



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS
PREVIAMENTE AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE *Hermetia illucens*
FRENTE A *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM ATCC 13311
MEDIANTE CO-CULTIVO IN VITRO

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor

Castillo Pareja, Denis Helan

Asesor

Velarde Vélchez, Mónica Margarita

ORCID: 0000-0002-8774-8729

Jurado

Yupanqui Siccha, Gisela Francisca

Iannacone Oliver, José Alberto

Candia Sulca, Elena

Lima - Perú

2026



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS PREVIAMENTE AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE Hermetia illucens FRENTE A Salmonella enterica SEROVAR TYPHIMURIUM ATCC 13311 MEDIANTE CO-CULTIVO IN

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%	6%	3%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unfv.edu.pe	<1%
	Fuente de Internet	
2	Jorge Chávez-Villalba, Edgar Alcántara-Razo. "Trends in bivalve aquaculture research and production in Mexico", Latin American Journal of Aquatic Research, 2025	<1%
	Publicación	
3	Shah, Parth N.. "Environmental Factors Influencing the Immune Response of Black Soldier Fly Larvae", Wageningen University and Research, 2025	<1%
	Publicación	
4	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia	<1%
	Trabajo del estudiante	
5	repositorio.utn.edu.ec	<1%
	Fuente de Internet	
6	1library.co	<1%
	Fuente de Internet	
7	www.infosalus.com	<1%
	Fuente de Internet	
8	doczz.es	<1%
	Fuente de Internet	
9	axoncomunicacion.net	<1%
	Fuente de Internet	
10	patents.google.com	<1%
	Fuente de Internet	
11	pesquisa.bvsalud.org	<1%
	Fuente de Internet	
12	www.cienciamx.com	<1%
	Fuente de Internet	
13	www.coursehero.com	<1%
	Fuente de Internet	



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS

PREVIAMENTE AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE *Hermetia illucens*

FRENTE A *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM ATCC 13311 MEDIANTE

CO-CULTIVO *IN VITRO*

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Castillo Pareja, Denis Helan

Asesora:

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

ORCID: 0000-0002-8774-8729

Jurado:

Yupanqui Siccha, Gisela Francisca

Iannacone Oliver, José Alberto

Candia Sulca, Elena

Lima – Perú

2026

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi familia nuclear,
mi esposa Liz y mis hijos Mathías,
Stephanía y María Fernanda.

ÍNDICE

	Página
Resumen	vi
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción y formulación del problema	1
1.2. Antecedentes	3
1.2.1. Microbiota de <i>Hermetia illucens</i>	3
1.2.2. Péptidos antimicrobianos en insectos (AMPs)	4
1.2.3. Co-cultivo de bacterias para inducción de metabolitos	5
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Justificación	6
1.5. Hipótesis	7
II. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Resistencia bacteriana	9
2.2. Búsqueda de nuevas fuentes antimicrobianas	10
2.3. Microbiota de insectos como reservorios de biodiversidad microbiana	11
2.4. Biología y ecología de <i>Hermetia illucens</i>	12
2.5. Composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de <i>H. illucens</i>	14
2.6. Producción de metabolitos secundarios y AMPs	15
2.7. Técnicas de co-cultivo para inducción de metabolitos	16
2.8. Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar actividad antimicrobiana	17
III. MÉTODO	19

3.1. Tipo de investigación	20
3.2. Ámbito temporal y espacial	20
3.3. Variables	21
3.4. Población y muestra	22
3.5. Instrumentos	22
3.6. Procedimientos	22
3.6.1. Preparación de inóculos bacterianos de <i>H. illucens</i> y de <i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	22
3.6.2. Ensayo de co-cultivo mediante técnica de bloques de agar modificada	23
3.6.3. Medición del halo de inhibición a 24, 48 y 72 horas	23
3.6.4. Cálculo del potencial antimicrobiano (índice halo/colonia)	24
3.6.5. Uso de Tetraciclina como control positivo	24
3.7. Análisis de datos	25
3.8. Consideraciones éticas	25
IV. RESULTADOS	27
4.1. Reactivación de cepas de bacterias aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (<i>Hermetia illucens</i>)	27
4.2. Evaluación de la actividad antibacteriana del antibiótico de referencia Tetraciclina contra la cepa de referencia <i>S. enterica</i> ATCC 13311	29
4.3. Evaluación de la actividad antibacteriana de 67 cepas de bacterias aisladas previamente del tracto digestivo de <i>H. illucens</i> contra la cepa de referencia <i>S. enterica</i> ATCC 13311	30
4.4. Evaluación del Potencial Antimicrobiano de las cepas de bacterias aisladas previamente del tracto digestivo de <i>H. illucens</i> contra la cepa de referencia <i>S. enterica</i> ATCC 13311	33

V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS	45
IX. ANEXOS	54

Resumen

La resistencia bacteriana constituye una de las principales amenazas para la salud pública global, especialmente por el aumento de patógenos multirresistentes como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Frente a este problema, se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos. En este contexto, la microbiota intestinal de *Hermetia illucens* (mosca soldado negra) ha emergido como un reservorio relevante debido a su adaptación a ambientes con alta carga microbiana y su capacidad natural para inhibir patógenos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas previamente aisladas del tracto intestinal de *H. illucens* contra *S. enterica* ATCC 13311 mediante co-cultivo *in vitro*. Se reactivaron 67 cepas bacterianas descriopreservadas y se enfrentaron a la cepa patógena usando la técnica de bloques de agar sobre placas sembradas con *Salmonella*. La inhibición se cuantificó mediante la medición del halo de inhibición y el cálculo del índice de potencial antimicrobiano (PA), comparándose los resultados con un control positivo de tetraciclina (30 µg). Los resultados mostraron que 7 cepas presentaron actividad inhibitoria significativa. Las especies con mayor actividad pertenecieron a los géneros *Enterococcus* y *Bacillus*, destacando *Enterococcus* sp. BGS11_20 con un PA de 2.2, similar al observado para tetraciclina. Asimismo, dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y una de *Providencia stuartii* mostraron halos moderados, confirmando la producción de metabolitos antimicrobianos difusibles. Estos hallazgos demuestran que la microbiota intestinal de *H. illucens* constituye una fuente prometedora de bacterias con capacidad antagonista frente a patógenos zoonóticos.

Palabras clave: *Hermetia illucens*, actividad antimicrobiana, co-cultivo bacteriano, *Salmonella enterica*, microbiota intestinal

Abstract

Bacterial resistance is one of the main threats to global public health, especially due to the increase in multidrug-resistant pathogens such as *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In light of this problem, it is necessary to search for new sources of antimicrobial compounds. In this context, the gut microbiota of *Hermetia illucens* (black soldier fly) has emerged as a relevant reservoir due to its adaptation to environments with high microbial loads and its natural ability to inhibit pathogens. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of bacterial strains previously isolated from the intestinal tract of *H. illucens* against *S. enterica* ATCC 13311 through *in vitro* co-culture. Sixty-seven cryopreserved bacterial strains were reactivated and confronted with the pathogenic strain using the agar block technique on plates seeded with *Salmonella*. Inhibition was quantified by measuring the inhibition halo and calculating the antimicrobial potential (AP) index, comparing the results with a positive control of tetracycline (30 µg). The results showed that seven strains exhibited significant inhibitory activity. The species with the highest activity belonged to the genera *Enterococcus* and *Bacillus*, with *Enterococcus* sp. BGS11_20 standing out with an AP of 2.2, similar to that observed for tetracycline. Likewise, two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* and one of *Providencia stuartii* showed moderate halos, confirming the production of diffusible antimicrobial metabolites. These findings demonstrate that the intestinal microbiota of *H. illucens* is a promising source of bacteria with antagonistic capacity against zoonotic pathogens.

Key words: *Hermetia illucens*, antimicrobial activity, bacterial co-culture, *Salmonella enterica*, intestinal microbiota

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema

La resistencia bacteriana constituye una de las mayores amenazas para la salud global en el siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha advertido sobre el preocupante aumento de infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos, particularmente en centros de atención sanitaria, con incrementos de mortalidad y morbilidad asociados (WHO & CDC, 2020). En países en desarrollo, incluido el Perú, este desafío se intensifica por prácticas inadecuadas en el uso de antimicrobianos en humanos, animales y agricultura, favoreciendo la emergencia de cepas resistentes que pueden transmitirse al ser humano por consumo de alimentos o agua contaminada (Dávalos-Almeida et al., 2022).

En este contexto, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium representa un patógeno de especial atención. Esta bacteria Gram negativa forma parte de los principales agentes de gastroenteritis en humanos en el mundo, pero además ha exhibido creciente resistencia a antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas. Los informes de cepas multirresistentes aumentan la urgencia de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos que rompan estos patrones de resistencia (Ruiz et al., 2022).

Un enfoque emergente en la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas es la exploración de ambientes microbiológicos poco estudiados, como la microbiota asociada a insectos. En particular, *Hermetia illucens* (mosca soldado negra) ha recibido considerable atención en los últimos años. Esta especie saprófaga habita en restos orgánicos en descomposición (un entorno con alta carga microbiana) y posee una microbiota intestinal con altas funciones digestivas y protectoras contra patógenos. Diversos estudios confirman que las larvas de esta mosca no solo reducen patógenos en los sustratos donde viven (Erickson et al.,

2004; Lalander et al., 2013), sino que también albergan microorganismos capaces de producir metabolitos antimicrobianos efectivos contra bacterias Gram negativas (Jeon et al., 2011; Liu et al., 2008). Por ejemplo, extractos de larvas inmunizadas con bacterias como *Lactobacillus casei* han mostrado actividad antibacteriana frente a distintas cepas de *Salmonella*, incluyendo *S. enterica* serovar Typhimurium, respaldando la idea de que estas especies pueden sintetizar péptidos antimicrobianos (AMPs) como cecropina y defensinas (Lee et al., 2020).

El fenómeno de resistencia a antibióticos refuerza aún más la necesidad de identificar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. La microbiota de insectos, en especial la de larvas de *H. illucens*, aparece como una fuente prometedora. Varios trabajos han demostrado la capacidad de estas bacterias para inhibir patógenos en cultivos mixtos o mediante aislamiento de metabolitos activos mediante co-cultivo. Algunos estudios más recientes confirman que la microbiota intestinal de la mosca posee enzimas capaces de degradar antibióticos y xenobióticos, demostrando su potencial protector contra contaminantes (Eke et al., 2023; Bruno et al., 2019).

Por tanto, el presente estudio propone evaluar el potencial antimicrobiano de bacterias aisladas del tracto intestinal de *H. illucens* contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, mediante co-cultivo *in vitro*. Esta línea de investigación se fundamenta en los siguientes aspectos clave:

1. Diversidad y funcionalidad de la microbiota de *H. illucens* dado que estudios recientes han caracterizado la microbiota de esta mosca, destacando su papel en la digestión de compuestos complejos, detoxificación y protección frente a patógenos (Eke et al., 2023).
2. Co-cultivo entre cepas como herramienta que permite inducir la síntesis de metabolitos secundarios *in vivo* que no aparecen en cultivos puros,

representando una estrategia eficiente para el descubrimiento de compuestos bioactivos.

3. Aplicación potencial en salud y agricultura mediante la identificación de bacterias con capacidad inhibitoria frente a patógenos zoonóticos como *Salmonella*, pudiendo tener impacto en seguridad alimentaria, agroindustria y medicina.

Por lo tanto, la pregunta central de esta tesis es: ¿Existe evidencia de que bacterias aisladas de la microbiota intestinal de *H. illucens* poseen actividad antimicrobiana significativa frente a *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 en co-cultivo *in vitro*?

1.2. Antecedentes

1.2.1. Microbiota de *Hermetia illucens*

En los últimos cinco años, la microbiota intestinal de *Hermetia illucens* (mosca soldado negra, BSF por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente estudiada por su papel crucial en procesos biotecnológicos, digestión de residuos y protección frente a patógenos (Siregar et al., 2024). Una revisión exhaustiva por Eke et al. (2023) describe la diversidad estructural y funcional en el intestino larval, resaltando cómo los microbios coevolucionaron con el insecto para procesar residuos orgánicos mediante enzimas especializadas.

Estudios recientes han confirmado que esta microbiota es capaz de metabolizar compuestos complejos, incluidos antibióticos y pesticidas, degradándolos en formas menos tóxicas. En un experimento de 2025, se detectó que larvas de BSF degradan tales xenobióticos gracias a enzimas de origen microbiano (Ment & Mishra, 2025). Este hallazgo tiene aplicaciones directas en biorremediación, lo cual posiciona a *H. illucens* como un recurso dual: productor de enzimas y sistema de detoxificación ambiental.

