



**Caracterización molecular y evaluación de la capacidad de degradación de microplástico  
de insectos del género *Hermetia* originarios del cantón Puerto Quito**

Pazmiño Flores, María Fernanda

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

13 de agosto del 2021



## Document Information

---

<b>Analyzed document</b>	MFPazmino para urkund.txt (D111220175)
<b>Submitted</b>	8/12/2021 9:26:00 PM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	fjflores2@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	2%
<b>Analysis address</b>	fjflores2.espe@analysis.urkund.com

## Sources included in the report

---

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.frontiersin.org/articles/635881">https://www.frontiersin.org/articles/635881</a> Fetched: 8/12/2021 9:27:00 PM	 <b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JORDAN%20SANCHEZ%20AARON%20ALEXANDER_comp%20ressed.pdf">https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JORDAN%20SANCHEZ%20AARON%20ALEXANDER_compressed.pdf</a> Fetched: 7/12/2021 4:27:22 AM	 <b>3</b>





**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización molecular y evaluación de la capacidad de degradación de microplástico de insectos del género *Hermetia* originarios del cantón Puerto Quito**” fue realizado por la señorita **Pazmiño Flores, María Fernanda** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 12 de agosto de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR**

**Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.**

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **PAZMIÑO FLORES MARÍA FERNANDA**, con C.C. 1716135247, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Caracterización molecular y evaluación de la capacidad de degradación de microplástico de insectos del género *Hermetia* originarios del cantón Puerto Quito**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 13 de agosto de 2021



Pazmiño Flores, María Fernanda

C.C.: 1716135247



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Autorización de publicación

Yo, **PAZMIÑO FLORES, MARÍA FERNANDA**, con C.C. 1716135247, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y evaluación de la capacidad de degradación de microplástico de insectos del género *Hermetia* originarios del cantón Puerto Quito”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 13 de agosto de 2021

Pazmiño Flores, María Fernanda

C.C.: 1716135247

## Dedicatoria

Dedico este y todos mis logros a mis padres, Elena y Guido, y a mi hermana menor, Carla, por su amor y apoyo incondicional para todos los objetivos que me he propuesto en mi vida.

*María Fernanda Pazmiño Flores*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a mi director Francisco Flores PhD. y a mi codirectora MSc. Ana Del Hierro por darme la oportunidad de trabajar en esta investigación, depositar su confianza en mí para llevarla a cabo y ser una guía durante el desarrollo de mi tesis.

A mis padres, Elena y Guido, por amarme, confiar en mí, motivarme y velar mi bienestar.

A Jean Pierre Herdoiza, gracias por contagiarme tu perseverancia para conseguir grandes logros, aconsejarme y estar siempre en todo momento.

Agradezco también a IDgen y al INABIO por brindarme el espacio en sus laboratorios, equipos e insumos.

A María José Anrango y Daniel Ortiz, investigadores del Proyecto INÉDITA del Instituto Tecnológico Superior Sucre e investigadores asociados al INABIO por su ayuda en la fase de campo y por compartirme su conocimiento sobre la Mosca Soldado Negra.

Y a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a todos los profesores, compañeros y amigos con los cuales me he formado para lograr lo que ahora soy como profesional.

## Índice de Contenidos

Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización De Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos.....	8
Índice de Tablas .....	11
Índice de Figuras.....	13
Listado de Abreviaturas.....	15
Resumen.....	16
Abstract .....	18
Capítulo I: Introducción.....	20
Formulación del problema.....	20
Justificación del problema.....	22
Objetivos de la investigación.....	23
<i>Objetivo General</i> .....	23
<i>Objetivos Específicos</i> .....	23
Capítulo II: Revisión bibliográfica.....	25
<i>Hermetia illucens</i> .....	25
<i>Ciclo de Vida</i> .....	26
<i>Anatomía</i> .....	27
<i>Degradación</i> .....	27
<i>Contenido Nutricional</i> .....	28
Residuos Sólidos .....	28

<i>Residuos Sólidos Orgánicos</i> .....	28
Plásticos .....	28
<i>Poliestireno</i> .....	29
<i>Bolsas Oxo-Biodegradables</i> .....	30
<i>Bioplásticos de almidón de maíz</i> .....	31
Hipótesis .....	32
Capítulo III: Metodología .....	33
Fase de Campo .....	33
<i>Recolección de muestras</i> .....	33
Fase de Laboratorio.....	35
<i>Identificación Morfológica</i> .....	35
Preparación de las muestras .....	35
Identificación.....	35
<i>Extracción de ADN</i> .....	36
<i>Caracterización Molecular</i> .....	36
Análisis de Secuencias .....	38
<i>Ensayo de Degradación</i> .....	39
Crianza de Insectos .....	39
Ensayo de Degradación con Microplásticos.....	40
Análisis Estadístico .....	41
<i>Diseño experimental del ensayo de degradación</i> .....	41
Capítulo IV: Resultados.....	43
Identificación morfológica.....	43
<i>Ciclo de vida</i> .....	43
Huevos .....	43
Larvas.....	44

	10
Pupa.....	48
Adultos.....	48
Caracterización molecular del insecto.....	51
<i>BLAST</i> .....	51
<i>Análisis filogenéticos</i> .....	53
<i>Análisis de varianza molecular (AMOVA)</i> .....	57
Ensayo de degradación con microplásticos.....	60
<i>Biomasa</i> .....	60
<i>Tasa de Crecimiento</i> .....	63
<i>Supervivencia</i> .....	66
<i>Tasa de reducción del sustrato</i> .....	68
Capítulo V: Discusión.....	73
Capítulo VI: Conclusiones.....	79
Capítulo VII: Recomendaciones.....	80
Bibliografía.....	81
Anexos.....	90

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Cebadores utilizados para amplificar los marcadores moleculares para la identificación de <i>Hermetia illucens</i>.....</i>	38
<b>Tabla 2</b> <i>Metadatos de las secuencias obtenidas de MSN recolectadas en Ecuador .....</i>	52
<b>Tabla 3</b> <i>Poblaciones agrupadas para el análisis AMOVA.....</i>	57
<b>Tabla 4</b> <i>Resultados del análisis AMOVA, promedio sobre 58 loci .....</i>	58
<b>Tabla 5</b> <i>Medidas de resumen para la variable biomasa [mg] en cuatro tratamientos con microplásticos.....</i>	61
<b>Tabla 6</b> <i>Análisis de la varianza para la variable biomasa .....</i>	62
<b>Tabla 7</b> <i>Prueba de Tukey, Alfa=0.05, DMS=184.68593, Error: 4989.0833, gl: 8 .....</i>	62
<b>Tabla 8</b> <i>Medidas de resumen para la variable tasa de crecimiento (mg/d) en cuatro tratamientos con microplásticos.....</i>	64
<b>Tabla 9</b> <i>Análisis de la varianza para la variable tasa de crecimiento .....</i>	65
<b>Tabla 10</b> <i>Promedio de larvas al inicio y al final del ensayo y porcentaje de larvas desaparecidas.....</i>	67
<b>Tabla 11</b> <i>Medidas de resumen para la variable supervivencia en cuatro tratamientos con microplásticos.....</i>	67
<b>Tabla 12</b> <i>Medidas de resumen para la variable tasa de reducción del sustrato en cuatro tratamientos con microplásticos.....</i>	69
<b>Tabla 13</b> <i>Análisis de la varianza para la variable tasa de reducción de sustrato .....</i>	70
<b>Tabla 14</b> <i>Larvas y sustrato al final del ensayo de degradación con microplásticos .....</i>	90
<b>Tabla 15</b> <i>Secuencias obtenidas de MSN recolectadas en Ecuador.....</i>	90

**Tabla 16** *Resultados de la búsqueda BLAST de los aislados obtenidos comparados con accesiones de GenBank-NCBI de Hermetia illucens de diferentes regiones .....90*

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Ciclo de vida de Hermetia illucens</i> .....	26
<b>Figura 2</b> <i>Estructura química del Poliestireno (PS)</i> .....	30
<b>Figura 3</b> <i>Estructura química del Polietileno (PE)</i> .....	31
<b>Figura 4</b> <i>Estructura química del Ácido Poliláctico (PLA)</i> .....	32
<b>Figura 5</b> <i>Obtención de muestras de insectos</i> .....	34
<b>Figura 6</b> <i>Morfología de huevos de MSN</i> .....	44
<b>Figura 7</b> <i>Morfología de larvas de MSN de 13-15 días de desarrollo</i> .....	45
<b>Figura 8</b> <i>Estadios larvales identificados según el tiempo de desarrollo</i> .....	47
<b>Figura 9</b> <i>Pupa de Mosca Soldado Negra</i> .....	48
<b>Figura 10</b> <i>Mosca Soldado Negra: Diferentes fenotipos de coloración en Mosca Soldado Negra encontrados en Puerto Quito, Ecuador</i> .....	49
<b>Figura 11</b> <i>Dimorfismo sexual en los aparatos reproductivos de la Mosca Soldado Negra</i> .....	50
<b>Figura 12</b> <i>Alineamiento múltiple MUSCLE de las secuencias parciales del marcador 28S rADN</i> .....	54
<b>Figura 13</b> <i>Alineamiento múltiple MUSCLE de las secuencias 5.8S, ITS2 y ARN de la subunidad grande ribosomal</i> .....	54
<b>Figura 14</b> <i>Árbol filogenético molecular del análisis de Máxima Verosimilitud y Bayesiano para especies del género Hermetia</i> .....	56
<b>Figura 15</b> <i>Resultados de la comparación entre pares de poblaciones para identificar las diferencias según valores FST, graficados por medio del software R</i> .....	59

<b>Figura 16</b> <i>Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable biomasa</i> .....	61
<b>Figura 17</b> <i>Gráfica de comparación de medias entre la biomasa obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación</i> .....	63
<b>Figura 18</b> <i>Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable tasa de crecimiento</i> .....	64
<b>Figura 19</b> <i>Gráfica de comparación de medias entre la tasa de crecimiento obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación</i> .....	66
<b>Figura 20</b> <i>Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable supervivencia</i> .....	68
<b>Figura 21</b> <i>Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable tasa de reducción de sustrato</i> .....	69
<b>Figura 22</b> <i>Gráfica de comparación de medias entre la tasa de reducción del sustrato obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación</i> .....	71
<b>Figura 23</b> <i>Rendimiento de <i>H. illucens</i> en el tratamiento de residuos con microplásticos: Control sin microplásticos, 5% de Poliestireno PS, 5% de bolsas de Polietileno PE y 5% de bolsas de Almidón - Ácido Poliláctico PLA</i> .....	72
<b>Figura 24</b> <i>Fotografías del ensayo de degradación</i> .....	90
<b>Figura 25</b> <i>Plásticos empleados en el ensayo de degradación con microplásticos</i> .....	90

**Listado de Abreviaturas**

<b>MSN</b>	Mosca Soldado Negra
<b>COI</b>	Gen citocromo c oxidasa mitocondrial I
<b>ITS2</b>	Espaciador Transcrito Interno 2
<b>28S rADN</b>	ADN de la subunidad grande ribosomal 28S
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>rARN</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>PE</b>	Polietileno
<b>PS</b>	Poliestireno
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>N</b>	Negro
<b>NA</b>	Negro-azul
<b>NC</b>	Negro-café
<b>NT</b>	Negro-turquesa
<b>BEAST</b>	Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees
<b>MCMC</b>	Monte Carlo basado en Cadenas de Markov
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NA</b>	Número de Acceso
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>pb</b>	Pares de Bases

## Resumen

A nivel mundial, los microplásticos representan una amenaza creciente para los ecosistemas. En Ecuador, la falta de clasificación de residuos ha provocado un aumento problemático en el volumen de plásticos, que sobrecarga los vertederos y las fuentes de agua. Con el tiempo y condiciones ambientales, los plásticos reducen su tamaño y entran silenciosamente en la cadena alimentaria. Las larvas de la mosca soldado negra (MSN), *Hermetia illucens*, tienen un comportamiento devorador y se utilizan para el manejo de desechos por sus beneficiosas cualidades como control de plagas de moscas, producción de biomasa y rápida degradación de desechos orgánicos. La presente investigación consistió en la caracterización molecular de larvas MSN y en la determinación del efecto de la alimentación con 5% de microplástico en el sustrato sobre el desarrollo de larvas de Puerto Quito, Ecuador. La caracterización molecular se realizó con los marcadores moleculares COI, ITS2 y 28S rADN. Para evaluar las tasas de biodegradación, se aplicaron cuatro tipos diferentes de dietas con microplásticos en un ambiente controlado: control (puré de banano), banano + 5% empaque de poliestireno, banano + 5% bolsa de polietileno (PE) oxo-biodegradable, banano + 5% bolsa de almidón de maíz (ácido poliláctico PLA). Se obtuvieron secuencias de MSN para cada uno de los marcadores de 9 individuos de MSN. Estas secuencias confirmaron que todos los individuos analizados pertenecen a la especie *Hermetia illucens*. El análisis de poblaciones indicó que las MSN en Ecuador están relacionadas con las poblaciones de Costa Rica y Asia del Sur (Tailandia, Singapur). Por otro lado, el ensayo de degradación con microplásticos demostró que no hay diferencias significativas de los tratamientos con el control; sin embargo, si existe un efecto significativo en la producción de biomasa de larvas criadas con microplásticos de bolsas de PE y bolsas de almidón de maíz - PLA, donde la biomasa obtenida con 5% de

microplásticos de PE es afectada negativamente. Esta información apoya al desarrollo de estrategias ambientales para el uso de poblaciones de MSN ecuatorianas para la biodegradación de residuos.

**Palabras clave:**

- **MOSCA SOLDADO NEGRA**
- **BIODEGRADACIÓN**
- **MICROPLÁSTICOS**

### Abstract

Globally, microplastics represent a growing threat to ecosystems. In Ecuador, the lack of waste classification has caused a problematic increase in the volume of plastics, overloading landfills and water sources. With time and environmental conditions, plastics shrink in size and quietly enter the food chain. The larvae of the black soldier fly (BSF), *Hermetia illucens*, have a devouring behavior and are used for waste management due to their beneficial qualities such as fly pest control, biomass production and rapid degradation of organic waste. The present investigation consisted of the molecular characterization of BSF larvae and in the determination of the effect of 5% microplastics in the feeding substrate on the development of larvae captured from Puerto Quito, Ecuador. Molecular characterization was carried out with the COI, ITS2 and 28S rDNA molecular markers. To evaluate the biodegradation rates, four different types of diets with microplastics were applied in a controlled environment: control (banana puree), banana + 5% polystyrene packaging, banana + 5% oxo-biodegradable polyethylene (PE) bag, banana + 5% cornstarch bag (polylactic acid PLA). BSF sequences were obtained for each of the markers from 9 MSN individuals. These sequences confirmed that all the analyzed individuals belong to the *Hermetia illucens* species. Population analysis indicates that BSF in Ecuador are related to the populations of Costa Rica and South Asia (Thailand, Singapore). On the other hand, the degradation test with microplastics showed that there are no significant differences between the treatments and the control. However, there is a significant effect on the biomass production of larvae reared with microplastics from PE bags and corn starch - PLA bags, where the biomass obtained with 5% PE microplastics is negatively affected. This information supports the development of environmental strategies for the use of Ecuadorian BSF populations for the biodegradation of waste.

