

# Exploración del microbioma intestinal de larvas de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) asociado a una dieta de poliestireno expandido

## Exploration of the intestinal microbiome of *Zophobas morio* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) associated with an expanded polystyrene diet

Luisa María Martínez López<sup>1,2</sup>, Jeison Eduardo García-Ariza<sup>1,3</sup>, Alberto Rojas-Triviño<sup>1,4</sup>, Diana López-Álvarez<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. <sup>2</sup>✉ [lummartinezlo@unal.edu.co](mailto:lummartinezlo@unal.edu.co); <sup>3</sup>✉ [jeigarciaar@unal.edu.co](mailto:jeigarciaar@unal.edu.co); <sup>4</sup>✉ [earojast@unal.edu.co](mailto:earojast@unal.edu.co); <sup>5</sup>✉ [dilopezal@unal.edu.co](mailto:dilopezal@unal.edu.co)



<https://doi.org/10.15446/acag.v72n3.112558>

2023 | 72-3 p 276-284 | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 | Rec.: 2023-01-19 Acep.: 2024-03-22

### Resumen

El poliestireno expandido (EPS) es un polímero sintético de uso común en diferentes industrias y posee una estabilidad molecular que le permite permanecer inmodificable por cientos de años generando un impacto negativo sobre el medio ambiente. Se ha reportado que larvas de coleópteros de la familia Tenebrionidae pueden biodegradarlo gracias a enzimas producidas por su microbiota intestinal. En esta investigación se caracterizó preliminarmente el microbioma intestinal de larvas de *Zophobas morio* alimentadas con poliestireno (PS) y avena, empleando metabarcoding, mediante secuenciación Illumina Miseq de la región V3-4 del gen 16s del ARNr. Con los resultados de la secuenciación se analizó la composición taxonómica y la abundancia relativa de las bacterias, de lo cual se obtuvo que el género *Spiroplasma* fue el más abundante en las dietas de PS y avena, y no se encontraron diferencias en los análisis de diversidad alfa. Sin embargo, se destacó el aumento del género *Pseudarthrobacter* en el microbioma de larvas alimentadas con poliestireno expandido y miembros de la familia Enterobacteriaceae sin asignación taxonómica a nivel de género. La identificación de microorganismos posiblemente asociados a una dieta de poliestireno es el punto de partida de ensayos de caracterización, aislamiento y biorremediación, para la degradación de este material; estos ensayos, además, pueden extenderse a otro tipo de plásticos.

**Palabras clave:** coleópteros, dieta, metabarcoding, poliestireno, *Pseudarthrobacter*.

### Abstract

Expanded polystyrene (EPS) is a synthetic polymer commonly used in different industries. It has a molecular stability that allows it to remain unchanged for hundreds of years, negatively impacting the environment. It has been reported that beetle larvae of the Tenebrionidae family can biodegrade it thanks to enzymes produced by their intestinal microbiota. In this research, the intestinal microbiome of *Zophobas morio* larvae fed with polystyrene (PS) and oat was characterized using metabarcoding, through Illumina Miseq sequencing of the V3-4 region of the 16s rRNA gene. With the results of the sequencing, the taxonomic composition and relative abundance of the bacteria were analyzed, obtaining that the *Spiroplasma* genus was the most abundant for both PS and oat diets; no differences were found in the alpha diversity analyses. However, the increase in the microbiome of expanded polystyrene-fed larvae of the genus *Pseudarthrobacter* and members of the family Enterobacteriaceae without taxonomic assignment at the genus level was highlighted. Microorganism identification possibly associated with the polystyrene diet is the reference for characterization, isolation, and bioremediation tests for the degradation of this material, these tests can be extended to other plastics.

**Keywords:** coleoptera, diet, metabarcoding, polystyrene, *Pseudarthrobacter*.

## Introducción

El plástico está presente en sectores productivos enfocados en la alimentación, textiles, transporte, fármacos, entre otros, debido a su versatilidad en actividades de almacenaje, transporte, embalaje, ensamblaje de estructuras, etc. (Andrady y Neal, 2009). El uso y demanda cotidiana de este material, se ve reflejado en el aumento a nivel mundial de la producción de plásticos, que tuvo, para el año 2021, un reporte de 390,7 millones de toneladas producidas, de las cuales 352,3 millones provienen de origen fósil, lo cual representa un aumento en comparación con años anteriores (Plastics Europe, 2022).

Los plásticos de origen fósil pueden clasificarse en 2 grupos dependiendo de su estructura química principal. El primer grupo engloba los polímeros con estructura heterocíclica y el segundo aquellos con estructura principal carbono-carbono (C-C) (Zhang et al., 2022). Actualmente, los principales plásticos que se producen de ambos grupos son el polietileno de baja densidad (PE-LD), polietileno de alta densidad (PE-HD), policloruro de vinilo (PVC), polietilentereftalato (PET), poliuretano (PUR) y poliestireno (PS) (Danso et al., 2019; Plastics Europe, 2023).

En Colombia, el PS es comercializado por la Industria Colombiana de Porosos (ICOPOR) y se puede hallar de 2 formas, ya sea extruido (XPS) o expandido (EPS); el primero es más denso y forma parte de empaques como las bandejas de frutas en supermercados, el segundo es más liviano y se encuentra en forma de esferas, principalmente para soportar el embalaje de productos delicados. Ambos tipos de poliestireno están compuestos en un 95 % por polímeros de estireno y 5 % de gas, lo que los hace químicamente similares (Xu et al., 2022). Infortunadamente, la versatilidad de este y los otros tipos de plásticos se ha visto opacada por los inconvenientes que se presentan en su manejo o disposición final, debido a que, al estar formado principalmente por cadenas de carbono, estas lo convierten en un material recalcitrante de difícil degradación (ONU, 2018; Zhang et al., 2022).

