

10
2Ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL: DIAGNOSTICOS
SEROLOGICOS RAPIDOS DE LA COLIBACILOSIS
PORCINA "VIABILIDAD DE E. Coli EN LA
PREPARACION DE HARINA DE LARVA DE MOSCA
DOMESTICA PARA SER UTILIZADA COMO
INGREDIENTE ALTERNATIVO EN LA
ALIMENTACION DEL CERDO"**

**INFORME DE SERVICIO
SOCIAL - TITULACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE DELGADO SAMANIEGO**

ASESORES: M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

MVZ ROMAN JAVIER MARTINEZ RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

270143



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN. Q. Ma del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de

El Informe de Servicio Social: Diagnosticos Serológicos Papidos de la Coli-
bacilosis Porcina. "Virulencia de E. coli en la Preparación de Harina de
Larva de Mosca Doméstica para ser Utilizada como Ingrediente Alternativo
en la Alimentación del Cerdo".

que presenta la pasante: María Guadalupe Delgado Samaniego
con número de cuenta: 9256385-2 para obtener el TITULO de
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de Octubre de 1998

PRESIDENTE M. en C. Florencia Gutierrez Estrada

VOCAL M. en C. Mara Ines Alvarez Nahuque

SECRETARIO M. en C. Adriana Miranda Bousquets

PRIMER SUPLENTE M. en C. Guadalupe Herrera Villarreal

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. María de la Luz Contreras Jarro

Dedicatorias

A ti Dios por concederme la gracia de tener unos padres tan maravillosos como los míos **Gracias Dios.**

A ti padre que siempre me transmitiste tu ejemplo de superación, de fe, de constancia, a ti a quien debo mi necesidad de alcanzar las metas propuestas y porque deseo con todo el corazón que tú te llegues a sentir tan orgulloso de mí, como yo lo estoy de ser tu hija, por todo esto, te dedico este trabajo, como una forma de mostrarte mi agradecimiento, además mostrarte que tus esfuerzos al proporcionarme siempre todo lo que te he pedido han tenido un fruto. **GRACIAS Papá te quiero mucho.**

A ti madre mía que con tu fe y tu confianza en mí, así como por tu ayuda y tus desvelos al estar a mi lado, cuando tenía que estudiar, por contar con tu presencia y atención para cuando estaba triste, o alegre, en fin, porque en todo momento he podido contar contigo, pero sobre todo por tu apoyo y amistad. Te dedico este trabajo, que más que ser un logro mío es un logro de ambas porque para llegar a lograrlo tu presencia fue lo más indispensable para mí, **GRACIAS mamita te quiero mucho.**

A todos y cada uno de mis hermanos, por que siempre y en todo momento he podido contar con su apoyo, con su ayuda o simplemente con su presencia, porque siempre han creído en mi y por su cariño, los quiero mucho **GRACIAS:**

Lilia
Martha
Mario
Sandra
Carmelita

A ti Pedro por tu presencia, por tu apoyo y tu cariño, por la ayuda que en todo momento me brindaste para que llegara a alcanzar mi sueño, que espero compartas conmigo. Por que tú has sido una parte muy importante de la inspiración que necesitaba para llegar hasta aquí y finalmente porque te quiero mucho **GRACIAS AMOR, POR ESTAR CONMIGO.**

A mi querida asesora, la M en C Clara Inés Alvarez Manrique quien en todo momento me brindo su ayuda, su apoyo y su amistad, así como por su valiosa guía que me ha ayudado a alcanzar la meta más próxima de mi vida, que culmina con la realización de este trabajo **GRACIAS**.

A la futura M en C Gloria Leticia García García por su apoyo tan grande y su ayuda pero sobre todas las cosas por ser mi amiga **GRACIAS**.

Al señor Juan Ignacio Vidal Arellano por su valioso apoyo en la realización de este trabajo y por su amistad.

INDICE

	PAGINA
INDICE DE FIGURAS	I
Abreviaturas	II
1. RESUMEN	III
2. INTRODUCCION	I
3. JUSTIFICACION	20
4. OBJETIVOS	21
5. MATERIALES Y METODOS	24
5.1 Reproducción masiva de moscas	26
5.2 Producción de larva bajo condiciones de asepsia	30
5.3 Obtención aséptica de larvas de mosca	32
5.4 Detección de m.o. a través de las diferentes generaciones	33
5.5 Lavado y desinfección de larvas para la eliminación de bacterias	34
5.6 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca y larva seca	35
5.6.1 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca	35
5.6.2 Cuantificación de bacterias coliformes en larva seca 65°/24h	36
5.7 Contaminación controlada de larvas de mosca con <i>E. coli</i> enterotoxigénica	37
5.7.1 Preparación de inóculo	37
5.8 Cuantificación de <i>E. coli</i> enterotoxigénica (LT,ST) inoculada en larva fresca y larva seca	38
5.8.1 <i>E. coli</i> enterotoxigénica inoculada en sustrato con larva fresca	38
5.8.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica inoculada en sustrato con larva seca (T= 65 C, t=24h)	39
5.9 Prueba de reactivación de <i>E. coli</i> enterotoxigénica en producto seco	40
5.10 Determinación de toxinas LT y ST de en larva seca infectada experimentalmente	40
5.10.1 Prueba del ratón lactante	41
5.10.2 Determinación de la presencia de LT, con la prueba de ELISA, según la técnica propuesta por Ristaino y col., (1983)	43
5.11 Análisis Químico Proximal	45
5.12 Digestibilidad de proteína	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Producción de larva bajo condiciones de asepsia	47
6.2 Detección de m.o. a través de las diferentes generaciones de larvas	48
6.3 Resultado del lavado y desinfección de larvas para la eliminación de bacterias	49
6.4 Resultados del análisis cuantitativo de bacterias coliformes en larva fresca y larva seca (65°C/24h)	50
6.5 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (LT+, ST+) en UFC/g inoculada en larva fresca y larva seca (65°c/24h)	52
6.6 Determinación de coliformes totales (NMP) reactivados en larva seca	53
6.7 Determinación serológica de toxina LT y ST de <i>E. coli</i> en larva seca infectada experimentalmente	54
6.8 Composición proximal	55
6.9 Digestibilidad de proteína	56

7. DISCUSION	57
7.1 Producción aséptica de larva de mosca	58
7.2 Detección externa e interna de m.o. a través de diferentes generaciones	61
7.3 Lavado y desinfección de larvas para la eliminación de bacterias	62
7.4 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca y larva seca	63
7.5 Cuantificación de <i>E. coli</i> enterotoxigénica (LT+,ST+) inoculada en larva fresca y larva seca (65°C /24h)	66
7.6 Determinación de toxinas LT y ST de <i>E. coli</i> en harina de larva de mosca.	67
7.7 Composición Proximal	67
7.8 Digestibilidad de proteína	68
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
9. APENDICES	73
10. BIBLIOGRAFIA	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cuadro General	23
Figura 2 Cuadro metodológico	25
Figura 3 Caja para la reproducción de moscas	26
Figura 4 Recipientes utilizados	27
Figura 5 Diagrama de flujo del proceso de obtención de larva de mosca	29

ABREVIATURAS

NPM	Técnica del Número Más Probable
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ST+	Toxina estable al calor
LT+	Toxina lábil al calor
PBS-Tween	Solución buffer de fosfatos + Tween
SSF	Solución Salina Fisiológica
AQP	Análisis Químico Proximal

1.- RESUMEN

La alimentación es uno de los conceptos de mayor repercusión en los costos de producción porcícola. Se han realizado investigaciones, para la producción de proteína a partir del cultivo de larva de mosca en excreta, pudiendo ser utilizada para la extracción de proteína de estiércol ya que es de fácil producción y sus perfiles nutritivos son buenos. Sin embargo, un gran número de bacterias están presentes regularmente en muchas de las sustancias de las cuales se alimentan estas larvas. Existe escasa información sobre la posibilidad de transmisión de agentes patógenos a través de la larva de mosca. Con la finalidad de generar información para determinar el posible riesgo bacteriológico de la larva de mosca al utilizarla como fuente de proteína para la alimentación de cerdos. Se evaluó la persistencia de bacterias mediante métodos físicos y químicos y la eficiencia de un tratamiento de secado para mejorar la calidad microbiológica de la larva, inoculando previamente los huevecillos con una dosis conocida de *Escherichia coli* productora de toxina LT y ST. Se cuantificó la cantidad de *E. coli* en el producto seco por la técnica del Número Más Probable y, las muestras que fueron negativas se sometieron a un proceso de reactivación bacteriana. Al producto seco se le determinó la presencia de toxinas LT por el método de ELISA y ST por la Prueba del ratón lactante. También se realizó el Análisis Químico Próximo (AQP) y la prueba de digestibilidad de proteína de larva de mosca mediante la técnica de digestibilidad de proteína por pepsina.

No se lograron eliminar los microorganismos de las larvas por lavado y desinfección posiblemente por la textura pegajosa de su superficie y a una posible adaptación de las bacterias en su intestino, por lo que se sometieron a un tratamiento térmico de secado de 65°C por 48 h., temperatura que no permitió la sobrevivencia de *E. coli* previamente inoculado, ni presencia de sus toxinas, pero si se logró reactivar, lo que nos indica que es aconsejable mantener el producto con una humedad relativa máxima de 5% para evitar la reactivación de bacterias posiblemente patógenas.

Se encontró que la larva de mosca mantiene su buena calidad proteica con un alto porcentaje de digestibilidad. Por lo anterior se deduce que, la administración de larvas de mosca vivas, como parte de la alimentación de cerdos, es una buena alternativa siempre y cuando se produzcan bajo condiciones controladas y si se llega a utilizar estiércol de la misma granja para la producción de larva, los cerdos que se encuentren en ella, pueden llegar a adaptarse a soportar cierta carga de *E. coli* presente en la ingesta diaria de su alimento.

2.-INTRODUCCIÓN

Los sistemas actuales de producción porcina tienden a utilizar el destete precoz como una práctica común para incrementar la productividad de la cerda (Friesen *et al.*, 1993; Shon *et al.*, 1994), disminuir los riesgos sanitarios (Cesaría, 1995), optimizar el uso de instalaciones y mano de obra con lo que se incrementa la viabilidad económica de la explotación. Hace 10 años, el destetar lechones menores de 28 días de edad resultaba en una marcada reducción en el peso de estos, un incremento en el número de días para gestar nuevamente a la cerda y una disminución en el número de lechones de las camadas subsecuentes. Hoy en día, la mayoría de las granjas comerciales destetan a 21 días y algunas lo hacen entre 10 y 14 días como parte de programas de destete precoz (ISOWEAN^R). Esta reducción en la edad a la cual los lechones son separados de la madre, ha sido lograda principalmente por medio de mejoras en la nutrición del animal destetado (Borboilla, 1994). Para que un animal desarrolle su máximo potencial de producción es importante que reciba los requerimientos nutricionales que garanticen un buen rendimiento productivo.

La producción industrial de alimentos con alto contenido en proteínas a partir de materias primas alternativas resulta de gran interés, dado el considerable déficit alimentario (en particular, el déficit proteico), existente en amplias zonas geográficas del mundo (Vázquez *et al.*, 1995). Por los altos costos de las materias primas para la elaboración de alimentos balanceados, la tendencia actual es optimizar el aporte de proteínas a menor costo (Monroy Silva M. A., 1989).

Debido a que uno de los requisitos más importantes al formular dietas para lechones a esta edad es la de producir un alimento que contenga un alto nivel de proteína, de buen valor biológico y alta digestibilidad, la adición de ingredientes convencionales en raciones para cerdos como el plasma porcino, el concentrado proteico de soya y la proteína hidrolizada de pescado es necesaria por su contenido de nutrientes, sin embargo, sus costos son elevados, por lo que se busca un alimento alternativo que posea las características nutricionales de estos ingredientes pero a un costo mucho más accesible para el pequeño y mediano productor. Además del costo, la disponibilidad de los ingredientes convencionales utilizados en raciones para cerdos provoca que los pequeños y medianos porcicultores tengan que estar cambiando continuamente los ingredientes que utilizan en sus raciones por lo que es necesario que cualquier ingrediente alternativo que sea promovido tenga como característica fundamental un alto valor nutritivo y una disponibilidad adecuada.

En México, la utilización de insectos como parte de la dieta de algunos pueblos indígenas, es una tradición que se ha transmitido de generación en generación desde la época prehispánica. Sin embargo, la posibilidad de utilizar la proteína proveniente de insectos en la alimentación de animales ha sido poco estudiada. (Albert I., Borbolla G., 1997).

Linder (1919), citado por Calvert. C. C. (1979), ha marcado la diferencia en la existencia de una de las primeras historias en proponer el uso de insectos coprófagos especialmente la mosca doméstica común (*Musca domestica*), para la producción de proteína a partir de excreta humana. Diseñó el cultivo de larva en excreta, la recolectó y después usó la larva seca como material proteico. Condujo algunos estudios

preliminares, pero el proyecto nunca progresó más allá de la fase especulativa. Hasta que Calvert *et al* (1969); Teotia J.S. y Miller. (1973), reportaron un estudio en el que excremento de aves de corral fue sembrado con huevos de mosca, logrando incubar los huevos, la larva resultante y pupa fue recolectada y usada como fuente de proteína para el crecimiento de polluelos.

Algunas investigaciones, han mostrado que estos insectos, específicamente la mosca casera puede ser producida en estiércol. Esta es una pequeña posibilidad de que la larva de mosca casera es algo más que producción de insectos (fuente de proteína) a partir de estiércol haciendola más aceptable a otras especies animales.

Tabla 1. Composición aproximada y contenido de calcio y fósforo de larva seca de mosca

Determinación	Larva fresca (%)	*Larva Seca (%)
Proteína Cruda	20.6	42.1
Fibra Cruda	3.8	7.0
Humedad	10.1	7.9
Extracto libre de nitrógeno	53.0	1.4
Ceniza	9.0	14.6
Calcio	2.71	5.0
Fósforo	0.92	1.5

*Base seca excepto humedad

Fuente: Calvert, C. C. *Journal of Animal Science* 1979

Tabla 2.

Contenido de aminoácidos en proteína de huevo y larva seca de mosca en g de aminoácidos por 100g de proteína

Aminoácidos esenciales	Proteína de Huevo	Proteína de Larva seca
Lisina	6.3	5.2
Leucina	9.0	5.3
Isoleucina	6.8	3.5
Fenilalanina	6.0	4.2
Metionina	3.1	2.6
Treonina	5.0	3.2
Triptofano	1.7	0.2
Valina	7.4	3.4
Tirosina	4.4	4.8
Cistina	2.3	0.4

Fuente: Calvert. C. C. *Journal of Animal Science*, 1979.