**Keywords:**

- **BLACK SOLDIER FLY**
- **BIODEGRADATION**
- **MICROPLASTICS**

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

*Hermetia illucens* es una especie del orden de los Dípteros, familia Stratiomyidae comúnmente conocida como mosca soldado negra (MSN); la cual ha ganado importancia ambiental y económica debido a su gran capacidad de degradación de residuos de origen orgánico. A causa del gran aumento volumétrico de plásticos en rellenos sanitarios y otros lugares que forman parte del ecosistema natural debido a la actividad humana, estos compuestos se degradan por fraccionamiento y otros procesos hasta llegar a tamaños microscópicos. Su entrada a la cadena trófica se hace inevitable y es consumido por varios organismos como los insectos, los cuales abundan en lugares donde existe materia en descomposición. El interés de estudio se debe a que ciertos insectos presentan gran voracidad en su estadio larvario; como *Hermetia illucens*, que podría alimentarse de polímeros como de los plásticos de tamaño menor a 5 mm o microplásticos. Con respecto a la degradación de plásticos y residuos orgánicos, los investigadores Cho et al. (2020), observaron el efecto de microplásticos de polietileno (PE) y poliestireno (PS) sobre el crecimiento de larvas de *H. illucens* y la degradación de residuos orgánicos. Concluyeron que ambos microplásticos, PE y PS, agilizaron la formación del estadio de pupa, disminuyeron la tasa de reducción de sustrato y que el PS disminuyó significativamente la tasa de supervivencia de las larvas. En consecuencia, analizar la capacidad de degradación de la MSN en presencia de plásticos podría significar de interés ambiental y alerta ecológica por la sobreproducción de estos desechos.

La caracterización molecular de *Hermetia illucens* puede ayudar a conocer la diversidad genética y establecer relaciones entre poblaciones. Estudios de este tipo no se han realizado para la MSN en Ecuador. Por ejemplo, en un estudio reciente por

Ståhls et al. (2020), se utilizaron regiones del gen marcador Citocromo c Oxidasa I (COI) mitocondrial y los marcadores nucleares: Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS2) y el ADN de la subunidad 28 ribosomal (28S rADN) para analizar la diversidad genética de poblaciones de *H. illucens* en regiones biogeográficas distintas. Determinaron que existe alto nivel de diversidad intraespecífica del gen COI entre poblaciones de *H. illucens*. Los investigadores concluyeron que se requiere caracterizar molecularmente (genotipado) a estos insectos y compartir dicha información. Del mismo modo, la caracterización molecular también se ha desarrollado para la identificación del insecto, como por ejemplo usando PCR a tiempo real en alimentos procesados para animales en el estudio de Zagon et al. (2018). En esta investigación se utilizó como marcador molecular una región de 89 pb del gen COI demostrando ser un método robusto y adecuado para la detección sensible y confiable de *H. illucens*.

En el Ecuador, el Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) es un Instituto Público de Investigación (IPI) adscrito al Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica – MAATE, responsable de la generación de conocimiento y desarrollo de Ciencia, Tecnología e Innovación para garantizar la conservación de la biodiversidad en el Ecuador. Desde el 2018, el INABIO ejecuta el proyecto “Bioconversión de Residuos Orgánicos y Plástico a partir de Invertebrados del Ecuador” gracias al financiamiento de la Convocatoria INÉDITA SENESCYT; enfocando sus esfuerzos por estudiar la biodegradación de desechos orgánicos y plásticos por medio de invertebrados. Por consiguiente, el presente proyecto de titulación se desarrolló en el marco del proyecto para aportar conocimiento sobre el efecto de microplásticos en larvas de MSN y la diversidad genética de insectos *Hermetia* sp. recolectados en el país (Instituto de Nacional de Biodiversidad [INABIO], 2020).

## Justificación del problema

En Ecuador se producen 4'139,512 toneladas de desechos cada año, de ellos el 61.4% son orgánicos y el 11% corresponde a plásticos (INABIO, 2020). Existen escasos datos sobre la situación actual en el Ecuador y se evidencia la carencia de proyectos entorno al efecto de los residuos en la biodiversidad. Además, la educación de la población en temas ambientales no es suficiente para concienciar sobre el problema del manejo de residuos actual y para empezar la separación de residuos para reducir el impacto.

En 2018, en el cantón de Puerto Quito se financió un proyecto para el mejoramiento integral de recolección de residuos sólidos que benefició a 13 000 habitantes, evitando proliferación de enfermedades y contaminación ambiental. Además, se crearon nuevas fuentes de empleo para los pobladores, por medio de la clasificación y el reciclaje de la basura (El Productor, 2018). Debido a este precedente en el cantón, su población tiene más apertura a la separación de residuos, lo que permite proveerlos de tecnologías para la conversión de los residuos sólidos orgánicos a productos con valor comercial con la ayuda de organismos, como es el caso de la MSN.

La importancia de la conservación de biodiversidad recae en las relaciones de dependencia que existen entre las especies que intervienen en la renovación del agua, purificación del aire, mantenimiento del suelo, regulación del clima y reciclaje de nutrientes y por ende para la producción de nuestros alimentos (Wilson, 2010). Por esta razón, la investigación de la biodiversidad presente en el Ecuador es importante para poder conservarla y que pueda ser utilizada responsablemente.

Se investigará a un insecto díptero, *Hermetia* sp., por su potencial de degradación de plástico y por ser estudiado mundialmente por su rol significativo en el

reciclaje de residuos biológicos y otros nutrientes acumulados en el ambiente (Jeon et al., 2011). No existe información sobre la caracterización molecular y diversidad poblacional para los insectos del género *Hermetia* en Ecuador. Actualmente esta información es relevante debido a la creciente importancia ambiental de la MSN por su capacidad para reducir la materia orgánica en descomposición, bacterias y olores, controlar poblaciones de moscas comunes, servir como alimento para animales, etc. (Ståhls et al., 2020; Zheng et al., 2013). En el contexto país, actualmente resulta necesario caracterizar las poblaciones locales para saber si pertenecen a las especies descritas en literatura y su nivel de variabilidad genética. De igual manera, la presente tesis de grado buscará determinar el potencial de biodegradación de plástico de la MSN en Ecuador.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo General***

- Caracterizar molecularmente y evaluar la capacidad de degradación de microplástico de insectos del género *Hermetia* originarios del cantón Puerto Quito.

### ***Objetivos Específicos***

- Identificar morfológicamente a larvas y adultos de *Hermetia* sp., recolectados del cantón Puerto Quito, por medio de claves dicotómicas.
- Caracterizar molecularmente a individuos de *Hermetia* sp. con tres marcadores moleculares: el gen citocromo c oxidasa mitocondrial (COI), el Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS2) y el ADN de la subunidad 28 ribosomal (28S rADN).

- Realizar un ensayo de degradación con larvas de *Hermetia* sp. expuestas a cuatro diferentes tipos de dietas, una de banano y tres mezclas conteniendo 95% de banano y 5% microplásticos (poliestireno, bolsas oxo-biodegradables de polietileno o bolsas de almidón de maíz).

## Capítulo II: Revisión bibliográfica

### Generalidades sobre *Hermetia illucens*

*Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), más conocida como Mosca Soldado Negra (MSN), es una mosca perteneciente al orden Díptera, familia Stratiomyidae y subfamilia Hermetiinae. Es nativa de regiones tropicales, subtropicales y templadas del continente Americano pero se ha extendido por todo el mundo y hasta regiones Neárticas, Paleárticas, Orientales, Australasianas y Afrotropicales y Asia entre la latitud 40° sur y 45° norte (Caruso et al., 2013; Roháček & Hora, 2013).

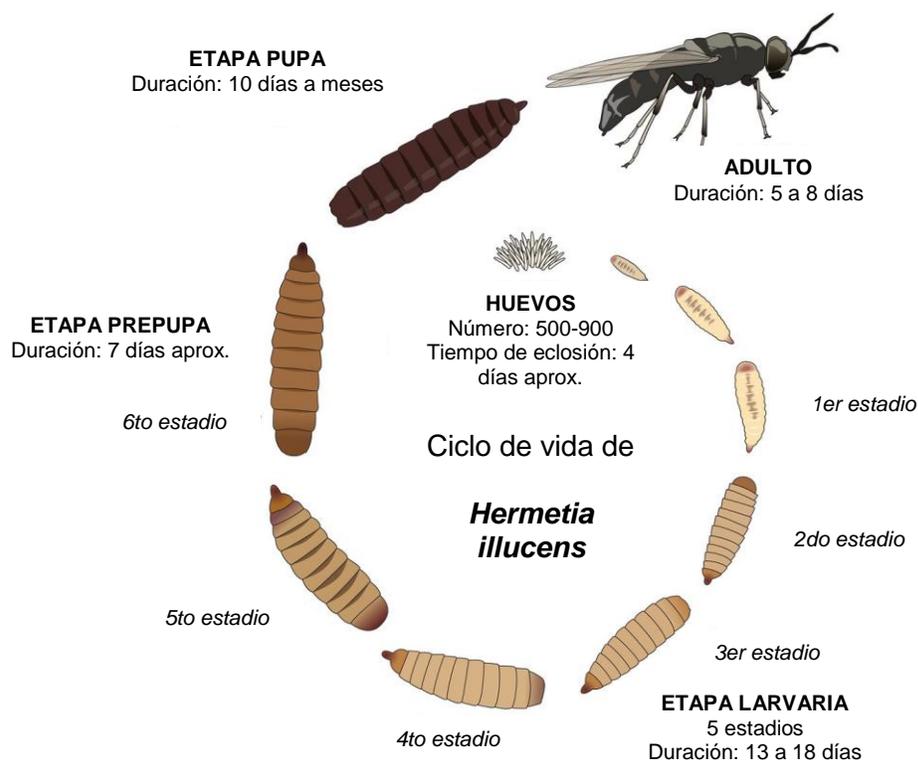
Es un insecto saprofito, que se alimenta de materia en descomposición, pero no se considera una plaga. Debido a que las MSN no tienen piezas bucales funcionales, no muerden o pican y no son conocidas por transmitir enfermedades (Oliveira et al., 2015). Por el contrario, son ambientalmente beneficiosas, pueden alimentarse de residuos orgánicos como frutas y vegetales en descomposición, restos de comida, vegetación y residuos de la agricultura como estiércol de animales, compost, etc. En el proceso de degradación, las larvas convierten los residuos orgánicos en proteína (37-63% en peso seco) y grasa (7-39% en peso seco), por lo que tienen amplias aplicaciones en el manejo de residuos, medicina o la elaboración de balanceados (Barragan-Fonseca et al., 2017; Liu et al., 2019; Roháček & Hora, 2013).

En base a otras experiencias, *H. illucens*, tal como en otras especies de larvas, podría haberse adaptado para degradar residuos no biodegradables como polietileno y poliestireno (Cifuentes et al., 2020).

## Ciclo de Vida

Figura 1

Ciclo de vida de *Hermetia illucens*



Nota. Tomado de Smet et al. (2018) y adecuado al español por María F. Pazmiño

*H. illucens* sufre una transformación de huevo a adulto cruzando por cinco fases: huevo, larva, prepupa, pupa y adulto (figura 1). Las hembras depositan sus huevos usualmente en un sustrato seco con un ambiente húmedo, aproximadamente cuatro días después a una temperatura de 27-29°C. Las larvas apenas salidas del huevo miden 0.66 mm de largo y su actitud voraz les da la capacidad de ingerir grandes cantidades de materia orgánica. El estado larvario dura de cuatro semanas a cinco meses dependiendo del alimento disponible, la temperatura y la humedad. Los estadios larvarios pueden separarse en cinco, difíciles de diferenciar (Caruso et al., 2013; Smet

et al., 2018). Una vez formada la pupa (estadio 5 larvario) se nota un característico cambio de color de beige a café oscuro. En esta etapa miden 12-25 mm de largo y durarán dos semanas en sufrir metamorfosis en condiciones adecuadas. Finalmente los adultos que emergen tardarán aproximadamente dos días hasta su reproducción y vivirán dos días más hasta la nueva puesta de huevos. Los adultos no requieren la misma cantidad de alimento que la etapa larvaria, su supervivencia dependerá principalmente de la disponibilidad de agua (Caruso et al., 2013).

### **Anatomía**

Los huevos tienen una forma ovoide (1 mm largo) y durante la incubación cambian de color de beige a amarillo. El cuerpo larvario tiene 11 segmentos cubiertos de pelos y cerdas, su color es variante según su edad y pueden llegar a tener 20 mm en largo y 6 mm en ancho (Caruso et al., 2013). Por otro lado, los adultos son de 13-20 mm en longitud, poseen dos largas antenas, un par de alas desarrolladas, alas traseras y tres pares de patas con un tarso blanco/amarillo. Hay dimorfismo sexual, los machos son más pequeños que las hembras y existe una diferencia anatómica en el último segmento abdominal que permite discriminar entre géneros. Las hembras tienen un oviducto tubular retráctil y los machos tienen un edeago (órgano reproductor masculino) y un par de ganchos que le permiten unirse a la hembra durante la cópula (Caruso et al., 2013).

### **Capacidad de degradación de materia orgánica**

La actividad enzimática (proteasa, amilasa, celulasa, lipasa) en las larvas permite la reducción rápida de materia orgánica. Esta capacidad de degradación se debe a comunidades bacterianas presentes en su sistema digestivo como *Bacillus*

*amyloliquefaciens*, *B. stratosphericus* y *Proteus mirabilis* (Caruso et al., 2013; Jeon et al., 2011).

### **Contenido Nutricional**

Las pupas de *H. illucens* están compuestas de 40% proteína, 30% grasa y 9% quitina, lo que les da un alto valor comercial como un alimento o suplemento para animales, además de que no acumulan pesticidas ni micotoxinas (Cho et al., 2020).

### **Residuos Sólidos**

Los residuos sólidos se definen como materiales de origen orgánico e inorgánico, putrescible o no generados en procesos de producción y consumo que no tienen un fin práctico para la actividad que se ejecuta (Alvaro & Moreno, 2013).

### **Residuos Sólidos Orgánicos**

Los residuos orgánicos son aquellos que se descomponen naturalmente, pueden desintegrarse de forma rápida y transformarse en otro tipo de materia orgánica (Garita Sánchez et al., 2014). En Ecuador, de las 4'139,512 toneladas de residuos sólidos producidas cada año, el 61.4% son orgánicos y el 11% corresponde a los plásticos (INABIO, 2020).

### **Plásticos**

Los plásticos son polímeros que principalmente se componen de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, cloruro y bromuro (Huang & Almeida, 2015). A pesar de su utilidad y moldeabilidad, se han vuelto una amenaza para la sociedad y el ambiente desde su invención debido a su lenta degradación y acumulación en el ambiente (Woo et al., 2020).

### ***Microplásticos***

En el 2017, menos del 9% de los plásticos producidos fueron reciclados en todo el mundo, el porcentaje restante se une con los demás residuos y forman microplásticos que son fragmentos plásticos de menos de 5mm en longitud. Estos contaminantes son altamente persistentes y pueden inhibir el desarrollo de organismos (Cho et al., 2020). Los microplásticos pueden clasificarse en dos tipos dependiendo de cómo son formados: primarios o secundarios. Los microplásticos primarios son aquellos manufacturados por el humano por medio de procesos específicos para ser utilizados en cosméticos, en la industria textil u otras aplicaciones. Por otro lado, los microplásticos secundarios se forman a partir de la descomposición de plásticos más grandes debido a factores ambientales como la abrasión del viento, golpeteo con agua o la radiación solar (National Geographic Society, 2019; Rogers, 2020).

