



取食聚苯乙烯塑料对黄粉虫幼虫肠道微生物群落的影响

张诗焘, 郭存雨, 黄世臣*, 傅民杰*

延边大学农学院, 吉林 延吉 133000

张诗焘, 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 Shihan, GUO Cunyu, HUANG Shichen, FU Minjie. Feeding of polystyrene plastics affects the gut microbiota of *Tenebrio molitor* larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2668-2680.

摘要: 随着塑料在人类社会中的普及, 越来越多的废弃塑料及其前体物质被遗留在环境中, 且其在自然环境中的降解速度十分缓慢, 为此寻找有效的降解途径成为亟待解决的科学问题。【目的】探究利用黄粉虫(*Tenebrio molitor*)幼虫取食聚苯乙烯对其肠道微生物种群及其代谢路径的响应, 以期通过食物诱导寻找一条生物降解和利用聚苯乙烯的有效途径。【方法】以聚苯乙烯为唯一食物来源喂饲黄粉虫幼虫, 通过测量幼虫存活率和个体的体重来测定其生长发育情况; 通过对其肠道内容物进行 16S rRNA 基因测序, 分析其肠道菌群结构的变化; 采用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析法来预测相关功能基因。【结果】取食聚苯乙烯黄粉虫幼虫存活率和体重均下降, 聚苯乙烯塑料明显减少; 取食聚苯乙烯的黄粉虫幼虫肠道菌群丰度与多样性明显减少, 在门水平, 取食聚苯乙烯的黄粉虫幼虫肠道的优势菌为变形菌门(*Proteobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*); 在属水平, 取食聚苯乙烯的黄粉虫幼虫肠道优势菌为螺旋体菌属(*Spiroplasma*)、肠杆菌(*Enterobacillus*)和大肠埃氏-志贺氏菌(*Escherichia-Shigella*); 通过 KEGG 功能预测, 找到与芳香类和烷烃降解功能相关的基因共 18 种, 取食聚苯乙烯组黄粉虫幼虫肠道菌群降解聚苯乙烯相关通路丰度升高, 相关基因表达增强。【结论】聚苯乙烯可以为黄粉虫幼虫生长发育提供一定的物质和能量, 且能够使其完成一个世代过程; 幼虫长时间取食单一食物后, 其肠道菌群结构会发生目标性变化, 利用 KEGG 预测能够找到与聚苯乙烯代谢相关的基因, 为后续研究工作提供了有价值的依据。

关键词: 黄粉虫; 高通量测序; 肠道菌群; 聚苯乙烯; 生物降解

资助项目: 吉林省科技厅重点科技研发项目(20180201076SF)

This work was supported by the Key Science and Technology Research and Development Project of Jilin Provincial Science and Technology Department (20180201076SF).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Shichen, schuang@ybu.edu.cn; FU Minjie, 0000001610@ybu.edu.cn

Received: 2022-10-14; Accepted: 2023-01-28; Published online: 2023-01-31

Feeding of polystyrene plastics affects the gut microbiota of *Tenebrio molitor* larvae

ZHANG Shihan, GUO Cunyu, HUANG Shichen*, FU Minjie*

College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China

Abstract: With the popularity of plastics in the human society, more and more waste plastics and their precursors are left in the environment. In view of the slow degradation of the plastics in the natural environment, it is in urgent need to develop an effective degradation pathway. **[Objective]** To investigate the responses of the gut microbiota and metabolic pathways in *Tenebrio molitor* larvae to the feeding of polystyrene, and find an effective way to biodegrade and utilize polystyrene through food intake. **[Methods]** The larvae were fed with polystyrene as the only food source, and the survival rate and body weight of the larvae were recorded. The changes in the structure of gut microbiota were analyzed by 16S rRNA gene sequencing of the gut contents. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment was performed to predict the relevant functional genes. **[Results]** The survival rate and body weight of the *T. molitor* larvae fed with polystyrene decreased, and polystyrene plastic was significantly reduced. The abundance and diversity of gut microbiota significantly decreased in the *T. molitor* larvae fed with polystyrene. The dominant phyla in the gut were *Proteobacteria*, *Tenericutes*, and *Firmicutes*, and the dominant genera were *Spiroplasma*, *Enterobacillus*, and *Escherichia-Shigella*. KEGG analysis predicted a total of 18 genes involved in aromatic and alkane degradation. The abundance of the pathways associated with polystyrene degradation by the gut microbiota of *T. molitor* larvae feeding on polystyrene increased and the expression of related genes was up-regulated. **[Conclusion]** Polystyrene can provide certain material and energy for the growth and development of *T. molitor* larvae and enable them to complete a generation. After the larvae feed on a single food source for a long time, their gut microbiota structure will undergo targeted changes. KEGG prediction can identify the genes associated with polystyrene metabolism, which provides a valuable basis for the subsequent research.

Keywords: *Tenebrio molitor*; high-throughput sequencing; gut microbiota; polystyrene; biodegradation

塑料因其成本低、易生产等特点得到了广泛应用。但因其具有较高的化学惰性, 不易被自然降解, 从而形成长期性污染问题^[1]。我国每年生产大约近 200 万 t 废弃塑料^[2], 对此我们常采用填埋法、焚烧法、化学处理法、回收再利用等处理方式^[3-4], 填埋法和焚烧法会对环境造成二次污染, 化学处理法和回收再利用成本

较高。近年来, 可取食和降解塑料的黄粉虫等昆虫的发现, 为废弃塑料的生物降解提供了新的研究方向和处理策略。

黄粉虫(*Tenebrio molitor*)又名面包虫, 在昆虫分类学上隶属于鞘翅目(*Coleoptera*)、拟步行虫科(*Walkozoidae*)、粉甲虫属(拟步行虫属)^[5]。陈重光^[6]在养殖黄粉虫的过程中, 意外发现黄