Las estrategias utilizadas principalmente para el manejo de los desechos plásticos ha sido incineración (12 %), reciclaje (9 %) y disposición en vertederos (79 %) (Geyer et al., 2017); esta última es preocupante debido a que se estima que el 25 % finaliza en los océanos (Jambeck et al., 2015). Además de la problemática ambiental, se suman los efectos que los desechos plásticos pueden causar en la salud humana, debido a que después de determinado tiempo de exposición a distintas variables ambientales, los plásticos de gran volumen se descomponen en microplásticos y se convierten en agentes tóxicos, los cuales se han reportado en alimentos de consumo humano como peces, azúcar, sal, miel, leche, carne de pollo, entre otros (Mamun et al., 2023).

Por otro lado, el PS no se degrada fácilmente, puede permanecer sin cambios en su estructura por largos periodos, entre 100 y 1000 años. Por otro lado, cuando este material se calienta, libera dioxinas y estireno, sustancias que se ha encontrado son cancerígenas en humanos (Zhao et al., 2024). Así mismo, diversos autores sugieren que componentes expansores del PS como el pentano, isopentano o ciclopentano pueden llegar a generar conjuntivitis, dermatitis, cefaleas, náuseas y afecciones en vías respiratorias altas y bajas cuando se inhalan en altas concentraciones (Xu et al., 2022).

En la actualidad, investigadores y la industria han dirigido sus esfuerzos en identificar microorganismos biodegradadores capaces de transformar el PS en dióxido de carbono, metano, compuestos inorgánicos, agua o biomasa (Liu et al., 2023; Tang et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Una de las técnicas para identificar qué microorganismos descomponen el PS se basa en tecnologías del ácido desoxirribonucleico (ADN), y permite evaluar la diversidad microbiana y predecir su función en el ambiente (Gilbert y Dupont, 2011; Lovley, 2003; Marrero-Coto et al., 2010). En este sentido, la metagenómica contribuye en el campo de la biorremediación de ecosistemas contaminados con PS, caracterizando comunidades microbianas taxonómica y funcionalmente con capacidad de degradación de plásticos, mediante marcadores moleculares como el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16s o mediante el uso de secuenciación aleatoria (Gilbert y Dupont, 2011; Lorenz y Eck, 2005).

Desde el año 2015 una estrategia de biodegradación de plásticos es usar larvas de escarabajos de la familia Tenebrionidae para la degradación de desechos plásticos (Yang et al., 2015a, 2015b). Los estudios realizados con *Tenebrio molitor* evidencian que estos materiales pueden ser consumidos, despolimerizados y biodegradados (Yang y Wu, 2020). La capacidad de biodegradación de este insecto, en desechos de poliestireno expandido, está influenciada por el microbioma del tracto digestivo (Yang et al., 2015b) y ha sido asociada a su habilidad natural para consumir lignina (Yang y Wu, 2020), por lo que ha surgido la pregunta de si esta habilidad está presente en otros insectos de la familia Tenebrionidae. Actualmente, existen reportes de consumo de PS por *Tenebrio obscurus* (Peng et al., 2019), *Zophobas atratus* (Yang et al., 2020) y *Zophobas morio* (Choi et al., 2020).

A pesar de los avances, se requiere continuar evaluando el uso de las larvas de estos insectos, haciendo énfasis en los cambios del microbioma tras el consumo de estos materiales, con el fin de encontrar bacterias posiblemente asociadas a la degradación de plásticos. La caracterización de estos microorganismos son el punto de partida en ensayos de aislamiento, inserción génica, entre otros, que prospectivamente permitan el diseño y construcción de biorreactores para la degradación

de estos desechos (Yang *et al.*, 2020). Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue explorar el microbioma del tracto digestivo de larvas de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) luego de consumir poliestireno expandido, en el municipio de Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

## Materiales y métodos

### Cría de insectos

Larvas de *Z. morio* fueron adquiridas en una empresa distribuidora de alimento para peces en el municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. Luego, las larvas fueron transportadas al municipio de Palmira. Allí, las larvas se sometieron a un ayuno de tres días para limpiar el tracto digestivo y se dividieron en dos grupos.

El primer grupo fue alimentado con una dieta a base de avena (control) y el segundo grupo fue alimentado exclusivamente con EPS comercial. Cada grupo consistió en 30 larvas juveniles ubicadas en recipientes de polipropileno (PP) de 25 x 20 x 15 cm (largo, alto y ancho), y alimentadas con las respectivas dietas durante seis meses, a una temperatura y humedad promedio de 25 °C y 70 %, respectivamente, con una exposición de luz de 12 horas. Para evitar la deshidratación de los individuos, cada dos días se adicionaba agua destilada estéril por aspersión a los recipientes y se añadieron trozos de naranja fresca al contenedor de larvas alimentadas con avena.

### Extracción del ADN

Las larvas se trasladaron al laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, donde se les extrajo el tubo digestivo; para este proceso cada larva fue puesta en una caja de Petri y luego llevada a -80 °C (Ultracongelador, marca IGLOO, modelo U-445, referencia 1331652725) durante cinco minutos para bajar su metabolismo. Posteriormente, se realizó un corte a lo largo de la línea lateral que une los terguitos con los esternitos del cuerpo de la larva, desde la región cefálica a la caudal, extrayendo el tubo digestivo. Para extraer entre 250-300 mg de tubos digestivos se emplearon alrededor de cuatro larvas, de lo que se obtuvo un total tres muestras para avena y dos para poliestireno expandido.

