



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio del microbioma intestinal de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) como aproximación al uso potencial para la biodegradación del poliestireno

Luisa María Martínez López

Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

Facultad de Ingeniería y Administración

Maestría en Ingeniería Ambiental

Palmira, Colombia

2023

Estudio del microbioma intestinal de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) como aproximación al uso potencial para la biodegradación del poliestireno

Luisa María Martínez López

Tesis de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Ambiental

Directora:

Ph.D. Diana Carolina López Álvarez

Codirector:

Ph.D. Edwison Alberto Rojas Triviño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Administración
Maestría en Ingeniería Ambiental
Palmira, Colombia

2023

Dedica a cada persona que pone una montaña o un granito de arena para ayudar a recuperar y tratar de salvar a nuestro planeta hogar.

Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo.

Aristóteles (384 AC-322 AC)

(Espacio para el Acta de Grado)

Agradecimientos

A mi madre, eterna gratitud por ser incondicional y por la fortaleza que me da, al doctor Alberto Rojas por su gran apoyo, a la doctora Diana Carolina López por su inmensa generosidad y entrega con paciencia y dedicación en mi formación, siempre estará en mi corazón y será el ejemplo que todos deberíamos seguir. A los profesores Nancy Barrera, Gabriel de la Cruz, Luis Octavio González, Ana Cecilia Agudelo, Víctor Alfonso Cerón por compartir sus valiosos conocimientos y el apoyo incondicional para realizar este trabajo, a Jeison García por su disposición, colaboración y acompañamiento en el laboratorio de Biología Molecular.

Al doctor Fernando Heredia Ferreira, por su gran apoyo, ayuda y disposición para el desarrollo de este trabajo de investigación; y a todos mis compañeros que pasaron conmigo este hermoso camino de conocimientos y saberes de nuestra Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Luisa María Martínez López

Nombre

Luisa María Martínez López

Fecha 03/03/2022

Resumen

Estudio del microbioma intestinal de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) como aproximación al uso potencial para la biodegradación del poliestireno.

El Poliestireno expandido (EPS) es un polímero sintético de uso común en diferentes industrias, principalmente en las de embalaje y construcción. Debido a su composición química a base de cadenas largas de hidrocarburos, el EPS posee una estabilidad molecular que le permite permanecer inmodificable por cientos de años lo que genera un impacto negativo sobre el medio ambiente, ya que no es un sustrato nutritivo para ningún microorganismo o se desconocía para cuál. En la actualidad, se ha reportado que larvas de coleópteros de la familia Tenebrionidae pueden biodegradarlo gracias a enzimas producidas por su microbiota intestinal. Considerando lo anterior, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la microbiota intestinal de larvas de *Zophobas morio* como aproximación al uso potencial para la biodegradación del Poliestireno (PS), empleando metabarcoding. Para esto se realizó secuenciación Illumina *Miseq* de la región V3-4 del gen 16s del ARNr de larvas de *Z. morio* alimentadas con dos tipos de dietas, EPS y Avena. Adicionalmente, a través de la plataforma de secuenciación Hiseq2500 se obtuvo el metagenoma completo de una de las muestras alimentadas con EPS. Con los resultados de la secuenciación se analizó la composición taxonómica, abundancia relativa de las bacterias y finalmente se realizó un análisis metabólico del microbioma obtenido de las larvas alimentadas con EPS. El análisis metagenómico permitió identificar que el género *Spiroplasma* presentó una abundancia relativa de 61,6 %, seguido de *Pantoea* (19,3%), *Enterobacter* (5%) y *Pseudarthrobacter* (4,7%). Otros géneros presentes fueron *Kluyvera georgiana*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., y *Romboutsia* sp. Se asume a estos géneros como los microorganismos más promisorios que influyen en la biodegradación del EPS. Los resultados obtenidos podrían ser incluidos en trabajos futuros donde se analice la actividad biológica y de biodegradación de microorganismos pertenecientes a los géneros encontrados.

Palabras clave: *Poliestireno, EPS, Metagenómica, Metabarcoding, Biodegradación, Coleópteros.*

Abstract

Study of the intestinal microbiome of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an approach to the potential use for the biodegradation of polystyrene.

Expanded Polystyrene (EPS) is a synthetic polymer commonly used in different industries, mainly in packaging and construction. Due to its chemical composition based on long hydrocarbon chains, EPS has a molecular stability that allows it to remain unchanged for hundreds of years, which generates a negative impact on the environment, since it is not a nutritious substrate for any microorganism, or it was unknown for which one. Currently, it has been reported that beetle larvae of the Tenebrionidae family can biodegrade it thanks to enzymes produced by their intestinal microbiota. Considering the above, the objective of this research was to characterize the intestinal microbiota of *Zophobas morio* larvae as an approach to the potential use for the biodegradation of Polystyrene, using metabarcoding. For this, the Illumina Miseq sequence of the V3-4 region of the 16s rRNA gene of *Z. morio* larvae fed with two types of diets, PE and Oats, was performed. Additionally, through the Hiseq2500 sequencing platform, the complete metagenome of one of the samples fed with EPS was obtained. With the results of the sequencing, the taxonomic composition, the relative abundance of the bacteria was analyzed and finally a metabolic analysis of the microbiome obtained from the larvae fed with EPS was carried out. The metagenomic analysis allowed us to identify that the genus *Spiroplasma* presented a relative abundance of 61.6%, followed by *Pantoea* (19.3%), *Enterobacter* (5%) and *Pseudarthrobacter* (4.7%). Other genera present were *Kluyvera georgiana*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., and *Romboutsia* sp. These genera are assumed to be the most promising microorganisms that influence the biodegradation of EPS. The results obtained could be included in future works where the biological activity and biodegradation of microorganisms belonging to the found genera are analyzed.

Keywords: Polystyrene, EPS, metagenomics, metabarcoding, biodegradation, Coleoptera.

Contenido

Resumen	XI
Abstract	XIII
Lista de figuras	XVII
Lista de tablas	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas	XX
Introducción	1
Planteamiento del problema y justificación	4
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos específicos	7
	1 22
1.1 22	
1.1.1 23	
1.1.2 24	
1.1.3 25	
1.1.4 28	
1.2 29	
1.3 31	
1.3.1 45	
1.3.2 32	
1.3.3 33	
1.3.4 33	
1.3.5 34	
1.3.6 34	
1.4 36	
1.5 36	
	2 39
2.1 40	
2.2 40	

Contenido

2.3	41	
2.3.1	41	
2.3.2	43	
2.3.3	43	
2.3.3.1	43	
2.3.3.2	43	
2.3.3.3	43	
2.3.3.4	44	
2.3.3.5	44	
2.3.3.6	44	
2.3.3.7	45	
2.3.4	45	
		3 46
3.1	46	
3.1.1	46	
3.1.2	46	
3.2	47	
3.2.1	47	
3.2.2	48	
3.2.3	61	
3.2.3.1	61	
3.2.3.2	64	
3.2.3.3	69	
3.3	69	
3.3.1.1	70	
3.3.1.2	72	
3.3.1.3	75	
3.3.1.4	75	
		4 81
4.1	81	
		A. 83
		B. 87
Bibliografía		77
		Pág.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Principales polímeros sintéticos producidos a nivel mundial en 2016. Los números en el gráfico indican la producción anual a nivel mundial de cada polímero. Adaptado de (Danso <i>et al.</i> , 2019).	10
Figura 2. Mecanismos de biodegradación microbiano del plástico utilizando enzimas despolimerasas, adaptado de (Ahmed <i>et al.</i> , 2018).	16
Figura 3. Sistema de degradación de plásticos de diferentes microorganismos adaptado de (Lucas <i>et al.</i> , 2008).	17
Figura 4. Esquema de flujo de trabajo implementado en la plataforma MG-RAST donde se muestran las principales etapas del procesamiento de datos adaptado de Calderoli, 2016.	23
Figura 5. Diagrama de flujo de trabajo global de la aplicación SHAMAN.	24
Figura 6. Cría de larvas de <i>Z. morio</i> alimentadas con poliestireno expandido.	27
Figura 7. Proceso de extracción de tubos digestivos de larvas de <i>Z. morio</i> donde: A) Corte lateral de larvas, B y C) tubo digestivo extraído y D) Tubos digestivos almacenados para microcentrifuga.	28
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde (S) estándar de ADN genómico total (50ng); (M-1) marcador de peso molecular Trans 2K; (1) ADN genómico de tubos digestivos de larvas de <i>Z. morio</i> y (M-2) marcador de peso molecular Trans 15K más escalera de ADN.	36
Figura 9. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Filo para los tratamientos A y P.	38
Figura 10. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Clase para los tratamientos A y P.	39
Figura 11. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Orden para los tratamientos A y P.	40
Figura 12. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Familia para los tratamientos A y P.	41
Figura 13. Abundancia taxonómica bacteriana a nivel de Género para los tratamientos A y P.	42
Figura 14. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Filo para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.	43
Figura 15. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Clase para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.	44

Figura 16. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Orden para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.	45
Figura 17. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Familia para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.	46
Figura 18. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Género para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.	47
Figura 19. Curva de rarefacción de OTUs.	49
Figura 20. Diversidad alfa: Comparación de la diversidad a nivel de OTUS entre los tratamientos.	50
Figura 21. Diversidad alfa: Comparación de la diversidad a nivel de OTUS entre las muestras.	51
Figura 22. Diferencia significativa entre géneros de bacterias de A y P, características diferenciales.	52
Figura 23. Diferencia significativa entre OTUs reportados en los tratamientos P (verde) y A (naranja).	53
Figura 24. Mapa de calor taxonómico a nivel de género de los dos tratamientos A y P. Donde rojo significa mayor abundancia y azul menor abundancia relativa.	57
Figura 25. Análisis de componentes principales para las muestras de tracto intestinal de <i>Z. morio</i> bajo dos tratamientos basados en la asignación taxonómica por género.	58
Figura 26. Análisis de secuencias y funciones potenciales obtenidas del tracto intestinal de <i>Z. morio</i> bajo una alimentación de poliestireno.	59
Figura 27. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos COGs.	60
Figura 28. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos NOGs.	60
Figura 29. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos KOs	61
Figura 30. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos de subsistemas.	61
Figura 31. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Dominio.	62
Figura 32. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Filo.	63
Figura 33. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Clase.	63
Figura 34. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Orden.	64
Figura 35. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Familia.	64
Figura 36. Curva de rarefacción para las lecturas obtenidas en el análisis de Metagenómica.	65
Figura 37. Histograma de distribución del porcentaje de GC en el análisis Metagenómico.	65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Microorganismos asociados a la degradación de materiales plásticos adaptado de (Urbanek <i>et al.</i> , 2018).	14
Tabla 2. Cuantificación del ADN de muestras para la amplificación del gen ARNr 16s región V3-4.	35
Tabla 3. Número de lecturas por muestra y asignaciones de OTUs.	37
Tabla 4. Porcentajes correspondientes a la presencia de géneros bacterianos en los tratamientos A y P.	47
Tabla 5. Porcentajes de la presencia de géneros bacterianos en las muestras 1 (A_3), 2 (P_1), 3 (P_2), 4 (A_1), y 5 (A_2).	48
Tabla 6. Asignación taxonómica de OTUs bacterianos significativamente diferentes entre los tratamientos evaluados.	54

Lista de Símbolos y abreviaturas

Esta sección es opcional, dado que existen disciplinas que no manejan símbolos y/o abreviaturas. Se incluyen símbolos generales (con letras latinas y griegas), subíndices, superíndices y abreviaturas (incluir sólo las clases de símbolos que se utilicen). Cada una de estas listas debe estar ubicada en orden alfabético de acuerdo con la primera letra del símbolo (en esta plantilla, el título del tipo de símbolo está en letra Arial de 14 puntos y en negrilla). Para escribir la definición en las tablas, se puede usar la herramienta de referencia cruzada (para textos editados en Microsoft Word). A continuación, se presentan algunos ejemplos.

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ESP	Poliestireno expandido
PS	Poliestireno
PA	Poliamida
PET	Tereftalato de polietileno
PVC	Cloruro de polivinilo
PP	Polipropileno
PV	Poliuretano
PUR	Poliuretano
PIR	Poliisocianurato
XPS	Poliestireno extruido
PCL	Policaprolactona
PVA	Acetato de Polivinilo
LLDPE	Polietileno lineal de baja densidad
LDPE	Polietileno de baja densidad
PHB	Polihidroxibutirato
PBS	Polibutadieno estireno
PEA	Poliéster acetato
PHA	Polihidroxialcanoato
PFT	Tetrafenol formaldehído
PLA	Ácido poliáctico

Introducción

Los plásticos son polímeros de origen vegetal, animal o artificiales (derivados del petróleo o de sustancias químicas) que se pueden moldear en diversas formas (Ghosh *et al.*, 2013; Posada, 2012). Químicamente, los plásticos están compuestos por hidrocarburos de cadena larga con elevado peso molecular; estos se derivan principalmente de productos petroquímicos y se pueden clasificar de acuerdo con su estructura y tamaño de partícula (Posada, 2012; Shima, 2001). Actualmente los principales plásticos que se producen son el Polietileno (PE), Poliamida (PA), Tereftalato de Polietileno (PET), Poliestireno (PS), Cloruro de Polivinilo (PVC), Polipropileno (PP) y el Poliuretano (PU) que engloba los materiales Poliuretano (PUR) y Poliisocianurato (PIR) (Danso *et al.*, 2019), no sólo en el contexto global, sino también en el nacional.

Desde la década de los 70's los polímeros sintéticos derivados del petróleo han ido sustituyendo de forma sustancial a los materiales de origen natural; por su versatilidad, bajo costo y durabilidad, se han convertido en un producto básico y cotidiano para la sociedad (ACRR-ASOC. *et al.*, 2004; Haider *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2008). El polímero conocido como Poliestireno Expandido (EPS), por ejemplo, reemplaza en muchos casos el uso de metales y compuestos cerámicos (Haider *et al.*, 2019).

En Colombia, el PS es comercializado por la Industria Colombiana de Porosos con el nombre de ICOPOR y se puede hallar de dos formas, ya sea extruido (XPS) o expandido (EPS); el primero es más denso y forma parte de empaques como las bandejas de frutas en los supermercados y el segundo es más liviano y se encuentra en forma de esferas, principalmente para soportar el embalaje de productos delicados. Ambos tipos de Poliestireno tienen una composición química similar (95% Polímeros de estireno y 5% de gas) (NOVA Chemicals®, 2017; Sánchez, 2017).

Pese a sus bondades, los residuos que se generan al producir el PS y la disposición final inadecuada de los mismos lo convierten en un material altamente contaminante para la

mayoría de los ecosistemas del planeta. Una característica particular del PS es que no se degrada fácilmente, puede permanecer sin cambios en su estructura por largos periodos de tiempo, cerca de 100 a 1000 años, lo que hace que sea propenso a acumularse en las superficies y, por ende, pueda ser ingerido por diferentes especies de animales provocando ahogamientos, intoxicaciones y en el peor de los casos la muerte. Por otro lado, cuando este material se calienta, libera Dioxinas y Estireno, sustancias que se han encontrado, son cancerígenas. En cuanto a los humanos, diversos autores sugieren que componentes expansores del PS como el Pentano, Isopentano y/o Ciclopentano pueden llegar a generar conjuntivitis, dermatitis, cefaleas, náuseas y afecciones en vías respiratorias altas y bajas cuando se inhalan en altas concentraciones (NOVA Chemicals®, 2017).

Existen diferentes métodos para degradar el PS, uno de ellos consiste en aplicar temperaturas elevadas al material y fundirlo; aunque este método es eficiente, al final produce grandes cantidades de Dioxina o precursores de estas como el Fenol Halogenado, lo que sigue repercutiendo de forma negativa en el ambiente (Tang *et al.*, 2017). En la actualidad y en un intento por mitigar el impacto negativo que tiene el PS sobre el ambiente, los investigadores y la industria han dirigido sus esfuerzos en identificar alternativas para degradar el mismo, tales como los Biodegradadores, microorganismos capaces de transformar el PS en Dióxido de carbono, metano, compuestos inorgánicos, agua y biomasa (Tang *et al.*, 2017; Téllez, 2012).

Recientemente se ha reconocido que una de las alternativas para identificar qué microorganismos descomponen el PS es usar herramientas biotecnológicas que permitan evaluar la diversidad microbiana y su función en el ambiente, identificar nuevos genomas, genes, proteínas y mecanismos moleculares que tengan un impacto positivo en la biorremediación de ambientes contaminados (Gilbert & Dupont, 2011; Lovley, 2003; Marrero-Coto *et al.*, 2010).

En este sentido, la metagenómica ha comenzado a impactar el campo de la biorremediación de ecosistemas contaminados con PS, a través del estudio de genes específicos como el Ácido Ribonucleico Ribosomal (ARNr) 16s o mediante el uso de secuenciación aleatoria (Gilbert & Dupont, 2011). Esta herramienta utiliza la información de todo el ADN genómico presente en una muestra ambiental y permite caracterizar taxonómicamente la comunidad microbiana presente y, además, analizar funcionalmente

el estado del ambiente en el que se encuentran (González *et al.*, 2017; Nesme *et al.*, 2016) (Lorenz y Eck, 2005). En el campo de la biorremediación los estudios de metagenómica se han enfocado principalmente en estudiar las transformaciones que sufren los metales, tales como oxidación, reducción, metilación y desmetilación de los mismos en ambientes contaminados, pero donde hay presencia de diversos microorganismos (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Otros investigadores se han centrado en estudiar cómo algunas especies de animales pueden degradar el PS, tal es el caso del estudio realizado por Yang *et al.* en el año (2015) donde utilizando las secuencias del ARNr 16s exploraron el intestino de *Tenebrio molitor* y *Zophobas morio* e identificaron la cepa YT2 de *Exiguobacterium* sp. y otros 12 aislados que podrían estar involucrados en la biodegradación del PS por parte de las larvas de estos coleópteros.

Dados estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la microbiota intestinal de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) como aproximación al uso potencial para la biodegradación del PS empleando metagenómica y metabarcoding.

Planteamiento del problema y justificación

Para el año 2013 la producción de plástico a nivel mundial alcanzaba los 299 millones de toneladas, 200 veces más de lo que se produjo para el año 1950, este dramático aumento se atribuye principalmente a la importancia que han tomado estos productos en la cotidianidad de los hogares, pues su uso involucra desde productos electrónicos, tuberías de suministro y drenaje de agua, revestimiento de cableados hasta empaques y contenedores (S. S. Yang *et al.*, 2021; S. S. Yang, Brandon, *et al.*, 2018; S. S. Yang, Wu, *et al.*, 2018). Por otro lado, el plástico juega un rol clave a nivel económico por su bajo costo frente a otros materiales, durabilidad y múltiples usos. Aun cuando genera tantos beneficios, el plástico es un material que no se biodegrada ni a corto ni a mediano plazo, por lo que resulta en una amplia gama de impactos ambientales negativos (Gómez Serrato, 2016; Ramis *et al.*, 2004)

Con el fin de disminuir los desechos plásticos en el ambiente y al mismo tiempo obtener energía del proceso, las industrias de plásticos han optado por diferentes métodos como incinerar el material; pero la generación de gases, partículas contaminantes y sustancias tóxicas tales como: Dioxinas, Furanos, Hexaclorobenceno, Clorofenoles, Amoníaco y Formaldehído, entre otros, ha hecho que este procedimiento no sea el más idóneo para el manejo de la acumulación de residuos (Jakubowicz *et al.*, 2011; K. Meng *et al.*, 2019). Otra opción, es utilizar estos residuos como insumo para la elaboración de nuevos plásticos, este reprocesamiento degrada de manera irreversible el material, puesto que el mismo, es sometido a factores mecánicos, químicos y físicos que alteran sus propiedades originales (Goitisoló *et al.*, 2008). A pesar de lo factible de este procedimiento, en la práctica no resulta ventajoso, ya que la logística para reciclar grandes volúmenes de plástico es dispendiosa, primero se requiere transportar el material desde su origen hasta la planta de procesamiento, luego clasificar los residuos, mezclarlos y homogenizarlos, para posteriormente convertirlo en un producto final que sea efectivo (Moore, 2008).

Teniendo en cuenta el impacto negativo que causan los desechos de plástico sobre el ambiente, resulta pertinente explorar métodos más eficientes para transformarlos en un material útil, que no genere contaminación y que adicionalmente tenga un valor agregado para la industria. Una opción más amigable y efectiva es la Biodegradación ambiental con microorganismos, que al asociarse utilizan el plástico como fuente de Carbono, sin tener repercusiones significativas en su peso (Sun *et al.*, 2022).

Con respecto a lo planteado anteriormente, se ha encontrado que el microbioma intestinal de algunos escarabajos tiene un potencial prometedor para la degradación del plástico, al combinar mecanismos físicos y bioquímicos; estos animales utilizan la fuerza mecánica, es decir, sus apéndices orales, para romper físicamente e ingerir las partículas de plástico que posteriormente pueden ser degradadas aún más por la comunidad microbiana alojada en su tracto digestivo (Sun *et al.*, 2022). Tang *et al.*, en el año (2017) reportaron que las larvas del escarabajo *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) pueden sobrevivir comiendo PS como dieta parcial o total y que su microbiota intestinal tiene la capacidad de biodegradar el PS en moléculas más inocuas para el ambiente, utilizando un proceso denominado despolimerización, donde las moléculas de PS de cadena larga se convierten en productos de bajo peso molecular (Yang *et al.*, 2020). Sin embargo, hacen falta análisis metagenómicos del microbioma de las larvas de *Z. morio*, que identifique a los miembros claves de la comunidad y su relación con la biodegradación del EPS. Teniendo en cuenta estos reportes, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿En la microbiota intestinal de las larvas de *Z. morio* existen bacterias con potencial uso en la biodegradación de EPS?

A. Objetivos

a. Objetivo General

Caracterizar la microbiota intestinal de *Z. morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) empleando metagenómica y metabarcoding.

b. Objetivos específicos

- Caracterizar a través de metabarcoding la composición taxonómica y la abundancia relativa de las bacterias presentes en el tracto digestivo de larvas de *Z. morio* bajo dos dietas.
- Realizar el análisis metabólico del microbioma obtenido a partir del metagenoma del tracto digestivo de larvas de *Z. morio* alimentadas con EPS.

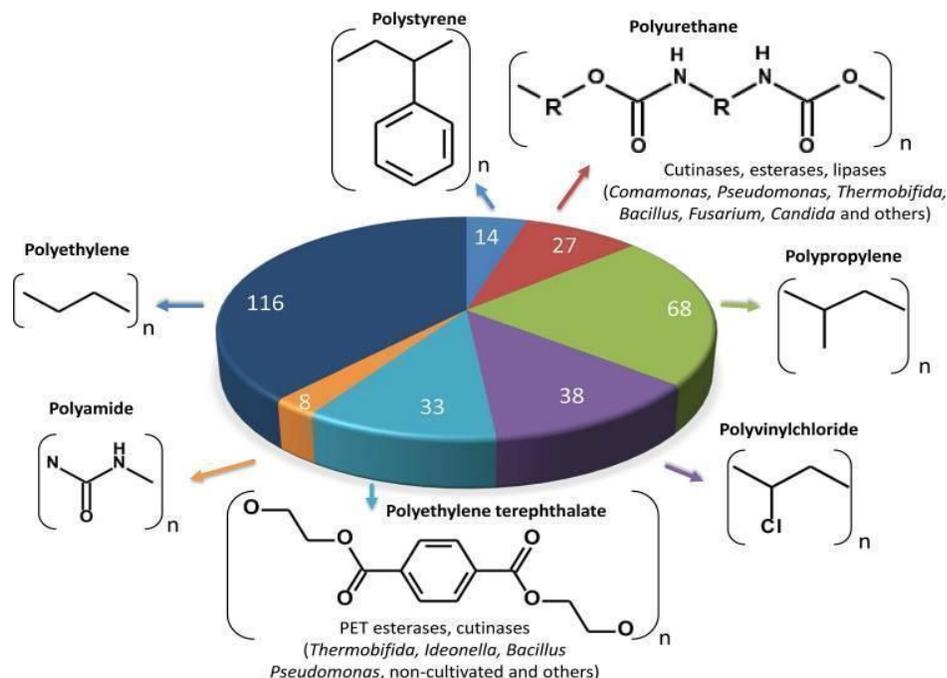
1 Marco teórico

1.1 Generalidades acerca de los plásticos

La palabra plástico proviene del griego “*Plastikos*” que significa sustancia que se puede moldear en cualquier forma (Ghosh *et al.*, 2013). Químicamente, los plásticos son polímeros conformados por largas cadenas de hidrocarburos cuyo peso molecular es elevado; su origen puede ser vegetal, animal, mineral o artificial a partir del petróleo y gas natural; su clasificación varía dependiendo del tamaño de las moléculas o de su estructura química (Posada, 2012; Shimao, 2001).

Para el año 2013 la producción de plástico a nivel mundial alcanzaba los 299 millones de toneladas, 200 veces más de lo que se produjo para el año 1950, este aumento se atribuye principalmente a la importancia que han tomado estos productos en la cotidianidad de los hogares, pues su uso involucra desde productos electrónicos, tuberías de suministro y drenaje de agua, revestimiento de cableados hasta empaques y contenedores (S. S. Yang *et al.*, 2021; S. S. Yang, Brandon *et al.*, 2018; S. S. Yang, Wu, *et al.*, 2018). Por otro lado, el plástico juega un rol clave a nivel económico por su bajo costo frente a otros materiales, durabilidad y múltiples usos. Danso *et al.*, reportan que para el año 2016 (2019) los polímeros que más se produjeron a nivel mundial fueron el Poliuretano (PUR), Polietileno (PE), Poliamida (PA), Tereftalato de polietileno (PET), Cloruro de polivinilo (PVC), Polipropileno (PP) y Poliestireno (PS), siendo este último el que más se destaca a nivel nacional (**Figura 1**).

Figura 1. Principales polímeros sintéticos producidos a nivel mundial en 2016.



Los números en el gráfico indican la producción anual a nivel mundial de cada polímero. Adaptado de (Danso *et al.*, 2019).

1.1.1 Poliestireno

El poliestireno es un polímero que se obtiene a partir de la destilación del petróleo y está compuesto principalmente por partículas o perlas de estireno y un agente que aumenta la densidad del producto, que generalmente es un hidrocarburo líquido volátil (NOVA Chemicals®, 2017).

Desde la década de los 70's los polímeros sintéticos derivados del petróleo han ido sustituyendo de forma sustancial a los materiales de origen natural; por su versatilidad, bajo costo y durabilidad, se han convertido en un producto básico y cotidiano para la sociedad (ACRR-ASOC. *et al.*, 2004; Haider *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2008). El polímero conocido como Poliestireno Expandido (EPS), por ejemplo, reemplaza en muchos casos el uso de metales y compuestos cerámicos (Haider *et al.*, 2019). Otras características del PS, que le dan ventaja sobre otros materiales es la rigidez, funciona como aislante térmico y es impermeable al agua (Daviran, 2017).

A nivel nacional, el PS es comercializado por la Industria Colombiana de Porosos con el nombre de ICOPOR y se puede hallar de dos formas, ya sea extruido (XPS) o expandido

(EPS); el primero es más denso y forma parte de empaques como las bandejas de frutas en los supermercados y el segundo es más liviano y se encuentra en forma de esferas, principalmente para soportar el embalaje de productos delicados. Ambos tipos de PS tienen una composición química similar (95% Polímeros de estireno y 5% de gas) (NOVA Chemicals®, 2017; Sánchez, 2017).