粉虫取食塑料泡沫的现象。Yang 等^[7-8]通过喂食庆大霉素来抑制黄粉虫肠道微生物活性,证明黄粉虫取食塑料的能力来自于黄粉虫肠道微生物。他们首次从黄粉虫肠道中分离出一株可以利用聚苯乙烯作为唯一生长营养物的细菌(*Exiguobacterium* sp. YT2),并使用同位素标记的聚苯乙烯饲喂黄粉虫,其中聚苯乙烯中 47.7% 的碳转化为 CO₂, 0.5% 的碳转化为生物质,说明被细菌降解的聚苯乙烯可被黄粉虫同化成为自身的生物量。孔芳等^[9]在取食聚苯乙烯的黄粉虫肠道中发现了真菌 KHJ-1,此菌种 60 d 内将 5 g 聚苯乙烯颗粒降解了 214.8 mg。陈冠舟等^[10]对饲喂聚氯乙烯的黄粉虫粪便提取物进行傅里叶变换红外光谱图分析,虫粪中聚氯乙烯长链被切断,氯原子相连的碳或氯原子侧基被脱离。Yang 等^[11]通过实验证明低密度聚乙烯和聚苯乙烯都可被大麦虫生物降解,并且凝胶渗透色谱分析表示 M_w 和 M_n 都明显降低。曹沁等^[12]从黄粉虫肠道中筛选出 2 株可降解聚苯乙烯的细菌,分别来自哈夫尼菌属(*Hafnia*)和摩根氏菌属(*Morganella*),其中 *Hafnia* sp. PVC-4 通过气相色谱-质谱法检测分析表示无机盐液体培养基中有小分子物质的产生,这些物质来自聚氯乙烯长链分子断裂或氧化水解产生的小分子物质,进一步证实了该菌种具有降解聚氯乙烯的能力。徐健全等^[13]对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和高通量测序,发现对聚氯乙烯膜的降解由 *Spiroplasma*、*Bacteroidetes*、*Faecalibacterium* 和 *Comamonas* 菌种协同代谢完成。Brandon 等^[14]通过高通量测序发现黄粉虫肠道中柠檬酸杆菌和 *Kosakonia* sp. 与聚苯乙烯和聚乙烯的降解密切相关。Zhong 等^[15]通过凝胶渗透色谱分析发现黄粉虫倾向于取食分子量较轻的聚合物,并对取食低密度聚乙烯和聚苯乙烯泡沫的黄粉虫进行了转录组分析和京都基因与基因组百科全

书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)注释分析,表明塑料的降解是由细胞外解聚酶的扩散引起的,这些解聚酶作用于远端聚合物主链而不是支链,解聚成包含≤16 个碳原子的较短线性链。

本文基于黄粉虫幼虫取食聚苯乙烯塑料的现象,研究取食聚苯乙烯对黄粉虫幼虫生长发育的影响,利用高通量测序技术分析对黄粉虫幼虫肠道微生物群落组成和结构的影响,探究其中优势菌群以及降解塑料的主要微生物,为将来利用菌群协同降解聚苯乙烯塑料的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 黄粉虫

黄粉虫成虫由延边大学农学植物保护实验室提供并保存。

1.2 黄粉虫幼虫的饲养及处理

取一张平整、干净的报纸,剪取适当大小(与饲养盆相当)放入成虫培养容器中,室温放置 24 h 后取出,查出 2 000 枚虫卵(以保证幼虫孵化的整齐度)并将其剪下,放在 29 cm×20 cm×9 cm 的聚丙烯塑料盆中,待孵化完成后,以麦麸为食物饲喂到 5 龄,饲料厚度保持约 3 cm,每 5 d 添加一次麦麸,每天清理排泄物并及时补充水分。根据积温定律 $K=NT$ ^[16]得出在本实验室条件下,黄粉虫由卵发育至 5 龄幼虫所需的时间进行取样,选取体态相近、虫态活泼的幼虫 1 350 只,实验分为 2 组,分别为 a 组:喂饲 4 g 聚苯乙烯泡沫, b 组:喂饲麦麸。每组 3 次重复,期间其他培养条件均保持一致,每 5 d 记录一次黄粉虫幼虫死亡数量以及虫体重量。

1.3 黄粉虫幼虫肠道内容物的取样方法

饲养 45 d 后,从 a 组和 b 组中各选取 30 只黄粉虫幼虫,置于 75% 的酒精中 90 s,对其表

面进行除菌处理, 然后用无菌水冲洗 1 次, 再将幼虫在升汞浸泡 30 s, 捞出后用无菌水冲洗 3 次。用无菌解剖刀将幼虫去头, 用无菌玻璃棒缓慢将肠道内容物挤出, 每 10 只幼虫肠道内容物集中至 1.5 mL 无菌离心管内, 做好标记, 每 10 只作为 1 个重复, 分别匀浆处理, -20°C 低温保存。

1.4 样品的 16S rRNA 基因测序

将收集到的黄粉虫幼虫肠道内容物匀浆 DNA 送至北京百迈客生物科技有限公司用 Illumina HiSeq 2500 测序仪进行 16S rRNA 基因测序。测序基本流程及信息如下: 使用 MN NucleoSpin 96 SoI DNA 提取试剂盒对黄粉虫肠道样品 DNA 进行提取。使用引物 338F (5'-AC TCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rRNA 基因 V3+V4 区域片段。PCR 反应体系为: DNA 50 ng, 上、下游引物各 0.3 μL , KOD FX Neo Buffer 5 μL , dNTPs 2 μL , KOD FX Neo 0.2 μL , ddH₂O 补至 10 μL 。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 循环 25 次; 72°C 末端延伸 7 min。PCR 扩增后, 对其产物进行纯化、定量和均一化。而后进行文库构建, 上机测序。

1.5 测序数据处理

首先使用 FLASH v1.2.7 软件对 PE reads 进行拼接, 拼接得到的 raw tags 使用 Trimmomatic v0.33 软件进行过滤, 得到高质量的 tags 数据 (clean tags)。使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列, 得到最终有效数据。本文数据已上传至国家微生物科学数据中心 (national microbial sciences data center, NMDC) 数据库 (DOI: <https://dx.doi.org/10.12210/metagenome.NMDC40027408>)。