Las proteínas en la alimentación proporcionan tanto el nitrógeno orgánico como los aminoácidos esenciales. La estimación cuantitativa del requerimiento de proteínas debe tener en cuenta su calidad, en cuanto a su composición de aminoácidos esenciales. Una proteína no solo debe aportar todos los aminoácidos esenciales, sino que estos deben encontrarse en las proporciones adecuadas. El comité de la FAO (1955) estableció una tabla que denomino Modelo Provisional de Aminoácidos. Bhagavan N.V. (1984). En este estudio la proteína de huevo de gallina sirvió como referencia y se le adjudicó una cantidad de 100 por 100, ya que tiene todos los aminoácidos esenciales en las proporciones adecuadas que comparándola con la proteína de larva de mosca, contiene todos los aminoácidos esenciales según Calvert. C. C. (1979), aunque sus proporciones son menores a las de los aminoácidos de huevo.

Por está razón, se ha pensado en la cría de organismos como larva de mosca con el propósito de utilizarlos como fuente de proteína y energía alterna, además de su fácil producción, por sus perfiles nutritivos.

Diversos estudios han evaluado la utilización de la larva de mosca como fuente de proteína. Andrade (1987) utilizando larva de mosca producida en excreta de cerdo para la alimentación de ratas, no observó diferencias significativas cuando la comparó con una dieta basada en caseína, cuando se sustituyó hasta un 100% del requerimiento proteico del cerdo. Por otra parte, Ocio *et al.* (1979), alimentaron pollos con larvas de mosca, sin encontrar diferencias en la ganancia de peso y conversión alimenticia, al compararla con una dieta que contenía harina de pescado.

Gudilin y Bayandina (1985) al alimentar cerdos en crecimiento con dietas conteniendo harina de carne y hueso, o harina de larva de mosca, encontraron que con esta última dieta se obtenían un 4.7% más de ganancia diaria de peso, sin embargo la conversión alimenticia era ligeramente menor, lo que habla de un mayor consumo. No existieron diferencias en el rendimiento en canal, ni en la calidad sensorial de la carne.

Por otro lado, al inicio de los años 80's, se comenzó a identificar a los desechos orgánicos producidos en las explotaciones pecuarias como un serio problema ambiental, debido principalmente a su gran cantidad, y a los graves problemas de contaminación que ocasionan a la atmósfera, el suelo y los mantos acuíferos, que contribuyen además, a la proliferación de fauna nociva (ej. moscas, roedores, etc.), esto aunado a la existencia de olores y al deterioro ambiental del perímetro inmediato a la granja.

En México, el programa para minimizar el impacto ambiental de los desechos generados por la actividad porcícola propuesto por el Consejo Mexicano de Porcicultura contempla una reducción gradual de la capacidad contaminante de los desechos, lo que significa que en seis años se debe reducir en un 65% los niveles de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), la cual depende de la concentración de nitrógeno y fósforo contenidos en el estiércol. Para lograr estas reducciones a nivel de granja, se han propuesto diversas estrategias entre las que se encuentra el uso de insectos en su etapa larvaria que se desarrollan en el estiércol y los cuales son capaces de utilizar el nitrógeno y el fósforo, convirtiéndolo en proteína de alta calidad nutricional. Debido a lo anterior, se ha pensado en la implementación de la larva de mosca como reductores del nivel de contaminantes de las excretas producidas por granjas porcinas. Aubert y., Borbolla G. (1997).

La industria de aves de corral afronta con una mayor disposición el problema de los desechos. La biodegradación de estiércol de aves de corral con *Mosca doméstica* ha sido estudiada por Calvert *et al.* (1969 a, b, 1970) Teotia y Miller (1973); Pacheco (1979); Pacheco. (1980); Reyes (1980); Teotia and Miller (1973), en intentos por resolver estos problemas.

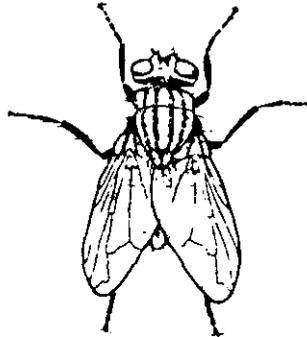
La biodegradación de excreta de aves de corral por larva de *Mosca doméstica*, resulta en una reducción relativa de olor y humedad. La pupa de la mosca contiene más del 50% de proteína y 6.35% de grasa, con valor energético superior al de la semilla de soya que es utilizada en la alimentación para la producción de pollo. Los pollos alimentados con pupa de mosca seca como un sustituto de alimento de soya, se crían normalmente y se producen aves comerciales sin modificación en el sabor.

Es importante el desarrollo de nuevas técnicas para obtener y secar estas larvas que son ricas en proteína, las cuales se usan para producir alimentos nutritivos adecuados para consumo animal. Ya que hasta ahora poca atención ha sido prestada en la posibilidad de la utilización de larvas para ser utilizadas para productos alimenticios Reyes (1980).

Para llevarlo a cabo resulta importante conocer algunos aspectos en el desarrollo y la vida de la Mosca Doméstica (*Musca domestica*) a través de sus diferentes fases.

La Mosca Doméstica

Orden: Diptera



Características:

Un solo par de alas membranosas, alas traseras modificadas, parte de su boca succional permanece oculta y la saca cuando va a ser utilizada, cuenta con un par de ojos largos.

Sufre metamorfosis completa a través de 4 fases, la fase de huevo, de larva, pupa y la adulta.

Familia: *Muscidae*

Características de especie:

La Mosca Doméstica Común (*Musca domestica*) mide en su fase adulta de 6-8 mm de longitud y de 13-15 mm su par de alas. Tórax gris con 4 franjas negras longitudinales, cubriendo básicamente la mitad del abdomen de su piel coloreada y ocasionalmente transparente de esa parte, con una banda negra central ensanchándose hasta cubrir el último segmento abdominal, cuando descansan sus alas son extendidas.

La mosca doméstica no muerde y no posee una alta selectividad en sus hábitos alimenticios, su alimentación es buena y rápida, de alimento humano, alimento de animales, despojos de animales, de desperdicios y excremento. Ellas van a frecuentar y alimentarse indiscriminadamente de cualquier alimento líquido o sólido, que pueda igualmente humedecer, debido a que no poseen boca y sólo pueden absorber, las moscas humedecen el alimento al rejurgitar jugos digestivos y el contenido de sus estómagos en las sustancias alimenticias, este material es después atraído por la parte succionadora de su boca y con ello, los insectos recogen así organismos patógenos que pueden ser colectados en su cuerpo y ser transferidos en contacto con otras superficies o sobreviven al paso a través del intestino para ser depositadas en algún sitio en la mosca.

Distribución:

La mosca doméstica es un insecto "ubícuo" con un rango de vuelo mínimo de 5 millas. Son altamente activas bajo techo. En climas fríos su reproducción generalmente cesa antes del invierno, entonces el insecto también cesa su actividad, como pupa o como adulto. Sin embargo, en ambiente templado permanecen activas y se reproducen todo el año. (Blackpool. 1996).

Importancia:

Hay microorganismos causantes de enfermedades en humanos y animales; transmitidos por moscas y pueden ser vectores potenciales de enfermedades como disentería, gastroenteritis, tifoidea, cólera, enfermedad de boca y pata provocada por un virus, mastitis, anthrax, brucellosis, tuberculosis, entre otras. (Orkin Ag Pest Control Online. , 1996)

Las moscas pueden refugiar bacterias y virus dentro de su sistema o en la superficie de su vellosidad por lo que las moscas podrían presentar una seria amenaza a la salud del ganado, porcino, ovino y caprino, por el transporte o transmisión de bacterias y virus. Aunque su papel es diferente dependiendo de enfermedades y condiciones, la evidencia de que las moscas están involucradas es inequívoca. Otras de las enfermedades comúnmente transmitidas por moscas a humanos son: tracoma, polio, brucelosis, Streptococcosis y Staphylococcosis, Salmonellosis, amibiasis, además de garrapatas. (Orkin Ag Pest Control Online, 1996, Grübel et al, 1997; De Hro Arteaga et al, 1990).

Ciclo de Vida

Después de 8 a 14 horas que la mosca casera común surge como un adulto, la hembra comienza a poner huevos. Durante su vida de adulto que puede ser de 1 a 5 meses es capaz de producir en promedio de 4 a 5 grupos de 100 a 150 huevos. De color blanco aperlado, los huevos cilíndricos de 1 mm de longitud, son puestos en la humedad de estiércol, líquido derramado, vegetales en descomposición y materia putrefacta principalmente, promoviendo con ello el desarrollo de larvas. Los huevos son incubados en un tiempo de 8 a 48 horas, tiempo necesario para que los huevecillos logren una suavidad que les permita iniciar su desarrollo como gusanos a lo que será la larva (pero en el invierno, este proceso puede tomar más de un mes). La larva tiende a alejarse o a esconderse de la luz, buscando una temperatura óptima de 45 a 50°C hasta alcanzar la madurez al tener una longitud de 10 a 12 mm, Cuando la larva madura sale de su sitio de refugio para recorrer el área circunvecina, pasan de su fase larvaria a su fase pupa, desarrollándose de pupa amarilla a pupa café y negra de 6 mm de longitud.

Dependiendo de las condiciones en que se encuentren, emergen como adultos en 3 días o una semana después. El círculo se completa generalmente entre 1 y 4 semanas, dependiendo de la temperatura.

En una sola estación pueden llegar a nacer hasta 12 generaciones de moscas en ambientes optimas (templados o calientes), sin duda esta velocidad de reproducción puede ser excedida.

Su capacidad de reproducción según Orkin Ag Pest Control Online. (1996) de una simple mosca en una granja en mayo puede dar origen a 1,000 moscas adultas y 25,000 moscas en fase huevo, debido a las características ambientales del mes. Con lo anterior es claro porque se considera con un enorme desarrollo potencial de una gran población.

Por otra parte, como una faceta más en el uso de Mosca Doméstica. La compañía Beneficial Insectary ha encontrado como posible uso la producción regular de Mosca Doméstica (*Musca domestica*) y la obtención de parásitos de mosca. A continuación se tiene las diversas fases de la vida de la mosca que se tienen disponibles para su venta, debido a que estas fases son todas usadas para la producción de moscas y sus parásitos (Beneficial. Insectary. Products. 1996). Algunos productos que esta compañía ofrece son:

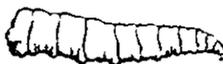
Huevos de mosca:

Los huevos de mosca son principalmente vendidos con propósitos de investigación.



Larva de Mosca:

La larva de mosca es principalmente vendida para alimento y también para propósitos de investigación. El envío se realiza durante la noche si se quiere para prevenir la pupación.



Pupa de mosca:

La pupa de mosca se vende para propósitos de investigación, alimento y polinización



Pupa de mosca congelada:

La pupa de mosca congelada puede ser usada como anfitrión de parásitos de mosca para propósitos de investigación (laboratorio y campo de experimentos)

Un gran número de bacterias están asociada a estos insectos y se encuentran presentes en muchas de las sustancias de las cuales se alimentan, particularmente en materiales en descomposición, excremento, etc. Estas sustancias constituyen el alimento de una gran variedad de insectos y de forma semejante, regularmente ingieren las bacterias que están presentes. Jordao y Terra (1989); Kilberg. R. (1972); Lemon y Terra (1991).

La producción comercial de larva de mosca se ha propuesto usar como sustrato el estiércol, como fuente de proteína y por lo tanto ser vehículo de m. o. patógenos o sus metabolitos. Lemos A. Francisco y Tera R. Walto (1991), Calvert *et al.*, (1969 ab, 1970); Newton, (1977); Charles T y Bures. (1976); Rusoo (1991); Hultmark *et al.*, (1980).

El grupo microbiano más abundante en la materia fecal utilizados como sustrato en el desarrollo de la larva de mosca corresponde a las bacterias, las cuales pueden formar parte de la flora benéfica del animal, además de algunos patógenos dependiendo del estado de salud del mismo. Muchas de las bacterias patógenas tienen efectos tóxicos sobre los animales debido a las toxinas que producen. Dentro de las bacterias patógenas toxigénicas más frecuentes en la materia fecal del cerdo están: La *Escherichia coli* toxigénica productora de toxinas de varios tipos lábiles y estables al calor; la *Salmonella spp* y en menor frecuencia *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp*, *Clostridium perfringens spp* enterotoxigénicas Guerrant *et al.*,(1976); Back *et al.*, (1980); Klipstein *et al.*, (1983); Guorino *et al.*, (1987.).

Varias de las enterotoxinas antes mencionadas pueden causar una hipersecreción de líquido a través de la mucosa intestinal que puede llegar a ser severa y ocasionar la muerte del animal Gemmell (1984). Los microorganismos enterotoxigenicos pueden ser transportados posiblemente y de manera fortuita en la superficie de las moscas y las larvas. Greenberg (1959).

En la larva de mosca, se han encontrado evidencias que indican que estos organismos poseen un complejo enzimático que podría estar contribuyendo a la inactivación de bacterias y virus Hasset *et al.*, (1988), Lemos y Walto, (1991). La posible transmisión de agentes patógenos a través de la larva de mosca sería un punto importante a determinar ya que existe escasa información a este respecto lo cual podría ser un impedimento para su libre utilización como ingredientes alternativos para raciones de cerdos jóvenes.

Además, en los estudios realizados usando a la larva de mosca como ingrediente alternativo, este siempre ha sido secado con calor, por lo que la transmisión de patógenos puede reducirse.

Sin embargo, es necesario evaluar si estos métodos de conservación, y los que no usan calor, reducen el potencial patogénico de estos organismos. En la industria porcícola se presentan a menudo casos de diarrea en lechones antes del destete, un número importante de ellos ha sido atribuidos al efecto de cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. Es una de las causas más importantes de muerte en estos provocando severas pérdidas a la porcicultura. Rojas y Pussing (1978). Intentos por controlar estos cuadros diarreicos que generalmente se presentan durante el periodo neonatal intermedio (mayor de 6 días de edad) y alrededor de las 3 a 9 semanas de edad, han dado lugar a numerosas investigaciones sobre su naturaleza y control. Fuller, R. (1986).

Los microorganismos coliformes, los "coliformes fecales" y *Escherichia coli* se utilizan en primer lugar para indicar una contaminación, los organismos indicadores son de gran utilidad tanto para determinar la calidad bacteriológica de los alimentos como la garantía que ofrece su consumo. Como las especies patógenas y las sospechosas de serlo son casi todas mesófilas, se presta mayor atención a los organismos de este tipo.

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por 4 a 10 o más subgrupos. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias pertenezcan a un sólo género taxonómico. La técnica del Número Más Probable (NMP) puede utilizarse

para este grupo de bacterias y aplicarse en agua potable, agua purificada, y alimentos procesados térmicamente, así como muestras destinadas a evaluar la eficiencia de las prácticas sanitarias en la industria alimentaria (Ramírez, H. y Alvarez M. 1996).