La composición microbiana detectada varía notablemente según el sustrato, condiciones de crianza, edad del insecto y región del tracto intestinal. Un análisis metagenómico en múltiples condiciones reveló que solo existe un conjunto mínimo de géneros compartidos como *Morganella*, *Providencia*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, entre otros, mientras que otros aparecen de forma más variable dependiendo del entorno. Adicionalmente, se han aislado especies como *Paenalcaligenes hermetiae*, una bacteria facultativa anaerobia capaz de vivir en el intestino de las larvas (Lee et al., 2013).

Además, se ha demostrado empíricamente que las larvas de BSF reducen la carga de patógenos en residuos orgánicos, eliminando o reduciendo significativamente especies como *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* (Ment & Mishra, 2025). Esta capacidad se atribuye tanto a la actividad directa de la microbiota como a la respuesta inmune del insecto, donde los microbios juegan un papel protector indirecto conocido como resistencia a la colonización.

1.2.2. Péptidos antimicrobianos en insectos (AMPs)

Los insectos se destacan como fuente rica de péptidos antimicrobianos (AMPs), defensas innatas con amplio espectro de acción, incluyendo Gram-positivos, Gram-negativos, hongos y virus. Una revisión en insectos comestibles africanos compiló centenares de AMPs, muchos con alto potencial terapéutico y agroindustrial (Eke et al., 2023).

En *H. illucens* se han descrito AMPs como cecropina, defensina y otros péptidos inducibles tras inmunización con bacterias. Jeon et al. (2011) demostraron que extractos de larvas tratadas con *Lactobacillus casei* presentaron actividad significativa frente a *Salmonella Typhimurium* (Erickson et al., 2004). Además, se ha documentado que estos genes AMP se expresan en respuesta a desafío bacteriano, lo que apoya su papel activo en defensa microbiana.

Adicionalmente, estudios en dípteros como *Drosophila* muestran que ciertos AMPs, como diptericina, proporcionan resistencia frente a patógenos específicos, respaldando la idea de que insectos relativamente simples pueden encerrar sistemas inmunológicos capaces de producir AMPs específicos y eficaces (Stączek, 2023).

Esta adaptabilidad y variedad funcional de AMPs en insectos posiciona a *H. illucens* como una fuente prometedora para moléculas con actividad antimicrobiana novedosa.

1.2.3. Co-cultivo de bacterias para inducción de metabolitos

El co-cultivo microbiano es una estrategia avanzada para descubrir metabolitos secundarios que no se producen en cultivos aislados. Bertrand et al. (2014) y revisiones posteriores describen cómo interacciones microbianas inducen rutas biosintéticas dormidas, produciendo antibióticos, pigmentos y compuestos bioactivos únicos (Selegato & Castro-Gamboa, 2023). Así mismo, investigaciones recientes describen cómo el co-cultivo entre especies ambientales puede estimular la síntesis de compuestos que no aparecen en cultivos monoclonales (Hamed et al., 2024).

En el entorno de microbiotas intestinales de insectos, los métodos de co-cultivo permiten simular interacciones ecológicas naturales, facilitando la producción de metabolitos bacterianos antimicrobianos. Protocolos eficientes publicados utilizan filtración rápida y extracción de metabolitos intra/extracelulares tras cultivos mixtos (Sedighikamal & Mashayekhan, 2025).

Aunque aún hay pocas aplicaciones en insectos, los principios del co-cultivo han sido exitosos en microorganismos marinos, hongos y bacterias ambientales, generando compuestos activos hasta contra patógenos multirresistentes (Thuan et al., 2022; Nicault et al., 2021).

Por lo tanto, el co-cultivo representa una estrategia importante para activar genes biosintéticos no expresados bajo cultivo estándar, lo que abre la posibilidad de descubrir moléculas antibióticas nuevas en microbiotas como la de *H. illucens*.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la capacidad antimicrobiana de bacterias intestinales previamente aisladas de larvas de *Hermetia illucens* frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 mediante co-cultivo *in vitro*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar las cepas bacterianas intestinales con actividad inhibitoria frente a *S. enterica*.
- Evaluar el potencial antimicrobiano mediante medición de halos de inhibición y espectro antibacteriano.
- Comparar la eficacia inhibitoria de las cepas frente a un control positivo (Tetraciclina).

1.4. Justificación

La presente investigación se justifica por su contribución significativa en un campo emergente como la exploración de microbiotas intestinales, específicamente la de *Hermetia illucens*, como fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos. A diferencia de las investigaciones convencionales centradas únicamente en la caracterización taxonómica o funcional de estos microbiomas, esta propuesta busca ir más allá y evaluar directamente la capacidad de cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra para inhibir a un patógeno de relevancia clínica como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

El estudio de estos microorganismos en condiciones de co-cultivo ofrece una oportunidad estratégica para inducir la expresión de rutas biosintéticas silenciadas, permitiendo la detección de metabolitos secundarios que no se producen en condiciones de cultivo estándar. Esta aproximación, que simula interacciones ecológicas reales entre especies microbianas, ha demostrado ser una técnica efectiva para la generación de compuestos bioactivos novedosos, incrementando el potencial de descubrimiento en ambientes naturales poco explorados (Selegato & Castro-Gamboa, 2023).

Además de su aporte al conocimiento científico, este estudio tiene importantes implicancias prácticas y sociales. La emergencia de cepas bacterianas multirresistentes requiere con urgencia el desarrollo de alternativas a los antibióticos convencionales (Chevrette et al., 2019). En este sentido, la identificación de cepas bacterianas intestinales con actividad inhibitoria frente a patógenos zoonóticos representa una alternativa ecológica, sostenible y de bajo costo (Vogel & Shah, 2021). Los bioproductos derivados de insectos como *H. illucens* pueden ser aprovechados en aplicaciones veterinarias, agroindustriales y alimentarias, reduciendo la dependencia de antibióticos sintéticos y minimizando la carga ambiental asociada a su uso indiscriminado. Asimismo, el potencial de estas bacterias para integrarse como cultivos protectores en estrategias de biocontrol o de sanidad alimentaria representa un valor añadido que contribuye a la seguridad alimentaria y a la salud pública (Buffie & Pamer, 2013; Dec et al., 2014).

1.5. Hipótesis

- Hipótesis alterna (H_1):

Cepas bacterianas previamente aisladas del tracto intestinal de larvas de *Hermetia illucens* presentan actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, evidenciada por la formación de halos de inhibición en

pruebas de co-cultivo, cuya magnitud puede ser comparable o superior a la generada por un control positivo con Tetraciclina.

- Hipótesis nula (H_0):

Las cepas bacterianas aisladas del tracto intestinal de *Hermetia illucens* no presentan actividad antimicrobiana significativa frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, o los halos de inhibición observados no difieren significativamente de los generados por el control negativo, ni alcanzan la magnitud del control positivo con Tetraciclina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Resistencia bacteriana

Desde mediados del siglo XX, los antibióticos han sido pilares fundamentales de la medicina moderna, revolucionando el tratamiento de infecciones bacterianas que antes resultaban mortales. Sin embargo, el uso extendido, y en muchos casos inadecuado, de estos fármacos en la salud humana, veterinaria y agricultura ha conducido a una creciente prevalencia de cepas bacterianas resistentes. La resistencia bacteriana (RB) ocurre cuando las bacterias desarrollan mecanismos para evadir o neutralizar la acción de los antibióticos, dificultando el tratamiento de infecciones comunes y aumentando el riesgo de propagación, enfermedades graves y muerte (Muteeb et al., 2023).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO & CDC, 2020), la resistencia a los antimicrobianos representa una de las 10 principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. Se estima que para el año 2050 podrían ocurrir hasta 10 millones de muertes anuales asociadas a infecciones por bacterias resistentes si no se toman medidas urgentes (Chevrette et al., 2019). Particularmente preocupante es la aparición de cepas multirresistentes (MDR) y panresistentes, como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella enterica*.

Este fenómeno ha sido impulsado no solo por la automedicación y el mal uso clínico de antibióticos, sino también por su inclusión como promotores del crecimiento en animales de consumo, el vertido inadecuado de aguas residuales hospitalarias y agrícolas, y la falta de regulación efectiva en muchas regiones del mundo, incluido América Latina (Klein et al., 2018). En países como el Perú, estudios recientes muestran una alarmante tendencia al alza en cepas resistentes de *Salmonella* aisladas de pacientes con gastroenteritis, siendo esta una de las bacterias entéricas más problemáticas por su capacidad de adquirir genes de resistencia plasmídica y propagarlos horizontalmente (Ruiz et al., 2022).

En este panorama, resulta fundamental buscar estrategias innovadoras que permitan contrarrestar la resistencia bacteriana. Una de las principales líneas de acción es el descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas, particularmente aquellas provenientes de fuentes naturales poco exploradas, como microorganismos simbioses de insectos, hongos entomopatógenos, bacterias marinas y metabolitos de plantas (Giordano, 2020).

Las autoridades de salud pública y entidades como la OMS, FAO y OIE han promovido el enfoque “Una Salud” (*One Health*), que reconoce la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental. En este marco, el estudio de nuevas fuentes antimicrobianas en organismos que interactúan en entornos contaminados o ricos en materia orgánica, como los insectos saprófagos, cobra una relevancia estratégica. *Hermetia illucens*, una especie con gran plasticidad ecológica y amplia distribución global, surge como un modelo ideal para la bioprospección de bacterias simbióticas con potencial antimicrobiano.

2.2. Búsqueda de nuevas fuentes antimicrobianas

La búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas ha evolucionado desde la simple observación de efectos inhibitorios hasta la aplicación de bioprospección sistemática en nichos ecológicos poco estudiados. En las últimas décadas, se ha recurrido a ambientes extremos como suelos volcánicos, fondos marinos, salares y termas en busca de bacterias o actinobacterias productoras de metabolitos secundarios con potencial farmacológico (Giordano, 2020).

Sin embargo, otro reservorio promisorio está en la microbiota asociada a insectos. Estos organismos representan más del 80 % de la biodiversidad animal del planeta y han desarrollado simbiosis altamente especializadas con bacterias, hongos y virus que les confieren ventajas ecológicas, defensivas y nutricionales. Específicamente, las microbiotas intestinales de insectos saprófagos y detritívoros están adaptadas a vivir en entornos ricos en competencia microbiana, por lo que sus miembros deben producir compuestos que inhiban a potenciales patógenos (Mondal et al., 2023).

Entre estos insectos destaca *Hermetia illucens*, cuyas larvas pueden consumir residuos orgánicos de diversa índole, desde restos vegetales hasta excretas animales, sin sufrir enfermedades microbianas evidentes. Esta capacidad sugiere la presencia de mecanismos de defensa eficaces, tanto inmunológicos como microbianos, capaces de controlar o inhibir la proliferación de bacterias patógenas en su entorno inmediato (Eke et al., 2023; Vogel & Shah, 2021).

La literatura reciente destaca que bacterias simbióticas de insectos como *Streptomyces*, *Enterococcus*, *Bacillus* o *Pseudomonas* han sido aisladas de especies como hormigas, abejas o cucarachas, mostrando actividad frente a *S. aureus*, *E. coli* y otros patógenos clínicos (Chevrette et al., 2019). En el caso de *H. illucens*, estudios en Asia, Europa y Sudamérica ya han descrito bacterias intestinales con capacidad de inhibir enterobacterias zoonóticas, lo cual refuerza su valor en programas de biodescubrimiento.

La ventaja adicional de estos microorganismos es que muchos de ellos no han sido cultivados en medios convencionales, por lo que las técnicas de aislamiento, enriquecimiento y co-cultivo ofrecen una ventana única para activar su metabolismo secundario y evaluar su perfil bioactivo (Nicault et al., 2021).

2.3. Microbiota de insectos como reservorios de biodiversidad microbiana

La microbiota intestinal de los insectos constituye un microecosistema complejo que participa activamente en procesos de digestión, detoxificación, inmunidad y comunicación con el entorno. La relación simbiótica entre los insectos y sus microorganismos intestinales es tan estrecha que se ha planteado que deben considerarse como holobiontes: unidades funcionales integradas por el hospedador y su microbioma (Buffie & Pamer, 2013).

En el caso particular de insectos saprófagos como *Hermetia illucens*, que se desarrollan sobre sustratos orgánicos en descomposición, la selección natural ha favorecido una microbiota

resistente a condiciones ambientales extremas, presencia de toxinas y alta carga microbiana exógena. Esta microbiota no solo ayuda al insecto a procesar y transformar los compuestos presentes en los residuos, sino que también actúa como una primera línea de defensa frente a microorganismos potencialmente patógenos. Se ha sugerido que algunas bacterias de esta microbiota ejercen “resistencia a la colonización”, fenómeno que limita la entrada o proliferación de patógenos exógenos mediante competencia por nutrientes, producción de antimicrobianos o inducción de mecanismos inmunes del hospedador (Buffie & Pamer, 2013).