使用 QIIME (version 1.8.0) 软件中的 UCLUST

对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU, 并基于 Silva (细菌) 分类学数据库对 OTU 进行分类学注释, 绘制 VENN 图; 利用 R 语言工具绘制黄粉虫肠道细菌群落结构图; 使用 Mothur (version v.1.30) 软件, 对样品 α 多样性指数进行评估; 使用 R 语言工具绘制的主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 图分析样本之间差异性; 使用 R 语言中的 vegan 包进行分析并使用 python 绘制 Adonis 分析箱型图; 使用 PICRUSt 软件通过比对 16S rRNA 基因测序数据获得的物种组成信息, 获得功能预测基因, 使用 Origin 9.0 绘制功能基因预测热图; 使用线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 分析组间样品差异显著性。

2 结果与分析

2.1 取食聚苯乙烯塑料对黄粉虫幼虫生长发育的影响

黄粉虫幼虫取食聚苯乙烯塑料主要以蛀洞形式取食 (图 1)。喂饲 45 d 时 a 组和 b 组幼虫虫体颜色变化明显 (图 2), 由图 2 可见, a 组处理幼虫体表颜色为黑褐色, 虫体上半部颜色加深明显 (图 2A); b 组处理幼虫体表颜色为黄褐色 (图 2B), 即正常色。从感官上可明显看出, a 组



图 1 黄粉虫幼虫取食聚苯乙烯泡沫场景
Figure 1 Scenes of *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene foam.

处理较 b 组处理的虫体普遍偏小。由图 3A 可知,在整个处理过程中, a 组处理幼虫存活率达 76%, 低于 b 组处理(92%), 经 t 检验(表 1)可知, a、b 两组处理幼虫存活率存在极显著性差异。

由图 3B 可见, a 组处理的幼虫体重在处理过程中呈增长趋势, 处理前 20 d 增长速度较快, 之后增速变缓, 且明显低于 b 组处理, 通过 t 检验(表 2)可知, 处理间差异达极显著水平。



图 2 黄粉虫幼虫 a 组(A)、b 组(B)虫态

Figure 2 Status of *Tenebrio molitor* larvae group a (A) and group b (B).

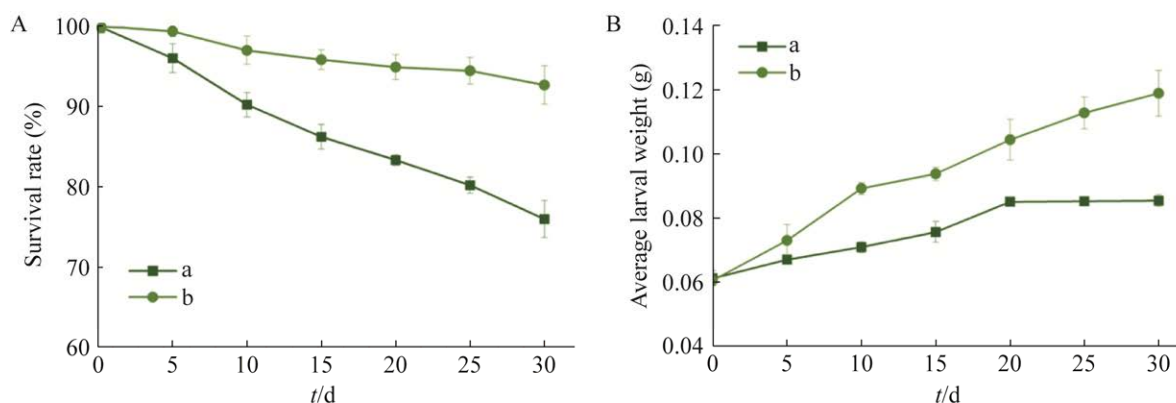


图 3 a、b 组黄粉虫幼虫取食过程中存活率(A)、幼虫平均体重(B)的变化

Figure 3 Changes of survival rate (A) and average larval weight (B) during feeding of *Tenebrio molitor* larvae in groups a and b.

表 1 a、b 组幼虫存活率差异独立性 t 检验

Table 1 Independent t -test for the survival rate of larvae in groups a and b

Test type	Levene's test for equality of variances				t-test for equality of means				
	F	Significance	t	df	Significance (2-tailed)	Mean difference	Standard error difference	95% confidence interval of the difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	15.844	0.000	-3.764	40	0.001	-0.073 437	0.019 510 7	-0.112 869 7	-0.034 004 2
Equal variances not assumed			-3.764	27.147	0.001	-0.073 437	0.019 510 7	-0.113 459 6	-0.033 414 3

表 2 a、b 组幼虫平均体重差异独立性 t 检验Table 2 Independent t -test for the difference of average weight of larvae in groups a and b

Test type	Levene's test for equality of variances				t-test for equality of means				
	F	Significance	t	df	Significance (2-tailed)	Mean difference	Standard error difference	95% confidence interval of the difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	9.506	0.004	-3.587	40	0.001	0.017 474 6	0.004 869 4	-0.027 308 2	-0.007 625 2
Equal variances not assumed			-3.587	28.105	0.001	0.017 474 6	0.004 869 4	-0.027 439 6	-0.007 493 8

2.2 OTU 分析

经 16S rRNA 基因测序共获得 1 048 698 对 reads, 过滤后共产生 890 394 条 clean tags。物种注释结果表明, 从 a、b 两组黄粉虫幼虫肠道样本中共检出细菌 7 门、11 纲、17 目、26 科、36 属。通过聚类, a、b 两组黄粉虫幼虫肠道菌群共 74 个 OTUs (图 4), 取食聚苯乙烯后黄粉虫幼虫肠道微生物减少了 25 个 OTU。

2.3 肠道微生物 α 多样性分析

2.3.1 稀释性曲线和等级丰度曲线

为了验证测序数据量是否足以反映样品中的物种多样性, 对于不同黄粉虫幼虫肠道微生物

群落多样性以及物种的丰富度和均匀度利用稀释性曲线和等级丰度曲线进行评估。

6 个样品的稀释型曲线随着测序量加大, OTU 数目先增加后趋于平缓, OTU 数目不再急剧上升, 表明本次测序数据量合理, 测序深度合适。等级丰度曲线表明样本 b 物种丰度大于样本 a, 这与 Chao1 指数、Ace 指数的分析结果一致, 样本 b 的物种分布均匀度大于样本 a, 2 组样本间优势细菌种类的相对丰度差异较大。