Los recuentos por arriba de 6 log indican de antemano que el producto va a alterarse muy pronto, ya que en la mayoría de los alimentos que entre 10^6 a 10^8 microorganismos por gramo la alteración es ya evidente. *Escherichia coli* es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas, entre ellas *Salmonella typhi*, otras salmonelas, *Shigella* spp, *Vibrios* spp, Entamoebas, parásitos diversos, agentes de zoonosis y virus entéricos. (Speak Marvin L., 1984, Thatcher y Clark D. S., 1973; López y Alamilla, 1986).

Escherichia coli son bacilos Gramnegativos, no esporulados, crecen con facilidad en la mayoría de los medios de cultivo, ya sea enriquecidos como el agar sangre o simples como el agar nutritivo. En general se usan para su crecimiento inicial medios selectivos y diferenciales como el agar MacConkey, agar EMB (Eosina Azul de Metileno), agar Endo, Tergitol 7, etc. Estos medios tienen en común, sustancias, como los colorantes, que inhiben el crecimiento de Grampositivos o tienen reactivos como son las sales biliares que favorecen el desarrollo de bacterias entéricas y tienen un azúcar común, la lactosa, la cual es fermentada, debido a que se sintetiza la enzima β -Galactosidasa que la hidroliza (Devis, Dulbecco, 1979).

E. coli es capaz de infectar a todas las especies de animales, aves, reptiles y peces. Algunos tipos específicos, conocidos por su patogenicidad, pueden encontrarse en intestinos de animales aparentemente normales, sin que haya signos de

incompatibilidad con el huésped. La patogenicidad de cepas específicas depende no solo de la capacidad de la bacteria para producir una toxina activa, sino también de la resistencia del huésped, del volumen de la dosis infectante y de las condiciones que favorecen la multiplicación intrainestinal de una cepa determinada. Dunne *et al.*, (1988), Lemon y Terra, (1991.)

El agente bacteriano que causa mayores pérdidas económicas durante la primera semana de vida del lechón es *E. coli*, la cual puede ser adquirida por el cerdo inmediatamente después de nacer, por vía digestiva y pasar a formar parte de la flora intestinal normal Rivera, (1977); Back *et al.*, (1980).

Sin embargo, se piensa que existen diferencias entre camadas en cuanto a su capacidad de adaptarse a los cambios de dieta, y que el estímulo para la proliferación de *E. coli* es principalmente un factor de la resistencia del huésped a la irritación intestinal. La diferencia de susceptibilidad entre las camadas y entre los integrantes de una camada dada, la consideran debida principalmente a factores genéticos (Dunne *et al.*, 1988).

Los síntomas de cuadros entéricos en animales presumiblemente están asociados con un incremento anormal de las bacterias patógenas en la flora intestinal. Se sabe que la acidez en el tracto gastrointestinal destruye muchas bacterias que pasan por el estómago y que en el intestino delgado superior inhibe parcialmente su crecimiento. Sin embargo, en los primeros días de vida del animal la acidez es relativamente baja, lo que implica en parte, la alta susceptibilidad de los animales

recién nacidos a los agentes bacterianos. Barnum (1967), Leman *et al.*, (1986); Lopez y Alamilla (1986).

Aunque la colonización es un prerequisite esencial para que las cepas produzcan diarrea, las cepas deben ser enterotoxigénicas para producir el cuadro diarreico (Smith y Lingood 1971, citados por Wray 1984).

El factor enterotóxico de *E. coli* es separado en toxina lábil (LT) y estable al calor (ST). El factor ST es una toxina de bajo PM, estable al calor Dunne *et al.*, 1988, Leman *et al.*, 1986). Las enterotoxinas estimulan la secreción líquida en la luz intestinal, se reconocen dos clases principales:

a) Toxina LT (Termolábil), es inmunogénica. Se han demostrado diferencias antigénicas entre la LT de cepa de *E. coli* asociadas con enfermedades en humanos, cerdos, aves, reptiles y peces (Sack, 1975). La toxina termolábil, estimula reacciones que incrementan la secreción de fluido en el lumen causando diarrea y deshidratación. Mathewson *et al.*, (1985).

b) Toxina ST (Termoestable), la segunda enterotoxina producida por *E. coli*, puede desencadenar cuadros diarreicos (Merson y cols, 1976 citados por Brandwein y cols, 1985), ó colibacilosis en lechones y becerros (Gyles 1971, Moon y cols, 1980; citados por Brandwein y cols. (1985). Klipstein *et al.*, (1983) ha reportado la existencia de dos diferentes tipos de enterotoxinas termoestables de *E. coli*, Sta y Stb, distintas genéticamente en su secuencia de DNA.

La *E. coli* que produce diarrea generalmente posee las siguientes propiedades:

- a) Capacidad para colonizar y multiplicarse en el intestino delgado.
- b) Puede producir enterotoxinas, que en un huésped susceptible provoca aumento de secreción líquida hacia el lumen intestinal y subsecuentemente diarrea.

Tales cepas de *E. coli* se adhieren a la superficie mucoide del epitelio veloso del intestino delgado, lo que permite superar la remoción mecánica por la motilidad intestinal y facilitar su colonización.

La adherencia está medida por antígenos termolábiles. La *E. coli* enteropatógena, se define como los serogrupos somáticos específicos que epidemiológicamente han sido incriminados como patógenos pero cuyos mecanismos de infección son a través de enterotoxinas o entero invasión (Endelman y Levine, 1983 citados por López y Altamilla; *et. al*, 1986).

Sin embargo, existen otros tipos de *E. coli* patógenas, las cepas involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos pueden ser clasificadas en 4 grupos:

1. *E. coli* Enteropatógena (EPEC), que generalmente no presentan enterotoxinas aunque ellas pueden causar diarrea, con mayor frecuencia en lactantes. (Guerrant, *et al*, 1976).

2. *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), productora de enterotoxinas (LT y ST) es capaz de adherirse al epitelio gastrointestinal y liberar las toxinas LT (labil al calor) y ST (estable al calor) y causa diarrea en adultos y animales.

3. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), no produce enterotoxinas, la bacteria penetra las capas superficiales de la mucosa, sin llegar, salvo excepcionalmente a los tejidos más profundos, produciendo síntomas de disentería. Típicamente, los pacientes con diarrea por *E. coli* enteroinvasiva tienen deposiciones con sangre, mucus y leucocitos polimorfonucleares.

4. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), esta representada por *E. coli* O157:H7 responsable de una infección entérica o colitis hemorrágica, produce básicamente dos toxinas, la toxina Shiga-like (slt-i Verotoxina, Verocitoxina) y SLT-II. Se ha aislado de materia fecal de animales y hombres, la toxina II causa en el hombre y animal diarreas sanguinolentas. Ristaino *et al.*,1983; Guarino *et al.*, 1987)

3.-JUSTIFICACIÓN

Debido a que en las granjas porcinas existe un gran interés en dar una aplicación a los grandes volúmenes de estiércol que generan granjas, se pretende utilizarlo como sustrato para la producción de larva de mosca que sirva como fuente de proteína para la alimentación del cerdo, pero es necesario, estudiar el riesgo microbiológico que implica su consumo.

3.- OBJETIVOS

Objetivo General

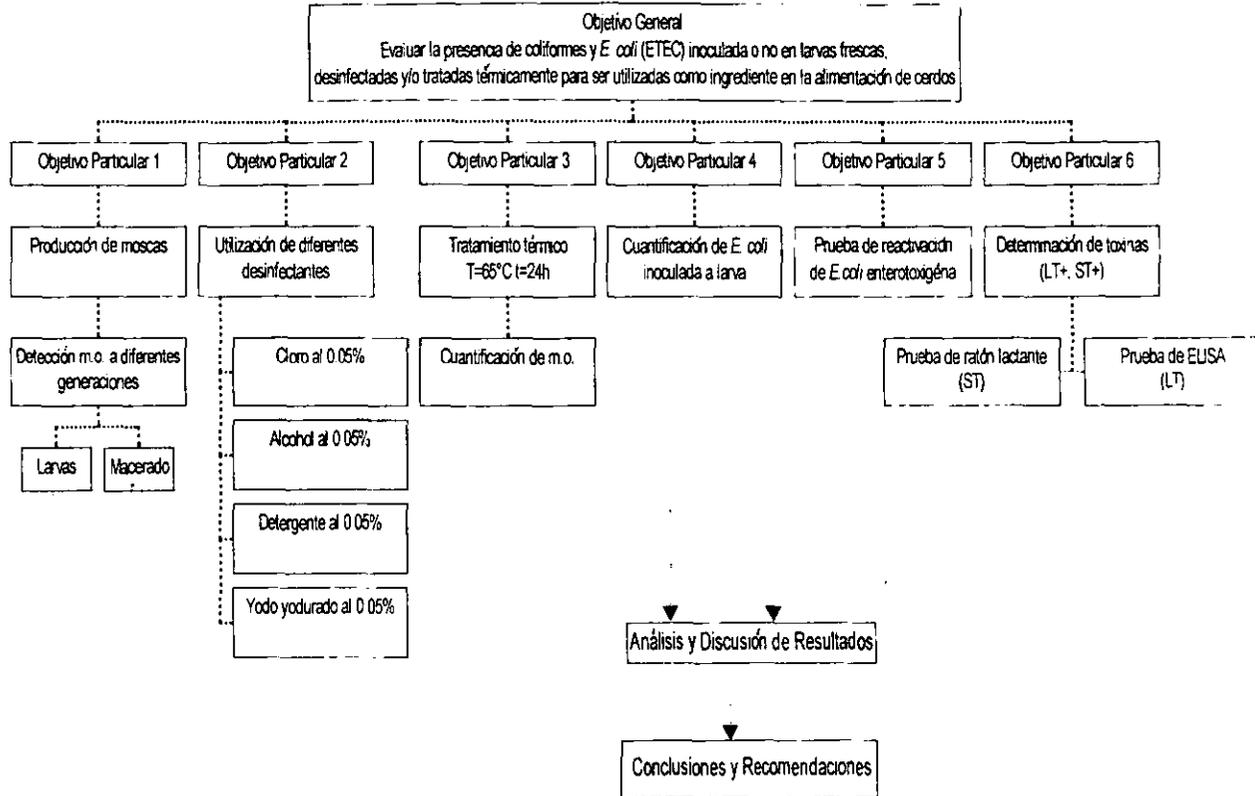
Evaluar la presencia de coliformes y *E.coli* (ETEC) inoculadas o no en larvas frescas, desinfectadas y/o tratadas térmicamente para ser utilizadas como ingrediente en la alimentación de cerdos.

Objetivos Particulares

1. Verificar la presencia o ausencia de microorganismos coliformes a la secuencia de 5 generaciones obtenidas bajo condiciones de asepsia
2. Evaluar diferentes tratamientos de desinfección en la eliminación de coliformes en las larvas de la 6ª generación.
3. Determinar las condiciones térmicas para obtener larvas libres de coliformes.
4. Evaluar la persistencia de *E. coli* (ETEC) en larvas de mosca inoculadas previamente.
5. Establecer las condiciones de secado que permitan obtener larvas libres de *E. coli* (ETEC) inoculadas previamente.

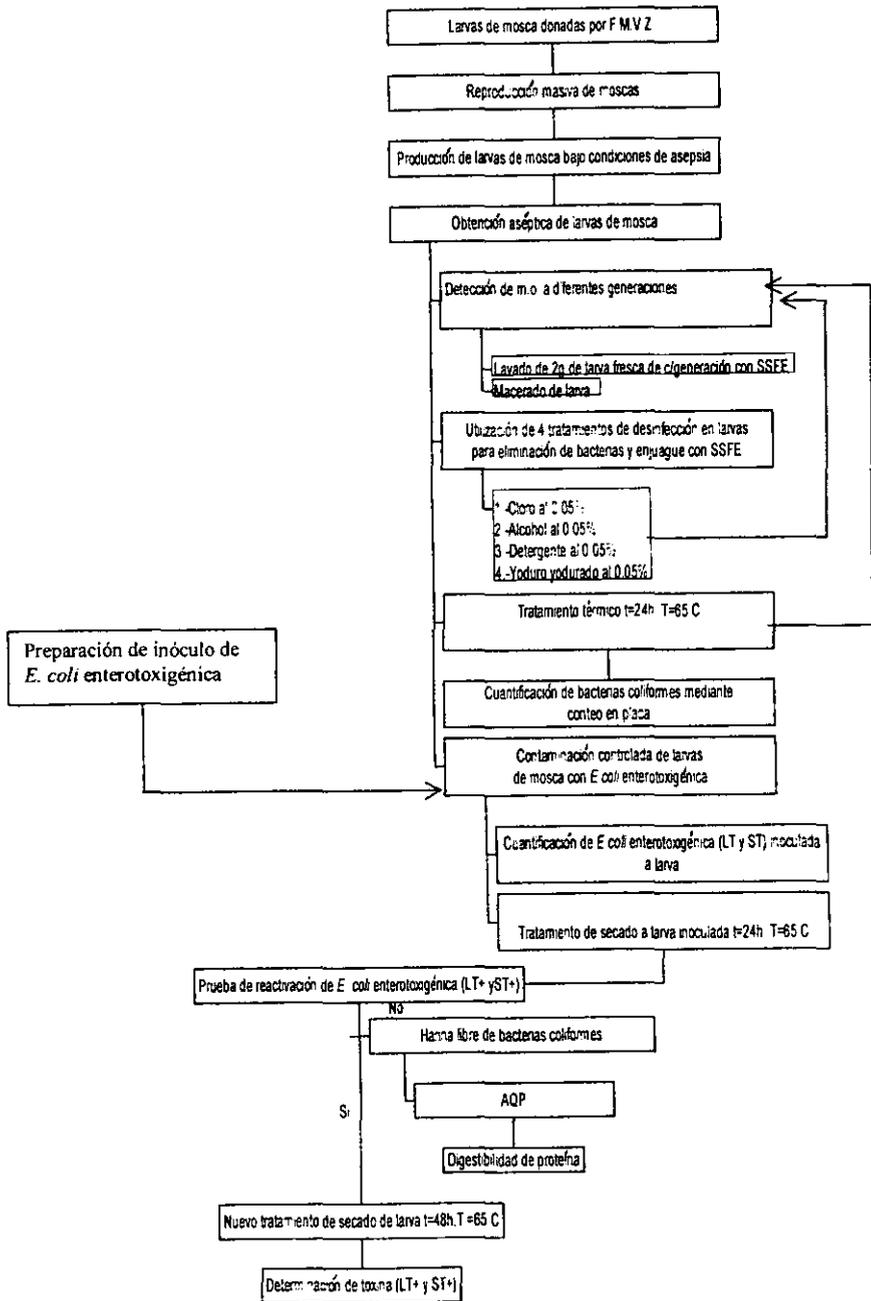
6. Evaluar la presencia de toxinas LT+ y ST+ en larvas secas inoculadas con *E. coli* (ETEC) previamente.

Figura 1 Cuadro General



5.-MATERIALES Y METODOS

Figura 2 Cuadro Metodológico



5.1 Reproducción masiva de moscas

La caja para reproducción de moscas y huevecillos se construyó con madera y tela de tul. La caja era un cubo de 1x1 m. con aberturas o ventanas a los costados y en la parte superior de la misma, con la finalidad de permitir tanto ventilación como entrada de aire del medio, esta se encontraba dividida a la mitad por una pared también de madera teniendo así dos contenedores, como lo muestra la figura No. 3.

