

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES NATURALES Y Salmonella typhimurium EN LARVAS DE MOSCAS SOLDADO NEGRA (Hermetia illucens) MEDIANTE TRATAMIENTOS DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA HHP

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO:
Pedro Salvatierra Contreras

TUTOR ACADEMICO:
Dr. Antonio Martínez López

COTUTORA EXTERNA:
Dra. Dolores Rodrigo Aliaga

DIRECTOR EXPERIMENTAL:
MSc. Cuauhtemoc Marín Martínez

Curso Académico: 2016 - 2017

VALENCIA, 04 DE JULIO DE 2017

INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES NATURALES Y *Salmonella typhimurium* EN LARVAS DE MOSCAS SOLDADO NEGRA (*Hermetia illucens*) MEDIANTE TRATAMIENTO DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA.

Salvatierra, P.; Martínez, A¹.; Rodrigo, D¹.; Marín C¹.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue llevar a cabo la caracterización microbiológica de larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), y la inactivación mediante altas presiones hidrostáticas de los microorganismos contaminantes naturales y *Salmonella typhimurium* inoculada en larvas de *Hermetia illucens*. La caracterización microbiológica indicó que las larvas contenían una alta carga de contaminación en bacterias aerobio mesófilas y enterobacterias. La presencia de microorganismos patógenos varió, mientras que no se encontró *Listeria spp* ni *Clostridium botulinum* o *perfringens* se detectaron *Salmonella* y *E. coli* en el extracto de larvas.

La alta presión fue eficaz contra la *Salmonella* y las bacterias aerobias mesófilas, pero se logró una baja reducción de la carga de mohos y levaduras. Cuando las larvas fueron inoculadas con *Salmonella typhimurium*, el nivel de inactivación varió según la intensidad de presión aplicada. A 350 MPa durante 15 minutos se logró una inactivación completa en el número de células viables. En conclusión, la aplicación de alta presión hidrostática parece ser una tecnología elegible para matar algunos microorganismos patógenos en productos de insectos y derivados.

PALABRAS CLAVES: Larva de mosca soldado negra, inactivación, *Salmonella typhimurium*, alta presión hidrostática.

RESUM

L'objectiu d'aquesta investigació va ser realitzar la caracterització microbiològica de larves de mosca soldat negra (*Hermetia illucens*) a més a més es va dur a terme l'intent d'inactivar els microorganismes contaminants naturals i *Salmonella typhimurium* inoculada en larves de *Hermetia illucens* mitjançant l'ús d'alta pressió hidrostàtica. La caracterització microbiològica va indicar que les larves contenien un alta carga de contaminació en bactèries aeròbies mesòfiles i enterobactèries. La presència de

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna (Valencia), España.

microorganismes patògens va variar mentre que no es va trobar *listeria spp ni clostridium –botilnum* o *perfringens* es varen detectar *Salmonella* i *E coli* al extracte de larves.

L'alta pressió va ser eficaç amb *Salmonella* però es va aconseguir una baixa reducció de la carga de mohos i levadures. Quan les larves van ser incloses amb *Salmonella typhimurium* el nivell d'inactivació va variar segon la intensitat de pressió aplicada. A 350 Mpa durant 15 minuts es va aconseguir una inactivació completa en el número de cèlules viables.. En conclusió, l'aplicació d'alta pressió hidrostàtica sembla ser una tecnologia triable per a matar alguns microorganismes patògens en productes d'insectes i derivats.

PALABRES CLAU: Larva de mosca soldado negra, inactivació, *Salmonella typhimurium*, alta pressió hidrostàtica.

ABSTRACT

The objective of this research was to carry out the microbiological characterization of black soldier larvae (*Hermetia illucens*), and the inactivation by high hydrostatic pressures of the natural contaminating microorganisms and *Salmonella typhimurium* inoculated in larvae of *Hermetia illucens*. Microbiological characterization indicated that the larvae contained a high contamination load on aerobic mesophilic bacteria and Enterobacteriaceae. The presence of pathogenic microorganisms varied; while no *Listeria spp* or *Clostridium botulinum* or *perfringens* were found *Salmonella* and *E. coli* were detected in larvae extract.

High pressure was effective against *Salmonella* and mesophilic aerobic bacteria, but a low reduction of mold and yeast load was achieved. When the larvae were inoculated with *Salmonella typhimurium*, the level of inactivation varied according to the applied pressure intensity. At 350 MPa for 15 minutes complete inactivation was achieved in the number of viable cells. In conclusion, the application of hydrostatic high pressure seems to be an eligible technology to kill some pathogenic microorganisms in products of insects and derivatives.

KEY WORDS: Black soldier fly larva, Inactivation, *Salmonella typhimurium*, High Hydrostatic Pressure.

INTRODUCCIÓN

Las tendencias predicen un aumento constante de la población para llegar a nueve mil millones de personas en 2050 obligando a un incremento en la producción de alimentos y piensos que pueden afectar a los ecosistemas agrícolas lo que resulta en una presión aún mayor sobre el medio ambiente que la actual (Van Huis et al., 2013). Esto está creando una demanda cada vez mayor de alimentos y colocando así una presión sustancial sobre la industria alimentaria para proveer a la población humana (Dar y Gowda, 2013). La consecuencia será la escasez de tierra para el cultivo, el agua, los bosques, la pesca, los recursos de la biodiversidad, así como los nutrientes y las energías no renovables (Van Huis et al., 2013).