2.3.2 α 多样性指数分析

α 多样性可以反映出单个样品物种丰度及物种多样性。其中有多种衡量指标: Chao1、Ace、Shannon、Simpson。

从表 3 中可以看出, 所有样品的覆盖度 (coverage) 都达到了 1, 说明测序深度充分, 测序结果能真实地反映黄粉虫幼虫肠道微生物的情况。综合来看, b 组 Chao1、Ace 指数和 Simpson 指数明显高于 a 组, 说明 b 组细菌群落更复杂, 物种丰度以及物种多样性均高于 a 组, 长时间取食聚苯乙烯致使黄粉虫幼虫肠道微生物群落丰度与多样性明显减小。

2.4 肠道微生物 β 多样性分析

为进一步了解取食聚苯乙烯塑料和取食麦麸两组黄粉虫肠道菌群结构差异, 我们基于 β 多样性分析得到距离矩阵, 用 R 语言工具绘制 PCoA (图 5) 来反映 2 组黄粉虫幼虫肠道微生物群落组成的相似性及差异。由图 5 可知, b 组

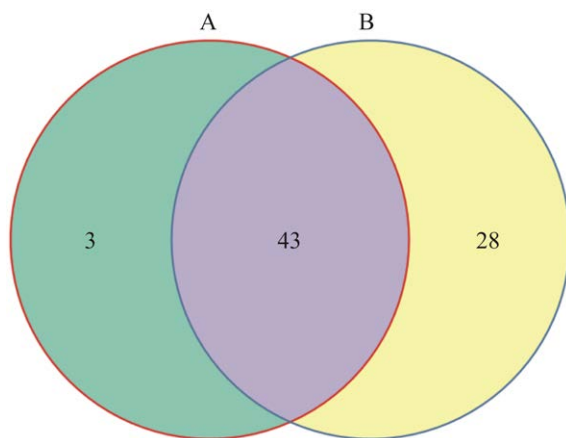


图 4 黄粉虫幼虫肠道微生物 Venn 图

Figure 4 Venn analysis of intestinal microorganism of *Tenebrio molitor* larvae. A: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene. B: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

表 3 α 多样性指数分析

Table 3 Alpha diversity index analysis

Sample ID	OTU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
a1	42	47.738 9	47	0.305 1	1.502 4	1
a2	39	42.508 5	41	0.306 1	1.506 2	1
a3	41	42.053 3	41.333 3	0.314 7	1.490 5	1
b1	70	71.433 2	73	0.370 3	1.513 9	1
b2	71	71	71	0.365 1	1.533 5	1
b3	69	69	69	0.374 1	1.518 6	1

a: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene; b: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

样品分布集中, 组内相似性较高; a 组样品与 b 组样品分别分布在 PCoA 左轴和右轴, 2 组数据簇完全分开, 并相距较远, 说明 a 组与 b 组样品细菌群落结构存在明显差异。

为了检验 2 组样本点的差异是否显著, 采用置换多元方差分析(Adonis)法, 通过构建 Bray-Curtis 距离矩阵, 结果见图 6, 在考虑物种丰度和物种是否存在时, 2 组肠道菌群组间差异大于组内差异, 且差异显著, 说明分组具有统计学意义。

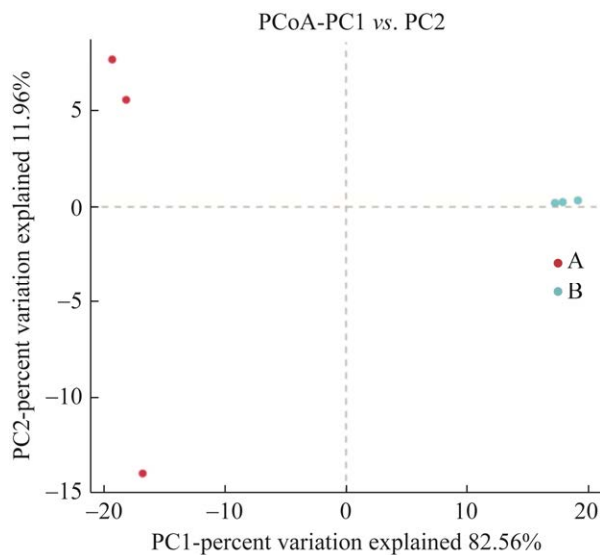


图 5 PCoA 分析图

Figure 5 PCoA analysis chart. A: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene. B: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

2.5 黄粉虫幼虫肠道微生物群落组成分析

由图 7A 可知, 在门水平, 黄粉虫幼虫肠道微生物相对丰度最高的门为软壁菌门(*Tenericutes*, 55.93%), 其次为厚壁菌门(*Firmicutes*, 39.33%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 2.79%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 1.37%)。黄粉虫幼虫在取食聚苯乙烯后的肠道细菌在门水平变化较大, 相对丰度最高的门为变形菌门(*Proteobacteria*, 49.39%), 其次为软壁菌门(*Tenericutes*, 41.92%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 8.44%)。由图 7B 可知, 在属水平, 黄粉虫幼虫肠道微生物相对丰度最高的属为螺原体菌属(*Spiroplasma*, 55.93%),

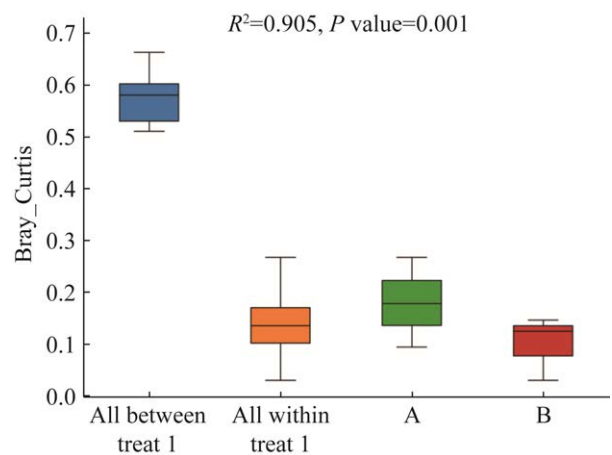


图 6 Adonis 分析箱型图

Figure 6 Adonis analysis box diagram. A: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene. B: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