El tejido intestinal obtenido fue limpiado con agua destilada estéril, retirando el tejido adiposo adyacente. Posteriormente, fue macerado y procesado utilizando el kit comercial DNAeasy PowerSoil de Qiagen (USA), según las indicaciones del fabricante.

La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, que contenía GelRed (Biotium®). La electroforesis se realizó en tampón TBE 0,5X a 100 V durante 30 minutos,

utilizando una escalera de ADN de 1 kb como marcador de peso molecular (Thermo Scientific) (Tabla S1). La concentración e índices de pureza 260/280 y 230/260 fueron obtenidos con espectrofotómetro para microvolúmenes (Marca Titertek Berthold, modelo Colibrí, referencia 160208, producido en Alemania) (Figura S1). El ADN extraído fue almacenado a -80 °C para su posterior uso.

### Secuenciación masiva

La composición taxonómica y la abundancia de las bacterias presentes en el tubo digestivo de las larvas fue estimada mediante secuenciación de la región V3 - V4 del gen ribosomal 16S. La amplificación empleó los cebadores 341F 5'CCTAYGGGRBGCASCAG3' y 806R 5'GGACTACNNGGGTATCTAAT3'. La secuenciación se realizó en Illumina® MiSeq, con una cobertura de 466 pb, y se obtuvieron en promedio 20 000 lecturas por muestra.

### Análisis bioinformáticos

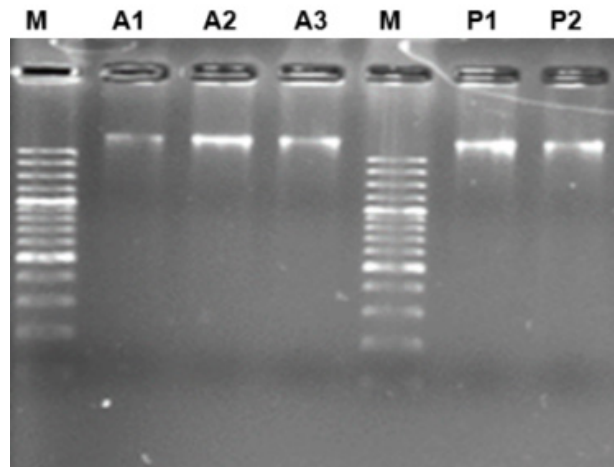
El análisis de los datos de secuenciación del gen 16S rRNA, tuvo el siguiente flujo: el control de calidad y solapamiento de lecturas complementarias (*merging*) se realizó a través de la plataforma QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019), haciendo uso del plugin DADA2 (Callahan *et al.*, 2016); igualmente, se realizó asignación taxonómica utilizando el clasificador entrenado de la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013). Las lecturas fueron normalizadas, tras realizar curva de rarefacción, mediante la técnica de escalamiento y submuestreo clasificado SRS (*scaling with ranked subsampling*, por sus siglas en inglés) (Beule y Karlovsky, 2020), con lo que se obtuvo un valor de 60 000 lecturas (Figura 1). Posteriormente, los datos de taxonomía y abundancia fueron analizados y representados a través del paquete Phyloseq en el lenguaje de programación R. El análisis de abundancia diferencial fue realizado con el programa DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

## Resultados y discusión

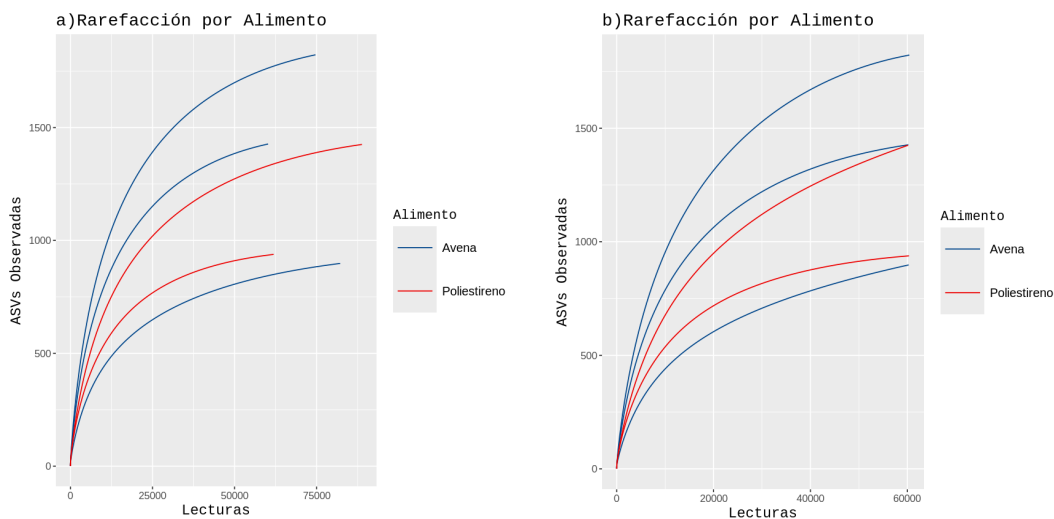
Se registró el consumo de poliestireno expandido por larvas de *Z. morio*, cuando se suministró este plástico (EPS) como dieta única. Hubo formación de túneles en el material objeto de estudio, además de pequeñas partículas que corresponden a las excretas de los insectos (Figura 2).