Diversos estudios han caracterizado taxonómicamente la microbiota de larvas de BSF, encontrando géneros recurrentes como *Enterococcus*, *Providencia*, *Morganella*, *Lactobacillus*, *Klebsiella* y *Paenaltcaligenes*, algunos de los cuales se han aislado en medios selectivos y evaluado funcionalmente (Jeon et al., 2011). A través de ensayos in vitro, se ha demostrado que estas bacterias presentan efectos inhibitorios frente a cepas ATCC de *Salmonella*, *Staphylococcus* y *E. coli*.

El potencial de estas bacterias para ser utilizadas como agentes de biocontrol, probióticos o fuentes de compuestos bioactivos, las convierte en candidatas ideales para estudios de co-cultivo y bioprospección. Asimismo, la posibilidad de emplearlas en combinación con extractos larvales o en sistemas integrados de producción (ejm. harina de insecto funcional) amplía su campo de aplicación agroalimentaria y sanitaria (Mondal et al., 2023; Vogel & Shah, 2021).

2.4. Biología y ecología de *Hermetia illucens*

Hermetia illucens, conocida comúnmente como mosca soldado negra, es un díptero de la familia Stratiomyidae nativo de América, aunque actualmente tiene distribución cosmopolita gracias a su capacidad de adaptación a distintos climas y sustratos. La larva de esta especie ha despertado gran interés científico y tecnológico en las últimas décadas debido a su capacidad

para degradar residuos orgánicos, producir biomasa de alto valor nutricional y reducir la carga microbiana de sustratos contaminados (Bruno et al., 2019; Diener et al., 2011; Erickson et al., 2004).

El ciclo de vida de *H. illucens* comprende cinco etapas: huevo, larva, prepupa, pupa y adulto. La fase larval es la más larga y metabólicamente activa, durante la cual las larvas consumen intensamente materia orgánica, transformándola en biomasa rica en lípidos y proteínas. Las larvas presentan una cutícula resistente, carecen de patas y tienen una cavidad digestiva robusta adaptada a condiciones anaerobias y con altas cargas microbianas (Jeon et al., 2011; Lalander et al., 2013).

Esta especie se caracteriza por su rusticidad y versatilidad ecológica. Puede desarrollarse en una amplia variedad de residuos, desde frutas y verduras hasta estiércol, pescado en descomposición y lodos industriales, siempre que se mantengan ciertos parámetros de humedad y temperatura. Este rasgo la hace ideal para programas de biorreciclaje y gestión de residuos sólidos urbanos o agroindustriales (Diener et al., 2011).

A diferencia de otras especies de dípteros como *Musca domestica*, *H. illucens* no representa un vector de enfermedades ni invade entornos domésticos, ya que los adultos no se alimentan ni son atraídos por heces y tienen un comportamiento de oviposición más selectivo. Este comportamiento y su bajo riesgo epidemiológico la convierten en un candidato ideal para la producción en sistemas controlados (Vogel & Shah, 2021).

Desde una perspectiva ecológica, las interacciones entre *H. illucens* y su entorno microbiano son fundamentales para comprender su éxito adaptativo. La larva no solo consume residuos, sino que modifica activamente el microambiente intestinal mediante secreciones antimicrobianas, regulación del pH y la incorporación selectiva de microorganismos simbióticos. Esta coevolución entre insecto y microbiota constituye un modelo valioso para la bioprospección de nuevas cepas bacterianas con potencial biotecnológico (Bruno et al., 2019).

2.5. Composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de *H. illucens*

La microbiota intestinal (entomil) de *Hermetia illucens* ha sido objeto de creciente interés debido a su diversidad funcional y su papel clave en la digestión, detoxificación y defensa contra patógenos. Diversos estudios metagenómicos han demostrado que la composición microbiana varía significativamente según el tipo de sustrato, la edad de la larva, la región del tracto digestivo y las condiciones ambientales (Jeon et al., 2011; Jiang et al., 2019).

En general, los filos bacterianos predominantes en el intestino de *H. illucens* son Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria. A nivel de géneros, se reportan consistentemente *Enterococcus*, *Providencia*, *Morganella*, *Paenaltcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Lactobacillus*, muchos de los cuales presentan capacidades metabólicas especializadas, como la degradación de celulosa, proteínas, lípidos y compuestos tóxicos como pesticidas y antibióticos (Klüber et al., 2022; Eke et al., 2023).

Esta microbiota cumple múltiples funciones:

- Digestión de compuestos complejos: Las bacterias intestinales colaboran en la degradación de polisacáridos, lípidos y proteínas presentes en residuos orgánicos, generando metabolitos aprovechables para el insecto (Jeon et al., 2011).
- Producción de metabolitos secundarios: Algunas cepas producen ácidos orgánicos, compuestos volátiles o péptidos antimicrobianos que modulan el ambiente intestinal y previenen la proliferación de microorganismos patógenos (Lee et al., 2020).
- Resistencia a la colonización: Las bacterias residentes compiten activamente con patógenos por espacio y nutrientes, generando un efecto de barrera natural (Buffie & Pamer, 2013).

- Estimulación del sistema inmune del hospedador: Se ha demostrado que ciertas bacterias simbióticas pueden inducir la expresión de genes antimicrobianos del insecto, como defensinas y cecropinas (Herman et al., 2024).

El estudio de esta microbiota no solo permite entender mejor la fisiología de *H. illucens*, sino que abre oportunidades para el aislamiento de cepas con aplicaciones en biotecnología industrial, medicina veterinaria, sanidad alimentaria y agricultura. En ensayos recientes, bacterias aisladas del intestino de *H. illucens* han mostrado actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Zheng et al., 2025).

2.6. Producción de metabolitos secundarios y AMPs

Uno de los aspectos más relevantes de la microbiota entomil es su capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Estos compuestos, sintetizados a través de rutas biosintéticas específicas como poliquétidos (PKS) o péptidos no ribosomales (NRPS), cumplen funciones ecológicas en el ambiente intestinal, como inhibir el crecimiento de competidores o facilitar la comunicación entre especies (Mondal et al., 2023).

En el caso de las bacterias intestinales de insectos, se ha identificado la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs), compuestos orgánicos volátiles (COVs), ácidos orgánicos, surfactantes y pigmentos bioactivos. Algunos de estos compuestos tienen estructuras químicas únicas, no presentes en metabolitos bacterianos comunes, lo que les otorga ventajas farmacológicas potenciales, como alta especificidad, baja toxicidad o estabilidad frente a pH y temperatura (Davis et al., 2013).

Por su parte, *Hermetia illucens* como hospedador también produce AMPs endógenos. Se ha demostrado que, ante exposición a bacterias patógenas, las larvas expresan genes que codifican defensinas, cecropinas, dipterinas y otras proteínas antimicrobianas de amplio

espectro. Estos AMPs pueden ser secretados en el intestino o hemolinfa, generando un entorno hostil para patógenos invasores (Herman et al., 2024).

El proceso de activación de la producción de AMPs tanto en bacterias como en el insecto puede ser estimulado mediante exposición a patógenos, co-cultivo con otras especies o mediante condiciones de estrés. Esta capacidad adaptativa ha sido aprovechada en estrategias de bioprospección, donde se inducen condiciones de competencia o interacción entre cepas para maximizar la expresión de rutas biosintéticas latentes (Herman et al., 2024).

En estudios realizados por Chevrette et al. (2019), se demostró que bacterias simbióticas de insectos xilófagos como escarabajos ceraméricos producían compuestos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. Asimismo, estudios recientes con *H. illucens* han identificado extractos larvales con propiedades antibacterianas, fungicidas y antioxidantes, reforzando su potencial como fuente de moléculas terapéuticas o agrícolas.

2.7. Técnicas de co-cultivo para inducción de metabolitos

El co-cultivo microbiano es una estrategia empleada para estimular la producción de metabolitos secundarios que, en condiciones estándar de monocultivo, permanecen silenciados o en niveles indetectables. Esta técnica se fundamenta en la simulación de interacciones microbianas presentes en ambientes naturales, donde los microorganismos compiten, cooperan o se comunican químicamente para sobrevivir y prosperar (Bertrand et al., 2014).

Desde una perspectiva biotecnológica, el co-cultivo ha permitido descubrir antibióticos, antifúngicos y otros compuestos bioactivos mediante la activación de rutas biosintéticas latentes. En muchos casos, estas rutas están reguladas por mecanismos de *quorum sensing*, represión catabólica o estrés ambiental que solo se activan ante la presencia de otras especies competidoras (Bertrand et al., 2014; Selegato & Castro-Gamboa, 2023).

Los tipos de co-cultivo pueden clasificarse en:

- Directos: las dos especies se siembran en el mismo medio, interactuando físicamente.
- Indirectos: se utiliza una membrana o barrera física que impide el contacto, pero permite el intercambio de metabolitos.
- Secuenciales: se siembra primero una especie, se deja crecer y luego se inocula la segunda.

En el contexto de esta investigación, se empleó el co-cultivo directo en placa como método de evaluación funcional. La técnica consistió en sembrar una cepa bacteriana previamente aislada (por ejemplo, de *H. illucens*) en un medio sólido, y luego se inoculó una cepa indicadora (como *Salmonella enterica* ATCC 13311) a una distancia determinada. La aparición de un halo claro de inhibición alrededor de la cepa simbiótica indicó producción de compuestos antimicrobianos (Dec et al., 2014).

Esta técnica ha sido validada para la identificación preliminar de bacterias productoras de antibióticos, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas o compuestos volátiles (VOCs). Su bajo costo, reproducibilidad y adaptabilidad la hacen idónea para investigaciones exploratorias, especialmente en laboratorios de recursos limitados (Dec et al., 2014).

Además, el co-cultivo puede servir no solo como herramienta de detección, sino también como sistema de preadaptación. Se ha demostrado que ciertos compuestos se producen de forma estable solo luego de varios pases de co-cultivo, lo que sugiere una respuesta adaptativa o epigenética de las bacterias frente a sus competidores (Selegato & Castro-Gamboa, 2023).

2.8. Ensayos *in vitro* para evaluar actividad antimicrobiana

La validación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas o sus metabolitos se realiza comúnmente mediante ensayos *in vitro*, los cuales permiten cuantificar y comparar la eficacia frente a microorganismos patógenos. Entre los métodos más utilizados destacan el

ensayo de difusión en agar (también conocido como prueba de halo o Kirby-Bauer modificado), el ensayo de dilución (en caldo o agar) y la determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2023).

El ensayo de difusión en agar consiste en inocular una capa homogénea de la bacteria objetivo sobre una placa de agar nutritivo. Luego, se aplica la muestra a evaluar (bacteria productora, extracto o antibiótico patrón) sobre la superficie, ya sea en pozos, discos de papel o sembrado puntual. Tras la incubación, se mide el diámetro del halo de inhibición alrededor de la muestra. Cuanto mayor es el halo, mayor es la actividad antimicrobiana del compuesto evaluado (Balouiri et al., 2016).

Este ensayo se ha estandarizado en muchos laboratorios gracias a su sencillez, sensibilidad y compatibilidad con controles positivos y negativos. Permite además el cribado simultáneo de múltiples cepas y su comparación con antibióticos comerciales como la tetraciclina o la ampicilina (CLSI, 2023).

El ensayo de dilución en caldo permite determinar de manera más precisa la concentración mínima a la cual un antibiótico inhibe el crecimiento visible del microorganismo. Se preparan diluciones seriadas del compuesto en tubos o placas de 96 pocillos y se inoculan con la cepa diana. Tras la incubación, se evalúa turbidez o crecimiento mediante absorbancia. Aunque más laborioso, este método es esencial para caracterizar la potencia de los compuestos descubiertos (Wiegand et al., 2008).

En el contexto de esta tesis, se empleó el ensayo de difusión en agar modificado como herramienta principal, utilizando bacterias aisladas de *H. illucens* enfrentadas a *S. enterica* ATCC 13311. Esta cepa es un patógeno zoonótico relevante y estandarizado, lo cual garantiza la reproducibilidad y pertinencia de los resultados.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

El presente estudio corresponde a una investigación de tipo aplicativa y de diseño experimental, enmarcada en un enfoque cuantitativo. La investigación aplicativa buscó generar conocimientos con una finalidad práctica concreta, en este caso, la identificación de bacterias intestinales provenientes de *Hermetia illucens* con potencial antimicrobiano frente a *Salmonella enterica* ATCC 13311. Esta modalidad de investigación resultó pertinente, considerando el creciente interés en fuentes alternativas de compuestos bioactivos y la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias para el control de patógenos resistentes en entornos agroalimentarios y clínicos.

Desde el punto de vista experimental, la investigación se fundamentó en la manipulación intencionada de variables independientes (las cepas bacterianas aisladas) para observar su efecto sobre una variable dependiente (la inhibición del crecimiento de la cepa indicadora). La interacción entre las cepas bacterianas se evaluó mediante ensayos de co-cultivo en medios sólidos, técnica ampliamente validada en microbiología para detectar la producción de metabolitos con actividad antibacteriana. El enfoque cuantitativo permitió una medición objetiva del fenómeno observado, utilizando parámetros numéricos como el diámetro del halo de inhibición (expresado en milímetros), que fueron posteriormente analizados estadísticamente.