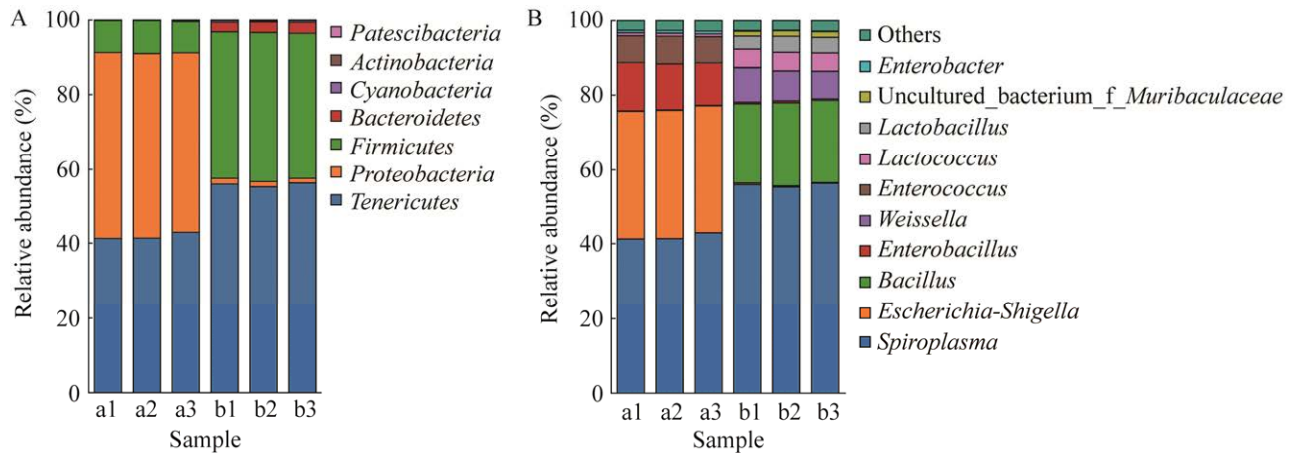


图7 黄粉虫幼虫肠道微生物群落组成

Figure 7 Composition of intestinal microbial community of *Tenebrio molitor* larvae. A: Phylum level. B: Genus level.

其次为芽孢杆菌属(*Bacillus*, 21.85%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 4.77%)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, 4.1%)。黄粉虫幼虫在取食聚苯乙烯后的肠道细菌在属水平上变化较大, 相对丰度最高的属为螺原体菌属(*Spiroplasma*, 41.92%), 其次为大肠埃氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*, 34.42%)、肠杆菌属(*Enterobacillus*, 12.29%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 7.18%)。

2.6 组间差异显著性分析

为了找到不同组之间具有统计差异的生物标记物, 我们使用线性判别分析(LDA)效应大小(LEfSe), 根据大于4的标准LDA值, 筛选出不同组之间不同水平的不同分类群。如图8所示, 样品a中有14种不同的分类群, 3种为厚壁菌门, 其余为变形菌门; 样品b中具有32种不同的分类群, 集中在拟杆菌门和软壁菌门。

2.7 KEGG 功能预测

通过KEGG代谢途径的差异分析, 比较得出黄粉虫幼虫取食塑料前后微生物群落的功能基因在代谢途径上的差异和变化。其中在一级功能层获得代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病

(human diseases)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processes)、有机系统(organismal systems) 6类生物代谢通路功能。由图9可知, 预测基因二级功能层由44个子功能组成, a组黄粉虫幼虫与氨基酸代谢(amino acid metabolism)、细胞运动性(cell motility)、膜转运(membrane transport)、信号传导(signal transduction)相关基因相对丰度更高。b组黄粉虫幼虫与翻译(translation)、免疫系统(nucleotide metabolism)、复制和修复(replication and repair)相关基因相对丰富更高。

在三级通路中共得到338种基因代谢通路, 其中与芳香类和烷烃降解功能相关的基因共18种(图10)。a组黄粉虫幼虫肠道菌群降解聚苯乙烯相关通路丰度显著高于b组黄粉虫幼虫肠道菌群, 表明a组中与聚苯乙烯相关降解基因得到明显富集。

