



NOTA

Polyethylene fragments affected the development of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae)

Fragmentos de polietileno afectaron el desarrollo de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae)

Ruiz Barrionuevo, Juliana M.^{*1,2} ; Geria Reines, Martín^{*1,2} ; Martín, Eduardo^{1,3} ; Malizia, Agustina² ; Galindo-Cardona, Alberto² ; Escobar, Lorena² ; Monmany Garzia, A. Carolina²

¹ Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

² Instituto de Ecología Regional (IER), UNT-CONICET. Yerba Buena, Tucumán, Argentina

³ Fundación Miguel Lillo (FML). San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

* Autores de correspondencia: <julimruiz4@gmail.com>, <martingeria1@gmail.com>

ABSTRACT

Products made of plastic have revolutionized people's way of life worldwide since they first appeared in 1950. Plastic products have many benefits to our society, but they have also provoked severe environmental problems and caused issues for many organisms. Microplastics (particles between 1 and 5 micrometers) have a negative impact on many biological processes, including the development, immune system, and stress levels of different organisms. In the present study we report, for the first time, a kind of mechanical damage caused by microplastics to a greater wax moth pupa *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae). This damage involved a perturbation in their cuticle development, provoking its death. Damage to development-related structures represents an acute lethal factor. Since an increasing number of insects are in contact with this pollutant in nature (e.g., soils), this type of damage becomes relevant and deserves attention from the scientific community.

Keywords — Emergent pollutants, mechanical damage, ontogeny, secondary microplastics.

► Ref. bibliográfica: Ruiz Barrionuevo, J. M.; Geria Reines, M.; Martín, E.; Malizia, A.; Galindo-Cardona, A.; Escobar, L.; Monmany Garzia, A. C. 2023. "Polyethylene fragments affected the development of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae)". *Acta zoológica lilloana* 67 (2): 361-368. DOI: <https://doi.org/10.30550/j.azl/1820>

► Recibido: 5 de julio 2023 – Aceptado: 23 de agosto 2023.



► URL de la revista: <http://actazoolologica.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

RESUMEN

Los artículos a base de plástico han revolucionado el modo de vida del mundo desde que aparecieron por primera vez en la década de 1950. A pesar de las mejoras en la vida de las personas, estos productos también han provocado serios problemas para el ambiente y las distintas formas de vida de la tierra. Los microplásticos (partículas entre 1 y 5 micrómetros) afectan distintos procesos biológicos de los organismos, incluyendo al desarrollo, sistema inmune y niveles de estrés. En el presente trabajo reportamos, por primera vez, un tipo de daño mecánico causado por microplásticos a una pupa de la polilla grande de la cera *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae). Este daño involucró una perturbación en el desarrollo de la cutícula, la cual no se formó por completo y dejó a la pupa expuesta a patógenos, provocando su muerte. El daño a estructuras relacionadas al desarrollo representa un factor letal inmediato. Dado que un número creciente de insectos se encuentra en contacto con este contaminante en la naturaleza (por ejemplo, suelos), este tipo de daño cobra relevancia y merece atención por parte de la comunidad científica.

Palabras clave — Contaminantes emergentes, daño mecánico, microplásticos secundarios, ontogenia.

Products of plastic are a constant in our daily life. Our dependence on them has grown since they appeared on the market in 1950s, due to their versatility, stability, low weight, and cheap production cost (Hale, Seeley, La Guardia, Mai, Zeng, 2020). Even though plastic products have many benefits for our society, they have also generated new environmental problems worldwide because of their overuse and their persistence in the environment after they are discarded (Sarria-Villa and Gallo-Corregidor, 2016).

There are two types of microplastics (i.e., particles between 1 and 5 micrometers), the primary microplastics used in cosmetics and some drugs, and the secondary microplastics, which are the result of aging and fragmentation of bigger plastics. The secondary microplastics are new pollutants distributed worldwide. Studies about their incidence focused mainly on marine ecosystems (Botterell et al., 2019; Messinetti, Mercurio, Parolini, Sugni, Pennati, 2018) and more recently, on land and freshwater environments (Rochman 2018; Malizia and Monmany Garzia 2019; Muñiz-Gonzales et al., 2021).