**Tabla S1.** Cuantificación del ADN de muestras para la amplificación del gen ARNr 16s región V3-4.

No.	Nombre de la muestra	Concentración de la muestra
1	A1	8,94 ng/μl
2	A2	15,07 ng/μl
3	A3	12,25 ng/μl
4	P1	11,66 ng/μl
5	P2	0,43 ng/μl



**Figura S1.** Gel de agarosa al 1% de ADN total, teñido con GelRed. De izquierda a derecha; M: marcador de peso molecular de 1 kb; A1, A2, A3: muestras de avena; P1-1, P1-2: muestras de EPS



**Figura 1.** Curva de rarefacción de las muestras secuenciadas bajo dos dietas. Los datos crudos (a) de cada muestra tienen cantidades diferentes de lecturas, luego de la normalización (b) todas las muestras tienen la misma cantidad, lo cual permite su comparación.

Los valores de abundancia, a nivel de filo, para las larvas alimentadas con poliestireno fueron firmicutes (68,77 %), proteobacteria (20,64 %), actinobacteriota (4,39 %) y acidobacteriota (1,62 %) (Figura 3a); mientras que en el grupo control fueron firmicutes (70,22 %), proteobacteria (15,48 %), bacteroidota (4,51 %), acidobacteriota (2,14 %) y actinobacteriota (1,58 %) (Figura 3a). Estos grupos han sido reportados en larvas de los insectos *T. molitor*, *Galleria mellonella* y *Z. atratus*, tras consumir poliestireno; en ellos se encontró una disminución en la abundancia relativa del filo firmicutes y un aumento en proteobacteria (Jiang et al., 2021; Peng et al., 2022), al igual que en el presente trabajo.

A nivel de género, las bacterias más abundantes para el grupo de poliestireno fueron *Spiroplasma* (86,49 %), *Pseudarthrobacter* (5,30 %), *Enterococcus* (3,16 %), *Lactococcus* (1,88 %) y *Bacillus* (1,57 %) (Figura

3b); mientras que en el grupo alimentado con avena predominó *Spiroplasma* (84,15 %), *Dysgonomonas* (5,59 %), *Enterococcus* (3,78 %), *Lactococcus* (3,11 %) y *Pseudarthrobacter* (0,77 %) (Figura 3b).

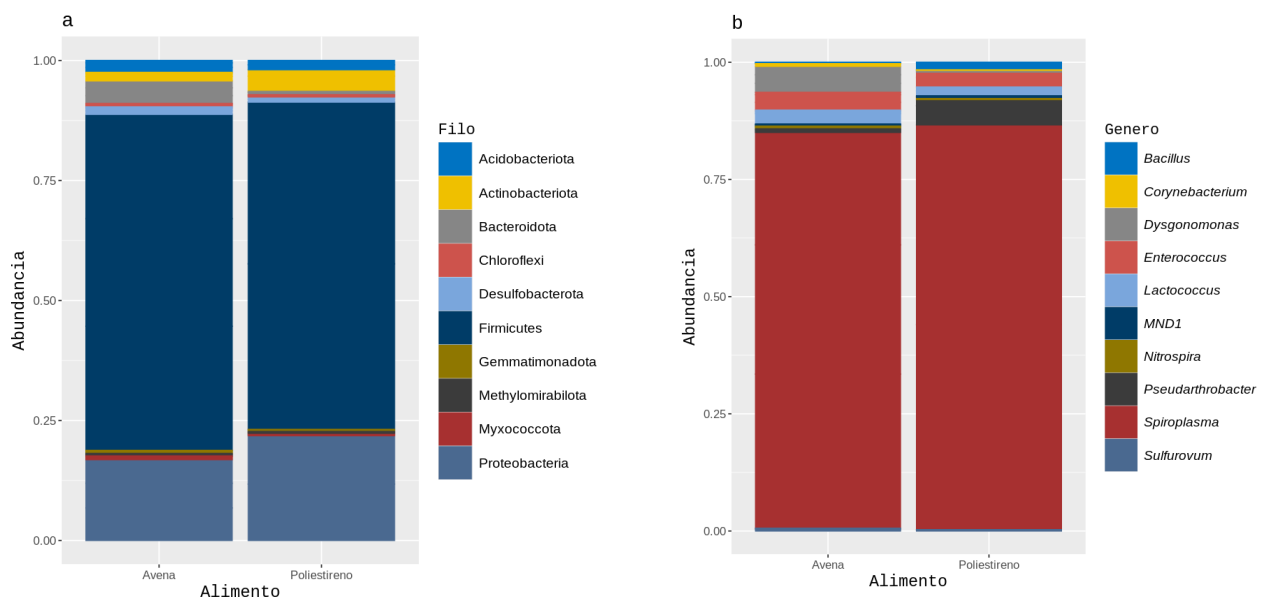
El género *Spiroplasma* ha sido considerado propio del tracto digestivo de insectos como *T. molitor* y *Tenebrio obscurus* (Peng et al., 2019), al igual que de *Z. atratus* (Luo et al., 2021). En el presente trabajo se encontró que *Spiroplasma* tenía una abundancia superior al 80 % para ambas dietas, lo que permite apoyar la idea de que este género posiblemente es propio del tracto digestivo de los insectos de la familia Tenebrionidae.