3 讨论与结论

本研究结果表明, 取食聚苯乙烯对黄粉虫幼虫生长发育具有较大影响。以单一聚苯乙烯

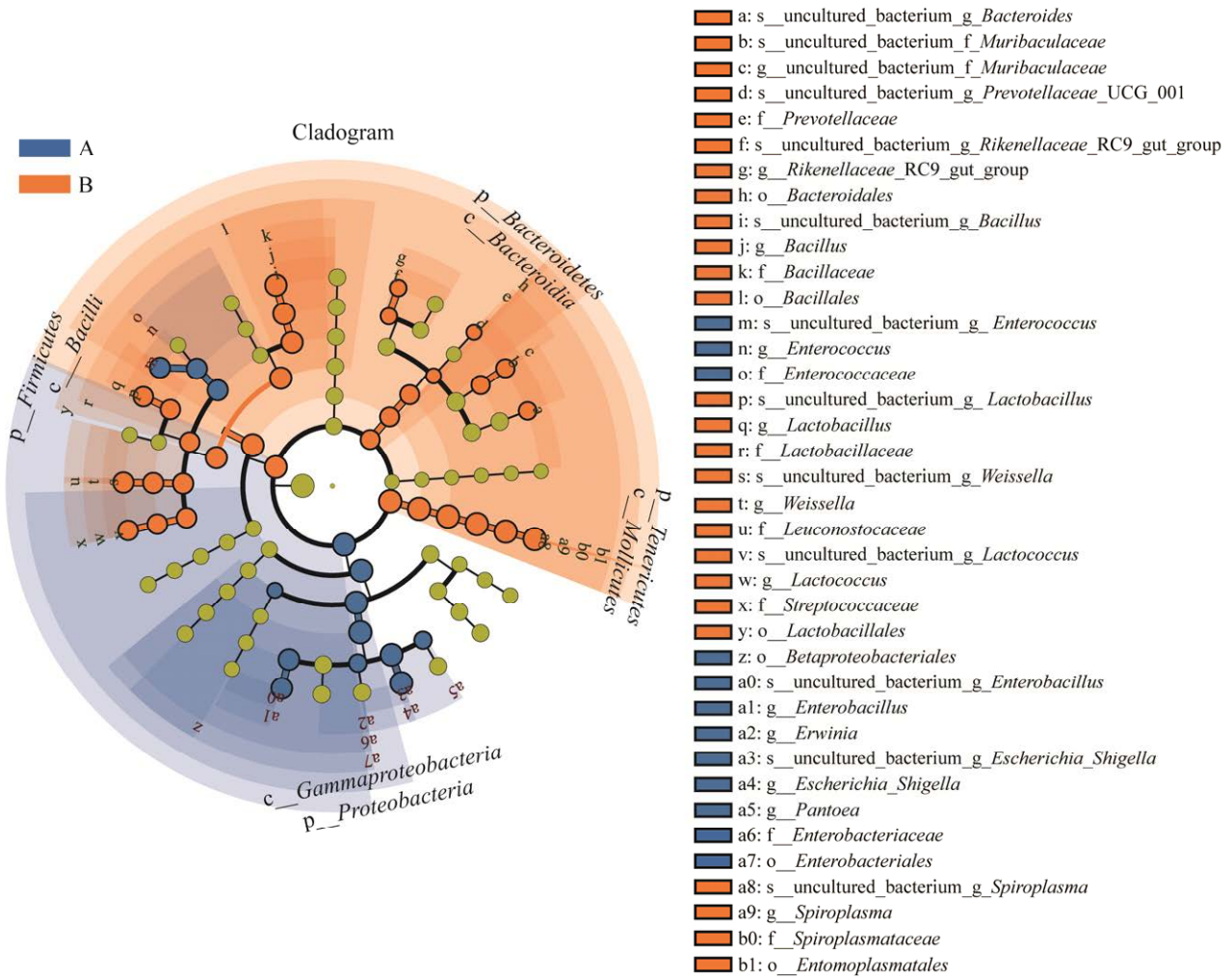


图 8 LEfSe 分析进化分支

Figure 8 LEfSe analysis evolutionary branching diagram. A: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene. B: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

为食物喂饲黄粉虫幼虫，幼虫期个体体重下降明显，喂饲前 20 d 个体重量保持持续增加态势，20 d 后虫体重量趋于稳定，存活率下降了约 16%，化蛹期提前 10 d 左右。说明只喂饲聚苯乙烯不能为黄粉虫幼虫的生长发育提供其所需的常规营养。陈耀等^[17]也论证了这一观点，黄粉虫生长性能随着饲料中聚苯乙烯含量增多而降低。

α 多样性和 β 多样性分析表明，取食聚苯乙烯后的黄粉虫幼虫肠道菌群丰度和多样性均

降低，同时有新的种群定殖黄粉虫幼虫肠道，这与 Fraune 等^[18]的研究结论：在昆虫的生长发育过程中，不仅肠道的发育需要微生物，协助宿主消化食物昆虫肠道微生物也起着重要作用是一致的，这说明黄粉虫幼虫肠道菌群不是简单微生物群落的反映，而是由于极端条件下，物种的选择、免疫及其代谢等共同导致的。

OTU 物种注释结果表明，取食聚苯乙烯黄粉虫幼虫肠道微生物的群落组成存在明显差异。本研究 2 组样品中，*Proteobacteria* 和 *Firmicute*