Microplastics may affect an organism's biological processes in different ways, including their development, immune system, and stress levels (Liu et al., 2019, Ma et al., 2020; Trestrail, Nugegoda, Shimeta, 2020; Ruiz Barrionuevo et al., 2022). In relation to insects, one of the most abundant animal groups in the world, there is some evidence that shows microplastic's negative effects on their development but it is still scarce (Muñiz-González et al., 2021). For example, mosquito larvae *Chironomus riparius* were exposed to low density polyethylene and they showed physiological responses and genetic alterations that negatively affected their development (Muñiz-González et al., 2021). In another experiment with insects, Romano and Fisher (2021) evaluated the effect of polypropylene on *Hermetia illucens* fly's devel-

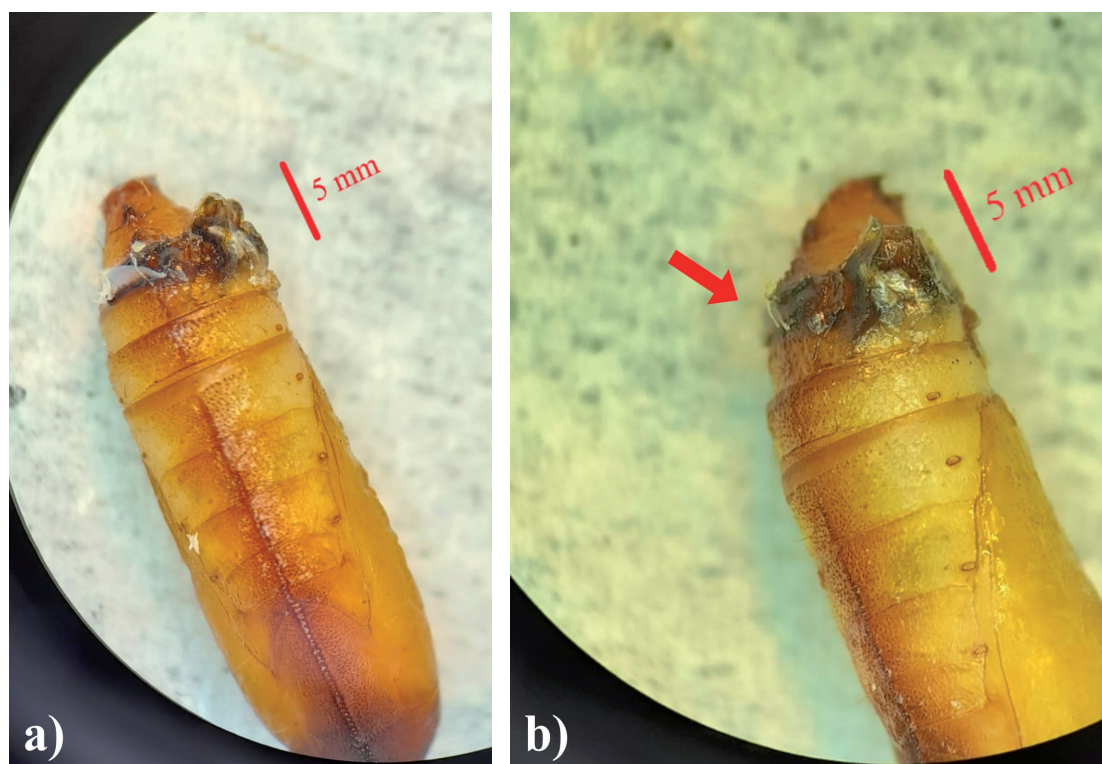


Figure 1. Photograph of one *Galleria mellonella* pupa (Lepidoptera, Pyralidae) showing the fragment of polyethylene microplastic embedded in the posterior end of the body: a) dorsal view, b) lateral view.

Figura 1. Fotografía de una pupa de *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) mostrando el fragmento de microplástico de polietileno incorporado en el extremo posterior del cuerpo: a) vista dorsal, b) vista lateral.