Pese a sus bondades, los residuos que se generan al producir el PS y la disposición final inadecuada de los mismos lo convierten en un material altamente contaminante para la mayoría de los ecosistemas del planeta. Una característica particular del PS es que no se degrada fácilmente, puede permanecer sin cambios en su estructura por largos periodos de tiempo, cerca de 100 a 1000 años, lo que hace que sea propenso a acumularse en las superficies y, por ende, pueda ser ingerido por diferentes especies de animales provocando ahogamientos, intoxicaciones y en el peor de los casos la muerte. Por otro lado, cuando este material se calienta, libera Dioxinas y Estireno, sustancias que se han encontrado, son cancerígenas. En cuanto a los humanos, diversos autores sugieren que componentes expansores del PS como el Pentano, Isopentano y/o Ciclopentano pueden llegar a generar conjuntivitis, dermatitis, cefaleas, náuseas y afecciones respiratorias altas y bajas cuando se inhalan en altas concentraciones (NOVA Chemicals®, 2017).

1.1.2 Degradación del Poliestireno

En la industria se describe con esta palabra a los cambios no deseados en las características y propiedades de los polímeros, como consecuencia del paso del tiempo o de la exposición a factores que al actuar de forma individual o en conjunto pueden cambiar las propiedades originales de los mismos; algunos de estos pueden ser físicos, como altas temperaturas que los funden o los inflaman, químicos, mecánicos, radiantes y biológicos (Posada, 2012). Dentro de los métodos más utilizados para degradar plástico se puede encontrar la aplicación de temperaturas elevadas al material, con el objetivo de fundirlo; aunque este método es eficiente, al final produce grandes cantidades de Dioxina o precursores de estas como el Fenol Halogenado, materiales altamente nocivos para el ambiente (Tang *et al.*, 2017).

En la actualidad y en un intento por mitigar el impacto negativo que tiene el PS sobre el ambiente, los investigadores y la industria han dirigido sus esfuerzos en identificar alternativas para degradar el mismo, tales como los Biodegradadores, microorganismos

capaces de transformar el PS en Dióxido de carbono, metano, compuestos inorgánicos, agua y biomasa (Tang *et al.*, 2017; Téllez, 2012).

1.1.3 Biodegradación

La biodegradación es un proceso mediante el cual microorganismos, principalmente bacterias y hongos transforman o alteran la estructura química, la forma y el peso molecular de sustancias que se encuentran presentes en el ambiente utilizando diversos mecanismos de hidrólisis enzimática y no enzimática (Lovley, 2003; Przemieniecki *et al.*, 2020). Los procesos de biodegradación varían y los mecanismos utilizados son complejos, el físico, por ejemplo, abarca factores químicos y biológicos (Cao & Wang, 2009).

Para el caso de los plásticos, se reportó en algún momento que estos eran nocivos para los microorganismos, hoy día se sabe que diversos aislados microbianos utilizan el plástico como fuente de alimento y sin tener repercusiones significativas en su peso (Sun *et al.*, 2022). Por otro lado, los microorganismos pueden utilizar diferentes estrategias para degradar el plástico, de forma aeróbica en la naturaleza, anaeróbica en sedimentos y vertederos y parcialmente aeróbica en abonos y suelo (Tipney *et al.*, 2009). En el caso de la biodegradación aeróbica, los microorganismos usan el oxígeno como receptor de electrones y descomponen las moléculas orgánicas en compuestos más pequeños como CO₂ y moléculas inorgánicas como el agua (Priyanka & Archana, 2011). La biodegradación anaeróbica es la descomposición de contaminantes orgánicos en ausencia de oxígeno, en este caso las bacterias utilizan como receptores finales de electrones, sustancias como nitrato, sulfato, hierro, manganeso y dióxido de carbono con el fin de para convertirlos en elementos más pequeños como Carbono (C) Plástico (CH₄+ CO₂ + H₂O + C residual + Biomasa) (Przemieniecki *et al.*, 2020).

Algunos de los plásticos más susceptibles a la degradación por microorganismos son Poliésteres, Polihidroxibutirato (PHB), Policaprolactona (PCL), Ácido Poliláctico (PLA), Poliuretano (PUR), Alcohol Polivinílico (PVA), Nylon y Polietileno (PE) (Shimao, 2001). Aunque, cabe destacar que dependiendo del tipo de polímero, así será el mecanismo de degradación a utilizar por parte de los microorganismos y su eficiencia en el proceso, ya que propiedades físicas como la cristalinidad y orientación y propiedades morfológicas como el área de superficie pueden afectar la tasa de degradación (Kale *et al.*, 2015).

Según Kale *et al.* (2015) el mecanismo principal para la biodegradación de polímeros de alto peso molecular como el plástico sintético es la oxidación o hidrólisis enzimática, con el fin de crear grupos funcionales que mejoren la hidrofobicidad de sus componentes. Por otro lado, polímeros más estables como el Polietileno (PE) no pueden ser degradados fácilmente por los microorganismos; aunque se ha informado que los oligómeros de PE de peso molecular menor o igual 600-800 gr/mol pueden ser degradados parcialmente por especies de bacterias como *Actinobacter* utilizando mecanismos como la hidrobiodegradación y oxobiodegradación (Ghosh *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2018).

A diferencia del PE, otros materiales como el Polipropileno (PP) se degradan fácilmente al exponerse a temperaturas altas y a la radiación ultravioleta generada por la luz solar. Sin embargo, la comunidad científica también ha explorado el uso de Biodegradadores y ha encontrado que en comunidades microbianas donde hay presencia de hongos como *Aspergillus niger* y bacterias como *Pseudomonas sp.* y *Vibrio sp.*, que pueden degradar el PP; estos transforman el material en grupos más pequeños como carbonilos y carboxilos (Sivan, 2011; Fesseha & Abebe, 2019). Finalmente, se encontró que respecto a polímeros de bajo peso molecular como el Cloruro de polivinilo (PVC) hay poca información acerca de la biodegradación, lo que se sabe es que este puede ser atacado por hongos de pudrición blanca (Imre & Pukánszky, 2013).

A la fecha son numerosos los reportes sobre microorganismos degradadores de plástico e hidrocarburos complejos, en biomoléculas más simples; especialmente hongos del género *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus niger*; bacterias gram positivas y negativas tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas* (**Tabla 1**) (Bhardwaj, H; Gupta R. 2013).

Bhardwaj y Gupta (2013) y (Ahmed *et al.*, 2018) reportan diferentes investigaciones en donde se encuentran microorganismos y enzimas involucradas en la degradación de plástico en distintos medios, siendo *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Firmicutes* los más comunes (**Anexo 2**). Cabe destacar la mayoría de microorganismos están relacionados con la degradación de Polietileno y no de EPS.

Tabla 1. Microorganismos asociados a la degradación de materiales plásticos adaptado de (Urbanek *et al.*, 2018).

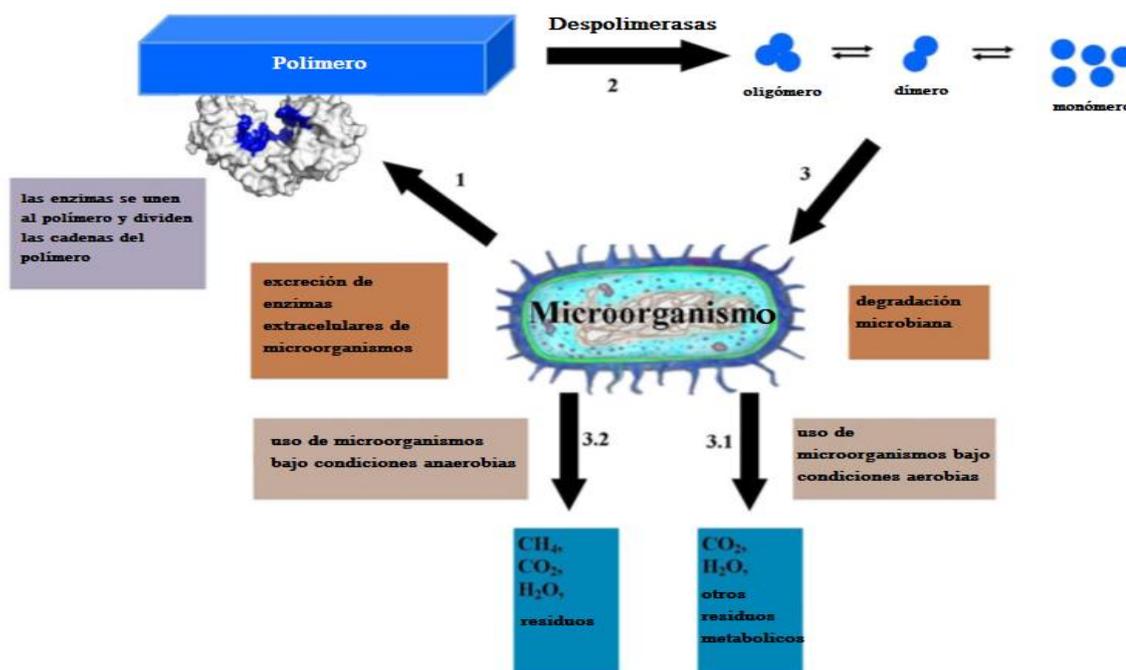
Microorganismo	Fuente	Plástico	Referencia
<i>Shewanella</i> sp. <i>Moritella</i> sp. <i>Psychrobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Sedimentos de aguas profundas, fosas de Kunle y Japón.	PCL	Sekiguchi <i>et al.</i> (2010)
<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i>	Zonas bentónicas de ambientes marinos.	PVA-LLDPE	Raghul <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Clonastachys rosea</i> <i>Trichoderma</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp.	El suelo ártico	PCL, Bolsas a base de patata y almidón de maíz.	Urbanek <i>et al.</i> (2017)
<i>Zalerion maritimum</i>	Ambiente marino	PS	Paco <i>et al.</i> (2017)
<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus</i> sp.	Costa de Kovalam frente a la bahía de Bengala.	LDPE	Pramila y Vijaya Ramesh (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aguas profundas de la prefectura de Tollori y mar adentro en la bahía de Toyama	PCL	Sekiguchi <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Alcanivorax</i> sp. <i>Tenacibaculum</i> sp.	Aguas profundas	Fibras monofilamentosas de PCL, PHB/V, PBS.	Sekiguchi <i>et al.</i> (2011)
<i>Phormidium</i> sp. <i>Lewinella</i> sp.	Comunidades microbianas adheridas a botellas de PET sumergidas en el mar del norte frente a la costa del Reino Unido	PET	Oberbeckmann <i>et al.</i> (2016)
<i>Phormidium</i> sp. <i>Rivularia Stanieria</i> <i>Pseudophormidium</i> sp	Microplástico del Atlántico norte	PP, PS	Zettler <i>et al.</i> (2013)
<i>Pseudophormidium</i> sp. <i>Phormidium</i> sp.	Partículas de plástico recolectadas frente a las costas del Reino Unido, Alemania y Dinamarca	PP, Ps	Oberbeckmann <i>et al.</i> (2014, 2016)
<i>Stanieria</i> , <i>Pseudophormidium</i>	Comunidades microbianas adheridas al PET bebible	PET	Oberbeckmann <i>et al.</i> (2014)
<i>Proteobateriasa</i> <i>Bacterioides</i> sp.	Microplásticos recolectados de parte del mar de Bélgica	Microplástico	De Tender <i>et al.</i> (2015)

<i>Arcobacter</i> sp. <i>Colwellia</i> sp.	Sedimentos de la costa marina de Reino Unido	LDPE	Harrison <i>et al.</i> (2011)
---	--	------	-------------------------------

1.1.4 Mecanismos de biodegradación

Cuando se habla de microorganismos biodegradadores, se debe tener en cuenta los mecanismos por los cuáles logran llevar a cabo estos procesos. Dada la composición química de los polímeros y su insolubilidad en medios acuosos, resulta imposible para los microorganismos movilizar este material a través de sus membranas celulares externas para incluirlas en su metabolismo. Para poder romper estas moléculas, los microorganismos desarrollaron mecanismos más eficientes, donde utilizan enzimas extracelulares como las despolimerasas presentes en algunas bacterias (Ahmed *et al.*, 2018) (**Figura 2**).

Figura 2. Mecanismos de biodegradación microbiano del plástico utilizando enzimas despolimerasas.

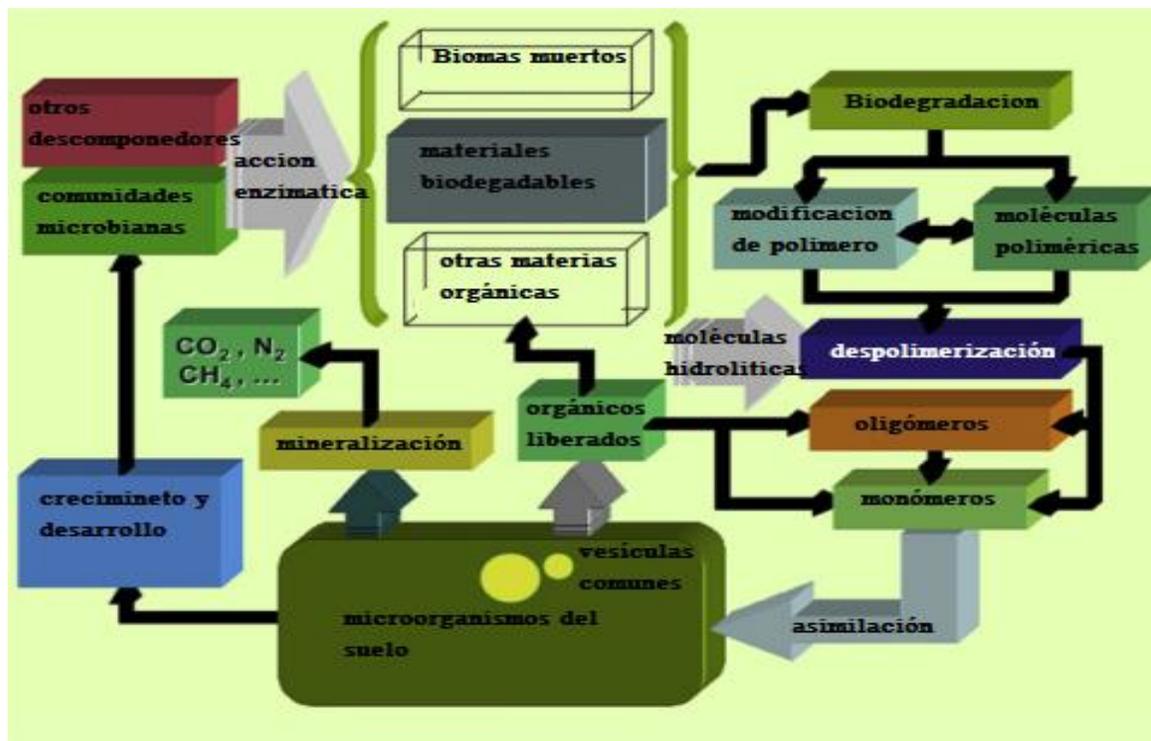


Adaptado de (Ahmed *et al.*, 2018).

Cuando los microorganismos se exponen a la presencia de plástico se desencadena una serie de pasos que según (Fesseha & Abebe, 2019) implica: La acción y adhesión de las comunidades microbianas y otros microorganismos a la superficie del polímero, siempre y cuando este sea hidrofílico; esta adhesión implica un deterioro físico y químico que resulta

en una degradación superficial; luego inicia la degradación del polímero en fragmentos más pequeños como oligómeros, dímeros o monómeros, por acción catalítica de diferentes ectoenzimas u oxidativas de los radicales libres que secretan los microorganismos. Finalmente se da el crecimiento del microorganismo utilizando estos compuestos más pequeños como fuente de carbono y energía (**Figura 3**) (Bornscheuer, 2002; Lucas *et al.*, 2008; Nomura *et al.*, 1998; Premraj & Doble, 2005; Rujnić-Sokele & Pilipović, 2017).

Figura 3. Sistema de degradación de plásticos de diferentes microorganismos



Adaptado de (Lucas *et al.*, 2008).

1.2 *Zophobas morio*

Nombre común: Gusano rey – gusano de la harina.

Orden: Coleóptera

Familia: Tenebrionidae

Género: *Zophobas*

Especie: *Z. morio*

Nombre científico: *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae).

Este escarabajo se puede encontrar ampliamente distribuido en zonas de Centro y Sudamérica, aunque países como Estados Unidos y algunos de Europa lo cultivan como una fuente de proteína alternativa. El tamaño de *Z. morio* puede variar dependiendo del estadio en el que se encuentre, los huevos por ejemplo miden alrededor de 1,2 a 1,4 mm de largo, son de color blanco y duran en esta etapa cerca de 8-12 días. Las larvas miden entre 1,2 a 2,5 mm al nacimiento, son de color amarillo y duran en esta etapa más o menos 6 semanas, al final de este estadio las larvas pesan aproximadamente 1,5 a 5g y miden entre 5 y 6 mm. Las pupas miden de 28 a 30mm y pasan de 2 a 3 semanas hasta que se convierten en un escarabajo adulto que puede llegar a medir de 30 a 34 mm de largo, 10-12 mm de ancho, se tornan de color negro y viven más o menos un 1 año. *Z. morio* presenta varias particularidades, entre las que se destaca un marcado dimorfismo sexual, donde la hembra es más grande que el macho; su estilo de vida es nocturno y de día prefieren estar en lugares oscuros; finalmente en los eventos reproductivos, la hembra puede llegar a colocar cerca de 400 huevos en cada uno (Schulte, 2006). De acuerdo con Daviran (2017) *Z. morio* es un coleóptero resistente que puede sobrevivir a base de alimentos con bajo contenido de humedad, conservando su propia agua y evitando excretar. En condiciones adversas se puede presentar el canibalismo entre especímenes de las mismas o diferentes fases biológicas.

Adicionalmente, se ha reportado que las larvas de *Z. morio* pueden sobrevivir en condiciones donde el EPS es la única fuente alimento. Recientemente, algunos autores descubrieron que las larvas de este escarabajo convertían cerca del 37% del plástico consumido en CO₂ (Yang *et al.*, 2020). Aunque faltan datos acerca de *Z. morio* la especie más cercana de referencia que se tiene es *Tenebrio molitor* cuyas larvas también pueden alimentarse de EPS como única fuente de alimento y pasar con éxito por todas las etapas que supone su ciclo de vida (Ramos, 2008; Yang *et al.*, 2015).

En una investigación realizada con larvas de *Z. morio*, las cuáles fueron alimentadas con 34 y 39 mg de estireno diarios, se obtuvo que el material fue degradado en un periodo de 24 horas, posterior a esto las larvas vivieron durante un mes y convirtieron el 47,7% de carbono del estireno en CO₂ y lo demás en material biodegradable (Yang, 2015).

1.3 Metagenómica

La Metagenómica es el análisis del ADN genómico de toda una comunidad presente en una muestra, para su comprensión se requiere aislar todo el ADN e identificar los genomas, genes y proteínas más relevantes de cada una de las muestras analizadas (Fuente, 2015), lo que difiere de la genómica, que es el análisis de ADN genómico de un organismo o célula individual (Gilbert & Dupont, 2011).

Con relación al estudio de microorganismos, la Metagenómica se ha centrado en evaluar la diversidad de los mismos y sus funciones dentro del ecosistema o muestra donde se encuentran. La mayoría de los estudios giran en torno a la caracterización taxonómica de una comunidad microbiana, bien sea mediante el empleo de un gen específico, como lo es el Ácido ribonucleico ribosomal (RNAr por sus siglas en inglés) 16S o mediante el uso de la secuenciación aleatoria, que se divide en dos grupos técnicamente distintos; por un lado, la secuenciación basada en la clonación utilizando vectores, cromosomas bacterianos artificiales de gran tamaño (10-100 Kpb) o el uso de vectores plasmídicos para insertos pequeños (<5 Kpb). Estas técnicas de aislamiento de ADN basadas en vectores están diseñadas principalmente para la expresión y secuenciación heteróloga. El otro tipo de secuenciación se denomina directa y está basada en las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés), las cuales no utilizan clonación para el aislamiento del ADN, sino que se basan en la fragmentación y captura de ADN a través de diversas estrategias de ligación (Gilbert & Dupont, 2011). Independientemente de la metodología que se elija a seguir, la clave para realizar un estudio de metagenómica con éxito es la extracción del ADN.

Los avances en las tecnologías de secuenciación (NGS) han dado lugar a procedimientos más rápidos y económicos, ya que con estas se puede reconstruir todo el genoma de microorganismos como bacterias y arqueas sin la necesidad conocerlas previamente, así como obtener secuencias contiguas más largas, a partir de algoritmos de montaje de gran alcance (Thomas *et al.*, 2012). Por otro lado, los avances también se dan en las plataformas utilizadas para secuenciar; actualmente, las más comunes para estudios de Metagenómica son Illumina/Solexa y la tecnología de pirosecuenciación 454/Roche. La tecnología de Illumina/Solexa se basa en la secuenciación por síntesis de moléculas unidas a una

superficie donde los grupos clonales se generan a través de un puente de amplificaciones, esta plataforma puede generar 2-3 billones de secuencias de 150 pb de longitud, mientras que el sistema de pirosecuenciación 454/Roche, está basado en una PCR de emulsión para amplificar fragmentos de ADN al azar, que posteriormente se unen a perlas microscópicas y finalmente son secuenciados. Esta tecnología actualmente puede generar aproximadamente un millón de secuencias de entre 500-800 pb de longitud por corrida. (Hernández *et al.*, 2016).

Para realizar un estudio de Metagenómica se deben tener en cuenta aspectos como tamaño y número de muestra, filtración de datos y grabación de metadatos.

1.3.1 Tamaño y número de muestras

El primer paso en un estudio de Metagenómica es obtener la muestra ambiental y determinar el tamaño y el número de muestras a emplear, teniendo en cuenta que estas deben representar a la población de la que se toman. Para estimar la población y la diversidad de la misma se suelen utilizar curvas de rarefacción las cuales trazan el número de especies en función del número de individuos muestreados. La curva generalmente comienza con una pendiente pronunciada dada por la aparición de todas las especies presentes, a medida que se descubren menos especies por muestra comienza a aplanarse; cuanto más suave es la pendiente, menor es la contribución del muestreo al número total de unidades taxonómicas operativas (OTU por sus siglas en inglés). Para muestras microbianas las OTU se caracterizan típicamente por ADNr 16S en procariotas o 18S en eucariotas (Wooley *et al.*, 2010).

1.3.2 Filtración

Existen dos tipos de filtrado, uno inicial, donde lo que se busca es descartar todo lo que no sea bacterias, como por ejemplo protistas o agentes virales, posterior a la secuenciación se puede realizar otro filtrado, pero este es de tipo computacional, en este caso se busca el material genómico de las muestras de interés. En este punto, se debe tener especial cuidado con los falsos negativos y positivos, en el caso de los negativos es descartar material genómico relevante que puede filtrarse porque los homólogos no se han depositado en las bases de datos existentes; respecto a los positivos, ocurre cuando en el material filtrado pasan genomas de eucariotas cuando sólo se va a analizar material

procariota. Es de destacar, que durante este paso también se puede detectar contaminación en las muestras (Wooley *et al.*, 2010).

1.3.3 Grabación de metadatos

Los metadatos son los datos precisos de la investigación tales como hora del muestreo y como fueron obtenidos esos datos, por ejemplo, en un muestreo realizado en agua serían la profundidad, la salinidad, la intensidad de la luz, las coordenadas geográficas, el pH, etc. En ecología microbiana, esto se refiere a características físicas, químicas y ambientales de la ubicación de la muestra (Wooley *et al.*, 2010). Muchas investigaciones en Metagenómica tienen como interés el descubrimiento de nuevos datos y la correlación estadística de estos con otros previamente reportados, que pueden llegar a tener relevancia biológica. Por esto, es importante proporcionar metadatos completos, estandarizados y susceptibles de ser computarizados (Wooley *et al.*, 2010).

1.3.4 Secuenciación

Para realizar la secuenciación del ADN primero se divide el contenido de ADN de una réplica genómica en fragmentos aleatorios. A continuación, los fragmentos se clonan en vectores de plásmidos que se cultivan en bibliotecas monoclonales para producir suficiente material genómico para la secuenciación. Después, se debe secuenciar el ADN y se repite el proceso para asegurarse que el genoma estudiado se secuencie varias veces. Luego, se utiliza un software de ensamblaje para ensamblar los fragmentos de secuencia en todo el genoma. Teóricamente, cualquier genoma de un tamaño menor de 5 Mbp se puede ensamblar de esta forma, aunque las regiones con grandes repeticiones tienden a frustrar los algoritmos de ensamblaje. Por lo tanto, las regiones con grandes repeticiones a menudo no se incorporan a la imagen genómica completa, lo que deja algunas lagunas (Sorek *et al.*, 2007)

En el estudio de microbiomas, el método para secuenciar más utilizado es Shotgun ambiental o ESS que proviene del uso de secuenciación en genómica de cultivos clónales, pero en este caso el material genómico proviene de una comunidad de microorganismos y no de uno solo, por eso en Metagenómica se utiliza la secuenciación Shotgun de la misma manera que en cultivos clónales pero con resultados de poblaciones múltiples mucho más útiles (Wooley *et al.*, 2010).

De acuerdo a la capacidad para tomar muestras, es posible que el secuenciar las muestras de ADN sólo se obtenga una aproximación genómica parcial de los organismos presentes en el medio, esto debido a que el material genómico de las especies más abundantes va a dominar en la muestra. Si se separan las muestras procariotas y eucariotas en una comunidad y se utilizan cebadores universales, se obtendrá una mejor imagen genómica. Cabe señalar que cuando se utilizan cebadores para el ADNr para clasificar las OTU en una muestra ambiental, hay que hacer elecciones con respecto a la secuencia del cebador, especialmente cuando se espera que la composición de OTU estudiada difiera significativamente de la mayoría de las especies conocidas, las denominadas biosferas raras o poco comunes.

1.3.5 Ensamblaje del metagenoma

El ensamblado se basa en el solapamiento de las secuencias para reconstruir secciones completas y contiguas de ADN (contigs), con la finalidad de armar genomas completos. Muchas veces los “contigs” no son lo suficientemente grandes para abarcar toda una región, por lo tanto, no pueden ensamblarse. Dado esto, se prefiere que los fragmentos producidos por la secuenciación sean grandes así el ensamblado será más fácil (Argüello *et al.*, 2014).

Por otro lado, una vez obtenido el ensamblado es necesario que las secuencias que conforman una región se encuentren secuenciadas varias veces, a esto se le conoce como profundidad de la cobertura de secuenciación y un genoma completo se considera confiable si tiene más de seis repeticiones (6X) (Argüello *et al.*, 2014).

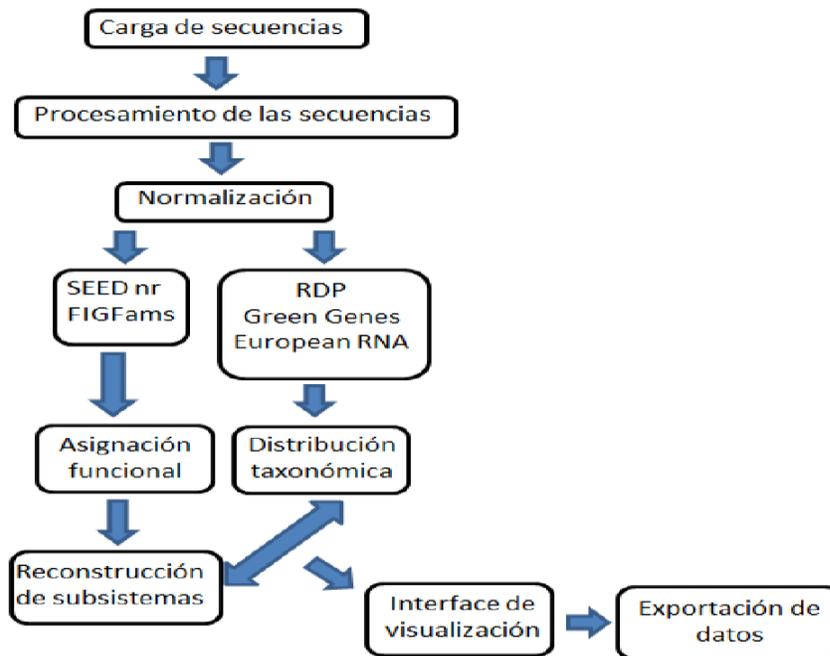
1.3.6 Metagenómica comparada

Existen varios programas bioinformáticos para comparar la composición de OTUs de dos o más muestras como MEGAN, MG-RAST, IMG/M y RAMMCP; estos programas proporcionan un análisis comparativo funcional basado en la secuencia para las muestras cargadas (Buchfink *et al.*, 2014; White *et al.*, 2009).