Este diseño metodológico buscó garantizar la reproducibilidad, el control de condiciones experimentales y la obtención de datos confiables que permitan evaluar el potencial bioactivo de la microbiota intestinal de *H. illucens* como fuente de nuevos agentes antimicrobianos.

3.2. Ámbito temporal y espacial

La investigación se llevó a cabo en un marco temporal comprendido en el año 2025, abarcando las etapas de reactivación bacteriana, mantenimiento de cepas, desarrollo de ensayos de co-cultivo, y análisis de resultados.

El ámbito espacial fue el Laboratorio Andino Amazónico de Química de la Vida (LAVI), perteneciente a la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicado en el campus central de San Martín de Porres, Lima, Perú. Este laboratorio cuenta con las condiciones físicas, biológicas y técnicas necesarias para la manipulación de microorganismos, incluyendo cámaras de bioseguridad, medios de cultivo especializados, equipos de incubación, y protocolos validados de análisis microbiológico. La elección de este entorno permitió asegurar el cumplimiento de las normas de bioseguridad vigentes y el manejo adecuado de cepas tanto nativas como patógenas.

Además, la infraestructura disponible permitió mantener las cepas aisladas bajo condiciones controladas, estandarizar los ensayos y aplicar metodologías reproducibles alineadas con buenas prácticas de laboratorio.

3.3. Variables

En este estudio se definieron las siguientes variables:

- Variable independiente: Las cepas bacterianas previamente aisladas del intestino de larvas de *Hermetia illucens*. Estas cepas constituyeron el objeto principal de evaluación, siendo consideradas potenciales productoras de compuestos antimicrobianos. Su diversidad funcional y genética representó un insumo importante para la caracterización bioactiva.
- Variable dependiente: El grado de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, cepa patógena de referencia. Esta inhibición se midió mediante el diámetro del halo de inhibición (en milímetros)

en ensayos de co-cultivo en agar, como indicador directo de la presencia y potencia de compuestos antimicrobianos secretados por las cepas en estudio.

Ambas variables se controlaron en condiciones experimentales estandarizadas, permitiendo su comparación y análisis cuantitativo. Se establecieron también controles positivos (antibiótico tetraciclina) y negativos (medio sin cepa productora) para validar los resultados obtenidos.

3.4. Población y muestra

La población estuvo conformada por la totalidad de las cepas bacterianas aisladas del tracto intestinal de larvas de *Hermetia illucens*, recolectadas como parte de un proyecto previo de investigación enfocado en la caracterización microbiológica de insectos saprófagos. Estas cepas representan una comunidad microbiana heterogénea, con potenciales capacidades metabólicas diversas, producto de su adaptación a ambientes ricos en materia orgánica y alta presión microbiana.

La muestra estuvo constituida por 67 cepas bacterianas previamente aisladas, las cuales fueron seleccionadas con base en criterios de viabilidad, crecimiento en medios específicos y estabilidad fenotípica. Estas cepas fueron sometidas a pruebas de co-cultivo con *S. enterica* ATCC 13311, seleccionándose finalmente aquellas que mostraron actividad antimicrobiana significativa, determinada por la formación de halos de inhibición mayores al control negativo. Esta selección permitió reducir el universo de trabajo a un conjunto de cepas candidatas con potencial biotecnológico.

3.5. Instrumentos

Durante la etapa experimental, se utilizaron instrumentos metodológicos diseñados para asegurar la trazabilidad de las cepas y el registro ordenado de los resultados. Entre ellos se encuentran:

- Ficha de codificación de cepas bacterianas (Anexo A) que permitió registrar información relevante sobre cada aislamiento, incluyendo código interno, fecha de aislamiento, fuente biológica, medio de cultivo e identificación taxonómica.
- Tabla de registro de co-cultivo empleada (Anexo B) para anotar las observaciones durante los ensayos de inhibición en placa, tales como tamaño del halo de inhibición (en milímetros), diámetro de la colonia, tiempo de evaluación (24 h, 48 h y 72 h) y observaciones cualitativas.

Los formatos vacíos de estos instrumentos fueron completados progresivamente durante la fase experimental denominada “3.6. Procedimientos”

3.6. Procedimientos

3.6.1. Preparación de inóculos bacterianos de *H. illucens* y de *Salmonella enterica* ATCC 13311

Para el inicio de los ensayos, se reactivaron las cepas bacterianas previamente aisladas del tracto intestinal de larvas de *Hermetia illucens* que se conservaron en crioviales a -80 °C en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol al 20 %. Se procedió a sembrar las cepas en placas de agar nutritivo (NA) y se incubarán a 30 °C por 24 horas con el fin de obtener colonias individuales viables. Posteriormente, a partir de una colonia aislada se preparó un inóculo en caldo LB estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL, medida por espectrofotometría a 600 nm. Este paso permitió asegurar la estandarización de la concentración bacteriana para cada ensayo experimental.

En paralelo, se reactivó la cepa indicadora *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311, la cual fue cultivada en caldo Mueller-Hinton (MH) bajo incubación a 37 °C durante 18-24 horas. Luego, se ajustó su concentración celular a 0.5 McFarland mediante dilución con solución salina estéril, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023) para ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Esta cepa fue utilizada como blanco para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas entomiles.

3.6.2. Ensayo de co-cultivo mediante técnica de bloques de agar modificada

Con el propósito de inducir y evaluar la producción de compuestos antimicrobianos por parte de las cepas entomiles, se implementó una técnica de co-cultivo en placas de Petri basada en el método de bloques de agar (Wang et al., 2021), adaptada a condiciones locales de laboratorio. Para ello, se recortaron cubos de 5 × 5 mm a partir de cultivos activos de 24 horas de las cepas entomiles sobre agar nutritivo. Estos bloques fueron transferidos con pinzas estériles al centro de placas previamente sembradas con *S. enterica* ATCC 13311 en una capa superficial homogénea de agar Mueller-Hinton.

La siembra de la cepa indicadora se realizó mediante el método de extensión en placa ("spread plate"), utilizando un hisopo estéril embebido en el inóculo estandarizado. Tras la colocación del bloque entomil, las placas fueron incubadas a 37 °C, en condiciones aerobias, y fueron observadas a intervalos de 24, 48 y 72 horas. Esta técnica simuló interacciones microbianas competitivas y permitió detectar la presencia de compuestos bioactivos que difundieron en el medio e inhibieron el crecimiento del patógeno objetivo.

3.6.3. Medición del halo de inhibición a 24, 48 y 72 horas

A cada intervalo de tiempo (24, 48 y 72 h), se procedió a medir el diámetro del halo de inhibición generado alrededor del bloque de agar con crecimiento bacteriano. Esta medición se

realizó en dos ejes perpendiculares para minimizar errores de lectura, y se utilizó un calibrador vernier estéril o una regla milimetrada. El halo fue definido como la zona clara sin crecimiento visible de *Salmonella* que rodea el bloque entomil. Así mismo, se tomaron fotografías para el registro digital y análisis posterior. Este método se empleó ampliamente como una herramienta rápida y efectiva para la identificación preliminar de bacterias productoras de sustancias antimicrobianas (Balouiri et al., 2016).

3.6.4. Cálculo del potencial antimicrobiano (índice halo/colonia)

Para normalizar la actividad antimicrobiana en función del tamaño de cada colonia o bloque de crecimiento bacteriano, se calculó un índice relativo de inhibición utilizando la fórmula:

$$\text{Índice de inhibición} = (\text{Diámetro total del halo} - \text{Diámetro del bloque}) / \text{Diámetro del bloque}$$

Este índice permitió comparar la capacidad inhibitoria entre distintas cepas de manera proporcional, independientemente del tamaño inicial del inóculo. Se realizaron triplicados de cada ensayo para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Este tipo de índice fue reportado en literatura como herramienta útil para discriminar niveles de potencia antimicrobiana en estudios de bioprospección (Siregar et al., 2024).

3.6.5. Uso de Tetraciclina como control positivo

Como control positivo del ensayo, se colocó en cada placa un disco estandarizado de Tetraciclina (30 µg), el cual generó un halo de inhibición esperable y reproducible frente a *S. enterica* ATCC 13311. Este control permitió validar la sensibilidad del sistema de detección y sirvió de referencia para la comparación cuantitativa del efecto de las cepas entomiles. Adicionalmente, se incluyó un control negativo (placa con *Salmonella* sin bloque bacteriano ni

antibiótico) para descartar inhibiciones espontáneas o artefactuales. Esta práctica está alineada con las recomendaciones de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para estudios de sensibilidad antimicrobiana mediante difusión en agar.

3.7. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de los ensayos de co-cultivo fueron registrados como medidas del halo de inhibición en milímetros (mm), tomadas en triplicado para cada cepa bacteriana entomil frente a *Salmonella enterica* ATCC 13311. Posteriormente, se calcularon los promedios y desviaciones estándar (DE) de los halos generados para cada tratamiento experimental.

Se empleó una prueba t de Student para muestras independientes para comparar la media del halo de inhibición generado por cada cepa con respecto al control positivo (disco de tetraciclina). Esta prueba fue apropiada para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos medias cuando las observaciones son independientes y siguen una distribución aproximadamente normal. El nivel de significancia adoptado fue $p < 0.05$, criterio comúnmente aceptado en estudios microbiológicos para establecer diferencias relevantes.

Para el procesamiento de datos se utilizó el software estadístico RStudio, lo que permitió además graficar los resultados en diagramas de caja (boxplots) o gráficos de barras con error estándar, favoreciendo la interpretación visual de los datos.

3.8. Consideraciones éticas

El presente estudio no involucró la participación de seres humanos ni el uso de vertebrados superiores, por lo que no requiere aprobación de un comité de ética biomédico. Las cepas bacterianas utilizadas fueron obtenidas a partir del intestino de larvas de *Hermetia illucens*, un insecto saprófago no regulado por las normas éticas sobre el uso de animales en investigación.

No obstante, se garantizó el cumplimiento estricto de las normas de bioseguridad de nivel 2 (BSL-2) para el manejo de cepas bacterianas potencialmente patógenas, como *Salmonella enterica*, siguiendo los lineamientos del Manual de Bioseguridad en Laboratorios del CDC y la OMS (2020). Todo el trabajo experimental fue realizado dentro de cabinas de bioseguridad tipo II, y el material biológico fue correctamente inactivado y descartado mediante autoclave o con soluciones desinfectantes certificadas (hipoclorito al 1 %, etanol 70 %, etc.).

Asimismo, se siguieron las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para estudios de sensibilidad antimicrobiana mediante difusión en agar, específicamente el documento CLSI M02-A13 (actualizado a CLSI M100-33 en su versión 2023), el cual estandariza condiciones críticas del ensayo como el tipo y pH del medio (agar Mueller-Hinton), la concentración del inóculo (0.5 McFarland), el tamaño de los discos de antibiótico (30 µg para tetraciclina), los tiempos y temperaturas de incubación, y el uso de controles positivos y negativos. Esta estandarización aseguró la reproducibilidad, validez comparativa y aceptación de los resultados dentro de la comunidad científica y biomédica.