El reto de alimentar a la población mundial sólo puede ser resuelto mediante un aumento de la producción agrícola mundial del 70 al 100% para el año 2050 (Bruinsma, 2009). Este aumento de la producción requiere la mejora de la eficiencia y rentabilidad de los sistemas de producción de alimentos con un efecto mínimo sobre el medio ambiente (Berg et al., 2013). Por lo tanto, es necesario mejorar la utilización de recursos limitados, como la tierra y el agua, y se debe investigar extensamente sistemas de producción sostenibles para contrarrestar los efectos adversos del cambio climático para proporcionar y sostener la disponibilidad de alimentos a nivel global. (Dar y Gowda, 2013)

Las predicciones anteriores centran el foco en los insectos como una fuente potencial de proteínas para el consumo animal o humano. El uso de insectos comestibles como fuente sostenible de proteínas ha sido promovido recientemente por la FAO, ya que los insectos comestibles siempre han sido parte de la dieta humana que representa aproximadamente 2.000 especies comestibles (Van Huis et al., 2013). Los insectos tienen altas eficiencias de conversión alimenticia y actúan como biotransformadores, convirtiendo los residuos orgánicos en larvas, prepupas y pupas de alto valor nutricional (Diener et al., 2009).

Los insectos son una fuente potencial para la producción convencional (mini-ganado) de proteínas, ya sea para consumo humano directo, o indirectamente en nuevos alimentos elaborados a partir de proteínas de insectos; y como una fuente de proteína en la mezcla de materias primas para piensos (Van Huis et al., 2013; Halloran et al., 2016). Los alimentos a base de insectos tienen un elevado contenido en proteínas (30-80%), grasas (14-50%) y en algunos minerales, y las variaciones en la composición están correlacionadas con la edad del insecto cuando se produce su recolección (Calvert y Martin, 1969, Inaoka et al., 2008, Aniebo et al., 2008), método de secado (Fasakin et al., 2003) y sustrato de alimentación de larvas (Pieterse, 2014).

Los insectos comestibles generalmente se cocinan en agua salada, se secan en grandes superficies o se asan ligeramente antes del consumo (Viesca y Romero, 2009). La industria actual de procesamiento de insectos ha comenzado a ofrecer productos secos utilizando técnicas convencionales

o de liofilización (Grabowski y Klein, 2016). Sin embargo, en Europa las autoridades sanitarias aconsejan que estos insectos se calienten convenientemente antes del consumo. Los insectos crudos se caracterizan por tener un elevado número de bacterias y hongos (Grabowski y Klein, 2014). Los insectos están a menudo contaminados en el exterior y en su tracto intestinal y ni las técnicas convencionales o de liofilización que se aplican parecen ser totalmente efectivas contra los microorganismos ya que estos continúan contaminando en gran número el producto procesado (Klunder et al., 2014).

Se debe considerar la inactivación microbiana para garantizar la seguridad del producto, preservando al mismo tiempo su valor nutricional. Se podrían aplicar diferentes métodos de conservación (por ejemplo, UV, pH, alta presión) para eliminar posibles microorganismos patógenos. *Salmonella* es el microorganismo patógeno que más toxiinfecciones alimentarias produce, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Flores, 2003) y puede encontrarse en el material de alimentación utilizado en la cría de insectos.

Entre los posibles insectos que se utilizan como fuente de proteínas, las larvas de la mosca soldado negra *Hermetia illucens* son un organismo muy eficiente que puede utilizarse en el manejo de desechos orgánicos (Sheppard et al 1994). La prepupa se puede utilizar en la alimentación animal porque tiene un alto contenido de grasa y proteínas 30% y 40% respectivamente (St-Hilaire et al 2007). Sin embargo, una de las principales preocupaciones en su sistema de alimentación es la higiene de las prepupas y el compost producido (Lalander et al., 2014).

La alta presión hidrostática (HPP) es una de las tecnologías de conservación no térmica más populares ya que permite la inactivación de microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos con cambios mínimos en su textura, color y sabor (Torres et al., 2005; Velazquez et al., 2002; Cheftel, 1995; Knorr, 1993). Se ha demostrado que la utilización de HPP permite obtener cinco reducciones decimales en patógenos importantes para la conservación de los alimentos, incluyendo *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Mackey et al., 1994; Metrick et al., 1989; Patterson et al., 1995; Stewart et al., 1997; Styles et al., 1991; Téllez-Luis et al., 2001).

Rumpold et al (2014) realizaron algunos estudios para evaluar el impacto del plasma frío, la alta presión hidrostática y los tratamientos térmicos en la superficie microbiana de las larvas de *Tenebrio molitor*. Los resultados indicaron que la alta presión hidrostática a 600 MPa y los tratamientos térmicos en un baño de agua a 90°C produjeron la reducción más alta en el recuento total. En consecuencia, la tecnología de alta presión hidrostática también puede utilizarse para reducir la carga microbiana de los insectos antes de utilizarla como alimento y pienso.