Aunque el género *Enterococcus* ha sido considerado tanto propio del tracto digestivo de tenebrionidos (Peng et al., 2019), así como microorganismo que contribuye a la degradación del poliestireno (Peng et al., 2022), el presente trabajo identificó una





**Figura 2.** Larvas de *Zophobas morio* consumiendo poliestireno expandido (EPS).



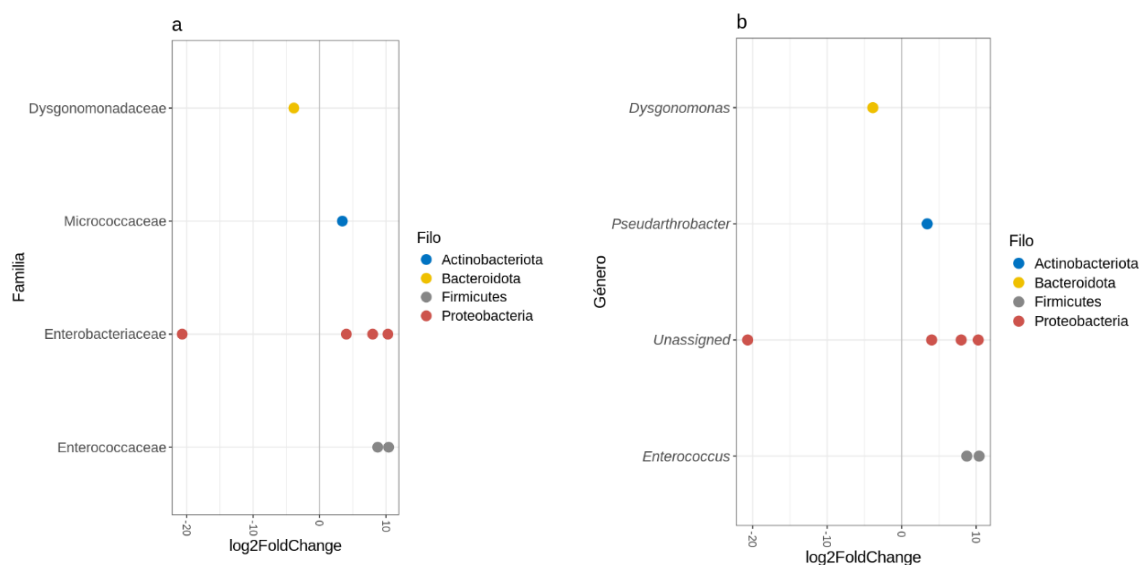
**Figura 3.** Abundancia a nivel de filo (a) y género (b) de bacterias asociadas al tracto digestivo de *Zophobas morio* bajo 2 dietas.

disminución de la abundancia relativa de este género tras el consumo de poliestireno; además, dicha disminución se asoció a diferencias significativas en el análisis de abundancia diferencial (Figura 4b), por lo cual se considera que la dieta plástica afectó la viabilidad de este género.

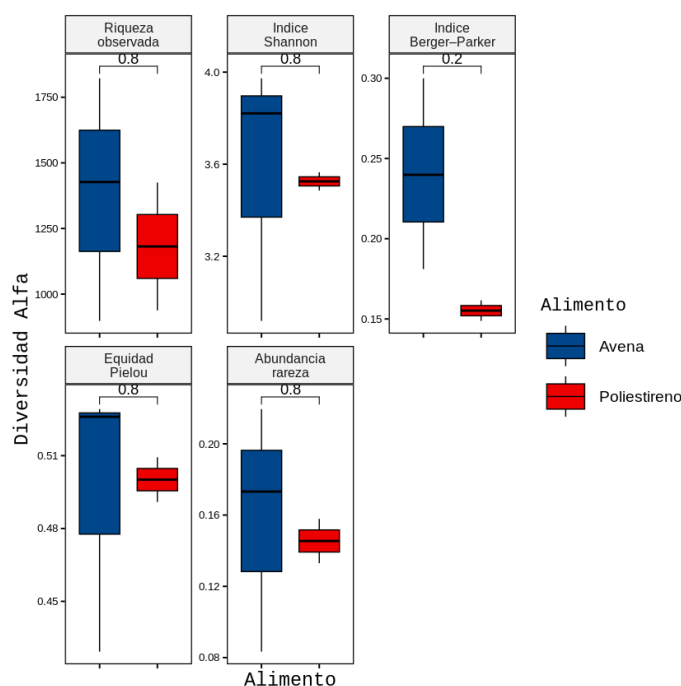
El género *Bacillus* spp., para la dieta con poliestireno (1,57 %), respecto al grupo control (0,33 %), presentó mayor abundancia, lo cual resulta de interés debido a los reportes recientes de aislamiento de *Bacillus* spp., en *Z. atratus* (Arunrattiyakorn et al., 2022), y *Bacillus megaterium* de larvas de *Z. morio*, cuya capacidad para biodegradar películas de este material fue además

verificada en laboratorio (Meng et al., 2021). Respecto al reporte de *Dysgonomonas* como bacteria asociada al consumo de Poliestireno en *Z. atratus* (Luo et al., 2021; Wang et al., 2022a), no se detectó esta asociación, por el contrario, hubo mayor abundancia en el grupo alimentado con avena con diferencias significativas (Figura 4b).

El género *Pseudarthrobacter* y miembros de la familia Enterobacteriaceae presentaron un aumento en su abundancia en el microbioma de larvas alimentadas con poliestireno, respecto al grupo control, con diferencias significativas (Figura 4). Ha sido reportado el aumento de abundancia de este género al estar



**Figura 4.** Análisis de abundancia diferencial a nivel de familia (a) y género (b) de microbioma según dieta de *Zophobas morio* ( $\alpha = 0,01$ ). Al lado negativo del log2FoldChange se encuentran las asignaciones diferenciadas para el control, mientras en el lado positivo está las de poliestireno.



