



饲喂塑料对 4 种昆虫幼虫生长与肠道微生物的影响

胡佳辰¹, 刘光玲¹, 黄石涛¹, 李子俊¹, 张洪波¹, 冯俊娜¹, 熊德玉², 张瑜瑜¹,
莫丽玲¹, 孔云虹¹, 夏云^{1*}

1 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214

2 云南省昭通市彝良县第一中学, 云南 昭通 657600

胡佳辰, 刘光玲, 黄石涛, 李子俊, 张洪波, 冯俊娜, 熊德玉, 张瑜瑜, 莫丽玲, 孔云虹, 夏云. 饲喂塑料对 4 种昆虫幼虫生长与肠道微生物的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4319-4337.

HU Jiachen, LIU Guangling, HUANG Shitao, LI Zijun, ZHANG Hongbo, FENG Junna, XIONG Deyu, ZHANG Yuyu, MO Liling, KONG Yunhong, XIA Yun. Effects of feeding plastics on the growth and gut microbiota of the larvae of four insect species[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4319-4337.

摘要: 塑料污染是全球最关注的环境问题之一, 目前利用昆虫肠道微生物降解塑料是解决塑料污染的新举措, 昆虫肠道微生物菌群在塑料降解过程中起重要作用, 但对昆虫取食塑料后肠道中微生物群落的组成和动态还缺乏了解。【目的】探究取食塑料对 4 种昆虫幼虫生理指标以及肠道微生物的组成和动态的影响。【方法】将聚苯乙烯塑料泡沫(polystyrene, PS)、聚乙烯塑料(polyethylene, PE)和麦麸(对照)作为唯一碳源分别饲喂大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟, 采用荧光原位杂交技术对 4 种幼虫肠道微生物菌群进行动态监测, 并比较了它们的生理指标和肠道菌群的关联。【结果】四种昆虫在取食 PS 和 PE 后, 体重和体长的增长幅度都显著低于麦麸对照组; 取食 PS 的黄粉虫和大麦虫的存活率比取食 PE 的分别高 25.33%和 11.75%; 4 种昆虫肠道中微生物优势细菌菌群为厚壁菌门(*Firmicutes*, 丰度 16.98%–54.93%)、变形菌门(*Proteobacteria*)中的 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*, 丰度 5.91%–39.34%)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*, 丰度 4.62%–30.86%)以及古菌(*Euryarchaeota*, 丰度 9.99%–58.05%)【结论】除厚壁菌门和变形菌门外, 古菌也是啮食 PE 和 PS 的大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟幼虫肠道中的主要菌群。昆虫肠道中主要微生物菌群的丰度随时间呈动态变化, 并受塑料类型以及昆虫种类的影响。大麦虫和黄粉虫的体重和体长与肠道微生物菌群显著相关。

关键词: 大麦虫; 黄粉虫; 黑粉虫; 大蜡螟; 荧光原位杂交技术; 聚苯乙烯; 聚乙烯; 肠道菌群

资助项目: 国家自然科学基金(31760178, 31860029)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760178, 31860029).

*Corresponding author. E-mail: xiayun22@hotmail.com

Received: 2024-05-21; Accepted: 2024-07-18; Published online: 2024-07-22

Effects of feeding plastics on the growth and gut microbiota of the larvae of four insect species

HU Jiachen¹, LIU Guangling¹, HUANG Shitao¹, LI Zijun¹, ZHANG Hongbo¹, FENG Junna¹, XIONG Deyu², ZHANG Yuyu¹, MO Liling¹, KONG Yunhong¹, XIA Yun^{1*}

¹ School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, Yunnan, China

² Yiliang County No.1 Middle School, Zhaotong 657600, Yunnan, China

Abstract: Plastic pollution is an environmental problem that has aroused global concern, and plastics degradation by insect gut microbiota is a new initiative to solve this problem. Despite the important role of insect gut microbiota in the degradation of plastics, little is known about the composition and dynamics of insect gut microbiota. **[Objective]** To study the effects of feeding plastics on the physiological indices and the composition and dynamics of gut microbiota in the larvae of four insect species. **[Methods]** Polystyrene (PS), polyethylene (PE), and wheat bran (control) were used as the sole carbon source respectively to feed the larvae of *Zophobas atratus* Fab., *Tenebrio molitor* L., *Tenebrio obscurus* F., and *Galleria mellonella* L. The dynamics of gut microbiota in the larvae of the four insect species were investigated by fluorescence *in situ* hybridization, and the correlations between the physiological indices and gut microbiota were analyzed. **[Results]** All four insect species fed with PS and PE had significantly lower body weight gain and body length increase than those in the control. The survival rates of *Z. atratus* and *T. molitor* larvae fed with PS were 25.33% and 11.75%, respectively, higher than those fed with PE. The dominant microbial taxa of the gut microbiota in the four insect species were *Firmicutes* (relative abundance of 16.98%–54.93%), *Betaproteobacteria* (5.91%–39.34%), *Gammaproteobacteria* (4.62%–30.86%) of *Proteobacteria*, and *Euryarchaeota* (9.99%–58.05%). **[Conclusion]** In addition to *Firmicutes* and *Proteobacteria*, archaea were also dominant in the gut microbiota in the larvae of the four species fed with PE and PS. The relative abundance of the main microbial taxa in the insect gut varied dynamically over time and was influenced by the types of plastics as well as the insect species. The body weights and body lengths of *Z. atratus* and *T. molitor* were correlated with their gut microbiota.

Keywords: *Zophobas atratus* Fab.; *Tenebrio molitor* L.; *Tenebrio obscurus* F.; *Galleria mellonella* L.; fluorescence *in situ* hybridization; polystyrene; polyethylene; gut microbiota

塑料因其耐腐蚀性强、耐磨性好、韧性高和成本低廉等特点，在多个领域得到广泛应用^[1]。据统计，1950–2015 年全球累积生产的塑料废弃

物达 63 亿 t^[2]。自 2020 年左右，口罩等塑料医疗制品大量生产^[3]。2021 年，中国就生产了 1.1 亿 t 塑料制品^[4]。预计至 2050 年，全球将累

计产生 120 亿 t 塑料废弃物^[5]。塑料的大量使用且难降解对生态环境造成了巨大压力^[6]。日常生活中常用的塑料有聚苯乙烯塑料泡沫(polystyrene, PS)和聚乙烯塑料(polyethylene, PE)等^[7]。目前处理 PS 和 PE 废弃物的方法有物理填埋法、燃烧能源回收法、再生造粒和化学原料回收法等^[8]。其中填埋和焚烧都会对环境造成再次污染^[9], 而化学分解成本较高, 难以普及^[10]。塑料废弃物再生造粒技术存在利用率低、能耗大以及排放物二次污染等问题^[11]。近年来, 利用生物降解塑料废弃物已经成为了环境保护研究的焦点^[12], 而利用昆虫降解塑料废弃物是生物降解中最具吸引力的方法之一^[13-14]。已知可取食塑料的昆虫包括鳞翅目中的印度谷螟(*Plodia interpunctella* Hübner)、粉斑螟(*Ephesia cautella*)和大蜡螟(*Galleria mellonella* L.), 鞘翅目中的杂拟谷盗(*Tribolium confusum*)、谷蠹(*Rhyzopertha dominica*)、烟草甲(*Lasioderma serricorne*)、米象(*Sitophilus oryzae*)、锯谷盗(*Oryzaephilus surinamensis*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、四纹豆象(*Callosobruchus maculatus*)、药材甲(*Stegobium obscurus* L.), 以及等足目中的孔团水虱(*Sphaeroma*)等^[15]。其中对有鞘翅目中的大麦虫(*Zophobas atratus* Fab.)、黄粉虫(*Tenebrio molitor* L.)和黑粉虫(*Tenebrio obscurus* F.), 以及鳞翅目的大蜡螟(*Galleria mellonella* L.)^[16]研究较多。大麦虫、黄粉虫和黑粉虫的游离氨基酸含量较高且无毒^[17], 能作为牲畜饲养过程中优质的氨基酸供体^[18]。

昆虫肠道微生物降解塑料的微生物学机制吸引了国内外学者的广泛关注^[19]。Peng 等^[20]发现黑粉虫幼虫肠道微生物的肠球菌科(*Enterococcaceae*)、螺旋体科(*Spiroplasmataceae*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的丰度变化与其取食 PS 的量有关。Brandon 等^[21]报道黄粉虫分

泌的乳化因子与其肠道微生物协同作用, 增强了对 PS 塑料的降解效率。Yang 等^[22-23]从黄粉虫肠道中分离出降解 PS 的微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp.), 课题组同时利用大庆霉素对肠道细菌进行抑制, 发现饲喂大庆霉素的黄粉虫失去了降解 PS 的能力。Yang 等^[24]发现印度古螟幼虫的肠道食糜可侵蚀并穿透 PE, 并分离出阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)可降解 PE 的细菌, 同时用软电离质谱技术对其释放出的化合物进行检测, 发现了 C₇H₁₀、C₃H₆O₂ 和 C₂₉H₄₈O₄ 等 12 种水溶性子产物。胡亚楠等^[25]在大蜡螟肠道食糜中分离出具有降解 PE 能力的菌株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和 *Enterobacter bugandensis*, 体外培养实验发现, 接种菌株后聚乙烯的 C-H 伸缩震动峰与酯羰基指数产生变化, 说明菌株利用聚乙烯导致了 C-H 键减弱, 从而使聚乙烯表面化学官能团产生了变化。李琛静等^[26]报道饲喂 PE 和 PS 塑料 25 d 后大麦虫不能正常化蛹, 通过凝胶渗透色谱仪(gel permeation chromatography, GPC)测定大麦虫粪便中残留的塑料分子量变化, 发现 PS 的中低分子量物质占比增加, 而 PE 的中高分子量物质占比增加。

根据上述研究结果可推断, 昆虫啃食塑料后, 通过肠道微生物菌群对塑料进行降解, 从而获得生长所必需的碳源和能源。然而取食不同塑料对昆虫生理指标及肠道微生物菌群的组成和动态的影响尚不清楚, 同时对功能菌群与昆虫生长发育之间的关联也尚待了解。因此, 本研究以大麦虫、黑粉虫、黄粉虫和大蜡螟幼虫为研究对象, 研究它们在取食 PS 和 PE 过程中的存活率、死亡率、化蛹率以及体重体长的变化情况, 并采用基因探针通过荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)研究不同时间段昆虫肠道微生物菌群的组成及动态。