El propósito general de este estudio fue llevar a cabo la caracterización microbiológica de *Hermetia illucens* y evaluar la inactivación de microorganismos contaminantes naturales e inoculados de *Salmonella*, con el fin de valorar la utilidad de la Alta Presión Hidrostática (HPP) en el control

de microorganismos patógenos que potencialmente pueden contaminar las larvas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

LARVAS

Las larvas fueron suministradas por (BioFlyTech S.L. Alicante, España), Las larvas de mosca soldado negra se criaron utilizando residuos vegetales como sustrato. Estas se recogieron y congelaron durante 1h y luego se secaron a 50°C (Figura 1).



FIGURA 1. Larva de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*)

Caracterización microbiológica

Para cada determinación se homogeneizaron 10 g \pm 0,1 g de muestra con 90 ml de agua de peptona estéril (Scharlab, S.L., Barcelona, España) las muestras constituidas por la mezcla larva-agua se transfirieron a bolsas de stomacher (Interscience[®], Saint Nom, Francia) a las que se añadieron 9 ml de agua de peptona estéril al 0,1% y se colocaron durante durante 3 min en el Stomacher (IUL S.A., Barcelona, España). Los microorganismos analizados y los métodos utilizados se detallan a continuación (Tabla 1).

inactivación, se. Finalmente, las bolsas que contenían larvas no inoculadas e inoculadas se sellaron al vacío y se introdujeron en la cámara de alta presión hidrostática para realizar los diversos tratamientos.

Alta presión hidrostática

Se realizaron diversos tratamientos de alta presión hidrostática en una unidad piloto (Engineered Pressure Systems International N.V. (EPSI). Temse, Bélgica) con una cámara de operación de 2,35 L y una presión máxima de tratamiento de 600 MPa (Figuras 2). El fluido transmisor de presión era una mezcla de agua y etilenglicol (70:30% (v /v)). Las muestras se presurizaron a 300, 325 y 350 MPa para tiempos específicos en un intervalo de 0 a 15 min a temperatura ambiente (18-30°C). La velocidad de aumento de presión fue de 300 MPa/min y el tiempo de despresurización fue inferior a 1 min. El tiempo de tratamiento descrito en este estudio no incluye los tiempos de aumento y descenso de la presión.

Todos los tratamientos se aplicaron por duplicado con dos bolsas por réplica. Para evitar fugas durante el tratamiento a altas presiones, cada bolsa de muestra se colocó en una bolsa más grande de un plástico de cloruro de polivinilo de 8 milésimas de espesor (McMaster-Carr, Elmhurst, IL) y se sellaron térmicamente. Después de completar el tratamiento, las muestras se retiraron del recipiente e inmediatamente se almacenaron en refrigeración ($3\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta la realización de los análisis. En todos los casos se utilizaron bolsas inoculadas no presurizadas como control de la carga microbiológica inicial.



FIGURA 2. Procesador de alimentos de alta presión

Enumeración de microorganismos

Las bolsas que contenían las larvas tratadas se cortaron asépticamente. Las muestras constituidas por la mezcla larva-agua se transfirieron a bolsas de stomacher a las que se añadieron 9 ml de agua de peptona estéril al 0,1% y posteriormente se llevaron al stomacher durante 3 min. Se realizaron diluciones decimales en serie de las muestras tratadas y los controles en agua de peptona estéril al 0,1% y se procedió a sembrar en profundidad por duplicado.

Los medios de enumeración utilizados para las células viables fueron Agar de Triptona y Soya (TSA) (Scharlab, S.L., Barcelona, España) y Agar de Patata y Dextrosa (PDA) (Scharlab, S.L., Barcelona, España). Las diluciones seleccionadas se incubaron a 37°C durante 24 h para *Salmonella*, 30°C durante 72 h para aerobios mesófilos y 25° C durante 5 días para mohos y levaduras. La reducción de células viables se expresó como el logaritmo decimal del cociente de las células tratadas y no tratadas.

Análisis Estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics® Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microbiológica

Se observó recuentos altos para las bacterias aerobias mesófilas (5.28 ± 0.054 log UFC/g), anaerobios totales (5.63 ± 0.16 log UFC/g), mohos y levaduras (5.19 ± 0.03 log UFC/g) y enterobacterias (4.29 ± 0.12 log UFC/g). Resultados similares fueron descritos por otros autores en larvas de mosca soldado (Jeon et al 2011). Al mismo tiempo, los recuentos de microorganismos patógenos variaron. Si bien no se encontró *Listeria spp* ni *Clostridium* sulfito-reductores se detectaron *Salmonella* (4.04 ± 0.18 log UFC/g) y *E. coli* (3.84 ± 0.11 log UFC/g) en el extracto de larvas, por lo que se necesitarán tratamientos de preservación para garantizar la inocuidad de las larvas y sus derivados en relación con estos patógenos.

Es necesario tener en cuenta que las larvas de *Hermetia illucens* pueden crecer en una amplia variedad de materiales de desecho. Las larvas utilizadas en este estudio se criaron utilizando desechos mixtos de vegetales ricos en celulosa como sustrato, contaminados probablemente con altos recuentos de mohos y levaduras, así como esporas que pueden contribuir a los altos recuentos de las bacterias aerobias mesófilas totales y anaerobios totales (Tabla 2).