**Figura 5.** Diagrama de caja y bigotes de los índices de diversidad alfa (riqueza observada, índice de Shannon, índice de Berger Parker, equidad de Pielou y rareza) de la microbiota intestinal según el alimento consumido por *Zophobas morio*. No se encontraron diferencias significativas entre las dietas ( $p > 0,05$ ).

expuesto en películas de plástico (Chung *et al.*, 2022), sin embargo, en *Z. morio* y en la familia Tenebrionidae es el primero que se realiza. La familia Enterobacteriaceae ha sido asociada a la degradación del poliestireno en *Z. atratus* (Jiang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022b); sin embargo, al igual que en el presente trabajo, no fue posible hacer la asignación taxonómica a nivel de género con la información disponible en las bases de datos.

Por otra parte, se resalta que en la literatura hay reportes de aislamientos bacterianos realizados del tracto digestivo de larvas de *Zophobas atratus* luego de consumir poliestireno: *Intestinirhabdus alba*, nuevo género y especie de la familia Enterobacteriaceae (Xu *et al.*, 2020); *Myroides albus* de la familia Flavobacteriaceae (Xia *et al.*, 2020); y *Pseudomonas* sp., familia Pseudomonadaceae, de la cual se resalta el papel de la proteína serina hidrolasa en la degradación de plásticos (Kim *et al.*, 2020).

El análisis de la riqueza observada de los microbiomas indicó una disminución de ASV (*Amplicon Sequence Variant*, por sus siglas en inglés) para el grupo de larvas alimentadas con poliestireno con una mediana de 1427 registros, respecto al grupo control que presentó una mediana de 1182. A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,8$ ) en los valores de este índice (Figura 5).

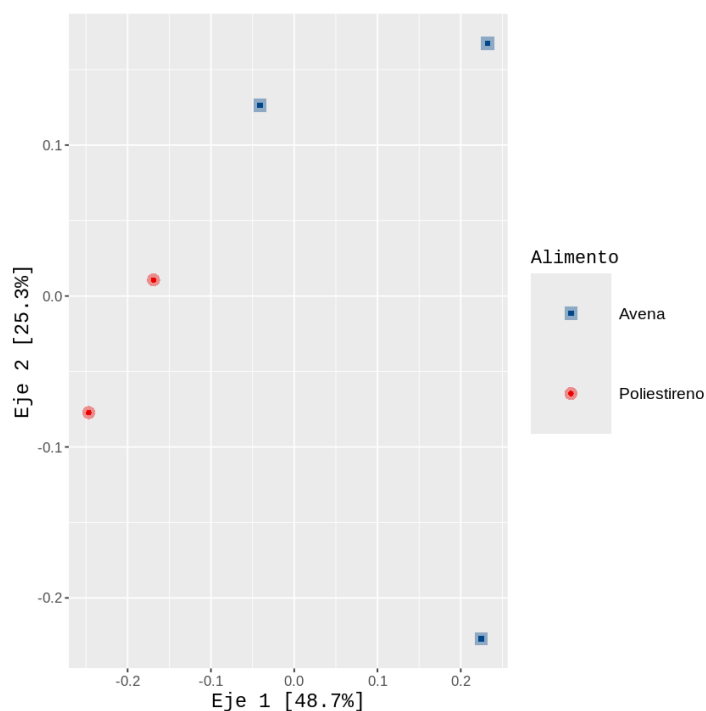
El índice de Shannon y Berger-Parker para la dieta de poliestireno presentó una mediana de 3,52 y 0,15; mientras que el grupo control reportó valores de 3,8 y 0,23 respectivamente. Lo anterior evidencia que hubo una leve disminución de la diversidad del microbioma de las larvas alimentadas con poliestireno, sin embargo, no se produjo dominancia de algún ASV en particular, lo cual coincide con lo reportado para *Z. atratus* (Peng *et al.*, 2022). Además, al tomar como referencia la interpretación clásica de Margalef (1972) sobre el índice de Shannon se concluye que la microbiota de ambas dietas tuvo una diversidad de nivel medio. La comparación de ambos índices no reportó diferencias significativas (Shannon  $p = 0,8$ ; Berger-Parker  $p = 0,2$ ).

El índice de uniformidad de Pielou reportó un valor menor en el grupo de poliestireno con una mediana de 0,50, respecto al grupo control que tuvo una mediana de 0,52 (Figura 5). Esta menor uniformidad es un indicador de que la abundancia de

determinados ASV no se vio favorecida o afectada por el consumo del plástico objetivo de estudio, lo cual concuerda con los índices evaluados anteriormente. Así mismo, el índice de rareza de abundancia tuvo un valor menor en el grupo de poliestireno (0,14), respecto al grupo control (0,17), estableciendo pocos valores atípicos en la abundancia del microbioma de los individuos alimentados con plástico.

El análisis de diversidad alfa, a partir de los índices evaluados, permitió reconocer que no hubo diferencias significativas entre la microbiota de las larvas alimentadas con poliestireno y la del grupo control ( $p > 0,05$ ). A pesar de lo anterior, se resalta que el grupo alimentado con plástico tuvo una disminución de la mediana para los valores de riqueza observada y el índice de Shannon, de igual forma que el reporte realizado para *Z. atratus* y *T. molitor* (Wang *et al.*, 2022a).

Los diagramas de caja y bigotes presentados para analizar los índices de diversidad alfa permitieron identificar que los valores del grupo control presentaron una mayor amplitud en sus datos, es decir, una distancia mayor entre sus valores mínimos y máximos (Figura 5). Lo anterior se confirmó al realizar el análisis de diversidad que indicó que el grupo control tuvo una mediana de 0,24, mientras la dieta de poliestireno una mediana de 0,17. A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias significativas entre ambos valores ( $p = 0,8$  o  $p = 0,2$ ).