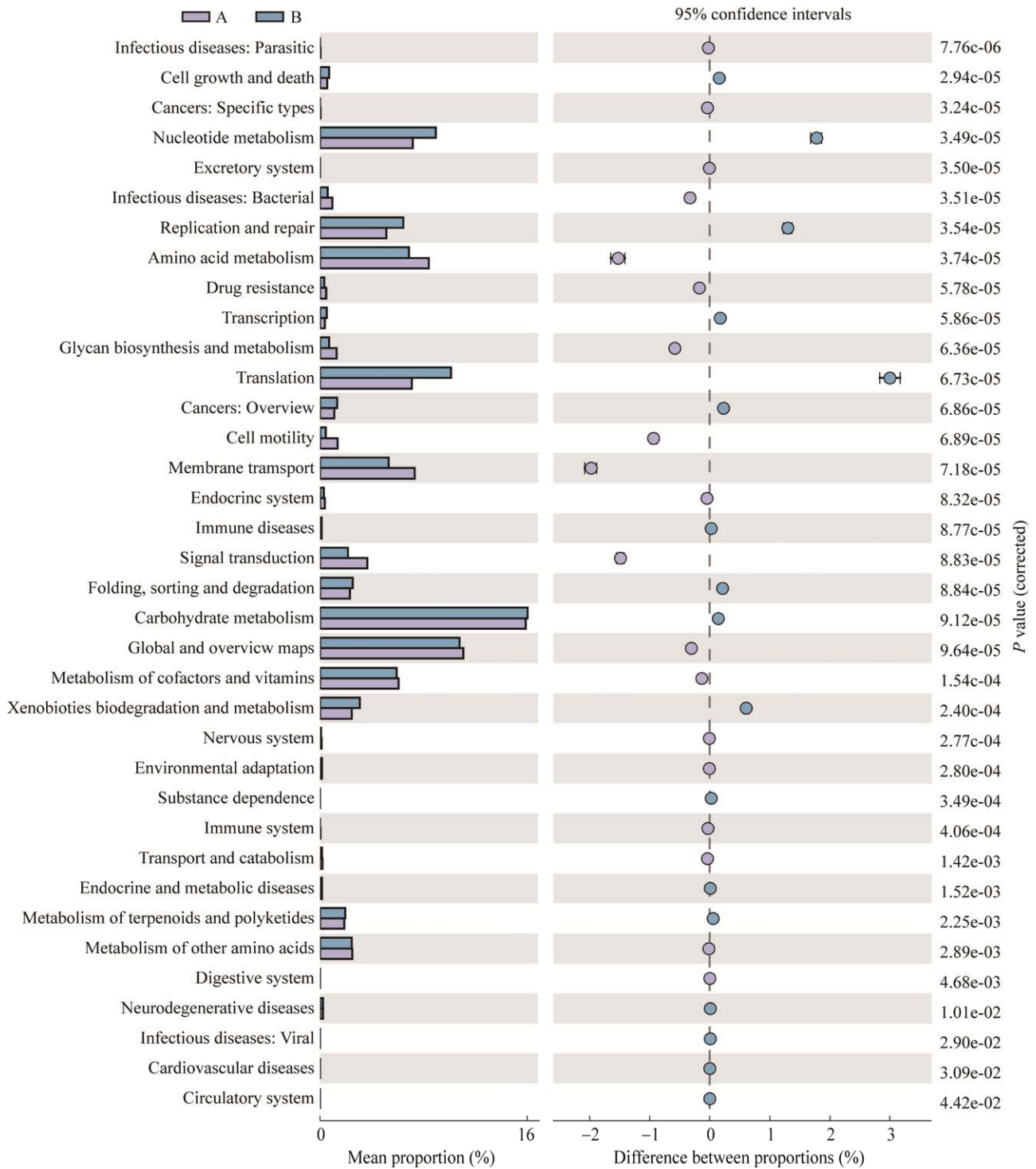


图 9 KEGG 二级代谢通路差异分析图

Figure 9 Differential analysis of KEGG class2 pathway. A: *Tenebrio molitor* larvae feeding on polystyrene. B: *Tenebrio molitor* larvae feeding on wheat bran.

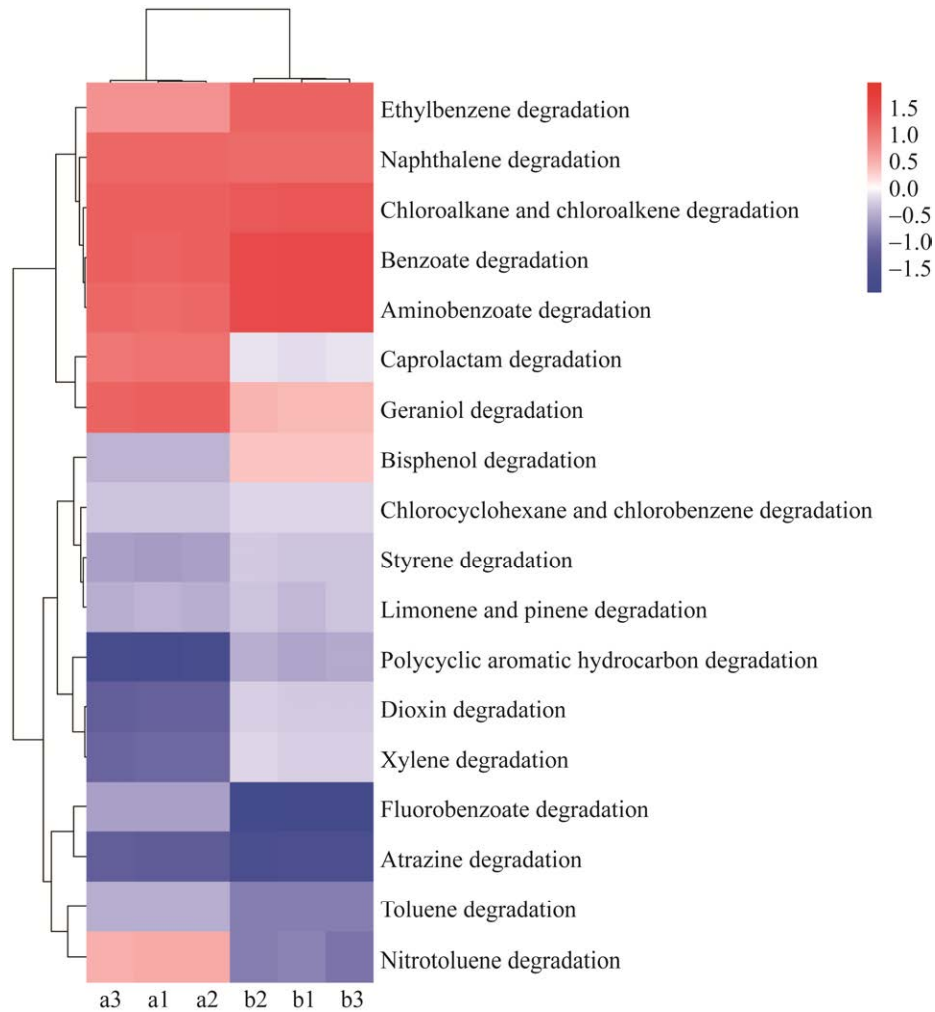


图 10 基于 KEGG 数据库与降解聚苯乙烯相关的基因预测热图

Figure 10 The heatmap of KO pathways related to polystyrene degradation based on KEGG pathway.

相对丰度占绝对优势，Yun 等^[19]对 218 种昆虫肠道菌群进行多样性分析表明，昆虫肠道中的优势菌群也隶属于 *Proteobacteria* 和 *Firmicute*。取食聚苯乙烯黄粉虫幼虫肠道中 *Proteobacteria* 的丰度明显增大，说明可能该门细菌具有代谢聚苯乙烯的相关酶类，也可能是由于聚苯乙烯这一有害外源物质导致代谢紊乱，微生态失调后产生的选择压力干扰了微生物群落的稳定性，*Proteobacteria* 适应性随之增强成为优势菌门^[20]。除此之外 *Proteobacteria* 具有多种生理功能，可以充分利用碳源，为宿主生长发育提供

能量^[21]。

本研究发现取食聚苯乙烯的黄粉虫幼虫肠道中出现大量 *Escherichia-Shigella*，徐健全等^[13]的测序结果中该菌属也为聚氯乙烯组优势菌属，但丰度相差较大，可能是由于取食不同种塑料时因塑料结构不同导致黄粉虫幼虫肠道菌群结构也不相同。*Spiroplasma* 也在黄粉虫肠道中大量出现，该结果与王子君^[22]的测序结果一致。虽然有些 *Spiroplasma* 是动、植物病原菌^[23]，但 Xie 等^[24]的研究发现 *Spiroplasma* 在果蝇受到寄生性黄蜂侵染时提供了保护，即 *Spiroplasma*