Si comparamos el resultado de aerobios mesófilos y mohos y levaduras con el valor a tiempo cero de los estudios de inactivación vemos que difieren aproximadamente en dos ciclos logarítmicos puesto que las muestras procedían de bolsas diferentes como se indicó en la preparación de

muestras para estudios de inactivación esto nos da una idea de la heterogeneidad de los niveles de contaminación microbiológica que puede encontrarse en este tipo de productos. Probablemente estas diferencias en los niveles de contaminación dependan del tipo de sustrato con que se han criado las larvas.

TABLA 2. Caracterización microbiológica en log UFC/g de larvas secas

Microorganismo	Recuento (log UFC/g)
Aerobios mesófilos	5.28±0.054
Enterobacterias	4.29±0.12
<i>E.coli</i>	3.84±0.11
<i>Salmonella spp</i>	4.04±0.18
<i>Listeria spp</i>	Nd
Anaerobios totales	5.63±0.16
Clostridium sulfito-reductores	Nd
Mohos y levaduras	5.19±0.03

Nd= No detectado

Tratamientos a alta presión sobre la contaminación natural presente en la larva

El logaritmo de superviviente de mohos y levaduras mostró una reducción cercana a 0.55 y 0.66 ciclos logarítmicos aplicando una presión de 300 y 325 MPa durante un tiempo máximo de 7 min respectivamente (Figuras 3 y 4).

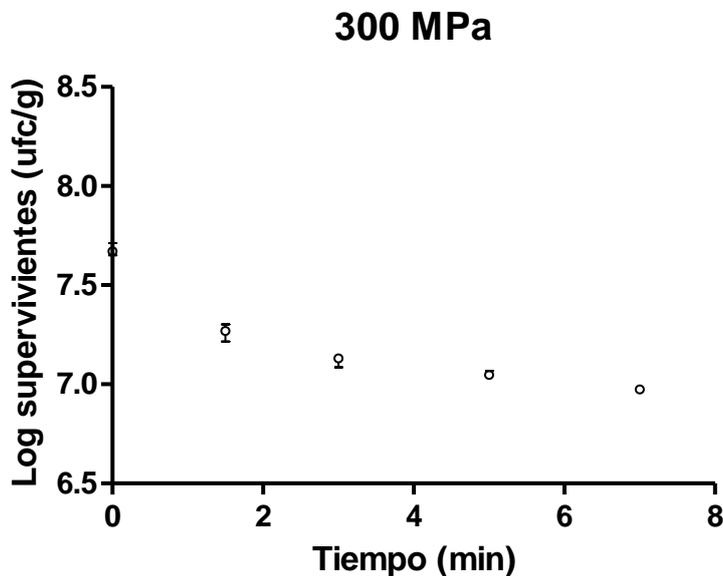


FIGURA 3. Curva de supervivencia de mohos y levaduras a 300 MPa de presión.

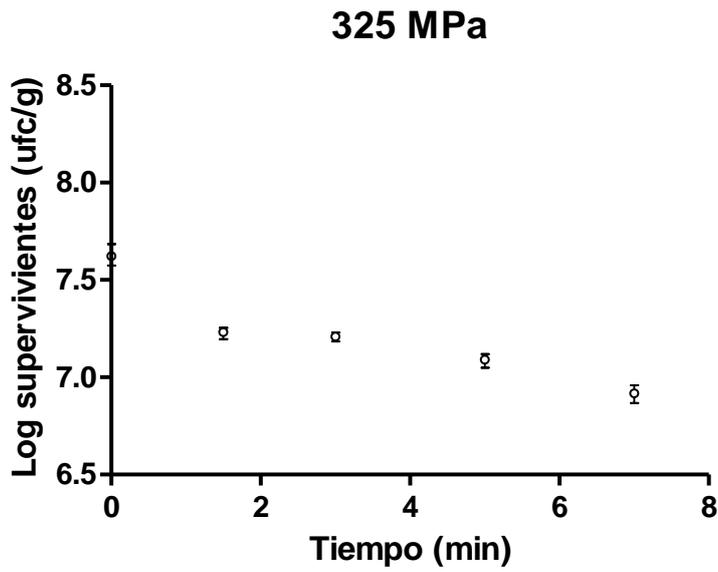


FIGURA 4. Curva de supervivencia de mohos y levaduras a 325 MPa de presión.

En las mismas condiciones, la reducción alcanzada para los conteos de bacterias aerobias mesófilas fue de aproximadamente 0.6 y 1 ciclos logarítmicos respectivamente (Figuras 5 y 6).

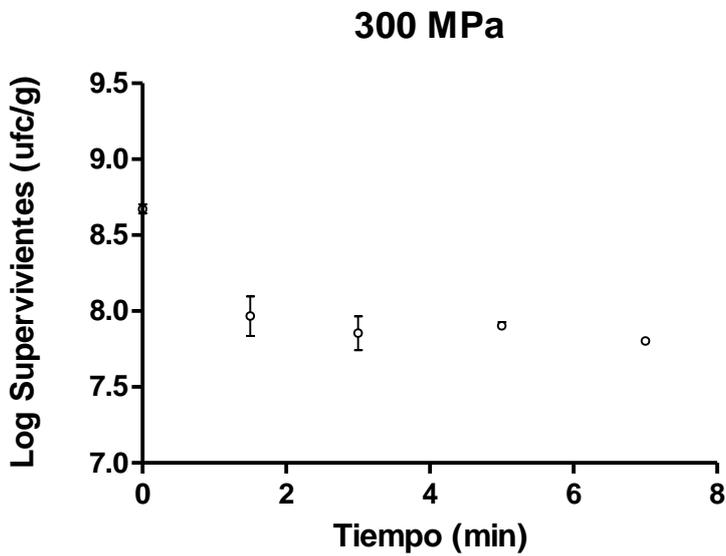


FIGURA 5. Curva de supervivencia de aerobios mesófilos a 300 MPa de presión.