**Figura 6.** Distancia entre las muestras de cada dieta, utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis. El eje 1 explica el 48,7 % de la disimilitud entre las muestras, mientras el eje 2 explica un 25,3 %, para un total de 74 % de explicación de variación. Se destaca que las muestras de poliestireno tienen a agruparse, lo que indica baja disimilitud entre ellas.

Al realizar el análisis de componentes principales PCoA (Figura 6), se observó que el eje 1 explicaba el 48,7 % de disimilitud, mientras que el eje 2 un 25,3 %, para un total de 74 % de variación. Se observa que las 2 muestras del grupo de poliestireno tienden a estar próximas; en cambio, las muestras de la dieta de avena presentan mayores distancias entre ellas. La cercanía entre las muestras de poliestireno puede explicarse por la abundancia y riqueza de bacterias que son más similares entre muestras de la dieta plástica, lo cual coincide con el análisis de abundancia diferenciada que permitió identificar taxones con diferencias significativas.

Aunque en este estudio no se analizó la degradación de plásticos por parte de los microorganismos en ambientes anaeróbicos, se infiere que estos procesos deberían ser investigados a futuro ya que los hábitats anóxicos son muy comunes en la tierra (Kotova et al., 2021).

## Conclusiones

Se encontró que el género *Spiroplasma* fue el más abundante en la dieta del PS (86,49 %) y avena (84,15 %), además, es considerado propio del tracto digestivo de los insectos de la familia Tenebrionidae.

Al comparar las dos dietas se obtuvo que los géneros *Pseudarthrobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactococcus* presentaron diferencias significativas en su abundancia relativa, lo que lleva a sugerir que hay una fuerte asociación entre su presencia en el tracto digestivo y la biodegradación de EPS.

De igual manera, se puede concluir que, en este estudio, las larvas alimentadas con EPS sobrevivieron, y los géneros bacterianos encontrados en su tracto digestivo podrían jugar un papel clave en el proceso de biodegradación de EPS. Finalmente, estos géneros bacterianos identificados en el tracto digestivo de *Z. morio* son candidatos-blanco para ser obtenidos en cultivo puro y evaluar individualmente su actividad en la biodegradación del poliestireno expandido.

## Referencias

- Andrady, A. L. y Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 1977-1984. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0304>
- Arunrattiyakorn, P.; Ponprateep, S.; Kaennonsang, N.; Charapok, Y.; Punphuet, Y.; Krajangsang, S.; Tangteerawatana, P. y Limtrakul, A. (2022). Biodegradation of polystyrene by three bacterial strains isolated from the gut of Superworms (*Zophobas atratus* larvae). *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2823-2831. <https://doi.org/10.1111/JAM.15474>
- Beule, L. y Karlovsky, P. (2020). Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): Application to microbial communities. *PeerJ*, 8, e9593. <https://doi.org/10.7717/peerj.9593>
- Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C. C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H.; Alm, E. J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J. E.; Bittinger, K.; Brejnrod, A.; Brislawn, C. J.; Brown, C. T.; Callahan, B. J.; Carballo-Rodríguez, A. M.; Chase, J. ... y Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A. y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Choi, I. H.; Lee, J. H. y Chung, T. H. (2020). Polystyrene biodegradation using *Zophobas morio*. *Journal of Entomological Research*, 44(3), 475-478. <https://doi.org/10.5958/0974-4576.2020.00079.1>
- Chung, J. H.; Yeon, J.; Seong, H. J.; An, S. H.; Kim, D. Y.; Yoon, Y.; Weon, H. Y.; Kim, J. J. y Ahn, J. H. (2022). Distinct bacterial and fungal communities colonizing waste plastic films buried for more than 20 years in four landfill sites in Korea. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 32(12), 1561-1572. <https://doi.org/10.4014/JMB.2206.06021>
- Danso, D.; Chow, J. y Streita, W. R. (2019). Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>
- Geyer, R.; Jambeck, J. R. y Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). DOI: [10.1126/sciadv.1700782](https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782)
- Gilbert, J. A. y Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: Beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, 347-371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Jambeck, J. R.; Geyer, R.; Wilcox, C.; Siegler, T. R.; Perryman, M.; Andrady, A.; Narayan, R. y Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771. DOI: [10.1126/science.1260352](https://doi.org/10.1126/science.1260352)
- Jiang, S.; Su, T.; Zhao, J.; Wang, Z.; Ferri, J. M.; Fombuena Borrás, V.; Fernando, M. y Carrasco, A. (2021). Biodegradation of polystyrene by *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella*, and *Zophobas atratus* Larvae and comparison of their degradation effects. *Polymers* 2021, 13(20), 3539. <https://doi.org/10.3390/POLYM13203539>
- Kim, H. R.; Lee, H. M.; Yu, H. C.; Jeon, E.; Lee, S.; Li, J. y Kim, D. H. (2020). Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. isolated from the gut of superworms (Larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental Science and Technology*, 54(11), 6987-6996. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01495>
- Kotova, I. B.; Taktarova, Y. V.; Tsavkelova, E. A.; Egorova, M. A.; Bubnov, I. A.; Malakhova, D. V. ... y Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2021). Microbial degradation of plastics and approaches to make it more efficient. *Microbiology*, 90, 671-701. <https://doi.org/10.1134/S0026261721060084>
- Liu, R.; Zhao, S.; Zhang, B.; Li, G.; Fu, X.; Yan, P. y Shao, Z. (2023). Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130056. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130056>
- Lorenz, P. y Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(6), 510-516. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1161>
- Lovley, D. R. (2003). Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 35-44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro731>