Respecto a bases de datos, las opciones para datos obtenidos de metagenomas son muy variados, por ejemplo, el servidor MG-RAST o *Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology* por sus siglas en inglés se basa en el concepto de subsistemas y

los datos establecidos por los equipos FIG (*Fellowship for Interpretation of Genomes* por sus siglas en inglés) y NMPDR (*The National Microbial Pathogen Database Resource* por sus siglas en inglés). Esta herramienta permite cargar datos propios obtenidos de estudios de Metagenómica para realizar un análisis automatizado y un almacenamiento de los datos. En este, el análisis de los datos se lleva a cabo en varias etapas (**Figura 4**).

Figura 4. Esquema de flujo de trabajo implementado en la plataforma MG-RAST



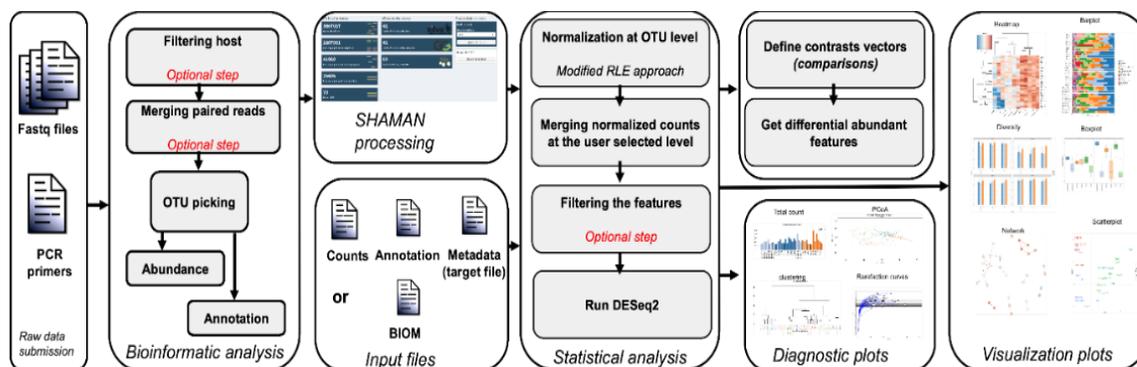
Donde se muestran las principales etapas del procesamiento de datos adaptado de Calderoli, 2016.

Otros programas como SHAMAN son útiles para el análisis diferencial de datos metagenómicos (16S, 18S, 23S, 28S, ITS y WGS) que incluye el tratamiento bioinformático de lecturas sin procesar para Metagenómica dirigida, análisis estadístico y visualización de resultados con una gran variedad de gráficos (diagramas de barras, diagramas de caja y mapas de calor).

El tratamiento bioinformático de los datos a partir de SHAMAN se realiza utilizando el paquete Vsearch, ya que es rápido y preciso (Rognes *et al.*, 2016). Por otro lado, para realizar análisis estadísticos, una opción viable es el paquete DESeq2 de R, que identifica de manera sólida las características diferenciales de las OTUS (Huse *et al.*, 2007)

SHAMAN identifica con firmeza los géneros más abundantes con el Modelo Lineal Generalizado implementado en DESeq2 (Love, 2014). SHAMAN presenta varias ventajas y es que es compatible con formatos estándar para análisis Metagenómico tales como csv, tsv y biom. Adicionalmente, las figuras se pueden descargar en varios formatos. A continuación, en la **Figura 5** se muestra el flujo de trabajo global del programa SHAMAN.

Figura 5. Diagrama de flujo de trabajo global de la aplicación SHAMAN.



Respecto a bases de datos, ONE CODEX es una de las más comunes en cuanto a microbiomas, actualmente es la más grande del mundo y puede respaldar millones de muestras, desde la secuenciación hasta el análisis de datos y la presentación de informes. ONE CODEX proporciona estructura a conjuntos de datos complejos, respondiendo preguntas como: ¿Qué microbios están presentes? y ¿Qué función cumplen? (Onecodex)

1.4 Aplicaciones de la metagenómica en el mundo microbiano

Los estudios de Metagenómica y posteriores análisis funcionales han permitido identificar nuevas enzimas, antibióticos y muchas otras moléculas de interés en diversos campos. La Metagenómica ha facilitado el descubrimiento de nuevas genomas, los cuales brindan una idea sobre la estructura de las comunidades microbianas y su función en el medio ambiente (Hernandez *et al.*, 2016).

En campos como el de la biorremediación, este tipo de estudios es clave ya que el éxito de esta depende de la identificación de los microorganismos presentes en el sitio

contaminado, la investigación de sus capacidades metabólicas y del entendimiento de los potenciales cambios en la comunidad microbiana en respuesta a las alteraciones en los factores ambientales (Lovley, 2003). En gran medida, gracias a la Metagenómica se han proporcionado datos esenciales sobre los mecanismos moleculares y biológicos implicados en la biorremediación de ambientes contaminados como las transformaciones enzimáticas de los metales que incluyen la oxidación, reducción, metilación y desmetilación (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

1.5 Metagenómica y gusano de la harina (*Tenebrio molitor*).

Algunos estudios de Metagenómica como el de Bae *et al.*, en el (2021) realizados en gusanos de la harina alimentados con salvado de maíz y EPS revelaron que estos escarabajos pueden ingerir y degradar el plástico, para poder lograr esto los microorganismos intestinales juegan un papel clave. Estos autores, también encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal entre el grupo alimentado con salvado (15 especies) y el grupo alimentado con EPS (siete especies).

En estudios realizados sobre índices de biodiversidad se encontró que en el tracto gastrointestinal de insectos y escarabajos, hubo una alta presencia del taxón *Spiroplasma* sp., el cual es necesario para el buen funcionamiento del sistema digestivo de insectos; también se encontró especies como *Lactococcus garvieae* y *Cronobacter sakazaki* que se sugiere, pueden ser microorganismos claves para la degradación del EPS (Bae *et al.*, 2021; Brandon *et al.*, 2018; Jung *et al.*, 2014; Nukmal *et al.*, 2018; Przemieniecki *et al.*, 2020).

En estudios realizados para analizar la densidad de población, se observó que microorganismos como *Cronobacter sakazakii*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae aumentaron su población en un 24,7 % cuando fueron alimentados con EPS (Bae *et al.*, 2021). Otros autores como (Henry & Fouladkhah, 2019) también sugieren que *C. sakazakii* puede crecer en superficies abióticas como acero inoxidable o plástico de poliéster. Otras familias como la Streptococcaceae presentan reportes similares, aunque se obtuvo un mayor aumento de la población en las bacterias alimentadas con EPS que con salvado (Peng *et al.*, 2020). Otros estudios al analizar el gen 16s del ARNr sugieren que microorganismos como las *Aeromonas* sp., y *Klebsiella*

pneumoniae tienen un crecimiento satisfactorio cuando se alimentan de PS (Tang *et al.*, 2017).

Algunos reportes respecto a la población de microorganismos presentes en el intestino de gusanos de la harina alimentados con EPS son aquellos pertenecientes al género *Lactococcus* (Nukmal *et al.*, 2018; Przemieniecki *et al.*, 2020). Sin embargo, estudios similares reportan que la densidad de población del género *Lactococcus* es baja, independiente de la dieta recibida (Brandon *et al.*, 2018).

2 Metodología

En este estudio se realizó un análisis de metagenómica a partir de muestras del tracto digestivo de larvas de *Z. morio* alimentadas con EPS (**Figura 6**) y avena. Las larvas empleadas en este estudio se adquirieron en una casa comercial para productos de pesca. Posterior a la adquisición, cuando se recibieron las larvas se sometieron a un ayuno de tres días para limpiar el tracto digestivo y se dividieron en dos grupos. El primer grupo de larvas fue alimentado con una dieta a base de avena y el segundo grupo fue alimentado exclusivamente con EPS comercial. Con el objetivo de proporcionar humedad a las dietas, se añadieron trozos de naranja al contenedor de larvas alimentadas con avena y aspersion con agua cada dos días a las larvas alimentadas con EPS. Finalmente, los contenedores con los grupos experimentales fueron incubados durante un periodo de seis meses a una temperatura de 25°C y una humedad del 70%.

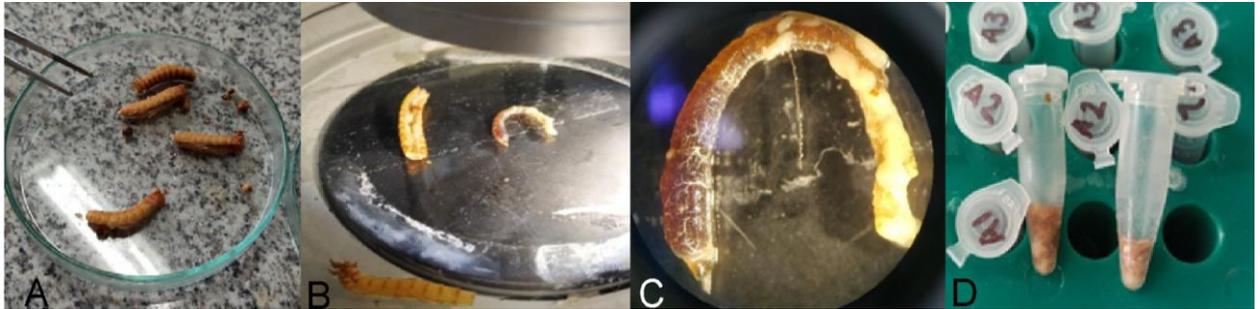
Figura 6. Cría de larvas de *Z. morio* alimentadas con EPS.



Pasados los seis meses las larvas se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira donde se realizó una extracción del tubo digestivo, para este proceso cada larva fue puesta en una caja de Petri y luego se llevó a -80 °C durante 5 minutos para bajar su metabolismo y evitar el sufrimiento del

animal. A continuación, con un bisturí se cortó cabeza y cola (**Figura 7**) y luego se abrió los laterales de la larva que es la zona donde se unen las escamas del cuerpo. Con ayuda de unas pinzas se extrajo el tubo digestivo, el cual se limpió con agua destilada y se eliminó el exceso de grasa circundante; el tubo se partió en trozos y se depositó en un tubo Eppendorf y se almacenó en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 7. Proceso de extracción de tubos digestivos de larvas de *Z. morio*



A) Corte lateral de larvas, B y C) tubo digestivo extraído y D) Tubos digestivos almacenados en tubos para microcentrífuga.

2.1 Extracción de ADN total

Se utilizó el kit comercial DNAeasy PowerSoil Kit (Qiagen, USA) para extraer el ADN genómico de tres muestras para el tratamiento con avena (A) y cinco para el que incluía EPS (P); cada muestra contenía cuatro tractos digestivos de las larvas. Cada extracción de ADN se realizó de forma independiente con el fin de evitar contaminación cruzada. La calidad y cantidad del ADN extraído fueron determinadas mediante electroforesis en geles de agarosa y empleando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Colibri Eppendorf). El ADN extraído fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

2.2 Secuenciación masiva empleando amplificaciones y genomas completos.

Previo a la secuenciación se realizó un prechequeo de la calidad de las muestras de ADN, a través de PCR (*Polymerase Chain Reaction* por sus siglas en inglés) con los cebadores 341F: (5'CCTAYGGGRBGCASCAG3') y 806R: (5'GGACTACNNGGGTATCTAAT3'), en un cóctel de $1\text{ }\mu\text{l}$ de ADN genómico, $3,9\text{ }\mu\text{l}$ de agua HPLC (*Ligh Pressure Liquid Chromatography* por sus siglas en inglés) estéril, $5,0\text{ }\mu\text{l}$ 2,0X Hot Master Mix (Qiagen) y

0,05 µl de cada cebador para una concentración final de 5 µl. El ciclo para la PCR tuvo una desnaturalización inicial a 95 °C durante tres minutos, seguida por 30 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95 °C durante 45 segundos. El alineamiento se dio a 50 °C por 45 segundos y la extensión a 68 °C por 90 segundos. Finalmente se realizó una última extensión a 68 °C por 5 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mezclando el mismo volumen de estos con el buffer de carga 1X (SybrSafe), los cuales fueron cargados para la separación electroforética en un gel de agarosa al 2% por 30 minutos a 100 voltios.

Una vez verificada la amplificación del ADN extraído y con el fin de determinar la composición taxonómica y abundancia relativa de bacterias, las muestras fueron enviadas a secuenciar con la plataforma Illumina® MiSeq con una cobertura de 466 pb. PE y 20.000 lecturas por muestra para las regiones variables V3-4 del gen ARN 16S con los cebadores 341F: 5'CCTAYGGGRBGCASCAG3' y 806R: 5'GGACTACNNGGGTATCTAAT3'.

Adicionalmente, una de las muestras de ADN fue enviada a secuenciar con el sistema HiSeq2500 de Illumina® para la obtención del Metagenoma. La biblioteca se construyó para tener secuencias de 350 pb de longitud y con 25 pb de superposición parcial entre pares de lecturas (150 pb para forward y 150 pb para reverse). Como resultado se obtuvo un rendimiento de 6 Gb de información, con una calidad de Q30 > 80% de las lecturas (Shelomi *et al.*, 2019).

2.3 Análisis bioinformáticos

2.3.1 Composición taxonómica y abundancia relativa de bacterias.

Los análisis de Metabarcoding para el gen ARNr 16S se realizaron empleando la plataforma bioinformática SHAMAN (<https://shaman.pasteur.fr/>) que permite realizar la asignación taxonómica de OTU y determinar su abundancia relativa a través de análisis estadísticos.

El flujo de trabajo para realizar los análisis bioinformáticos fue el siguiente:

1. Se filtraron y se descartaron las lecturas de microbiomas que se alineaban con el genoma de *Z. morio*, pero que no eran de interés. Esto se llevó a cabo utilizando la

herramienta Bowtie2. Posteriormente la calidad de las lecturas fue verificada mediante AlienTrimmer, un software para recortar secuencias contaminantes.

2. Finalmente, las lecturas de los extremos emparejados fueron fusionados utilizando el software Pear.
3. Utilizando Vsearch se realizó la selección y cuantificación de OTUs, así como la anotación taxonómica. El proceso de selección de OTUs constó de cinco pasos.
 - “Dereplication” identificación de grupos de genomas idénticos o similares.
 - Eliminación de singletons.
 - Detección de quimeras.
 - Agrupación
 - Alineación.

El número de amplicones de entrada se alinearon con el conjunto de OTUs detectadas y se creó una tabla de contingencia. La finalidad de este paso fue el de refinar los recuentos de OTUs mediante la inclusión de singletons correspondientes a secuencias con una cantidad razonable de errores de secuenciación es decir $<3\%$.

Las anotaciones taxonómicas de las OTUs fueron realizadas empleando la base de datos de referencia SILVA, donde las anotaciones para el nivel taxonómico de Filo se mantuvieron cuando la identidad entre el OTU y la secuencia de referencia era $\geq 75\%$; de forma similar, con $\geq 78,5\%$ para el nivel Clase, $\geq 82\%$ para Orden, $\geq 86,5\%$ para Familia, $\geq 94,5\%$ para Género y $\geq 98\%$ para el nivel de Especie.

4. Se realizó un análisis filogenético de las OTUs, las cuales fueron alineadas utilizando el programa Mafft y para filtrar las regiones poco conservadas se utilizó el software BMGE; finalmente se infirió la filogenia del árbol y sobre la base del último árbol, se calculó la distancia UNIFRAC en SHAMAN con el objetivo de comparar las comunidades microbianas.

Los resultados del flujo de trabajo general se almacenaron en varios archivos: un archivo BIOM (por base de datos de referencia), un árbol filogenético y un archivo de resumen que especifica el número de elementos que pasaron por las diferentes etapas del flujo de trabajo.

2.3.2 Análisis metabólico del microbioma obtenido del metagenoma del tracto digestivo de larvas de *Z. morio* alimentadas con poliestireno expandido.

Para el metagenoma obtenido de la secuenciación por Hiseq2500, se empleó el servidor MG-RAST v.3.1 (*Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology*), que proporciona un procesamiento automatizado de las secuencias a través del siguiente flujo de trabajo:

2.3.3 Control de calidad de las secuencias.

Después de la carga de las lecturas de secuenciación, se procesaron previamente mediante SolexaQA (Cox *et al.*, 2010) para recortar las regiones de baja calidad de los datos de FASTQ. Todas las secuencias enviadas al sistema permanecerán disponibles, pero no se analizarán las lecturas descartadas. Esta información puede ser visualizada en una gráfica, donde se observa cuantas secuencias no pasaron el proceso de calidad, tienen una función desconocida y alguna conocida.

2.3.3.1 Extracción de características.

La identificación de codificación de proteínas y características de ARNr (también conocidos como genes) se hizo con la herramienta Vsearch comparando contra una base de datos de ARN reducida, con esto se se identificó de manera eficiente el ARN ribosómico. La base de datos reducida fue una versión agrupada con identidad del 90% de las bases de datos SILVA, Greengenes y RDP y se utilizó para identificar secuencias ARN con similitudes.

2.3.3.2 Anotación de características.

Identificación de funciones putativas y orígenes taxonómicos para cada una de las características.

2.3.3.3 Filtrado de proteínas

Se identificaron las regiones codificantes de posibles proteínas que se superponen con los ARN ribosomales y se excluyeron del procesamiento posterior.

2.3.3.4 Agrupando aminoácidos

Utilizando MG-RAST se crearon grupos de proteínas con un nivel de identidad del 90% utilizando el cd-hit y preservando las abundancias relativas. Estos grupos reducen en gran medida la carga computacional de comparar todos los pares de lecturas cortas, mientras que el agrupamiento al 90% de identidad conserva suficientes señales biológicas.

2.3.3.5 Identificación de proteínas

Una vez creados los grupos, un representante (la secuencia más larga) de cada uno se sometió a un análisis de similitud. Para esto, en lugar de BLAST se utilizó sBLAT, una implementación del algoritmo BLAT (Kent, 2002), que se paraleliza usando OpenMP (OpenMP, 2011).

Con DIAMOND se realizó el cálculo de similitudes de proteínas comparándolas contra el algoritmo M5nr (Buchfink *et al.*, 2014; Wilke *et al.*, 2012). Durante el cálculo, las secuencias de proteínas y ARNr se representaron mediante un identificador derivado de la secuenciación (una suma de comprobación MD5). Una vez calculadas las similitudes, se presentaron reconstrucciones del contenido de especies de la muestra en función de los resultados de similitud. Se reconstruye la composición de especies putativas de la muestra al observar el origen filogenético de las secuencias de la base de datos afectadas por las búsquedas de similitud.

Las búsquedas de similitud de secuencia se calcularon contra una base de datos de proteínas derivada de M5nr (Wilke *et al.*, 2012), que proporcionaron una integración no redundante de las bases de datos GenBank (Benson *et al.*, 2013), SEED (Overbeek *et al.*, 2005), IMG (Markowitz *et al.*, 2008), UniProt (Magrane & Consortium, 2011), KEGG (*Kanehisa-The KEGG Database - PubMed-2002*, n.d.) y eggNOG (Jensen *et al.*, 2008).

2.3.3.6 Agrupación de ARNr

Las lecturas similares al ARNr se agruparon a continuación con una identidad del 97 % utilizando cd-hit, y la secuencia más larga se eligió representante del grupo.

2.3.3.7 Identificación de ARNr

Se realizó una búsqueda de similitud BLAST para el representante de clúster más largo contra la base de datos M5rna que integra las herramientas SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), Greengenes (Edgar, 2013) y RDP (Cole *et al.*, 2003).

2.3.4 Generación de perfiles.

Finalmente, se integraron los datos calculados en una serie de productos de datos, de los cuales, los perfiles de abundancia fueron los más importantes ya que representaron una versión dinámica y agregada de los archivos de similitud. Se calcularon los perfiles de abundancia de mejor acierto, acierto representativo.

3 Resultados y discusión

3.1 Control de calidad del ADN extraído.

3.1.1 Control de calidad del ADN extraído para la amplificación del gen RNA 16s.

En la **Tabla 2**, se presentan los resultados del control de calidad y concentración del ADN para la amplificación del gen 16s región V3-4, en esta se puede observar que solo las muestras 1 a 5 cumplieron los estándares con una amplificación cercana a las 500 pares de bases, mientras que las muestras 6, 7 y 8 no y por eso no se incluyeron en el estudio (**Anexo 1**).

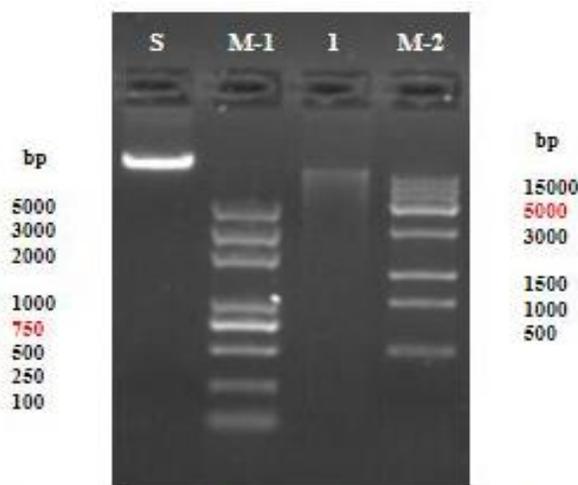
Tabla 2. Cuantificación del ADN de muestras para la amplificación del gen ARNr 16s región V3-4.

No.	Nombre de la muestra	Resultados de la muestra QC	Memoria de la muestra QC	Concentración de la muestra
1	A2_1	Aprobado	Ninguno	8,94 ng/μl
2	A2_2	Aprobado	Ninguno	15,07 ng/μl
3	A3_1	Aprobado	Ninguno	12,25 ng/μl
4	P1_1	Aprobado	Ninguno	11,66 ng/μl
5	P1_2	Aprobado	Ninguno	0,43 ng/μl
6	P3_1	Fallo	Amplificación fallida	8,75 ng/μl
7	P3_2	Fallo	Amplificación fallida	5,15 ng/μl
8	P2	Fallo	Amplificación fallida	9,15 ng/μl

3.1.2 Control de calidad del ADN de la muestra incluida en el estudio de Metagenómica

Respecto a la muestra P2_MET empleada para el análisis de Metagenómica, se estudió la integridad de esta con Agilent 2100, electroforesis en gel de agarosa y Agilent 5400. Obteniéndose un volumen final de 21 μl con una concentración de 23,80 ng/μl (cantidad total μg = 0.49980). En cuanto a la calidad de la muestra la mayor parte del fragmento de ADN estuvo por encima de 500 pb. En la **Figura 8** se presenta el ADN en un gel de agarosa, con los resultados obtenidos se tiene que la muestra califico para la preparación de la biblioteca.

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%



(S) estándar de ADN genómico total (50ng); (M-1) marcador de peso molecular Trans 2K; (1) ADN genómico de tubos digestivos de larvas de *Z. morio* y (M-2) marcador de peso molecular Trans 15K más escalera de ADN.

3.2 Análisis bioinformáticos.

3.2.1 Composición taxonómica y abundancia relativa de bacterias presentes en el tracto digestivo de larvas de *Z. morio* bajo dos dietas usando metabarcoding.

Para este estudio se procesaron cinco muestras: A2_1, A2_2, A3_1, P1_1, P1_2, siendo **A** las muestras de los tubos digestivos de larvas de *Z. morio* alimentadas con avena y **P** alimentadas con EPS. De la secuenciación se obtuvieron un total de 578.582 amplicones (**Tabla 3**) de los cuales se asignaron 1.226 OTUs.

Todas las secuencias fueron asignadas a nivel taxonómico Dominio; mientras este porcentaje decreció a medida que se avanzó en la escala jerárquica taxonómica. A nivel de Filo se obtuvo una asignación del 98,82 %, para Clase del 90,34 %, Orden 76,49 %, Familia 57,26 %, Género 34,76 % y para Especie 13,69 %. En número de asignaciones por nivel taxonómico presentes en las muestras secuenciadas, se encontraron los tres Dominios a saber: Eukarya, Bacteria y Archaea; con 46 Filos, 93 Clases, 161 Órdenes, 193 Familias, 217 Géneros y 104 Especies.

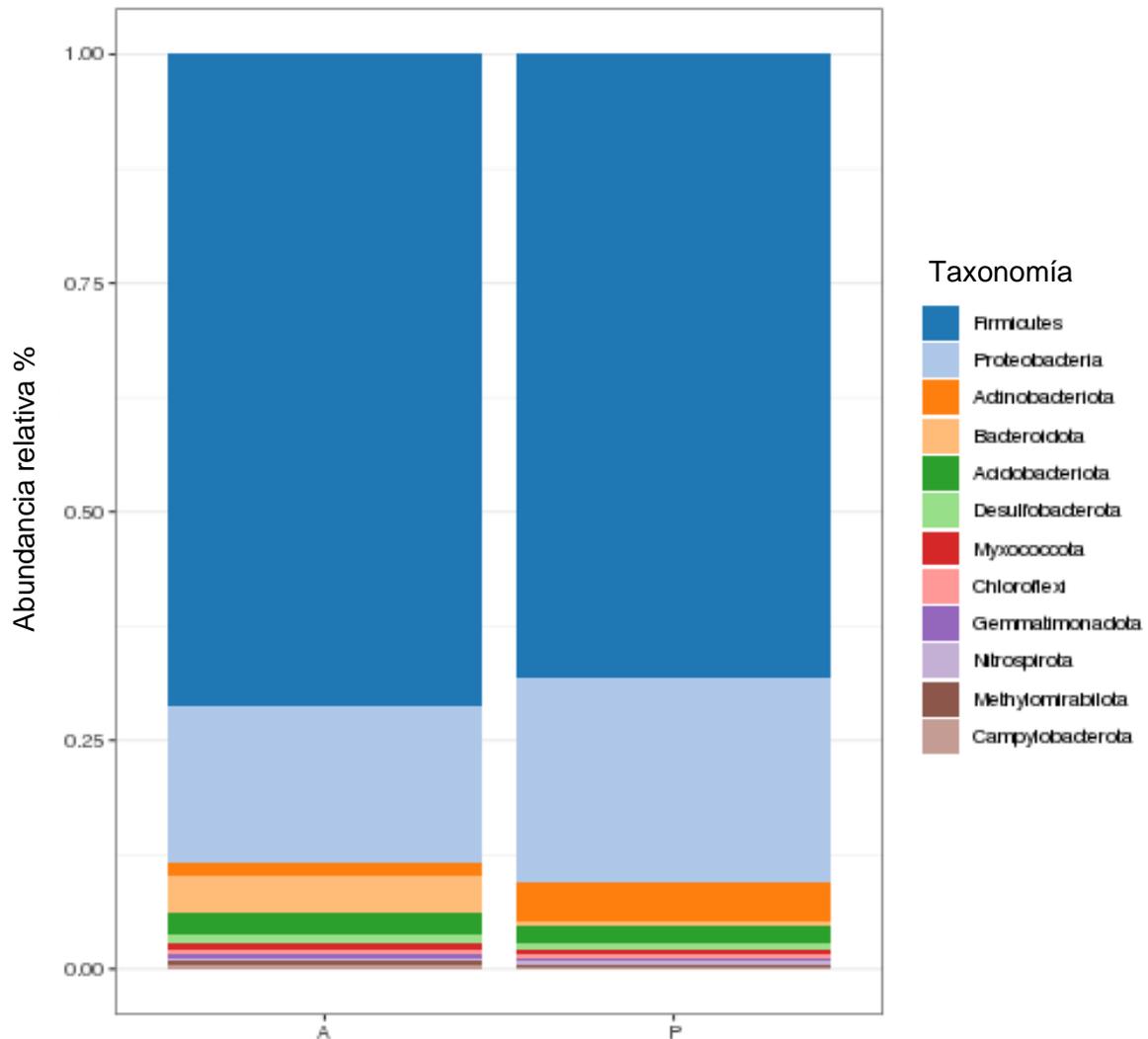
Tabla 3. Número de lecturas por muestra y asignaciones de OTUs.