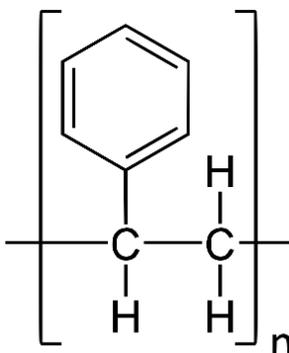
En el Ecuador existen estudios relacionados con microplásticos pero la gran mayoría se enfoca en la contaminación de los océanos y fauna marina. Se estima que la cantidad de partículas de plástico presentes en el mar del Ecuador será unas 3.9 veces superior en 2030 comparado con 2008, a menos que se adopten medidas para cambiar la situación (Orayeva, 2020).

### ***Poliestireno***

El poliestireno (PS) es un polímero que tiene una columna lineal de carbono con anillos de fenilo unidos alternadamente a esta (Figura 2). Su estructura lo hace un plástico de difícil biodegradación. Solo existen limitados registros de la descomposición directa de PS por organismos (Cho et al., 2020; Woo et al., 2020).

**Figura 2**

*Estructura química del Poliestireno (PS)*



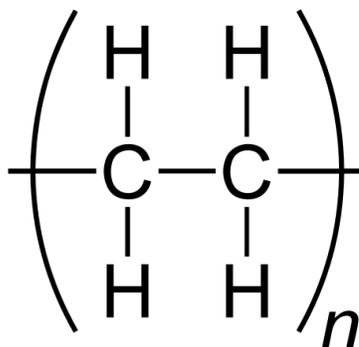
*Nota.* Tomado de Wikimedia Foundation, Inc. (2008)

***Bolsas Oxo-Biodegradables***

La mayoría de bolsas plásticas se componen de una estructura polimérica de polietileno de baja densidad LDPE. El polietileno se forma a partir de la polimerización de monómeros de etileno (Figura 3) (Matmatch GmbH, 2021; SpecialChem, 2021). Esta característica hace a las bolsas plásticas resistentes a la degradación por lo que terminarán enterradas en vertederos, acumulándose. Aquellas bolsas llamadas biodegradables tienen la misma composición con la diferencia de estar mezcladas con compuestos de origen vegetal o aditivos que cambian su estructura química. Por este hecho son susceptibles a la biodegradación y pueden clasificarse en dos tipos: polímeros hidro-biodegradables y polímeros oxo-biodegradables (Huang & Almeida, 2015).

### Figura 3

*Estructura química del Polietileno (PE).*



*Nota.* Tomado de Wikimedia Foundation, Inc. (2021)

En el 2013 en Ecuador se utilizaban alrededor de 257 millones de fundas plásticas por año por lo que se consideraron varias propuestas para impulsar el uso de bolsas reusables y recicladas (Gobierno de la República del Ecuador, 2013). No fue hasta el 09 de mayo del 2020 que se aplicó un impuesto a las fundas plásticas para cargar alimentos y para evitar esto las compañías de expensa de alimentos cambiaron a bolsas con un contenido del 50% o más de plástico reciclado las cuales están exentas del impuesto de 4 centavos de dólar (El Universo, 2020).

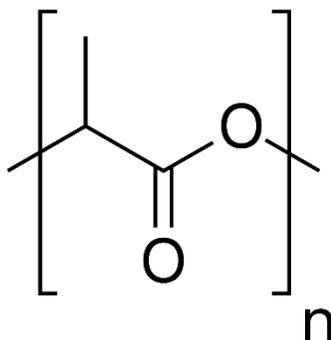
### ***Bioplásticos de almidón de maíz***

Se consideran bioplásticos a plásticos orgánicos formados a partir de fuentes renovables que pueden reemplazar los plásticos tradicionales derivados del petróleo (Biodegradables Ecuador, s/f). Los polímeros orgánicos pueden formar bioplásticos, un ejemplo es el ácido poliláctico (PLA) obtenido por la fermentación del almidón de vegetales como el maíz (Cowley, 2020). La estructura química del PLA se resume en una columna linear de monómeros de ácido láctico (Figura 4). Por ende, las ventajas de los bioplásticos formados a partir de almidón de maíz incluyen una mayor susceptibilidad a la degradación, no son tóxicos ni liberan co-productos peligrosos al

ambiente y la reducción de la huella de carbono debido a su origen orgánico (Jaimes Guitierrez, 2020).

#### Figura 4

Estructura química del Ácido Poliláctico (PLA).



Nota. Tomado de Wikimedia Foundation, Inc. (2021b)

#### Hipótesis

Los insectos recolectados del cantón Puerto Quito se identifican como *Hermetia illucens* según la morfología descrita en claves dicotómicas y bases de datos bioinformáticas.

Los aislados secuenciados de *Hermetia illucens* no tienen variabilidad genética en los marcadores moleculares COI, ITS2 y 28S rADN con otras secuencias de la especie encontradas en otros países.

Los microplásticos afectan la producción de biomasa, la tasa de crecimiento, la supervivencia y la tasa de reducción de sustrato de larvas de *Hermetia* sp.

## Capítulo III: Metodología

### Fase de Campo

#### *Recolección de muestras*

Un total de 30 insectos en etapa larvaria, 9 adultos y 2 posturas de huevos de *Hermetia* sp., 6 fueron obtenidos en Puerto Quito (coordenadas: 0°08'04.1"N 79°16'32.0"W, fecha: 14/05/2021 y 13/06/2021, hora: 12h00 a 14h00) y 3 en Nanegalito (coordenadas: 0°06'05.1"N 78°43'39.8"W, fecha: 14/05/2021, hora: 16h00), Ecuador.

Las moscas, hembras en su mayoría, fueron recolectadas con redes largas de tela mientras eran atraídas por el olor de un criadero de cerdos. Luego se les indujo la puesta de huevos en pedazos de cartón seco. Por último, los huevos recolectados de dos posturas se incubaron a  $23.8 \pm 2.2$  °C y humedad relativa de  $41.3 \pm 12.6\%$  en una cámara de crecimiento junto a sustrato fresco (puré de banano) para el surgimiento de las nuevas larvas. Los individuos requeridos para la caracterización molecular se sacrificaron y preservaron en alcohol 96% y 4°C hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron a -20°C previo a la extracción de ADN (Figura 5).

**Figura 5***Obtención de muestras de insectos*

En total, para la identificación morfológica se necesitaron 15 larvas (en varios estadios larvarios) y 6 adultos (entre hembras y machos de diferentes fenotipos: negro (N), negro-azul (NA), negro-café (NC) y negro-turquesa (NT)). Para la caracterización molecular fue necesaria una larva (estadio 20 días) y 8 adultos de cualquier sexo (1 de cada fenotipo). Y finalmente para el ensayo de degradación, se necesitaron dos posturas de huevos de MSN con el fin de criar 360 larvas en 4 diferentes tratamientos.

## **Fase de Laboratorio**

### ***Identificación Morfológica***

#### **Preparación de las muestras**

Previo a la identificación morfológica se sometió a las larvas a una clarificación por limpieza química para mejor observación de sus estructuras. Primero se sumergieron las larvas en agua hirviendo durante 5 min a 70–80°C y luego en etanol al 70%. Finalmente las muestras se clarificaron en KOH al 10% durante 24 h a temperatura ambiente, el KOH se removió por medio de un lavado con ácido acético 20% y fueron observados directamente en un estereomicroscopio trinocular SMZ1270 (Nikon) (Velásquez et al., 2010). Se minimizó la manipulación de las muestras con pinzas para evitar dañar estructuras.

Por otro lado, los adultos de MSN fueron sacrificados por sofocación en un recipiente con un algodón embebido en alcohol al 96% para evitar el daño de las alas y se observaron los individuos en el estereomicroscopio.

#### **Identificación**

Se realizó la descripción morfológica de cada etapa del ciclo de vida de la MSN: huevo, larva, pupa y adulto (Jaramillo et al., 2019). Los especímenes se observaron con estereomicroscopio utilizando el software MSHOT. Se determinó la especie del insecto mediante claves de identificación morfológica, ilustraciones y recopilación de imágenes de insectos del orden Díptera, familia Stratiomyidae, subfamilia Hermetiinae, (Capinera, 2008; Fachin & Carvalho-Filho, 2020; Hauser et al., 2017; Ivorra et al., 2020; James & Wirth, 1967; Kovac & Rozkošný, s/f; Lessard, 2020; Lessard et al., 2019; Mason, 2013; Rozkošný & Kovac, 1994; Velásquez et al., 2010).

### **Extracción de ADN**

Las muestras de larvas y moscas almacenadas en etanol 96% y -20°C fueron utilizadas para la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen). La calidad y concentración del ADN resultante fue evaluada con la medición en el espectrofotómetro Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific). El ADN extraído fue almacenado en buffer de elución a -20°C hasta su uso en la amplificación de los marcadores moleculares COI, ITS2 y 28S rADN (Khamis et al., 2020; Soyeon Park et al., 2017; Zagon et al., 2018).

### **Caracterización Molecular**

Tres marcadores moleculares serán analizados para la caracterización molecular de *Hermetia illucens*: COI, ITS2 y 28S rADN, con los cebadores indicados en la tabla 2. Las condiciones de PCR para la amplificación de estos fragmentos fueron tomadas de investigaciones previas y considerando las condiciones de la polimerasa DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific).

Para COI, la desnaturalización inicial se realizó por 180 s a 95.0 °C y 35 ciclos con desnaturalización por 30 s a 95.0 °C, annealing de 45 s a 52.0 °C y extensión de 60 s a 72.0 °C y una extensión final de 300 s a 72.0 °C (Khamis et al., 2020; Soyeon Park et al., 2017). Para ITS2 la desnaturalización inicial se realizó por 180 s a 95.0 °C y 35 ciclos con desnaturalización por 30 s a 95.0 °C, annealing de 30 s a 50.0 °C y extensión de 60 s a 72.0 °C y una extensión final de 300 s a 72.0 °C (Aboagye-Antwi et al., 2015). Para 28S rADN la desnaturalización inicial se realizó por 180 s a 95.0 °C y 35 ciclos con desnaturalización por 30 s a 95.0 °C, annealing de 30 s a 41.0 °C y extensión de 60 s a 72.0 °C y una extensión final de 300 s a 72.0 °C . El volumen total para todas las

reacciones de PCR fue de 25  $\mu$ L con 12.5  $\mu$ L de master mix, 0.4  $\mu$ M de cada primer y 100-200 ng de ADN genómico.

Posteriormente se realizó una electroforesis con los productos de la PCR para comprobar su correcta amplificación. Los fragmentos fueron observados en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen), con buffer TAE 1X (Invitrogen) y 4  $\mu$ L del agente intercalante SYBR Safe (Invitrogen), comparándolos con el marcador molecular Trakit 100 pb (Invitrogen) en un transiluminador UV a 300 nm (Ultralum). Los amplicones obtenidos se enviaron a Macrogen™ (Seúl, Corea del Sur) para someterlos a secuenciación bidireccional Sanger.

**Tabla 1**

*Cebadores utilizados para amplificar los marcadores moleculares para la identificación de *Hermetia illucens**

<b>Marcador</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Tamaño del fragmento</b>
<b>COI</b> (Khamis et al., 2020)	COI-A Forward: 5'ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG3'	657 pb
	COI-B Reverse: 5'TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3'	
<b>ITS2</b> (Ståhls et al., 2020)	ITS2-A Forward: 5'TGTGAACTGCAGGACACAT3'	453 pb
	ITS2-B Reverse: 5'TATGCTTAAATTCAGGGGGT3'	
<b>28S rADN</b> (Ståhls et al., 2020)	28S-A Forward: 5'TTYRGGAYACCTTYDGGAC3'	270 pb
	28S-B Reverse: 5'GGTTTCCCCTGACTTCDACCTGATCA3'	

### **Análisis de Secuencias**

Las secuencias crudas se limpiaron y ensamblaron por medio de ensamblaje *de novo* para secuencias con calidad alta y ensamblaje con una referencia para las secuencias con calidad baja en el software Geneious Prime v2021.2.2.

Para identificar la especie de las MSN se realizaron análisis en BLAST con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para

encontrar homólogos cercanos. Con 11 secuencias similares y 2 outgroups se realizaron árboles filogenéticos usando los métodos de máxima verosimilitud y análisis bayesiano, para analizar la relación de las poblaciones ecuatorianas con individuos de MSN de otros países. Los software MEGA v7.0.26 y BEAST v1.10.4 se usaron para la construcción de los árboles de máxima verosimilitud y bayesiano respectivamente. Los N° de accesoión (NA) de los aislados tomados de la base de datos de NCBI fueron: COI (*H. illucens*: MT178509.1, MT483918.1, MT520663.1, LR792255, MT520686.1, KY817115, MT178493.1, MT483914.1, LR792260, LR792259, *H. coarctata*: MG967891.1, *H. inflata*: MT434000.1), ITS2 (*H. illucens*: MZ224484, LR792260, LR792255, LR899015.1), 28S rADN (*H. illucens*: MT150784.1, MT50786.1, MT50789.1, MT150791.1, MT150792.1, MT150794.1).

Finalmente se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de las divergencias calculadas entre las poblaciones identificadas por el árbol filogenético del gen COI, locus por locus, con 5% de significancia y análisis por pares estadísticos F, con el índice de fijación (FST). Para esto se utilizó Linux en máquina virtual VirtualBox 2021 con Ubuntu 20.04, el software Arlequin 3.5 (Khamis et al., 2020; Soyeon Park et al., 2017; Ståhls et al., 2020).

## ***Ensayo de Degradación***

### **Crianza de Insectos**

Los huevos y larvas de *Hermetia illucens* fueron criados a  $23.8 \pm 2.2$  °C, fotoperiodo 12:12 L:O y humedad relativa de  $41.3 \pm 12.6\%$  en una cámara de crecimiento (Bruno et al., 2018; Gao et al., 2019, 2019; Oliveira et al., 2015; Raimondi et al., 2020). Dos posturas de huevos recolectadas de Puerto Quito se incubaron junto a

sustrato control (puré de banano saturado con agua) en un recipiente plástico de polipropileno (PP) (12 cm diámetro y 6 cm de alto) (Bruno et al., 2018; Gao et al., 2019; Sheppard et al., 2002; Wynants et al., 2019; Yu et al., 2011; Zheng et al., 2013). Cada dos días o cada vez que fue necesario, el sustrato se renovó para evitar la contaminación con hongos y ácaros (Gao et al., 2019). Después de seis días de la eclosión (4 días en eclosionar), se inició el ensayo de degradación y se transfirieron las larvas a nuevos contenedores de PP (12 cm diámetro y 6 cm altura) con 4 tratamientos diferentes. Un día antes del inicio del ensayo, se indujo hambruna a las larvas para estimular la alimentación bajo la presencia de microplásticos (Anexos – figura 24).

### **Ensayo de Degradación con Microplásticos**

Trescientos sesenta larvas se distribuyeron en 12 recipientes de PP (12 diámetro x 6 altura cm) tapados con malla tipo tul. Se probaron 4 dietas diferentes: una control de puré de banano y tres mezclas conteniendo 95% de banano y 5% microplásticos (poliestireno PS, bolsas oxo-biodegradables PE o bolsas de almidón de maíz PLA). Cada siete días se administraron 30 g de sustrato nuevo (Jaramillo et al., 2019).

Los plásticos (PS, PE y PLA) se redujeron a microplásticos para obtener un tamaño menor a 5 mm ( $2.12 \pm 1.01$  mm PLA,  $1.71 \pm 1.40$  mm PE,  $1.06 \pm 0.76$  mm PS, medidos con el software Fiji), lo cual se logró mediante fragmentación por procesamiento (rayado y cortes, Anexos - figura 25). Los microplásticos obtenidos de PS se mezclaron con el puré de plátano y 20 mL de agua para evitar que seque durante el transcurso de una semana (Anexos – tabla 14).