1 材料与方

1.1 PS、PE 以及麦麸的来源

PS 塑料泡沫板采购自武汉齐为建筑材料有限公司(材料符合国家标准, 检测数据由湖北一检建设工程质量检测有限公司提供), 规格为 9.5 cm×5 cm×5 cm, 质量约为 3.68 g; PE 透明自封袋采购自浙江名科塑业股份有限公司(材料符合国家标准, 检测数据由国家预包装食品质量监督检验中心提供), 规格为 4 cm×6 cm×0.05 mm, 质量约为 0.16 g; 粗麦麸采购自凤台县锦娟商贸有限公司(主要原料为小麦, 粗蛋白≥11%, 粗纤维<11%, 粗灰分<6%)。

1.2 昆虫来源及其饲养

大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟幼虫均购自北京君和子平科贸有限公司, 在昆明学院农学与生命科学学院植物保护实验室室温(22±2) °C 避光饲养。采购的 4 种幼虫均在 3–4 龄, 饲养盒为 29 cm×20 cm×15 cm 聚苯乙烯硬质塑料盒, 所用饲养盒材质坚硬, 未被昆虫啃食。选取相近体态和有活力的幼虫作为研究对象, 每个培养盒中饲养 200 只。每种幼虫被分为 3 个处理组, 对照组 50 g 粗麦麸, PE 处理组 7 g 聚乙烯透明塑料袋, PS 处理组 7 g 聚苯乙烯泡沫板, 每 7 d 饲喂一次。所用饲喂材料均经过紫外灯进行 3 次灭菌处理, 每次 15 min。实验周期为 28 d, 在 7、14、21、28 d 收集当天的昆虫粪便, 用于 FISH 样品固定实验。黄粉虫、黑粉虫和大麦虫均为拟布甲属仓储害虫^[27], 麦麸是它们最常见的取食材料, 因此本研究选择麦麸作为对照。大蜡螟是以蜂蜡为食的世界性害虫^[28], 麦麸也可作为大蜡螟的食物来源^[29], 为统一 4 种昆虫对照组营养来源, 避免产生误差, 特选用麦麸作为对照。

1.3 昆虫幼虫的生理指标测定

本研究在 7、14、21、28 d 统计 4 种昆虫幼

虫的死亡数、存活数以及化蛹数, 将昆虫幼虫的死尸和蛹挑出培养盒, 防止幼虫吃掉尸体^[30]。每 7 d 更换饲喂材料时, 从 4 种昆虫的每组培养箱中随机挑选 30 只幼虫, 测量体长和体重。昆虫存活率、死亡率和化蛹率按照公式(1–3)计算。

$$\text{存活率(\%)} = \frac{\text{试验结束时存活的幼虫数}}{\text{试验开始时幼虫数}} \times 100^{[29]} \quad (1)$$

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{总死亡虫数}}{\text{试验开始时幼虫数}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{化蛹率(\%)} = \frac{\text{化蛹数}}{\text{试验开始时幼虫数}} \times 100^{[26]} \quad (3)$$

1.4 昆虫幼虫粪便样品的收集和 FISH 样品的固定

无菌条件下收集昆虫粪便, 参照 Amann 等方法进行 FISH 样品固定^[31]。取幼虫粪便样品 2 g, 分装于 2 支 2 mL 离心管中, 一支加入 1 mL 的 50%乙醇(C₂H₅OH)用于固定革兰氏阳性细菌, 另一支加入 1 mL 的 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA, Biosharp)用于固定革兰氏阴性细菌。4 °C 冰箱静置 3 h 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 8 min, 去除上清液后各加入 1 mL 1×PBS 磷酸缓冲液, 混匀后离心去除上清液。50%乙醇固定的样品加入与样品等体积的 50%乙醇, 保存于–20 °C 冰箱备用; PFA 固定的样品加无菌水至 2 mL, 混匀后 4 °C、8 000 r/min 离心 8 min, 去除上清液后, 洗脱重复 3 次, 加入与样品等体积的 50%乙醇保存于–20 °C 冰箱备用。

1.5 昆虫幼虫的肠道微生物组成和丰度测定

1.5.1 FISH 探针的筛选

寡核苷酸探针购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 核苷酸探针采用荧光染料 CY3 或荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)在核酸序列的 5'-末端标记。昆虫肠道微生物主要由细菌和古菌组成^[32], 在 ProbeBase 数据库^[33]中的对可能适用于昆虫肠道微生物菌群的寡核苷酸探针进行了初步筛选, 选择了细菌门水

平探针以及动物肠道中常见功能菌群探针, 古菌则选择了已知动物肠道中常用的门水平探针以及动物肠道中常用的甲烷菌探针。初步筛选出 EUB338I、EUB338II、EUB338III (Bacteria 细菌)、HGC69A (*Actinobacteria* 门)、LGC354abc (*Firmicutes* 门)、GNSB-941+CFX784 (*Chloroflexi* 门)、ALF968 (*Alphaproteobacteria* 纲)、GAM42a (*Gammaproteobacteria* 纲)、Bet42a (*Betaproteobacteria* 纲)、SRB385+SRB385DB (*Desulfovibrionales* 目)、CF319a (*Flavobacteriia* 目)、Erec482 (*Clostridiales* 目)、BAC303 (*Bacteroidales* 科)、Lab (*Lactobacillus* 属)、Ent (*Enterobacteriaceae* 科)、Bif228 (*Bifidobacterium* 属)、Chis150 (*Clostridium* 属)、Clit135 (*Romboutsia* 属)、FPR-1 (*Faecalibacterium prausnitzii* 种)、Bfra602 (*Bacteroides fragilis* 种)、ARCH915

(*Euryarchaeota* 古菌)、MSMX860 (*Methanosarcinales* 目)、MB1174 (*Methanobacteriales* 目)、MG1200b (*Methanomicrobiales* 目)、MS1414 (*Methanosarcinales* 科)、MC1109 (*Methanococcaceae* 科)、MB311 (*Methanobacteriales* 科)、MX825 (*Methanosaeta* spp.属)、Mbr830 (*Methanobrevibacter* 属)、Msp541 (*Methanosphaera* 属)、Rotcl1 (*Methanosaeta concilii* 种)和 Mmi1123 (*Methanomicrobium mobile* 种), 共 30 种探针, 通过 FISH 技术对麦麸、PE 和 PS 三种饲料喂养的 4 种昆虫幼虫混合(1:1:1)粪便样品进行了测定(3 次重复), 最终选择细胞平均丰度 >1% [4',6- 二脒基 -2 苯基 吲 哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色的总菌数]的 FISH 探针作为本研究中使用的探针(表 1), 并在所有 FISH 实验中均采用 NONEUB^[34] 探针作为对照,排除 FISH 中可能存在的假阳性。

表 1 本研究使用的寡核苷酸探针

Table 1 The oligonucleotide probes used in this study

Probe name	Target microorganism	Sequences (5'→3')	Formamide (FA, %)
ARCH915	<i>Euryarchaeota</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	5
Rotcl1	<i>Methanosaeta concilii</i>	CTCCCGGCCTCGAGCCAGAC	40
EUB338I	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0
EUB338II	Bacteria	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0
EUB338III	Bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0
NONEUB	Control probe complementary to EUB338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	0
LGC354a	<i>Firmicutes</i>	TGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354b	<i>Firmicutes</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	35
LGC354c	<i>Firmicutes</i>	CCGAAGATTCCCTACTGC	35
Lbd	<i>Lactobacillus</i>	AAGGATAGCATGTCTGCA	10
Lab2185	<i>Lactobacillus</i>	TGGTGATCCATCGTCAATCAGGTG	10
Lab9057	<i>Lactobacillus</i>	TGAACCGCCTGCACTCGCTTTAC	10
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35
Bet42a	<i>Betaproteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGTTT	35
Ent	<i>Enterobacteriaceae</i>	CCCCCWCTTTGGTCTTGC	30

EUB338IIIIII是 EUB338I、EUB338II和 EUB338III的组合探针; Lab 是 Lbd、Lab2185 和 Lab9057 的组合探针; LGC354abc 是 LGC354a、LGC354b 和 LGC354c 的组合探针

EUB338IIIIII is a combination of probes EUB338I, EUB338II and EUB338III; Lab is a combination probe for Lbd, Lab2185 and Lab9057; LGC354abc is a combination of probes LGC354a, LGC354b and LGC354c, Combination probes are mixed and added at the same time.