Figura No. 3 Caja para la reproducción de moscas



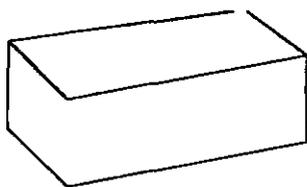
Cada uno de ellos poseía un orificio que soportaba una malla de tela de tul de 70 cm de largo en forma de guante con una abertura en el centro, a través del cual se podía introducir la mano y realizar los manejos y actividades diarias que fueran necesarias en el interior de los contenedores y así evitar la salida o escape de las moscas.

Las adaptaciones que se fueron realizando a la caja a lo largo de la experimentación fueron:

- A la caja se le adicionó una fuente de luz (foco) que permitiera elevar la temperatura en el interior hasta 30°C
- Las ventanas delanteras y traseras se cubrieron con película plástica para guardar el calor producido por la fuente de luz y permitir que esta alcanzara una temperatura antes mencionada, así como una mayor visibilidad al interior de la caja.

Figura No. 4 Recipientes utilizados

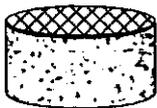
Caja para incubar larva



Caja recolectora de larva



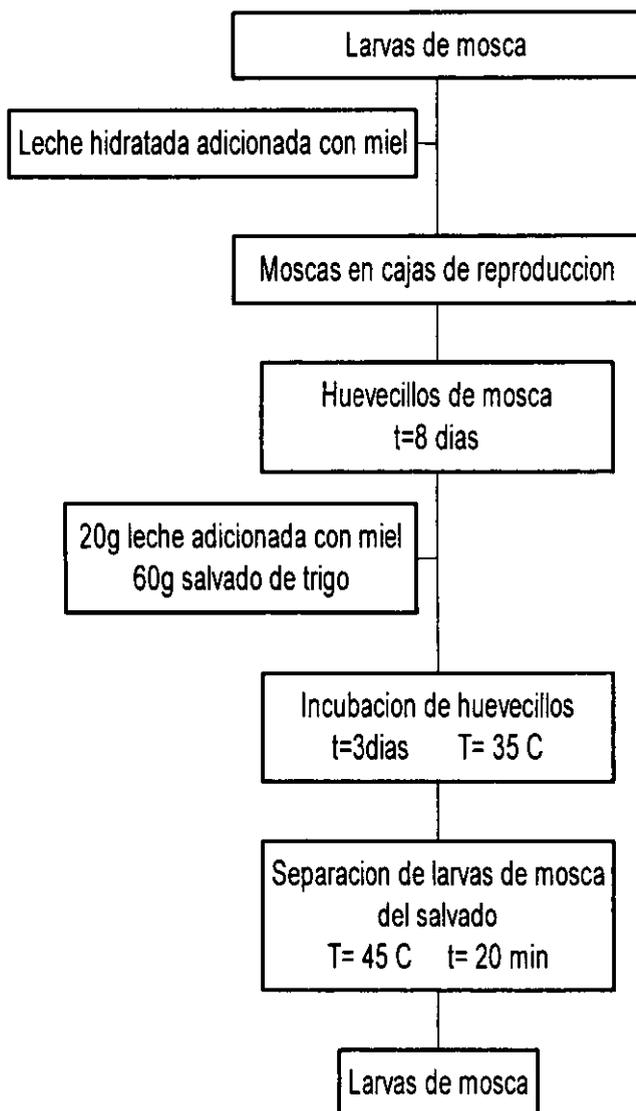
Recipiente de alimento



Tamiz



Figura No. 5 Diagrama de flujo del proceso de obtencion de larva de mosca



5.2 Producción de larva bajo condiciones de asepsia.

La producción de larva se inició partiendo de unas que fueron donadas por el departamento de producción animal, de la F.M.V.Z. de la UNAM, de donde se obtuvieron las primeras moscas con las que se dio inicio la recolección de sus huevecillos, se esperó un tiempo de 8 días en el que ellas iniciaron la producción de huevos, sin embargo el apareamiento de las mismas se inició de 16 a 24 horas después de la emersión, en condiciones ambientales (entre 20 y 25°C).

La alimentación diaria constituida de porciones de 60g. de salvado y 20g. de leche adicionada con miel se permitió una producción aproximada de 0.4-0.6 g de huevecillos de mosca diaria

La malla de tela les proporcionaba a las moscas tanto un soporte para que estas pudieran alimentarse y un refugio para los huevecillos al plizarse la tela. El alimento que se continuó dando hasta finalizar la experimentación consistió en leche en polvo rehidratada, enriquecida con miel, la cual se renovaba todos los días.

Los huevos recolectados directamente del recipiente de leche eran sembrados en charolas de plástico que contenían una mezcla de salvado- leche adicionada con miel. Sin embargo, al no ser constante la producción de huevos por variar en función de las condiciones ambientales y que además afectaba el desarrollo larvario, así como la actividad de las moscas, se colocó una fuente de luz dentro de la caja que contenía las moscas alcanzando una temperatura constante de 35°C.

Las cajas de plástico en donde se llevaba a cabo el desarrollo de las larvas se colocaron dentro de una estufa a temperatura constante de 35°C. Reduciéndose su tiempo de desarrollo a 3 días, al final de los cuales las larvas se encontraban en las condiciones máximas de tamaño (9 mm aprox.) y grosor que pudieron alcanzar.

Las charolas eran cubiertas con su tapa previamente perforada, sin embargo al segundo o tercer día de ser sembrados los huevecillos ya incubados y en su forma de larva tenían la tendencia a escapar. La secuencia en el desarrollo de las larvas inicia cuando éstas se incuban, las pequeñas larvas inician una etapa de migración fuera de las charolas con lo que se tenían pérdidas de larva se optó por cubrirlas con película plástica adherible, esta se perforó para facilitar la entrada de aire con pequeños orificios los cuales debían ser suficientes para una buena entrada de aire y de un tamaño mínimo para evitar que escaparan.

El tiempo que tardaban las larvas al inicio de la experimentación en alcanzar un buen desarrollo en tamaño y grosor máximo, era de 7 días, al inicio y en condiciones, 3 días en estufa a temperatura constante de 35°C (tiempo que requerían para alcanzar un desarrollo máximo antes de pupar).

El contenido de la charola era vaciado sobre una malla, este proceso se realizaba de forma lenta por lo que tomando en cuenta su tendencia a ocultarse de la luz, se colocó una fuente de luz a la cual se le colocó una lamina de aluminio a manera de reflector sobre el contenedor, por lo que el paso de las larvas a través de la malla fue más rápido, obteniendo larvas limpias de salvado en menos tiempo.

5.3 Obtención aséptica de larvas de mosca

Las larvas que dieron origen a la primera generación de moscas fueron instaladas en uno de los contenedores de la caja y mantenida en condiciones de asepsia en donde a partir del segundo día empezaron a pupar. La pupa sufrió cambios en su coloración tornando desde un color hueso hasta un color café oscuro a negro y finalmente emergen como moscas.

Las moscas después de su emersión sólo pueden vivir 24 horas máximo sin alimento, de lo contrario mueren. Por lo tanto las moscas, que son omnívoras, fueron alimentadas con alimento estéril compuesto de leche adicionada con miel y agua, ya que necesitan una dieta que contenga azúcar, para mantener la vida y producir la energía necesaria en todos los procesos vitales, así como proteínas o sustancias obtenidas de la hidrólisis de estas, para la formación de los huevos. (Otto Hecht., 1970)

Al octavo día se inicio la recolección de los huevos que fueron colocados en la malla que se encontraba en el recipiente de leche. Los huevos de mosca fueron separados de la malla y colocados bajo condiciones de asepsia en un recipiente plástico que contenía una mezcla de salvado y leche adicionada con miel en una relación 3:1 y agua suficiente para hacer una mezcla. La charola fue cubierta con una película plástica con orificios para permitir la entrada de aire.

La charola permaneció así por 3 o 4 días a temperatura constante de 35°C al final de los cuales se inicio la separación de las larvas de mosca.

5.4 Detección de m.o. a través de las diferentes generaciones.

De las larvas que se obtuvieron se tomaron 2 gramos que fueron sometidas a un proceso de 10 lavados cada uno con 50 ml de solución salina fisiológica (estéril), del último lavado se tomó una asada que fue sembrada en agar MacConkey incubándose después 24 h a 37° C, para verificar la presencia de bacterias coliformes.

Por otro lado se tomo 1 gramo de larvas y se maceró en un mortero previamente estéril, posteriormente se tomó una muestra y fue sembrada en agar MacConkey (ver apéndice 3), incubándose a 37°C por 24 h y se verificó la presencia de bacterias coliformes.

Las larvas restantes se mantuvieron en la caja hasta pasar a su fase de pupa, el proceso para formación de otra generación de moscas se llevó a cabo de la forma antes descrita. A partir de 8 días de la emersión se volvió a iniciar el proceso de obtención de larvas. A las larvas obtenidas de esta 2da. generación se les sometió al mismo proceso de lavado.

El proceso se repitió en un total de 5 generaciones de larvas producidas y mantenidas en condiciones de asepsia, y se observo previamente la carga microbiana.

5.5 Lavado y desinfección de larvas para la eliminación de bacterias

Para eliminar la carga microbiana contenida en la larva, estas fueron sometidas a diferentes procesos de lavado y desinfección de la larva. Se prepararon 4 lotes de 2 g cada lote cada uno de larva de mosca, fueron lavados con 30 ml de solución salina fisiológica (estéril), posteriormente fue desinfectado con:

- Lote 1. Solución al 0.05% de alcohol
- Lote 2. Solución al 0.05% de cloro
- Lote 3. Solución al 0.05% de detergente de uso común
- Lote 4. Solución al 0.05% de yodo yodurado

Finalmente de cada lote se eliminaron los restos de desinfectante con 30 ml de solución salina fisiológica estéril y posteriormente de cada lote se maceró en un mortero estéril y de ahí se tomó una asada que fue sembrada sobre una caja de agar MacConkey (ver apéndice 3), Incubándose a 37°C por 24 h, de igual forma, se tomó una asada de cada una de las aguas de lavado final y se sembró en agar MacConkey a las mismas condiciones. Transcurrido ese tiempo se verificó la presencia de colonias.

5.6 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca y larva seca.

Para cuantificar la carga microbiana en larvas obtenidas bajo condiciones de laboratorio (el proceso parte de un sustrato compuesto de leche en polvo rehidratada enriquecida con miel y salvado de trigo que fue sometido a un proceso de radiación por microondas en 3 eventos por 1 minuto para reducir la carga microbiana), se realizó un muestreo a 5 lotes de larva fresca y larva secada por 24 h a T° de 65°C.

Los huevos de mosca fueron retirados con espátula de la malla que soportaba el contenedor de leche dentro de la caja y colocados en una mezcla de los ingredientes [mencionado previamente, fue cubierta con una película plástica que fue perforada para asegurar la presencia de oxígeno. Al alcanzar las larvas un desarrollo máximo estas fueron separadas del salvado.

5.6.1 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca

De las larvas obtenidas de 5 lotes diferentes se procedió a tomar 0.5 g de muestra de sustrato (mezcla de salvado-leche adicionada con miel en el que se llevó a cabo el desarrollo de larvas) y larva fresca. La larva restante fue sometida a un proceso de secado.

De cada muestra de sustrato y de larva fresca se realizaron 9 diluciones decimales, se tomaron 0.5 g de la muestra a analizar, previamente macerada y se adicionó 4.5 ml de diluyente (SSF), constituyendo la dilución 10^1 se agitó en un vortex

y se transfirió 0.5 ml de la dilución a otros tubos con 4.5 ml de diluyente y se continuó el proceso hasta la dilución 10^{10} . Todo se realizó en condiciones de esterilidad.

Posteriormente de las últimas diluciones, para cada producto. Se tomo una muestra de 50 μ l y se inoculó por duplicado en cajas petri con agar MacConkey (ver apéndice 3), incubándose después 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se verificó y cuantificó la presencia de colonias. Considerando aquellas cajas en las que se pudieran contar y el resultado se determinó multiplicando al número de colonias por el inverso de la dilución y multiplicando por 2 para obtener el número de UFC/g

$$\text{UFC/g} = (\text{No. de unidades formadoras de colonias} \times \text{inverso de dilución})$$

5.6.2 Cuantificación de bacterias coliformes en larva seca sometida a tratamiento térmico de 24 horas a 65°C.

La larva fue sometida a un proceso de secado de 65°C por 24 horas en un recipiente de aluminio en una estufa de Temperaturas hasta de 80°C y se determinó la presencia de coliformes por la técnica del Número Más Probable. (Ramírez, H. y Alvarez, M. (1996); Thatcher F. S. y Clark D.S. (1973), descrito en apéndice 1.

Una vez que las larvas fueron secadas se les realizó el análisis de la siguiente manera. Se tomaron 0.5 g. del producto y se realizaron 3 diluciones decimales, siguiendo la técnica descrita en el punto anterior.

La cuantificación de coliformes se realizó por el método del NMP, donde se inoculó por triplicado al transferir 1 ml de cada dilución a un tubo con tapón de rosca con Caldo Lauril Sulfato Triptosa (ver apéndice 3), y campana de fermentación, se incubaron los tubos a 44.5°C +/- 2°C en un Baño María con circulación mecánica.

Confirmándose en agar MacConkey para detectar los microorganismos lactosa positiva, inoculando por duplicado e incubando después 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se procedió a verificar la presencia de colonias lactosa positiva (de color rojo).

5.7 Contaminación controlada de larvas de mosca con *E. coli* enterotoxigénica.

5.7.1. Preparación de inóculo de *E. coli* enterotoxigénica.

Para la preparación del inóculo, se tomó 1 colonia de *E. coli* enterotoxigénica (LT+, ST+) con una concentración de 10⁸ sembrada sobre agar MacConkey para inocularla en Caldo Nutritivo, realizando todo el proceso en condiciones de esterilidad, se incubó a 35°C por 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo la titulación del inóculo, mediante diluciones, en las que se tomaron 0.5 ml del inóculo y se transfirieron a otro tubo que

contenía 4.5 ml de solución diluyente, se realizaron 7 diluciones más. Posteriormente, de las últimas 3 diluciones (diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9), se tomaron muestras de 50μ y se inocularon por duplicado en cajas de petri con agar MacConkey, incubándose después 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Transcurrido este tiempo se verificó y cuantificó la presencia de colonias. Considerándose aquellas cajas en las que se pudieran contar entre 20 y 200 UFC, el número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución. La titulación del inóculo de *E. coli* enterotoxigénica se realizó para cada lote de larvas que posteriormente sería contaminado con el inóculo.