IV. RESULTADOS

4.1. Reactivación de cepas de bacterias aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*)

Se procedió a descriopreservar 67 cepas de bacterias previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra *H. illucens* siguiendo la metodología descrita previamente. A partir de este proceso se logró obtener con éxito los cultivos bacterianos codificados en la tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de las 67 cepas de bacterias previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (Hermetia illucens) que fueron descriopreservadas

Número	CEPA	Género	Especie
1	BGS8_1	Enterococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
2	BGS8_2	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
3	BGS8_3	Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>
4	BGS8_4	Providencia	<i>Providencens rettgeri</i>
5	BGS8_6	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
6	BGS8_7	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
7	BGS8_8	klebsiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	BGS11_1	Providencia	<i>Providencens rettgeri</i>
9	BGS11_2	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
10	BGS11_3	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
11	BGS11_4	klebsiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	BGS11_5	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
13	BGS11_6	Bacillus	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
14	BGS11_8	klebsiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	BGS11_10	Bacillus	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
16	BGS11_11	Stenotrophomonas	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
17	BGS11_12	Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>
18	BGS11_13	Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>
19	BGS11_14	Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i>
20	BGS11_15	Klesiella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
21	BGS11_16	Paenobacillus	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>

22	BGS11_17	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
23	BGS11_18	Providencia	<i>Providencia stuartii</i>
24	BGS11_19	Methylobacterium	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
25	BGS11_20	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
26	BGS11_21	Achromobacter	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
27	BGS11_22	Bacillus	<i>Bacillus subtilis</i>
28	BGS11_23	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
29	BGS11_24	Bacillus	<i>Bacillus subtilis</i>
30	BGU11_1	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
31	BGU11_2	Alcaligenes	<i>Alcaligenes faecalis</i>
32	BGU11_3	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
33	BGU11_4	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
34	BGU11_5	Ignatzschineria	<i>Ignatzschineria indica</i>
35	BGU11_6	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
36	BGU11_7	Paenibacillus	<i>Paenibacillus lactis</i>
37	BGU11_8	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
38	BGU11_9	Ignatzschineria	<i>Ignatzschineria indica</i>
39	BGU11_10	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
40	BGU11_11	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
41	BGU11_12	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>
42	BGU11_13	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
43	BGU11_14	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
44	BGM11_1	Enterococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
45	BGM11_2	Lysinibacillus	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>
46	BGM11_3	Lysinibacillus	<i>Lysinibacillus macroides</i>
47	BGM11_4	Vagococcus	<i>Vagococcus fluvialis</i>
48	BGM11_5	Enterococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
49	BGM11_6	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
50	BGM11_7	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
51	BGM11_8	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
52	BGM11_9	Enterococcus	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
53	BGM11_10	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
54	BGM11_11	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
55	BGM11_12	Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i>
56	BGM11_13	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
57	BGM11_14	Lysinibacillus	<i>Lysinibacillus macroides</i>
58	BGM11_15	Escherichia	<i>Escherichia fergusonii</i>
59	BGM11_16	Enterococcus	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
60	BGM11_17	Oceanobacillus	<i>Oceanobacillus caeni</i>

61	BGM11_18	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
62	BGM11_19	Providencia	<i>Providencia stuartii</i>
63	BGM11_20	Enterococcus	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
64	BGM11_21	Providencia	<i>Providencia rettgeri</i>
65	BGM11_22	Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i>
66	BGM11_23	Paenalcaligenes	<i>Paenalcaligenes suwonensis</i>
67	BGM11_24	Enterococcus	<i>Enterococcus sp</i>

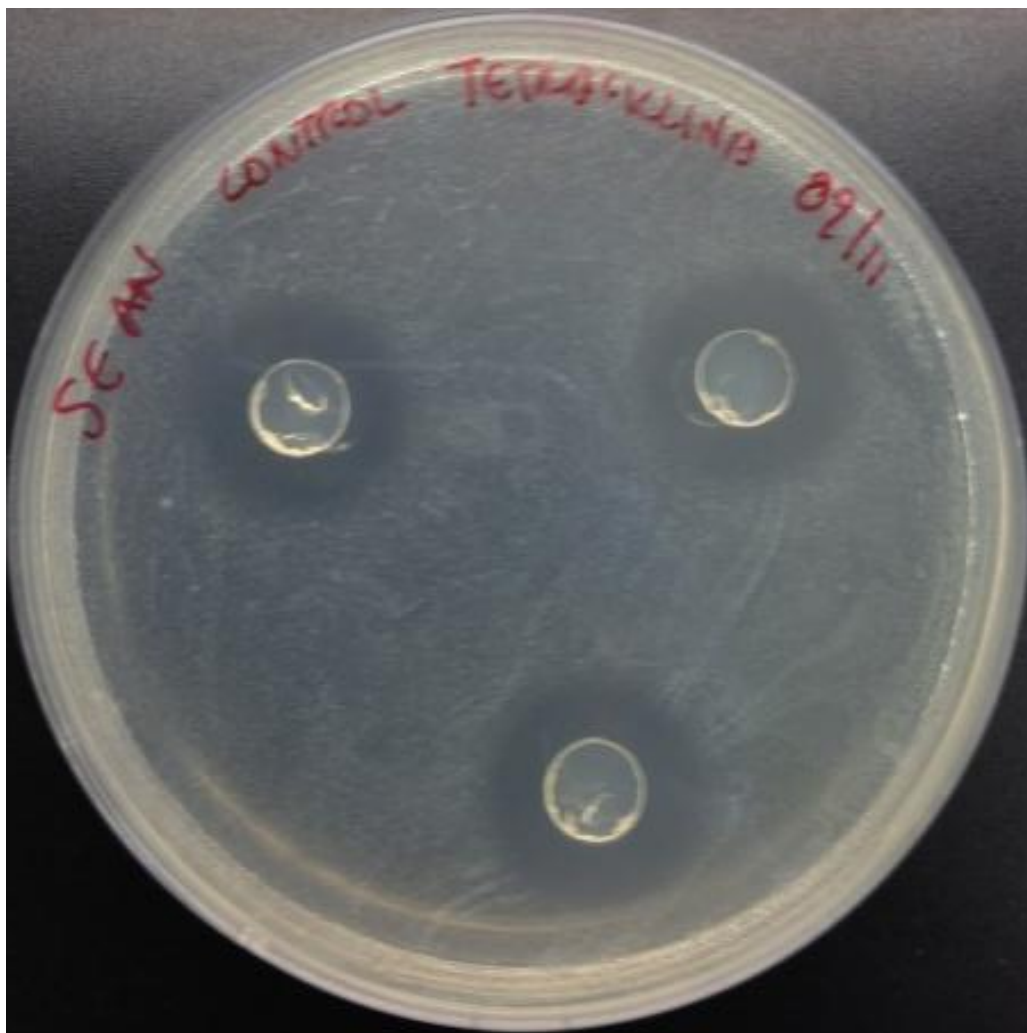
Así mismo, se logró descriopreservar la cepa de referencia *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311.

4.2. Evaluación de la actividad antibacteriana del antibiótico de referencia Tetraciclina contra la cepa de referencia *S. enterica* ATCC 13311

Luego de reactivar la cepa patógena de referencia *S. enterica* ATCC 13311 se procedió a realizar la evaluación de su sensibilidad frente al antibiótico de referencia Tetraciclina. El resultado presentado en la figura 1 muestra que la cepa de referencia *S. enterica* fue sensible frente al antibiótico mostrando halos de inhibición promedio de $17.8 \text{ mm} \pm 0.2$ y un potencial antimicrobiano de 2.2 ± 0.02 .

Figura 1

Evaluación de la actividad de la droga de referencia Tetraciclina frente a S. entérica ATCC 13311. Halo de inhibición: 17.8 ± 0.2 mm



4.3. Evaluación de la actividad antibacteriana de 67 cepas de bacterias aisladas previamente del tracto digestivo de *H. illucens* contra la cepa de referencia *S. enterica* ATCC 13311

Luego de reactivar las 67 cepas previamente aisladas de la mosca *H. illucens*, se procedió a realizar el enfrentamiento de cada bacteria contra la cepa patógena de referencia *S. enterica* ATCC 13311. Los resultados presentados en la tabla 2 muestran que 4 cepas del género *Enterococcus* presentaron actividad antimicrobiana (formación de halos de inhibición

entre 9.9 y 26 mm de diámetro) contra la cepa de referencia *S. enterica*, siendo dos de ellas pertenecientes a la especie *E. faecium*. Así mismo, se observó que 2 cepas de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, presentaron actividad antimicrobiana con halos de inhibición entre 17.8 y 24.7 mm de diámetro. Finalmente, la especie *Providencia stuartii* presentó actividad antimicrobiana con un halo de inhibición de 12.3 mm de diámetro. Las imágenes de halos de inhibición de las 07 cepas de bacterias aisladas previamente de la mosca *H. illucens* contra la cepa de referencia *S. enterica* ATCC 13311 son presentados en el anexo A.

Tabla 2

Determinación de los diámetros de inhibición de bacterias previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (Hermetia illucens) frente a S. enterica ATCC13311

Número	CEPA	Especie previamente aislada de la mosca <i>H. illucens</i>	Diámetro de halo de inhibición	Desviación estándar (SD)
1	BGS8_1	<i>Enterococcus faecium</i>	26	0.3
2	BGS8_2	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
3	BGS8_3	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0
4	BGS8_4	<i>Providencens rettgeri</i>	0	0
5	BGS8_6	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
6	BGS8_7	<i>Enterococcus sp</i>	0	0
7	BGS8_8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
8	BGS11_1	<i>Providencens rettgeri</i>	0	0
9	BGS11_2	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
10	BGS11_3	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
11	BGS11_4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
12	BGS11_5	<i>Enterococcus sp</i>	0	0
13	BGS11_6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24.7	1.2
14	BGS11_8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
15	BGS11_10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17.8	0.2
16	BGS11_11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0
17	BGS11_12	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0
18	BGS11_13	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0
19	BGS11_14	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0
20	BGS11_15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0

21	BGS11_16	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>	0	0
22	BGS11_17	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
23	BGS11_18	<i>Providencia stuartii</i>	12.3	0.3
24	BGS11_19	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0	0
25	BGS11_20	<i>Enterococcus sp</i>	17.3	0.7
26	BGS11_21	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0	0
27	BGS11_22	<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
28	BGS11_23	<i>Providencens rettgeri</i>	0	0
29	BGS11_24	<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
30	BGU11_1	<i>Morganella morganii</i>	0	0
31	BGU11_2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	0
32	BGU11_3	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
33	BGU11_4	<i>Enterococcus sp</i>	0	0
34	BGU11_5	<i>Ignatzschineria indica</i>	0	0
35	BGU11_6	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
36	BGU11_7	<i>Paenibacillus lactis</i>	0	0
37	BGU11_8	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
38	BGU11_9	<i>Ignatzschineria indica</i>	0	0
39	BGU11_10	<i>Enterococcus sp</i>	0	0
40	BGU11_11	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
41	BGU11_12	<i>Enterococcus sp</i>	9.9	0.4
42	BGU11_13	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
43	BGU11_14	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
44	BGM11_1	<i>Enterococcus faecium</i>	0	0
45	BGM11_2	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	0	0
46	BGM11_3	<i>Lysinibacillus macroides</i>	0	0
47	BGM11_4	<i>Vagococcus fluvialis</i>	0	0
48	BGM11_5	<i>Enterococcus faecium</i>	15.3	0.3
49	BGM11_6	<i>Morganella morganii</i>	0	0
50	BGM11_7	<i>Morganella morganii</i>	0	0
51	BGM11_8	<i>Morganella morganii</i>	0	0
52	BGM11_9	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	0
53	BGM11_10	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
54	BGM11_11	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
55	BGM11_12	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0
56	BGM11_13	<i>Morganella morganii</i>	0	0
57	BGM11_14	<i>Lysinibacillus macroides</i>	0	0
58	BGM11_15	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0
59	BGM11_16	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	0

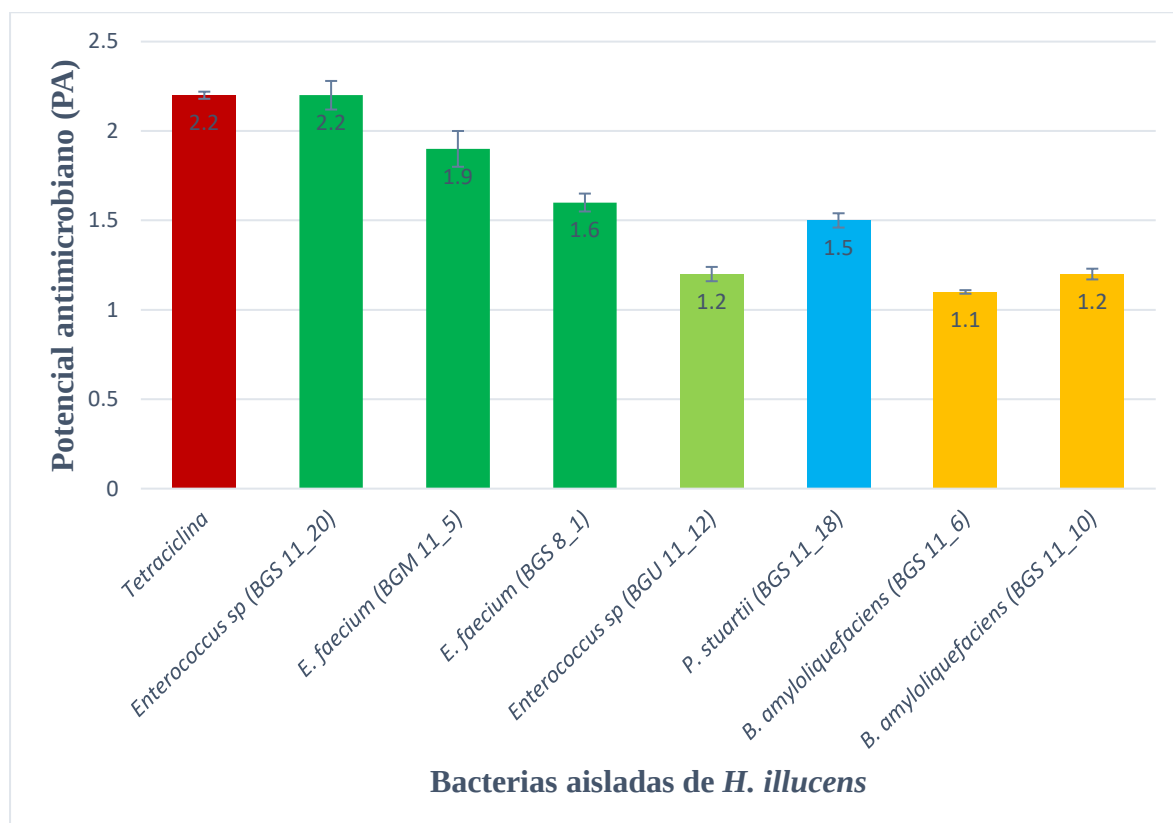
60	BGM11_17	<i>Oceanobacillus caeni</i>	0	0
61	BGM11_18	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
62	BGM11_19	<i>Providencia stuartii</i>	0	0
63	BGM11_20	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	0
64	BGM11_21	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0
65	BGM11_22	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0
66	BGM11_23	<i>Paenaltcaligenes suwonensis</i>	0	0
67	BGM11_24	<i>Enterococcus sp</i>	0	0