1.5.2 FISH 操作步骤

将等量乙醇或 PFA 固定的昆虫粪便样品(约 20 μL)置于 3%明胶涂层的载玻片上,用一片新的与其对应重叠放置,前后拉动 10–15 次,将微生物细胞均匀涂布在两片 1/3 处。为了增加寡核苷酸探针穿透细胞壁的能力,涂有样品的载玻片自然阴干后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱低温处理 5 min,随后放入 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中高温处理 5 min,并重复 3 次。之后采用 CARD-FISH 处理以进一步增加探针的穿透性^[35],阴干后依次浸泡在 50%、80%和 100%乙醇溶液中各脱水 3 min,在无茵且避光环境下将杂化液与 FISH 探针依次加到载玻片上,在 $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内杂化 3 h;杂化后将载玻片置于 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的洗脱液中洗脱 15 min;随后在超纯水中浸洗后阴干。阴干后滴加浓度为 100 μL 0.005 mg/mL 的 DAPI 浸染杂化区 10 min,最后在超纯水中浸洗 3 遍后阴干等待镜检。

1.5.3 显微镜观察与靶标微生物丰度计算

FISH 样品采用荧光显微镜 BX60 (Olympus Corporation 公司)观察。该显微镜配备了特定的荧光激发块,分别用于观测 Cy3 和 FITC 标记的探针杂化样品,以及 DAPI 染色的样品。在 100 \times 的物镜下观察并采集图像,通过 ImageJ 软件^[36]计数功能对拍摄的图像进行计数,用探针点亮的靶标微生物数量除以同一视野下被 DAPI 点亮的微生物数量算出该探针靶标微生物的相对丰度,每组 FISH 探针杂化的微生物菌群的百分比丰度通过 15 个不同视野采集的图像进行计算。

1.6 数据统计与分析

昆虫生理指标及其肠道菌群的丰度数据通过 SPSS 25.0 进行分析,采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)和最小显著性差异(least-significant difference, LSD)两两

比较($P<0.05$)确定处理间差异的显著性,采用皮尔逊(Pearson)相关性分析比较($P<0.05$)生理指标与靶标微生物间相关的显著性。通过 Microsoft Excel 365 进行数据整理,所有作图均使用 R software package v.4.2.3 完成。

2 结果与分析

2.1 昆虫对 PS 和 PE 的取食方式

四种昆虫幼虫均以蛀洞(图 1)的形式取食 PS,以啃食的形式从边缘取食 PE。在饲养过程中发现,所有处理组均产生刺激性臭味,其中 PS 处理组和 PE 处理组臭味大于麦麸组(对照)。黄粉虫和大蜡螟虫在取食 PS 和 PE 之前虫体颜色均为淡黄色,取食 21 d 后虫体颜色较对照组深。相比之下,大麦虫和黑粉虫在各处理组中的虫体颜色变化不明显。

2.2 昆虫生理指标的变化

2.2.1 存活率、死亡率和化蛹率

饲养 28 d 后,与饲喂麦麸的对照相比,饲喂塑料的 4 种昆虫幼虫存活率和化蛹率高低不同(表 2)。饲喂麦麸的大麦虫存活率最高,且未观察到化蛹现象。饲喂 PS 的黄粉虫和黑粉虫存活率比对照组高。大蜡螟中饲喂 PE 的存活率最高。除大麦虫外,其余 3 种昆虫对照组的化蛹率均高于 PE 和 PS 组(表 2)。

2.2.2 体重和体长

在 28 d 饲养过程中取食塑料和麦麸的 4 种昆虫的体重和体长呈不同程度的增长(图 2)。除麦麸组外,体重增长率最高的是黑粉虫 PS 组,每只由 7 d 的(0.07 ± 0.01) g 平均增长至 28 d 的(0.10 ± 0.01) g,增长率为 42.86%。其次是黄粉虫 PE 组(33.33%)、黄粉虫 PS 组(33.33%)、黑粉虫 PE 组(33.33%)、大蜡螟 PS 组(12.50%)、大麦虫 PS 组(8.75%)、大蜡螟 PE 组(8.00%)和大麦虫 PE

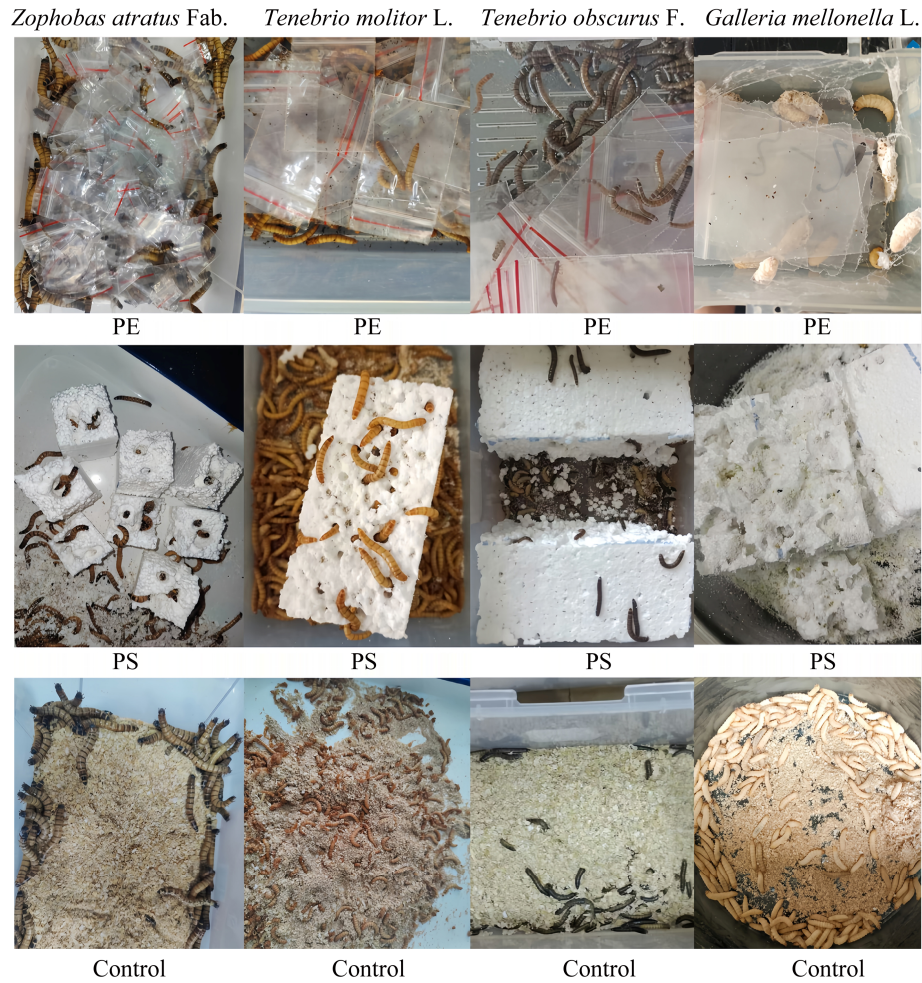


图 1 四种昆虫幼虫分别取食聚乙烯(PE)、聚苯乙烯(PS)和麦麸(control)的图像

Figure 1 Images of larvae of four insects feeding on polyethylene (PE), polystyrene (PS) and wheat bran (control).

表 2 实验结束时(28 d) 4 种昆虫幼虫存活率、死亡率和化蛹率

Table 2 Recovery rate, mortality rate, and pupation rate of four insect larvae at the end of the experiment (28 days)

Insect	Treatment	Mortality rate (%)	Recovery rate (%)	Pupation rate (%)
<i>Zophobas atratus</i> Fab.	Control	14.00±2.13	86.00±5.89	0.00
	PE	43.33±2.16	56.67±4.52	0.00
	PS	18.00±1.78	82.00±6.69	0.00
<i>Tenebrio molitor</i> L.	Control	10.00±1.98	52.75±3.78	37.25±4.34
	PE	11.75±2.66	73.75±5.62	14.50±2.07
	PS	2.75±0.31	85.50±5.47	11.75±2.67
<i>Tenebrio obscurus</i> F.	Control	8.50±1.63	48.50±4.73	43.00±5.95
	PE	49.00±3.87	44.50±4.13	6.50±1.08
	PS	34.50±2.78	50.50±3.05	15.00±1.36
<i>Galleria mellonella</i> L.	Control	46.67±5.48	37.33±4.86	16.00±1.55
	PE	54.00±4.76	41.33±4.81	4.67±0.67
	PS	59.33±4.75	30.00±2.56	10.67±1.47

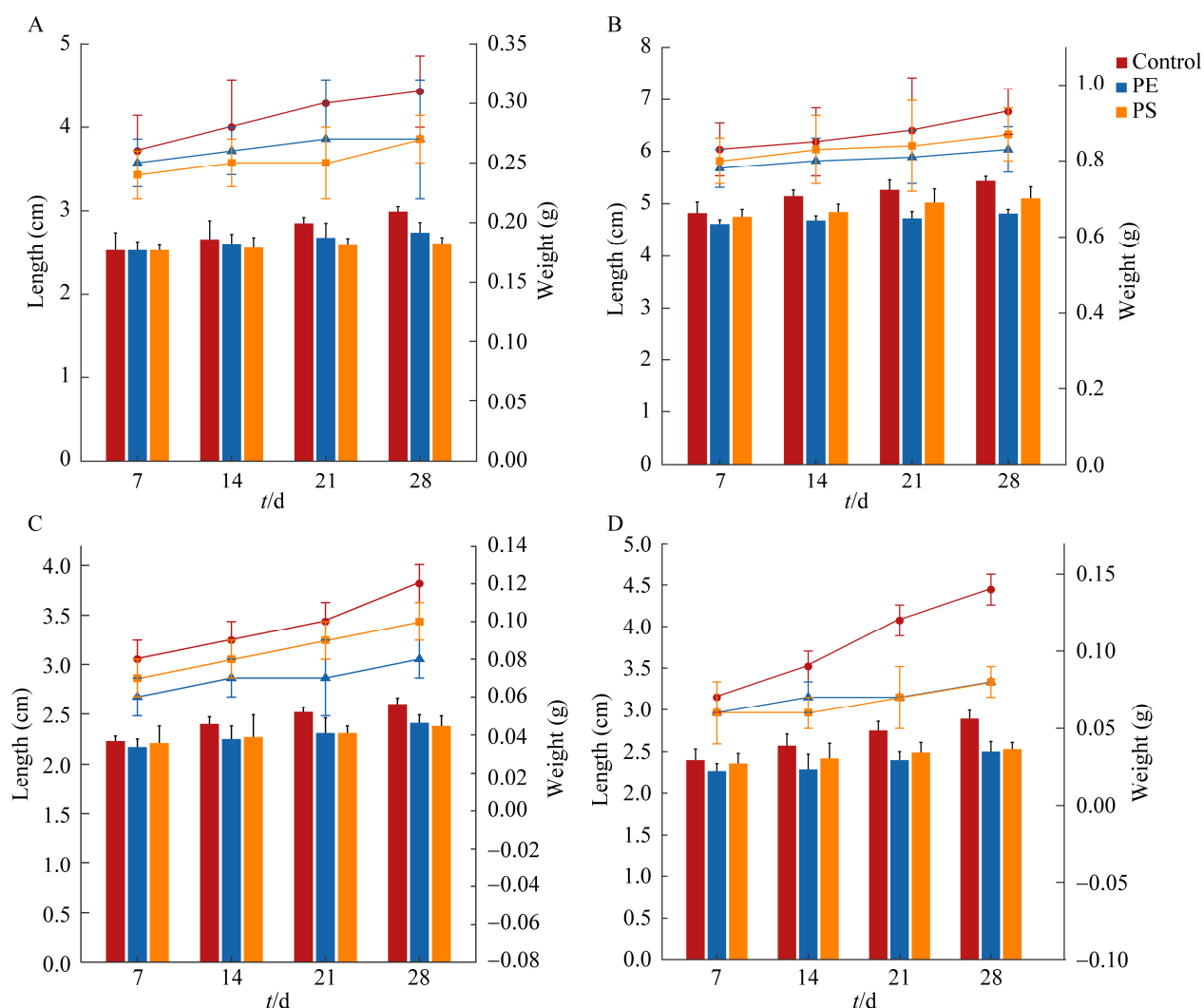


图2 四种昆虫幼虫体重和体长随时间(7、14、21和28 d)的变化趋势 柱状图为昆虫体长变化趋势,折线图为昆虫体重变化趋势. A、B、C和D分别表示大蜡螟、大麦虫、黑粉虫和黄粉虫

Figure 2 Changes in body weights and lengths of four insect larvae over time (7 d, 14 d, 21 d, and 28 d). Bar graphs show changes in insect body lengths and line graphs show changes in insect body weights; A, B, C and D denote *Galleria mellonella* L., *Zophobas atratus* Fab., *Tenebrio obscurus* F., and *Tenebrio molitor* L., respectively.