5.8 Cuantificación de *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) inoculada en larva fresca y larva seca.

Para ver el riesgo que pudiera presentar el contacto de larvas inoculadas previamente con una dosis de 10^8 g/ml de *Escherichia coli* toxigénica, así como su persistencia en larva secada por 24 horas a 65°C .

5.8.1 Cuantificación de *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) inoculada en sustrato con larva fresca.

Se tomaron 5 muestras de 2 g de cada uno de los 5 lotes diferentes de larvas y sustrato en frascos de vidrio con tapón plástico previamente esterilizados a las que se

les contaminó con 0.5 ml del inóculo de *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) cuya preparación se menciona en el punto (5.7.1) las muestras inoculadas estuvieron a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de 1 h para posteriormente cuantificar la cantidad de *E. coli* presente, siguiendo la metodología ya descrita (5.6.2) excepto que sólo se realizaron 8 diluciones decimales.

5.8.2 Cuantificación de *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) en la larva seca (t=24h, T=65°C.)

Se formaron 5 lotes empleando diferentes recipientes (cajas de petri, frascos con tapa y papel de aluminio previamente flameados) con el fin de seleccionar aquel que impidiera la migración de las larvas al exterior y que asegurara el secado de las larvas eficientemente, después se inocularon con 0.5 ml del inóculo mencionado en el punto (5.7.1) a cada uno de los lotes. Las muestras inoculadas estuvieron a T° ambiente por una hora, pasado este tiempo, los lotes se introdujeron en una estufa de secado donde se mantuvieron a 65°C por 24 horas. Posteriormente se tomaron 0.5 g. De la larva seca de cada uno de los lotes, macerándolas con 4.5 ml de solución diluyente, las muestras se colocaron nuevamente en los tubos y fueron homogeneizadas en un vortex a la velocidad alcanzada por el aparato hasta obtener una muestra homogénea.

Posteriormente se realizaron las diluciones como se mencionó anteriormente (5.6.2) y se realizó la prueba del NMP para detectar los coliformes persistentes siguiendo la metodología descrita en el mismo punto.

5.9 Prueba de reactivación de *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) en larva seca (65°C/24h).

. Las muestras que dieron negativo a la prueba del NMP se sembraron en Caldo nutritivo finalmente se incubó a 37°C por 24 h. Con lo que se busco comprobar la eficiencia del tratamiento térmico en la destrucción de todas las *E. coli* enterotoxigenica. Para los tubos positivos se hicieron nuevos lotes de 2 g cada uno y se aumentó el tiempo de secado o se aumentó la temperatura a 75°C, para posteriormente detectar la viabilidad de la *E. coli* y sus toxinas.

5.10 Determinación de Toxina LT y ST de *E. coli* en larva seca, infectada experimentalmente.

Se verificó la presencia de toxinas (LT y ST) de *E. coli* en harina de larva seca inoculada.

Para detectar la presencia de la toxina ST se empleó la prueba de ratón lactante según Dean y cols., (1972) y para la detección de toxina LT se utilizó la prueba de ELISA según Ristaino y cols., (1983).

5.10.1. Prueba del ratón lactante

La inoculación intragástrica de ratones recién nacidos con toxina es una prueba uniforme, rápida, confiable, fácil de realizar y barata. Esta prueba detecta solamente la *E. coli* productora de la toxina ST, que provoca diarrea en los humanos y en los animales Dean y cols., (1972).

Procedimiento: El material enterotóxico se preparó con una muestra de 0.5 gramos de harina de larva secada a 65°C por 24 horas suspendida en solución salina fisiológica estéril. La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 40 minutos y el sobrenadante se filtró a través de filtro millipore tipo HA con poro de 0.45 micrómetros.

Los ratones se obtuvieron del bioterio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1. La pareja de ratones se mantuvo junta por espacio de una semana para esperar su apareamiento, y la hembra tuvo sus crías a los 15 días, al cabo de este tiempo se separaron de la madre y se procedió con la prueba

Los ratones lactantes se inocularon en la región intragástrica con 0.1 ml del material de prueba (material enterotóxico) antes descrito, teniendo la precaución de que estuvieran recién alimentados para hacer más evidente su estómago, se empleó jeringa hipodérmica con aguja de 21 x 13 mm. Cada ml de inóculo fue teñido con una gota de colorante azul de Evans al 2% para facilitar la lectura y comprobar la correcta inoculación.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos de cuatro, manteniendo a uno de los grupos como grupo de control negativo.

A las cuatro horas de inoculados, se sacrificaron los ratones con una sobre dosis de éter, luego se le efectuó la necropsia. Sus intestinos fueron removidos con pinzas.

Lectura: se pesaron los intestinos por separado y junto con el cuerpo. Para finalmente calcular la relación de:

Peso del intestino/Peso del resto del cuerpo

Las relaciones menores de 0.07 se consideraron negativas, las relaciones en el rango de 0.070 a 0.090 se consideraron positivas.

Las relaciones superiores a 0.090 se consideraron fuertemente positivas (Dean y cols., 1972), tomando en cuenta los controles negativos. Los filtrados se utilizaron el mismo día de su preparación.

3. Se colocaron 100 μ l de la muestra en la microplaca por duplicado. se incubó durante toda la noche a 4°C.
4. Se lavó con 150 μ l PBS-Tween al 0.05% se dejó agitando 3 minutos y luego se eliminó el buffer invirtiendo la placa sobre un papel absorbente. Se repitió el lavado 5 veces.
5. Se bloqueó con leche descremada al 3% en PBS agregando 100 μ l en cada uno de los pozos de la placa y se incubó a 37°C por una hora.
6. Se lavó 5 veces con PBS-Tween al 0.05% de la misma forma como se describe en el paso 4.
7. Se agregaron 100 μ l de antisuero (anti-LT) (título 1:200).
8. Se incubó 1 hora a 37°C
9. Se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05% de la misma forma como se describe en el paso 4.
10. Se adicionaron 100 μ l de conjugado (proteína A peroxidasa)(título 1:250) diluida en PBS.
11. Se incubó a 37°C por una hora.
12. Se lavó 5 veces con PBS Tween al 0.05% de la misma forma como se describe en el paso 4.
13. Se adicionaron 100 μ l en cada pozo del sustrato (0-fenilén diamino), el cual fue preparado al momento, se incubó en la obscuridad a 37°C hasta que se observó color paja, se detuvo la reacción adicionando 100 μ l por pozo de H₂SO₄ 3M y se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm.

5.11 Análisis Químico Proximal

El análisis químico proximal de harina de larva de mosca sometida a un tratamiento de secado a una temperatura de 65°C por 48 horas, se realizó empleando las técnicas oficiales, según métodos del A.O.A.C.15ª. Edición 1990 y que se indican en el apéndice 2.

Tabla (3). Técnicas analíticas para determinación de AQP

Determinación	Técnica	Método
Humedad	Secado por estufa	A.O.A.C. 931.01
Ceniza	Klemm	A.O.A.C. 942.05
Fibra Cruda	Weende	A.O.A.C. 962.09
Grasa	Soxhlet	A.O.A.C. 929.39
Proteína (N X 6.25)	MicroKjeldahl	A.O.A.C. 984.13

Fuente: Association of Official Agricultural Chemistry. 15ª. Edición 1990 Washington, DC.

5.12 Digestibilidad de la proteína.

Según la técnica 970.01 de digestibilidad de proteína con pepsina descrita en el "AOAC"15ª. Edición 1990 y descrita en el apéndice 2.

6.-RESULTADOS

6.1 Producción de larvas bajo condiciones de asepsia.

La variación en las concentraciones de leche adicionada con miel y salvado con las que se alimentaron a las larvas, dio como resultado que en la relación de 1:1(salvado-leche) que eran 20 g. de salvado en 20. de leche adicionada con miel se formaron grumos, que no permitieron una buena aereación y por esto fermentó la mezcla, alargando el tiempo de desarrollo por lo que la producción de larva fue sólo un 10% de lo que se esperaba y no se logro que alcanzarán un desarrollo de aproximadamente 9 mm de longitud. En la segunda relación de 2:1 mejoró la producción de larva, sin embargo en la siguiente que era de 3:1, la larva llego a desarrollarse sin ningún contratiempo alcanzando el tamaño y grosor máximo con respecto de las fórmulas probadas. Al probarse la relación 4:1, se obtuvieron larvas muy delgadas y muchas otras no alcanzaron a desarrollarse, y el tiempo de desarrollo entre ellas fue marcadamente mayor. Debido a lo anterior se continuó alimentando a las larvas con una relación de 3:1 logrando tener con esto unas larvas gordas y grandes y con ello pupas de mayor tamaño las cuales generaron moscas adultas de gran tamaño.

Las cajas de plástico en donde se llevaba cabo el desarrollo de la larva se colocaron dentro de una estufa de temperatura constante regulada a 35°C. Las charolas fueron cubiertas con película plástica adherible, esta se perforó para facilitar la entrada de aire con pequeños orificios los cuales debían ser suficientes para una buena aereación y de un tamaño tal que evitara que estas escaparan. Con lo anterior se redujo su tiempo de desarrollo a 3 días, al final de los cuales las larvas se encontraban en el tamaño máximo (9 mm aprox.)

6.2 Detección externa e interna de m.o. coliformes a través de las diferentes generaciones de larvas.

El lavado de larvas pretendía que a través de una secuencia generacional su carga microbiana fuera disminuyendo tanto interna como externamente, a medida que una nueva generación fuera emergiendo, sin embargo al realizar este proceso de lavado con solución salina fisiológica a cada generación, mostró que la generación subsecuente seguía presentando carga microbiana similar en cada una, tanto en el agua de lavado como al realizar el macerado de la propia larva, siendo cualitativamente mayor en esta forma la presencia de coliformes.

Tabla (2). Presencia de microorganismos coliformes en diferentes generaciones de larvas.

Lavado a generaciones	H₂O de Lavado	Macerado de larvas
1ra. Generación	+	+
2da. Generación	+	+
3ra. Generación	+	+
4ta. Generación	+	+
5ta. Generación	+	+

* Tratamiento realizado por duplicado

6.3 Resultado del lavado y desinfección de larvas, para la eliminación de bacterias

Se logró eliminar la carga microbiana externa utilizando soluciones de cloro al 0.05% y yodo yodurado al 0.05% como desinfectantes y no se logró eliminar la contaminación interna con ninguno de los tratamientos empleados. El jabón y el alcohol no lograron la eliminación de los microorganismos ni en su superficie, ni en su interior.

Tabla (3). Presencia de coliformes en larvas tratadas con diferentes soluciones.

Compuesto químico	Presencia de coliformes en H ₂ O de lavado	Presencia de coliformes en macerado de larvas
Solución de Jabón 0.05%	+	+
Solución de alcohol 0.05%	+	+
Solución clorada 0.05%	-	+
Solución de yodo yodurado 0.05%	-	+

Tratamiento realizado por duplicado

6.4 Resultados del análisis cuantitativo de bacterias coliformes en sustrato, larva fresca y larva seca (65°C/ 24 horas)

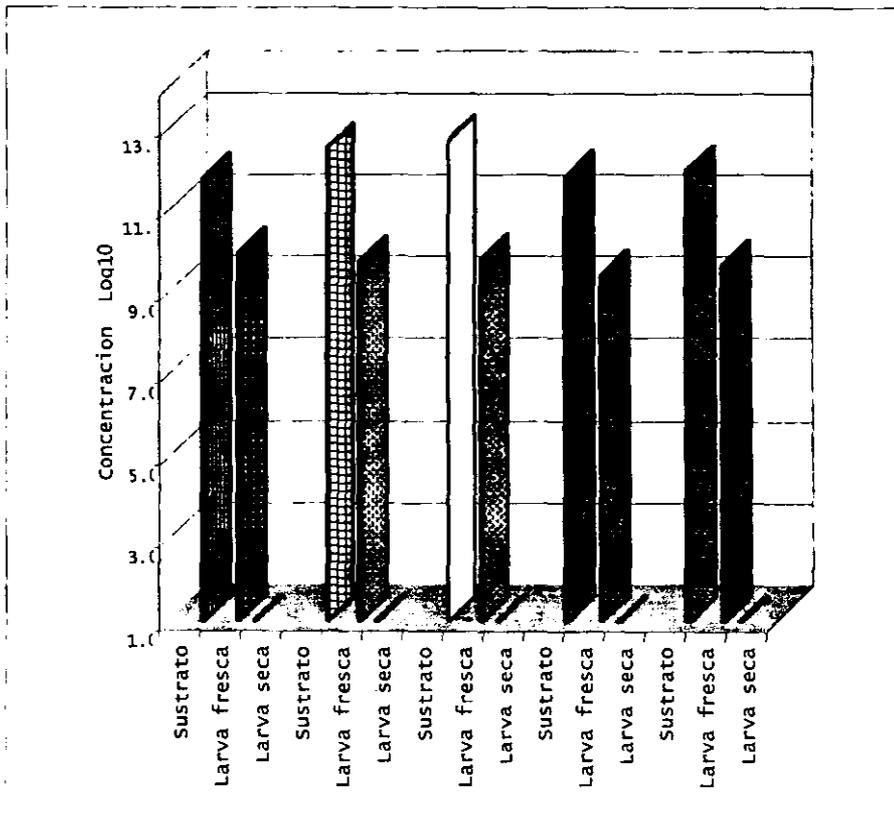
Al no tener larvas libres de microorganismos coliformes se sometió la larva a un proceso de secado, tratando térmicamente al sustrato y manejando condiciones de asepsia en la producción de las larvas. Se les cuantificó la carga de coliformes al sustrato, larva fresca y seca, el análisis cuantitativo da como resultado una mayor contaminación en el sustrato, en cantidades hasta de 10^{11} , la larva fresca soporta poblaciones hasta de 10^7 , como lo muestra la tabla 4, el grado de contaminación no varió significativamente en los diferentes lotes. Se sometió a la larva a un tratamiento térmico a 65°C, se hizo un muestreo al transcurrir 1 hora, el cual presentó crecimiento de colonias, el muestreo a las 2 horas mostró ausencia total de microorganismos, así como el muestreo a las 3 horas. Sin embargo, debido a la resistencia que ofrece su cuerpo a la pérdida de humedad la larva tiende a la descomposición, por lo anterior el tiempo de secado se extendió hasta 24 horas, en donde finalmente tampoco se tubo presencia de bacterias coliformes como lo presenta la tabla 4 y se puede apreciar su distribución en la gráfica 1.

Tabla (4). Resultado de las UFC/g de bacterias coliformes en sustrato, larva fresca y larva seca (65°C/ 24 horas).

Producto	Lote 1 UFC/g.	Lote 2 UFC/g.	Lote 3 UFC/g.	Lote 4 UFC/g.	Lote 5 UFC/g.
Sustrato	59×10^{10}	31×10^{11}	50×10^{11}	64×10^{10}	87×10^{10}
Larva fresca	82×10^8	54×10^8	62×10^8	25×10^8	44×10^8
Larva seca	0	0	0	0	0

Cada lote fue analizado por duplicado.