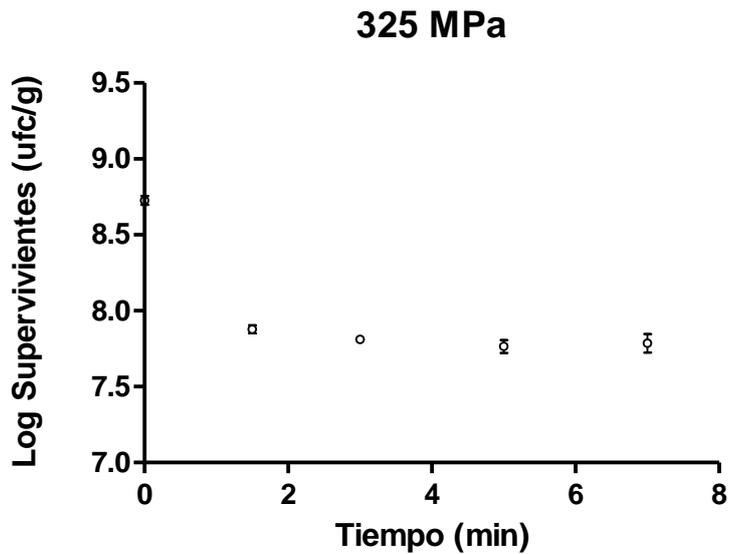


FIGURA 6. Curva de supervivencia de aerobios mesófilos a 325 MPa de presión.

Los niveles de inactivación tanto para aerobios mesófilos así como para mohos y levaduras aumentaron a medida que aumentaba la presión y el tiempo. El tratamiento a 350 MPa durante 7 min logró una reducción aproximada de 3.2 ciclos logarítmicos para el caso de las bacterias aerobias mesófilas, mientras que aplicando la misma presión durante 15 min se consiguió la inactivación completa en el número de células viables (Figura 7) y la reducción de aproximadamente 1 ciclo logarítmico en mohos y levaduras (Figura 8).

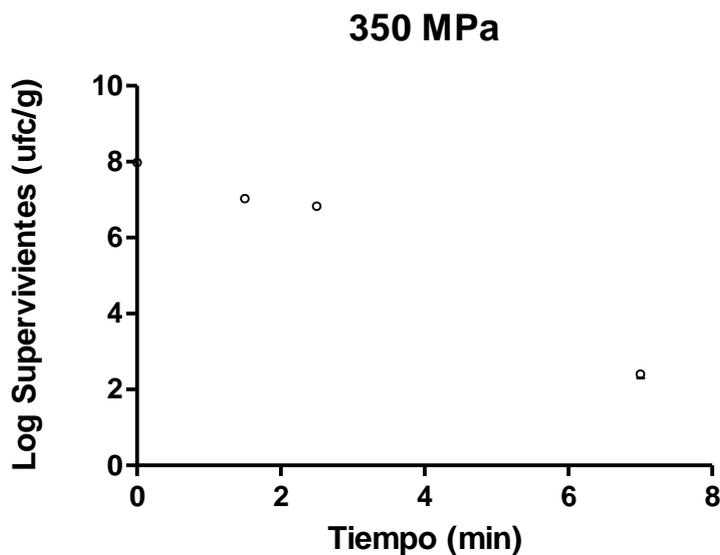


FIGURA 7. Curva de supervivencia de aerobios mesófilos a 350 MPa de presión.

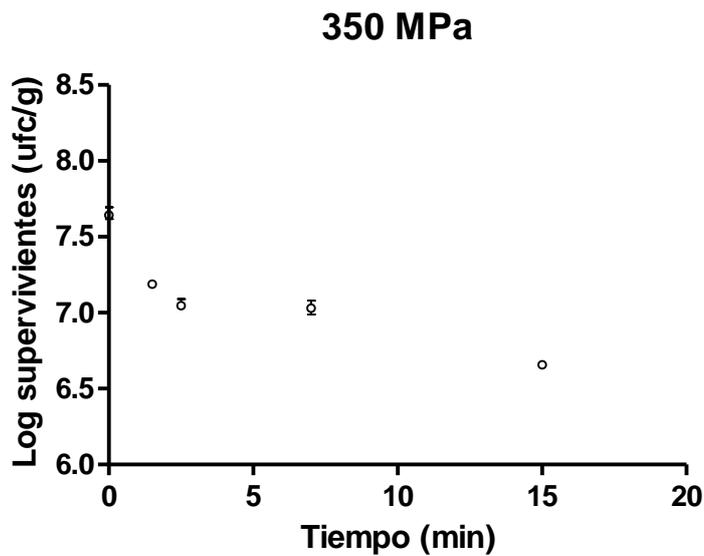


FIGURA 8. Curva de supervivencia de mohos y levaduras a 350 MPa de presión.