组(6.41%)。除麦麸组外,体长增长率最高的是黑粉虫 PE 组,每只由 7 d 的(2.17±0.08) cm 增长至 28 d 的(2.41±0.08) cm,增长率为 11.06%,其次是黄粉虫 PE 组(10.13%)、大蜡螟 PE 组(8.30%)、黑粉虫 PS 组(7.69%)、大麦虫 PS 组(7.37%)、黄粉虫 PS 组(7.20%)、大麦虫 PE 组(4.34%)、大蜡螟 PS 组(3.16%)。实验结束时,大麦虫和黄粉虫 PE 组和 PS 组的体重均显著

($P < 0.05$)低于对照组,取食塑料 PE 和 PS 后的大麦虫体重无显著($P > 0.05$)差异。黑粉虫 PE 组体重显著($P < 0.05$)低于 PS 和对照组,而大蜡螟 PE 组体重与 PS 组无显著($P > 0.05$)差异。

2.3 取食塑料对昆虫肠道微生物群落组成的影响

FISH 结果表明,饲喂 PS、PE 和麦麸的昆虫肠道中细菌与古菌为优势菌群。细菌与古菌

占大麦虫肠道总菌数的 86.46%–95.21%，黄粉虫肠道的 79.49%–82.15%，黑粉虫肠道的 75.45%–90.85%，大蜡螟肠道的 89.99%–91.99%。肠道微生物群落主要由广古菌门的古菌(图 3A) (平均丰度 9.99%–58.05%)以及厚壁菌门(图 3D) (平均丰度 16.98%–54.93%)，变形菌门的 β -

形菌纲(图 3B) (平均丰度 5.91%–39.34%)和 γ -变形菌纲(图 3C) (平均丰度 4.62%–30.86%)的细菌组成。其中鬃毛甲烷菌(图 3F)占广古菌门的 2.27%–22.45%，肠杆菌和乳杆菌(图 3E)分别占厚壁菌门细菌的 1.32%–20.21%和 3.39%–26.81%。

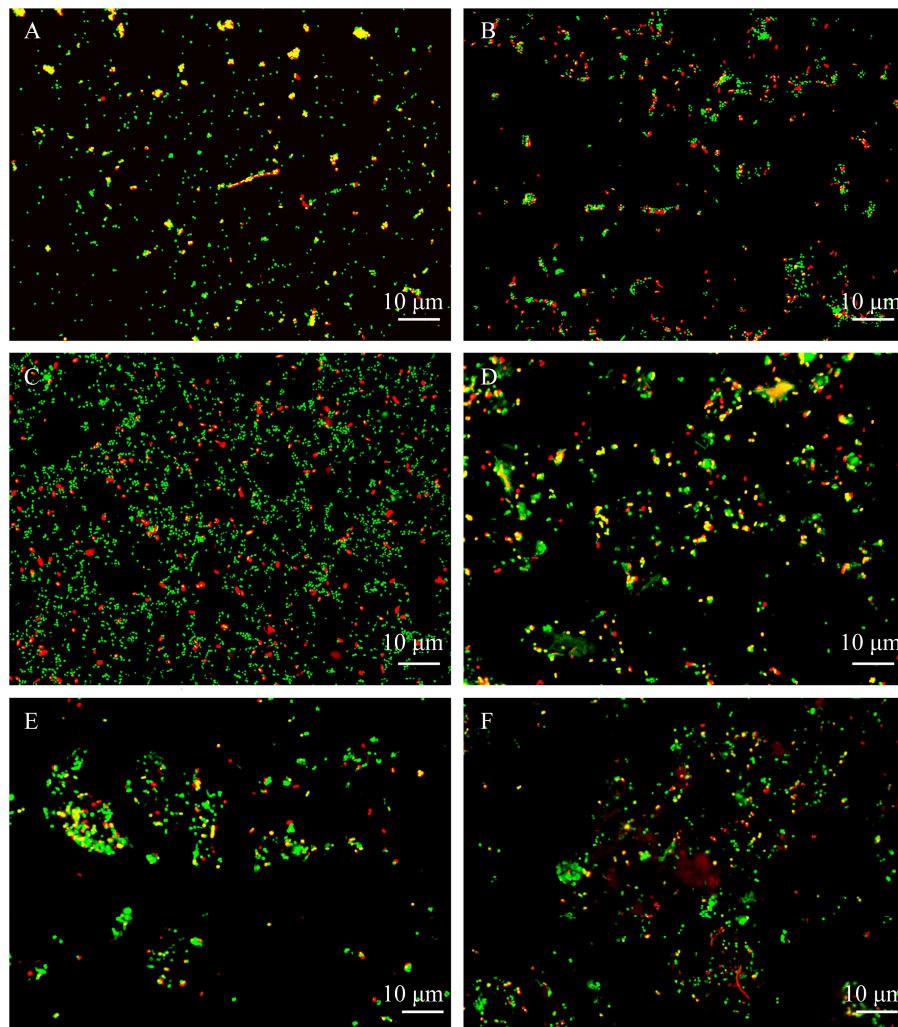


图 3 昆虫幼虫肠道菌群荧光镜检重叠图像 A、B、C、D、E 和 F 是使用不同寡核苷酸探针进行荧光原位杂交的重叠图像，黄色细胞是由与单个 FISH 探针杂交的细胞(红色)和同一显微镜视野中 DAPI 染色的细胞(绿色)重叠而成。A: ARCH915. B: Bet42a. C: GAM42a. D: LGC354abc. E: Lab. F: Rotcl1

Figure 3 Overlapping images of fluorescence *in situ* hybridization of the intestinal microflora of the insect larvae. A, B, C, D, E and F are overlapping images of fluorescence in situ hybridization using different oligonucleotide probes, in each image the yellow-colored cells are overlapped from those hybridized with the individual FISH probes (red-colored) and with the DAPI-stained cells (green-colored) in the same microscopic field. A: ARCH915. B: Bet42a. C: GAM42a. D: LGC354abc. E: Lab. F: Rotcl1.

从饲喂麦麸改为单一的 PE 或 PS 对昆虫肠道微生物主要菌群影响的程度不同,影响的时间不同(图 4、图 5)。与麦麸对照组相比,饲喂 PE 的大麦虫肠道中厚壁菌门(从 26.45%升至 50.88%)和 γ -变形菌纲(从 4.62%升至 10.72%)在 7 d 时显著($P<0.05$)升高,乳杆菌在 14 d 时显著降低(从 22.69%降至 4.20%),广古菌门(从 9.99%升至 23.46%)和肠杆菌(从 3.66%升至 8.05%)在 28 d 时显著($P<0.05$)升高(图 4A1, 图 5A1)。饲喂 PS 的大麦虫肠道中 β -变形菌纲(从 19.46%升至 35.64%)和鬃毛甲烷菌(从 2.27%升至 10.76%)在 21 d 时显著($P<0.05$)升高,而厚壁菌门(从

18.88%降至 16.90%)则显著($P<0.05$)降低(图 4A2, 图 5A2)。黄粉虫肠道中, PE 组乳杆菌(15.42%升至 17.43%),鬃毛甲烷菌(从 14.22%升至 18.42%)和肠杆菌(从 8.23%升至 16.96%)在 14 d 时显著($P<0.05$)升高(图 5B1),而广古菌门(从 36.23%降至 19.83%)显著($P<0.05$)降低,21 d 时的肠杆菌(11.52%)显著($P<0.05$)高于对照组(4.16%),而 28 d 的广古菌门(13.92%)则显著($P<0.05$)低于对照组(34.80%) (图 4B1, 图 5B1)。饲喂 PS 在 7 d 时显著($P<0.05$)升高了黄粉虫肠道中的肠杆菌(从 2.56%升至 7.27%),在 14 d 时显著($P<0.05$)升高了 γ -变形菌纲(从 14.37%升至

