratamiento con *T. reesei* fueron los únicos que presentan potencial como abono. La relación C/N de este residuo del proceso de bioconversión se ubica dentro del rango óptimo de un compost maduro. En lo que respecta al pH, este pasó de ser moderadamente ácido (4.2) a ligeramente ácido (5.0 - 5.4) después del proceso (Tabla III). Debido a que el pH de un abono influye sobre el pH del suelo lo que a su vez tiene una incidencia directa sobre la asimilación de nutrientes, es necesario verificar que el abono esté dentro de un rango óptimo de 5 a 6 (IFA-FAO, 1992). Todos los valores de pH de los residuos del proceso de bioconversión estuvieron dentro del rango óptimo.

Tabla III. Propiedades químicas del sustrato AC y los residuos del proceso de bioconversión (n=4, media \pm error estándar)*.

Tratamiento	C, %	N, %	C/N	pH
Sustrato	42.6 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1 ^A	10.1 \pm 0.2 ^C	4.2 \pm 0.1 ^B
Residuos del sustrato				
<i>T. reesei</i> C2A	41.5 \pm 0.8	2.8 \pm 0.1 ^B	14.7 \pm 0.5 ^B	5.4 \pm 0.1 ^A
C1**	42.3 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2 ^{BC}	15.9 \pm 1.0 ^{AB}	5.3 \pm 0.1 ^A
<i>B. subtilis</i> DSO3	41.9 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2 ^{BC}	16.9 \pm 1.0 ^{AB}	5.1 \pm 0.1 ^A
Probiótico	42.1 \pm 0.5	2.3 \pm 0.1 ^C	18.2 \pm 0.5 ^A	5.1 \pm 0.1 ^A
C2**	40.8 \pm 0.4	2.4 \pm 0.1 ^{BC}	17.0 \pm 0.6 ^{AB}	5.0 \pm 0.2 ^A

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticas para cada ensayo según prueba de Tukey ($P < 0.05$)

*Valores expresados en base seca.

**Controles

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente estudio se analizaron los efectos de la inoculación de *Trichoderma reesei* C2A, *Pleurotus* sp., *Bacillus subtilis* DSO3, y un probiótico comercial en la bioconversión de afrecho de cervecería (AC). AC (pre)tratado fue utilizado como sustrato para el cultivo de larvas de *H. illucens* de seis días de edad.

El pretratamiento de AC por 7 días con *T. reesei* C2A dio como resultado una mayor reducción del sustrato y del contenido de N. Adicionalmente, aunque se produjo menor cantidad de harina de larva, su contenido de proteína fue similar al obtenido en el control. Se recomienda evaluar la aplicación de esta u otras cepas como pretratamiento de otros sustratos lignocelulósicos de menor valor nutricional que AC

La inclusión de *Pleurotus* sp. tuvo efectos negativos en el desarrollo larval. El peso larval después de diez días de cultivo no incrementó respecto al peso de siembra por lo que el experimento con este hongo fue suspendido. Se concluye que el sustrato AC pretratado por 7 días con *Pleurotus* sp. no es recomendable suministrarlo directamente a larvas de 6 días de edad de *H. illucens* porque limita su desarrollo.

La inoculación de *B. subtilis* DSO3 mostró mejoras solo en el peso larval promedio. Se recomienda evaluar en futuros estudios la aplicación de otras cepas individuales o en complejo y establecer las condiciones óptimas de fermentación.

El probiótico usado en este estudio no tuvo efectos en el desarrollo larval ni en la bioconversión, pero sí hubo efectos positivos en la reducción de N del sustrato inicial. No obstante, debido a su contenido de enzimas y bacterias benéficas se sugiere evaluar su aplicación como pretratamiento de otros RSA a una mayor concentración.