Se reportaron resultados similares para mohos y levaduras en jamón serrano. (Martínez-Onandi et al., 2017), donde se produjo una reducción de aproximadamente 1.02 ciclos logarítmicos después de un tratamiento a 600 MPa por 6 min. Por lo tanto, el tratamiento a 350 MPa es suficiente para controlar eficazmente los aerobios mesófilos presentes en la larva, no obstante se demuestra que bajo las mismas condiciones no es capaz de logra una reducción significativa de ciclos logarítmicos en los mohos y levaduras. Daryaei et al (2008) también han informado que las presiones para inactivar la mayoría de la levadura en el queso como fuente de proteína fueron de hasta 600 MPa.

Efecto de la alta presión sobre la larva inoculada con *Salmonella typhimurium*

Se obtuvo una reducción de 2.5 ciclos logarítmicos aplicando una presión de 300 MPa durante 7 min (Figura 9) y de 3.5 ciclos logarítmicos aplicando una presión de 325 MPa durante 7 minutos (Figura 10). (Neeto et al., 2011), reportaron una reducción de *Salmonella* en cebollas verdes similar a la obtenida en el presente estudio; por ejemplo, con un tratamiento de 300 MPa durante 2 min alcanzaron una reducción de 2.4 ciclos logarítmicos.

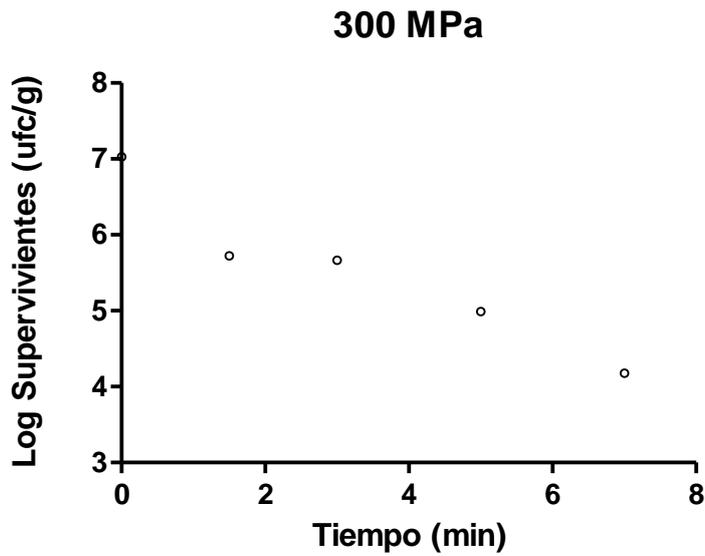


FIGURA 9. Curva de supervivencia para *Salmonella typhimurium* a 300 MPa de presión.

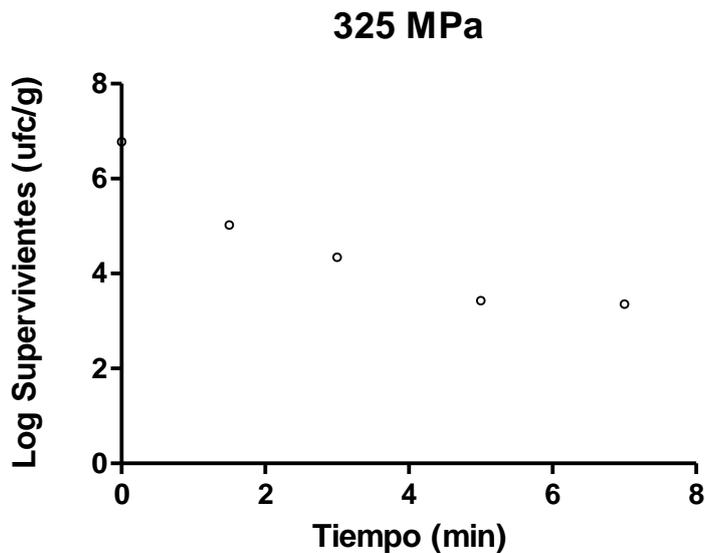


FIGURA 10. Curva de supervivencia para *Salmonella typhimurium* a 325 MPa de presión.

El nivel de inactivación de *Salmonella typhimurium* alcanzado aumentó sustancialmente a medida que aumentaba la presión (Figura 11). El tratamiento a 350 MPa durante 7 min logró una reducción de 5 ciclos logarítmicos mientras que aplicando la misma presión durante 15 min se consiguió la inactivación completa en el número de células viables.