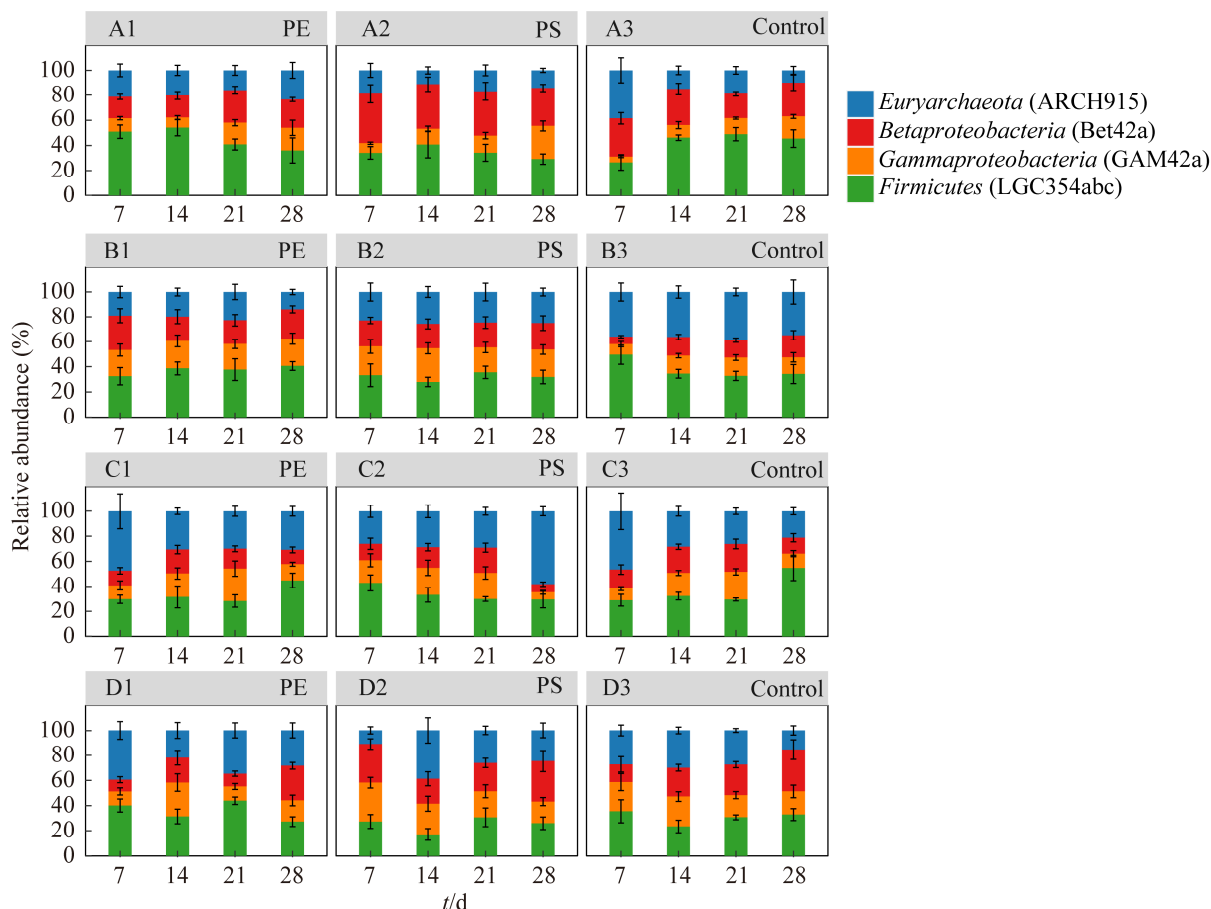


图 4 四种昆虫幼虫水平肠道菌群的组成和变化 A1–A3、B1–B3、C1–C3 和 D1–D3 分别表示大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟

Figure 4 Phylum level composition and dynamics of gut microbiome of four insect larvae. A1–A3, B1–B3, C1–C3 and D1–D3 denote *Zophobas atratus* Fab., *Tenebrio molitor* L., *Tenebrio obscurus* F., and *Galleria mellonella* L., respectively.

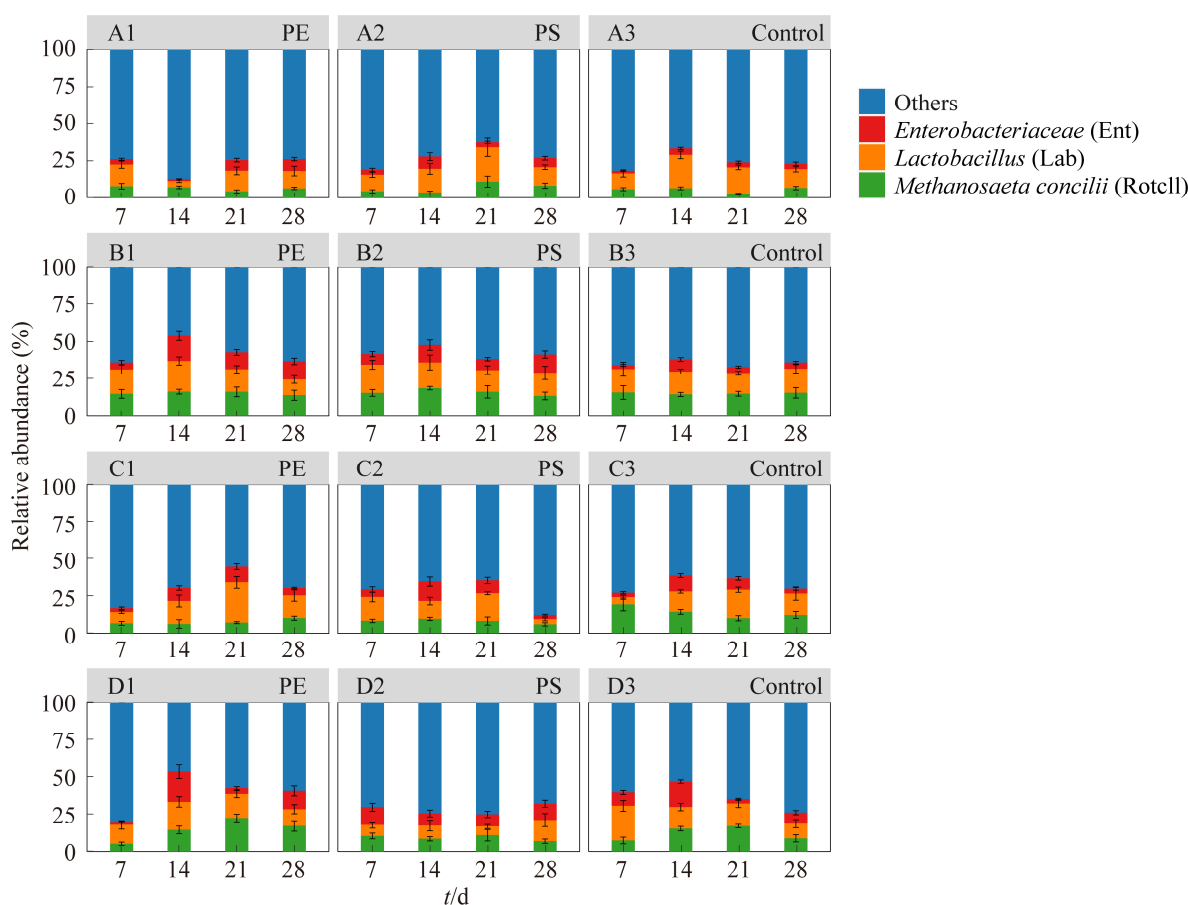


图5 四种昆虫幼虫科肠道功能菌群的组成和变化 A1–A3、B1–B3、C1–C3 和 D1–D3 分别表示大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟

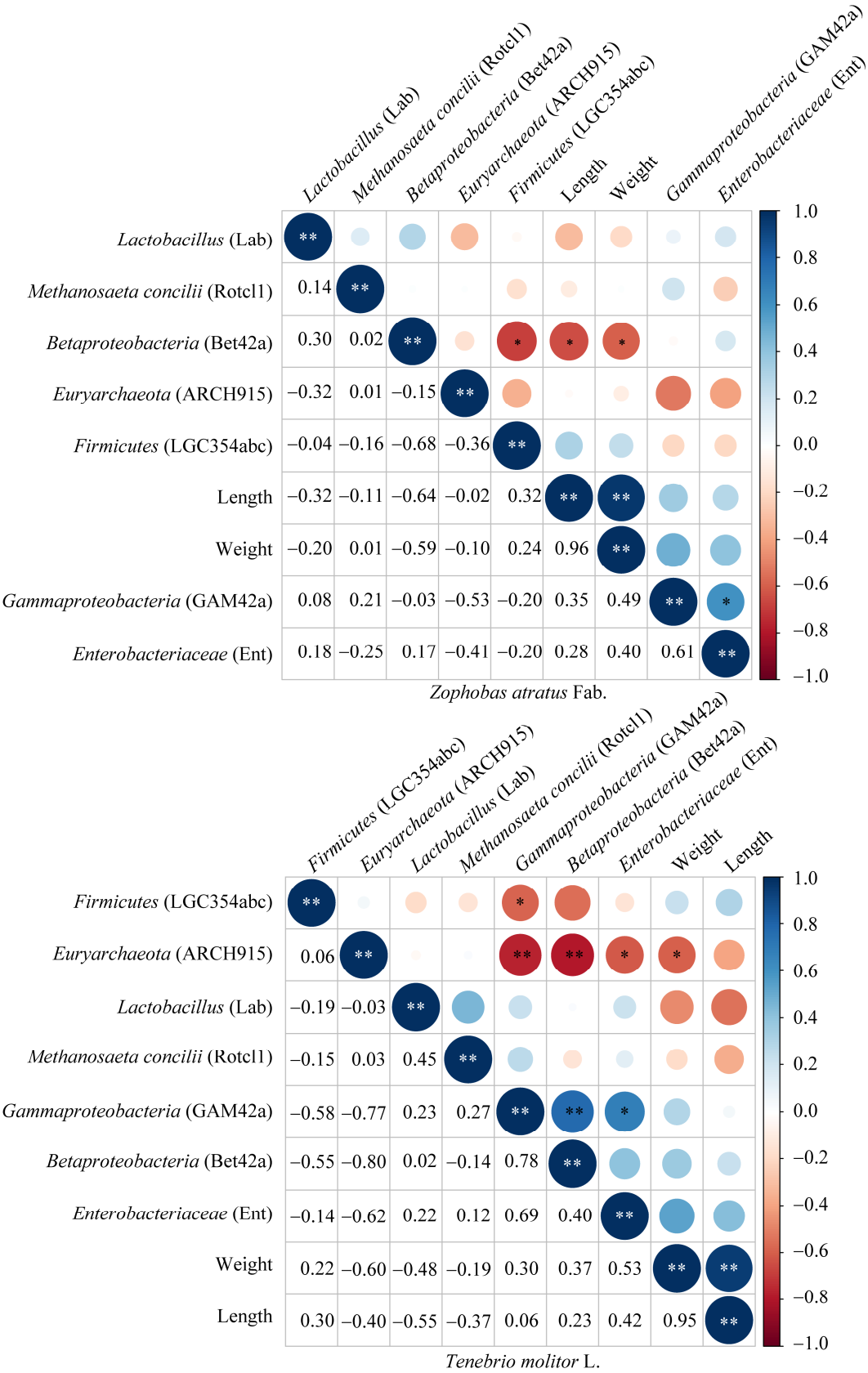
Figure 5 Composition and dynamics of the functional microflora in the guts of four insect larvae. A1–A3, B1–B3, C1–C3 and D1–D3 denote *Zophobas atratus* Fab., *Tenebrio molitor* L., *Tenebrio obscurus* F., and *Galleria mellonella* L., respectively.