Dos veces por semana se muestrearon 10 larvas para pesaje, se contó el número de larvas sobrevivientes y se registró el peso del residuo. El pesaje de las

larvas se realizó limpiando a las larvas con agua destilada y luego se secándolas con papel (Bruno et al., 2018; Cho et al., 2020).

El experimento se consideraría concluido cuando el 25% de larvas lleguen a etapa de prepupa. Una vez con estos datos, la biomasa total, la tasa de crecimiento promedio, la supervivencia larvaria y tasa de reducción del sustrato fue calculada con las ecuaciones 1, 2, 3 y 4 (Cho et al., 2020; Raimondi et al., 2020):

$$\text{Biomasa total (g)} = \text{peso total estadio prepupa} + \text{peso final larvas restantes} \quad (1)$$

$$\text{Tasa de crecimiento promedio } \left(\frac{g}{d}\right) = \frac{(\text{Peso prepupa medio} + \text{Peso final larvas} - \text{peso medio larvas})}{\text{periodo (d)}} \quad (2)$$

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{Sobrevivientes} - \text{Encontradas Muertas}}{\text{Sobrevivientes}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Tasa de reducción de sustrato (\%)} = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100 \quad (4)$$

Donde,

So es el sustrato al inicio del ensayo

Sf es el sustrato al finalizar el ensayo

## **Análisis Estadístico**

### ***Diseño experimental del ensayo de degradación***

El ensayo consistió en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones. Para determinar el efecto de los cuatro tratamientos en la biomasa total, tasa de crecimiento promedio, supervivencia y tasa de reducción del sustrato, se realizó

un análisis de varianza en un sentido (ANOVA) y además pruebas de comparaciones de medias de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . El software utilizado fue la versión estudiantil de InfoStat 2020. Los factores controlables fueron temperatura, humedad y luz. Los tratamientos fueron cuatro dietas: Una control de banano, dos mezclas conteniendo 90% de banano y 10% microplásticos (PS, PE o PLA). La unidad experimental fueron 12 contenedores de plástico con 30 larvas cada uno.

## Capítulo IV: Resultados

### Identificación morfológica

Se realizó la descripción morfológica e identificación del ciclo de vida de la especie de MSN recolectada en Puerto Quito, Ecuador con la ayuda de claves dicotómicas.

La mosca estudiada en el presente proyecto presenta las mismas características de la especie *Hermetia illucens*, la cual tiene cinco etapas durante su ciclo de vida: huevo, larva, prepupa, pupa y adulto. Cada etapa se describe a continuación según su crianza en el Laboratorio de Investigación Aplicada y Biotecnología del INABIO en Quito, Ecuador.

### Ciclo de vida

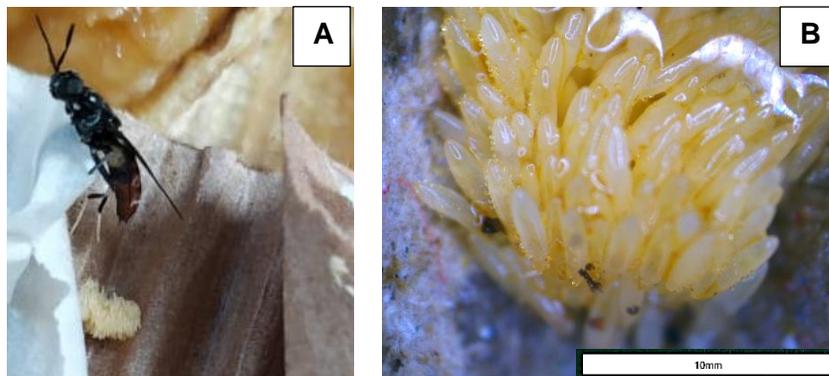
#### Huevos

Las hembras MSN fueron atrapadas mientras eran atraídas por el estiércol de cerdo como fuente de alimento. Las posturas de huevos fueron inducidas entre pliegues de cartón e incubadas con puré de plátano.

Los huevos son de forma ovoide y exhiben un color beige apenas son puestos por la mosca, toman una coloración amarilla durante su incubación. Su tamaño promedio estuvo entre los  $4 \pm 0.5$  mm (figura 6).

## Figura 6

### Morfología de huevos de MSN



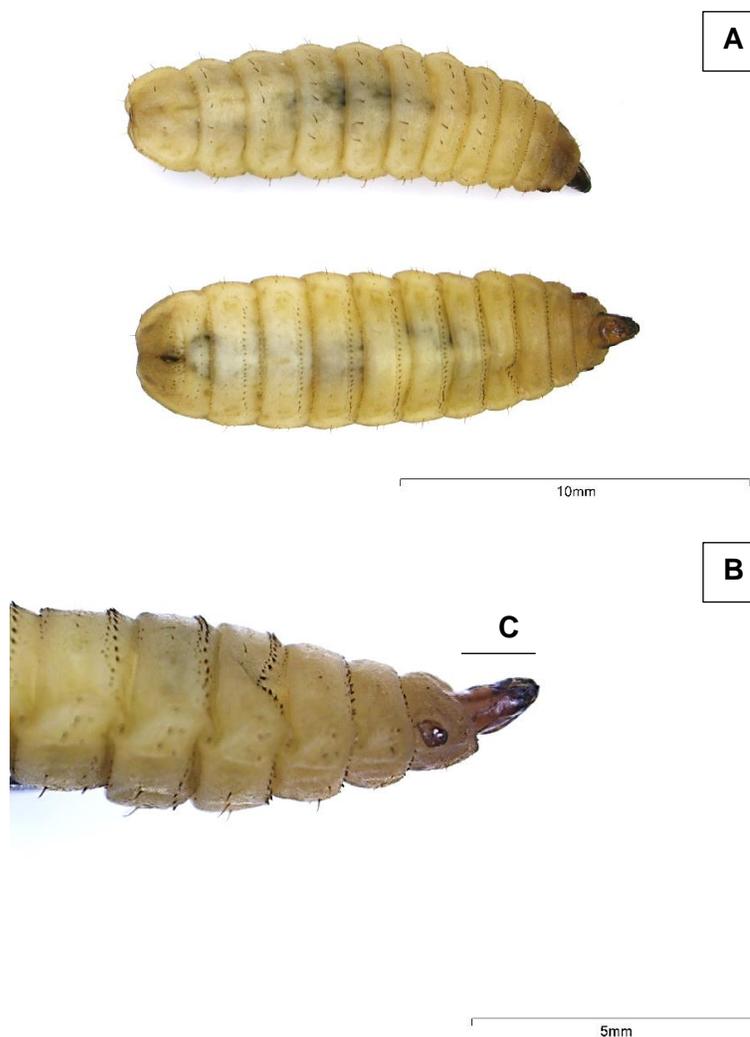
*Nota.* A. MSN Hembra depositando huevos en hendiduras de cartón. Fotografía tomada por María Pazmiño. B. Huevos de MSN. Fotografía tomada en estereomicroscopio por MSHOT.

### Larvas

Después de cinco días de incubación, las larvas emergieron de su huevo y fueron criadas durante seis semanas. Las larvas tienen un cuerpo alargado y aplanado dorsiventralmente, con una pared corporal o tegumento endurecido (figura 7). El cuerpo se compone de 11 segmentos y tres regiones: cápsula cefálica, tres segmentos torácicos y ocho segmentos abdominales, cada uno con una determinada quetotaxia. La cápsula cefálica es estrecha, donde se dispone su boca sin mandíbulas y los ojos lateralmente. Por otro lado, en el extremo redondeado del cuerpo y del lado ventral se distingue el ano. El color de las larvas es beige y varían en tonalidad según el estadio larvario (Jaramillo et al., 2019; Mullen, 2019).

**Figura 7**

*Morfología de larvas de MSN de 13-15 días de desarrollo*



*Nota.* A. Vista ventral y dorsal de larvas MSN en estadio 5 larvario. B. Cápsula cefálica (C) y primeros segmentos del cuerpo de larva de MSN. Fotografías tomadas en estereomicroscopio por MSHOT.

Se han determinado cinco estadios larvales según varios autores, difícilmente definido de acuerdo al tamaño de la cápsula cefálica que a su vez depende de las condiciones de humedad, temperatura y alimentación con las que se desarrolle el

insecto (Gobbi, 2012; Jaramillo et al., 2019). En la figura 8 se muestran fotografías de larvas en diferentes etapas de su ciclo de acuerdo al tiempo desde la eclosión del huevo. Las larvas maduras para la crianza en Quito se consideraron a aquellas con más de 20 días y una longitud de 20 mm y las pre-pupas a aquellas que toman una tonalidad café antes de su conversión a pupa.

**Figura 8**

*Estadios larvales identificados según el tiempo de desarrollo*

PRIMER ESTADÍO 1-3 DÍAS



SEGUNDO ESTADÍO 5 DÍAS



5mm

TERCER ESTADÍO 13-15 DÍAS



10mm

CUARTO ESTADIO >20 DÍAS



10mm

QUINTO ESTADÍO PREPUPA >20 DÍAS



10mm

*Nota.* Fotografías tomadas en estereomicroscopio por MSHOT.

## Pupa

Las larvas en el último estadio larvario forman pupas que es el paso a su metamorfosis a mosca. La coloración en este estadio cambia a café oscuro y de igual manera cambia el comportamiento del insecto requiriendo menos alimento y prefiriendo los lugares calientes y secos (figura 9).

## Figura 9

*Pupa de Mosca Soldado Negra*



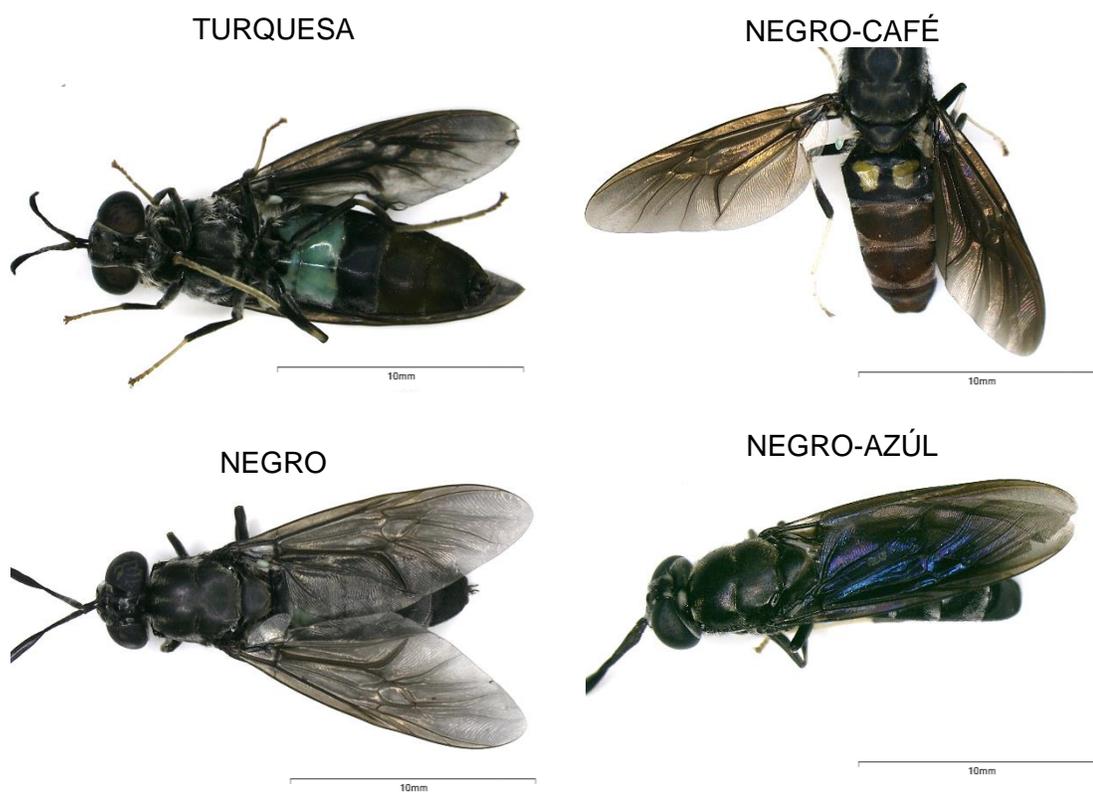
*Nota.* Fotografía tomada en estereomicroscopio por MSHOT.

## Adultos

Los adultos de MSN capturados midieron en promedio 21.1 mm de longitud. Tienen diferentes fenotipos en coloración: negro, negro-azulado, negro-turquesa y negro-café (figura 10). No poseen mandíbulas y tienen manchas translúcidas en el segundo segmento abdominal (Mullen, 2019; Oliveira et al., 2015).

**Figura 10**

*Mosca Soldado Negra: Diferentes fenotipos de coloración en Mosca Soldado Negra encontrados en Puerto Quito, Ecuador*



*Nota.* Fotografías tomadas en estereomicroscopio por MSHOT.

De igual manera se realizaron fotografías de la terminación del abdomen de la MSN que indican el dimorfismo sexual (figura 11) (Jaramillo et al., 2019).

**Figura 11**

*Dimorfismo sexual en los aparatos reproductivos de la Mosca Soldado Negra*



*Nota.* Segmento posterior de adultos de diferente sexo de MSN. Fotografías tomadas en estereomicroscopio por MSHOT.

Las moscas soldado (Stratiomyidae) son uno de los grupos de Díptera más diversos. La subfamilia Hermetiinae es mayormente cosmopolita y entre sus géneros, el género *Hermetia* es el más extendido en el mundo (Lessard et al., 2019).

Según claves de identificación de insectos del orden Díptera (moscas), familia Stratiomyidae (moscas soldado) y subfamilia Hermetiinae, los individuos recolectados pudieron ser reconocidos como moscas de la especie *Hermetia illucens*.

En resumen la especie de *Hermetia illucens* está diferenciada por ojos desnudos (quetotaxia) y facetas pequeñas e uniformes. Las larvas varían en color beige durante su desarrollo, tienen un cuerpo segmentado, cada segmento con una quetotaxia distinguible. Una vez alcanzado los 20 mm inician su transición a prepupa observado por el cambio de color a café oscuro y en su comportamiento. Las estructuras descritas anteriormente para la identificación morfológica se detallan en las claves dicotómicas: Clave para las familias sudamericanas de Díptera con importancia forense (Barros de Carvalho & de Mello-Patiu, 2008), Clave de identificación de larvas de dípteros en estadio maduro de importancia forense en la Península Ibérica (Velásquez et al., 2010), Clave para los géneros australianos de Hermetiinae (Lessard et al., 2019), Clave para las especies *Hermetia* (Lessard et al., 2019), Clave para los géneros y especies de moscas soldado (Díptera: Stratiomyidae) de Sunderban indio (Roy et al., 2018).

## **Caracterización molecular del insecto**

### ***BLAST***

Se obtuvieron 9 secuencias parciales del gen COI, 9 secuencias del gen 28S rADN y 8 secuencias del espaciador ITS2 a partir de 9 individuos MSN de diferentes fenotipos y diferentes locaciones como se indica en la tabla 2 y Anexos – tabla 15. Al compararlos con la base de datos del NCBI se obtuvieron identidades del 100% con secuencias de *Hermetia illucens* demostradas por una cobertura del 100% y valores de expectativa (E-value) de 0 en la mayoría de las secuencias (Anexo - tabla 16).