4.4. Evaluación del Potencial Antimicrobiano de las cepas de bacterias aisladas previamente del tracto digestivo de *H. illucens* contra la cepa de referencia *S. enterica* ATCC 13311

Posterior a la evaluación de los halos de inhibición de las 67 cepas previamente aisladas de la mosca *H. illucens* contra la cepa patógena de referencia *S. enterica* ATCC 13311, se procedió a calcular el potencial antimicrobiano de las cepas activas. Los resultados presentados en la figura 2 muestran a la bacteria BGS11_20 del género *Enterococcus sp.* con el mayor potencial antimicrobiano (PA) obteniéndose un valor de 2.2 similar al valor de PA de la droga de referencia Tetraciclina representado de color rojo en la figura 2. Así mismo, se puede observar que 3 cepas del género *Enterococcus* tuvieron un PA mayor a 1.5 (color verde oscuro en figura 2), mientras que la cepa BGU11_12 del mismo género tuvo el menor PA con un valor de 1.2 representado de color verde claro en la figura 2. De manera similar se observa que la especie *Providencia stuartii* tuvo un PA de 1.5 representado de color celeste en figura 2; mientras que las cepas BGS11_6 y BGS11_10 de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* presentaron los menores valores de PA, entre 1.1 y 1.2 respectivamente (barras de color amarillo en figura 2).

Figura 2

Determinación del potencial antimicrobiano (PA) de las bacterias previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (Hermetia illucens) contra la bacteria S. enterica ATCC 13311



V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan el potencial de la microbiota intestinal de *Hermetia illucens* como una fuente valiosa de bacterias con actividad antimicrobiana. La recuperación de 67 aislamientos bacterianos viables (Tabla 1) a partir del tracto intestinal de la larva de la mosca soldado negra muestra una diversidad cultivable considerable, incluso bajo condiciones de laboratorio. Este hallazgo coincide con lo reportado por otros estudios que han identificado comunidades bacterianas dominadas por Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria en el intestino de larvas de *H. illucens* criadas en diferentes sustratos (Jeon et al., 2011; Bruno et al., 2019).

Las observaciones morfológicas mediante tinción Gram revelaron una alta proporción de bacilos Gram positivos (Anexo B), lo cual tiene relación con estudios previos en donde describen un predominio de géneros como *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus* en estos insectos (Lin & Shelomi et al., 2021). La capacidad de estos géneros para formar esporas y resistir condiciones adversas puede explicar su alta frecuencia y persistencia en el intestino larval, un entorno caracterizado por cargas microbianas elevadas y competencia intensa por nutrientes.

El aislamiento de estas cepas cultivables representa un paso importante para la exploración biotecnológica de su actividad funcional. A diferencia de enfoques metagenómicos que ofrecen una visión global de la diversidad microbiana, el cultivo selectivo permite caracterizar fenotípicamente a las bacterias y realizar ensayos funcionales directos, como los de actividad antimicrobiana (Costa et al., 2022). En ese sentido, la recolección y diferenciación de colonias según morfología macroscópica permitió priorizar a aquellas cepas con mayor viabilidad y comportamiento diferencial para su evaluación posterior.

Posteriormente, en el ensayo de co-cultivo (Tabla 2) se evaluó de manera funcional la capacidad inhibitoria de las 68 cepas bacterianas seleccionadas frente a *Salmonella enterica* ATCC 13311, un patógeno entérico que es utilizado como un modelo ampliamente utilizado en ensayos de sensibilidad antimicrobiana debido a su relevancia clínica y alimentaria (Eng et al., 2015). La formación de los halos de inhibición en medio de agar se interpretó como evidencia de la producción de metabolitos antimicrobianos difusibles, una estrategia comúnmente empleada para el cribado inicial de compuestos bioactivos (CLSI, 2023).

Los halos de inhibición generados por las cepas seleccionadas alcanzaron diámetros promedio entre 9.9 y 26 mm, valores comparables a los observados en ensayos similares realizados con bacterias del género *Bacillus* u otras especies entomopatógenas aisladas de insectos (Baranova et al., 2022). Este rango de inhibición sugiere un nivel de actividad antimicrobiana moderado a fuerte, considerando que halos mayores a 9 mm son generalmente considerados significativos en pruebas de cribado preliminar (Valgas et al., 2007).

El hallazgo de que 7 de las cepas presentaron un potencial antimicrobiano (PA) en co-cultivo frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 (Figura 2), representa una evidencia significativa del potencial funcional de estos microorganismos. Esta observación refuerza la hipótesis de que la microbiota intestinal de *H. illucens* no solo participa en la degradación de sustratos orgánicos, sino que también podría contribuir activamente a la defensa del hospedador mediante la producción de metabolitos antimicrobianos (Borrelli et al., 2017).

Cabe destacar que en estudios previos se ha identificado la producción de péptidos antimicrobianos, ácidos grasos volátiles y otros compuestos bioactivos por parte de bacterias asociadas a insectos, lo cual ha motivado su exploración como fuentes alternativas de antibióticos (Chevrette et al., 2019). En el caso particular de *H. illucens*, se ha reportado que

extractos de sus larvas presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo cepas clínicas multirresistentes (Lee et al., 2020).

Así mismo, la selección de las cuatro cepas con mayor PA representa una estrategia apropiada para enfocar recursos en aquellas con mayor potencial biotecnológico. Esta selección se justifica no solo por el PA igual o mayor a 1.5, sino también por la reproducibilidad de los resultados en réplicas independientes, lo cual aporta robustez a las observaciones. Estudios similares han empleado la misma estrategia para seleccionar cepas de interés a partir de insectos y otros ambientes extremos, como suelos volcánicos o residuos orgánicos (Multisanti et al., 2025).

La inclusión de Tetraciclina como control positivo permitió establecer un punto de referencia cuantitativo frente al cual comparar la potencia de las cepas de bacterias evaluadas. La Tetraciclina, un antibiótico de amplio espectro, actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana mediante su unión a la subunidad 30S ribosomal, y ha sido extensamente utilizada en estudios de sensibilidad frente a *Salmonella* spp. (Chopra & Roberts, 2001). En el presente estudio, el valor del PA promedio para Tetraciclina fue de 2.2, similar al valor del PA de *Enterococcus* sp. y ligeramente superior a los obtenidos con las cepas más activas, pero no en todos los casos con diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados podrían sugerir que algunos metabolitos producidos por las bacterias intestinales de *H. illucens* pueden ejercer una inhibición comparable a la de los antibióticos convencionales, al menos en condiciones *in vitro*. Aunque la composición exacta de dichos metabolitos no ha sido determinada en esta fase del estudio, trabajos previos han descrito la presencia de lipopéptidos, bacteriocinas, y ácidos orgánicos entre los compuestos secretados por bacterias entéricas de insectos con efectos antimicrobianos (Rumbos et al., 2021).

El uso del co-cultivo como metodología tiene implicancias importantes desde el punto de vista ecológico y biotecnológico. Este enfoque permite simular interacciones competitivas que ocurren naturalmente entre microorganismos, muchas veces estimulando la activación de rutas biosintéticas silenciadas en cultivos monoclonales (Bertrand et al., 2014). De hecho, se ha demostrado que el estrés generado por la proximidad de patógenos puede inducir la producción de antimicrobianos como mecanismo defensivo, especialmente en bacterias adaptadas a nichos como el tracto digestivo de insectos (Abdelmohsen et al., 2015).

Por otro lado, la variabilidad en el PA entre cepas seleccionadas puede deberse a múltiples factores, incluyendo diferencias en la tasa de crecimiento, en la difusión del compuesto en el medio, en la estabilidad del metabolito secretado o en la expresión diferencial de genes biosintéticos. Estudios transcriptómicos y metabolómicos han confirmado que las condiciones del medio, la competencia microbiana y las señales del hospedador modulan fuertemente la expresión de metabolitos secundarios en bacterias ambientales (Aleti et al., 2015).

En el caso del género *Enterococcus* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para sintetizar bacteriocinas, péptidos antimicrobianos ribosomales que muestran una potente actividad frente a patógenos Gram positivos y, en ciertos casos, Gram negativos como *Salmonella enterica* (Ben Braïek & Smaoui, 2019). Específicamente, cepas de *E. faecium* han mostrado una producción de enterocinas como enterocina A, B, L50 y P, muchas de las cuales actúan a través de la disrupción de la membrana citoplasmática de las bacterias diana (Arqués et al., 2015).

La elevada actividad observada en *E. faecium* BGM11_5 y BGS8_1 podría atribuirse a una regulación diferencial de rutas biosintéticas responsables de estas enterocinas. A pesar de pertenecer a la misma especie, las diferencias entre cepas pueden estar determinadas por su

genoma accesorio (genes adquiridos por transferencia horizontal) y por elementos móviles como plásmidos, transposones y fagos, que pueden portar genes de biosíntesis de compuestos antimicrobianos (Lebreton et al., 2017).

En el caso de *Enterococcus* sp. BGS11_20, el alto valor de PA sugiere que, aunque no se haya identificado aún a nivel de especie, podría tratarse de una cepa productora de una enterocina aún no caracterizada, o de un metabolito no ribosomal con efecto inhibitorio. Esta cepa representa un candidato prometedor para estudios posteriores de purificación y caracterización estructural de metabolitos.

Así mismo, *Providencia stuartii* BGS11_18 es una enterobacteria típicamente considerada un oportunista hospitalario, pero también ha sido aislada de ambientes naturales y organismos invertebrados, como insectos, donde cumple funciones simbióticas (Caparros Megido et al., 2017). Su actividad antimicrobiana ha sido poco documentada, aunque recientes estudios han reportado cepas ambientales capaces de sintetizar compuestos con actividad anti-*Staphylococcus aureus* y *E. coli*, posiblemente derivados de rutas biosintéticas activadas por estrés ambiental o interacciones intermicrobianas (Heise et al., 2019).

La capacidad de *P. stuartii* para inhibir a *Salmonella enterica* puede deberse a la producción de aminas biógenas, biosurfactantes o compuestos volátiles con acción inhibitoria indirecta, como compuestos derivados del metabolismo del triptófano o ácidos grasos volátiles. Otra posibilidad es que *P. stuartii* esté produciendo sideróforos u otros compuestos con capacidad de quelación que generan un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos competidores.

Consideramos que los resultados refuerzan el valor del co-cultivo como estrategia de evaluación funcional y confirman la actividad antibacteriana significativa de al menos cuatro

cepas provenientes del intestino de *H. illucens* contra un patógeno modelo. Este hallazgo se alinea con investigaciones recientes que promueven el uso de insectos y sus microbiotas como fuente de nuevas moléculas antimicrobianas, con aplicaciones potenciales en medicina humana, veterinaria y seguridad alimentaria (Van Huis, 2020).

En esta línea, se ha observado que la microbiota intestinal de *Hermetia illucens* ha captado atención creciente como fuente de probióticos y agentes antimicrobianos naturales aplicables en nutrición animal y control de patógenos (Jeon et al., 2021). En particular, las bacterias simbióticas adaptadas al intestino de larvas que se alimentan de residuos orgánicos muestran una elevada capacidad competitiva y de síntesis de compuestos bioactivos, resultado de la presión selectiva constante en ambientes ricos en microorganismos oportunistas. Esta adaptación ecológica permite generar perfiles de actividad antimicrobiana que pueden ser aprovechados biotecnológicamente para el desarrollo de aditivos funcionales en alimentación animal o incluso agentes terapéuticos para salud humana y veterinaria (Mahayri et al., 2025).

El hallazgo de cepas intestinales con efecto inhibidor significativo frente a *S. enterica* ATCC 13311 plantea áreas de aplicación. Por ejemplo, la incorporación de dichas bacterias como cultivos vivos o sus extractos como aditivos en dietas de animales monogástricos podría reducir la colonización intestinal de *Salmonella* spp., mejorando el perfil sanitario del ganado y disminuyendo la carga bacteriana en productos derivados (Rumbos et al., 2021). Esta aproximación encaja dentro del esquema de alternativas a antibióticos promotores de crecimiento (AGPs), cuyo uso ha sido restringido o prohibido en diversas regiones como la Unión Europea y próximamente en América Latina.