Gráfico 1. Distribución de bacterias coliformes en diferentes lotes de sustrato larva fresca y larva seca (65°C/24 horas)



6.5 *E. coli*. enterotoxigénica (LT+, ST+) en UFC/g inoculada en larva fresca y larva seca (65°C/24 horas).

La larva de mosca fresca inoculada con *E. coli* enteotoxigénica presentó cantidades de 10^7 UFC/g 1 hora después de la inoculación, ver tabla (5).

La larva ya inoculada y seca no presento formación de colonias, sin embargo, al someter al producto seco a un proceso de reactivación, este resulto positivo, lo que nos permite deducir que este tratamiento térmico no fue suficiente para destruir los microorganismos presentes en la larva, sólo los inhibe parcialmente y cuando vuelve a tener condiciones favorables de temperatura, este tiende activar su multiplicación.

Tabla (5). *E. coli*. enterotoxigénica en UFC/g en larva fresca y larva seca (65 C/24horas).

Producto	Lote 1 UFC/g	Lote 2 UFC/g	Lote 3 UFC/g	Lote 4 UFC/g	Lote 5 UFC/g
Larva fresca	32×10^7	45×10^7	37×10^7	51×10^7	42×10^7
Inoculo	25×10^8	37×10^8	23×10^8	28×10^8	32×10^8
Larva seca	0	0	0	0	0

* Cada lote fue analizado por duplicado

6.6 Determinación de Coliformes totales (NMP) reactivados en larva seca.

En las muestras que fueron negativas a coliformes en el cultivo directo y se sometieron a reactivación fueron detectados hasta una concentración de 42 bact./g de muestra. Los resultados en la utilización de la técnica del NMP como se puede ver en la tabla 5 muestra que 3 tubos resultaron positivos de 5.

Tabla (5). Resultados de Coliformes totales por la técnica NMP en larva seca (65°C/24 horas)

Muestra	NMP / g
1	42
2	0
3	0
4	23.0
5	20.0

Cada muestra analizada por triplicado

6.7 Determinación serológica de Toxina LT y ST de *E. coli* en larva seca, infectada experimentalmente.

Al realizar las pruebas para detección de la presencia de toxinas LT y ST, se observó ausencia total de toxinas confirmándose esto con los controles, tanto en la prueba de Elisa como en la de ratón Lactante.

Tabla (6). Determinación de toxina (LT) y (ST) en larva seca (65°C/24horas).

Muestra	(LT) Elisa	(ST) Ratón lactante
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
control	+	+

Cada muestra realizada por duplicado

6.8 Composición Proximal.

La determinación del AQP de larva seca a 65°C por 48 horas, se obtuvo como resultado como se puede observar en la tabla 7, que el contenido en proteína fue de 53.43%, el contenido de humedad de 4.94% al contenido de cenizas se tuvo un 8.97%, presenta una mínima variación con respecto al contenido de proteína, humedad y ceniza que presentan trabajos realizados anteriormente, el contenido de fibra es muy similar al de otros autores, el valor obtenido fue de 7.52% y el de otros trabajos oscila entre 6.4 y 7.0%. Para el extracto libre de nitrógeno, que son en su mayoría carbohidratos, se obtuvo un valor de 9.24%.

Tabla (7). Resultados de la composición proximal de harina de larva de mosca sometida a un tratamiento térmico de 65°C durante 48 h.

Determinación	Experimental (%)	Comparación bibliográfica	
		Andrade (%)	Newton
Humedad	4.94	5.9	7.9
Ceniza	8.97	5.7	14.66
Fibra cruda	7.52	7.4	6.4
Grasa	5.33	19.1	15.8
Proteína (N= 6.25)	53.43	54.6	42.1
Extracto Libre de Nitrógeno	9.24	9.4	13.14

Cada determinación se realizó por triplicado.

6.9 Digestibilidad de proteína.

Por otro lado, en la prueba de digestibilidad de proteína, el resultado presenta un 88.11% de digestibilidad, valor muy similar al encontrado por Andrade (1987) que fue del 90.0% para la larva de mosca y para la caseína obtuvo un valor de 93.33%

7.-DISCUSSION

7.1 Producción aséptica de larva de mosca

Se logró reducir el tiempo de producción de la larva al considerar una temperatura constante de 35°C en charolas que contenían proporciones de 3:1 de salvado y leche en polvo adicionada con miel y agua suficiente para hacer una mezcla, la charola fue cubierta con una película plástica perforada para permitir la entrada de aire, logrando un aumento en la producción de larva reduciéndose su tiempo de desarrollo, a 3 días, mientras que Andrade (1987) empleando estiércol y temperatura de 34°C tarda 7 días en obtener larvas desarrolladas.

La disminución en el tiempo de desarrollo de las larvas permite obtener una producción más acelerada, lo que se atribuye a las condiciones de temperatura y humedad que permanecen constantes en el medio de desarrollo creando un hábitat ideal para la larva al facilitar la ingesta de nutrientes, al ir disminuyendo la humedad por un fenómeno de convección entre el aire y el medio de desarrollo de la larva, provocaba una reducción en la facilidad de ingerir su alimento, propició que su desarrollo se llevará a cabo de manera más lenta. Lo anterior nos comprobó que una mejora en las condiciones de producción es, la de mantener cierta humedad en el sustrato.

La separación de la larva se llevó a cabo de una manera más rápida y limpia cuando sustrato y larva fueron colocados en un espesor aproximado de 1cm. sobre una malla, colocando sobre ellos un reflector de luz, a una distancia de 5 a 10 cm del recipiente de separación, debido a que el sustrato se encontraba húmedo, se quedó

sobre la malla y a la vez le proporcionó a la larva una mayor movilidad, que facilitó su paso a través de los orificios de la malla.

En el proceso de separación o recolección, Teotia y Miller (1973) utilizaron la pupa como fuente de proteína quienes realizaron un proceso de separación por flotación. Andrade (1987) utilizó un proceso de separación por malla aprovechando su movilidad y la tendencia de la larva a esconderse de la luz por ser fototáctico-negativo. Retomando la experiencia de Andrade, en este trabajo la rapidez en la separación se vio aumentada por el reflector de luz además de la observación de que las larvas tienden a escapar de la desecación al buscar refugio en lugares húmedos, lo que anterior se observó a través de la secuencia en las mejoras realizadas para la obtención de larvas, las cuales fueron las de elevar la temperatura a 35°C y mantenerla constante durante su desarrollo, además de mantenerlas cubiertas con la película plástica perforada que mantenía húmedo el sustrato y evitaba el escape de las larvas.

Por otro lado, la producción de huevos no fue constante observando que variaba en función a las condiciones ambientales, debido a que la actividad de las moscas depende en alto grado la presencia de luz y el aumento en su actividad es debida a: La temperatura a la que está expuesta, edad y tamaño de las moscas, las de tamaño grande son de mayor fecundidad. El tamaño de las moscas adultas y su fecundidad dependen de la nutrición en la vida larvaria y de la alimentación de las moscas, una dieta basada en agua con azúcar y muy poca cantidad de leche da como resultado que se tenga una disminución en la cantidad de huevos que ovopositan. La calidad de la nutrición en las moscas adultas, influye grandemente en la fecundidad.

Cuando se alimentaron con azúcar y agua exclusivamente sin adición de proteínas, la maduración sexual de los machos no se afectó, pero la de los ovarios de las hembras si disminuyó Otto Hecht, (1970). Se observó además, que no se logra un control total en el crecimiento inoculando huevecillos del mismo día para un lote. Andrade (1987) menciona que para obtener un control de crecimiento, inocula el sustrato sólo con huevecillos del mismo día evitando el desfase de estadios larvarios en una misma charola. Se considera que lo anterior no se logró totalmente debido a que algunos huevecillos no lograban desarrollarse al mismo tiempo, esto presumiblemente a una mayor desecación en los huevos de mosca, observando que su desarrollo, se producía 1 o 2 días después. Como algunos huevecillos desarrollados tenían la tendencia a salir de las charolas, al cubrir las con la película plástica que se encontraba perforada, se logró evitar que salieran.

Andrade (1987), Calvert *et al*, (1969, 1970); y Newton, (1977) en la búsqueda de un alimento alternativo con características nutricionales de productos tales como: plasma porcino, concentrado proteico de soya proteína hidrolizada de pescado y pensando que además del alto valor nutritivo, tuviera un costo más accesible al productor, diversos estudios han evaluado la utilización de larva de mosca como suplemento alimenticio Andrade (1987), Calvert *et al* (1979); Teotia y Miller (1979), Ocio *et al* (1973), entre otros han evaluado la producción, rendimiento, biodegradación de sustrato, comparándolos mediante pruebas de utilización neta de proteína (NPU). Sin embargo, debido a la tendencia a utilizar como materia prima alternativa el estiércol en la obtención de un alimento proteico a menos costo, algunos investigadores han expresado la necesidad de evaluar la posibilidad de que a través de ellos se diseminen agentes patógenos.

7.2 Detección externa e interna de m.o. a través de las diferentes generaciones de larvas.

El tratamiento de lavado una secuencia de 5 generaciones mantenidas bajo condiciones de asepsia, y el análisis microbiológico cualitativo de microorganismos coliformes que se realizó posteriormente, permitió observar que generación tras generación siguió presentando carga microbiana similar en cada una de ellas, tanto en el agua de lavado como al realizar el macerado de la larva, siendo de esta forma aun mayor la invasión de bacterias sobre el medio.

En trabajos realizados por Greeberg (1958) se informa que el problema de muchos investigadores es que se desconoce el comportamiento y destino de bacterias patógenas ingeridas por larva de mosca y que generalmente se encuentran en su medio de desarrollo, en ese trabajo se estudio la supervivencia de *Salmonella* y *Shigella* a través de las diferentes fases de la mosca, como resultado de esa investigación reporto que el grado de contaminación es menor en mosca adulta que en su fase de larva indicando con éso en esa fase hay una destrucción parcial en la población bacterial. Sin embargo, ese trabajo no se continuó.

En este trabajó se mantuvo la carga microbiana fue mas o menos constante a través de las 5 generaciones, posiblemente el medio ambiente favoreció la contaminación del sustrato donde se desarrollaron las larvas, pero si esto sucede en condiciones relativamente controladas, el grado de contaminación empleando estiércol deberá ser mayor.

Por eso, en el tratamiento de lavado se verificó la presencia o ausencia de microorganismos coliformes en lavados con solución salina fisiológica estéril y presentó una disminución de colonias en el agua de lavado, pero finalmente al realizar el lavado a la 5ª generación, se comprobó que tanto el agua de lavado como el macerado de larvas, seguía presentando carga microbiana sin disminuir. Comprobando que aún bajo condiciones de laboratorio no se puede lograr una ausencia total de bacterias coliformes, las cuales se presentaron en las generaciones subsecuentes, indicando con ello, que el riesgo potencial persiste en su consumo al no eliminarse las bacterias coliformes.

7.3 Lavado y Desinfección de larvas para la eliminación de bacterias

De los productos químicos que se utilizaron se logró que, con el uso de una solución de cloro al 0.05% y una solución de yoduro yodurado al 0.05% como desinfectante, la carga microbiana del agua de lavado desapareciera, sin embargo al realizar el macerado de la larva, seguía presentando carga microbiana, atribuyéndose a que la larva pudieran refugiar microorganismos coliformes en su interior, debido a una posible adaptación de los microorganismos al interior del intestino de la larva.

El utilizar una solución de alcohol y una solución jabonosa, no presentó cambio alguno en el agua de lavado, y por otro lado el macerado mostró un gran número de colonias presentes ya sea en el agua de lavado o en el interior de su cuerpo.

La concentración utilizada en los diferentes desinfectantes pudo ser mayor pero no se incrementó para evitar la presencia de residuos de productos químicos como contaminantes, los resultados demuestran que la desinfección sólo se logrará en la superficie pero los que llegaran a pasar al intestino no se ven afectados.

7.4 Cuantificación de bacterias coliformes en larva fresca y larva seca.

La eliminación de microorganismos coliformes en larvas producidas bajo condiciones de laboratorio no se logró, por lo que se procedió al análisis de las larvas en su etapa final y del sustrato, con lo que se comprobó que la carga microbiana del sustrato era muy alta (10^{11} UFC/g) y que la larva fresca soporta poblaciones hasta de 10^7 UFC/g y las cantidades son uniformes para diferentes lotes.

Lo anterior se atribuye a una sustancia adherente que es producida por la larva, de coloración café oscura y que produce en cantidad suficiente para transmitir al sustrato tanto el color como un olor; a la fermentación producida por la leche adicionada con miel que contiene el sustrato o bien la alta humedad dentro de la caja, haciendo que las condiciones fueran muy favorables para toda clase de crecimiento microbiano.

Greenberg (1958., 1959) afirma, que la flora microbiana de la larva puede ejercer un efecto antibiótico en el patógeno. Además, las larvas poseen una Lisozima (EC 3.2.1.17) que cataliza la hidrólisis de la 1-4 β glicosidico y el N-acetilglucosamino, la unión entre ácido N-acetil muramico del peptidoglicano presente en la pared celular de muchas bacterias.

La lisozima es considerada como parte del mecanismo de defensa frente a bacterias y ha sido descrita en casi todos los animales. Las larvas poseen una lisozima (EC 3.2.1.17) que es considerada como parte del mecanismo de defensa frente a bacterias Jolles P. y Jolles J. (1984); Jolles *et al.*, (1979); Hultmark *et al.*, (1980); Fernández S., (1977); Espinoza-Fuentes *et al.*, (1984); Dement'eva and Pishchenko., (1985). Esto hace evidente que la larva de mosca doméstica (Diptera) digiere bacterias (su mejor alimento) como una costumbre Lemos y Terra, (1991); Espinoza-Fuentes *et al.* (1987).

Según Greenberg (1959) la diferencia en el medio de crianza de la larva se interpreta como la variabilidad natural misma en la interacción anfitrión-contaminante y no como una medida significativa producidas por un medio. De cualquier medio los adultos emergen con un número de bacterias similar. Esto se puede explicar por los fenómenos que se presentan durante el desarrollo larvario, descritos anteriormente. Lo anterior, aunado a este trabajo nos sugiere que las moscas a través de sus diferentes fases de desarrollo son capaces de transmitir microorganismos, siendo durante la fase larvaria, la fase o etapa que se presenta una mayor contaminación. Los patógenos tienen la inhabilidad o habilidad limitada de propagarse bajo condiciones competitivas en los diversos medios de la larva.

En el trabajo realizado por Greenberg (1959) se recuperó *Pseudomona sp.*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Escherichia coli*, *Escherichia freundii* y *Aerobacter aerogenes*, en medios de crianza de laboratorio.

Conociendo que tanto cualitativa como cuantitativamente la contaminación puede ser transmitida generación tras generación o bien pueden volverse a recontaminar al no tener un sustrato completamente estéril fermento, posteriormente se llevó a cabo un tratamiento de secado en donde la larva fue sometida durante 24 horas a 65°C en una estufa de secado, presentando como resultado una ausencia de microorganismos coliformes en el producto seco.