**Tabla 2.***Metadatos de las secuencias obtenidas de MSN recolectadas en Ecuador*

<b>Individuo</b>	<b>Fenotipo (Sexo, color)</b>	<b>Lugar de recolección</b>	<b>Marcador molecular</b>	<b>Tamaño del fragmento (pb)</b>	<b>%HQ Calidad</b>
A	Hembra, negro- café	Puerto Quito	COI	622	96.8
			28S rADN	281	95.4
			ITS2	441	98.0
B	Hembra, negro- café	Puerto Quito	COI	636	74.1
			28S rADN	281	98.9
			ITS2	404	98.5
C	Hembra, negra	Puerto Quito	COI	679	97.6
			28S rADN	283	96.1
			ITS2	429	96.7
D	X, negra	Nanegalito	COI	683	98.5
			28S rADN	283	94.3
			ITS2	368	90.2
E	Hembra, negra- azul	Puerto Quito	COI	680	98.5
			28S rADN	281	98.9
			ITS2	443	95.5
F	Hembra, negra- azul	Puerto Quito	COI	677	97.8
			28S rADN	283	97.9
			ITS2	440	96.1
G		Nanegalito	COI	682	99.7

	Hembra, negro-		28S rADN	286	97.2
	turquesa		ITS2	443	98.4
H	Hembra, negro-	Nanegalito	COI	669	68.3
	turquesa		28S rADN	283	100
I	Hembra, negro-	Puerto Quito	COI	670	98.7
	turquesa		28S rADN	286	95.5
			ITS2	434	94.9

Nota. X: Sexo no identificado

### **Análisis filogenéticos**

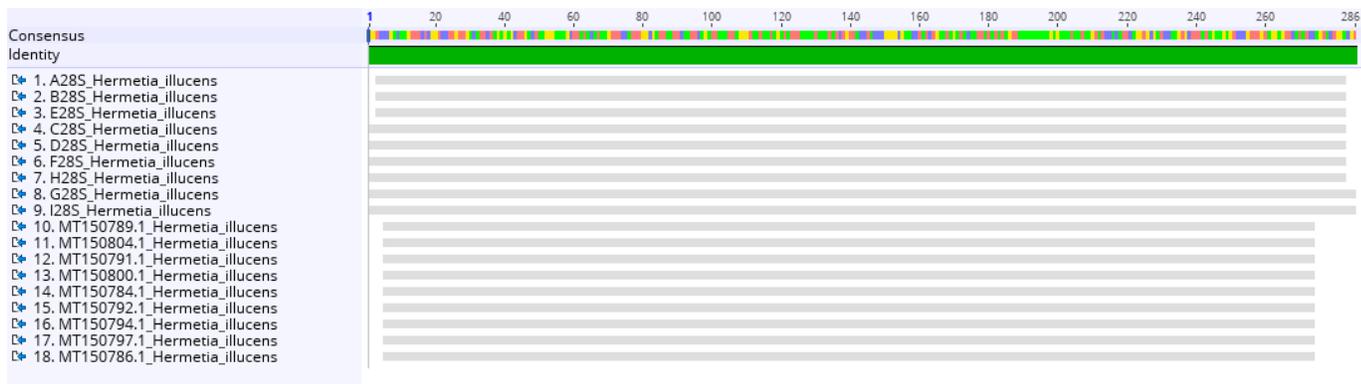
Durante el alineamiento múltiple de las secuencias se determinó que el marcador 28S rADN no tiene variabilidad entre individuos de la especie *H. illucens* (figura 12), mientras que el marcador ITS2 muestra una variabilidad mínima y el marcador COI presenta la mayor variabilidad entre individuos.

El marcador ITS2 amplificado incluye la secuencia completa del espaciador transcrito interno 2, secuencias parciales del gen de ARN ribosomal 5.8S y del gen de ARN de la subunidad grande ribosomal (figura 13). Estas regiones fueron identificadas usando como referencia a las secuencias del genoma de *H. illucens*: XR\_005250511.1 y NC\_051855.1. Se observó la ausencia de un polimorfismo en la posición 63 del marcador ITS2 para las secuencias de la mayoría de los individuos de Ecuador, con excepción del individuo D, donde tienen una timina. La posición 63 del ITS2 para el individuo D tiene un polimorfismo K (Timina o Guanina) al igual que las secuencias de

Kenia, España y Australia. Además, todas las muestras secuenciadas en Ecuador tienen una delección de una adenina en la posición 131 de ITS2.

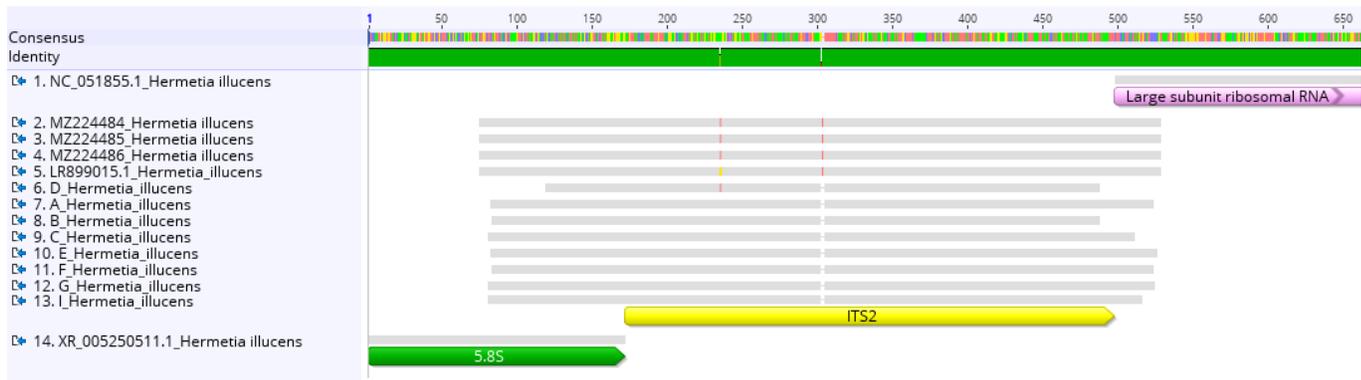
## Figura 12

*Alineamiento múltiple MUSCLE de las secuencias parciales del marcador 28S rADN*



## Figura 13

*Alineamiento múltiple MUSCLE de las secuencias 5.8S, ITS2 y ARN de la subunidad grande ribosomal 28S rADN*



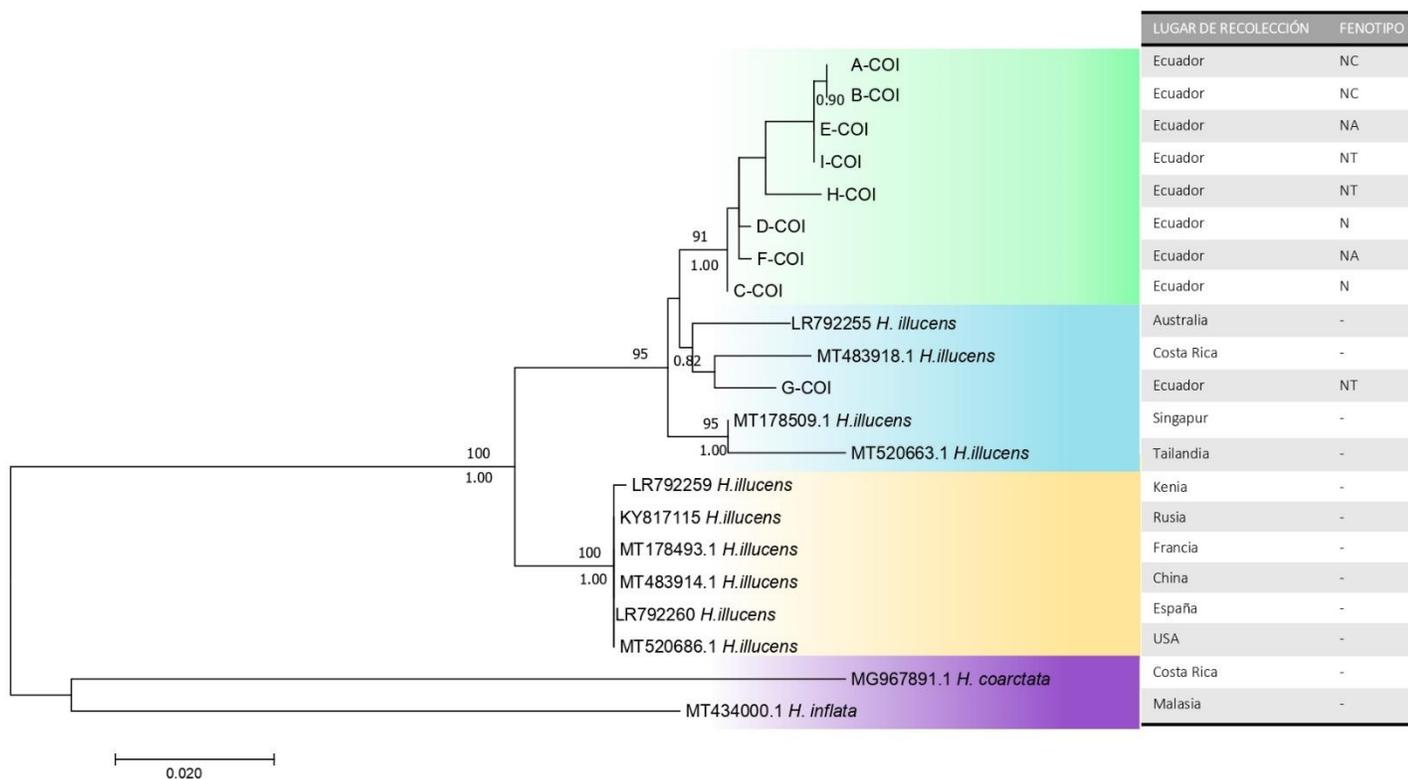
Para comprobar y analizar estas variaciones, se construyeron árboles filogenéticos solo con el gen marcador COI. La figura 14 muestra el árbol filogenético para *Hermetia illucens* y outgroups de otras especies del género *Hermetia*. Con este análisis se puede confirmar que las MSN recolectadas en Puerto Quito y Nanegalito,

Ecuador, pertenecen a la especie *Hermetia illucens* debido a su alta semejanza con las secuencias de aislados en bases de datos moleculares. Otro punto es que aunque existe una relación muy fuerte apoyada por los valores de soporte del árbol, los individuos recolectados en Ecuador presentan diferencias con otras poblaciones del mundo, a excepción del individuo G que forma parte del mismo clado con un valor de soporte de 95% pero se relaciona con otras poblaciones en Singapur, Tailandia y Costa Rica. Por esta razón se realizó un análisis de varianza molecular entre las poblaciones distinguidas en el árbol.

Adicionalmente, en el árbol filogenético se muestran los fenotipos de las muestras recolectadas en Ecuador. Solo los individuos A y B con fenotipo NC tienden a agruparse y los demás individuos con fenotipos N, NA y NT son polifiléticos.

## Figura 14

Árbol filogenético molecular del análisis de Máxima Verosimilitud y Bayesiano para especies del género *Hermetia*.



*Nota.* Valores de soporte bootstrap >80% (ubicados sobre los nodos) calculados en RAxML por el software MEGA 7: N° Repeticiones de Bootstraps=500, modelo de sustitución General Time Reversible model (GTR). Valores de soporte posterior probabilities >0.90 (ubicados bajo los nodos), calculados con el software BEAST: modelo de sustitución GTR, reloj molecular estricto, longitud de la cadena MCMC 1000000, frecuencia de muestreo 1000, burn-in 10%. En el nombre de cada aislado se encuentra el número de accesoión de NCBI y al lado izquierdo de la figura se indican los lugares de recolección y el fenotipo de cada muestra (N, NA, NC, NT). La escala indica la distancia genética calculada. Imagen del árbol filogenético obtenida con FigTree v.1.4.4 y editada con PowerPoint.

### **Análisis de varianza molecular (AMOVA)**

Las poblaciones escogidas para realizar el análisis se agruparon según los árboles como se observa en la tabla 3.

**Tabla 3.**

*Poblaciones agrupadas para el análisis AMOVA*

<b>Población</b>	<b>Nombre, NA NCBI (Lugar de recolección)</b>
1	A-COI, B-COI, C-COI, D-COI, E-COI, F-COI, H-COI, I-COI
2	G-COI, MT178509.1 (Singapur) MT483918.1 (Costa Rica), MT520663.1 (Tailandia)
3	LR792255 (Australia)
4	MT520686.1 (USA), KY817115 (Rusia) MT178493.1 (Francia), MT483914.1 (China) LR792260 (España), LR792259 (Kenia)

Los resultados obtenidos en el AMOVA se muestran en la tabla 4. Estos indican una muy alta variación entre las poblaciones (84.9%) y baja variación dentro de las poblaciones. Para determinar entre qué poblaciones existe tan alta diferencia se realizó el análisis de las diferencias por pares (figura 15). Este análisis muestra una alta varianza entre las poblaciones 1 y 4.

**Tabla 4.**

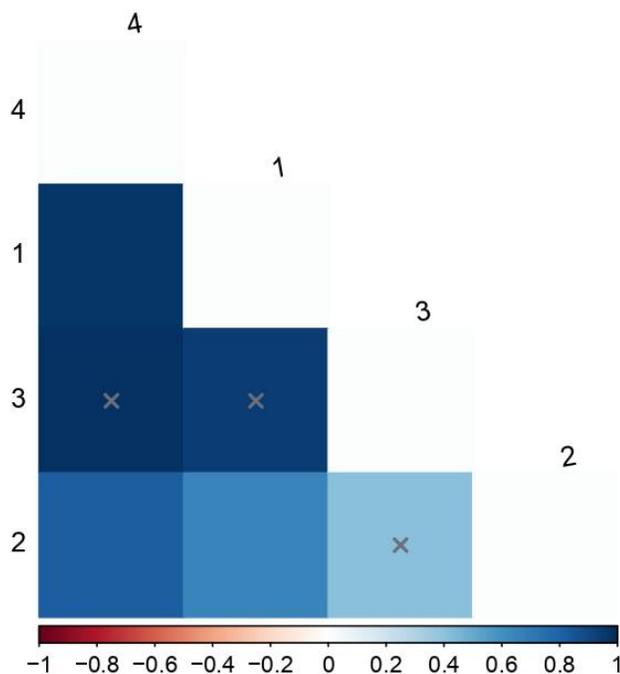
*Resultados del análisis AMOVA, promedio sobre 58 loci*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b>Test de significancia (1023 permutaciones) Valor-p</b>
Entre poblaciones	247.074	9.54637	84.85095	0.00000
Dentro de las poblaciones	56.083	1.70438	15.14905	
Total	303.157	11.25075		

*Nota.* AMOVA Locus por locus, organismo diploide, N° de permutaciones: 1000,  
Diferencia FST entre pares calculada con 0.05 de significancia y 100 permutaciones.