ID	Lecturas crudas	Recortadas	Removidas	Lecturas filtradas	Combinadas	Sin combinar	Selección de replicación	Selección única	Quimera de selección	Selección de OTUs	Lecturas solapadas	Porcentaje de combinación de lecturas finales
A1	130796	67171	7856	124162	121463	124162	55556	1790	1583	336	89546	72.12
A2	104285	54770	6295	98964	96242	98964	42294	1336	1150	255	72333	73.09
A3	130575	66503	8014	123859	120653	123859	44675	1574	1389	184	101606	82.03
P1	157774	80321	9786	149615	145074	149615	58166	2120	1758	282	117162	78.31
P2	194581	54034	6306	99288	95150	99288	37887	1389	1179	169	77001	77.55
	718011	322799	38257	595888	578582	595888	238578	8209	7059	1226		

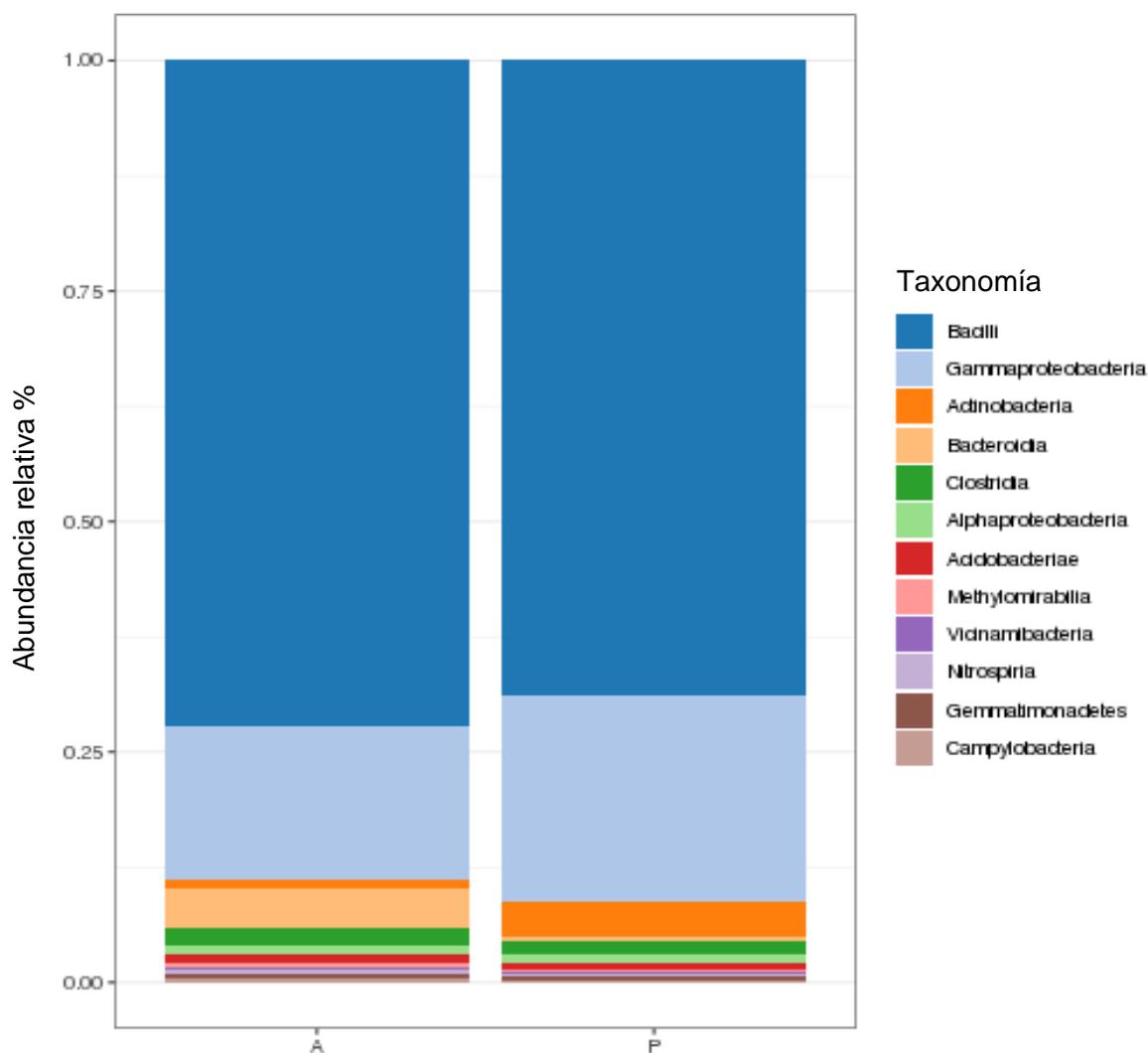
3.2.2 Diversidad taxonómica

De acuerdo con los análisis realizados, en el tratamiento A (dieta de avena) y P (dieta de EPS), se observaron los mismos **Filos**; sin embargo, las abundancias variaron entre los mismos. El Filo más abundante correspondió a *Firmicutes* siendo incluso más abundante en el tratamiento A (71,3%) comparado con el tratamiento P (68,1%). Otros filo observados fueron *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Myxococcota*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadota*, *Nitrospirota*, *Methylomirabilota* y *Campylobacterota* (**Figura 9**).

Figura 9. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Filo para los tratamientos A y P.

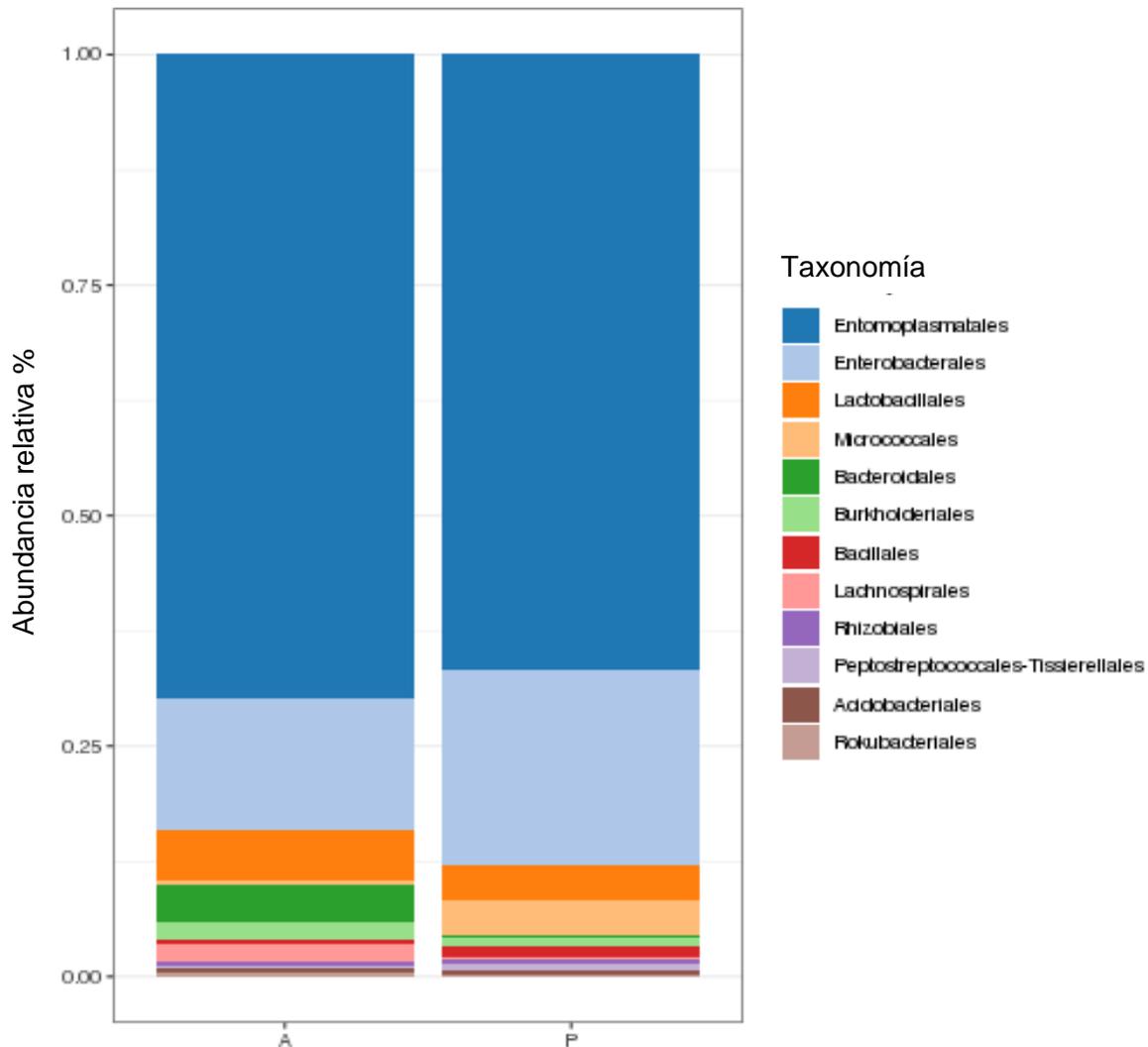


De forma similar, a nivel de **Clase** en los dos tratamientos se encontró que la que presentó mayor abundancia relativa fueron *Bacilli* (72,3% para A y 69,0% para P) y *Gammaproteobacteria*, seguidos de *Actinobacteria*, *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteriae*, *Methyloirabilia*, *Vicinamibacteria*, *Nitrospira*, *Gemmatimonadetes* y *Campylobacteria* (**Figura 10**).

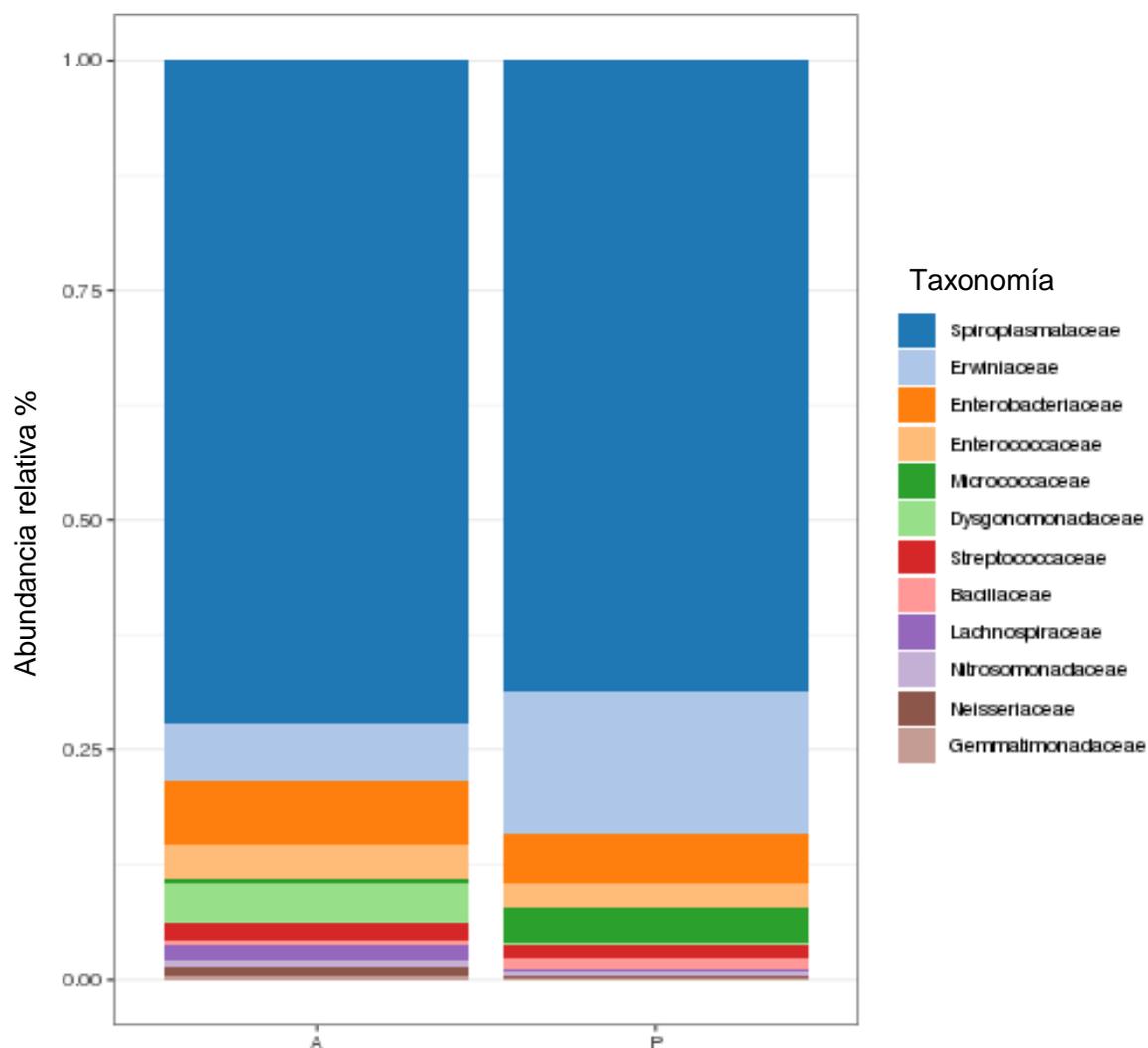
Figura 10. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Clase para los tratamientos A y P.

A nivel de **Orden** los *Entomoplasmatales* (69,8% para A y 66,7% en P) y *Enterobacterales* (14,2% para A y 21,2% en P) fueron los más abundantes, seguidos de *Lactobacillales*, *micrococcales*, *Bacteroidales*, *Burkholderiales*, *Bacillales*, *Lactnospirales*, *Rhizobiales*, *Peptostreptococcales*, *Tissierellales*, *Acidobacteriales* y *Rokubacteriales* (**Figura 11**).

Figura 11. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Orden para los tratamientos A y P.

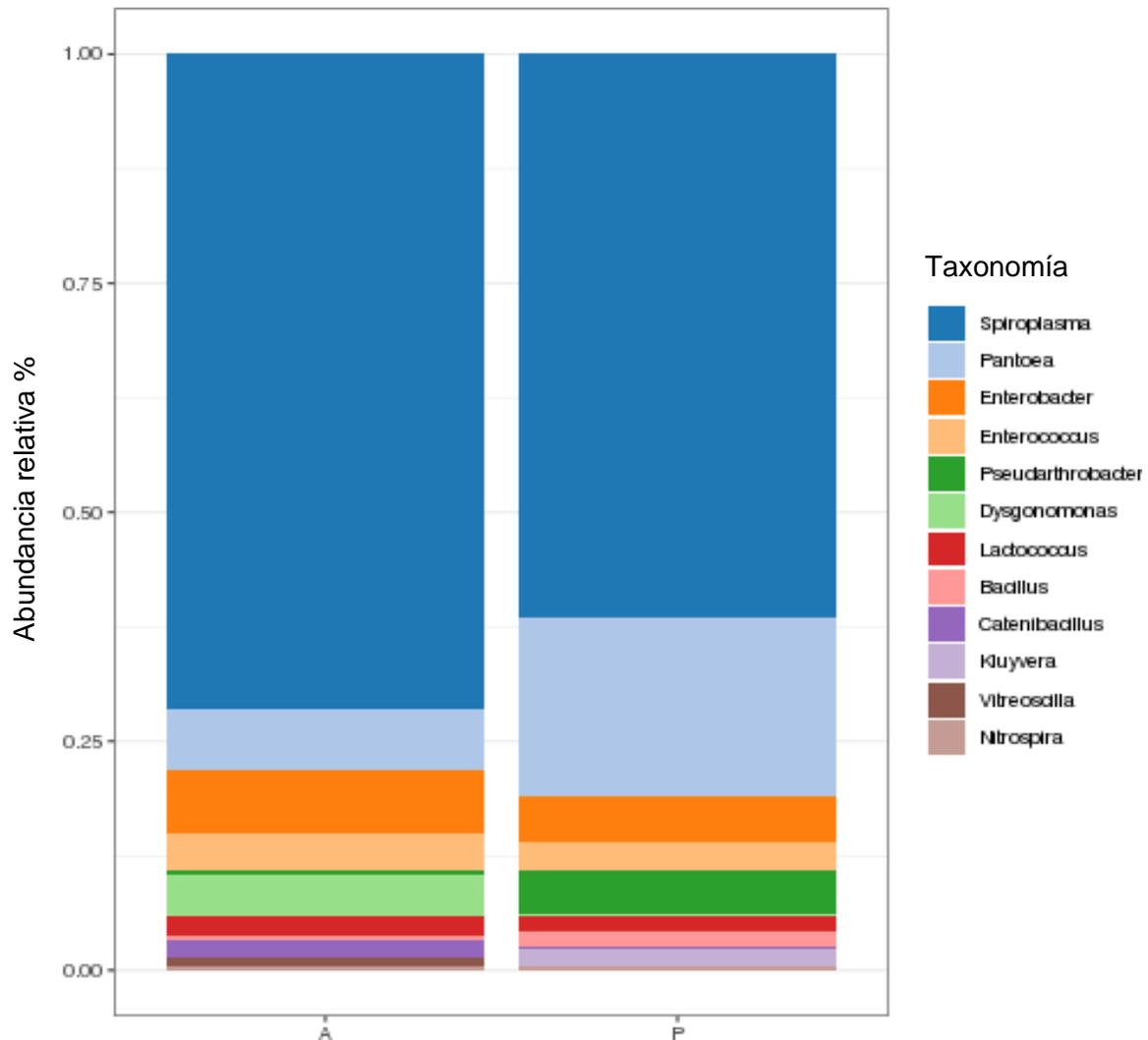


A nivel de **Familia** *Spiroplasmataceae* (72,2% para A y 68,7% en P) y *Erwiniaceae* (6,3% para A y 15,5 % en P) fueron las más abundantes, seguidas de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Dysgonomonadaceae*, *Streptococcaceae* *Bacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Neiceriaceae*, y *Gemmatimonadaceae* (**Figura 12**).

Figura 12. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Familia para los tratamientos A y P.

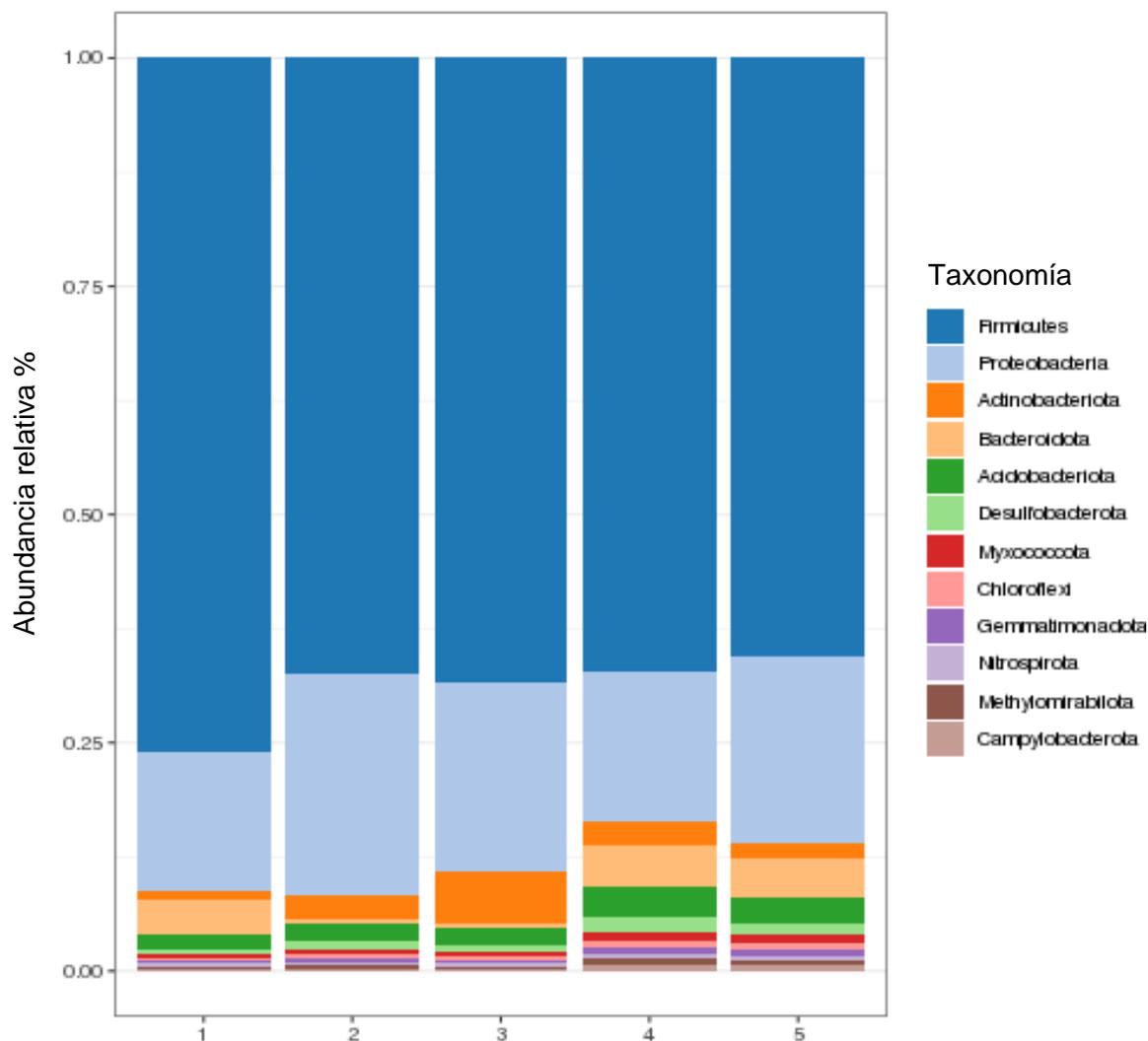
Los **Géneros** encontrados en mayor abundancia correspondieron a *Spiroplasma* (71,5% para A y 61,6% para P) y *Pantoea* (6,6% para A y 19,3% para P) y con menor abundancia se registraron los *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudarthobacter*, *Dysgonomonas*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Catenibacillus*, *Kluyvera*, *Vitreoscilla* y *Nitrospira* (**Figura 13**).

Figura 13. Abundancia taxonómica bacteriana a nivel de Género para los tratamientos A y P.



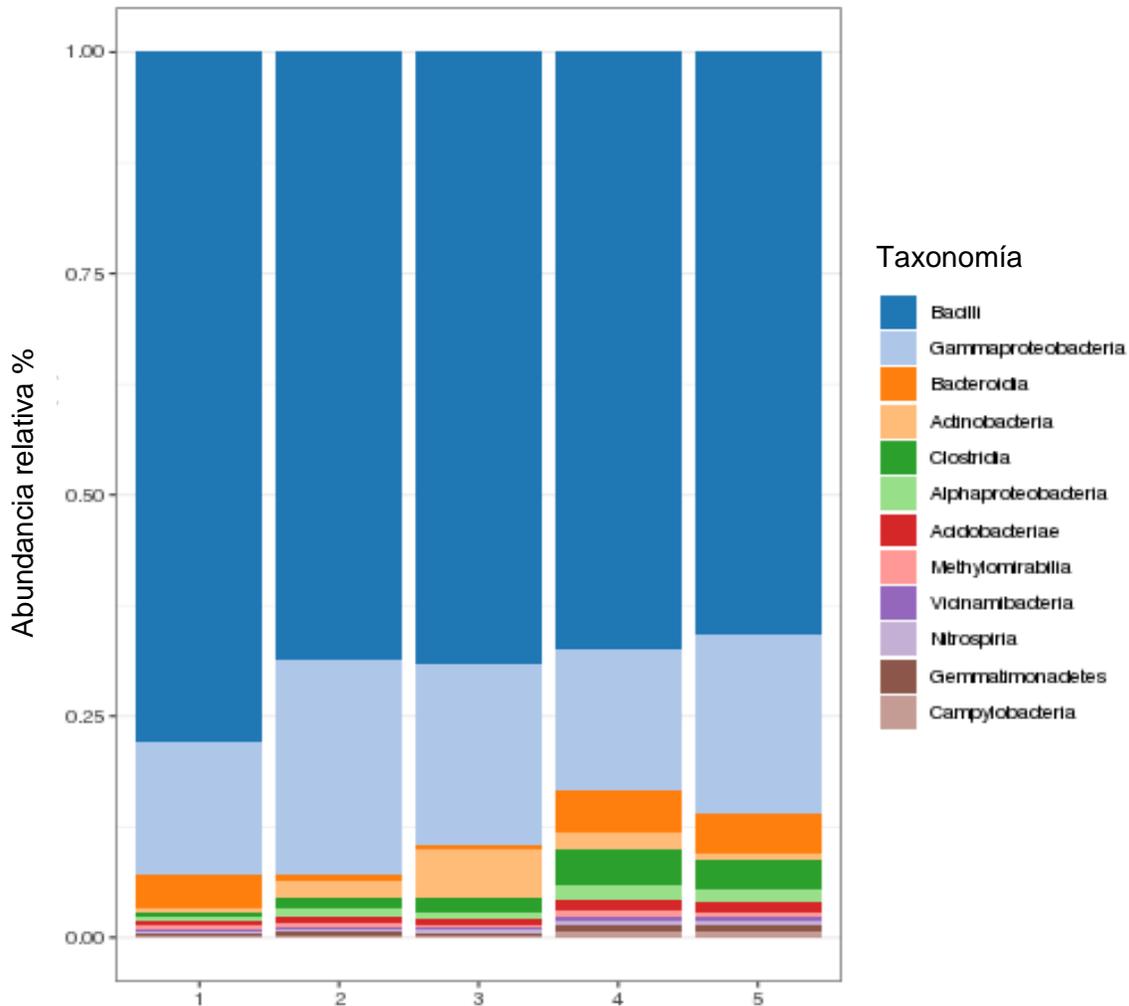
Al analizar cada una de las muestras de ambos tratamientos se obtuvo que el **Filo Firmicutes** fue el más abundante en un porcentaje de 76% en la muestra 1; 67,5% en la muestra 2; 68,5% en la muestra 3; 67,3% en la muestra 4 y 65,5% en la muestra 5. El segundo filo que se observó fue *Proteobacteria* y en menor proporción se obtuvieron los fila *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Myxococcota*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadota*, *Nitrospirota*, *Methylomirabilota* y *Campylobacterota* (**Figura 14**).

Figura 14. Abundancia taxonómica de bacterias al nivel Filo para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.