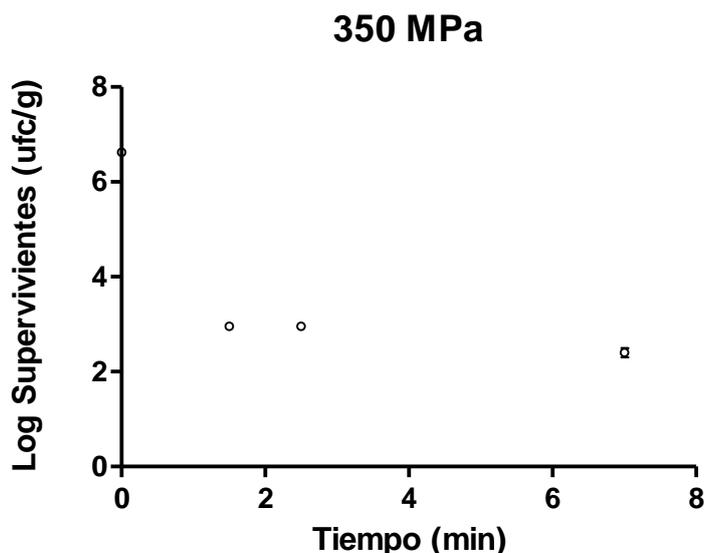


FIGURA 11. Curva de supervivencia para *Salmonella typhimurium* a 350 MPa de presión.

Patterson (2005) mostró que un tratamiento a presión de 350 MPa y 15 min a 20 ° C redujo *Salmonella typhimurium* en 5 ciclos logarítmicos. (Neeto y Chen, 2010), demostraron que el tratamiento a 350 MPa por 5 min eliminó completamente una carga de 5 ciclos logarítmicos de *Salmonella* en semillas de alfalfa. En el presente trabajo se consiguió una inactivación completa en el número de células viables de *Salmonella typhimurium* presente en las larvas después del tratamiento a 350 MPa durante 15 min.

Para ninguna de las presiones estudiadas (250, 300 y 350 MPa) la curva de inactivación siguió una línea recta, esto significa que los resultados no pueden analizarse usando un modelo logarítmico lineal como el modelo de Bigelow, por lo que sería necesario incrementar el número de puntos para poder utilizar un modelo no lineal como el modelo de Weibull utilizado con éxito para este microorganismo en otros sustratos (Rodrigo et al., 2003).

CONCLUSIONES

En conclusión, puede decirse que, debido a la contaminación que presentan las larvas de mosca soldado con *E.coli* y *Salmonella* se deben tomar algunas medidas de control antes de usarlo como una fuente de proteína. Es importante decir que no se observó contaminación por *Listeria monocytogenes* en este estudio, dicho microorganismo puede contaminar fundamentalmente las líneas de procesamiento y producir la recontaminación de los productos alimenticios.

Con el uso de técnicas modernas o métodos tradicionales (liofilización, ebullición, secado al sol o tostado) para aumentar la vida útil de los insectos comestibles, los microorganismos no se matan y tampoco se obtienen suficientes reducciones microbianas y cuando se rehidratan, muchos

vuelven a los estadios vegetativos, esto significa que bajo el punto de vista de la inocuidad de los alimentos, pueden surgir problemas si no se da un proceso de cocinado posterior adecuado antes de comerlos. Por otro lado, algunos métodos basados en calor pueden penalizar el valor nutricional de los insectos comestibles, así como las propiedades sensoriales. Debido a todo esto, la alta presión hidrostática puede ofrecer una oportunidad para reducir la carga de microorganismos patógenos a niveles lo suficientemente bajos sin afectar las propiedades nutricionales o sensoriales del producto.

No obstante y teniendo en cuenta los resultados obtenidos sería conveniente llevar a cabo estudios adicionales incrementando el nivel de presión y aumentando el número de puntos de las curvas de supervivencia.

AGRADECIMIENTO

El autor del presente trabajo agradece al Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), por las facilidades brindadas para la realización del mismo.

REFERENCIAS

- Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Ray, B. 2000. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, **60(1)**: 33-42.
- Aniebo, A.O; Erundu, E.S; Owen, O.J. 2008. Proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica*) meal generated from mixture of cattle blood and wheat bran. *Livestock Research for Rural Development*, **20(205)**:1-5.
- Berg, A.; De Noblet-Ducoudré, N.; Sultan, B.; Lengaigne, M.; Guimberteau, M. 2013. Projections of climate change impacts on potential C4 crop productivity over tropical regions. *Agricultural and Forest Meteorology*, **170(13)**: 89-102.
- Bruinsma, J., 2009. The resource outlook to 2050: by how much land, water and crop yields need to increase by 2050? Paper presented at the FAO Expert Meeting on "How to Feed the World in 2050". Food and Agricultural Organization of the United Nations, [en línea]. Rome: 24 al 26 de Junio de 2009. Dirección URL: <<ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/ResourceOutlookto2050.pdf>>. [Consulta: 16 Mar. 2017].
- Calvert, C. C.; Martin, R. D. 1969. Housefly pupae as food for poultry. *Journal of Economic Entomology*. **62(4)**: 938-939.
- Cheftel, J. C. 1995. High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, **1(2-3)**:75-90.
- Dar, W. D.; Gowda, L. C. 2013. Declining agricultural productivity and global food security. *Journal of Crop Improvement*, **27(2)**: 242-254.
- Daryaei, H.; Coventry, M. J.; Versteeg, C.; Sherkat, F. 2008. Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9(2)**: 201-205.
- Diener, S.; Zurbrugg, C.; Tockner, K. 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research*, **27(6)**: 603-610.
- Fasakin, E. A.; Balogun, A. M; Ajayi, O. O. 2003. Evaluation of full-fat and defatted maggot meals in the feeding of clariid catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *Aquaculture Research*, **34(9)**: 733- 738.