La importancia en la obtención de larva de mosca es la de producir un alimento con alto nivel de proteína y alta digestibilidad a partir de materias primas alternativas. Por ello, el tratamiento de las proteínas por calor, puede modificar de una forma más o menos importante esta conformación, produciendo desnaturalización. Por lo que se recomienda un tratamiento térmico no muy severo. Sin embargo, durante el proceso térmico se hicieron pequeños experimentos donde se sometió a la larva a un tratamiento térmico a 65°C, se hizo un muestreo al transcurrir 1 hora, el cual presentó crecimiento de colonias, el muestreo a las 2 horas mostró ausencia total de microorganismos, así como el muestreo a las 3 horas.

Sin embargo, debido a la resistencia que ofrece su cuerpo a la pérdida de humedad la larva tiende a la descomposición, por lo anterior y tomando como base la temperatura de secado de 65°C durante toda la noche (Teotia and Miller, 1973) el tiempo de secado se extendió hasta 48 horas a una T° de 65°C, donde el contenido de humedad que presenta el producto hacen de este un producto sumamente estable a una recontaminación.

7.5 Cuantificación de *E. coli* enterotoxigénica (LT+, ST+) inoculada en larva fresca y larva seca (65°/24h).

El proceso de secado para la larva a la que se le adicionó el inóculo, se llevó a cabo en paquetes de aluminio previamente flameados, debido a que se lograba evitar la huida de la larva, lo que no se lograba cuando se utilizaron cajas de petri y además permitió que se llevara a cabo de manera eficiente el proceso de secado. La dosis inoculada en las larvas con *E.coli* patógena comprobada cuantitativamente antes de someterlas al proceso térmico, permitió confirmar que el tiempo y temperatura de secado fueron eficientes para el control de estos patógenos. Sin embargo, al someter el producto a un proceso de reactivación, éste resultó positivo, lo que permitió deducir, que este tratamiento térmico sólo inhibe a la *E. coli* en la larva y cuando vuelve a tener condiciones favorables de temperatura, recobró su vitalidad.

Por lo que el tratamiento de secado se llevo a un mayor tiempo de secado (48 horas) y a una temperatura mayor (75°C por 24 horas), resultando aún, viable la reactivación en ambos casos.

7.6 Determinación de Toxina LT y ST de *E. coli* en harina de larva de mosca.

Las pruebas para detectar la presencia de toxinas LT y ST fueron negativas, lo anterior sugiere que el tratamiento térmico de 65°C por 48 horas fue suficiente para eliminar las toxinas que pudieran haber segregado las bacterias que se encontraban presentes en las larvas de mosca o que no se liberaron en cantidades apreciables.

7.7 Composición Proximal.

La determinación del AQP se realizó para verificar como fue afectada la composición química de la larva después de un tratamiento de secado a 65°C por 48 horas. Los resultados del análisis químico proximal (ver la tabla 7), muestra un contenido de proteína de 53.43% que presenta una mínima variación con respecto al contenido de proteína que presenta Andrade (1987) que es del 54.6% y una mayor variación con respecto al 42.1% que presenta Newton et al. (1977), ésto atribuido a las condiciones de secado, en donde Andrade (1987) mantiene la temperatura de secado, más no así el tiempo y por otra parte Newton (1977) no menciona sus condiciones de secado. Sin embargo el producto sigue manteniendo un contenido proteico similar al que presentan otros autores después del tratamiento de secado.

El contenido de humedad de 4.94% fue menor al alcanzado por el trabajo de Newton (1977) que fue de 7.9%, lo que aumenta su conservación, al disminuir su actividad de agua.

Con respecto del contenido de cenizas se tuvo un 8.97%, un valor bajo con respecto al 14.66% que obtuvo Newton (1977), se considera que pudiera haber contenido residuos de estiércol, a diferencia de las larvas obtenidas en este trabajo.

El contenido de fibra es muy similar al de otros autores, el valor obtenido fue de 7.52% y el de otros trabajos oscila entre 7.0 y 6.4%. Este contenido de fibra cruda, lo compone en su mayoría la quitina, que forma parte de la cutícula de la larva y que constituye uno de los principales compuestos del exoesqueleto de la mosca adulta. (Andrade 1987, Terra and Ferreira 1994).

Para el extracto libre de nitrógeno, que son en su mayoría carbohidratos, se obtuvo un valor de 9.24%. Según Andrade (1987) el glucógeno es el compuesto predominante de estos hidratos de carbono y es una reserva energética en la etapa de pupa.

7.8 Digestibilidad de proteína.

Para la prueba de digestibilidad de la proteína de larva de mosca, se obtuvo un valor de 88.11% y Andrade (1987) reporta un valor de 90.0%, él es el único autor que reporta resultados en pruebas de digestibilidad "in vitro" de harina de larva, en comparación con la proteína de referencia que es la caseína, resulto en un valor de 93.33%, se observo un valor muy similar en la proteína de larva de mosca, que presenta a la larva como un producto de alta digestibilidad.

8.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De la experimentación realizada se concluye que la presencia de bacterias coliformes continua a través de varias generaciones, se esperaba que esta fuera disminuyendo debido a los antecedentes que se tenían bibliográficamente, mencionaba, que como todo organismo superior, los insectos han sido dotados con un necesario y eficiente sistema inmune de la larva. En algunos trabajos se encontró que contienen diversos factores antibacterianos, como respuesta a una muerte inminente o a la variabilidad de bacterias. Sin embargo, lo observado en este trabajo experimental sugiere que la fase larvaria presenta una alta contaminación de microorganismos al no tener un control total del ambiente, así como la posible recuperación de algunos microorganismos que pudieran adaptarse a las condiciones que prevalecen en el intestino de la larva y que además presumiblemente pudieran sobrevivir a través de la metamorfosis, pasando así a una nueva generación, pero la tendencia a transmitir microorganismos se lleva a cabo a través de las diferentes generaciones que se estudiaron.

Por otro lado, al someter a las larvas a un proceso de desinfección, tampoco se logró eliminar su carga microbiana, debido a que siguen presentado microorganismos en su interior.

Lo anterior hace evidente que para la utilización de larva de mosca es necesario que sea sometida a un tratamiento térmico, sin embargo, el tratamiento propuesto en este trabajo logró disminuir el contenido de humedad que permitió una mayor conservación del producto, así como eliminó la carga microbiana, además se observó

una ausencia total de toxinas que pudieran haber segregado las bacterias que se encontraban presentes o no se liberaron en cantidades apreciables, sin embargo, al someter al producto a condiciones favorables para los microorganismos estos tienden a reactivarse

Finalmente, el Análisis Químico Proximal realizado a la larva de mosca muestra que aun bajo el tratamiento de secado esta sigue conservando las cualidades proteicas, además de ser altamente digerible. Por lo que se recomienda realizar el tratamiento de secado a temperaturas superiores a las que se utilizaron en este trabajo, ya que debido a algunos problemas técnicos no se elevó la temperatura de secado, pero pudiera ser posible que con temperaturas superiores no se lograra la reactivación de los m.o.

El tratamiento de secado propuesto en este trabajo puede ser seguro para bacterias toxigénicas de *E. coli*, debido a que bajo estas condiciones no liberó producción de toxina o si lo hizo, fue en cantidades no detectables. Las bacterias de *E. coli* se mueren o se inactivan, sin embargo esto no se puede generalizar para otro tipo de bacterias como termófilas o termodúricas que soportan altas temperaturas de pasteurización, que pudieran estar presentes en otro tipo de sustratos.

Por lo anterior se recomienda realizar otro tipo de trabajos para conocer su relación con respecto a parásitos y virus, así como para algunas otras bacterias patógenas.

La administración de larva de mosca viva, como parte de la alimentación de cerdos, es una buena alternativa siempre y cuando se produzcan bajo condiciones controladas y en el caso de utilizar sustratos como materia fecal de la misma granja, para la producción de larva, se pone en riesgo a los animales nuevos que no hayan estado en contacto previo con el nivel de contaminación de la misma así como a los lechones, e igual sucedería al utilizar larva seca aunque con, menor riesgo.

9.- APENDICES

Apéndice 1 (Técnica microbiológica)

TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

La técnica que a continuación se describe, estima el contenido de microorganismos con base en la magnitud del cambio observado en los cultivos como resultado de la actividad bacteriana. Son pues, verdaderas estimaciones y no recuentos en el sentido estricto de la palabra a pesar que los resultados se expresan en número de microorganismos por gramo o mililitro del material.

La técnica del número más probable (NMP), consiste en inocular series de tubos con un medio de cultivo y algún dispositivo o indicador que permita poner de manifiesto un microorganismo o un grupo particular de ellos. Un cierto número de tubos se inocula con volúmenes definidos de muestra: por ejemplo 3 tubos con 10 ml, 3 con 1 ml y 3 con 0.1 ml. Después de la incubación es de esperarse, si la distribución de microorganismos viables es homogénea en la muestra original, un número de tubos positivos en proporción directa al contenido microbiano de la muestra. Para la combinación de tubos positivos, con respecto a los inoculados, existe un número que puede consultarse en las tablas (Tabla 8) que para el efecto acompañan al método.

TABLA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE PARA LA DETECCIÓN DE M.O.

Tubos inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:01 g de muestra
 3 con 1 ml dilución 1:001 g de muestra
 3 con 1 ml dilución 1:0001 g de muestra

Tabla. (8) Número Más Probable de Organismos.

Tubos Positivos			NMP/g	Tubos Positivos			NMP/g
3 (0.1)	3 (0.001)	3 (0.0001)		3 (0.1)	3 (0.001)	3 (0.0001)	
0	0	0	-3.0	2	0	0	9.1
0	1	0	3.0	2	0	1	14.0
0	2	0	6.0	2	0	2	20.0
0	3	0	9.0	2	0	3	26.0
1	0	0	3.0	2	1	0	15.
1	1	0	6.1	2	1	1	20.0
1	2	0	9.2	2	1	2	27.0
1	3	0	12.0	2	1	3	34.0
2	0	0	6.2	2	2	0	21.0
2	1	0	9.3	2	2	1	28.0
2	2	0	12.0	2	2	2	35.0
2	3	0	16.0	2	2	3	42.0
3	0	0	9.4	2	3	0	29.0
3	1	0	13.0	2	3	1	36.0
3	2	0	16.0	2	3	2	44.0
3	3	0	19.0	2	3	3	53.0
0	0	1	3.6	3	0	0	23.0
0	1	1	7.2	3	0	1	39.0
0	2	1	11.0	3	0	2	64.0
0	3	1	15.0	3	0	3	95.0
1	0	1	7.3	3	1	0	43.0
1	1	1	11.0	3	1	1	75.0
1	2	1	15.0	3	1	2	120.0
1	3	1	19.0	3	1	3	160.0
2	0	1	11.0	3	2	0	93.0
2	1	1	15.0	3	2	1	150.0
2	2	1	20.0	3	2	2	210.0
2	3	1	24.0	3	2	3	290.0
3	0	1	16.0	3	3	0	240.0
3	1	1	20.0	3	3	1	460.0
3	2	1	24.0	3	3	2	1 100.0
3	3	1	29.0	3	3	3	> 1 100.0

Apéndice 2 (Métodos utilizados para el Análisis Químico Proximal)

Humedad

1. Siguiendo el método del A.O.A.C. 931.01 15^a. Edición 1990.
2. Se fijó que 5 g de muestra se sequen durante 5 h en una estufa de vacío a 98-100° C en una cápsula de aluminio de 40-70mm de diámetro. Pesar la muestra, reportando la pérdida de peso como humedad.

$$\% \text{Humedad} = (\text{ml de H}_2\text{O}) * 100 / \text{Peso de la muestra en g}$$

Cenizas

1. El método utilizado para la determinación fue el 942.05 del A.O.A.C. 15^a Edición 1990.
2. Se pesan 2 g de muestra en un crisol de Porcelana, puesto previamente a peso constante.
3. La muestra se incineró hasta tener un color negro.
4. Posteriormente el crisol se colocó en una mufla a temperatura de 600°C durante 2 h. Al término de este tiempo se pasa al desecador y se pesa.
5. Reportando la ceniza se relaciona con la muestra que se pesó inicialmente y se expresa en porcentaje.

$$\% \text{ Ceniza} = (\text{Peso de cenizas} / \text{Peso de la muestra}) * 100$$

Fibra Cruda

1. Se determinó por el método del A.O.A.C., 962.09, 15ª Edición 1990.
2. Se pesaron 2.0 g de muestra, se transfirieron a un aparato de extracción con éter de petróleo, fue sometido a agitación, asentamiento y decantación 3 veces.
3. Se secó a temperatura ambiente la muestra extraída y se transfirió a un matraz cónico. Se adicionó 200 ml de H_2SO_4 y se llevó a ebullición durante 30 min a volumen constante con movimientos rotatorios a intervalos de tiempo.
4. Posteriormente se dejó, reposar 1 minuto y se vertió sobre un embudo buchner provisto de papel filtro, se drenó por succión suave el embudo ya preparado, realizándose la filtración completa de los 200 ml 10 minutos.
5. Se lavó el material insoluble con agua hirviendo varias veces hasta que el agua de lavado no tuvo acción ácida.
6. La muestra se lavó con NaOH, y se llevó a ebullición siguiendo el mismo tratamiento que en el punto 3.
7. Se filtró totalmente con ayuda de agua hirviendo, después se dio un lavado con HCl, se lavó varias veces hasta que el agua quedó libre de ácido.
8. Se lavó entonces con 3 porciones de 50 ml de H_2O y 25 ml de alcohol.
9. Se pasó el material insoluble a un papel filtro sin cenizas, se secó a $100^\circ C$ hasta un peso constante.
10. Finalmente se incineró el papel y su contenido a unas cenizas color rojo tenue

11. Para el resultado se restó el peso de las cenizas al aumento del peso en el papel debido al material insoluble y se registro la diferencia como fibra cruda

$$\% \text{ Fibra Cruda} = (A - B) / C * 100$$

A= Peso de cenizas.

B= Aumento de peso en el papel debido al material insoluble.