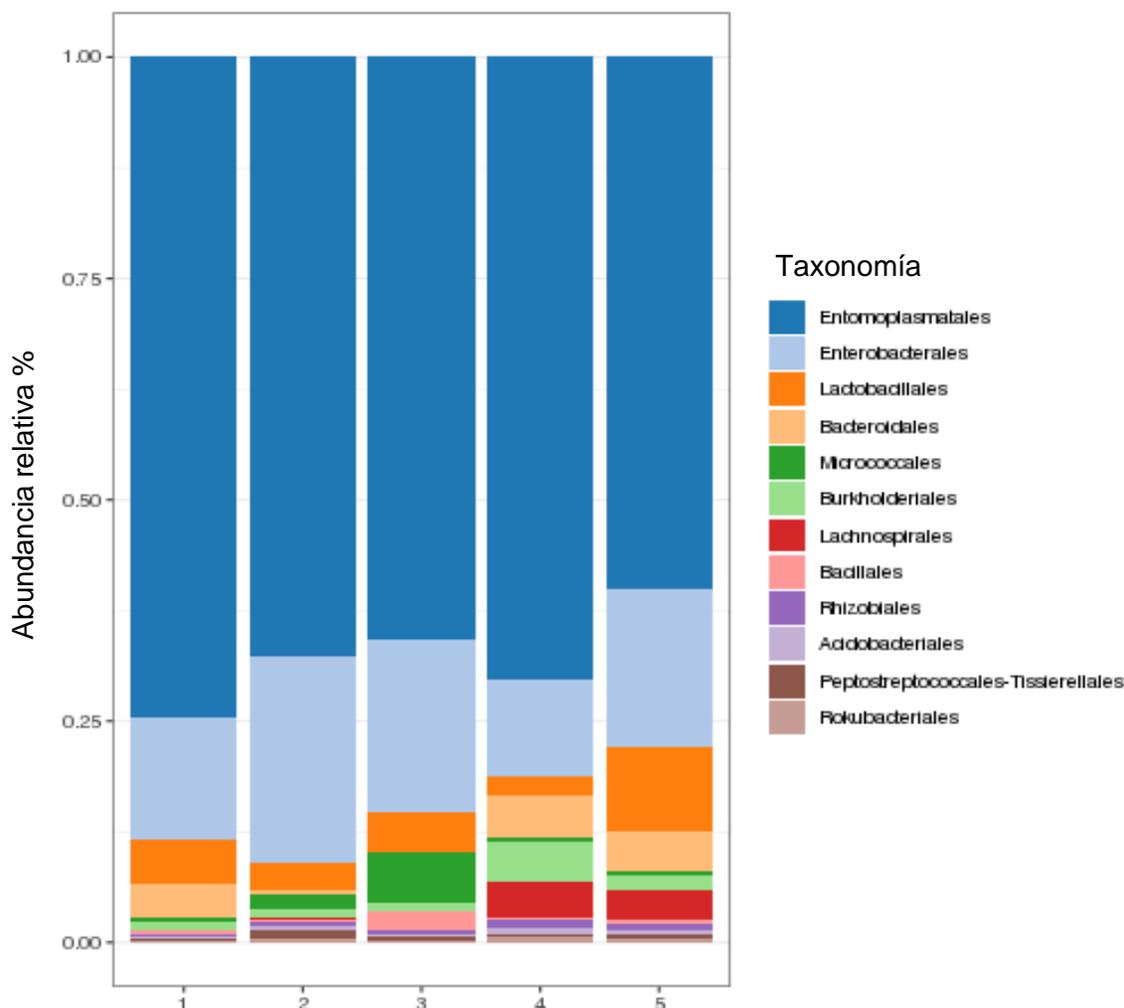
En la **Figura 15** se observó que la **Clase Bacilli** tuvo una mayor presencia en todas las muestras con 77,8% en la 1; 68,7% en la 2; 69,1% en la 3; 67,5% en la 4 y 65,8% en la 5, seguida de *Gammaproteobacteria*. Las Clases que se encontraron en menor proporción fueron *Bacteroidia*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteriae*, *Methyloirabillia*, *Vicinamibacteria*, *Nitrospira*, *Gemmatimonadetes*, *Campylobacteria*.

Figura 15. Abundancia taxonómica de bacterias al nivel Clase para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.



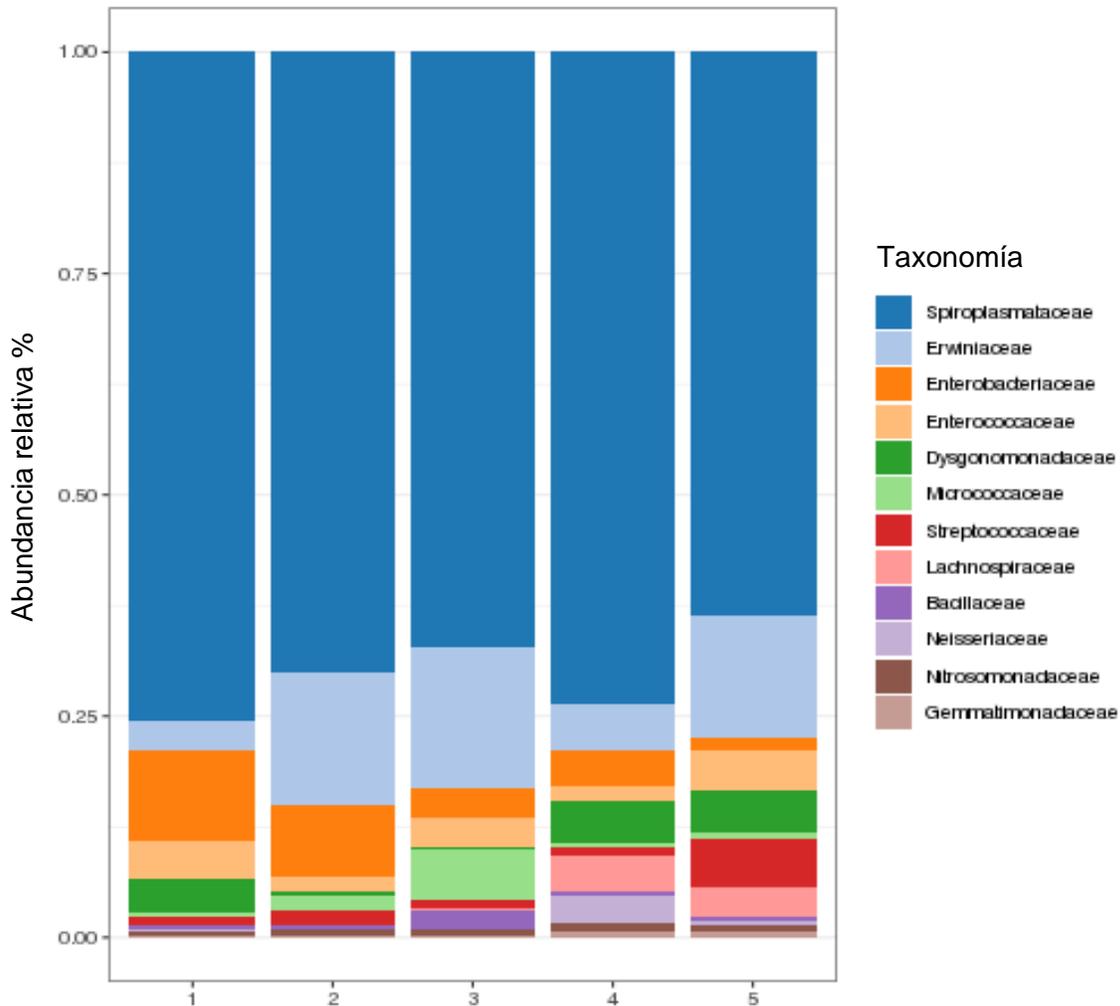
En cuanto al **Orden** la *Entomoplasmatales* se obtuvo en mayor abundancia para todas las muestras 74,5% en la 1; 67,8% en la 2; 65,8% en la 3; 70,2% en la 4 y 60% en la 5. El Orden que le sigue fue *Enterobacterales* y en menor presencia *Lactobacillales*, *Bacteroidales*, *Micrococcales*, *Burkholderiales*, *Lachnospirales*, *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Acidobacteriales*, *Peptostreptococcales*, *Tissierellales* y *Rokubacteriales* (**Figura 16**).

Figura 16. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Orden para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.



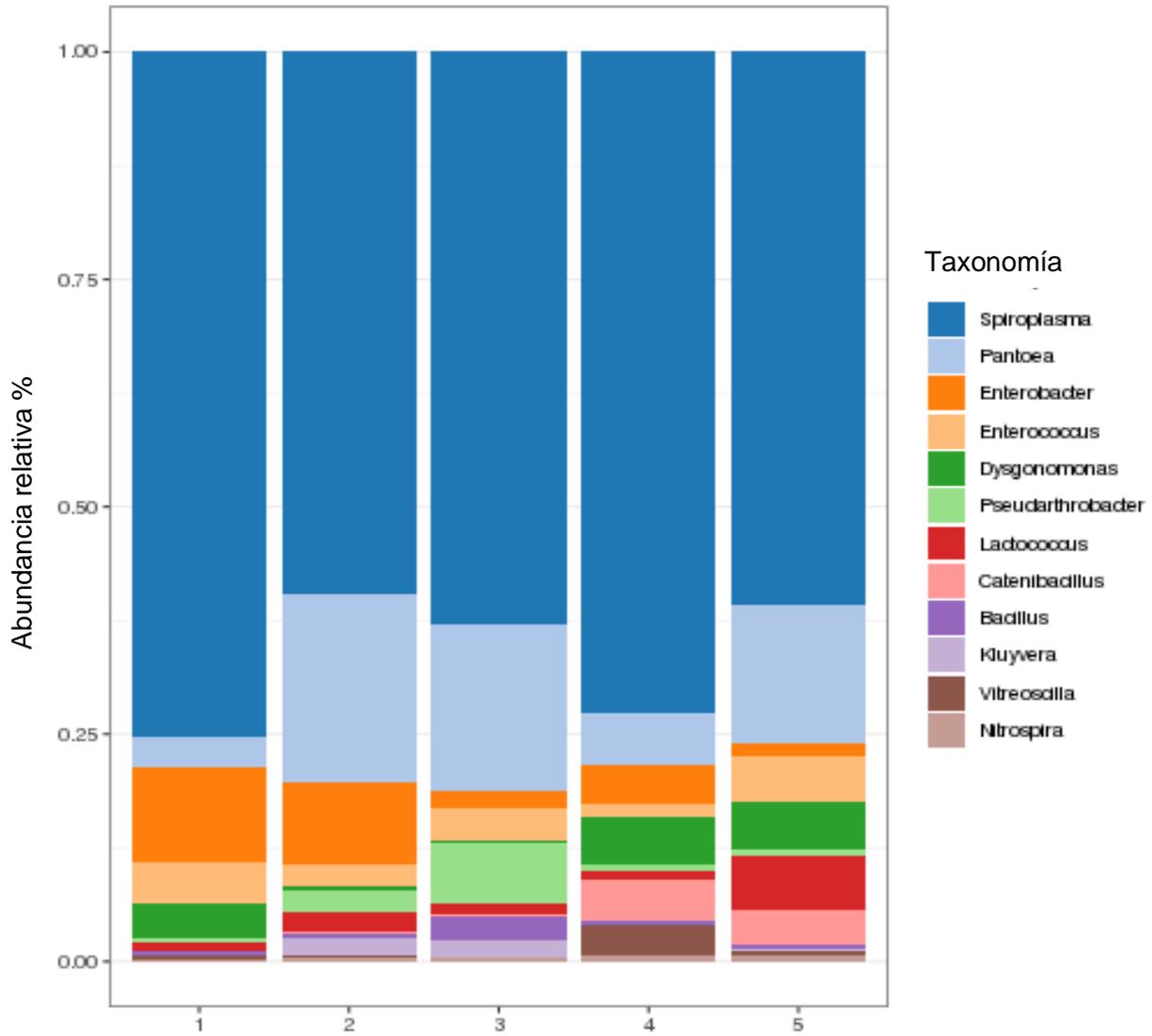
En cuanto a las **Familias** encontradas por muestra, se obtuvo que *Spiroplasmataceae* fue la más abundante para todas las muestras 75,4% en la 1; 70,1% en la 2; 67,2% en la 3; 73,7% en la 4 y 63,7% en la 5. Las Familias menos abundantes fueron *Erwiniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Dysgonomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Bacillaceae*, *Neisseriaceae*, *Nitrosomonadaceae* y *Gemmatimonadaceae* (**Figura 17**).

Figura 17. Abundancia taxonómica de bacterias a nivel de Familia para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.



Finalmente, a nivel de **Géneros** se encontró que *Spiroplasma* fue el más abundante en todas las muestras 75,3% en la 1; 59,7% en la 2; 63% en la 3; 72,7% en la 4 y 60,8% en la 5. Los géneros menos comunes fueron *Pantoea*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Dysgonomonas*, *Pseudarthrobacter*, *Lactococcus*, *Catenibacillus*, *Bacillus*, *Kluyvera*, *Vitreoscilla* y *Nitrospira* con un comportamiento porcentual similar a lo que se ve en Filo y Clase donde el primero tiene mayor relevancia porcentual y el segundo, pero los otros en conjunto son menos comunes (**Figura 18**).

Figura 18. Abundancia taxonómica bacterias a nivel de Género para cada muestra donde: 1) A3, 2) P1, 3) P2, 4) A1, 5) A2.



Para cada muestra, la proporción de lecturas más representativas fueron para el Filo *Firmicutes*, en Clase *Bacilli*, en Orden *Entomoplasmatales*, en Familia *Spiroplasmataceae*, y en Género *Spiroplasma*. En la **Tabla 4** se presentan los porcentajes correspondientes a los tratamientos A y P según su asignación taxonómica a nivel de género.

Tabla 4. Porcentajes correspondientes a la presencia de géneros bacterianos en los tratamientos A y P.

Asignación taxonómica a nivel de Género	Tratamiento (A)%	Tratamiento (P)%
<i>Spiroplasma</i>	71,5	61,6
<i>Pantoea</i>	6,6	19,3
<i>Enterobacter</i>	7,0	5,0
<i>Enterococcus</i>	3,9	3,2
Asignación taxonómica a nivel de Género	Tratamiento (A)%	Tratamiento (P)%
<i>Pseudarthrobacter</i>	0,5	4,7
<i>Dysgonomonas</i>	4,5	0,3
<i>Lactococcus</i>	2,1	1,6
<i>Bacillus</i>	0,4	1,7
<i>Catenibacillus</i>	1,9	0,2
<i>Kluyvera</i>	0,1	1,9
<i>Vitreoscilla</i>	1,0	0,1
<i>Nitrospira</i>	0,4	0,4
<i>Clostridium sensu stricto 6</i>	0,1	0,8
<i>Romboutsia</i>	0,1	0,8

Por otro lado, en la **Tabla 5** se evidencian los porcentajes correspondientes a cada muestra analizada según su asignación taxonómica a nivel de Género, observándose que para todas las muestras el más abundante fue *Spiroplasma*, aunque en mayor abundancia para las muestras donde el tratamiento de alimentación fue con avena; un comportamiento similar, aunque en baja proporción de asignaciones se obtuvo para los géneros *Enterococcus*, *Dysgonomonas*. Un comportamiento diferente se observó en el género *Pantoea* siendo este, el más abundante en las muestras donde los tratamientos incluían el EPS como base de alimentación; un comportamiento similar, aunque en baja proporción de asignaciones se obtuvo para el género *Pseudarthrobacter*. Respecto a *Enterobacter* el comportamiento fue similar entre las muestras 1, 2, 3 y 4. Los géneros *Lactococcus* y *Catenibacillus* fueron los más abundantes para la muestra 5, donde se utilizó la avena como base para la alimentación de las larvas. Finalmente, *Nitrospira* fue el género más abundante en todas las muestras estudiadas.

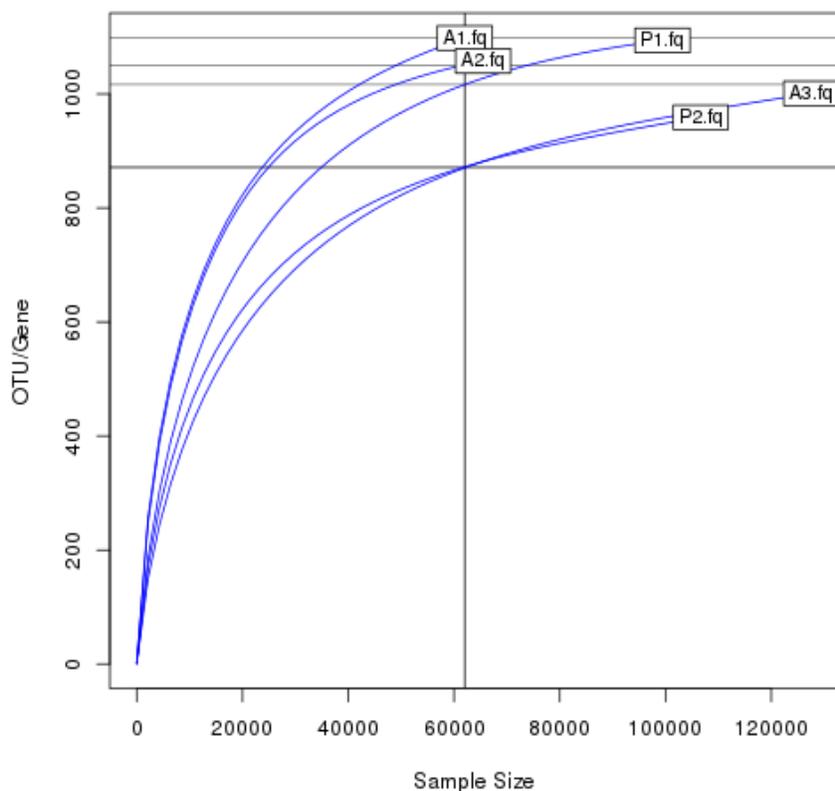
Tabla 5. Porcentajes de la presencia de géneros bacterianos en las muestras 1 (A_3), 2 (P_1), 3 (P_2), 4 (A_1), y 5 (A_2).

Asignación taxonómica a nivel de Género	MUESTRA 1 (A_3)	MUESTRA 2 (P_1)	MUESTRA 3 (P_2)	MUESTRA 4 (A_1)	MUESTRA 5 (A_2)
<i>Spiroplasma</i>	75.3	59.7	63.0	72.7	60.8
<i>Pantoea</i>	3.4	20.6	18.3	5.6	15.1
<i>Enterobacter</i>	10.4	9.0	1.8	4.3	1.6
<i>Enterococcus</i>	4.4	2.4	3.8	1.6	5.0
<i>Dysgonomonas</i>	4.0	0.5	0.2	5.2	5.1
<i>Pseudarthrobacter</i>	0.4	2.4	6.5	0.7	0.7
<i>Lactococcus</i>	0.9	2.1	1.3	0.9	6.1
<i>Catenibacillus</i>	0.1	0.2	0.2	4.5	3.7
<i>Bacillus</i>	0.4	0.5	2.6	0.4	0.5
<i>Kluyvera</i>	0.1	1.9	1.9	0.1	0.2
<i>Vitreoscilla</i>	0.3	0.2	0.1	3.4	0.6
<i>Nitrospira</i>	0.3	0.5	0.4	0.6	0.6

3.2.3 Curva de Rarefacción de OTUs.

Al observar la curva de rarefacción se identificó que la muestra A3 presentó 120.000 lecturas, siendo el mayor número de todo el análisis, mientras que la muestra A1 fue la de menor número con 60.000. Sin embargo, en la gráfica se pudo observar que todas las muestras tienden a empezar a llegar a la asíntota sobre las 60.000 lecturas, indicando que este valor podría ser el máximo número de especies observadas (**Figura 19**). Las muestras, A1 y P1 son las que presentaron mayor número de OTUs (por encima de 1000) aunque con diferencias en la cantidad de lecturas, P1 necesitó más número de lecturas que A1 y la muestra que presentó menor cantidad de OTUs encontrados fue la muestra P2 (por debajo de 1000).

Figura 19. Curva de rarefacción de OTUs.

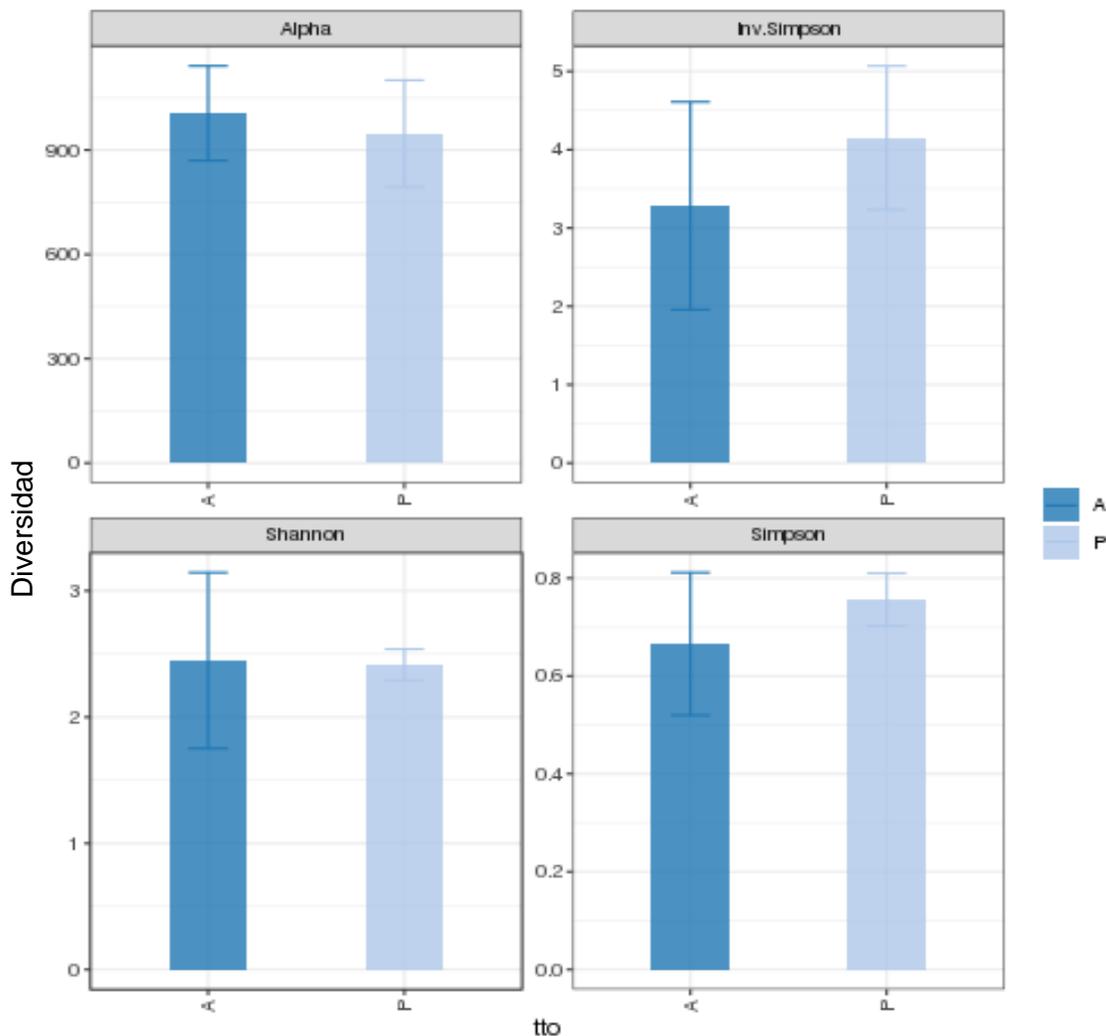


3.2.3.1 Diversidad Alfa: comparación de la diversidad a nivel de OTUs bacterianos entre los tratamientos A y P y entre las muestras 1, 2, 3, 4, y 5.

De acuerdo con el índice de diversidad alfa, en **Figura 20** se puede observar que en el tratamiento A hay mayor diversidad (1006) de especies que en el tratamiento P (947.5), en la

Figura de **Shannon**, donde se asume que todas las especies están representadas, se evidencia la uniformidad entre los dos tratamientos A (2.4477) y P (2.4142). La figura correspondiente al índice de **Simpson** muestra en el tratamiento P (0.6655) una menor probabilidad de que dos individuos sacados al azar sean de la misma especie, a diferencia que el tratamiento A (0.7559), infiriendo que hay mayor presencia de una misma especie en el tratamiento P que en el tratamiento A, lo cual se corrobora con el resultado de la gráfica de **Simpson invertido** teniendo el tratamiento A (3.2843) y P (4.1505).

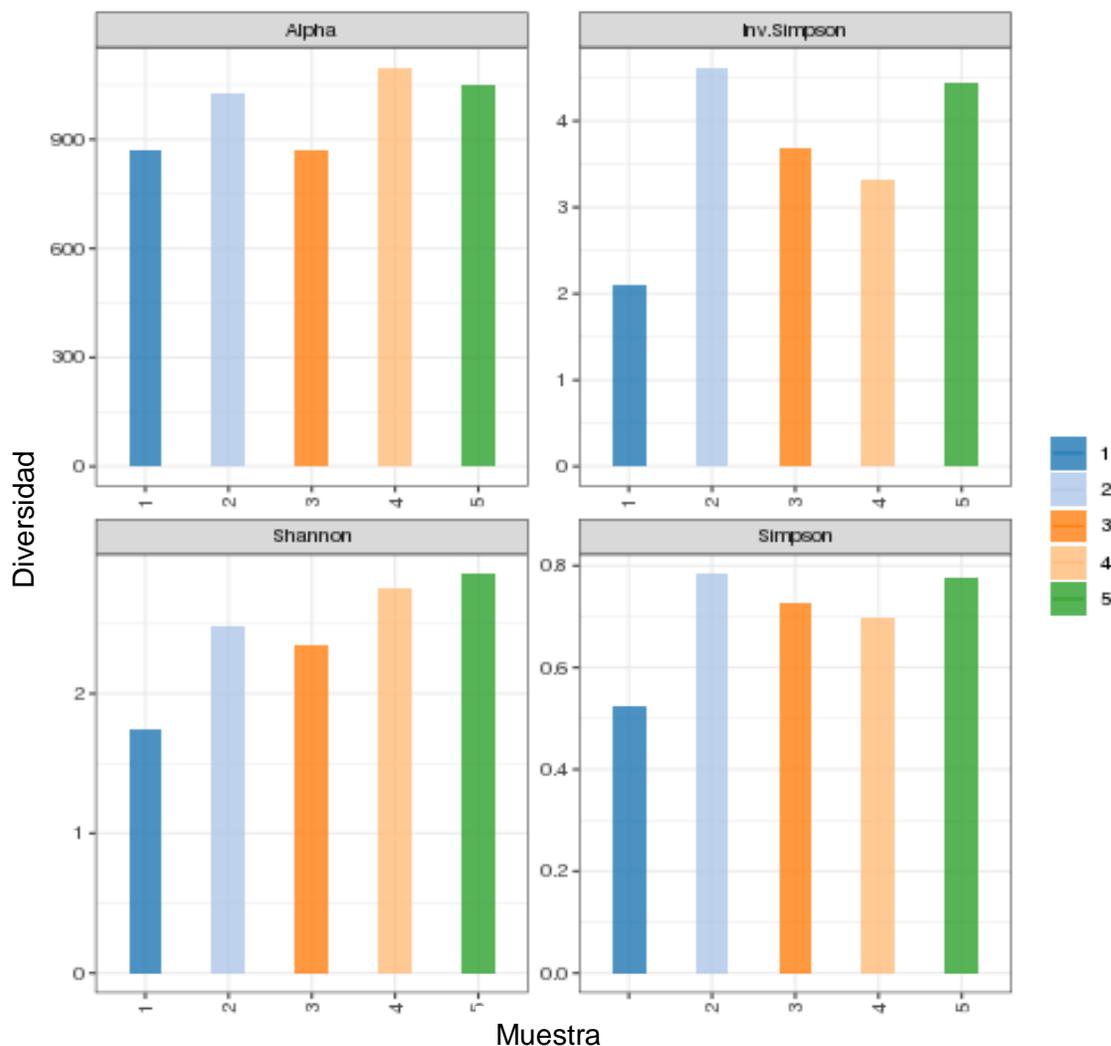
Figura 20. Diversidad alfa: Comparación de la diversidad a nivel de OTUS entre los tratamientos.