BIBLIOGRAFÍA

- Alananbeh, K. M., Bouqellah, N. A., & Al Kaff, N. S. (2014). Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(6), 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.001>
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Awasthi, M. K., Liu, T., Awasthi, S. K., Duan, Y., Pandey, A., & Zhang, Z. (2020). Manure pretreatments with black soldier fly *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae): A study to reduce pathogen content. *Science of the Total Environment*, 737, 139842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139842>
- Bánfi, R., Pohner, Z., Kovács, J., Luzics, S., Nagy, A., Dudás, M., Tanos, P., Márialigeti, K., & Vajna, B. (2015). Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. *Fungal Biology*, 119(12), 1354–1363. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.003>
- Barragan-Fonseca, K.B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed – a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2), 105–120. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>
- Barragan-Fonseca, Karol B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2018). Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(9), 761–770. <https://doi.org/10.1111/eea.12716>
- Bartaburu, D., Montes, E., & Pereira, M. (2012). Utilización de la paja de arroz en la Alimentación Animal. *Alternativas Tecnológicas Para Enfrentar Situaciones de Crisis Forrajera*, 18–19.
- Bava, L., Jucker, C., Gislón, G., Lupi, D., Savoldelli, S., Zucali, M., & Colombini, S. (2019). Rearing of *Hermetia illucens* on Different Organic By-Products: Influence on Growth, Waste Reduction, and Environmental Impact. *Animals*, 9(6), 289. <https://doi.org/10.3390/ani9060289>
- BIOMÉRIEUX. (2007). *Manual de usuario DENSIMAT* (Issue 0).

- Bonelli, M., Bruno, D., Brilli, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21144955>
- Bosch, G., Oonincx, D. G. A. B., Jordan, H. R., Zhang, J., van Loon, J. J. A., van Huis, A., & Tomberlin, J. K. (2019). Standardisation of quantitative resource conversion studies with black soldier fly larvae. *Journal of Insects as Food and Feed*, *6*(2), 95–109. <https://doi.org/10.3920/jiff2019.0004>
- Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Research International*, *105*(November 2017), 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.012>
- Callegari, M., Jucker, C., Fusi, M., Leonardi, M. G., Daffonchio, D., Borin, S., Savoldelli, S., & Crotti, E. (2020). Hydrolytic Profile of the Culturable Gut Bacterial Community Associated With *Hermetia illucens*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01965>
- Cammack, J. A., & Tomberlin, J. K. (2017). The impact of diet protein and carbohydrate on select life-history traits of the black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Insects*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/insects8020056>
- Castellanos, S., Gamarra, J., Gómez, C., & Fernández, M. (2017). Amonificación de la panca de maíz (*Zea mays* L) con tres niveles de urea para la mejora de su digestibilidad. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *28*(1), 78–85. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V28I1.12946>
- Chaquilla-Quilca, G., Renato Balandrán-Quintana, R., Mendoza-Wilson, A. M., & Mercado-Ruiz, J. N. (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *Bioteconología y Ciecniás Agropecuarias*, *12*(2), 137–147.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Av. Cien. Ing*, *4*(4), 15–46. http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/15
- Chen, S., Liao, W., Liu, C., Wen, Z., Kincaid, R. L., Harrison, J. H., Elliott, D. C., Brown, M. D., Solana, A. E., & Stevens, D. J. (2003). *Value-Added Chemicals from Animal Manure*. <https://doi.org/10.2172/15009485>

- Cheng, J. Y. K., Chiu, S. L. H., & Lo, I. M. C. (2017). Effects of moisture content of food waste on residue separation, larval growth and larval survival in black soldier fly bioconversion. *Waste Management*, *67*(June 2017), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.046>
- Chia, S. Y., Tanga, C. M., Khamis, F. M., Mohamed, S. A., Salifu, D., Sevgan, S., Fiaboe, K. K. M., Niassy, S., Van Loon, J. J. A., Dicke, M., & Ekesi, S. (2018). Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206097>
- Cianchetta, S., Maggio, B. Di, Burzi, P. L., & Galletti, S. (2014). Evaluation of selected white-rot fungal isolates for improving the sugar yield from wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014 *173*:2, *173*(2), 609–623. <https://doi.org/10.1007/S12010-014-0869-3>
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002 *58*:5, *58*(5), 582–594. <https://doi.org/10.1007/S00253-002-0930-Y>
- Cullere, M., Tasoniero, G., Giaccone, V., Miotti-Scapin, R., Claeys, E., De Smet, S., & Dalle Zotte, A. (2016). Black soldier fly as dietary protein source for broiler quails: apparent digestibility, excreta microbial load, feed choice, performance, carcass and meat traits. *Animal*, *10*(12), 1923–1930. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001270>
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, *28*(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Díaz Almeida, C. M. (2020). *Bacillus subtilis* y su utilización en la biotecnología. 978–959.
- Diclaro, J. W., & Kaufman, P. E. (2012). Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta : Diptera : Stratiomyidae). *IFAS Extension*, *5*. <http://sfyl.ifas.ufl.edu/about/>
- Diener, S, Lalander, C., Zurbrugg, C., & Vinnerås, B. (2015). Opportunities and constraints for medium- scale organic waste treatment with fly larvae. *15th International Waste Management and Landfill Symposium, March 2016*. http://www.eawag.ch/fileadmin/Domain1/Abteilungen/sandec/publikationen/SWM/BSF/Opportunities_constraints_medium_scale.pdf
- Diener, Stefan, Studt Solano, N. M., Roa Gutiérrez, F., Zurbrugg, C., & Tockner, K. (2011). Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly

- larvae. *Waste and Biomass Valorization*, 2(4), 357–363.
<https://doi.org/10.1007/s12649-011-9079-1>
- Diener, Stefan, Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management and Research*, 27(6), 603–610.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Dobermann, D., Field, L. M., & Michaelson, L. V. (2019). Using *Hermetia illucens* to process Ugandan waragi waste. *Journal of Cleaner Production*, 211, 303–308.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.176>
- Dortmans, B., Diener, S., Verstappen, B., & Zurbrügg, C. (2017). *Black Soldier Fly Biowaste Processing*. <https://bit.ly/3cYFEDZ>
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36–52.
<https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.07.007>
- FAO. (2009). *How to feed the world in 2050*.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Mudura, E., Dulf, F. V., Vodnar, D. C., And, M. T., & Salanță, L. C. (2017). Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients. *IntechOpen*, 32, 137–144.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69231>
- FEDNA. (n.d.). *Bagazo de cerveza húmedo*. Retrieved February 6, 2021, from <https://bit.ly/3rQfq6>
- FEDNA. (2016). *Pulpa de remolacha*.
http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/pulpa-de-remolacha
- Filian, W., Salinas, J., Arias, R., & Gómez, J. (2020). Evaluación físico-química de residuos agroindustriales para la alimentación animal. *Journal of Science and Research*, 5(1), 182–199.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7712461>
- Gao, Z., Wang, W., Lu, X., Zhu, F., Liu, W., Wang, X., & Lei, C. (2019). Bioconversion performance and life table of black soldier fly (*Hermetia illucens*) on fermented maize straw. *Journal of Cleaner Production*, 230, 974–980.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.074>

- Garro, J. (2016). El suelo y los abonos orgánicos. *Sector Agro Alimentario*, 20; <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F04-10872.pdf>
- Gerhardt. (2021). *Análisis de nitrógeno - El método de Jean Dumas*. 2.
- Gold, M., Tomberlin, J. K., Diener, S., Zurbrügg, C., & Mathys, A. (2018). Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Management*, 82, 302–318. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- Gomes, E. V., Ulhoa, C. J., Cardoza, R. E., Silva, R. N., & Gutiérrez, S. (2017). Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the Regulation of Botrytis Virulence- and Tomato Defense-Related Genes. *Frontiers in Plant Science*, 0, 880. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00880>
- Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., & Pohleven, F. (2008). The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnology*, 25(2–3), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.003>
- Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., & Silva, R. N. (2016). The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? *Trends in Biotechnology*, 34(12), 970–982. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003>
- Hamdache, A., Ezziyiani, M., Alain, B., & Lamarti, A. (2012). Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. *African Journal of Biotechnology*, 11(9), 2210–2217. <https://doi.org/10.5897/ajb11.645>
- Hauser, M. (2015). The historical spread of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera, Stratiomyidae, Hermetiinae), and its establishment in Canada. *The Journal of the Entomological Society of Ontario*, 146(0).
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ahead*, 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205>
- Hogsette, J. A. (1992). New diets for production of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2291–2294. <https://doi.org/10.1093/JEE/85.6.2291>
- Holmes, L. A., Vanlaerhoven, S. L., & Tomberlin, J. K. (2012). Relative Humidity Effects on the Life History of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Environmental Entomology*, 41(4), 971–978.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1603/en12054>

IFA-FAO. (1992). *Los fertilizantes y su uso*. <http://www.fao.org/3/x4781s/x4781s.pdf>