**Figura 15**

*Resultados de la comparación entre pares de poblaciones para identificar las diferencias según valores FST, graficados por medio del software R studio*



*Nota.* Matriz con valores de los índices FST obtenidos en el análisis AMOVA. Estos índices representan la correlación de alelos elegidos al azar dentro de una misma subpoblación en relación con toda la población (Weir, 2012). Un valor FST de 0 indica que la proporción de diversidad genética debida a diferencias de frecuencia de alelos entre poblaciones es nula y por ende las poblaciones no pueden ser fácilmente distinguidas entre ellas según sus secuencias; lo contrario ocurre con valores de FST cercanos a 1 donde las poblaciones tienen alta diversidad genética y pueden ser fácilmente distinguidas entre ellas según su genética. Los números 1-4 representan las poblaciones antes determinadas (tabla 3). Los colores indican los valores de FST, donde 0 es blanco y 1 es azul oscuro. Las equis en la mitad de los cuadrados indican

que no existen diferencias significativas entre las poblaciones y por ende no deben ser tomados en cuenta.

### **Ensayo de degradación con microplásticos**

Del ensayo de degradación con microplásticos se obtuvo los datos de biomasa y se calcularon las tasas de crecimiento, reducción de sustrato y la supervivencia de las larvas a la 4ta semana de ensayo o 31 días a partir de la eclosión. No se observó formación de prepupas y los pesos de las larvas fueron significativamente bajos para su desarrollo en todos los tratamientos, incluyendo el control (Anexos – tabla 14). Para comparar los tratamientos se obtuvieron las medidas de resumen. Con el objetivo de comprobar la homocedasticidad de los datos se generaron gráficas Q-Q plot y posteriormente se realizó el ensayo ANOVA con una prueba Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

### ***Biomasa***

El valor de la biomasa tuvo gran diferencia entre los tratamientos. El valor F crítico (3.86) es menor al F de prueba obtenido, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que existe diferencia entre las medias de la biomasa de las larvas criadas con los diferentes tratamientos (tabla 6). Según la prueba de Tukey, existen diferencias significativas entre la biomasa de larvas criadas con bolsas de almidón y bolsas de polietileno pero no existen diferencias entre la biomasa del tratamiento control y el que contenía poliestireno (tabla 7, figura 17).

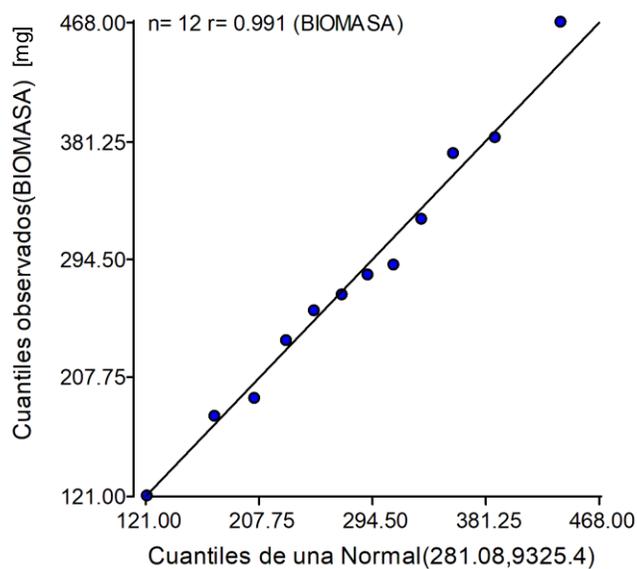
**Tabla 5.**

*Medidas de resumen para la variable biomasa [mg] en cuatro tratamientos con microplásticos*

TRATAMIENTO	n	Media [mg]	D.E.	E.E.	CV	Mín.	Máy.
PLA 5%	3	392	72.33	41.76	18.45	324	468
C	3	278	96.6	55.77	34.75	179	372
PE 5%	3	190	68.02	39.27	35.8	121	257
PS 5%	3	264	27.68	15.98	10.47	235	290

**Figura 16**

*Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable biomasa*



**Tabla 6.***Análisis de la varianza para la variable biomasa*

<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
BIOMASA	12	0.61	0.46	25.13	

<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	62666.25	3	20888.75	4.19	0.0468
TRATAMIENTO	62666.25	3	20888.75	4.19	0.0468
Error	39912.67	8	4989.08		
Total	102578.92	11			

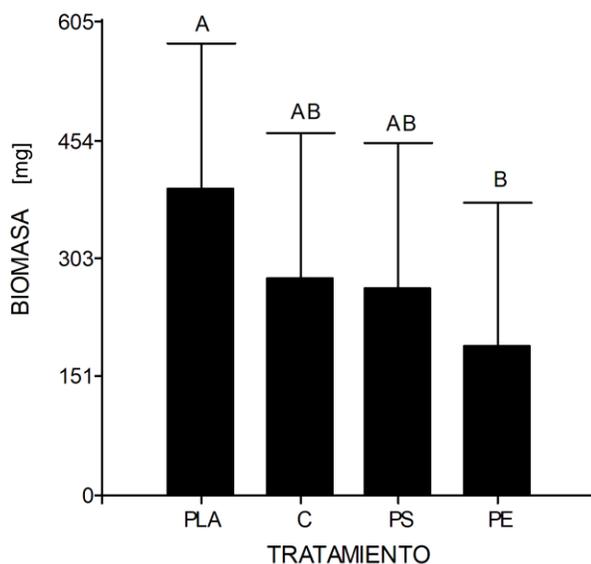
**Tabla 7.***Prueba de Tukey, Alfa=0.05, DMS=184.68593, Error: 4989.0833, gl: 8*

TRATAMIENTO	Medias [mg]	n	E.E.		
PLA 5%	392	3	40.78	A	
C	278	3	40.78	A	B
PS 5%	264	3	40.78	A	B
PE 5%	190	3	40.78		B

*Nota.* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Figura 17**

*Gráfica de comparación de medias entre la biomasa obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación*



*Nota.* Los intervalos representan el valor DMS obtenido en la prueba de Tukey

### ***Tasa de Crecimiento***

Los análisis realizados para la tasa de crecimiento larvaria calculada demuestran que no existen diferencias entre los tratamientos. El valor F crítico (3.07) es mayor al F de prueba obtenido, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, lo que indica que no existe diferencia entre las medias de la tasa de crecimiento de larvas criadas con los diferentes tratamientos (tabla 9, figura 19).

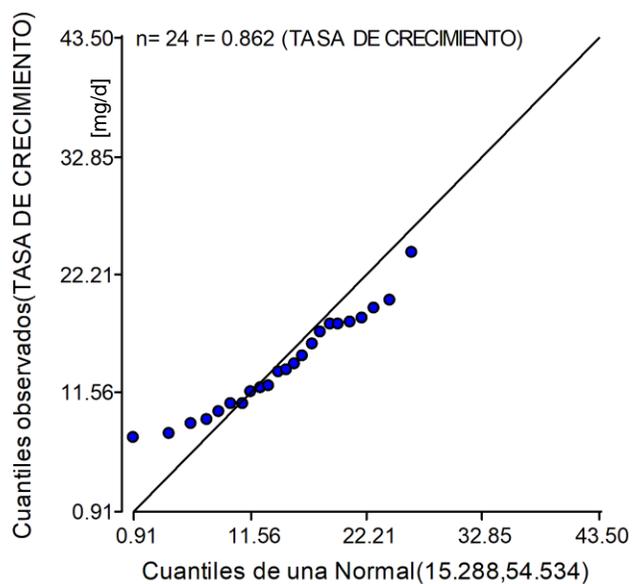
**Tabla 8.**

*Medidas de resumen para la variable tasa de crecimiento (mg/d) en cuatro tratamientos con microplásticos*

TRATAMIENTO	n	Media [mg/d]	D.E.	E.E.	CV	Mín.	Máy.
C	6	17.45	12.92	5.27	74.04	10.50	43.50
PE 5%	6	9.52	2.39	0.98	25.13	7.50	14.10
PLA 5%	6	19.33	2.55	1.04	13.19	17.00	24.10
PS 5%	6	14.85	2.50	1.02	16.87	11.60	17.90

**Figura 18**

*Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable tasa de crecimiento*



**Tabla 9.***Análisis de la varianza para la variable tasa de crecimiento*

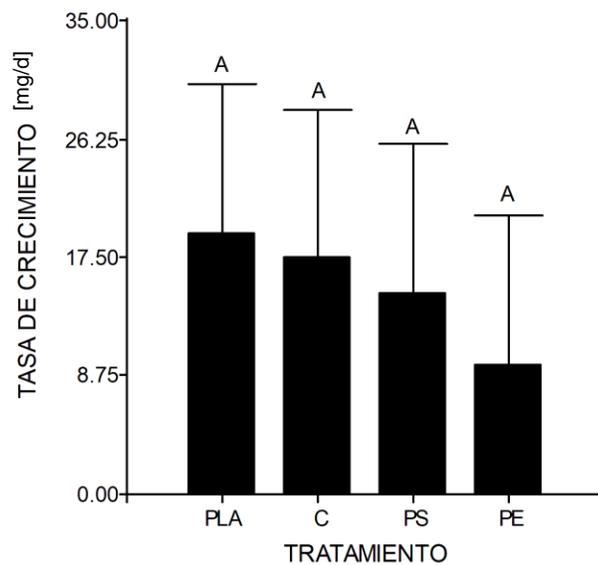
<b>Análisis de la varianza</b>					
<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>CV</b>	
TASA DE CRECIMIENTO	24	0.26	0.15	44.53	

<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	327.23	3	109.08	2.35	0.1027
TRATAMIENTO	327.23	3	109.08	2.35	0.1027
Error	927.05	20	46.35		
Total	1254.29	23			

**Figura 19**

*Gráfica de comparación de medias entre la tasa de crecimiento obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación*



*Nota.* Los intervalos representan el valor DMS obtenido en la prueba de Tukey

***Supervivencia***

Los datos de supervivencia obtenidos no fueron robustos en cantidad y significado, muestran heterocedasticidad según el gráfico Q-Q por lo que no se realizaron análisis posteriores (figura 20).

**Tabla 10.**

*Promedio de larvas al inicio y al final del ensayo y porcentaje de larvas desaparecidas*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Nº final</b>	<b>Nº inicio</b>	<b>%Desaparecidas</b>
CONTROL	25	30	17
PS 5%	27	30	11
PE 5%	19	30	38
PLA 5%	28	30	78

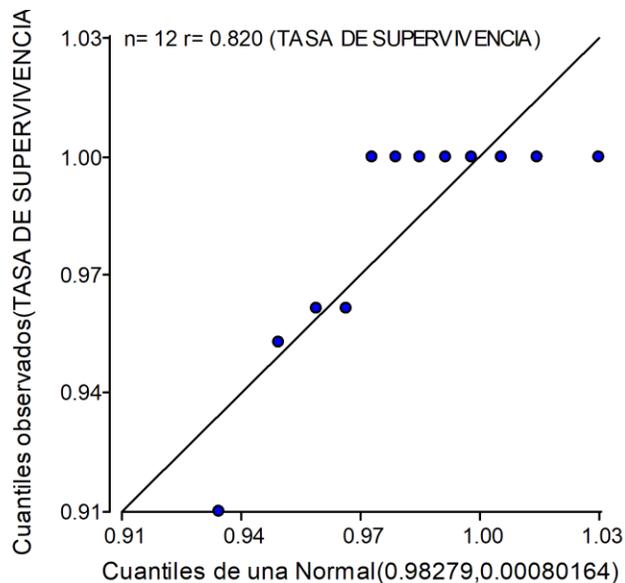
**Tabla 11.**

*Medidas de resumen para la variable supervivencia en cuatro tratamientos con microplásticos*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>E.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máy.</b>
C	3	0.99	0.02	0.01	2.17	0.96	1
PE 5%	3	0.96	0.04	0.03	4.55	0.91	1
PLA 5%	3	0.99	0.02	0.01	2.17	0.96	1
PS 5%	3	1	0	0	0	1	1

**Figura 20**

*Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable supervivencia*



### ***Tasa de reducción del sustrato***

Los análisis realizados para la tasa de reducción del sustrato demuestran que no existen diferencias entre los tratamientos. El valor F crítico (5.41) es mayor al F de prueba obtenido, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, lo que indica que no existe diferencia entre las medias de la tasa de reducción del sustrato por las larvas criadas en diferentes tratamientos (tabla 13, figura 22).

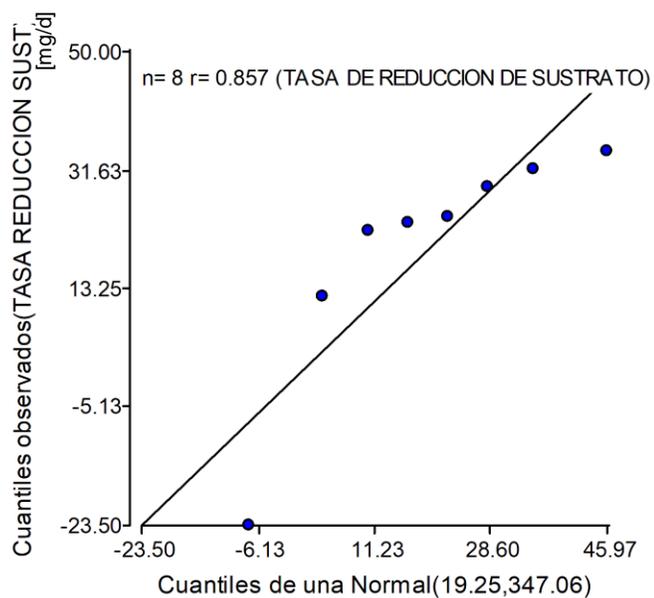
**Tabla 12.**

*Medidas de resumen para la variable tasa de reducción del sustrato en cuatro tratamientos con microplásticos*

TRATAMIENTO	n	Media [mg/d]	D.E.	E.E.	CV	Mín.	Máx.
C	2	2.80	37.19	26.3	1328	-23.5	29.1
PE 5%	2	21.9	14.14	10	64.6	11.9	31.9
PLA 5%	2	29.6	7.21	5.1	24.4	24.5	34.7
PS 5%	2	22.7	0.85	0.6	3.74	22.1	23.3

**Figura 21**

*Gráfica Q-Q plot para la normalidad de la variable tasa de reducción de sustrato*



**Tabla 13.**

*Análisis de la varianza para la variable tasa de reducción de sustrato*

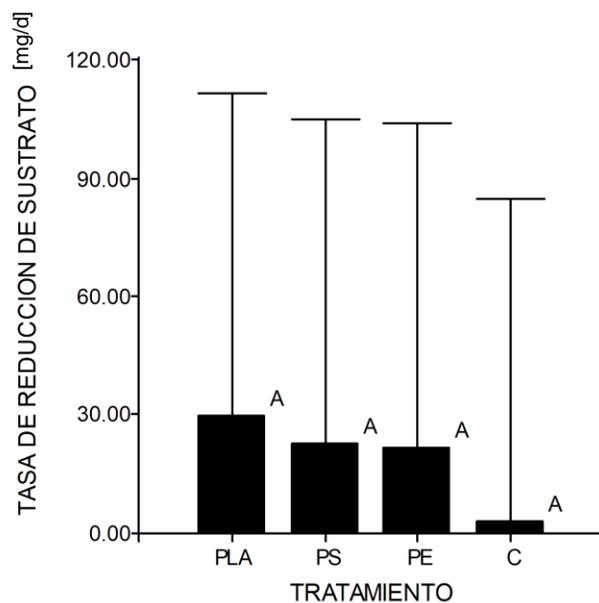
<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
TASA DE REDUCCION DE SUSTRATO	8	0.33	0	105.06	

<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	793.30	3	264.43	0.65	0.6249
TRATAMIENTO	793.30	3	264.43	0.65	0.6249
Error	1636.12	4	409.03		
Total	2429.42	7			

**Figura 22**

*Gráfica de comparación de medias entre la tasa de reducción del sustrato obtenida con los diferentes tratamientos del ensayo de degradación*