Teniendo en cuenta que las muestras 1, 4 y 5 pertenecen al tratamiento A y las muestras 2 y 3 pertenecen al tratamiento P (**Figura 21**), de acuerdo con el índice de diversidad alfa se tiene que hay diversidad en todas las muestras, aunque en mayor proporción en la muestra 4 (1098), seguida por la muestra 5 (1050), la 2 (1026), la 1 (870) y la 3 (869). En la figura de **Shannon**

donde se asume que todas las especies están representadas, se ve que hay mayor uniformidad en las muestras 4 (2.7490) y 5 (2.8547) que pertenecen al tratamiento A, pero no en la muestra 1 (1.7395) del mismo tratamiento, un comportamiento de las gráficas similar a **Alpha**. La Figura 21 correspondiente a **Simpson** evidenció que la probabilidad de que dos individuos sacados al azar sean de la misma especie es menor en la muestra 1 (0.5234) y muy similar entre el resto de las muestras, con mayor abundancia en las muestras 2 (0.7835) y 5 (0.7748), lo cual se percibe similar en el resultado de la figura de **Simpson invertido**, en la muestra uno se obtuvo un valor inferior al resto de las muestras (2.0984); la muestra dos obtuvo el mayor valor (4.6184), seguida de la muestra cinco (4.4404), la muestra tres (3.6826) y la muestra cuatro (3.3142).

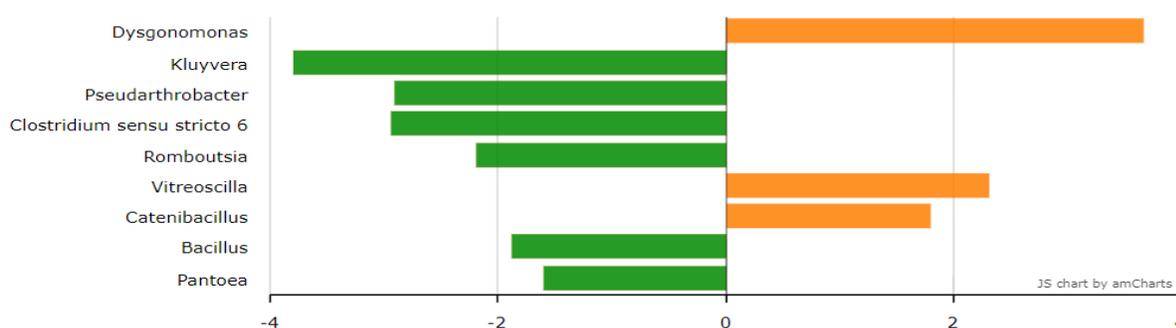
Figura 21. Diversidad alfa: Comparación de la diversidad a nivel de OTUS entre las muestras.



3.2.3.2 Diversidad Beta: Comparación a nivel de Género y OTUS bacterianos entre los tratamientos A y P y análisis de Componentes Principales.

En los análisis de beta diversidad se encontró que hay diferencias significativas entre las abundancias relativas de los géneros, *Kluyvera* (1,9%), *Pseudoarthrobacter* (4,7%), *Pantoea* (19,3%), *Bacillus* (1,7%), *Clostridium sensu stricto 6* (0,8%) y *Romboutsia* (0,8%) presentes en mayor abundancia en el tratamiento con EPS, mientras que *Dysgonomonas* (4,5%), *Catenibacillus* (1,9%), *Vitreoscilla* (1,0%) son más abundantes en el tratamiento con avena (Figura 22).

Figura 22. Diferencia significativa entre géneros de bacterias de A y P, características diferenciales.



Al analizar las diferencias entre tratamientos a nivel de OTUs (Figura 23), se encontró que hay 13 OTUs que presentaron diferencias significativas entre las abundancias relativas encontradas por tratamiento, siendo los OTUs 657, 317, 1021, y 337 más abundantes en avena, mientras que el OTU_320, es el más abundante en el tratamiento con EPS con un valor de 10.464 y que corresponde a la especie *Kluyvera georgiana*, también se encontró el OTU 820 con un valor de 11.771 del género *Pseudoarthrobacter*, el OTU 49 con valor de 10.791 *Enterococcus*, OTU 516 con valor de 14.093 asignado a la familia *Spiroplasmataceae*, OTU 50 con valor de 10.008 perteneciente al género *Bacillus*, OTU 921 con valor de 9.292 Género *Clostridium sensu stricto 6*, OTU 526 valor de 10.317 correspondiente a *Spiroplasma*, OTU 1183 valor 9.197 Género *Romboutsia*, OTU 313 valor 13.8 género *Pantoea*. Fueron más abundantes en EPS. La asignación taxonómica de estos OTUs se representa en la Tabla 7.

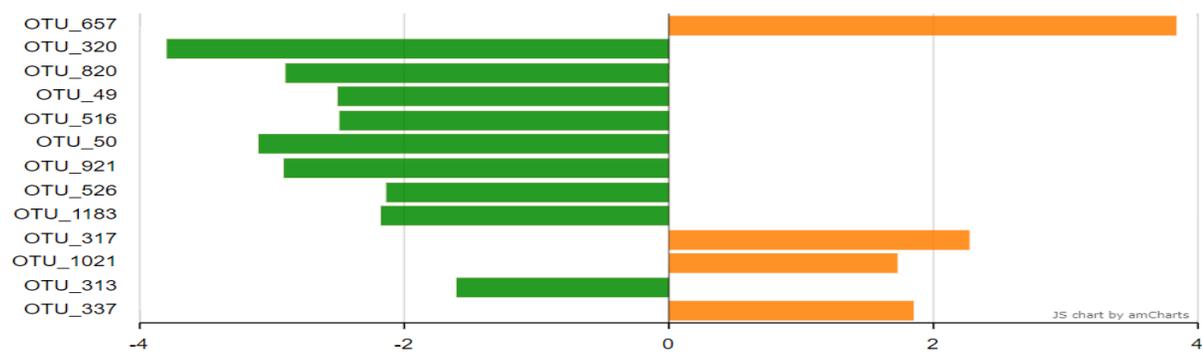
Figura 23. Diferencia significativa entre OTUs reportados en los tratamientos P (verde) y A (naranja)

Tabla 6. Asignación taxonómica de OTUs bacterianos significativamente diferentes entre los tratamientos evaluados.

OTU	FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
657	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>	
320	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>
820	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Pseudarthrobacter</i>	Arthrobacter sp. XBGRY2
49	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
516	Firmicutes	Bacilli	Entomoplasmatales	Spiroplasmataceae		
50	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	
921	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium sensu stricto 6</i>	
526	Firmicutes	Bacilli	Entomoplasmatales	Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i>	
1183	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales Tissierellales	Peptostreptococcaceae	<i>Romboutsia</i>	
317	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Neisseriaceae	<i>Vitreoscilla</i>	
1021	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	<i>Catenibacillus</i>	
313	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	<i>Pantoea</i>	
337	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>

De acuerdo con los resultados obtenidos se tiene que *Spiroplasma* es un género de *Mollicutes*, un grupo de bacterias pequeñas que no poseen pared celular; la mayoría de las especies de este género se encuentran en el intestino o la hemolinfa de los insectos (Alexeeva *et al.*, 2006). Por otro lado, *Pantoea*, que pertenece a la familia *Erwiniaceae*, es un género de bacterias Gram negativas separadas recientemente del género *Enterobacter*; este género incluye al menos 20 especies, igualmente *Enterobacter* es un género de bacterias Gram negativas anaerobias facultativas de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Muchas de estas bacterias son patógenas, causantes de infecciones y otras son descomponedoras que viven en la materia orgánica. *Enterococcus* son bacterias Gram positivas que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos incluyendo al hombre (Pérez *et al.*, 2010). Respecto a las *Dysgonomonas*, se tiene que también se han aislado de fuentes humanas, estas pertenecen a un género de bacterias Gram negativas, facultativamente anaerobias de la familia *Dysgonomonadaceae*. La bacteria *Dysgonomonas* puede causar gastroenteritis en personas inmunodeprimidas (Bennet *et al.*, 2014).

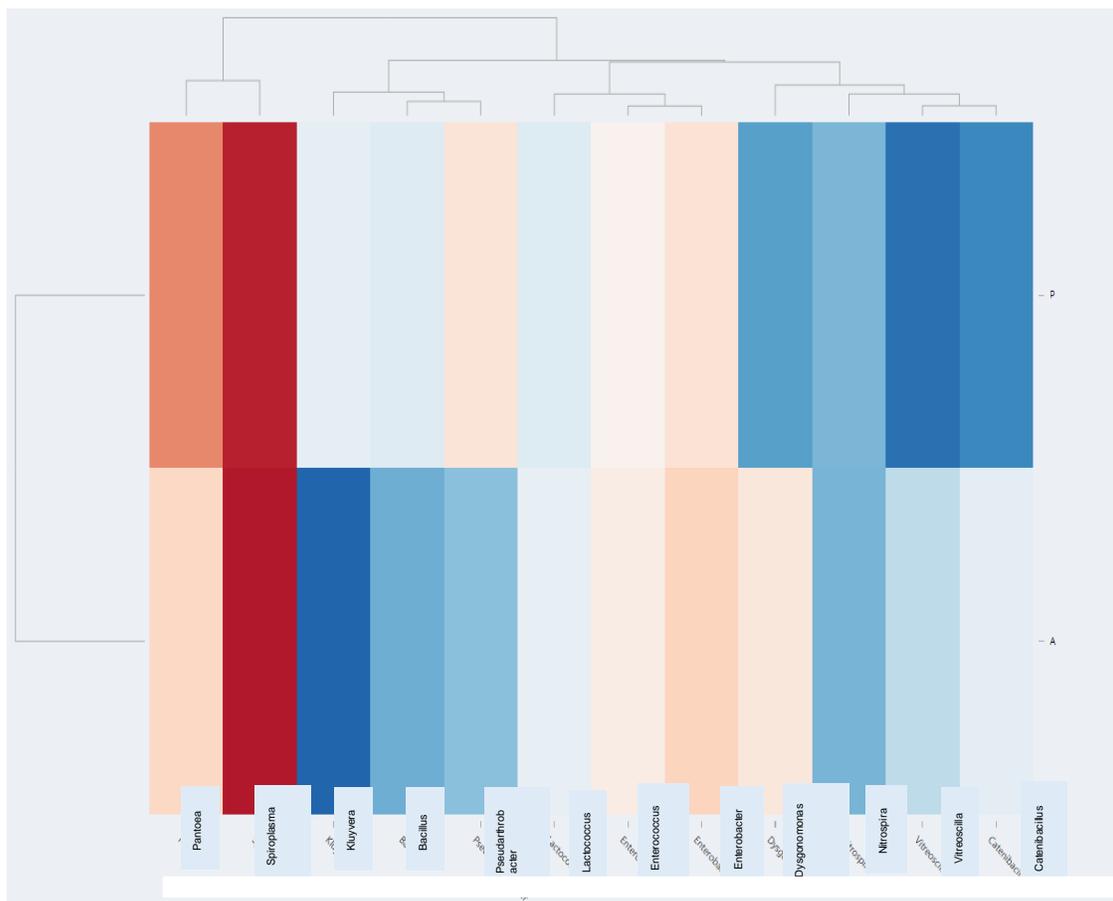
El género *Catenibacillus*, que fue encontrado en este estudio, es una bacteria anaerobia Gram positiva, no formadora de esporas y no móvil aislada principalmente del intestino humano (Haider *et al.*, 2019). Respecto a especies se reportó las *Bacillus* que se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, esta característica les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres e incluso en ambientes bajo condiciones extremas, sin embargo, el suelo es considerado el principal reservorio de este tipo de bacterias, debido a que la mayoría de especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el mismo (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

El género *Kluyvera* engloba a bacterias Gram negativas de morfología bacilar, no ácido-alcohol resistentes y no esporuladas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* del orden *Enterobacterales*, perteneciente, a su vez, a la clase *Gammaproteobacteria* del Filo *Proteobacteria*. Generalmente crecen bien en medios de cultivo con peptonas, extracto de carne o en agar MacConkey, con una temperatura de cultivo óptima de entre 22 y 35°C. Son bacterias anaerobias facultativas flageladas. Forman parte de la microbiota, normal o microbioma intestinal de algunas especies de animales (Farmer, 2015).

Otra bacteria presente en las muestras analizadas fue *Vitreoscilla*, que es un género de bacterias aeróbicas Gram negativas. A partir de esta bacteria se descubrió la hemoglobina bacteriana (VHb) que tiene una amplia gama de aplicaciones biológicas y biotecnológicas, incluida la promoción del crecimiento celular, la síntesis de proteínas, la producción de metabolitos, la respiración, la desintoxicación celular, la fermentación y la biodegradación que es de gran interés en el presente trabajo de investigación. Igualmente está presente *Nitrospirae* o *Nitrospira* que es un grupo de bacterias Gram negativas con una sola familia *Nitrospiraceae*. El primer miembro de esta familia fue reportado por Watson (1986) y se le denominó *Nitrospira marina*, una bacteria nitrito-oxidante.

Se observó que el género más abundante en los dos tratamientos fue *Spiroplasma* (15,617% en A y 15,476% en P) color rojo en el mapa de calor, seguido de *Pantoea* (12,183% en A y 13,8 % en P), aunque en este caso es más abundante en P. La menor presencia de microorganismos se presenta en color azul oscuro, en este caso *Kluyvera* (6,375% en A y 10,464% en P) (**Figura 24**).

Figura 24. Mapa de calor taxonómico a nivel de género de los dos tratamientos A y P.

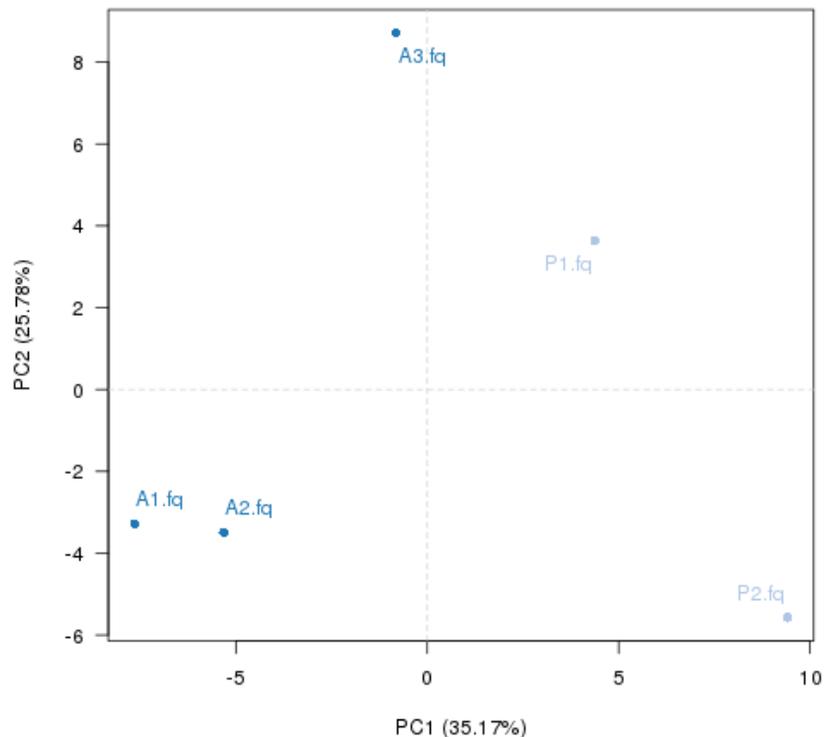


Dónde rojo significa mayor abundancia y azul menor abundancia relativa.

3.2.3.3 Análisis de componentes principales empleando la asignación taxonómica de género.

En el análisis de componentes principales empleando las asignaciones a nivel de género, se observó que el primer eje separa con un 35,71% de varianza en los datos las dos muestras del tratamiento P de las muestras del tratamiento A; mientras que en el segundo eje con un 25,78 % de la varianza, se observa la separación de la muestra A3 de las otras dos muestras del tratamiento A (**Figura 25**).

Figura 25. Análisis de componentes principales para las muestras de tracto intestinal de *Z. morio* bajo dos tratamientos basados en la asignación taxonómica por género.

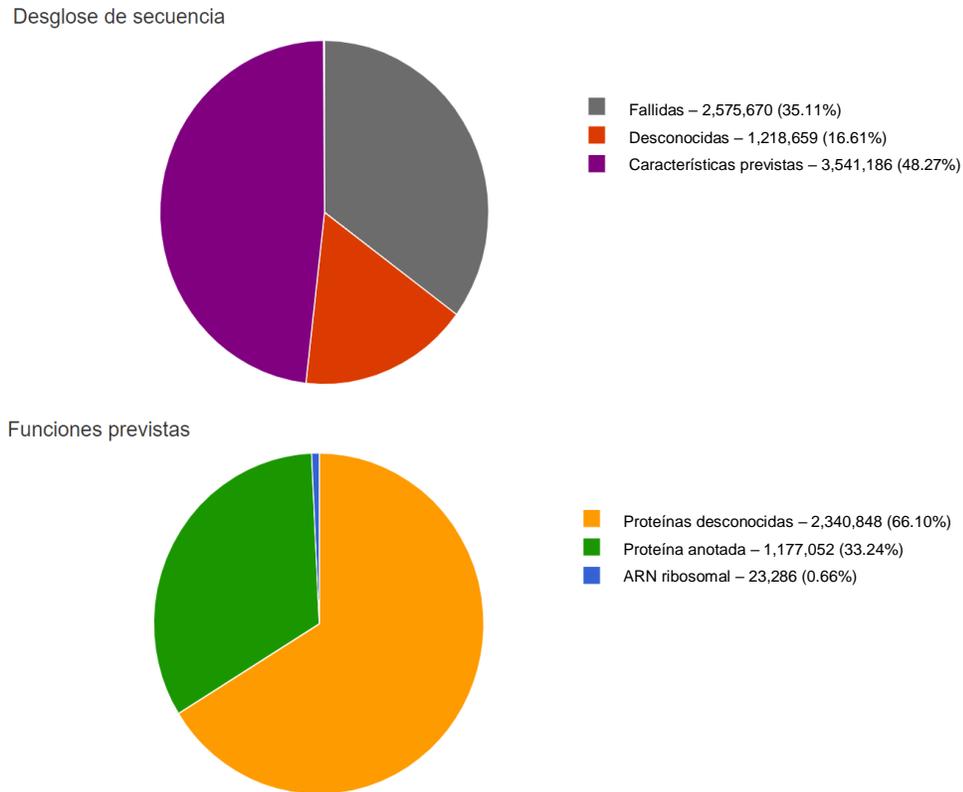


3.3 Análisis metabólico del microbioma obtenido del Metagenoma del tracto digestivo de larvas de *Z. morio* alimentadas con Poliestireno Expandido.

Para este análisis, el conjunto de datos de la muestra estuvo conformado por 7.335.515 secuencias que suman un total de 1.817.898.404 pares de bases con una longitud promedio de 248 bp. De las 2.575.670 secuencias obtenidas, 35,11% no pasaron los filtros de calidad requeridos y de estas, la "Dereplication" identificación de grupos de genomas idénticos o similares, identificó 2.574.628 secuencias como lecturas duplicadas

artificialmente. De las secuencias que pasaron el control de calidad, 23.286 secuencias (1%) presentaron genes correspondientes al ARN ribosomal, 1.177.052 secuencias (33,24%) presentaron proteínas predichas con funciones conocidas y 2.340.848 secuencias (66,10%) proteínas con función desconocida (**Figura 26**).

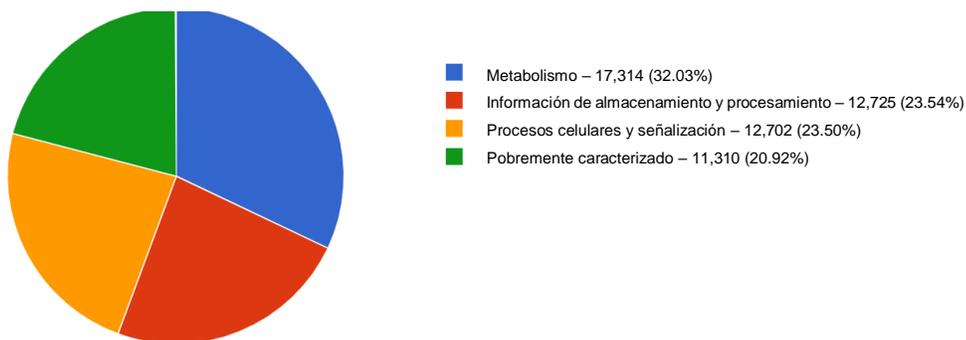
Figura 26. Análisis de secuencias y funciones potenciales obtenidas del tracto intestinal de *Z. morio* bajo una alimentación de EPS.



3.3.1.1 Distribución de asignaciones a potenciales categorías funcionales.

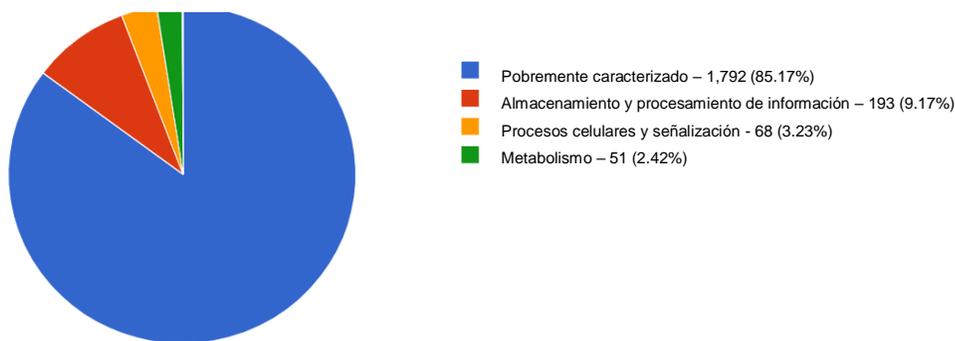
Los gráficos que se presentan a continuación (**Figuras 27 a 30**) ilustran la distribución de categorías funcionales para Clusters of Orthologous Genes (COGs), KEGG Orthology (KOs), Noggin, (NOGs) y subsistemas en el nivel más alto respaldado por estas jerarquías funcionales. En las gráficas se indicó el porcentaje de lecturas con funciones proteicas anotadas en la categoría de la fuente dada. A través de COG (**Figura 27**) se representó el 32,03% de las lecturas corresponden a una función perteneciente al metabolismo, seguido de almacenamiento y procesamiento de información 23,54%, procesos celulares y señalización 23,5% y un 20,92% que no se caracterizó.

Figura 27. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos COGs.



En la **Figura 28** para los resultados obtenidos por NOG, se encontró que a este nivel las lecturas no se caracterizaron en un 85,17%, sin embargo, el 9,17% corresponde a Información de almacenamiento y procesamiento, seguido de procesos celulares y señalización 3,23% y por último metabolismo con 2,42%.

Figura 28. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos NOGs.



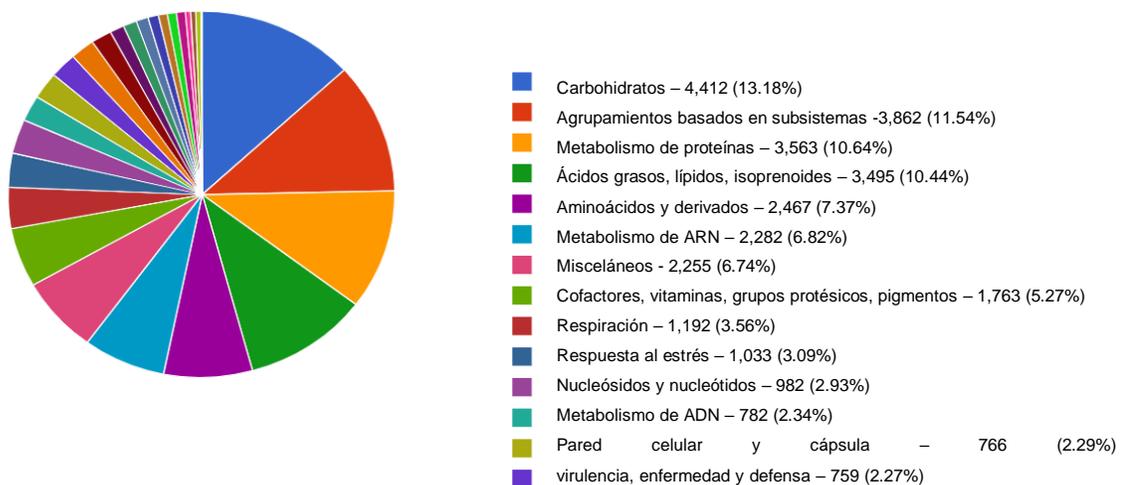
En la **Figura 29** se encontró que usando la base de datos de KO la asignación más alta del microbioma corresponde al metabolismo con 27,07%, seguido de procesamiento en la información genética (24,8%) y procesos celulares (20%); también se encontraron funciones asignados a la categoría de procesamiento de la función ambiental en un 13,2%, a enfermedades humanas en un 11,6% y finalmente en menor asignación a sistemas orgánicos con un 3%.

Figura 29. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos KOs



Al analizar esta información por las categorías de subsistemas (**Figura 30**), se observó que el microbioma está asociado a un 13,18% con el metabolismo de carbohidratos, con similares porcentajes para subsistemas de agrupamientos de bases, metabolismo de proteínas, ácidos grasos, aminoácidos derivados, metabolismo de RNA y otras funciones en menor proporción como misceláneas entre las que se podría incluir la degradación de alimento, cofactores, vitaminas, grupos protéticos, pigmentos, respiración, respuesta al estrés, nucleósidos y nucleótidos, metabolismo del ADN, pared celular y cápsula, enfermedad y defensa.

Figura 30. Asignación de lecturas teniendo en cuenta la categoría funcional de la base de datos de subsistemas.