对宿主有保护机制。因此在本研究中虽不能直接证明 *Spiroplasma* 参与聚苯乙烯降解, 但可能是通过共生体相互作用抵御外来有毒物质入侵产生积极作用。

功能预测中找到了 18 个与聚苯乙烯代谢相关的基因通路, 相关基因表达增加, 通路丰度提高。脂肪酸降解基因在喂饲塑料过程中表达增加, Zhong 等^[15]通过转录分析和 KEGG 注释分析发现, 黄粉虫幼虫降解塑料的过程中, 脂肪酸降解途径可能在肠道细菌产生塑料降解中间产物过程中发挥重要作用。异生物素代谢-细胞色素 P450 (metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、药物代谢-细胞色素 P450 (drug metabolism-cytochrome P450)、药物代谢-其他酶(drug metabolism-other enzymes)等与外源化学物的生物降解与代谢有关的通路表达也有所增加, 进一步说明了黄粉虫幼虫肠道细菌参与了聚苯乙烯降解。

参考文献

- [1] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, TANIGUCHI I, YAMAJI H, MAEDA Y, TOYOHARA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [2] 王西西, 曲长凤, 王文宇, 安美玲, 缪锦来. 中国海洋微塑料污染的研究现状与展望[J]. *海洋科学*, 2018, 42(3): 131-141.
WANG XX, QU CF, WANG WY, AN ML, MIAO JL. Research status and prospects of marine microplastics contamination in the Chinese oceans[J]. *Marine Sciences*, 2018, 42(3): 131-141 (in Chinese).
- [3] HORTON AA, WALTON A, SPURGEON DJ, LAHIVE E, SVENDSEN C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 586: 127-141.
- [4] 俞文灿. 可降解塑料的应用、研究现状及其发展方向[J]. *中山大学研究生学刊(自然科学与医学版)*, 2007, 28(1): 22-32.
- [5] 任国栋, 何燕, 于有志. 中国已知拟步甲的种类组成和分布概貌[J]. *华东昆虫学报*, 1998, 7(1): 12-20.
REN GD, HE Y, YU YZ. Faunistic component and distributional surveying of the known darklin beetles from China (*Coleoptera: Tenebrionidae*)[J]. *Entomological Journal of East China*, 1998, 7(1): 12-20 (in Chinese).
- [6] 陈重光. 黄粉虫可消化有机塑料的发现[J]. *科学 24 小时*, 2005(2): 25.
CHEN (C/Z)G. Discovery of digestible organic plastics of *Tenebrio molitor*[J]. *Science in 24 Hours*, 2005(2): 25 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] Yang Y, Yang J, Wu W M, Zhao J, Song Y, Gao L, Yang R, 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.
- [9] 孔芳, 洪康进, 徐航, 赵世光, 王幼平. 基于啃食泡沫塑料黄粉虫肠道菌群中聚苯乙烯生物降解的探究[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(7): 1438-1449.
KONG F, HONG KJ, XU H, ZHAO SG, WANG YP. Evidence of polystyrene biodegradation by gut microbiota of styrofoam-feeding yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus)[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(7): 1438-1449 (in Chinese).
- [10] 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).
- [11] YANG L, GAO J, LIU Y, ZHUANG GQ, PENG XW,

- WU WM, ZHUANG XL. Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (*Coleoptera: Tenebrionidae*): broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence[J]. *Chemosphere*, 2021, 262: 127818.
- [12] 曹沁, 林毅博, 陈军, 肖明. 黄粉虫及其肠道微生物对聚氯乙烯的生物降解作用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(2): 390-400.
CAO Q, LIN YB, CHEN J, XIAO M. Biodegradation of polyvinyl chloride by *Tenebrio molitor* and its intestinal microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(2): 390-400 (in Chinese).
- [13] 徐健全, 杨爱玉, 欧阳勇, 张燕, 胡文静, 曾建立. 取食 PVC 塑料膜对黄粉虫生长发育及肠道微生物的影响[J]. *安全与环境学报*, 2022, 22(5): 2759-2767.
XU JQ, YANG AY, OUYANG Y, ZHANG Y, HU WJ, ZENG JL. Study on the feeding of *Tenebrio molitor* larvae on PVC membrane and the response of intestinal microbiome to PVC biodegradation[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2022, 22(5): 2759-2767 (in Chinese).
- [14] BRANDON AM, GAO SH, TIAN RM, NING DL, YANG SS, ZHOU JZ, WU WM, CRIDDLE CS. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(11): 6526-6533.
- [15] ZHONG Z, NONG WY, XIE YC, LAM HUI JH, CHU L. Long-term effect of plastic feeding on growth and transcriptomic response of mealworms (*Tenebrio molitor* L.)[J]. *Chemosphere*, 2022, 287: 132063.
- [16] 肖启明, 欧阳河. 植物保护技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2005.
XIAO QM, OUYANG H. *Plant Protection Technology*[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2005 (in Chinese).
- [17] 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).
- [18] FRAUNE S, BOSCH TCG. Why bacteria matter in animal development and evolution[J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2010, 32(7): 571-580.
- [19] YUN JH, ROH SW, WHON TW, JUNG MJ, KIM MS, PARK DS, YOON C, NAM YD, KIM YJ, CHOI JH, KIM JY, SHIN NR, KIM SH, LEE WJ, BAE JW. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(17): 5254-5264.
- [20] SHIN NR, WHON TW, BAE JW. *Proteobacteria*: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [21] LU HP, WANG YB, HUANG SW, LIN CY, WU M, HSIEH CH, YU HT. Metagenomic analysis reveals a functional signature for biomass degradation by cecal microbiota in the leaf-eating flying squirrel (*Petaurista alborufus* Lena)[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 466.
- [22] 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).
- [23] 于汉寿, 刘淑园, 阮康勤, 陈永莹, 王志伟. 螺原体的分类及其生物多样性研究进展[J]. *微生物学报*, 2009, 49(5): 568-573.
YU HS, LIU SY, RUAN KQ, CHEN YX, WANG ZW. Advances in classification and biodiversity of spiroplasmas—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(5): 568-573 (in Chinese).
- [24] XIE JL, VILCHEZ I, MATEOS M. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12149.