- Flores, L. 2003. Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas en ambientes marinos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Grabowski, N.; Jansen, W.; Klein, G. 2014. Microbiological status of edible insects sold as pet feed in Germany. International Conference Insects to Feed the World, [en línea]. The Netherlands: 14 al 17 de Mayo del 2014. Dirección URL: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Programme_FAO_conference__5_mei_final_V2.pdf.>. [Consulta: 16 Mar. 2017].
- Grabowski, N.; Klein G. 2016. Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. Food Science and Technology International, **23(1)**:17-23.
- Halloran, A.; Roos, N.; Eilenberg, J.; Cerutti, A.; Bruun, S. 2016. Life cycle assessment of edible insects for food protein: a review. Agronomy for Sustainable Development, **(2016)** 36:57.
- Inaoka, T.; Okubo, G.; Yokota, M; Takemasa, M. 2008. Nutritive value of house fly larvae and pupae fed on chicken faeces as food source for poultry. The Journal of Poultry Science. **36(3)**: 174-180.
- Jeon, H.; Park, S.; Choi, J.; Jeong, G.; Sang-Beom, L.; Choi, Y.; Sung-Jae, L. 2011. The Intestinal Bacterial Community in the Food Waste-Reducing Larvae of *Hermetia illucens*. Current Microbiology, **(62) 5**: 1390-1399.
- Klunder, H.C.; Wolkers-Rooijackers, J.; Korpela, J.M.; Nout, M.J.R. 2014. Microbiological aspects of processing and storage of insects. Food Control, **26(2)**: 628-631.
- Knorr, D. 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. Food Technology, **47(6)**: 156-161.
- Lalander, C.H.; Diener, S.; Vinnerås, B. 2014. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Ascaris suum* in batch and continuous black soldier fly treatments. Abstract book Conference "Insects to Feed the World", [en línea]. The Netherlands: 14 al 17 de Mayo del 2014. Dirección URL: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/summary_report_incl_concl_recomm_part_list_jun2014.pdf>. [Consulta: 05 May. 2017].
- Mackey, B.M.; Forestiere, K.; Isaacs, N.S.; Stenning, R.; Brooker, B. 1994. The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. Letters in Applied Microbiology, **19(6)**: 429-432.
- Martínez-Onandia, N.; Castioni, A.; San Martín, E.; Rivas-Cañedo, A.; Nuñez, M.; Torriani, S.; Picon, A. 2017. Microbiota of high-pressure-processed Serrano ham investigated by culture-dependent and culture-independent methods, **16(241)**: 298–307.
- Metric, C.; Hoover, D.G.; Farkas, D.F. 1989. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. Journal of Food Science, **54 (6)**: 1547-1549.
- Neetoo, H.; H, Chen. 2010. Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on artificially contaminated alfalfa seeds using high hydrostatic pressure. ScienceDirect, **27(3)**: 332-338.
- Patterson, M. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. Journal of Applied Microbiology, **98 (6)**:1400-1409.
- Patterson, M.; Quinn, M.; Simpson, R.; Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. Journal of Food Protection, **58(5)**: 524-9.
- Rodrigo, D.; Barbosa-Canovas, G.; Martínez, A.; Rodrigo, M. 2003. Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Echerichia coli* by pulsed electric fields. Journal of Food Protection, **66(6)**: 1007-1012.
- Rumpold, B.; Fröhling, A.; Reineke, K.; Knorr, D.; Boguslawski, S.; Ehlbeck, J.; Schlüter, O. 2014. Comparison of volumetric and surface decontamination techniques for innovative processing of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). Innovative Food Science and Emerging Technologies, **26(14)**: 232-241.
- Sheppard, D.C.; Newton, G.L.; Thompson, S. A., Savage, S. 1994. A value added manure management system using the black soldier fly. Bioresource Technology, **50(3)**: 275-279.

- Stewart, M.F.; Jewett, F.F.; Dunne, C.P.; Hoover, D.G. 1997. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, **17(1)**: 23-36.
- St-Hilaire, S.; Sheppard, C.; Tomberlin, J.K.; Irving, S.; Newton, L.; McGuire, M.A.; Mosley, E.; Hardy, R.W.; Sealey, W. 2007. Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **38(1)**: 59-67.
- Styles, M.F.; Hoover, D.G.; Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, **56(5)**: 1404-1407.
- Téllez-Luis, S. J.; Ramírez, J. A.; Pérez-Lamela, C.; Vázquez, M.; Simal-Gándara, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **3(2)**: 66-80.
- Torres, J.A.; Velazquez, G. 2005. Commercial opportunities & research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, **67(1-2)**: 95-112.
- Van Huis, A.; Van Itterbeeck, J.; Klunder, H.; Mertens, E.; Halloran, A.; Muir, G.; Vantomme, P. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO FORESTRY PAPER 171*. Food And Agriculture Organization of the United Nations, [en línea]. Roma: 2013. Dirección URL: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>>. [Consulta: 05 May. 2017].
- Velazquez, G.; Vázquez, P.; Vázquez, M.; Torres, J. A. 2005. Aplicaciones del procesado de alimentos por alta presión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **4(5)**: 343-352.
- Viesca-González, F.C.; Romero-Contreras, A.T. 2009. La entomofagia en México. Algunos aspectos culturales. *El Periplo Sustentable*, **(16)**: 57-83.