opment and found that only 65.2% of the larvae exposed to polypropylene reached the pupal stage compared to the control group that showed a pupation percentage of 83.8%. Furthermore, they reported an increase in the proportion of short chain fatty acids in the larvae exposed to polypropylene, which could indicate a change in their internal microbiota (Romano and Fischer, 2021). In another study, Al-Jaibachi, Cuthbert, Callaghan et al. (2018) examined mosquitoes from *Culex pipiens* and determined that microplastics could be transferred ontogenetically throughout an organism's life cycle. In fact, they detected that microplastics <0.002 millimeters can pass from the larval stage to the adult stage. This represents a problem not only for the larval stage of the individuals exposed to microplastics, but also for the animals that feed on the adult stage of these individuals (Al-Jaibachi, Cuthbert, Callaghan et al., 2018). Finally, Ruiz Barrionuevo et al. (2022) found out that the ingestion of polyethylene, polystyrene and polypropylene shortened the development of *Galleria mellonella* larvae as the larvae exposed to plastic diets turned into pupa faster ($\sim 7-10$ days) than those based on a natural diet of beeswax (~ 15 days). All these studies add information about the microplastics' physiochemical and biological effects on insects' development. However, given that the records about the impact of these pollutants are recent, we are far from knowing the true spectrum of the damage that microplastics can cause on animal development, and particularly, on insects.

In this study we report our observations on the development of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) in the presence of polyethylene. This moth lives inside beehives and feeds on beeswax, which has a similar chemical composition to polyethylene (Kwadha, Ong' amo, Ndegwa, Raina, Fombong, 2017). This species is considered “plastivore” because it is able to consume polyethylene, polystyrene and polypropylene (Bombelli, Howe, Bertocchini, 2017; Lou et al., 2020; Ruiz Barrionuevo et al., 2022; Réjasse et al., 2022). From the experimental rearing of *G. mellonella* in lab conditions, individuals were selected for a diet experiment. One of them consisted exclusively of 10 mm² (average size) polyethylene fragments. Groups of 7 larvae individuals were fed for 7 days, and once they reached the pupal stage, small plastic fragments (~2.5 mm²) attached to the pupal cuticle of one individual were found (Fig. 1). These fragments, located in the rear end of the body, prevented the full closure of the cuticle, leaving the individual exposed to possible fungal, viral, or bacterial infections. Probably this was the cause of the immediate death of the individual.

We report for the first time this type of mechanical damage caused by microplastics during the development of wax moth larvae. Previous studies demonstrated mechanical damage on other animals (Varó et al., 2021; Silva et al., 2021; Pittura et al., 2018), although our observation suggests that the effects of microplastics can interfere in processes as the formation of micro-structures during insect development. Unlike other more discrete impacts, such as changes in the gut microbiota or increased stress, damage to structures related to their development represents an immediate lethal factor. Since an increasing number of insects are in contact with this contaminant in nature (e.g., soils), this type of damage becomes relevant and deserves attention from the scientific community.

REFERENCES

- Al-Jaibachi, R., Cuthbert, R.N., Callaghan, A. (2018). Up and away: ontogenic transference as a pathway for aerial dispersal of microplastics. *Biology Letters* 14: 20180479. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0479>
- Bombelli, P., Howe, C.J., Bartocchini, F. (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* 27(8), 292-293. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060>
- Botterell, Z.R.L., Beumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R.C., Lindeque, P.K. (2019). Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environmental Pollution* 245, 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.065>
- Hale, R.C., Seeley, M.E., La Guardia, M.J., Mai, L., Zeng, L.Y. (2020). A Global Perspective on Microplastics. *JGR Oceans* 125(1).
- Kwadha, C.A., Ong' amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., Fombong, A.T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8(2), 61. <https://doi.org/10.3390/insects8020061>
- Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Chen, M., & Zhao, Y. (2019). Effects of microplastics on the innate immunity and intestinal microflora of juvenile