26.81%)和鬃毛甲烷菌(从 14.22%升至 18.42%)的丰度(图 4B2, 图 5B2)。饲喂 PE 对黑粉虫肠道菌群的影响较小, 只有鬃毛甲烷菌(6.24%)在 14 d 时显著($P<0.05$)低于对照组(14.35%) (图 5C1)。饲喂 PS 在 7 d 时显著($P<0.05$)升高了黑粉虫肠道中 γ -变形菌纲(从 9.35%升至 18.11%)和乳杆菌(从 4.80%升至 15.90%)的丰度, 在 28 d 时显著($P<0.05$)升高了广古菌门(从 21.10%升至 58.05%)的丰度, 同时显著($P<0.05$)降低了厚壁菌门(从 54.93%降至 29.70%)和鬃毛甲烷菌(从 12.25%降至 6.01%)的丰度(图 4C2, 图 5C2)。饲喂 PE 在 21 d 时显著($P<0.05$)降低了大蜡螟肠道 β -变形菌纲(从 24.24%降至 10.14%)的丰度, 在

28 d 显著($P<0.05$)升高了广古菌门(从 15.45%升至 28.43%)的丰度(图 4D1)。饲喂 PS 显著($P<0.05$)降低了大蜡螟肠道 7 d 乳杆菌(从 23.41%降至 7.40%)的丰度(图 5D2)。

2.4 昆虫肠道微生物菌群与体重体长的相关性分析

通过 Pearson 分析对 4 种昆虫幼虫的体重、体长以及肠道微生物菌群的丰度进行了相关性分析, 结果表明(图 6), 大麦虫的体重和体长与 β -变形菌纲均存在显著负相关, 黄粉虫体重与广古菌门存在显著负相关($P<0.05$), 而大蜡螟和黑粉虫的体重、体长与其肠道微生物菌群无显著相关性($P>0.05$)。



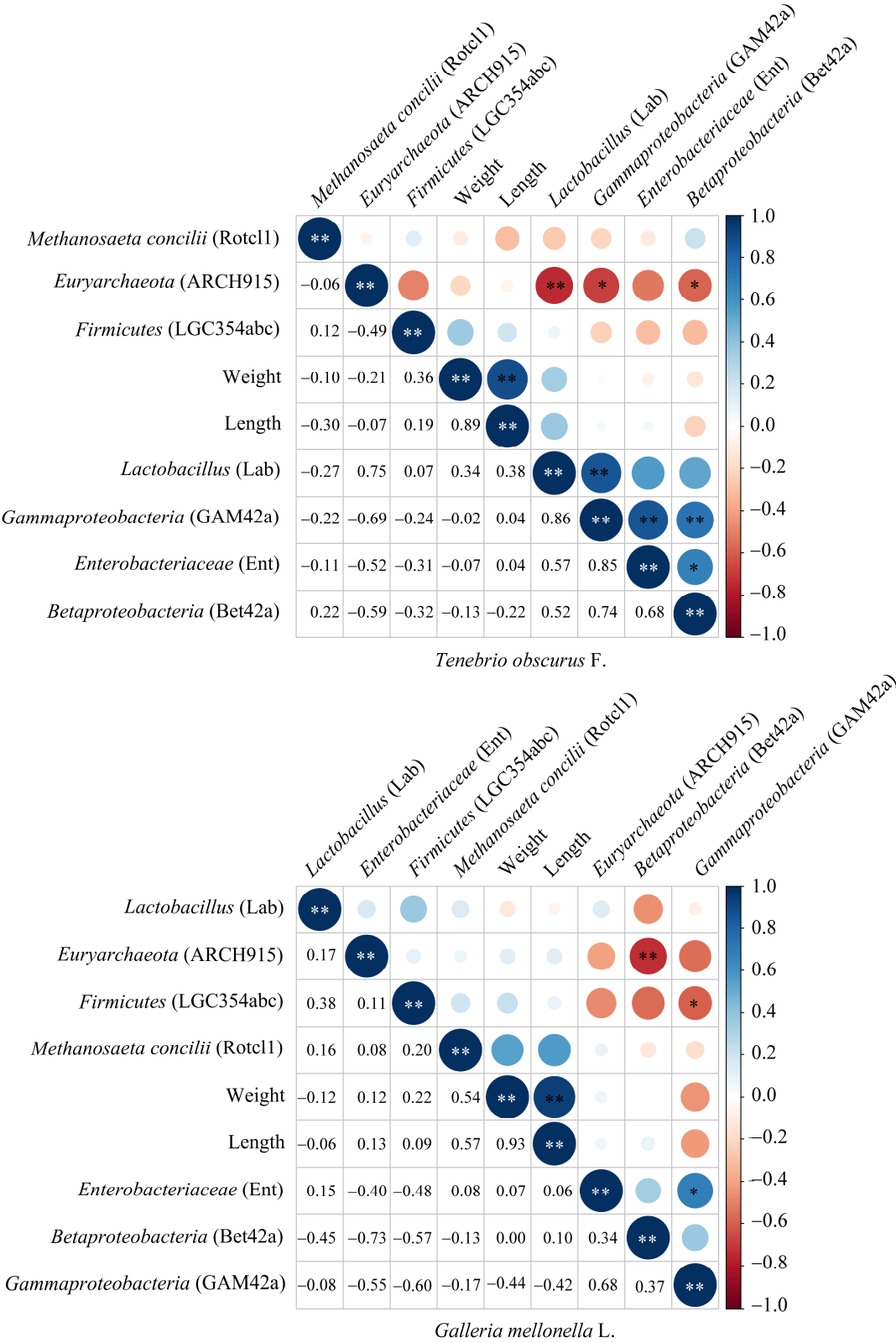


图 6 昆虫体重、体长和肠道菌群的相关性分析
Figure 6 Correlation analyses between body weights, body lengths of the four insects and their gut microflora.

3 讨论

3.1 昆虫取食塑料后肠道微生物群落的组成

昆虫肠道微生物菌群在塑料降解中起重要作用。昆虫啃食塑料后,塑料碎片进入昆虫肠道,而肠道中的微生物菌群降解塑料碎片,产生短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA), SCFA 提供了昆虫所需的碳源和能源^[37]。在饲养过程中观察到昆虫对 PS 和 PE 的取食方式与李玮等^[38]、唐瑞等^[39]及丁梦琪^[40]的报道相符。本研究采用 FISH 技术对取食 PS、PE 和麦麸的大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟幼虫肠道微生物群落的组成和丰度进行了多个时间点(7、14、21 和 28 d)分析,发现广古菌门的古菌是 4 种昆虫肠道中的优势菌群,占不同时间点昆虫肠道总菌数的 9.99%–58.05%,特别是在饲喂 PS 的黑粉虫肠道中 28 d 高达 58.05% (图 5C2),而同一时间点的细菌丰度仅为 37.58%,说明古菌也是塑料降解昆虫肠道微生物群落中的主要菌群。王子君^[41]报道,黄粉虫在啃食 PS 后产生了丙酮酸和乙酸,推测昆虫取食塑料后产生的乙酸可能被甲烷菌利用而产生甲烷^[42]。本研究在饲喂塑料的昆虫肠道中发现了鬃毛甲烷菌,该菌利用乙酸作为能源和碳源生产甲烷^[43],初步验证了王子君^[41]的推测,但是在本研究中鬃毛甲烷菌只占广古菌门古菌总数的 22.72%–38.67%,广古菌门绝大部分是甲烷菌^[44],推测还存在其他的甲烷菌,但它们的组成和代谢特征还有待研究。本研究中除古菌外,厚壁菌门和变形菌门的细菌也是昆虫肠道中的优势菌群,与张诗焱等^[45]、Urbanek 等^[46]和陈冠舟等^[47]采用 16S rRNA 基因高通量测序对取食 PS 的黄粉虫肠道微生物群落研究的结果一致。

饲喂单一的 PE 和 PS 对 4 种昆虫肠道中主要微生物菌群丰度的影响不同。影响的时间不

同,例如 PE 对大麦虫肠道菌群在第 7 天产生显著影响,而 PS 的对肠道菌群的影响在第 21 天才观察到。影响的菌群不同,黄粉虫中 PS 显著影响广古菌门、厚壁菌门、 γ -变形菌纲、乳杆菌和鬃毛甲烷菌,而 PE 仅影响了鬃毛甲烷菌。然而昆虫不同,PE 和 PS 影响的微生物菌群、影响的时间均存在显著差异,说明昆虫肠道微生物群落的组成非常复杂。基于饲喂 PE 和 PS 昆虫早期(第 7 天)微生物菌群丰度的变化无法判定可能直接参与塑料降解的微生物菌群,因为不同昆虫微生物菌群丰度的变化各异,甚至有些昆虫(如黄粉虫和大蜡螟)的微生物菌群丰度并未发生显著变化。这是因为目前对降解塑料的昆虫肠道微生物菌群的组成,特别是降解塑料的微生物菌群的组成还缺乏了解,还未能设计出以塑料降解菌群为靶标的特异性的基因探针,因此加强昆虫肠道微生物菌群的纯培养及其功能研究很有必要。