C= Peso de la muestra

Grasa

1. Se utilizó el método del A.O.A.C. 929.39 15ª Edición 1990.
2. Se pesaron 2 g de muestra seca, se envuelven en papel filtro para introducir a un cartucho de extracción.
3. Se colocó en el aparato Soxhlet, se adicionó éter de petróleo como solvente dentro de un matraz, puesto previamente a peso constante y se mantiene en reflujo durante 3 h, al término se coloca en una estufa a secar a 100°C a peso constante.
4. Enfriar en el desecador a la temperatura del lugar y pesar, el peso constante es logrado cuando periodos sucesivos de secado de 1 h muestran una pérdida adicional <0.05%.

$$\% \text{ Grasa} = (\text{Peso de la grasa} / \text{Peso de la muestra}) * 100$$

Proteína Cruda

1. Por el método del A.O.A.C. 984.13 15ª Edición 1990.
2. A una muestra de 2.0 g colocada en un matraz Kjeldahl, se le agregaron 15 g de K_2SO_4 más 0.8 g de $CuSO_4$ y por último 20 ml de H_2SO_4 .
3. Se llevó a cabo la digestión en un aparato microkjeldahl hasta que tomó un color verde perla transparente, aproximadamente 90 min.
4. Se enfrió y añadió 250 ml de H_2O y 100 ml de $NaOH$.
5. Posteriormente se destiló recogiendo los vapores en una solución de ácido bórico al 5%.
6. Finalmente se titula la solución de ácido bórico con HCl al 0.1N

$$\% \text{ Proteína cruda} = ((A * B * 0.014 / C) * 6.25) * 100$$

A= ml de HCl .

B= Normalidad HCl .

C= Peso de la muestra en g.

Digestibilidad de Proteína

1. Método del A.O.A.C., 971.09 15ª Edición 1990.
2. A una muestra seca y desgrasada de 0.5 g se le adicionó una solución de pepsina 150 ml preparada ese mismo día a 45°C (con actividad 1:10000) a una concentración de 2 g/l en una solución de HCl.
3. Asegurándose de que la muestra y el testigo (caseína) estuviera completamente mojados por la solución de pepsina, se colocaron en una estufa con agitación constante a incubar 16 h a 45°C, al final de las cuales la suspensión se separó centrifugándola a 2900 rpm durante 30 minutos.
4. Por otro lado se secan filtros de fibra de vidrio por 30 minutos a 110°C, se enfrían en el desecador por 30 min. y se pesan
5. Al paso anterior se le denomina (**W1**).
6. Se colocó el filtro pesado en el embudo buchner, se aplicó succión y la muestra se filtró, después que el sobrenadante ha pasado a través del filtro, se le transfiere a otra botella y se le realizan 2 enjuagues con 15 ml de acetona.
7. El residuo se coloca en el horno, se enfría y se pesa, a esto se denomina (**W2**).
8. Finalmente se determina la proteína no digerible transfiriendo el residuo contenido en el filtro directamente a un matraz kjeldahl y se procede como en el método 984.13 del A.O.A.C. para calcular el % de proteína basado en la muestra original al lo cual se le denomina (**Wt**), el resultado representa el porcentaje de proteína no digerible en la muestra.

$$\% \text{ de Proteína digerida} = ((W1 - W2) / Wt) * 100$$

Apéndice 3 (Medios de Cultivo)

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR MacConkey

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	17.0
Mezcla de peptonas	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001

pH final 7.1 +/- 0.2

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Mezclar totalmente y después calentar y agitar frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a 45 a 50°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

CALDO LAURIL SULFATO

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Lauril Sulfato de Sodio	0.10
Peptona de caseína	20.00
Lactosa	5.00
Fosfato dipotásico	2.75
Fosfato monopotásico	2.75
Cloruro de sodio	5.00

pH final 6,8 +/- 0.2

Procedimiento:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo con campanas de Durham invertidas en porciones de 10 ml. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

CALDO NUTRITIVO

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	5.00
Lactosa	3.00
Extracto de carne de res	2.75

pH final 6.9 +/- 0.2

Procedimiento:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo en porciones de 10 ml. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

10.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Andrade, M.G., 1987: Evaluación de la calidad proteica de larva de mosca desarrolladas en estiércol de cerdo y valoración de su actividad como biodegradador de los desechos. Tesis de Licenciatura. *ENEP Iztacala*, México.
2. "AOAC" Official Method Analysis Association of Official Analytic Chemistry". 1990. Washington, D. C., USA. 15ª Edición.
3. Ibid. Humedad 931.01
4. Ibid. Cenizas 942.05
5. Ibid. Fibra cruda 962.09
6. Ibid. Grasa 929.39
7. Ibid. Proteína cruda 984.13
8. Ibid. Digestibilidad de proteína 917.09
9. Aubert Y., Borbolla G. 1997. Aprovechamiento de la excreta de cerdo como sustrato en la producción de proteína larvaria. *Nutrición*. p.57.
10. Back, E; Mollby, R; Stintzing, G; Wandstrom, T y Habte, D., 1980: Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, haemagglutinins, colonization factor antigen and loss of enterotoxigenity. *J. Infect. Dis.* 142: 138-327.

11. Beneficial Insectary Products. 1996. http://www.house_insectary.inc/house.htm.
12. Bhagavan N.V. 1984 Bioquímica. 2da. Edición. Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. pp. 455-466
13. Blackpool. 1996. <http://www.blackpool.net/www/sbwalsh/housefly.htm>
14. Borbolla A.G., 1994: Utilization of Nutrients by the Small intestine of the developing pig and role of corticosteroids in postweaning lag pig. (Tesis) Texas University.
15. Brandwein H., A. Deutsch, m. Thompson, and R. Giannella. 1985. Production of neutralizing monoclonal antibodies to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 47 (1); 242-246.
16. Calvert. C. C. R C.D. Martin and M. o. Morgan, 1969a. Housefly pupae as food for poultry. *J. Econ. Entom.* 62: 938.
17. Calvert. C. C. R C.D. Martin and M. o. Morgan, 1969b. Dual roles for house flies in poultry manure disposal. *Poultry Sci.* 48: 1793.

18. Calvert. C. C. 1979. Use for animal excreta for microbial and insect protein synthesis. *Journal of Animal Science*, Vol. 48, No. 1 Pag. 178-192
19. Cesaria R.S. Destete Precoz de Lechones y Utilización Digestiva de los Alimentos. 1995 XIX Simposium de Ganadería Tropical., Topics Relevantes en Porcicultura. INIHAP.
20. Charles, T. Brues. 1976. *Insects Food and Ecology*. Dover Publications, Inc. New York. pp. 199-201.
21. Dean A. G., Ching R. G. Williams, L. B. Harden. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125 (4): 407-411.
22. De Haro, A.I., Tay J., Quintero, G., M. E., Rojas, W., G. E., C. R., Calderón, R. L., Ibarra, J. C. 1990. La actividad transmisora de mosca doméstica en la zona metropolitana del D.F. I Bacterias. *Rev. Fac. Med. UNAM* 33. 6 Nov-Dic 365-370.
23. Dement'eva, T. A.; Pishchenko, V. I., 1985: Effect of adding housefly larvae meal to the diet for pigs on blood oxidation-reduction enzymes. *Biologicheskaya utilizatsiya svinogo navoza na kormovye dobavki iudobreniya*. 58-61.

24. Dunne H.W., D.V.M.Ph. D, Shuman R.D., B.S., D.V.M. 1988. Infecciones Bacterianas y Micóticas parte III, Vol. IX. Edit. Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina. pp. 97-105.
25. Espinoza-Fuentes F. P., Ferreira C. and Terra W. R. 1984. Spatial Organization of Digestion in the larva and imaginal stages of the *Sciarid* fly, *Trichosia Pubescens*. *Insect. Biochem* 17, 631-638.
26. Espinoza-Fuentes F. P. and Terra W. R. 1987 Physiological Adaptations for Digesting Bacteria. Water, Fluxes and Distribution of Digesting Enzymes in *Musca domestica* Larval Midgut. *Insect. Biochem.* 17, 809-817.
27. Fernández S. J.M., Gavilanes J. G., Municio A. M., Pérez, A. A. and Rodríguez R. 1977. Lysozyme from the Insect *Ceratitis capitata* Eggs. *Eur. J. Biochem.* 72, 25-33.
28. Friesen R.D., Good Band R.D., Nelssen J.L., Blecha J., Reddy D.N., Reddy P.G., Kats L.J., 1993: The Effect of Pre and Postweaning Exposure to Soybean Meal on Growth Performance and the Immune Response in the Early Weaned Pig. *J. Ani. Sci.* Vol. 71:289.

29. Greenberg Bernard.R.1958. Persistence of bacteria in the developmental stages of the housefly I. Survival of Enteric Pathogens in the normal and Aseptically Reared Host. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
30. Greenberg Bernard.R.1959. Persistence of bacteria in the developmental stages of the housefly II. Quantitative Studio of the Host Contaminant Relationship in flies Breending under natural conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8, 412-416.
31. Grübel Peter, Hoffman James S., Chong Frank K., Burstein Nelson A., Chandrakant Mepani and Cave David R. 1997. Vector Potential of Houseflies for *Helicobacter pylory*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 35, No. 6. pp.1300-1303.
32. Guarino, A; Capano, G; Malamisura, B; Alessio, M; Guandalini, S y Rubino, A., 1987: Production of *Escherichia coli* Sta-like Heat-stable Enterotoxin by *Citrobacter Freundii* located From Humans. *J. Clin. Microbiol.* 25: 110-114
33. Gudilin, I. I.; Bayandina, G.V.,1985: House Fly Larvae Meal - A Replacer For Animal Protein Feeds in Fattening Young Pigs. *Biologicheskaya utilizatsiya svinogo navoza na kormovye dobavki i udobreniya.* 3:12.

34. Guerrant, R.L; Dickens, M.D; Wenzel, R.P y Kapikian, A.Z., 1976: Toxigenic Bacterial Diarrhea: Nursery Outbreak Involving multiple Bacterial Strains. *J. of Pediatrics*. 89: 885-89.
35. Gyles C. I., M. so and S. Falkow. 1974. The Enterotoxin Plasmids of. *J. Infect. Dis.* 130: 40-49.
36. Hasset, DJ; Bisesi, MS; Hartenstein, R., 1988: Earthworm Peroxidasa: Distribution, Microbicidal Action and Molecular Weigth. *Soil biology and biochemistry*. 20: 6, 887-890.
37. Howard E. Evans. 1984. *Insect Bioloby A Textbook of Entomology*. Addison-Wesley Pub. Co. Pag. 11,12,40,41,48,49.
38. Hultmark Dan, Steiner Hakan, Rasmuson Torgny, and Boman G. Hans. 1980. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hylaphoracecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106, 7-16.
39. Jolles P. and Jolles J. 1984. What's New in Lysozyme Research. *Molec. cell. Biochem.* 663, 165-184.

40. Jolles J. Schoentgen F., Croizer G., Croizer L. and Jolles P. 1979 Insect Lysozymes from three Species the Lepidopteras: Their Structural Relatedness to the (chicken) Type Lysozyme. *J. Molec. Evol.* 14, 267-271.
41. Jordao B. P. and Terra W. R. 1989 Distribution, Properties and Fuctions of Midgut Carboxypeptidases and Dipeptidases from *Musca domestica* larvae. *Archs. Insect. Biochem. Physiol.* 11, 231-244.
42. Kilberg, R. 1972: The microbe as a source of foód. *Ann. Rev. Microbial.*, 29. 427-466.
43. Klipstein, F.A; Engert, R.F y Houghtten, R.A., 1983: Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 44: 838-841
44. Leman, A. D., Straw Barbara D.G., Glock D. Robert, Mengeling William L., Penny R:H:C:, Scholl Erwin. 1986. Diseases of swine. 6th Ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. pp. 520-532.
45. Lemon, J.A. Francisco and Terra R. Walter. R 1991. Digestion of Bacteria and the role of midgut Lysozyme in some insect larvae. *Com. Biochem. Physiol.* Vol.100B.2, 265-268.

46. Lopez C. R. H., Alamilla M. W. 1986. Estudio de la variación colonial de *E. coli* de origen diarréico y su relación con la producción de enterotoxinas. Tesis de carrera. FES-Cuautitlan, México.
47. Mathewson J. J., P. C. Johnson, H. Y. Dupont, d. R. Morgan, S. A. Thomson, L. V. Wood and Ch. D. Ericsson. 1985. A newly recognized cause of traveler's diarrhea enteroadherent. *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151 (3): 471-475.
48. Monroy, S. M. A. 1989. Efecto de dos niveles de proteína cruda en dietas de finalización sobre el rendimiento productivo del cerdo de engorda. Tesis de carrera. FES- Cuautitlan. UNAM. México.
49. Newton, G.L; Booram, C.V; Barker, R.W y Hale, O.M., 1977: Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a suplement for swine. *J. of Animal Sci.* 443, 392-400
50. Ocio, E., Viñaras, R., 1979: House: Fly larvae meal grown on municipal organic waste as a source of protein in poultry diets. *Anim. Feed. Science and Technology.* 4, 227-231.
51. Orkin Ag Pest Control Online. 1996. Fly Breeding Facts. Disease <http://www.orkin-ag.com/breeding.htm>.

52. Otto Hecht. 1970. Ecología y Comportamiento de las Moscas Domésticas. Pag. 56,57. IPN. México.
53. Pacheco. A. J. 1980 Larva de mosca Alternativa como fuente de proteína en la cría de Codorniz. Departamento de Zootecnia, Chapingo, Mex. UACH. *Tesis de carrera*.
54. Pacheco, E., J.H. 1979. Evaluación de la gallinaza con pupa y larva de mosca casera (*Musca domestica*), como ingrediente en raciones de iniciación para pollos de engorda. Departamento de Zootecnia, Chapingo, Mex. UACH. *Tesis de carrera*.
55. Ramírez H. H., Alvarez M. C. I. 1996. Manual: Curso Básico de Análisis Microbiológico de los alimentos. FES: Cuautitlán UNAM.
56. Reyes, M. R. R. 1980. Estudio preliminar de larva de mosca como fuente de proteína en dietas para pollos. Chapingo, Mex. UACH. *Tesis de carrera*.
57. Rivera, H. J., citado por Alvarez C. I. 1984. Problemas de enterobacterias en cerdos. *Porcivama*, 53: 45-47, 1977.

58. Ristaino, P. A., Levine M. M. and Young Ch. R. 1983. Improved GM1-Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microb.* 18 (4): 805-815.
59. Rusoo, M. 1991. The Insect almanac Ayear-Round Activity Guide. Sterling Publishing Co., Inc. New York.
60. Sack, A. D., Sack B. R. 1975. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using adrenal cell in miniculture. *Infect. Immun.* 11 (2) : 334-336.
61. Shon, K.S., Maxwell, C.V., Bucharian D.S., Southern L.L., 1994. Improved Soybean Protein Sources for Early Weaned Pigs: Effects on Performance and Total Tract Aminoacid Digestibility. *J. Anim. Sci.* Vol. 72:622.
62. Speack, L. M. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. 2^{da}. Edition. American Public Health association. Washington, D.C. pp. 99-110.
63. Thattcher, F. S. y Clark, D.S. 1973. Analisis Microbiologico de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. pp. 30-36, 82-87

64. Terra, R. W. and Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. 1994. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 109B. No. 1. pp. 1-62.
65. Teotia, J.S. and Miller, R. 1973. Fly as a Dietary ingredient for Starting Chicks. *Poultry Science* 52: 1830-1835.
66. Vázquez, D., Lage, M. A., Parajó, J. C. y Alonso, J.L. 1997. Evaluación de microorganismos para la producción unicelular. *Alimentaria*, Julio /Agosto 93/99.