- Eriocheir sinensis*. Science of the Total Environment, 685, 836-846. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.265>
- Lou, Y., Ekaterina, P., Yang, S., Lu, B., Liu, B., Ren, N., Corvini, P.F.-X., Xing, D. (2020). Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. Environmental Science & Technology 54(5), 2821-2831. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07044>
- Ma, H., Pu, S., Liu, S., Bai, Y., Mandal, S., & Xing, B. (2020). Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences. Environmental Pollution, 261, 114089. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114089>
- Malizia, A., Monmany Garzia, A.C. (2019). Terrestrial ecologists should stop ignoring plastic pollution in the Anthropocene time. Science of the Total Environment 668, 1025-1029. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.044>
- Messinetti, S., Mercurio, S., Parolini, M., Sugni, M., Pennati, R. (2018). Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. Environmental Pollution 237, 1080-1087. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.030>
- Muñiz-González, A. B., Silva, C. J. M., Patricio Silva, A. L., Campos, D., Pestana, J. L. T., & Martínez-Guitarte, J. L. (2021). Suborganismal responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to polyethylene microplastics. Science of the Total Environment, 783, 146981. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146981>
- Pittura, L., Avio, C.G., Giuliani, M.E., d'Errico, G., Keiter, S.H., Cormier, B., Gorb, S., Regoli, F. (2018). Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Frontiers in Marine Science 5, 351215. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103>
- Réjasse, A., Waeytens, J., Deniset-Besseau, A., Crapart, N., Nielsen-Leroux, C., Sandt, C. (2022). Plastic biodegradation: Do *Galleria mellonella* Larvae Bioassimilate Polyethylene? A Spectral Histology Approach Using Isotopic Labeling and Infrared Microspectroscopy. Environmental Science & Technology 56(1), 525-534. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03417>
- Rochman, C.M. (2018). Microplastics research—from sink to source. Science 360(6384), 28-29. <https://doi.org/10.1126/science.aar7734>
- Romano, N., Fischer, H. (2021). Microplastics affected black soldier fly (*Hermetia illucens*) pupation and short chain fatty acids. Journal of Applied Entomology 145(7), 731-736. <https://doi.org/10.1111/jen.12887>
- Ruiz Barrionuevo, J.M., Martín, E., Galindo Cardona, A., Malizia, A., Chalup, A., de Cristóbal, R. E., & Monmany-Garzia, A. C. (2022). Consumption of low-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene materials by larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae), impacts on their ontogeny. Environmental Science and Pollution Research International, 29(45), 68132–68142. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20534-1>
- Sarria-Villa, R.A., Gallo-Corregidor, J.A. (2016). La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. Journal de Ciencia e Ingeniería 8(1), 21-27.

- Silva, C.J.M., Beleza, S., Campos, D., Soares, A.M.V.M., Silva, A.L.P., Pestana, J.L.P., Gravato, C. (2021). Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *Journal of Hazardous Materials* 414, 125401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125401>
- Trestrail, C., Nugegoda, D., Shimeta, J. (2020). Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of The Total Environment*, 734, 138559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>
- Varó, I., Osorio, K., Estensoro, I., Naya-Català, F., Sitjà-Bobadilla, A., Navarro, J.C., Pérez-Sánchez, J., Torreblanca, A., Piazon, M.C. (2021). Effect of virgin low density polyethylene microplastic ingestion on intestinal histopathology and microbiota of gilthead sea bream. *Aquaculture* 545, 737245. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737245>

MATERIAL SUPLEMENTARIO / TEXTO EN ESPAÑOL

Fragmentos de polietileno afectaron el desarrollo de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae)

Los productos creados a base de plástico son una constante de nuestra vida cotidiana. Nuestra dependencia hacia ellos ha aumentado desde su aparición en el mercado en la década de 1950, gracias a su versatilidad, estabilidad, bajo peso y reducido costo de producción (Hale, Seeley, La Guardia, Mai, Zeng, 2020). Si bien los productos plásticos tienen muchos beneficios para la sociedad, estos han generado nuevas problemáticas ambientales a nivel mundial debido a su uso excesivo y persistencia en el medio ambiente luego de su descarte (Sarria-Villa y Gallo-Corregidor, 2016).

Existen dos tipos de microplásticos (es decir, partículas entre 1 y 5 micrómetros), los primarios que se usan en cosméticos y algunos fármacos y los secundarios, que son el resultado del desgaste y fragmentación de plásticos más grandes (Crawford et al., 2016; Courtney et al., 2009). Los microplásticos secundarios son nuevos contaminantes distribuidos por todo el mundo. Estudios sobre su incidencia se han concentrado principalmente en ecosistemas marinos (Botterell et al., 2019; Messinetti, Mercurio, Parolini, Sugni, Pennati, 2018) y más recientemente, en ambientes terrestre y dulceacuícolas (Rochman, 2018; Malizia y Monmany Garzia, 2019; Muñoz-Gonzales et al., 2021).