3.2 取食塑料对昆虫幼虫的生长指标的影响

目前,虽然使用单一塑料作为碳源饲喂昆虫以实现塑料降解是可行的,但其效率仍有待提高。本研究发现以单一的 PS 和 PE 分别饲喂 4 种昆虫幼虫,虽然昆虫体重和体长均有所增加,但速度慢于饲喂麦麸的对照组,这与张诗焱等^[45]和陈耀等^[48]所得结论一致。此外,本研究发现在饲喂 PS 的 4 种昆虫中黄粉虫的存活率较高,而殷涛等^[49]对比了取食 PS、PE 和聚丙烯发泡板(polypropylene, PP)大麦虫和黄粉虫化蛹率后发现,大麦虫幼虫期较长且化蛹率低,本研究结果也表明在 28 d 的饲养中大麦虫无化蛹现象,与其他 3 种昆虫相比幼虫期最长,说明可取食降解塑料的周期也最长。研究表明在未成龄幼虫时(实验开始前期)少量多次投喂青菜叶、瓜果麦麸、玉米秸秆和水稻秸秆等,对后期发育化蛹有利^[40,50],因此,为了有效地提高昆虫取食塑料的效率,在利用昆虫降解塑料时,应选择存活率较

高的黄粉虫或者幼虫期较长的大麦虫,同时添加一定比例的辅食提高昆虫的存活率,从而有效提高昆虫取食塑料的效率。

此外,本研究观察到黄粉虫和大蜡螟在取食塑料后体色加深。Evison 等^[51]发现黄粉虫的体色变化与其表皮结构及抗真菌的能力相关,体色较深时,表皮更厚且孔隙更少,与免疫相关的酚氧化酶活性更高。张诗焱等^[45]也观察到类似的现象,并通过 KEGG 功能预测发现取食 PS 塑料后黄粉虫体内与氨基酸代谢相关基因的丰度升高。

3.3 昆虫幼虫的生长指标与肠道微生物菌群丰度的相关性

本研究发现,大麦虫的体重和体长的变化与 β -变形菌的丰度变化呈显著负相关($P<0.05$)。 β -变形菌包含了许多病原菌,例如伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)^[52],在植物害虫生物防治上被广泛研究^[53],本研究中 β -变形菌丰度会随大麦虫取食塑料的时间显著增加,因而这可能是导致其肠道内 β -变形菌丰度变化与体重和体长的变化呈显著负相关($P<0.05$)的原因。黄粉虫体重的变化与肠道中的广古菌门丰度变化呈显著($P<0.05$)负相关,广古菌门绝大部分是甲烷菌^[44],甲烷菌(例如鬃毛甲烷菌)与宿主(昆虫)竞争利用塑料降解产生的短链脂肪酸,因此造成了黄粉虫体重的降低。然而黑粉虫和大蜡螟的体重、体长的变化与肠道微生物种群的变化无显著($P>0.05$)相关,说明饲喂 PS 和 PE 的黑粉虫及大蜡螟幼虫,其肠道微生物菌群丰度的变化对它们的体重和体长无显著影响。

4 结论

(1) 除细菌厚壁菌门和变形菌门外,古菌广古菌门也是啃食 PE 和 PS 的大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟幼虫肠道中的主要菌群。

(2) 大麦虫、黄粉虫、黑粉虫和大蜡螟幼虫肠道中的主要微生物菌群的丰度随时间呈动态变化,并受塑料类型以及昆虫种类的影响。

(3) 大麦虫和黄粉虫的体重和体长与肠道微生物菌群显著相关,而黑粉虫和大蜡螟与肠道微生物菌群无显著相关性。

作者贡献声明

胡佳辰: 论文撰写与论文修改,完成实验研究与数据整理;刘光玲: 完成实验研究与数据整理;黄石涛: 完成实验研究与数据整理;李子俊: 完成实验研究与数据整理;张洪波: 实验研究指导,修改论文;冯俊娜: 完成实验结果统计分析与作图;熊德玉: 完成实验前期过程中 FISH 样品采集工作(该作者为本课题组原有成员,本科毕业后在暑假期间帮助完成课题实验内容);张瑜瑜: 研究课题监管与指导,审阅论文;莫丽玲: 研究课题监管与指导,审阅论文;孔云虹: 实验设计验证与核实,获取研究资金,审阅与修订论文;夏云: 设计实验方案,获取研究资金,审阅与修订论文。

参考文献

- [1] 廖正品. 中国塑料工业发展现状与未来[J]. 塑料工业, 2002, 30(4): 1-6, 9.
LIAO ZP. Present situation and future of development of Chinese plastics industry[J]. China Plastics Industry, 2002, 30(4): 1-6, 9 (in Chinese).
- [2] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3: 1-5.
- [3] HOANG TC. Plastic pollution: where are we regarding research and risk assessment in support of management and regulation?[J]. Integrated Environmental Assessment and Management, 2022, 18(4): 851-852.
- [4] 朱光泽, 周炜, 夏志东, 王晓露, 李炳毅, 郭福, 吴玉锋. 有机废弃物热解分析技术现状与展望[J]. 中国塑料, 2023, 37(11): 101-116.
ZHU GZ, ZHOU W, XIA ZD, WANG XL, LI BY, GUO

- F, WU YF. Current situation and prospect of pyrolysis analysis technology of organic wastes[J]. *China Plastics*, 2023, 37(11): 101-116 (in Chinese).
- [5] GARCIA JM, ROBERTSON ML. The future of plastics recycling[J]. *Science*, 2017, 358(6365): 870-872.
- [6] 张远, 陶树明, 邱小云, 金可默, 胡树文. 生物降解塑料及其性能评价方法研究进展[J]. *化工进展*, 2010, 29(9): 1666-1674.
- ZHANG Y, TAO SM, QIU XY, JIN KM, HU SW. Research progress in biodegradable plastics and their properties characterization[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2010, 29(9): 1666-1674 (in Chinese).
- [7] 苗开珍, 孟娇龙, 姜雪峰. 塑料废弃物污染及降解的研究进展[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2023(1): 170-176.
- MIAO KZ, MENG JL, JIANG XF. Research progress on pollution and degradation of plastic waste[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2023(1): 170-176 (in Chinese).
- [8] 王东利, 徐晓白, 储少岗. 塑料废物焚烧与持久性有机物环境污染[J]. *环境与健康杂志*, 2003, 20(4): 250-252.
- WANG DL, XU XB, CHU SG. Waste plastics incineration and environmental pollution caused by persistent organic pollutants[J]. *Journal of Environment and Health*, 2003, 20(4): 250-252 (in Chinese).
- [9] 樊丽华, 马沛生, 梁英华. 聚苯乙烯废塑料的化学回收[J]. *石油化工*, 2004, 33(12): 1198-1203.
- FAN LH, MA PS, LIANG YH. Chemical recycling of waste polystyrene[J]. *Petrochemical Technology*, 2004, 33(12): 1198-1203 (in Chinese).
- [10] 宋力, 赵晶晶, 王战勇, 苏婷婷. 生物降解塑料降解技术及其前景展望[J]. *塑料*, 2020, 49(5): 88-91, 120.
- SONG L, ZHAO JJ, WANG ZY, SU TT. Biodegradable plastic degradation technology and the prospects[J]. *Plastics*, 2020, 49(5): 88-91, 120 (in Chinese).
- [11] 陈勇. 废塑料无害化回收利用发展现状及趋势[J]. *现代化工*, 2022, 42(9): 23-26.
- CHEN Y. Development status and trend of harmless recycling of spent plastics[J]. *Modern Chemical Industry*, 2022, 42(9): 23-26 (in Chinese).
- [12] 叶焱, 孟祥泽, 唐国烁, 金广轩, 杨睿, 谢续明. 高分子材料的生物降解性能表征[J]. *高分子学报*, 2023, 54(9): 1363-1384.
- YE Y, MENG XZ, TANG GS, JIN GX, YANG R, XIE XM. Characterization techniques of polymer biodegradation properties[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2023, 54(9): 1363-1384 (in Chinese).
- [13] 陈丹, 黄兴元, 汪朋, 梁雄, 周献华. 废旧塑料回收利用的有效途径[J]. *工程塑料应用*, 2012, 40(9): 92-94.
- CHEN D, HUANG XY, WANG P, LIANG X, ZHOU XH. Recycling effective ways of waste plastics[J]. *Engineering Plastics Application*, 2012, 40(9): 92-94 (in Chinese).
- [14] 张李婷, 张博, 许维东, 崔中利, 曹慧. 聚乙烯塑料生物降解研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(5): 1949-1962.
- ZHANG LT, ZHANG B, XU WD, CUI ZL, CAO H. Polyethylene biodegradation: current status and perspectives[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(5): 1949-1962 (in Chinese).
- [15] 赵晶晶, 冯雅郡, 朱潇婷, 朴金雪, 苏婷婷, 王战勇. 石油基塑料的昆虫降解研究进展[J]. *应用化工*, 2023, 52(7): 2207-2211, 2217.
- ZHAO JJ, FENG YJ, ZHU XT, PIAO JX, SU TT, WANG ZY. Review progress of insects feeding and degrading plastics[J]. *Applied Chemical Industry*, 2023, 52(7): 2207-2211, 2217 (in Chinese).
- [16] 郭鸿钦, 罗丽萍, 杨宇航, 王宇萌, 陆遥力, 赵鑫, 胡筱敏. 利用昆虫取食降解塑料研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(6): 1546-1553.
- GUO HQ, LUO LP, YANG YH, WANG YM, LU YL, ZHAO X, HU XM. Research progress on plastic degradation by worms[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(6): 1546-1553 (in Chinese).
- [17] 沈叶红. 黄粉虫肠道菌的分离和取食塑料现象的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2011.
- SHEN YH. Isolation of intestinal bacteria from *T. molitor* L and study on the phenomenon of plastic degradation[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2011 (in Chinese).
- [18] 石冬冬, 田园, 范志影, 张萍, 刘庆生, 马书宇. 3种拟步甲科昆虫幼虫的游离氨基酸分析[J]. *饲料研究*, 2014(7): 53-57.
- SHI DD, TIAN Y, FAN ZY, ZHANG P, LIU QS, MA SY. Analysis of free amino acids in larvae of three species of Tenebrionidae[J]. *Feed Research*, 2014(7): 53-57 (in Chinese).