Isibika, A., Vinnerås, B., Kibazohi, O., Zurbrügg, C., & Lalander, C. (2019). Pre-treatment of banana peel to improve composting by black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.), Diptera : Stratiomyidae) larvae. *Waste Management*, *100*, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.09.017>

Janssen, R. H., Vincken, J. P., Van Den Broek, L. A. M., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. M. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(11), 2275–2278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>

Jaramillo, I., & Sanchez, A. (2018). Identification of Mass Flow Dynamics in a Pretreatment Continuous Tubular Reactor. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 43). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64235-6.50028-0>

Julita, U., Suryani, Y., Kinasih, I., Yuliawati, A., Cahyanto, T., Maryeti, Y., Permana, A. D., & Fitri, L. L. (2018). Growth performance and nutritional composition of black soldier fly, *Hermetia illucens* (L), (Diptera : Stratiomyidae) reared on horse and sheep manure. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *187*(1), 0–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/187/1/012071>

Jurado, M. Á. (2017). *Fraccionamiento del bagazo cervecero bajo el concepto de biorrefinería*. <https://bit.ly/3eQGeEO>

Karagodin, V. P., Yurina, O. V., & Bastrakov, A. I. (2018). Studying development of *Hermetia illucens* fly larvae cultivated on high cellulose plant substrates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *24*(2), 279–284.

Khan, S. M., Nawaz, A., Malik, W., Javed, N., Yasmin, T., ur Rehman, M., Qayyum, A., Iqbal, Q., Ahmad, T., & Khan, A. A. (2011). Morphological and molecular characterization of Oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *African Journal of Biotechnology*, *10*(14), 2638–2643. <https://doi.org/10.5897/AJB10.499>

Kim, J.-G., Choi, Y.-C., Choi, J.-Y., Kim, W.-T., Jeong, G.-S., Park, K.-H., & Hwang, S.-J. (2008). Ecology of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratmyidae) in Korea. *Korean Journal of Applied Entomology*, *47*(4), 337–343. <https://doi.org/10.5656/ksae.2008.47.4.337>

Kumar, V., Fawole, F. J., Romano, N., Hossain, M. S., Labh, S. N., Overturf, K., & Small, B. C. (2021). Insect (black soldier fly, *Hermetia illucens*) meal

supplementation prevents the soybean meal-induced intestinal enteritis in rainbow trout and health benefits of using insect oil. *Fish and Shellfish Immunology*, 109, 116–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.008>

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). La secuencia completa del genoma de la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256. <http://www.nature.com/articles/36786>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>

Leiber, F., Gelencsér, T., Stamer, A., Amsler, Z., Wohlfahrt, J., Früh, B., & Maurer, V. (2017). Insect and legume-based protein sources to replace soybean cake in an organic broiler diet: Effects on growth performance and physical meat quality. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 32(1), 21–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1742170515000496>

Li, S., Ji, H., Zhang, B., Zhou, J., & Yu, H. (2017). Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological stru. 477(March), 62–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.015>

Li, T. H., Zhang, C. R., Che, P. F., Ma, Y., & Zang, L. S. (2021). Recycling of spent mushroom substrate and food waste: utilisation as feed materials for black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.) Diptera: Stratiomyidae). <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0105>, 7(4), 409–417. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0105>

Li, W., Li, M., Zheng, L., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, Z., Ma, Z., & Li, Q. (2015). Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid accumulation in black soldier fly. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0306-z>

Liu, C., Wang, C., Yao, H., & Chapman, S. J. (2021). Pretreatment is an important method for increasing the conversion efficiency of rice straw by black soldier fly larvae based on the function of gut microorganisms. *Science of the Total Environment*, 762, 144118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144118>

Liu, X., Chen, X., Wang, H., Yang, Q., Ur Rehman, K., Li, W., Cai, M., Li, Q., Mazza,