Los microplásticos pueden afectar procesos biológicos de los organismos de distintas maneras. Se han documentado efectos negativos sobre el desarrollo, sobre el sistema inmune y sobre niveles de estrés en varias especies animales (Liu et al., 2019; Ma et al., 2020; Trestrail, Nugegoda, Shimeta, 2020; Ruiz Barrionuevo et al., 2022). En relación con los insectos, uno de los grupos animales más abundantes del planeta, existe evidencia, aunque escasa, que muestra estos efectos negativos de los microplásticos en el desarrollo. Por ejemplo, larvas del mosquito *Chironomus riparius*, expuestas a polietileno de baja densidad mostraron respuestas fisiológicas y alteraciones a nivel genético que afectaron negativamente su desarrollo (Muñoz-González

et al., 2021). En otro experimento con insectos, Romano y Fischer (2021) evaluaron el efecto de polipropileno en el desarrollo de moscas *Hermetia illucens* y encontraron que sólo el 65% de las larvas expuestas al tratamiento con polipropileno pasaron al estado de pupa, mientras que este porcentaje ascendió a 83,8% en el caso de las larvas en el grupo control. Además, observaron un aumento en la proporción de ácidos grasos de cadena corta en las larvas expuestas a polipropileno, lo que podría indicar un cambio en la microbiota intestinal (Romano y Fischer, 2021). En otro estudio (Al-Jaibachi, Cuthbert, Callaghan et al., 2018) se examinaron mosquitos del género *Culex* y se determinó que los microplásticos pueden transferirse ontogénicamente a lo largo de la vida de un organismo a través de sus distintos estadios. De hecho, detectaron que microplásticos < 0,002 milímetros pueden pasar del estado de larva al estado adulto. Esto representa problemas de exposición a microplásticos para los animales de los estadios larvales, como también para los que se alimentan del estado adulto (Al-Jaibachi, Cuthbert, Callaghan et al., 2018). Finalmente, Ruiz Barrionuevo et al. (2022) mostraron que el consumo de polietileno, poliestireno y polipropileno acortó el desarrollo de larvas de *Galleria mellonella*: las larvas sometidas a dietas basadas en plástico pasaron al estado de pupa más rápidamente (~7-10 días) que las larvas del grupo bajo dieta natural de cera de abeja (~15 días). Todos estos estudios aportan información sobre efectos físico-químicos y biológicos de los microplásticos en el desarrollo de insectos. Sin embargo, dado que los registros de los impactos de estos contaminantes son recientes, estamos lejos de conocer el espectro completo de daños que los microplásticos causan sobre el desarrollo de animales y en especial, de insectos.

En este estudio reportamos observaciones sobre el desarrollo de la polilla de la cera *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) en presencia de polietileno. Esta polilla habita dentro de colmenas de abejas y consume cera de abejas, la cual tiene una composición química similar al plástico (Kwadha, Ong'amo, Ndegwa, Raina, Fombong, 2017). Esta especie es considerada 'plastívora' debido a que puede consumir polietileno, poliestireno y polipropileno (Bombelli, Howe, Bertocchini, 2017; Lou et al., 2020; Ruiz Barrionuevo et al., 2022; Réjasse et al., 2022). En nuestra cría experimental de *G. mellonella* en condiciones de laboratorio, seleccionamos individuos para un ensayo de dietas. Una de las dietas consistió exclusivamente de fragmentos de polietileno de 10 mm² (tamaño promedio). Las larvas (en grupos de 7 individuos) se alimentaron durante 7 días y una vez que pasaron al estadio de pupa, encontramos pequeños fragmentos de plástico (~2,5 mm) adheridos a la cutícula de una pupa (Figura 1). Estos fragmentos, ubicados en la parte posterior del cuerpo, evitaron que la cutícula se selle por completo, dejando a la pupa expuesta a posibles infecciones de hongos, virus o bacterias. Probablemente esto provocó la muerte inmediata del individuo.

Reportamos aquí por primera vez este tipo de daño mecánico causado por un microplástico secundario durante el desarrollo de la larva de la polilla de la cera. Estudios previos en otros animales demostraron daños mecánicos (Varò et al., 2021; Silva et al., 2021; Pittura et al., 2018), aunque nuestra observación sugiere que los efectos de microplásticos pueden interferir en procesos tan sutiles como la formación de micro-estructuras durante el desarrollo de insectos. A diferencia de otros

impactos negativos, más silenciosos, como los cambios en la microbiota intestinal o el aumento de estrés, el daño a estructuras relacionadas al desarrollo representa un factor letal inmediato. Dado que un número creciente de insectos se encuentra en contacto con este contaminante en la naturaleza (por ejemplo, en los suelos), este tipo de daño cobra relevancia y merece atención por parte de la comunidad científica.