Asimismo, las implicancias ecológicas de utilizar bacterias intestinales de *Hermetia illucens* como fuentes de compuestos antimicrobianos son significativas y alineadas con los principios de la bioeconomía circular. La cría masiva de esta especie de díptero en sistemas de

bioconversión de residuos orgánicos no solo permite obtener proteínas y lípidos valiosos para nutrición animal, sino también un microbioma adaptado a ambientes ricos en materia orgánica y competidores microbianos, lo que lo convierte en un reservorio natural de potenciales biocontroladores (Bruno et al., 2025).

Finalmente, el presente trabajo constituye un avance significativo en la valorización integral de *Hermetia illucens* como bioplataforma multifuncional, evidenciando que su microbioma no solo cumple roles digestivos y simbióticos, sino que puede representar una fuente estratégica de soluciones para el control de patógenos en contextos agroalimentarios. Esta aproximación innovadora permite abrir un nuevo frente en la lucha contra la resistencia antimicrobiana, al integrar enfoques de microbiología ambiental, biotecnología de insectos y salud pública bajo una perspectiva transdisciplinaria y sostenible.

VI. CONCLUSIONES

6.1. El presente estudio permitió validar un ensayo de co-cultivo *in vitro*, sensible y reproducible, para evaluar la actividad antimicrobiana de bacterias intestinales de *Hermetia illucens* frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. El método demostró ser útil para diferenciar cepas activas mediante la formación de halos de inhibición, y compararlas con controles establecidos.

6.2. Tres cepas bacterianas mostraron una inhibición significativa, con halos de hasta 18 mm, comparables o superiores a los del antibiótico tetraciclina. Esto respalda la hipótesis de que el microbioma intestinal de *H. illucens* contiene bacterias capaces de producir metabolitos con potencial antimicrobiano.

6.3. Los resultados destacan a estas cepas como candidatas para aplicaciones en biocontrol o desarrollo de agentes antimicrobianos alternativos. Asimismo, se refuerza el valor biotecnológico de *H. illucens* como fuente microbiana enmarcada en estrategias de economía circular y bioprospección sostenible.

VII. RECOMENDACIONES

7.1. Se propone avanzar hacia la caracterización bioquímica de los metabolitos producidos por las cepas activas, mediante técnicas de fraccionamiento cromatográfico y análisis estructural, lo cual permitiría identificar compuestos específicos con posible valor terapéutico o industrial. En paralelo, se sugiere realizar estudios de secuenciación genómica completa de las cepas seleccionadas, con el fin de mapear clústeres biosintéticos de antibióticos y explorar su potencial no expresado bajo condiciones estándar.

7.2. Desde un enfoque aplicado, podrían desarrollarse ensayos de formulación de estos microorganismos o sus metabolitos en matrices apropiadas como biofilms, recubrimientos activos o aditivos para piensos, evaluando su eficacia en la reducción de patógenos en animales de producción o productos frescos. También se recomienda estudiar su interacción con microbiotas nativas de ambientes agroalimentarios para entender su ecocompatibilidad y evitar desequilibrios ecológicos.

7.3. Otra línea estratégica será investigar la posibilidad de inducir o potenciar la actividad antimicrobiana mediante co-cultivo con otros microorganismos, modulando la expresión de genes silenciosos y favoreciendo sinergias metabólicas. Esta estrategia ya ha demostrado ser efectiva en actinobacterias y podría aplicarse al microbioma de *H. illucens* para ampliar la gama de compuestos obtenibles.

7.4. Finalmente, se recomienda impulsar alianzas interinstitucionales que permitan integrar capacidades de microbiología, química de productos naturales, regulación sanitaria, ingeniería de bioprocesos e innovación empresarial. La consolidación de estos esfuerzos podría convertir a *H. illucens* y su microbioma en una plataforma nacional para la innovación en biocontrol y

salud pública, alineada con las agendas ODS y con potencial de escalamiento regional e internacional.

VIII. REFERENCIAS

- Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., & Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*, 33(6), 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.003>
- Aleti, G., Sessitsch, A., & Brader, G. (2015). Genome mining: Prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed research international*, 2015, Article 584183. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baranova, A. A., Zakalyukina, Y. V., Ovcharenko, A. A., Korshun, V. A., & Tyurin, A. P. (2022). Antibiotics from Insect-Associated Actinobacteria. *Biology*, 11(11), 1676. <https://doi.org/10.3390/biology11111676>
- Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed research international*, 2019, 5938210. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology advances*, 32(6), 1180–1204. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001>

- Borrelli, L., Coretti, L., Dipineto, L., Bovera, F., Menna, F., Chiariotti, L., Nizza, A., Lembo, F., & Fioretti, A. (2017). Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Scientific reports*, 7(1), 16269. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16560-6>
- Bruno, D., Bonelli, M., De Filippis, F., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Casartelli, M., Ercolini, D., & Caccia, S. (2019). The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), e01864-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01864-18>
- Bruno, D., Orlando, M., Testa, E., Carnevale Miino, M., Pesaro, G., Miceli, M., Pollegioni, L., Barbera, V., Fasoli, E., Draghi, L., Baltrocchi, A. P. D., Ferronato, N., Seri, R., Maggi, E., Caccia, S., Casartelli, M., Molla, G., Galimberti, M. S., Torretta, V., Vezzulli, A., ... Tettamanti, G. (2025). Valorization of organic waste through black soldier fly: On the way of a real circular bioeconomy process. *Waste management* 191, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.10.030>
- Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(11), 790–801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>
- Caparros Megido, R., Desmedt, S., Blecker, C., Béra, F., Haubruge, É., Alabi, T., & Francis, F. (2017). Microbiological Load of Edible Insects Found in Belgium. *Insects*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.3390/insects8010012>
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., Book, A. J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W., Grubbs, K. J., Horn, H. A., Hoffmann, F. M., Klassen, J. L., Knack, J. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Muller, L., Melo, W. G. P., Pinto-Tomás, A. A., Schmitz, A., Wendt-Pienkowski, E., Wildman,

- S., Zhao, M., Zhang, F., Bugni, T. S., Andes, D. R., Pupo, M. T., & Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, 10, Article 516. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (33rd ed.). CLSI Supplement M100.
- Costa, O. Y. A., de Hollander, M., Pijl, A., Liu, B., & Kuramae, E. E. (2020). Cultivation-independent and cultivation-dependent metagenomes reveal genetic and enzymatic potential of microbial community involved in the degradation of a complex microbial polymer. *Microbiome*, 8(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00836-7>
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 840–859. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0306-z>
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., & Wernicki, A. (2014). Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poultry science*, 93(10), 2464–2472. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04025>
- Diener, S., Zurbrugg, C., & Tockner, K. (2011). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research*, 27(6), 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Eke, M., Tougeron, K., Hamidovic, A., Tinkeu, L. S. N., Hance, T., & Renoz, F. (2023). Deciphering the functional diversity of the gut microbiota of the black soldier fly

- (*Hermetia illucens*): recent advances and future challenges. *Animal microbiome*, 5(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00261-9>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Erickson, M. C., Islam, M., Sheppard, C., Liao, J., & Doyle, M. P. (2004). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *Journal of food protection*, 67(4), 685–690. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.4.685>
- Giordano D. (2020). Bioactive Molecules from Extreme Environments. *Marine drugs*, 18(12), 640. <https://doi.org/10.3390/md18120640>
- Hamed, A. A., Ghareeb, M. A., Kelany, A. K., Abdelraof, M., Kabary, H. A., Soliman, N. R., & Elawady, M. E. (2024). Induction of antimicrobial, antioxidant metabolites production by co-cultivation of two red-sea-sponge-associated *Aspergillus* sp. CO2 and *Bacillus* sp. COBZ21. *BMC biotechnology*, 24(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00830-z>
- Heise, P., Liu, Y., Degenkolb, T., Vogel, H., Schäberle, T. F., & Vilcinskas, A. (2019). Antibiotic-Producing Beneficial Bacteria in the Gut of the Burying Beetle *Nicrophorus vespilloides*. *Frontiers in microbiology*, 10, 1178. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01178>
- Herman, N., Vitenberg, T., Hayouka, Z., & Opatovsky, I. (2024). Regulation of antimicrobial peptides in *Hermetia illucens* in response to fungal exposure. *Scientific Reports*, 14, Article 29561. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80133-7>

- Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S. B., Choi, Y., & Lee, S. J. (2011). The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Current microbiology*, 62(5), 1390–1399. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9874-8>
- Jiang, C. L., Jin, W. Z., Tao, X. H., Zhang, Q., Zhu, J., Feng, S. Y., Xu, X. H., Li, H. Y., Wang, Z. H., & Zhang, Z. J. (2019). Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) strengthen the metabolic function of food waste biodegradation by gut microbiome. *Microbial biotechnology*, 12(3), 528–543. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13393>
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H. & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Klüber, P., Müller, S., Schmidt, J., Zorn, H., & Rühl, M. (2022). Isolation of bacterial and fungal microbiota associated with *Hermetia illucens* larvae reveals novel insights into entomopathogenicity. *Microorganisms*, 10(2), 319. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020319>
- Lalander, C., Diener, S., Magri, M. E., Zurbrügg, C., Lindström, A., & Vinnerås, B. (2013). Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*)-from a hygiene aspect. *The Science of the total environment*, 458-460, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>
- Lebreton, F., van Schaik, W., McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., Corander, J., Cheng, L., Saif, S., Young, S., Zeng, Q., Wortman, J., Birren, B., Willems, R. J., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio*, 4(4), e00534-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00534-13>

- Lee, K. S., Yun, E. Y., & Goo, T. W. (2020). Antimicrobial Activity of an Extract of *Hermetia illucens* Larvae Immunized with *Lactobacillus casei* against *Salmonella* Species. *Insects*, 11(10), 704. <https://doi.org/10.3390/insects11100704>
- Lee, Y. Y., Lee, J. K., Park, K. H., Kim, S. Y., Roh, S. W., Lee, S. B., Choi, Y., & Lee, S. J. (2013). *Paenalcaligenes hermetiae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), and emended description of the genus *Paenalcaligenes*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 11), 4224–4229. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049098-0>
- Lin, S.-W., & Shelomi, M. (2024). Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Microbiome and Microbe Interactions: A Scoping Review. *Animals*, 14(22), 3183. <https://doi.org/10.3390/ani14223183>
- Liu, Q., Tomberlin, J. K., Brady, J. A., Sanford, M. R., & Yu, Z. (2008). Black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae reduce *Escherichia coli* in dairy manure. *Environmental entomology*, 37(6), 1525–1530. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-37.6.1525>
- Mahayri, T. M., Atallah, E., Mrázek, J., Bovera, F., Piccolo, G., Moniello, G., & Fliegerová, K. O. (2025). The Inclusion of *Hermetia Illucens* Larvae Meal in the Diet of Laying Hens (Hy-Line Brown) Affects the Caecal Bacterial Composition and Diversity. *Veterinary medicine and science*, 11(6), e70650. <https://doi.org/10.1002/vms3.70650>
- Ment, D., & Mishra, S. (2025). The integral role of the Black Soldier fly, *Hermetia illucens* L., microbiota in its life history. *Frontiers in Microbiomes*, 4. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2025.1517715>

- Mondal, S., Somani, J., Roy, S., & Babu, A. (2023). *Insect microbial symbionts: Ecology, interactions, and biological significance*. *Microorganisms*, 11(11), 2665. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112665>
- Multisanti, C. R., Celi, V., Dibra, A., Pintus, A., Calogero, R., Rizzo, C., & Faggio, C. (2025). Microbial Blue Bioprospecting: Exploring the Advances of Compounds Post-Discovery. *Marine Drugs*, 23(10), 406. <https://doi.org/10.3390/md23100406>
- Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1615. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>
- Nicault, M., Zaiter, A., Dumarcay, S., Chaimbault, P., Gelhay, E., Leblond, P., & Bontemps, C. (2021). Elicitation of Antimicrobial Active Compounds by *Streptomyces*-Fungus Co-Cultures. *Microorganisms*, 9(1), 178. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010178>
- Ruiz, J., Flores-Paredes, W., Luque, N., Albornoz, R., Rojas, N., Espinoza, M., & Pons, M. J. (2022). Retrospective analysis of the emergence of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* infections in a level IV hospital from Lima, Peru, 2009–2014. *Tropical Doctor*, 52(1), 68–73. <https://doi.org/10.1177/00494755211060990>
- Rumbos, C. I., & Athanassiou, C. G. (2021). 'Insects as Food and Feed: If You Can't Beat Them, Eat Them!'-To the Magnificent Seven and Beyond. *Journal of insect science (Online)*, 21(2), 9. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab019>
- Sedighikamal, H., & Mashayekhan, S. (2025). Critical assessment of quenching and extraction/sample preparation methods for microorganisms in metabolomics. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 21(2), 40. <https://doi.org/10.1007/s11306-025-02228-0>