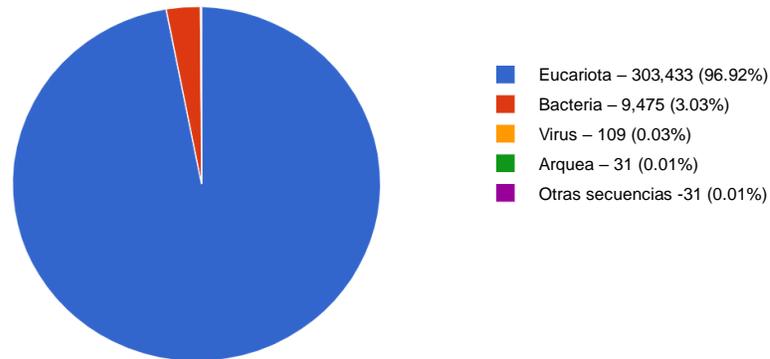


3.3.1.2 Distribución de aciertos taxonómicos

Las siguientes Figuras representan la distribución de taxones utilizando el algoritmo contigLCA que encuentra una única entidad taxonómica de consenso para todas las

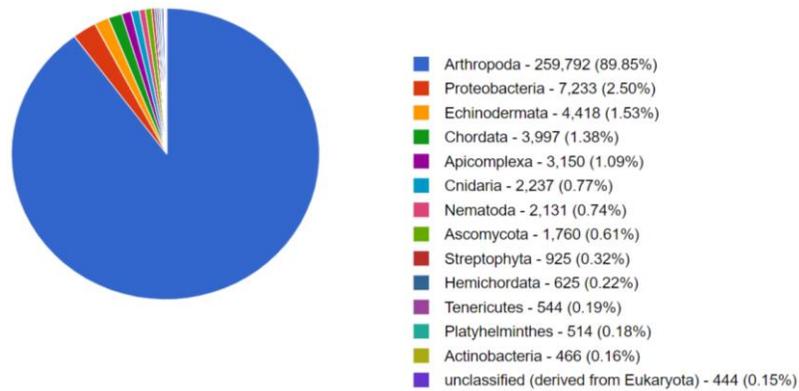
características de cada secuencia individual. El gran porcentaje de *Eukaryota* hallado pertenece a *Zophobas* debido a la técnica usada para obtener la muestra desde el intestino de las larvas y aunque existan *Virus*, *Archaea* y otras secuencias, la presencia del dominio *Bacteria* es la parte de taxones en la que se enfoca el presente trabajo (**Figura 31**), ya que es el Dominio más representativo de los microorganismos encontrados.

Figura 31. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Dominio.



En la **Figura 32**, se tiene que el mayor porcentaje de asignación de lecturas corresponde al Filo *Arthropoda* proveniente del origen de la muestra, seguido de *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*. También se encontró asignación en un 0,61 % para el Filo *Ascomycota*.

Figura 32. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Filo.



En la **Figura 33** de aciertos taxonómicos por clase, *Insecta* corresponde al 89,73% perteneciente a la larva, igual que en la **Figura 34**, el orden *Coleoptera*. En la Clase *Mollicutes* incluye el género *Spiroplasma*.

Figura 33. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Clase.

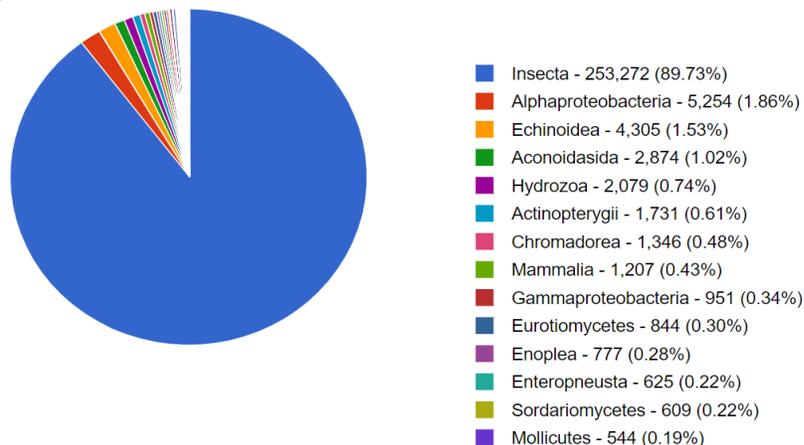
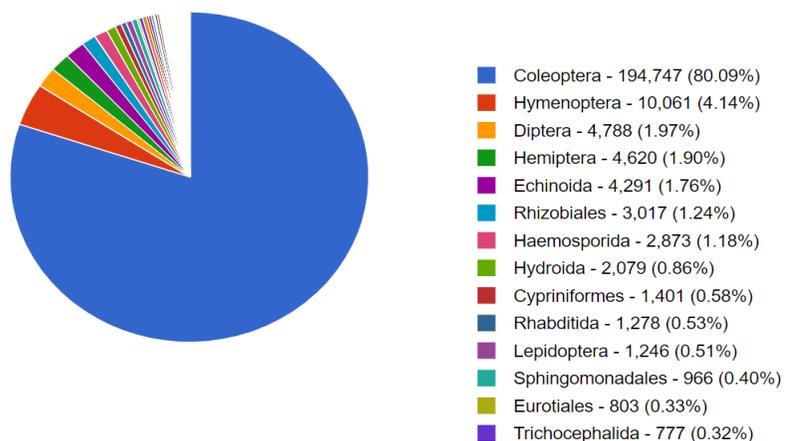
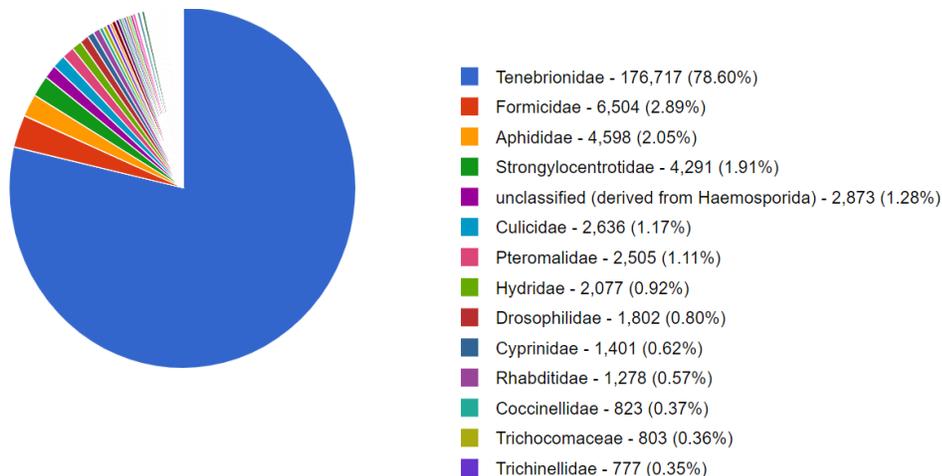


Figura 34. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Orden.



En la **Figura 35** de distribución de aciertos taxonómicos la familia *Tenebrionidae*, a la cual pertenece el *Zophobas Morio*, es la de mayor porcentaje (78,60%).

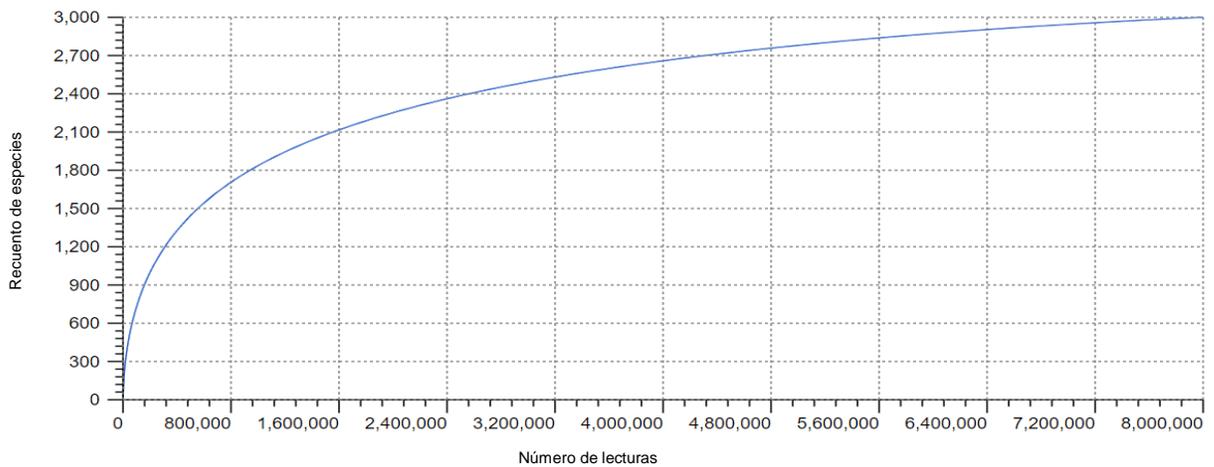
Figura 35. Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas a nivel de Familia.



3.3.1.3 Curva de rarefacción

En la **Figura 36**, se presenta la curva de rarefacción de la riqueza de especies anotada para la muestra secuenciada. Inicialmente Las curvas de muestreo aumentan rápidamente y luego se estabilizan hacia una asíntota, esto pasa a medida que se encuentran menos especies nuevas por unidad de individuos recolectados. Estas curvas de rarefacción se calcularon a partir de la tabla de abundancia de especies. Las curvas representan el número promedio de anotaciones de especies diferentes para submuestras del conjunto de datos completo, aquí se puede observar que se empieza a estabilizar sobre las 7.200.000 lecturas para una asignación de 3.000 especies.

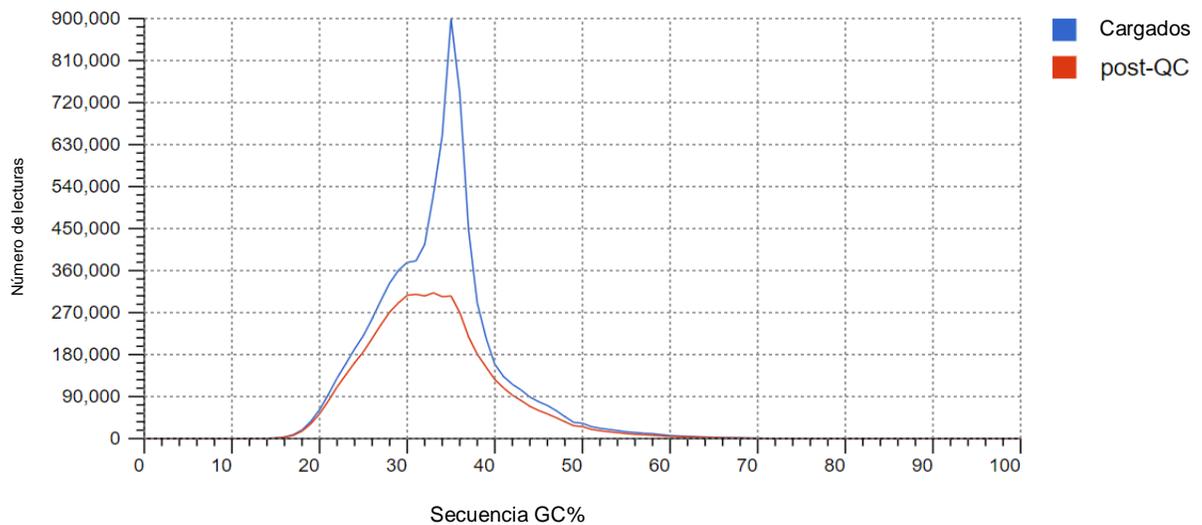
Figura 36. Curva de rarefacción para las lecturas obtenidas en el análisis de Metagenómica.



3.3.1.4 Distribución de secuencia de GC

El histograma a continuación presenta la distribución del porcentaje de GC para este Metagenoma (**Figura 37**). Cada posición representa el número de secuencias dentro de un rango de porcentaje de GC (32%). Los datos utilizados en estos gráficos se basan en la carga sin procesar y las secuencias posteriores al control de calidad.

Figura 37. Histograma de distribución del porcentaje de GC en el análisis Metagenómico.



De acuerdo con los resultados obtenidos El género *Spiroplasma* (**Figura 14, Tabla 6**) fue el que más predominó en el tracto digestivo de las larvas para todas las muestras, con una diferencia notoria en los porcentajes en comparación con los otros géneros, tanto en las tres muestras alimentadas sólo con avena, como con las dos de EPS. Esto indicaría que, aunque algunos microorganismos son capaces de degradar el plástico, el % de biodegradación es bajo (Urbanek et al., 2018). Las bacterias del género *Spiroplasma* son habitantes naturales y quizá el principal tipo de microorganismos en nichos donde las condiciones de supervivencia dependen exclusivamente de plástico, lo que es apoyado por los resultados de los análisis de diversidad alfa de Simpson entre tratamientos y muestras (**Figuras 20 y 21**) y con diferencias significativas de acuerdo con los resultados de diversidad beta para tratamientos (**Figura 22**).

La clasificación taxonómica y los porcentajes de abundancia de la microbiota hallada en cada tratamiento (**Figuras 9 a 13**), permitieron comprobar que bajo las dos dietas utilizadas para la alimentación de las larvas de *Zophobas morio* se encontraron microorganismos similares, aunque en proporciones diferentes, siendo por ejemplo *Spiroplasma* spp. El más abundante en los dos tratamientos, con un 71,5% de abundancia relativa en el tratamiento con avena y 61,6% en el tratamiento con EPS, autores como Anja et al., (2018), reportaron este género en un hallazgo similar. También se evidenció la presencia de otros géneros como *Pantoea*, la segunda bacteria más abundante y en menor proporción de *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudoarthobacter*, *Disgonomonas*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Catenibacillus*, *Kluyvera*, *Vitroscilla* y *Nitrospira*; sin embargo, hay que recalcar que como

en la curva de rarefacción (**Figura 19**) aún se observa una tendencia en ascenso de esta, en un futuro estudio podrían incluso aparecer algunos otros nuevos géneros, por ejemplo para el supergusano *Zophobas* las especies del microbioma intestinal más abundantes fueron *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Kluyvera* y *Lactococcus*; para *Z. morio*, fueron *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia-Shigella* y *Lactococcus*, esas especies del microbioma de los filos *Enterococcus* y *Enterobacteriaceae* fueron encontrados en larvas alimentadas durante 20 días con EPS, lo que puede indicar un papel crucial en la degradación del mismo; otros filos como *Firmicutes* y *Proteobacteria* fueron también predominantes en los intestinos de los grupos alimentados con EPS durante 20 días, este resultado es consistente con los resultados de estudios previos realizados por (Jiang *et al.*, 2021) y coincide con los encontrados en este estudio. Por otro lado, hay reportes que no coinciden con los de este estudio como el hallazgo de la cepa YT2 de *Exiguobacterium* sp encontrada en el intestino de los gusanos de la harina *Tenebrio molitor* y *Zophobas morio* (Yang *et al.*, 2015). También, (Kotova *et al.*, 2021) observaron una sucesión pronunciada en la comunidad microbiana intestinal de larvas que se alimentaron de EPS, siendo las *Lactobacterias* y las *Enterobacterias* las bacterias más predominantes al iniciar el estudio y posteriormente reemplazadas por *Streptococos*, *Espioplasmas* y *Enterococos* al finalizar la investigación, similar a lo hallado en este estudio.

En los análisis comparativos entre tratamientos se observó algunas diferencias significativas entre OTUs (**Figura 23**) lo que permite corroborar lo expresado anteriormente, por ejemplo el OTU_320, es el más abundante en el tratamiento con EPS y corresponde a la especie *Kluyvera georgiana*, también está el OTU_820 del género *Pseudarthrobacter*, el OTU_49 *Enterococcus*, OTU_516 asignado a la familia *Spiroplasmataceae*, OTU_50 perteneciente al género *Bacillus*, OTU_921 del Género *Clostridium sensu stricto* 6, OTU_526 correspondiente a *Spiroplasma*, OTU_1183 del Género *Romboutsia*, OTU_313 género *Pantoea*. Estos resultados deben ser corroborados en estudios posteriores teniendo en cuenta que otros investigadores también citan otros microorganismos degradadores de plástico que no fueron evidenciados en esta investigación, como el caso de los reportados por (Fesseha & Abebe, 2019) donde encontraron la presencia de *Clostridium botulinum*, *Firmicutes*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacillus borstelensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum*, *Amycolatopsis species* y *Aspergillus flavus*.

Cabe resaltar que de acuerdo con las diferencias significativas encontradas entre OTUs de los dos tratamientos, se podría sugerir a los microorganismos reportados en la **Figura 23** como posibles degradadores de EPS. Con estos resultados se asume que los microorganismos que crecen en la superficie del EPS pueden sintetizar enzimas o producen metabolitos agresivos que promueven la degradación del polímero en oligómeros y monómeros; Sin embargo, ninguna de las enzimas microbianas actualmente conocidas demostró ser capaz de degradar EPS (Kotova *et al.*, 2021). Aunque existen reportes que indican el crecimiento de microorganismos sobre el EPS; los signos que revelaron esto fueron la turbidez y el oscurecimiento del medio mineral, estos se corroboraron a través de la observación con el microscopio electrónico de barrido, donde se identificaron túneles, grietas y agregados celulares en las láminas de EPS (Peña-Pascagaza *et al.*, 2020). El proceso de degradación del EPS comienza con la generación de biopelículas en la superficie del mismo, seguido del deterioro del material debido a la actividad enzimática de los microorganismos. En opinión de muchos investigadores, las vías metabólicas involucradas en la transformación de plástico aún no están claras, sin embargo, algunos describen que la oxidación de estireno a fenilacetato a través del ciclo del ácido cítrico, es común entre diferentes microorganismos (Peña-Pascagaza *et al.*, 2020).

Otros estudios, pero realizados en ambientes marinos encontraron que algunos de los microorganismos que crecen en presencia de plástico son *Phormidium*, *Lewinella*, *Rivularia*, *Stanieria*, *Pseudophormidium*, *Proteobacteria*, *Bacterioides*, *Arcobacter*, *Colwellia*, de los cuales solo el filo *Proteobacteria* coincide con los encontrados en esta investigación (Urbanek *et al.*, 2018). En reportes enfocados en estudiar el tracto digestivo de insectos, (Ziganshina *et al.*, 2018) encontraron los filos *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, *Planctomycetes*, *Chlorifexae*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Synergistetes*, de los cuales solo los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* coinciden con este estudio y los de (Hou & Majumder, 2021).

Otros reportes sugieren que los microorganismos *Rhizopus delemar*, *C. botulinum*, Firmicutes, *R. arrizus*, *P. stutzeri*, *B. bordetelensis*, *Pseudomonas fluorescens* B-22. *P. putida*, *Ochrobactrum* TD, *Streptomyces*, *Fusarium*, *Amycolaptosis spp.*, *Pestalotiopsis microspore*, *Curvularia senegalensis* y *Fusarium solani* están involucrados en la degradación de polímeros tanto biodegradables como no biodegradables (Ahmed *et al.*,

2018). De estos y al igual que con los estudios presentados anteriormente, los filos *Firmicutes* son comunes con respecto a lo hallado en esta investigación.

Otros microorganismos sugeridos como responsables de la degradación de plásticos los presentó (Imre & Pukánszky, 2013), entre los cuales destaca *Streptomyces* y el Filo Firmicutes; *Aspergillus flavus*, *Penicilium funiculosum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp*, *Fusarium*, *Amycolatiopsis spp*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizopus delemar*, Proteobacteria, *Penicillium*, *Rhizopus arrizus* y *Pseudomonas stutzeri*. También *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* descritas por Skariyachan *et al.* (2021). Aunque todos los reportes que se presentan soportan los resultados obtenidos en esta investigación, la diversidad de sustratos y formas de muestras utilizadas como película de polímero, polvo o gránulos de plástico dificultan la comparación de resultados entre diferentes estudios, por ejemplo, en el caso de las cepas de *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter pittii* y *Micrococcus luteus* que demostraron realizar la biofragmentación de polietileno de baja densidad (LDPE) sin necesidad de tratar previamente (Kotova *et al.*, 2021)

En los análisis realizados en MG-RAST para el Metagenoma completo, también se encontró que el género más abundante correspondió a *Spiroplasma*, sin embargo, la mayor asignación de lecturas en este análisis correspondió a la especie huésped *Z. morio* y en la curva de rarefacción se evidenció que tampoco llegó a la asíntota. Esto pudo deberse a que en estudios de genomas completos para la identificación de microorganismos las muestras a analizar solo representan más o menos el 1% de los datos totales de la secuenciación, lo que hace difícil establecer relaciones de sus funciones como se observa en la **Figura 26**. Sin embargo, se trató de realizar una aproximación que permitiera obtener una idea del potencial metabólico del microbioma obtenido, encontrándose que un 66,1 % de las secuencias contienen proteínas predichas, aunque con función desconocida y solo un 33 % tienen alguna función que puede o no estar relacionado con el microbioma y el hospedero.

En la distribución de las asignaciones de la categoría funcional COG (Grupos Ortólogos de Proteínas) que se basa en comparar secuencias de proteínas codificadas en genomas completos y que representan los grandes linajes filogenéticos en almacenamiento, procesos celulares y metabolismo, se encontró que un 20,92% corresponde a secuencias pobremente caracterizadas (**Figura 27**); para NOG (Genealogía Evolutiva de los Genes)

un 85,17% corresponde a secuencias pobremente caracterizadas (**Figura 28**) y finalmente para la evaluación a nivel de asignación de lecturas de subsistemas (**Figura 30**) se encontraron caracterizaciones de muchas funciones que pertenecen probablemente al huésped como metabolismo de carbohidratos en su mayor proporción, proteínas, ácidos grasos, lípidos, aminoácidos, metabolismo de RNA, respiración celular, metabolismo del ADN, etc., pero también se encontró funciones miscelánea en un 6,74% donde se podría encuadrar funciones cumplidas por el microbioma. Entre estas probablemente se ubica la biotransformación del plástico, que es una función específica de algunos microorganismos. Muchas de las secuencias pertenecientes a subsistemas metabólicos y de degradación de diferentes materiales son reportadas en una colección consistente de roles publicada en la web (http://www.theseed.org/Release1_Subsystems/index.html) (Overbeek *et al.*, 2005).

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). En este sentido, algunos estudios han encontrado compuestos resultantes del metabolismo de oxígeno en la superficie del EPS, al igual que algunos materiales que parecen ser tóxicos y peligrosos, como tolueno, fenol y heptano, que pueden asociarse a plastificantes, antioxidantes y otros aditivos en el PS, sin embargo, estos compuestos no se detectaron en el intestino ni en excrementos de las larvas, lo que sugiere una posible degradación por parte de las mismas (Jiang *et al.*, 2021).

De los resultados obtenidos, se destaca la presencia del género *Pseudomonas*, ya que estos microorganismos toman el EPS y lo llevan a su forma básica de estireno, a su vez este se degrada en precursores del ciclo del ácido tricarbóxico. Dado esto, el estireno se degrada aeróbicamente a través de dos vías principales, una ataca al grupo vinilo y la otra se basa en la ruptura directa del anillo. En condiciones anaeróbicas, el estireno se convierte en ácido fenilacético (PAA) y luego en ácido benzoico; por ambos mecanismos se hace posible biodegradar completamente el EPS (Hou & Majumder, 2021).

4 Conclusiones

4.1 Conclusiones

Se encontró que el género *Spiroplasma* fue el más abundante respecto a los 11 identificados. Su presencia se detectó en las dos dietas evaluadas con una frecuencia de 71,5% para el tratamiento con Avena y de 61,6% para el tratamiento EPS.

Al comparar las dos dietas se obtuvo que los microorganismos *Kluyvera georgiana* y *Clostridium sensu stricto* 6, así como los géneros *Pseudarthrobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Romboutsia* y *Pantoea* 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.

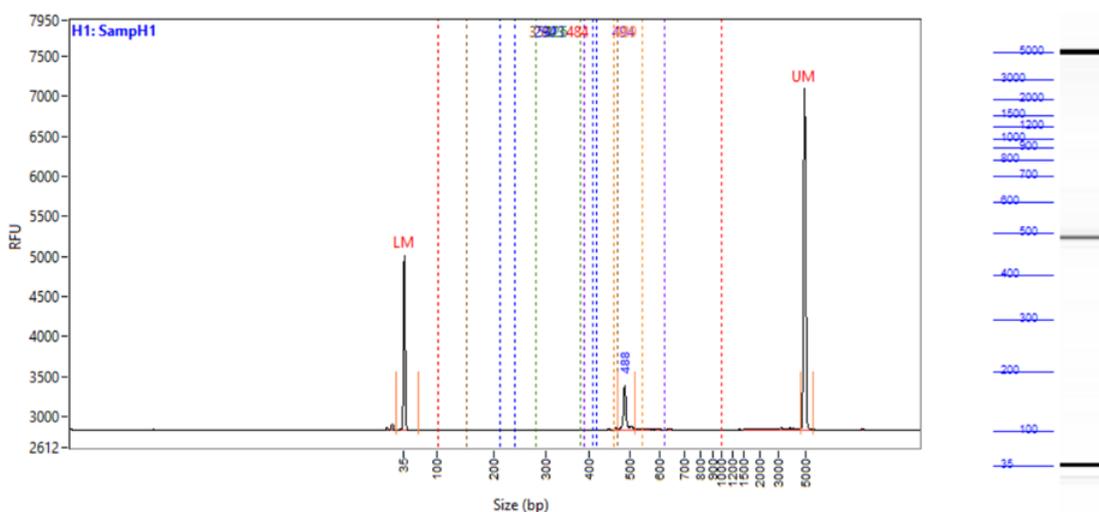
En el análisis del potencial metabólico del microbioma se encontró que hay muchas secuencias a las que aún se le desconoce su función o relación con una proteína en específico, esto puede deberse a que las funciones relacionadas con biodegradación aún no están determinadas en secuencias y por ende no se encuentran reportadas en las bases de datos.

De acuerdo con las curvas de rarefacción obtenidas, se sugiere seguir realizando estudios de metagenómica, en los cuales se pueda llegar a una asíntota determinante y conclusiva de las especies encontradas.

Se puede concluir que en este estudio las larvas alimentadas con EPS expandido sobrevivieron y los géneros/especies bacterianos encontrados en su tracto digestivo podrían jugar un papel clave en el proceso de biodegradación de EPS.

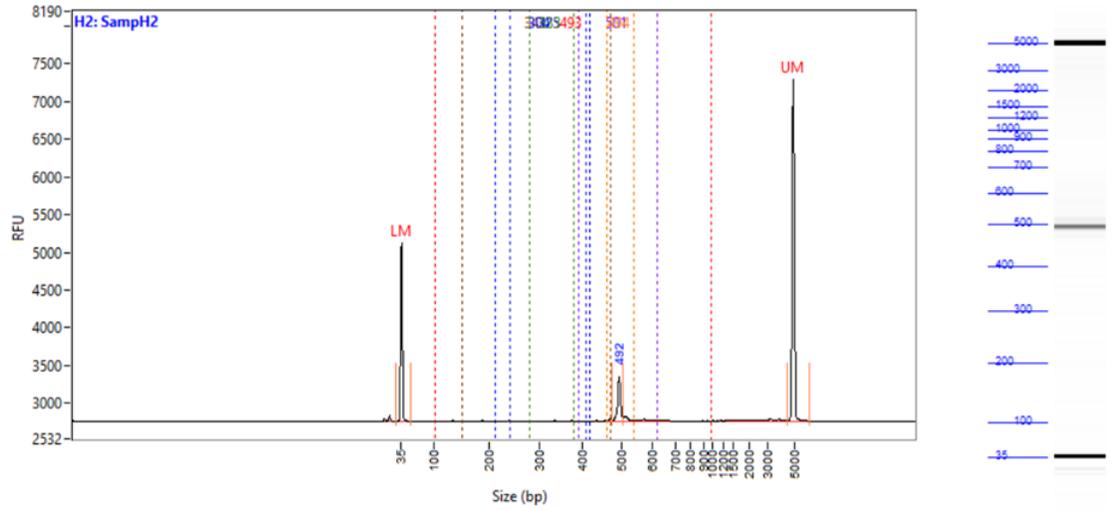
Finalmente, los géneros/especies bacterianos encontrados en el tracto digestivo de *Z. morio* son candidatos-blancos para ser obtenidos en cultivo puro y poder determinar individualmente su actividad en la biodegradación del EPS.

A. Anexo: Cuantificación de las muestras e integridad con el procedimiento de electroforesis en gel de agarosa usando Agilent 5400. 1) Muestra A2_1; 2) Muestras A2_2; 3) Muestra A3_1; 4) Muestra P1_1; 5) Muestra P1_2; 6) Muestra P3_1; 7) Muestra P3_2; 8) Muestra P2.