- Love, M. I.; Huber, W. y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1-21. [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)
- Luo, L.; Wang, Y.; Guo, H.; Yang, Y.; Qi, N.; Zhao, X.; Gao, S. y Zhou, A. (2021). Biodegradation of foam plastics by *Zophobas atratus* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) associated with changes of gut digestive enzymes activities and microbiome. *Chemosphere*, 282, 131006. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131006>
- Mamun, A. al; Prasetya, T. A. E.; Dewi, I. R. y Ahmad, M. (2023). Microplastics in human food chains: Food becoming a threat to health safety. *Science of The Total Environment*, 858(1), 159834. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.159834>
- Margalef, R. (1972). Homage to Evelyn Hutchinson, or why there is an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 44, 211-235. <https://digital.csic.es/handle/10261/166281>
- Marrero-Coto, J.; Díaz-Valdivia, A. y Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(1), 67-78. <https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevBiol/article/view/609/493>
- Meng, T. K.; Kassim, A. S. B. M.; Razak, A. H. B. A. y Fauzi, N. A. B. M. (2021). *Bacillus megaterium*: A potential and an efficient bio-degrader of polystyrene. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, 1-12. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021190321>
- ONU. (2018). Plásticos de un solo uso: una hoja de ruta para la Sostenibilidad. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. [https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25496/singleUsePlastic\\_SP.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25496/singleUsePlastic_SP.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Peng, B. Y.; Su, Y.; Chen, Z.; Chen, J.; Zhou, X.; Benbow, M. E.; Criddle, C. S.; Wu, W. M. y Zhang, Y. (2019). Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science and Technology*, 53(9), 5256-5265. [https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B06963/SUPPL\\_FILE/ES8B06963\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B06963/SUPPL_FILE/ES8B06963_SI_001.PDF)
- Peng, B. Y.; Sun, Y.; Wu, Z.; Chen, J.; Shen, Z.; Zhou, X.; Wu, W. M. y Zhang, Y. (2022). Biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Zophobas atratus* larvae: Fragmentation into microplastics, gut microbiota shift, and microbial functional enzymes. *Journal of Cleaner Production*, 367, 132987. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.132987>
- Plastics Europe. (2022). Plásticos. Situación en 2022. <https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plasticos-situacion-en-2022/>
- Plastics Europe. (2023). Plastics: the fast facts 2023. <https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2023/10/Plastics-the-fast-Facts-2023.pdf>
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J. y Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Tang, Z.-L.; Kuo, T.-A. y Liu, H.-H. (2017). The study of the microbes degraded polystyrene. *Advances in Technology Innovation*, 2(1), 13-17. <https://ojs.imeti.org/index.php/AITI/article/view/204>
- Wang, J.; Wang, Y.; Li, X.; Weng, Y.; Wang, Y.; Han, X.; Peng, M.; Zhou, A. y Zhao, X. (2022a). Different performances in polyethylene or polystyrene plastics long-term feeding and biodegradation by *Zophobas atratus* and *Tenebrio molitor* larvae, and core gut bacterial- and fungal-microbiome responses. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6), 108957. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.108957>
- Wang, Y.; Luo, L.; Li, X.; Wang, J.; Wang, H.; Chen, C.; Guo, H.; Han, T.; Zhou, A. y Zhao, X. (2022b). Different plastics ingestion preferences and efficiencies of superworm (*Zophobas atratus* Fab.) and yellow mealworm (*Tenebrio molitor* Linn.) associated with distinct gut microbiome changes. *Science of The Total Environment*, 837, 155719. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155719>
- Xia, M.; Hu, L.; Huo, Y. X. y Yang, Y. (2020). *Myroides albus* sp. nov., isolated from the gut of plastic-eating larvae of the coleopteran insect *Zophobas atratus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(10), 5460-5466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004429>
- Xu, J.-L.; Lin, X.; Wang, J. J. y Gowen, A. A. (2022). A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure. *Science of The Total Environment*, 851, 158111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158111>
- Xu, Z.; Xia, M.; Huo, Y. X. y Yang, Y. (2020). *Intestinirhabdus alba* gen. Nov., sp. nov., a novel genus of the family enterobacteriaceae, isolated from the gut of plastic-eating larvae of the Coleoptera insect *Zophobas atratus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004364>
- Yang, S. y Wu, W. (2020). Biodegradation of plastics in *Tenebrio* genus (Mealworms). En H. Defu y L. Yongming (eds.), *Microplastics in terrestrial environments - emerging contaminants and major challenges. The handbook of environmental chemistry* (vol. 95, pp. 385-422). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978\\_2020\\_457](https://doi.org/10.1007/978_2020_457)
- Yang, Y.; Wang, J. y Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of The Total Environment*, 708, 135233. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135233>
- Yang, Y.; Yang, J.; Wu, W.; Zhao, J.; Song, Y.; Gao, L.; Yang, R. y Jiang, L. (2015a). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12087-12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>
- Yang, Y.; Yang, J.; Wu, W.; Zhao, J.; Song, Y.; Gao, L.; Yang, R. y Jiang, L. (2015b). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12087-12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663>
- Zhang, Y.; Pedersen, J. N.; Eser, B. E. y Guo, Z. (2022). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*, 60, 107991. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.107991>
- Zhao, X.; Gao, P.; Zhao, Z.; Wu, Y. Sun, H. y Liu, C. (2024). Microplastics release from face masks: Characteristics, influential factors, and potential risks. *Science of The Total Environment*, 921, 171090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171090>