- Selegato, D. M., & Castro-Gamboa, I. (2023). Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1117559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117559>
- Siregar, D. J. S., Julianti, E., Tafsir, M., & Suryanto, D. (2024). Antibacterial activity of lactic acid bacteria from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae fed with empty fruit bunch and tofu waste. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1352, 012011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1352/1/012011>
- Stączek, S., Cytryńska, M., & Zdybicka-Barabas, A. (2023). Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5753. <https://doi.org/10.3390/ijms24065753>
- Thuan, N. H., Tatipamula, V. B., Canh, N. X., & Van Giang, N. (2022). Recent advances in microbial co-culture for production of value-added compounds. *3 Biotech*, 12(5), 115. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03177-4>
- Valgas, C., Souza, S. M., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. Jr. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369–380. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
- van Huis, A. (2020). Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1), 27-44. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0017>
- Vogel, M., & Shah, P. N. (2021). Health of the black soldier fly and house fly under mass-rearing conditions: Innate immunity and the role of the microbiome. *Journal of Insects as Food and Feed*, 8(8), 857–878. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0151>
- Wang, K., Liu, N., Shang, F., Huang, J., Yan, B., Liu, M., & Huang, Y. (2021). Activation of Secondary Metabolism in Red Soil-Derived Streptomycetes via Co-Culture with

Mycolic Acid-Containing Bacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2187.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112187>

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

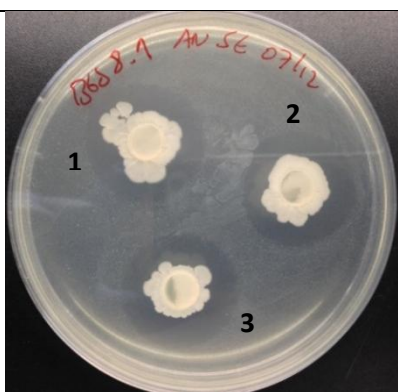
World Health Organization (WHO) & Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). *Laboratory Biosafety Manual* (4th ed.). Geneva: World Health Organization.

Zheng, S., Li, R., Huang, Y., Yang, M., Chen, W., Mo, S., Qi, R., Wang, W., Wan, D., Yin, Y., & Peng, J. (2025). Gut microbiome of black soldier fly larvae for efficient use and purification of organic waste: An environmentally friendly development concept. *The Innovation Life*, 3(2), Article 100134. <https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2025.100134>

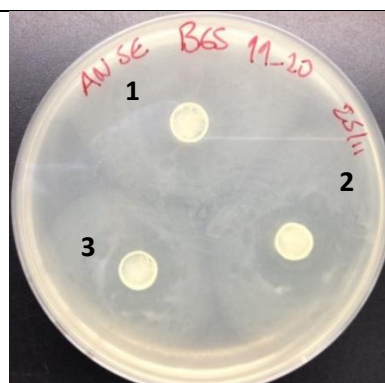
IX. ANEXOS

Anexo A

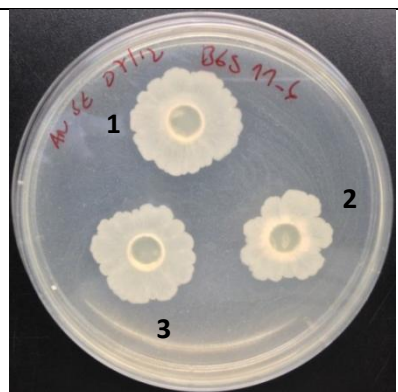
Co-cultivo de las cepas de bacterias previamente aisladas del tracto digestivo de la mosca soldado negra (BSF) activas contra la cepa de referencia de *Salmonella enterica* serovar *Tiphymurium* ATCC 13311



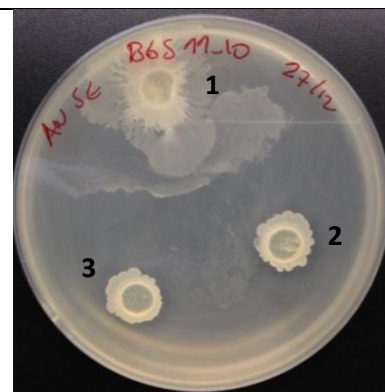
Anexo A1. Cepa BGS 8_1 *Enterococcus faecium* vs. *S. enterica* ATCC 13311. Halo de inhibición: 26 ± 0.33 mm
Diámetro de la Colonia: 16.5 mm



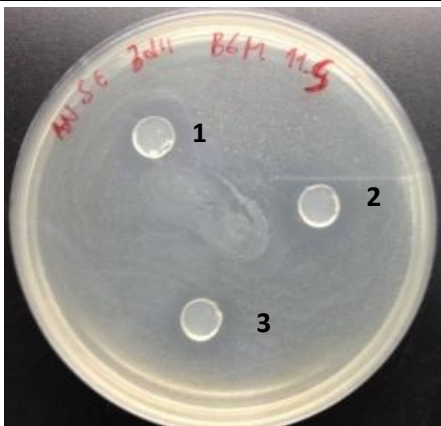
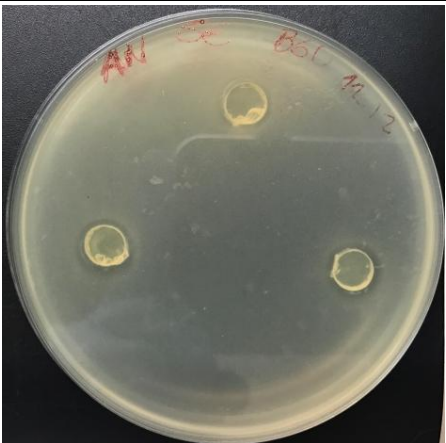
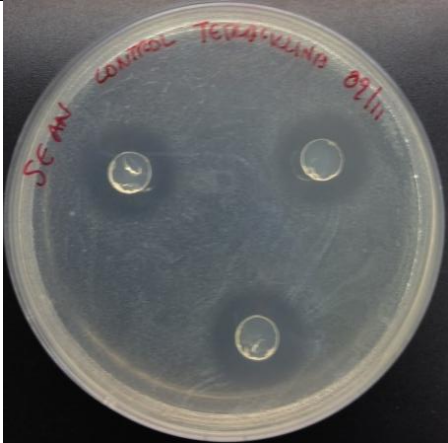
Anexo A2. Cepa BGS 11_20 *Enterococcus* sp vs. *S. enterica* ATCC 13311. Halo de inhibición: 17.33 ± 0.67 mm
Diámetro de la colonia: 8 mm



Anexo A3. Cepa BGS 11_6 *Bacillus amyloliquefaciens* vs. *S. enterica* ATCC 13311. Halo de inhibición: 24.67 ± 1.2 mm



Anexo A4. Cepa BGS 11_10 *Bacillus amyloliquefaciens* vs. *S. enterica* ATCC 13311. Halo de inhibición: 17.75 ± 0.2 mm

Diámetro de la colonia: 22 mm	Diámetro de la colonia: 14.5 mm
 Anexo A5. Cepa BGS 11_18 <i>Providencia stuartii</i> vs. <i>S. enterica</i> ATCC 13311. Halo de inhibición: 12.33 ± 0.33 mm Diámetro de la colonia: 8 mm	 Anexo A6. Cepa BGM 11_5 <i>Enterococcus faecium</i> vs. <i>S. enterica</i> ATCC 13311. Halo de inhibición: 15.33 ± 0.33 mm Diámetro de la colonia: 8 mm
 Anexo A7. Cepa BGU 11_12 <i>Enterococcus</i> sp vs. <i>S. enterica</i> ATCC 13311. Halo de inhibición: 9.92 ± 0.36 mm Diámetro de la colonia: 8 mm	 Figura A8. Tetraciclina vs. <i>S. enterica</i> ATCC 13311. Halo de inhibición: 17.83 ± 0.17 mm Diámetro de la colonia: 8 mm

Anexo B

Ficha de registro de co-cultivo de las bacterias previamente aisladas de la mosca soldado negra Hermetia illucens con Salmonella enterica serovar Typhimurium ATCC 13311

N°	Código	Especie previamente aislada de la mosca <i>H. illucens</i>	Tinción Gram / Forma		Diámetro del halo de inhibición (mm)	SD	Diámetro de la colonia (mm)	PA	SD
1	BGS 8_1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	Bacilos	26	0.33	16.5	1.58	0.05
2	BGS 8_2	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
3	BGS 8_3	<i>Proteus mirabilis</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
4	BGS 8_4	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
5	BGS 8_6	<i>Providencia rettgeri</i>	v	Bacilos	---	---	---	---	---
6	BGS 8_7	<i>Enterococcus sp</i>	v	Bacilos	---	---	---	---	---
7	BGS 8_8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	Cocobacilos	---	---	---	---	---

8	BGS 11_2	<i>Providencia rettgeri</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
9	BGS 11_3	<i>Escherichia fergusonii</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
10	BGS 11_4	<i>Escherichia fergusonii</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
11	BGS 11_5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
12	BGS 11_6	<i>Enterococcus sp</i>	+	Bacilos	24.67	1.2	22	1.12	0.01
13	BGS 11_7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
14	BGS 11_8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
15	BGS 11_10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	Bacilos	17.75	0.2	14.5	1.22	0.03
16	BGS 11_11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
17	BGS 11_12	<i>Proteus mirabilis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
18	BGS 11_13	<i>Proteus mirabilis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
19	BGS 11_14	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
20	BGS 11_15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
21	BGS 11_16	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
22	BGS 11_17	<i>Escherichia fergusonii</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
23	BGS 11_18	<i>Providencia stuartii</i>	-	Bacilos	12.33	0.33	8	1.54	0.04

24	BGS 11_19	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	+	Bacilos vacuolados	---	---	---	---	---
25	BGS 11_20	<i>Enterococcus sp</i>	+	Cocobacilos	17.33	0.67	8	2.17	0.08
26	BGS 11_21	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
27	BGS 11_22	<i>Bacillus subtilis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
28	BGS 11_23	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
29	BGS 11_24	<i>Bacillus subtilis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
30	BGU 11_1	<i>Morganella morganii</i>	+	Cocobacilos	---	---	---	---	---
31	BGU 11_2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
32	BGU 11_3	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
33	BGU 11_4	<i>Enterococcus sp</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
34	BGU 11_5	<i>Ignatzschineria indica</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
35	BGU 11_6	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
36	BGU 11_7	<i>Paenibacillus lactis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
37	BGU 11_8	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
38	BGU 11_9	<i>Ignatzschineria indica</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---

39	BGU 11_10	<i>Enterococcus sp</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
40	BGU 11_11	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
41	BGU 11_12	<i>Enterococcus sp</i>	+	Bacilos	9.92	0.36	8	1.24	0.04
42	BGU 11_13	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
43	BGU 11_14	<i>Escherichia fergusonii</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
44	BGM 11_1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
45	BGM 11_2	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
46	BGM 11_3	<i>Lysinibacillus macroides</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
47	BGM 11_4	<i>Vagococcus fluvialis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
48	BGM 11_5	<i>Enterococcus faecium</i>	+	Cocos	15.33	0.33	8	1.92	0.04
49	BGM 11_6	<i>Morganella morganii</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
50	BGM 11_7	<i>Morganella morganii</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
51	BGM 11_8	<i>Morganella morganii</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
52	BGM 11_9	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
53	BGM 11_10	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
54	BGM 11_11	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---

55	BGM 11_12	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cocobacilos	---	---	---	---	---
56	BGM 11_13	<i>Morganella morganii</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
57	BGM 11_14	<i>Lysinibacillus macroides</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
58	BGM 11_15	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	Cocos	---	---	---	---	---
59	BGM 11_16	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
60	BGM 11_17	<i>Oceanobacillus caeni</i>	v	Cocos	---	---	---	---	---
61	BGM 11_18	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
62	BGM 11_19	<i>Providencia stuartii</i>	-	Bacilos	---	---	---	---	---
63	BGM 11_20	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
64	BGM 11_21	<i>Providencia rettgeri</i>	-	Bacilos ovalados	---	---	---	---	---
65	BGM 11_22	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cocos	---	---	---	---	---
66	BGM 11_23	<i>Paenaltcaligenes suwonensis</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
67	BGM 11_24	<i>Enterococcus sp</i>	+	Bacilos	---	---	---	---	---
	Control (Tetraciclina)			---	17.83	0.17	8	2.23	0.02

Nota: V: tinción Gram variable; +: Tinción Gram positiva; -: Tinción Gram Negativa; ---: no se generó halo de inhibición; SD: Desviación estándar;

PA: Potencial antimicrobiano