- L., Zhang, J., Yu, Z., & Zheng, L. (2017). Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLOS ONE*, *12*(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182601>
- Liu, Z., Minor, M., Morel, P. C. H., & Najar-Rodriguez, A. J. (2018). Bioconversion of Three Organic Wastes by Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *Environmental Entomology*, *47*(6), 1609–1617. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy141>
- Manurung, R., Supriatna, A., & Esyanthi, R. R. (2016). Bioconversion of Rice straw waste by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.): Optimal feed rate for biomass production. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *4*(4), 1036–1041. <https://bit.ly/3fM8bi2>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, *28*, 1–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001
- Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Nur Cahyanto, M., Lundquist, K., & Taherzadeh, M. J. (2011). Biological pretreatment: Review. *BioResources*, *6*(4), 5224–5259.
- Miranda, C. D., Cammack, J. A., & Tomberlin, J. K. (2020). Mass Production of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Manure Types. *Animals*.
- Müller, A., Wolf, D., & Gutzeit, H. O. (2017). The black soldier fly, *Hermetia illucens* - A promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *72*(9–10), 351–363. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>
- Mulyono, M., Yudianto, V. D., Suthama, N., & Sunarti, D. (2019). The effect of fermentation time and Trichoderma levels on digestibility and chemical components of Black Soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Livestock Research for Rural Development*, *31*(10).
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(7), 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Myers, H. M., Tomberlin, J. K., Lambert, B. D., & Kattes, D. (2008). Development of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Fed Dairy Manure. *Environmental Entomology*, *37*(1), 11–15. <https://doi.org/10.1093/ee/37.1.11>

- Nguyen, T. T. X., Tomberlin, J. K., & Vanlaerhoven, S. (2015). Ability of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae to Recycle Food Waste. *Environmental Entomology*, 44(2), 406–410. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>
- Nyakeri, E. M., Ogola, H. J. O., Ayieko, M. A., & Amimo, F. A. (2017). Valorisation of organic waste material: Growth performance of wild black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on different organic wastes. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(3), 193–202. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0004>
- Oonincx, D. G. A. B., van Huis, A., & van Loon, J. J. A. (2015). Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(2), 131–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.3920/jiff2014.0023>
- Ovando-Chacón, S. L., & Waliszewski, K. N. (2005). Commercial cellulase preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 113–122. www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
- Ozcirak Ergun, S., & Ozturk Urek, R. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>
- Palma, L., Fernandez-Bayo, J., Niemeier, D., Pitesky, M., & VanderGheynst, J. S. (2019). Managing high fiber food waste for the cultivation of black soldier fly larvae. *Npj Science of Food*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0047-7>
- Parra Paz, A. S., Carrejo, N. S., & Gómez Rodríguez, C. H. (2015). Effects of Larval Density and Feeding Rates on the Bioconversion of Vegetable Waste Using Black Soldier Fly Larvae *Hermetia illucens* (L.), (Diptera: Stratiomyidae). *Waste and Biomass Valorization*, 6(6), 1059–1065. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12649-015-9418-8>
- Paudel, S. R., Banjara, S. P., Choi, O. K., Park, K. Y., Kim, Y. M., & Lee, J. W. (2017). Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. *Bioresource Technology*, 245(July), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.182>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., & Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 51(1), 47–52. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223153894008>

- Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., & Jäger, H. (2017). Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(8), 1410–1420. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>
- Putra, E. R., Hutami, R., Suantika, G., & Rosmiati, M. (2017). Application of Compost Produced by Bioconversion of Coffee Husk by Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens*) as Solid Fertilizer to Lettuce (*Lactuca Sativa* Var . Crispa) : Impact to Growth. *Proceedings of International Conference on Green Technology*, 8(1), 38–44.
- Putro, J. N., Soetaredjo, F. E., Lin, S. Y., Ju, Y. H., & Ismadji, S. (2016). Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances*, 6(52), 46834–46852. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/c6ra09851g>
- Quevedo-Hidalgo, C., Cesar, P., Marina, A., & Enrique, M. (2015). Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 117–127. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.eple>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., & Polak-Berecka, M. (2020). Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ*, 8, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>
- Ramlucken, U., Lalloo, R., Roets, Y., Moonsamy, G., van Rensburg, C. J., & Thantsha, M. S. (2020). Advantages of Bacillus-based probiotics in poultry production. *Livestock Science*, 241, 104215. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2020.104215>
- Rebolledo-Prudencio, O. G., Dautt-Castro, M., Estrada-Rivera, M., González-López, M. del C., Jijón-Moreno, S., & Casas-Flores, S. (2020). Trichoderma in the rhizosphere. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 3–38). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819453-9.00001-5>
- Rehman, K. ur, Cai, M., Xiao, X., Zheng, L., Wang, H., Soomro, A. A., Zhou, Y., Li, W., Yu, Z., & Zhang, J. (2017). Cellulose decomposition and larval biomass production from the co-digestion of dairy manure and chicken manure by mini-livestock (*Hermetia illucens* L.). *Journal of Environmental Management*, 196, 458–465. <https://doi.org/https://doi.org/110.1016/j.jenvman.2017.03.047>
- Rehman, K. ur, Rehman, A., Cai, M., Zheng, L., Xiao, X., Somroo, A. A., Wang, H., Li, W., Yu, Z., & Zhang, J. (2017). Conversion of mixtures of dairy manure and soybean curd residue by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.). *Journal*

of *Cleaner Production*, 154(June), 366–373.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.019>