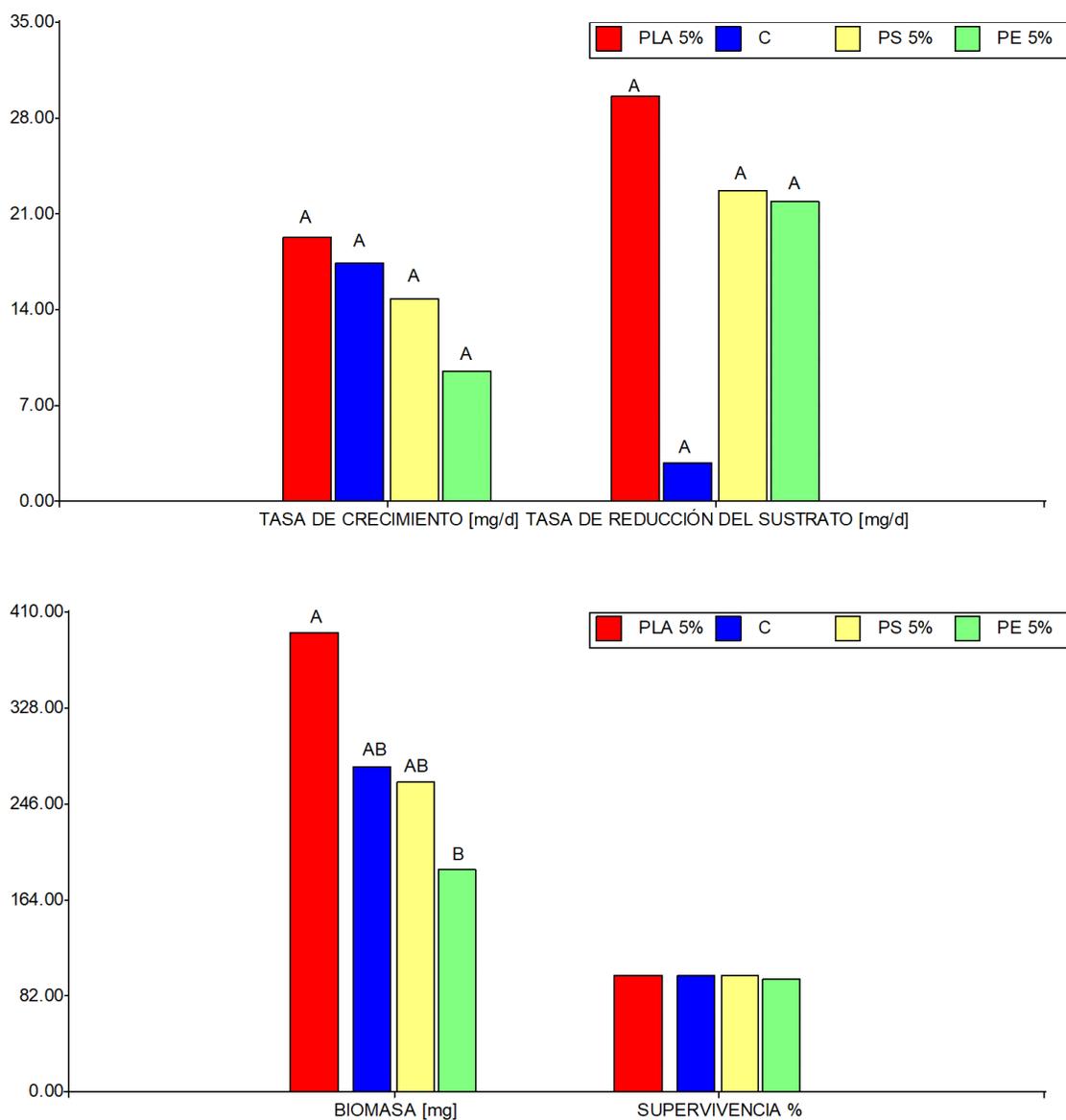


*Nota.* Los intervalos representan el valor DMS obtenido en la prueba de Tukey

Finalmente, un resumen de los datos obtenidos del ensayo de degradación se detalla en la figura 23, donde la biomasa fue la variable donde hay diferencias significantes entre los tratamientos.

**Figura 23**

Gráfica resumen para el rendimiento de *H. illucens* en el tratamiento de residuos con microplásticos: Control sin microplásticos, 5% de Poliestireno PS, 5% de bolsas de Polietileno PE y 5% de bolsas de Almidón - Ácido Poliláctico PLA.



Nota. Las letras A y B, indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Capítulo V: Discusión

Los insectos recolectados del cantón Puerto Quito se identifican como *Hermetia illucens* según los resultados de la caracterización molecular, la búsqueda BLAST, el árbol filogenético y son apoyados con el aporte fotográfico y la comparación con claves dicotómicas. Por primera vez, se obtuvo información genética del insecto MSN en Ecuador y de igual forma se proporcionó información sobre la variabilidad genética que existe entre poblaciones con los marcadores moleculares COI, ITS2 y 28S rADN.

De acuerdo con el gen marcador mitocondrial COI, Ståhls et al. (2020) identificaron que posee un alto nivel de diversidad genética intraespecífica (4.9%) entre aislados secuenciados de varias partes del mundo, encontrando 56 haplotipos diferentes. Por el contrario, los genes ITS2 y 28S rADN presentaron invariabilidad intraespecífica. Todos estos resultados son corroborados por los obtenidos en el presente estudio, dando a entender que el gen COI es un marcador adecuado para la caracterización molecular de *H. illucens* debido a la gran cantidad de información que proporciona entre poblaciones. De igual manera para un objetivo de identificación molecular, dentro de esta región parcial amplificada del gen COI, 89 pb resultan ser específicos para *H. illucens* y con estos se puede diferenciarla entre especies saprófitas (Zagon et al., 2018).

Adicionalmente, el presente proyecto proporciona la caracterización del marcador ITS2 de *H. illucens*. Se indica su posición entre las regiones parciales de la subunidad 5.8S ribosomal y el gen de rARN de la subunidad grande ribosomal 28S rRNA, que comprenden una sola región amplificada por los cebadores descritos en metodología. Se pudo identificar que el marcador ITS2, en los aislados de Ecuador, tenía dos variaciones puntuales entre los individuos MSN analizados. Para determinar si ITS2 se puede usar como un marcador molecular adecuado para diferenciar entre

poblaciones de *H. illucens*, es necesaria una mayor cantidad de secuencias del mismo para poder ser incluido en el análisis. En los alineamientos de este marcador solo se utilizaron 4 secuencias encontradas en las bases de datos que no fueron suficientes para establecer un resultado sobre las poblaciones.

Las muestras de este estudio formaron un clado monofilético con secuencias de *H. illucens* de GenBank- NCBI. Aun así, el resultado de la prueba AMOVA indicó alta diferenciación genética entre poblaciones. Las poblaciones 1 y 4 tienen un valor de FST muy alto con nivel de significancia 0.05; lo cual significa que, los individuos de las determinadas poblaciones pueden ser fácilmente identificadas por sus diferencias genéticas significativas. Las poblaciones 2 y 4 de igual manera podrán identificarse pero con menor facilidad puesto a que sus diferencias no son tan notorias como con las poblaciones 1 y 4. La población 1 se compone por los aislados de Ecuador y la población 4 por aislados de Europa y África. De esta forma, se indica que los aislados pueden tener mayor semejanza con *H. illucens* provenientes de Asia y Costa Rica que conforman la población 2.

Según el análisis filogenético de Khamis et al. (2020), muestras de *H. illucens* de África Occidental (Nigeria y Ghana) formaron un grupo distinto, muestras de Tailandia y Estados Unidos estaban estrechamente relacionadas, muestras de Uganda se agruparon por separado y todas las muestras de Australia, Países Bajos, Sudáfrica, Kenia, Estados Unidos y China se agruparon entre ellas. Así también, Soyeon Park et al. (2017), señalan que la alta diferenciación molecular entre poblaciones indica una limitación en la dispersión de la MSN de forma regional que puede estar afectada por las condiciones climáticas.

El segundo componente de estudio se enfocó en la biodegradación con plásticos que duró cuatro semanas y con el que se obtuvo datos no tan robustos. Se identificó

que la biomasa de las larvas en el grupo control no se asemejó a la biomasa que podrían llegar a tener normalmente larvas criadas con las mismas condiciones. También fue notable que, en todos tratamientos, ninguna larva logró llegar a estadio de prepupa. Bajo condiciones óptimas y con buena cantidad y calidad de alimento, las larvas crecerían en solo 15 días aprox. Las larvas de MSN son organismos resilientes y por tanto tienen la habilidad de extender su ciclo de vida bajo condiciones no favorables. Debido a que los estadios larvarios son los únicos momentos donde este organismo se alimenta, solo cuando las reservas de grasa y proteína almacenadas sean suficientes, las larvas van a sufrir la pupación (inicio de la metamorfosis) (Dortmans et al., 2017). Así pues, una posible explicación a la baja producción de biomasa sería que por unidad experimental se usaron solo 30 larvas a diferencia de otros estudios donde utilizan por lo menos 100. Las larvas en grupos grandes tendrían mejores condiciones para resistir situaciones limitantes debido a un comportamiento colectivo. Esto puede ser ratificado por el estudio de Shishkov et al. (2019), donde se propuso un modelo matemático de la mecánica de alimentación de las larvas MSN quienes se alimentan rápidamente en grupo, aumentando la tasa de alimentación. Primero, las larvas se arrastran unas sobre otras para acceder al alimento, se tocan constantemente entre sí y no les gusta estar aisladas. Aquellas que están comiendo toman descansos frecuentes, lo que impide que otras larvas accedan a la comida. Esto resulta un problema para los grupos de larvas y es superado por medio de la generación fuentes de larvas alrededor de los alimentos, donde las larvas hambrientas se arrastran desde el fondo y son "bombeadas" hacia el alimento. De modo que, las larvas de mosca pueden ser únicas entre los saprofitos con habilidades de alimentación grupal.

Además se podría atribuir el lento desarrollo larvario a las condiciones de altura y presión en Quito (2850 msnm, 0.71 atm) debido a no ser las óptimas para el insecto

(Paredes, 2018). Este es uno de los primeros experimentos realizados a esta altura y a condiciones controladas.

Por tanto, los datos de supervivencia y la tasa de reducción de sustrato no pueden ser considerados para determinar el efecto del microplástico en la crianza de *H. illucens*. Debido a que las larvas no adquirieron peso rápidamente, la supervivencia no fue correctamente registrada. Las larvas que morían no podían distinguirse entre el sustrato por su pequeño tamaño, se perdían entre el sustrato y seguramente fueron consideradas como desaparecidas. Así se explicaría el por qué en los tratamientos de 5% de PE se obtuvo la menor biomasa y hubo la mayor cantidad de desaparecidos. Asimismo, la tasa de reducción de sustrato no pudo medirse correctamente. Esta tasa fue también afectada por el lento crecimiento de las larvas debido a que la cantidad de sustrato no variaba entre semana por la alimentación de las larvas (que era muy limitada) sino por la deshidratación o hidratación accidental del sustrato.

Sin embargo, existen claras diferencias entre las medias de la biomasa de las larvas alimentadas con los cuatro diferentes tratamientos. Sorprendentemente, las larvas alimentadas con el tratamiento control no tuvieron diferencias con respecto al peso final obtenido con las larvas del tratamiento de 5% de PS. Además, las diferencias más significativas se encontraron entre las larvas con mayor biomasa promedio: tratamiento 5% PLA y las larvas con menor biomasa promedio: 5% PE. Las larvas alimentadas con 5% microplásticos de bolsas de PE fueron afectadas negativamente con respecto a su biomasa a comparación de las larvas alimentadas con 5% microplásticos de bolsas de almidón (PLA) que tuvieron el mayor peso promedio de todos los tratamientos.

Una explicación al mayor aumento de peso en larvas alimentadas con fundas de almidón sería que el polímero PLA del que están hechas las bolsas biodegradables es

un polímero natural, es decir que puede crearse en la naturaleza o destruirse por hidrólisis, fotólisis, microorganismos y degradación enzimática con mayor facilidad a los plásticos como PE o PS. Debido a la fermentación fomentada por las bacterias, este polímero se transformaría en ácido láctico y otros monómeros que sirven de alimento a su vez a las larvas. Esta fuente de alimento adicional y fácil de asimilar, pudo ser causante del aumento significativo en la biomasa de este tratamiento. El PLA después de exponerse a la humedad sufre lisis en sus grupos éster de su cadena principal haciendo que disminuya su peso molecular y liberando oligómeros y monómeros solubles (ácido láctico, glucosa). La reacción crea grupos ácidos que reducen el pH y los iones  $H^+$  aceleran la reacción. La degradación enzimática con ayuda de microorganismos está dada principalmente por proteasas (serina proteasas) y en menor proporción por lipasas (esterasa) y las cutinasas. Así, las bacterias adheridas en el PLA donde colonizan la superficie, excretan enzimas extracelulares que degradan el PLA e hidrolizan su estructura polimérica (Zaaba & Jaafar, 2020).

Ahora bien, el obtener un resultado positivo para el aumento de biomasa en larvas de MSN no necesariamente indicaría que es mejor el uso de bolsas biodegradables de almidón de maíz para reemplazar los plásticos PE o PS como empaques debido al menor impacto en este organismo. Sino que la degradación de 5% microplásticos de PLA es facilitada por la presencia de agua y la ayuda de las larvas de MSN que permiten la proliferación de bacterias y por ende la producción de enzimas para la degradación de la materia orgánica en descomposición. Hay desventajas del uso del plástico a base de almidón - PLA. Aunque su producción no proviene de derivados del petróleo, tiene un impacto ambiental por el requerimiento de agua necesaria para el cultivo de maíz, antes que por la producción de gases de efecto invernadero. Además, el PLA no es fácilmente degradable a condiciones ambientales,

sino que necesita de agua, luz, enzimas o bacterias como antes discutido (Zaaba & Jaafar, 2020).

Para terminar, la utilización de larvas de *H. illucens* o insectos en general en la gestión de los residuos orgánicos es prometedor debido a la capacidad que tienen para bioconvertir materia en descomposición. Si hay plásticos presentes se demuestra que existe una afectación al desarrollo de biomasa larvaria, especialmente por las fundas de PE, indicando que los microplásticos crean una presión en el ecosistema por su difícil degradación. Hacen falta estudios que apoyen esta hipótesis para que se puedan superar dichas limitaciones. Así, la utilización de insectos para bioconversión de residuos orgánicos podrá usarse como herramienta asequible para el manejo de residuos en países en desarrollo de Latinoamérica como Ecuador, donde la pobreza es un factor limitante para el desarrollo de prácticas eficientes (Del Hierro, 2016).

## Capítulo VI: Conclusiones

Se aislaron 26 secuencias de 9 insectos MSN del cantón Puerto Quito y mediante observación morfológica, análisis filogenéticos y de similitud molecular se pudieron identificar como *Hermetia illucens*.

El análisis filogenético de poblaciones de *H. illucens* de diferentes regiones del mundo indica que la población de Ecuador está más relacionada con las poblaciones de MSN de Costa Rica y Asia del Sur (Tailandia, Singapur).