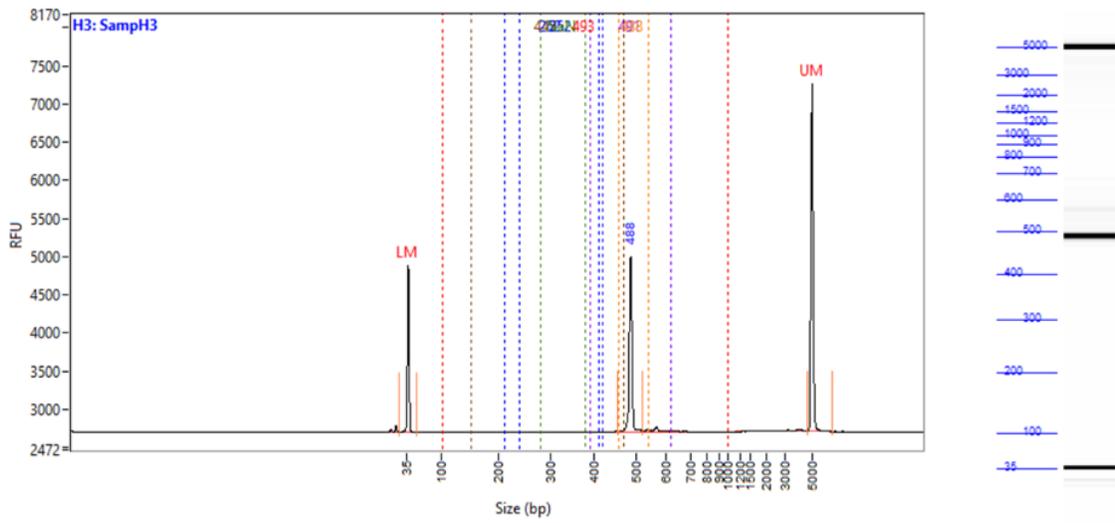


1.

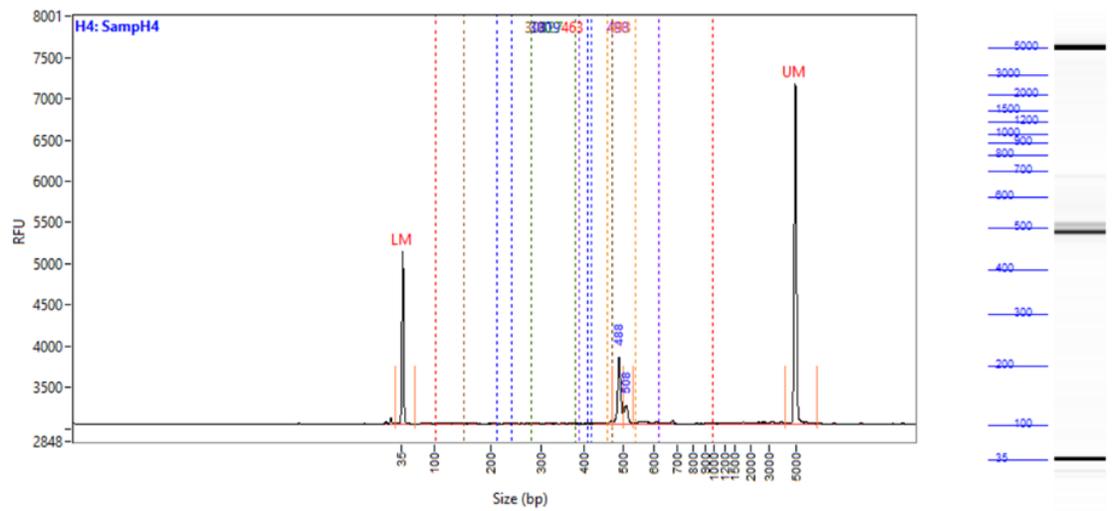
84 Estudio del microbioma intestinal de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) como aproximación al uso potencial para la biodegradación del Poliestireno



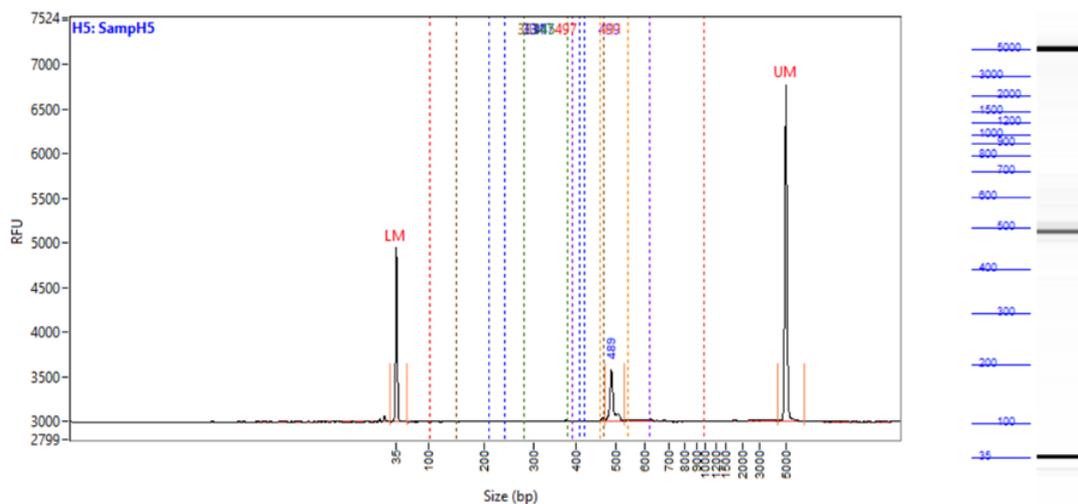
2.



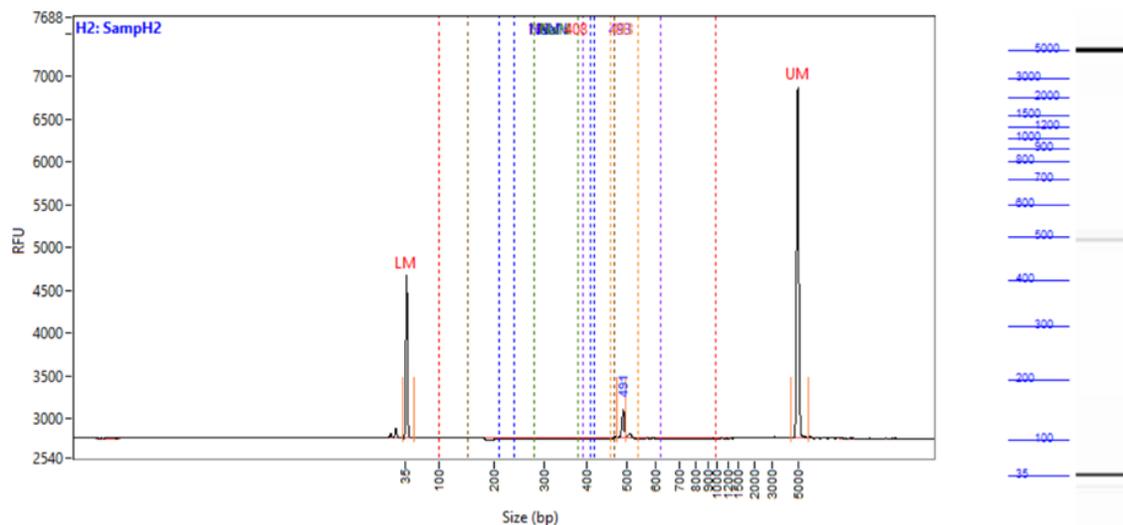
3.



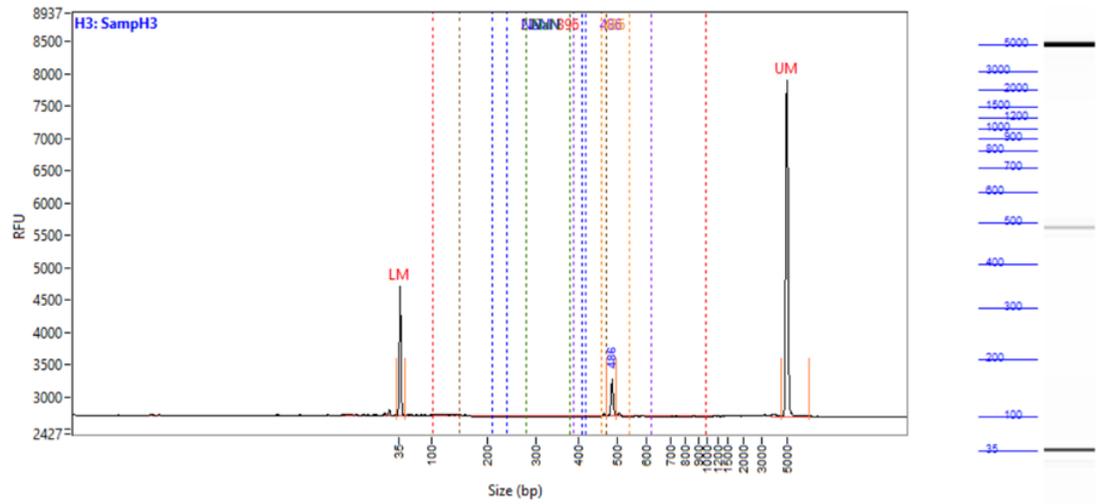
4.



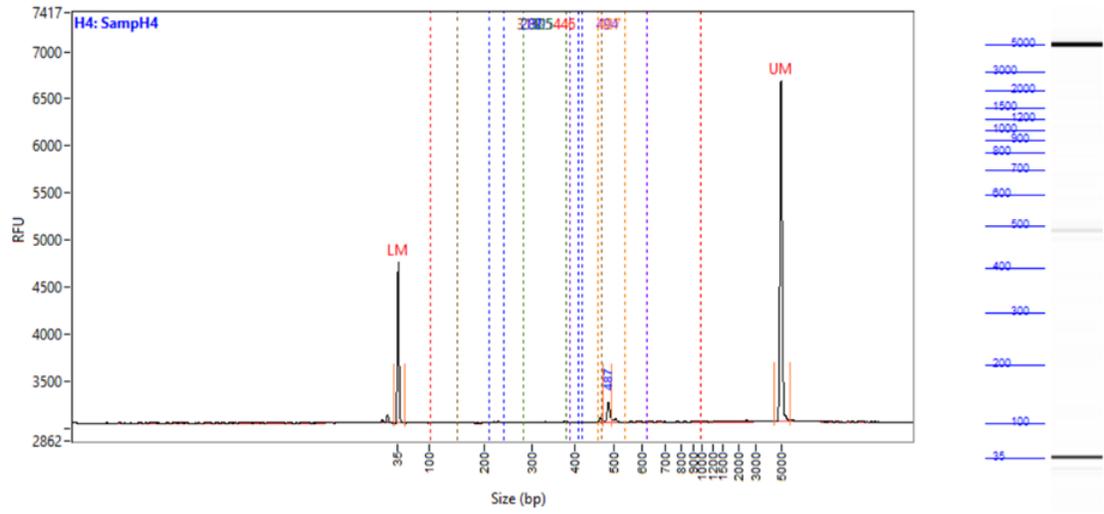
5.



6.



7.



8.

B.Anexo: Enzimas/cepas bacterianas y fúngicas involucradas en la degradación de plásticos biodegradables y no biodegradables. Tomado de Ahmed *et al.* (2018); Bhardwaj & Gupta (2013) y Fesseha (2019).

Tipo	Enzima	Microorganismo	Tipo de plástico	Referencia
Bacteria	Lipasa	<i>C. botulinum</i>	PCL	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Desconocida	<i>Firmicutes</i>	PHB, PCL Y PBS	Tokiwa <i>et al.</i> (2009) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013 Fesseha, 2019
	Lipasa	<i>Penicillium</i>	Adipato polietileno (PEA), PBS Y PCL	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Serina hidrolasa	<i>P. stutzeri</i>	Polihidroxialcanoato (PHA), PBS Y PCL	Muhamad <i>et al.</i> (2015) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013 Fesseha, 2019
	Desconocida	<i>B. bordetelensis</i>	PET	Calabia y Tokiwa (2006)
	Desconocida	<i>Pseudomonas fluoerescens B-22. P putida, Ochrobactrum TD</i>	PVC, PFT	Danko <i>et al.</i> (2004); Orr <i>et al.</i> (2004) Fesseha, 2019
	Desconocida	<i>Protobacteria</i>	PHB, PCL y PBS	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Lipasa	<i>Clostridium botulinum</i>	PCL	Fesseha, 2019
	No identificada	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	PHA	Fesseha, 2019
	Desconocida	<i>Streptomyces (Genus)</i>	PHB, PVC	Fesseha, 2019
	Desconocida	<i>Streptomyces</i>	PHB Y PCL	Tokiwa <i>et al.</i> (2009) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Magnesio peroxidasa	<i>Amycolatopsis species</i>	PLA, PE	Fesseha, 2019
	Manganeso peroxidasa	<i>Amycolaptosis sp.</i>	PLA Y PE	Muhamad <i>et al.</i> (2015)
	Hongo	Glicosidasa	<i>A. flavus</i>	Poliprolactona (PCL)
Lipasa		<i>Rhizopus delemar,</i>	PCL	Abou-zeid <i>et al.</i> (2001. 2009)
Lipasa		<i>Rhizopus arrizus</i>	Adipato polietileno (PEA), PBS Y PCL	Tokiwa <i>et al.</i> (2009)

	Desconocida	<i>Penicilium funiculosum</i>	Polihidroxitirato (PHB)	Tokiwa <i>et al.</i> (2009) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013 Fesseha, 2019
Hongo	Catalasa, proteasa	<i>A. niger</i>	PCL	Tokiwa <i>et al.</i> (2009) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013 Fesseha, 2019
	Cutinasa	<i>Fusarium</i>	PCL	Muhamad <i>et al.</i> (2015)
	Cutinasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Polibutileno succinato (PBS)	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Ureasa	<i>Trichoderma sp.</i>	Poliuretano	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Cutinasa	<i>Fusarium</i>	PCL	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013 Fesseha, 2019
	Desconocida	<i>Amycolatiopsis sp.</i>	Ácido poliláctico (PLA)	Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
	Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Polietileno	Fesseha, 2019
	Lipasa	<i>Rhizopus arrisus</i> <i>Rhizopus delemor</i>	PEA, PBS Y PCL PCL	Fesseha, 2019
	Serina hidrolasa	<i>Pestalotiopsis microspore,</i> <i>Curvularia senegalensis,</i> <i>Fusarium solani</i>	PUR	Howard (2002); Russell <i>et al.</i> (2011) Bhardwaj, H; Gupta R. 2013
PCL-Policaprolactona, PHB-Polihidroxitirato, PLA-Acido poliláctico, PE-Polietileno, PVC-Polivinil clorhidrato, PET-Tereftalato de polietileno, PEA-Poliéster acetato, PBS-Succinato de polibutileno, PHA-Polihidroxiácido.				

Bibliografía

- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>
- Alexeeva, I., Elliott, E. J., Rollins, S., Gasparich, G. E., Lazar, J., & Rohwer, R. G. (2006). Absence of Spiroplasma or other bacterial 16S rRNA genes in brain tissue of hamsters with scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(1), 91–97. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.91-97.2006>
- Argüello, H., Cortez-Romero, C., Rojas-Martínez, R. I., Segura-León, O. L., Herrera-Haro, J. G., Salazar-Ortiz, J., & Gallegos-Sanchez, J. (2014). Polimorfismos de la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15) y su relación con el tipo de parto en la oveja pelibuey. *Agrociencia*, *48*(1), 53–69.
- Bae, J., Cho, H. woo, Jung, H., Park, J., Yun, S., Ha, S., Lee, Y., & Kim, T. J. (2021). Changes in Intestinal Microbiota Due to the Expanded Polystyrene Diet of Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Indian Journal of Microbiology*, *61*(2), 130–136. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00922-w>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2012). *Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics*. *Journal of Polymers and the Environment*, *21*(2), 575–579. doi:10.1007/s10924-012-0456-z
- Bornscheuer, U. T. (2002). *Bornscheuer 2002*. *26*, 73–81.

- Brandon, A. M., Gao, S. H., Tian, R., Ning, D., Yang, S. S., Zhou, J., Wu, W. M., & Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science and Technology*, 52(11), 6526–6533. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301>
- Bennet, John; Dolin Raphael; Blaser Martin. (2014). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone. ISBN 978-1-455-74801-3.
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Calderoli, P. (2016). Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Cao, Y., & Wang, B. (2009). Biodegradation of silk biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1514–1524. <https://doi.org/10.3390/ijms10041514>
- Cole, J. R. (2003). *The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy*. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 442–443. doi:10.1093/nar/gkg039
- Cox, M. P., Peterson, D. A., & Biggs, P. J. (2010). SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-485>
- Danso, D., Chow, J., & 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>
- Daviran Yance, P. (2017). Biodegradación de la Espuma de Poliestireno por la larva del *Tenebrio molitor* para la producción de Abono, 2017. *Universidad César Vallejo*.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Farmer, J. J. (2015). Kluveria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01151>
- Fesseha, H., & Abebe, F. (2019). Degradation of Plastic Materials Using Microorganisms: A Review. *Public Health – Open Journal*, 4(2), 57–63. <https://doi.org/10.17140/phoj-4-136>

- Fuente-Salcido, Norma. (2015). Las Bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* y la Proteómica como una Herramienta para su Análisis. *Fronteras En Microbiología Aplicada, October*, 154–174. México.
- Ghosh, S. K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research International, 20(7)*, 4339–4355. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1706-x>
- Gilbert, J. A., & 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>
- Goitisoló, I., Eguiazábal, J. I., & Nazábal, J. (2008). Effects of reprocessing on the structure and properties of polyamide 6 nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability, 93(10)*, 1747–1752. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.030>
- Gómez Serrato, J. G. (2016). Diagnóstico del impacto del plástico (botellas) sobre el medio ambiente: Un estado del arte [en línea]. *Universidad Santo Tomás*, 81. <http://hdl.handle.net/11634/10047>
- Haider, T. P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie - International Edition, 58(1)*, 50–62. <https://doi.org/10.1002/anie.201805766>
- Henry, M., & Fouladkhah, A. (2019). Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms, 7(3)*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030077>
- Hou, L., & Majumder, E. L. W. (2021). Potential for and distribution of enzymatic biodegradation of polystyrene by environmental microorganisms. *Materials, 14(3)*, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ma14030503>
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Welch, D. M. (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology, 8(7)*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r143>
- Imre, B., & Pukánszky, B. (2013). Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal, 49(6)*, 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019>
- Jakubowicz, I., Yarahmadi, N., & Arthurson, V. (2011). Kinetics of abiotic and biotic degradability of low-density polyethylene containing prodegradant additives and its

- effect on the growth of microbial communities. *Polymer Degradation and Stability*, 96(5), 919–928. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.01.031>
- Jensen, L. J., Julien, P., Kuhn, M., von Mering, C., Muller, J., Doerks, T., & Bork, P. (2008). eggNOG: Automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1), 250–254. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm796>
- Jiang, S., Su, T., Zhao, J., & Wang, Z. (2021). Biodegradation of polystyrene by tenebrio molitor, galleria mellonella, and zophobas atratus larvae and comparison of their degradation effects. *Polymers*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/polym13203539>
- Jung, J., Heo, A., Woo Park, Y., Ji Kim, Y., Koh, H., & Park, W. (2014). Gut microbiota of tenebrio molitor and their response to environmental change. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 888–897. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05016>
- K. Meng, T., Y.Y. Beng, D., S. Mohd Kassim, A., H. A. Razak, A., & A. Mohd Fauzi, N. (2019). Optimization of Polystyrene Biodegradation using Response Surface Methodology (RSM) Measured by Simple Colorimetric Method. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(4.14), 216. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i4.14.27567>
- Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., & Patil, V. B. (2015). Microbial degradation of plastic: a review Swapnil. *Journal of Biochemical Technology*, 6(2), 952–961.
- Kanehisa-The KEGG database - PubMed-2002*. (n.d.).
- Kent, W. J. (2002). BLAT —The BLAST -Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12(4), 656–664. <https://doi.org/10.1101/gr.229202>
- Kotova, I. B., Taktarova, Y. V., Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Bubnov, I. A., Malakhova, D. V., Shirinkina, L. I., Sokolova, T. G., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2021). Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Make it More Efficient. *Microbiology (Russian Federation)*, 90(6), 671–701. <https://doi.org/10.1134/S0026261721060084>
- Lorenz P, Eck J.. Metagenomics and industrial applications. (2005). *Nature Reviews Microbiology* 3(6):510-6. DOI:10.1038/nrmicro1161
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8. PMID: 25516281; PMCID: PMC4302049.
- Lovley DR. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol*. Oct;1(1):35-44. doi: 10.1038/nrmicro731. PMID: 15040178.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E.

- (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Magrane, M., & Consortium, U. P. (2011). UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data. *Database*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1093/database/bar009>
- Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., Chen, I. M. A., Grechkin, Y., Dubchak, I., Anderson, I., Lykidis, A., Mavromatis, K., Hugenholtz, P., & Kyrpides, N. C. (2008). IMG/M: A data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1), 534–538. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm869>
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & 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.
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>
- Nomura, N., Shigeno-Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., & Nakahara, T. (1998). Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(4), 339–345. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(99\)89001-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(99)89001-1)
- Nukmal, N., Umar, S., Amanda, S. P., & Kanedi, M. (2018). Effect of styrofoam waste feeds on the growth, development and fecundity of mealworms (*Tenebrio molitor*). *OnLine Journal of Biological Sciences*, 18(1), 24–28. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2018.24.28>
- OpenMP, A. (2011). OpenMP Application Program Interface, v. 3.1. *OpenMP Architecture Review Board*, July. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:OpenMP+Application+Program+Interface#1>
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H. Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E. D., Gerdes, S., Glass, E. M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., ... Vonstein, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5691–5702. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
- Peña-Pascagaza, P. M., López-Ramírez, N. A., & Ballen-Segura, M. A. (2020). *Tenebrio*

- molitor and its gut bacteria growth in polystyrene (PS) presence as the sole source carbon. *Universitas Scientiarum*, 25(1), 37–53. <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.SC25-1.TMAI>
- Peng, B. Y., Li, Y., Fan, R., Chen, Z., Chen, J., Brandon, A. M., Criddle, C. S., Zhang, Y., & Wu, W. M. (2020). Biodegradation of low-density polyethylene and polystyrene in superworms, larvae of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae): Broad and limited extent depolymerization. *Environmental Pollution*, 266, 115206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115206>
- Pérez, M. D., Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147–161.
- Posada, B. (2012). La degradación de los plásticos. In *Revista Universidad EAFIT* (Vol. 30, Issue 94, pp. 67–86). <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/1408>
- Premraj, R., & Doble, M. (2005). Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(2), 186–193. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-2015-8-2-113-130>
- Priyanka, N., & Archana, T. (2011). Biodegradability of Polythene and Plastic By The Help of Microorganism: A Way for Brighter Future. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 01(02), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000111>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Ciesielski, S., & Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 256, 113265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113265>
- Ramis, X., Cadenato, A., Salla, J. M., Morancho, J. M., Vallés, A., Contat, L., & Ribes, A. (2004). Thermal degradation of polypropylene/starch-based materials with enhanced biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 86(3), 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.05.021>
- Ramos, J; Pino, J; Angeles, Sergio; García, A. 2008. Utilización potencial de la excreta del gusano amarillo de las harinas como abono orgánico. Instituto de Biología UNAM. Ap. Postal 70-153, C.P. 04510 México D.F

- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rujnić-Sokele, M., & Pilipović, A. (2017). Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management and Research*, 35(2), 132–140. <https://doi.org/10.1177/0734242X16683272>
- SCHULTE, Rainer. (2006). EL MANEJO DE ZOPHOBAS MORIO (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EN CLIMAS TROPICALES HUMEDOS. *Folia Amazónica*. 8. 47. 10.24841/fa.v8i2.321.
- SHAMAN: un sitio web fácil de usar para el análisis metataxonómico desde lecturas sin procesar hasta análisis estadístico Volant S, Lechat P, Woringer P, Motreff L, Campagne P, Malabat C, Kennedy S, Ghozlane A; *BMC Bioinformatics* 2020 10 de agosto; 21 (1): 345.
- Shelomi, M., Lin, S. S., & Liu, L. Y. (2019). Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae. *BMC Genomics*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6352-3>
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics Masayuki Shimao. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 242–247.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>
- Skariyachan, S., Taskeen, N., Kishore, A. P., Krishna, B. V., & Naidu, G. (2021). Novel consortia of enterobacter and pseudomonas formulated from cow dung exhibited enhanced biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Journal of Environmental Management*, 284(January), 112030. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112030>
- Sorek, R., Zhu, Y., Creevey, C. J., Francino, M. P., Bork, P., & Rubin, E. M. (2007). Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science*, 318(5855), 1449–1452. <https://doi.org/10.1126/science.1147112>
- Sun, J., Prabhu, A., Aroney, S. T. N., & Rinke, C. (2022). Insights into plastic biodegradation: community composition and functional capabilities of the superworm (*Zophobas morio*) microbiome in styrofoam feeding trials. *Microbial Genomics*, 8(6), 1–19. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000842>
- Tang, Z.-L., Kuo, T.-A., & Liu, H.-H. (2017). The Study of the Microbes Degraded Polystyrene. *Advances in Technology Innovation*, 2(1), 13–17.

- Téllez, A. (2012). La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos : una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá. In 2012.
- Thomas, T., Gilbert, J. & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Informatics Exp* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tipney, H. J., Leach, S. M., Feng, W., Spritz, R., Williams, T., & Hunter, L. (2009). Leveraging existing biological knowledge in the identification of candidate genes for facial dysmorphism. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S1-S12>
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W. et al. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* 144, 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00454947>
- White, J. R., Nagarajan, N., & Pop, M. (2009). Statistical Methods for Detecting Differentially Abundant Features in Clinical Metagenomic Samples. *PLoS Computational Biology*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000352>
- Wilke, A., Harrison, T., Wilkening, J., Field, D., Glass, E. M., Kyrpides, N., Mavrommatis, K., & Meyer, F. (2012). The M5nr: A novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-141>
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Yang, S. S., Brandon, A. M., Xing, D. F., Yang, J., Pang, J. W., Criddle, C. S., Ren, N. Q., & Wu, W. M. (2018). Progresses in Polystyrene Biodegradation and Prospects for Solutions to Plastic Waste Pollution. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 150(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/150/1/012005>
- Yang, S. S., Ding, M. Q., Zhang, Z. R., Ding, J., Bai, S. W., Cao, G. L., Zhao, L., Pang, J.

- W., Xing, D. F., Ren, N. Q., & Wu, W. M. (2021). Confirmation of biodegradation of low-density polyethylene in dark- versus yellow- mealworms (larvae of *Tenebrio obscurus* versus *Tenebrio molitor*) via. gut microbe-independent depolymerization. *Science of the Total Environment*, 789, 147915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147915>
- Yang, S. S., Wu, W. M., Brandon, A. M., Fan, H. Q., Receveur, J. P., Li, Y., Wang, Z. Y., Fan, R., McClellan, R. L., Gao, S. H., Ning, D., Phillips, D. H., Peng, B. Y., Wang, H., Cai, S. Y., Li, P., Cai, W. W., Ding, L. Y., Yang, J., ... Criddle, C. S. (2018). Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chemosphere*, 212, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.078>
- Yang, Y., Wang, J., & 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. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., & Jiang, L. (2015). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environmental Science and Technology*, 49(20), 12080–12086. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>
- Ziganshina, E. E., Mohammed, W. S., Shagimardanova, E. I., Vankov, P. Y., Gogoleva, N. E., & Ziganshin, A. M. (2018). Fungal, bacterial, and archaeal diversity in the digestive tract of several beetle larvae (coleoptera). *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6765438>