Rehman, K. ur, Rehman, R. U., Somroo, A. A., Cai, M., Zheng, L., Xiao, X., Ur Rehman, A., Rehman, A., Tomberlin, J. K., Yu, Z., & Zhang, J. (2019). Enhanced bioconversion of dairy and chicken manure by the interaction of exogenous bacteria and black soldier fly larvae. *Journal of Environmental Management*, 237(February), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.048>

Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor*. www.fao.org/publications

Salmones, D. (2018). Pleurotus djamor, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. *Scientia Fungorum*, 46, 73–85. <https://doi.org/10.33885/sf.2017.46.1177>

Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65(2014), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068>

Sánchez Laiño, A., Torres Navarrete, E., Vargas Burgos, J., Sánchez Torres, J., & Sánchez Vélez, N. (2015). Valoración nutritiva del rastrojo de Zea mays y Oryza sativa para la alimentación de ovinos en el trópico ecuatoriano. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 4(3), 235–249.

Sanderson, K. (2011). Lignocellulose a chewy problem. *Nature*, 474. <https://www.nature.com/articles/474S012a.pdf>

Sarsaiya, S., Jain, A., Kumar Awasthi, S., Duan, Y., Kumar Awasthi, M., & Shi, J. (2019). Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology*, 291(July), 121905. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121905>

Setti, L., Francia, E., Pulvirenti, A., Gigliano, S., Zaccardelli, M., Pane, C., Caradonia, F., Bortolini, S., Maistrello, L., & Ronga, D. (2019). Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.), Diptera: Stratiomyidae) larvae processing residue in peat-based growing media. *Waste Management*, 95, 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.017>

Sheppard, C., Newton, L., Thompson, S. A., & Savage, S. (1994). A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource Technology*, 50, 275–279.

Sheppard, D. C., Tomberlin, J. K., Joyce, J. A., Kiser, B. C., & Sumner, S. M. (2002).

- Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(4), 695–698. <https://doi.org/https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
- Shumo, M., Osuga, I. M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. 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), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46603-z>
- Sijinamanoj, V., Muthukumar, T., Muthuraja, R., Rayappan, K., Karmegam, N., Saminathan, K., Govarthanan, M., & Kathireswari, P. (2021). Ligninolytic valorization of agricultural residues by *Aspergillus nomius* and *Trichoderma harzianum* isolated from gut and comb of *Odontotermes obesus* (Termitidae). *Chemosphere*, 284, 131384. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131384>
- Silva, R. N., Monteiro, V. N., Steindorff, A. S., Gomes, E. V., Noronha, E. F., & Ulhoa, C. J. (2019). Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology*, 123(8), 565–583. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Singhvi, M. S., & Gokhale, D. V. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23–24), 9305–9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
- Somroo, A. A., ur Rehman, K., Zheng, L., Cai, M., Xiao, X., Hu, S., Mathys, A., Gold, M., Yu, Z., & Zhang, J. (2019). Influence of *Lactobacillus buchneri* on soybean curd residue co-conversion by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for food and feedstock production. *Waste Management*, 86, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.01.022>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). Trichoderma: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9060762>
- Sousa, G. O. C., Rodrigues, R. C., Lima, J. R. L., Lima, N. M., Miranda, B. E. C., Jesus, A. P. R., Parente, H. N., & Costa, C. D. S. (2019). Nutritional value of dehydrated maize straw ammoniated with urea. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, 20. <https://doi.org/10.1590/S1519-9940200132019>
- Stamer, A., Wesselss, S., Neidigk, R., & Hoerstgen-Schwark, G. (2014). Black Soldier

Fly (*Hermetia illucens*) larvae-meal as an example for a new feed ingredients ' class in aquaculture diets. *Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference. 'Building Organic Bridges', at the Organic World Congress, October, 13–15.*

Thiago, R. dos S. M., Pedro, P. M. de M., & Eliana, F. C. S. (2014). Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.5897/jbd2014.0043>

Tomberlin, Jeffery K., Adler, P. H., & Myers, H. M. (2009). Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environmental Entomology*, 38(3), 930–934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1603/022.038.0347>

Tomberlin, Jeffrey K., & Sheppard, D. C. (2002). Factors influencing Mating and Oviposition of Black Soldier Fly Flies in a Colony. In *Journal of Entomological Science* (Vol. 37, Issue 4, pp. 345–352).