- [19] 刁晓倩, 翁云宣, 付焯, 周迎鑫. 生物降解塑料应用及性能评价方法综述[J]. 中国塑料, 2021, 35(8): 152-161.
- DIAO XQ, WENG YX, FU Y, ZHOU YX. Review of applications and performance evaluation methods of biodegradable plastics[J]. China Plastics, 2021, 35(8): 152-161 (in Chinese).
- [20] PENG BY, SU YM, CHEN ZB, CHEN JB, ZHOU XF, BENBOW ME, CRIDDLE CS, WU WM, ZHANG YL. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio Molitor*) Mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae)[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(9): 5256-5265.
- [21] BRANDON AM, GARCIA AM, KHLSTOV NA, WU WM, CRIDDLE CS. Enhanced bioavailability and microbial biodegradation of polystyrene in an enrichment derived from the gut microbiome of *Tenebrio molitor* (mealworm larvae)[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(3): 2027-2036.
- [22] YANG Y, YANG J, WU WM, ZHAO J, SONG YL, GAO LC, YANG RF, JIANG L. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 1. chemical and physical characterization and isotopic tests[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12080-12086.
- [23] YANG Y, YANG J, WU WM, ZHAO J, SONG YL, GAO LC, YANG RF, JIANG L. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. role of gut microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12087-12093.
- [24] YANG J, YANG Y, WU WM, ZHAO J, JIANG L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(23): 13776-13784.
- [25] 胡亚楠, 贺旭, 亚森·沙力, 罗明, 张宇宏, 张帅. 大蜡螟和黄粉虫肠道菌中聚乙烯地膜降解细菌的筛选及其降解性能[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4029-4041.
- HU YN, HE X, YASEN·SHALI, LUO M, ZHANG YH, ZHANG S. Screening of polyethylene film-degrading bacteria from gut microbiota of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4029-4041 (in Chinese).
- [26] 李琛静, 王哲, 张雅林. 大麦虫幼虫取食塑料的研究[J]. 应用昆虫学报, 2022, 59(1): 93-103.
- LI SJ, WANG Z, ZHANG YL. Research on the consumption and degradation of plastics by *Zophobas atratus* larvae[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2022, 59(1): 93-103 (in Chinese).
- [27] 任国栋, 李雪. 世界储藏物拟步甲分类进展[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2020, 40(1): 49-56.
- REN GD, LI X. Advances in classification of the storage tenebrionid beetles in the world[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2020, 40(1): 49-56 (in Chinese).
- [28] 罗丽林, 杨广明, 龙立炎, 王兴红, 黄振兴, 乙天慈, 罗雪丹, 刘曼. 温度对大蜡螟生长发育和繁殖的影响[J]. 植物保护学报, 2022, 49(2): 644-653.
- LUO LL, YANG GM, LONG LY, WANG XH, HUANG ZX, YI TC, LUO XD, LIU M. Effects of temperature on the development and reproduction of the greater wax moth, *Galleria mellonella*[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(2): 644-653 (in Chinese).
- [29] 赵鑫, 罗丽萍, 王宇萌, 郭鸿钦. 大麦虫取食塑料影响因素及肠道功能菌群探究[J]. 东北大学学报(自然科学版), 2021, 42(7): 1019-1024.
- ZHAO X, LUO LP, WANG YM, GUO HQ. Research on influencing factors of polystyrene consumption by *Zophobas atratus* larvae, and gut core functional microbiome[J]. Journal of Northeastern University (Natural Science), 2021, 42(7): 1019-1024 (in Chinese).
- [30] YANG SS, DING MQ, ZHANG ZR, DING J, BAI SW, CAO GL, ZHAO L, PANG JW, XING DF, REN NQ, WU WM. Confirmation of biodegradation of low-density polyethylene in dark- versus yellow-mealworms (larvae of *Tenebrio obscurus* versus *Tenebrio molitor*) via gut microbe-independent depolymerization[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 789: 147915.
- [31] AMANN RI, BINDER BJ, OLSON RJ, CHISHOLM SW, DEVEREUX R, STAHL DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(6): 1919-1925.
- [32] ENGEL P, MORAN NA. The gut microbiota of insects -diversity in structure and function[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 699-735.
- [33] GREUTER D, LOY A, HORN M, RATTEI T. probeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes and primers: new features

- 2016[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D586-D589.
- [34] WALLNER G, AMANN R, BEISKER W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms[J]. Cytometry, 1993, 14(2): 136-143.
- [35] RAMM J, LUPU A, HADAS O, BALLOT A, RÜCKER J, WIEDNER C, SUKENIK A. A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of cyanobacterial akinetes in lake sediments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(1): 23-36.
- [36] XIA Y, KONG YH, SEVIOUR R, YANG HE, FORSTER R, VASANTHAN T, McALLISTER T. *In situ* identification and quantification of starch-hydrolyzing bacteria attached to barley and corn grain in the rumen of cows fed barley-based diets[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(8): fiv077.
- [37] ZHENG H, POWELL JE, STEELE MI, DIETRICH C, MORAN NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(18): 4775-4780.
- [38] 李玮, 王丹丹, 庞诗琪, 陈大印, 王洪凤, 解志红, 赵志国. 大麦虫及其肠道微生物对聚乙烯的生物降解[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1422-1431.
- LI W, WANG DD, PANG SQ, CHEN DY, WANG HF, XIE ZH, ZHAO ZG. Biodegradation of polyethylene by *Zophobas atratus* and its gut microorganisms[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1422-1431 (in Chinese).
- [39] 唐瑞, 林佳倚, 劳乔斌, 徐梓锐, 谭梓铭, 吴正伟. 取食聚乙烯微塑料对大蜡螟生长发育的影响[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(23): 93-96.
- TANG R, LIN JY, LAO QB, XU ZR, TAN ZM, WU ZW. Effect of feeding on polyethylene microplastics on the growth and development of *Galleria mellonella*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(23): 93-96 (in Chinese).
- [40] 丁梦琪. 黄粉虫和黑粉虫幼虫降解聚乙烯效能的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2021.
- DING MQ. Polyethylene-degradation capacity in dark-versus yellow-mealworms (larvae of *Tenebrio obscurus* versus *Tenebrio molitor*)[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2021 (in Chinese).
- [41] 王子君. 黄粉虫幼虫啃食聚苯乙烯泡沫塑料的肠道组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学硕士学位论文, 2021.
- WANG ZJ. Study on intestinal multi-omics of *Tenebrio molitor* larvae feeding on expanded polystyrene[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Normal University, 2021 (in Chinese).
- [42] AKYOL Ç, INCE O, COBAN H, KOKSEL G, CETECIOGLU Z, AYMAN OZ N, INCE B. Individual and combined inhibitory effects of methanol and toluene on acetyl-CoA synthetase expression level of acetoclastic methanogen, *Methanosaeta concilii*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 105: 233-238.
- [43] OZUOLMEZ D, NA H, LEVER MA, KJELDSSEN KU, JØRGENSEN BB, PLUGGE CM. Methanogenic Archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence?[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 492.
- [44] 张洪波, 冯俊娜, 张昱, 李文达, 张瑜瑜, 陈丽娟, 夏云. 滇池湿地满江红根际微生物群落组成与水质关联研究[J]. 环境科学与技术, 2023, 46(7): 48-59.
- ZHANG HB, FENG JN, ZHANG Y, LI WD, ZHANG YY, CHEN LJ, XIA Y. Association between composition of rhizosphere microbial community and water quality of *Azolla imbricate* in Tien Lake wetland[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 46(7): 48-59 (in Chinese).
- [45] 张诗焱, 郭存雨, 黄世臣, 傅民杰. 取食聚苯乙烯塑料对黄粉虫幼虫肠道微生物群落的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2668-2680.
- ZHANG SH, GUO CY, HUANG SC, FU MJ. Feeding of polystyrene plastics affects the gut microbiota of *Tenebrio molitor* larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2668-2680 (in Chinese).
- [46] URBANEK AK, RYBAK J, WRÓBEL M, LELUK K, MIROŃCZUK AM. A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste[J]. Environmental Pollution, 2020, 262: 114281.
- [47] 陈冠舟, 张白鹭, 纪梦梦, 吴晓刚, 周君仪, 陈家楠, 王芸, 田浩, 张晓君. 高通量测序探究啃食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫的肠道菌群结构[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2011-2018.
- CHEN GZ, ZHANG BL, JI MM, WU XG, ZHOU JY,

- CHEN JN, WANG Y, TIAN H, ZHANG XJ. Gut microbiota of polystyrene-eating mealworms analyzed by high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2011-2018 (in Chinese).
- [48] 陈耀, 陈冬梅, 邱枢林, 周材权. 黄粉虫对不同比例聚苯乙烯的取食效率研究[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(3): 690-698.
- CHEN Y, CHEN DM, QIU SL, ZHOU CQ. Study of the ingestion efficiency of *Tenebrio molitor* on different proportion of polystyrene[J]. Journal of Environmental Entomology, 2021, 43(3): 690-698 (in Chinese).
- [49] 殷涛, 周祥, 王艳斌, 黄方巧. 泡沫塑料的取食对黄粉虫和大麦虫生长的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(2): 74-79.
- YIN T, ZHOU X, WANG YB, HUANG FQ. Effects of plastic foam feeding on the growth of *Tenebrio molitor* L. and *Zophobas morio* Fabricius[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2018, 53(2): 74-79 (in Chinese).
- [50] 张春悦, 卢惠迪, 夏秋博, 汪梓晗, 程广东. 大麦虫饲养及应用的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(17): 29-33.
- ZHANG CY, LU HD, XIA QB, WANG ZH, CHENG GD. Research progress on *Zophobas morio* feeding and application[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(17): 29-33 (in Chinese).
- [51] EVISON SEF, GALLAGHER JD, THOMPSON JJW, SIVA-JOTHY MT, ARMITAGE SAO. Cuticular colour reflects underlying architecture and is affected by a limiting resource[J]. Journal of Insect Physiology, 2017, 98: 7-13.
- [52] DEPOORTER E, BULL MJ, PEETERS C, COENYE T, VANDAMME P, MAHENTHIRALINGAM E. *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5215-5229.
- [53] 肖彩, 李莉, 李仁婧, 付梅, 韦云, 李琳. 大麦虫和黄粉虫转化塑料效率对比及饲料配比优化[J]. 山地农业生物学报, 2024, 43(2): 85-92.
- XIAO C, LI L, LI RJ, FU M, WEI Y, LI L. Comparison of plastic conversion efficiency and optimization of feed ratio between *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor*[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2024, 43(2): 85-92 (in Chinese).