El ensayo de degradación con microplásticos comprobó que existe un efecto negativo en la biomasa larvaria al criar *H. illucens* con microplásticos de bolsas de PE. El tratamiento con microplásticos de bolsas de almidón de maíz PLA fue el que resultó en la mayor biomasa larvaria entre los tratamientos evaluados. El presente ensayo no demuestra la capacidad de degradación de plásticos por medio de las larvas de *H. illucens* pero si muestra el efecto que tienen los microplásticos sobre las larvas.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Con el objetivo de obtener un análisis profundo sobre el origen de la población de Ecuador de *H. illucens*, se podría realizar el análisis filogenético y de haplotipos con un repertorio mayor de secuencias del género *Hermetia* y especies *H. illucens* de varias bases de datos, lugares de recolección y fenotipos distintos.

Se recomienda utilizar una muestra de por lo menos 100 larvas para el ensayo de degradación de tal forma que se obtengan datos cercanos al desarrollo de larvas en campo.

Para investigaciones posteriores se recomienda realizar un ensayo químico que pueda verificar si existe la degradación de plásticos por parte de *H. illucens*.

Finalmente se recomienda realizar un análisis del microbioma del tracto digestivo del insecto con secuenciación de alto rendimiento para relacionar con el efecto de los microplásticos en la dieta.

## Bibliografía

- Aboagye-Antwi, F., Kwansa-Bentum, B., Dadzie, S. K., Ahorlu, C. K., Appawu, M. A., Gyapong, J., Wilson, M. D., & Boakye, D. A. (2015). Transmission indices and microfilariae prevalence in human population prior to mass drug administration with ivermectin and albendazole in the Gomoa District of Ghana. *Parasites & Vectors*, 8(1), 562. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1105-x>
- Alvaro, M., & Moreno, C. (2013). *Identificación del Potencial Aprovechable de los Residuos Sólidos Orgánicos que se generan en Mercados, Supermercados, Parques, Jardines y diferentes Sectores Industriales de la Zona Sur del Distrito Metropolitano de Quito*. [Tesis previa a la obtención del Título de: INGENIERO AMBIENTAL]. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO.
- Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M., & van Loon, J. J. A. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed – a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2), 105–120. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>
- Barros de Carvalho, C. J., & de Mello-Patiu, C. A. (2008). *Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America*. 52(3), 390–406.
- Biodegradables Ecuador. (s/f). FAQ. Biodegradables Ecuador. <https://biodegradablesecuador.com/preguntas-frecuentes-productos-y-materiales-desechables-biodegradables/#1557871436328-4b60a9e0-0178>
- Bruno, D., Bonelli, M., De Filippis, F., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Casartelli, M., Ercolini, D., & Caccia, S. (2018). The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), e01864-18, [/aem/85/2/AEM.01864-18.atom. https://doi.org/10.1128/AEM.01864-18](https://doi.org/10.1128/AEM.01864-18)

- Capinera, J. L. (Ed.). (2008). *Encyclopedia of entomology* (2. ed). Springer Science+Business Media B.V.
- Caruso, D., Devic, Subamia, Talamond, & Baras. (2013). *Technical handbook of domestication and production of diptera Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens*, Stratiomyidae*. Penerbit IPB Press.
- Cho, S., Kim, C.-H., Kim, M.-J., & Chung, H. (2020). Effects of microplastics and salinity on food waste processing by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of Ecology and Environment*, 44(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s41610-020-0148-x>
- Cifuentes, Y., Glaeser, S. P., Mvie, J., Bartz, J.-O., Müller, A., Gutzeit, H. O., Vilcinskas, A., & Kämpfer, P. (2020). The gut and feed residue microbiota changing during the rearing of *Hermetia illucens* larvae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(9), 1323–1344. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01443-0>
- Cowley, L. (2020). *What is Corn Starch Plastic?* Eco World. <https://ecoworldonline.com/what-is-corn-starch-plastic/>
- Del Hierro, A. (2016). *Waste Management to promote Sustainable Development in Latin American and Caribbean region*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27138.73924>
- Dortmans, B. M. A., Diener, S., Verstappen, B. M., & Zurbrügg, C. (2017). *Black Soldier Fly Biowaste Processing—A Step-by-Step Guide* (Donahue, P.). Eawag-Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology.
- El Productor. (2018). Puerto Quito cuenta con un moderno sistema para el manejo de residuos sólidos. *EL PRODUCTOR*. <https://elproductor.com/2018/06/puerto-quito-cuenta-con-un-moderno-sistema-para-el-manejo-de-residuos-solidos/>
- El Universo. (2020). *Corporación Favorita no cobrará por fundas plásticas al contener 50% de materia prima reciclada*. El Universo. <https://www.eluniverso.com/noticias/2020/05/14/nota/7841472/fundas-plasticas-megamaxi-supermaxi-impuesto-ecuador/#:~:text=Publicidad->

, Corporación Favorita no cobrar a por fundas plásticas al contenedor 2050, con 204 centavos de 20d lar.

Fachin, D. A., & Carvalho-Filho, F. D. S. (2020). New findings on the Neotropical species *Hermetia goncalvensis* Albuquerque, 1955 (Diptera: Stratiomyidae):

Redescription, puparium, and geographical records. *Zootaxa*, 4755(3), 515–530.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4755.3.4>

Gao, Z., Deng, W., & Zhu, F. (2019). Reference gene selection for quantitative gene expression analysis in black soldier fly (*Hermetia illucens*). *PLOS ONE*, 14(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221420>

Garita Sánchez, Rojas Vargas, & Calderón. (2014). *Guía práctica para el manejo de los residuos orgánicos utilizando composteras rotatorias y lombricompost* Guía práctica para el manejo de los residuos orgánicos utilizando composteras rotatorias y lombricompost. Universidad Nacional Costa Rica.

<https://documentos.una.ac.cr/bitstream/handle/unadocs/3818/Manual%20Composteras.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gobbi, F. P. (2012). *Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de Hermetia illucens (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa* [Universidad de Alicante].

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=62033>

Gobierno de la República del Ecuador. (2013). *El uso de bolsos reusables se incrementa gracias a la iniciativa 'Una funda por el planeta'*. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. <https://www.ambiente.gob.ec/el-uso-de-bolsos-reusables-se-incrementa-gracias-a-la-iniciativa-una-funda-por-el-planeta/>

- Hauser, Fachín, & Woodley. (2017). *Manual of Afrotropical Diptera. Volume 2. Nematocerous Diptera and lower Brachycera*. South African National Biodiversity Institute.
- Huang, & Almeida. (2015). *Estudio comparativo de la compostabilidad de fundas plásticas de PEBD, oxo-biodegradables y de papel distribuidas en el Distrito Metropolitano de Quito*. 7, C20–C30.
- Instituto Nacional de Biodiversidad. (2020). *Investigadora del INABIO lidera un proyecto que busca transformar el problema de la sobreproducción de residuos en una oportunidad de generar insumos para la industria*. INABIO.  
<https://inabio.biodiversidad.gob.ec/2020/01/15/investigadora-del-inabio-lidera-un-proyecto-que-busca-trasformar-el-problema-de-la-sobreproduccion-de-residuos-en-una-oportunidad-de-generar-insumos-para-la-industria/>
- Ivorra, T., Hauser, M., Low, V. L., Tomberlin, J. K., Nur Aliah, N. A., Cammack, J. A., & Heo, C. C. (2020). *Hermetia illucens* and *Hermetia fenestrata* (Diptera: Stratiomyidae) Colonization of “Spoiled” Stingless Bee *Geniotrigona thoracica* (Hymenoptera: Apidae) Hives in Malaysia. *Insects*, 11(11), 737.  
<https://doi.org/10.3390/insects11110737>
- Jaimes Guitierrez, R. (2020). *PLA Plastic/Material: All You Need to Know*. ALL3DP.  
<https://all3dp.com/1/pla-plastic-material-polylactic-acid/>
- James, M. T., & Wirth, W. W. (1967). The Species of *Hermetia* of the aurata Group (Diptera: Stratiomyidae). *Proceedings of the United States National Museum*, 123(3603), 1–19. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.123-3603.1>
- Jaramillo, M. G., Valencia, N. R., & Machado, P. B. (2019). *Uso potencial de Hermetia illucens (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) para transformación de pulpa de café: Aspectos biológicos*. 10.

- Jeon, H., Park, S., Choi, J., Jeong, G., Lee, S.-B., Choi, Y., & Lee, S.-J. (2011). The Intestinal Bacterial Community in the Food Waste-Reducing Larvae of *Hermetia illucens*. *Current Microbiology*, 62(5), 1390–1399. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9874-8>
- Khamis, F. M., Ombura, F. L. O., Akutse, K. S., Subramanian, S., Mohamed, S. A., Fiaboe, K. K. M., Saijuntha, W., Van Loon, J. J. A., Dicke, M., Dubois, T., Ekesi, S., & Tanga, C. M. (2020). Insights in the Global Genetics and Gut Microbiome of Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*: Implications for Animal Feed Safety Control. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01538>
- Kovac, D., & Rozkošný, R. (s/f). *Insecta: Diptera, Stratiomyidae*. 7.
- Lessard, B. D. (2020). Review of Australian Sarginae soldier fly genera (Diptera: Stratiomyidae), with first records of *Cephalochrysa*, *Formosargus* and *Microchrysa*. *Records of the Australian Museum*, 72, 22.
- Lessard, B. D., Yeates, D. K., & Woodley, N. E. (2019). Revision of the Hermetiinae of Australia (Diptera: Stratiomyidae): Hermetiinae soldier flies of Australia. *Austral Entomology*, 58(1), 122–136. <https://doi.org/10.1111/aen.12333>
- Liu, C., Wang, C., & Yao, H. (2019). Comprehensive Resource Utilization of Waste Using the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae). *Animals*, 9(6), 349. <https://doi.org/10.3390/ani9060349>
- Mason, F. (2013). Updated Italian checklist of Soldier Flies (Diptera, Stratiomyidae). *ZooKeys*, 336, 61–78. <https://doi.org/10.3897/zookeys.336.6016>
- Matmatch GmbH. (2021). *LDPE vs HDPE: Properties, Production and Applications*. Matmatch. <https://matmatch.com/learn/material/lpde-vs-hdpe>
- Mullen, G. R. (2019). *Medical and veterinary entomology* (3rd edition). Elsevier.
- National Geographic Society. (2019, julio 1). *Microplastics*. National Geographic. <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/microplastics/>

- Oliveira, F., Doelle, K., List, R., & O'Reilly, J. R. (2015). Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5), 6.
- Orayeva, J. (2020). *Ecuador: Un estudio de más de 10 años realizado en cooperación con el OIEA analiza la polución por microplásticos en el océano Pacífico tropical oriental*. Organismo Internacional de Energía Atómica.  
<https://www.iaea.org/es/newscenter/news/ecuador-estudio-microplasticos-pacifico-oriental>
- Paredes, G. C. (2018). *Quito, ciudad de altura*. 2, 9.
- Raimondi, S., Spampinato, G., Macavei, L. I., Lugli, L., Candelieri, F., Rossi, M., Maistrello, L., & Amaretti, A. (2020). Effect of Rearing Temperature on Growth and Microbiota Composition of *Hermetia illucens*. *Microorganisms*, 8(6), 902.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060902>
- Rogers, K. (2020, septiembre 8). *Microplastics*. Encyclopedia Britannica.
- Roháček, J., & Hora, M. (2013). *A northernmost European record of the alien black soldier fly Hermetia illucens (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae) / Nejsevernější evropský výskyt nepůvodní braněnky Hermetia illucens (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae)*. 62(2), 101–106. <http://dx.doi.org/10.2478/cszma-2013-0011>
- Roy, S., Chakraborty, S. K., Parui, P., & Mitra, B. (2018). Taxonomy of Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) of Sunderban Biosphere Reserve, India. *Proceedings of the Zoological Society*, 71(2), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0200-0>
- Rozkošný, R., & Kovac, D. (1994). *A NEW SPECIES OF ODONTOMYIA MEIGEN (INSECTA: DIPTERA: STRATIOMYIDAE) FROM SABAH, BORNEO*. 859–867.

- Sheppard, D. C., Tomberlin, J. K., Joyce, J. A., Kiser, B. C., & Sumner, S. M. (2002). Rearing Methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(4), 695–698. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
- Shishkov, O., Hu, M., Johnson, C., & Hu, DL. (2019). *Black soldier fly larvae feed by forming a fountain around food*. 16: 20180735. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2018.0735>
- Smet, J. D., Wynants, E., Cos, P., Campenhout, L. V., & Drake, H. L. (2018). Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), e02722-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>
- Soyeon Park, Hansu Choi, Ji-young Choi, & Gilsang Jeong. (2017). Population Structure of the Exotic Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) in Korea. *Korean Journal of Environment and Ecology*, 31(6), 520–528.
- SpecialChem. (2021). *Polyethylene (PE)*. Omnexus. <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-plastic>
- Ståhls, G., Meier, R., Sandrock, C., Hauser, M., Šašić Zorić, L., Laiho, E., Aracil, A., Doderović, J., Badenhorst, R., Unadirekkul, P., Mohd Adom, N. A. B., Wein, L., Richards, C., Tomberlin, J. K., Rojo, S., Veselić, S., & Parviainen, T. (2020). The puzzling mitochondrial phylogeography of the black soldier fly (*Hermetia illucens*), the commercially most important insect protein species. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01627-2>
- Velásquez, Y., Magaña, C., Martínez-Sánchez, A., & Rojo, S. (2010). Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: Larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00879.x>

- Weir, B. S. (2012). Estimating  $F$ -Statistics: A Historical View. *Philosophy of Science*, 79(5), 637–643. <https://doi.org/10.1086/667904>
- Wikimedia Foundation, Inc. (2008). *Polystyrene*. Wikipedia.  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Polystyrene.svg>
- Wikimedia Foundation, Inc. (2021a). *Polyethylene*. Wikipedia.  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene>
- Wikimedia Foundation, Inc. (2021b). *Polylactic acid*. Wikipedia.  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Polylactic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Polylactic_acid)
- Wilson, E. (2010). *Why do we need to protect biodiversity?* European Commission.  
[https://ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/intro/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/intro/index_en.htm)
- Woo, S., Song, I., & Cha, H. J. (2020). Fast and facile biodegradation of polystyrene by the gut microbial flora of *Plesiophthalmus davidis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01361-20>
- Wynants, E., Froominckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrock, C., Wohlfahrt, J., Van Schelt, J., Depraetere, S., Lievens, B., Van Miert, S., Claes, J., & Van Campenhout, L. (2019). Assessing the Microbiota of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) Reared on Organic Waste Streams on Four Different Locations at Laboratory and Large Scale. *Microbial Ecology*, 77(4), 913–930.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-018-1286-x>
- Yu, G., Cheng, P., Chen, Y., Li, Y., Yang, Z., Chen, Y., & Tomberlin, J. K. (2011). Inoculating Poultry Manure With Companion Bacteria Influences Growth and Development of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) Larvae. *Environmental Entomology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/10.1603/EN10126>
- Zaaba, N. F., & Jaafar, M. (2020). A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation.

*Polymer Engineering & Science*, 60(9), 2061–2075.

<https://doi.org/10.1002/pen.25511>

Zagon, J., Rienzo, V. di, Potkura, J., Lampen, A., & Braeuning, A. (2018). A real-time PCR method for the detection of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in feedstuff.

*Food Control*, 91, 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.032>

Zheng, L., Crippen, T. L., Singh, B., Tarone, A. M., Dowd, S., Yu, Z., Wood, T. K., & Tomberlin, J. K. (2013). A Survey of Bacterial Diversity From Successive Life Stages of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) by Using 16S rDNA

Pyrosequencing. *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 647–658.

<https://doi.org/10.1603/ME12199>

## Anexos