Tsegaye, Z., & Tefera, G. (2018). Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* Kumm, 1871) using Agro-Industrial Residues. *Journal of Applied Microbiological Research*, 1(1), 1–6. https://www.researchgate.net/publication/323029481_Cultivation_of_oyster_mushroom_Pleurotus_ostreatus_Kumm_1871_using_agro_industrial_residues

van der Fels-Klerx, H. J., Camenzuli, L., van Der Lee, M. K., & Oonincx, D. G. A. B. (2016). Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>

van Huis, A. (2013). Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 563–583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>

Wong, C. Y., Ho, Y. C., Lim, J. W., Show, P. L., Chong, S., Chan, Y. J., Ho, C. D., Mohamad, M., Wu, T. Y., Lam, M. K., & Pan, G. T. (2020). In-situ yeast fermentation medium in fortifying protein and lipid accumulations in the harvested larval biomass of black soldier fly. *Processes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/pr8030337>

Wong, C. Y., Lim, J. W., Chong, F. K., Lam, M. K., Uemura, Y., Tan, W. N., Bashir, M. J. K., Lam, S. M., Sin, J. C., & Lam, S. S. (2020). Valorization of exo-microbial fermented coconut endosperm waste by black soldier fly larvae for simultaneous biodiesel and protein productions. *Environmental Research*, 185(April), 109458. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109458>

Xiao, X., Mazza, L., Yu, Y., Cai, M., Zheng, L., Tomberlin, J. K., Yu, J., van Huis, A.,

- Yu, Z., Fasulo, S., & Zhang, J. (2018). Efficient co-conversion process of chicken manure into protein feed and organic fertilizer by *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae) larvae and functional bacteria. *Journal of Environmental Management*, 217, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.122>
- Yildirim-Aksoy, M., Eljack, R., Schrimsher, C., & Beck, B. H. (2020). Use of dietary frass from black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, in hybrid tilapia (Nile x Mozambique, *Oreochromis niloticus* x *O. mozambique*) diets improves growth and resistance to bacterial diseases. *Aquaculture Reports*, 17(April), 100373. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100373>
- Yu, G., Cheng, P., Chen, Y., Li, Y., Yang, Z., Chen, Y., & Tomberlin, J. K. (2011). Inoculating poultry manure with companion bacteria influences growth and development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Environmental Entomology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/10.1603/EN10126>
- Zheng, L., Hou, Y., Li, W., Yang, S., Li, Q., & Yu, Z. (2012). Biodiesel production from rice straw and restaurant waste employing black soldier fly assisted by microbes. *Energy*, 47(1), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.09.006>
- Zhineng, Y., Ying, M., Bingjie, T., Rouxian, Z., & Qiang, Z. (2021). Intestinal microbiota and functional characteristics of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01626-8>
- Zhou, F., Tomberlin, J. K., Zheng, L., Yu, Z., & Zhang, J. (2013). Developmental and Waste Reduction Plasticity of Three Black Soldier Fly Strains (Diptera: Stratiomyidae) Raised on Different Livestock Manures. *Journal of Medical Entomology*, 50(6), 1224–1230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1603/me13021>
- Zoghalmi, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7(December). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

ANEXOS



Figura 11. Procesamiento de larvas postcosecha durante el estudio preliminar.



Figura 12. AC pretratado con *T. reesei* C2A antes (izquierda) y después del proceso de bioconversión (centro). Larvas obtenidas del tratamiento (derecha).



Figura 13. AC pretratado con *Pleurotus* sp. después del proceso de bioconversión (izquierda) y larvas obtenidas de ese tratamiento (derecha).



Figura 14. Muestras de harina de larva (izquierda) y AC (derecha) después de la molienda.