



利福平对红裸须摇蚊幼虫肠道微生物群落结构及功能的潜在影响

孙文雯, 马微微, 徐海轩, 曹威, 闫春财, 孙泽阳*

天津师范大学生命科学学院 天津市动物多样性保护与利用重点实验室, 天津 300387

孙文雯, 马微微, 徐海轩, 曹威, 闫春财, 孙泽阳. 利福平对红裸须摇蚊幼虫肠道微生物群落结构及功能的潜在影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2848-2863.

SUN Wenwen, MA Weiwei, XU Haixuan, CAO Wei, YAN Chuncai, SUN Zeyang. Potential effects of rifampin on the structure and the function of gut microbiota in *Prosilocerus akamusi* larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2848-2863.

摘要:【目的】摇蚊是水生生态系统中重要的昆虫种类之一, 其肠道微生物与个体生长发育、环境适应等过程密切相关, 本研究旨在探究抗生素处理对摇蚊幼虫肠道微生物群落结构及功能的潜在影响。【方法】利用 16S rRNA 基因扩增子测序技术对利福平处理的红裸须摇蚊(*Prosilocerus akamusi*)幼虫肠道内容物中的菌群进行分析和比较, 应用 Tax4Fun 法对其肠道菌群功能进行预测。

【结果】利福平处理能够改变红裸须摇蚊幼虫肠道群落结构和多样性, 宿主肠道菌群中拟杆菌门(*Bacteroidota*) ($P < 0.05$)以及脱铁杆菌门(*Deferribacterota*) ($P < 0.001$)的相对丰度显著上升, 而变形菌门(*Proteobacteria*)与厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度有所下降。在属水平上, 利福平处理使耶尔森菌属(*Yersinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)的相对丰度有所降低, 其中脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)显著降低。与此同时, 共线性网络分析表明利福平处理后细菌群落稳定性大幅下降, 菌种之间关联性显著减弱。通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路注释预测出红裸须摇蚊幼虫肠道菌群基因与基因信息处理、新陈代谢、人类疾病等功能相关, 利福平处理可以使肠道菌群基因的抗药性功能显著上升, 而内分泌和代谢疾病功能显著下降。【结论】研究结果揭示了抗生素利福平对红裸须摇蚊幼虫肠道细菌群落结构及功能的潜在影响, 为进一步探索摇蚊肠道菌群发挥的必要作用奠定理论基础。

关键词: 利福平; 红裸须摇蚊; 肠道微生物; 多样性

资助项目: 天津师范大学研究生科研创新项目(2022KYCX022Z); 天津市教委科研计划(自然科学) (2021KJ183); 天津市科学技术普及研发项目(22KPxMRC00070)

This work was supported by the Tianjin Normal University Research Innovation Project for Postgraduate Students (2022KYCX022Z), the Scientific Research Program of Tianjin Education Commission (Natural Science) (2021KJ183), and the Tianjin Science and Technology Popularization Project (22KPxMRC00070).

*Corresponding author. E-mail: skysunzeyang@tjnu.edu.cn

Received: 2022-11-03; Accepted: 2023-01-11; Published online: 2023-01-19

Potential effects of rifampin on the structure and the function of gut microbiota in *Prosilocerus akamusi* larvae

SUN Wenwen, MA Weiwei, XU Haixuan, CAO Wei, YAN Chuncai, SUN Zeyang*

Tianjin Key Laboratory of Conservation and Utilization of Animal Diversity, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: [Objective] *Prosilocerus akamusi* is one of the most important insects in aquatic ecosystem, and its gut microbiota is closely related to individual growth and development, environmental adaptation, and other physiological processes. This study aimed to investigate the potential effects of antibiotic treatment on the structure and the function of gut microbiota in *P. akamusi* larvae. [Methods] The microbes in the gut content of *P. akamusi* larvae treated by rifampin were analyzed and compared by using the 16S rRNA amplicon sequencing, and the functional prediction of gut microbial genes was conducted by using Tax4Fun method. [Results] Rifampin altered the structure and the diversity of gut microbiota in *P. akamusi* larvae. After rifampin treatment, the relative abundance of the bacterial phylum *Bacteroidota* ($P < 0.05$) and *Deferribacterota* ($P < 0.001$) was up-regulated, while that of *Proteobacteria* and *Firmicutes* was down-regulated. At the genus level, treatment with rifampin resulted in a significant decrease in the relative abundance of *Yersinia*, *Pseudomonas*, and *Desulfovibrio* ($P < 0.05$). At the same time, the co-occurrence network showed that the stability of the microbiota coupled with the correlation between bacterial species were significantly weakened after rifampin treatment. Additionally, the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis predicted that genes in the gut microbiota of *P. akamusi* larvae were mostly involved in the genetic information processing, metabolism, and human disease. Rifampin significantly increased the expression level of genes involved in drug resistance, while decreased those participating in endocrine and metabolic disease function. [Conclusion] The above-mentioned results reveal the potential effects of rifampin on the structure and the function of the gut microbiota in *P. akamusi* larvae, which build a fundamental basis to further explore the essential roles of the gut microbiota in *P. akamusi*.

Keywords: rifampin; *Prosilocerus akamusi*; gut microbiota; diversity

昆虫肠道内含细菌、古菌、病毒、真菌等多种微生物, 其中栖息细菌具有提供消化酶、降解杀虫剂产生的有毒次生代谢物、改变昆虫摄取方式及效率、保护宿主免受不利因子侵害、增强种内以及种间交流等重要功能^[1]。因此, 肠道细菌与昆虫宿主的发育、进化等生理过程存在密切关系。此外, 研究表明昆虫肠道微生物

群落结构和多样性受物种类别、系统发育、饮食、生活阶段以及环境条件动态影响^[2-3], 并在个体应对环境污染过程中发挥关键作用。例如, 当环境中存在高浓度重金属铅时, 家蝇 (*Musca domestica*) 肠道中的波氏杆菌 (*Bordetella* sp.)、海氏普罗威斯登菌 (*Providencia heimbachae*) 和松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*) 可以通

过转运重金属来降低其带来的生物毒性^[4]。埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)肠道内的梭状芽孢杆菌(*Pseudomonas viridiflava*)和大田根瘤菌(*Rhizobium daejeonense*)等菌株能够提高个体对氯氟氰菊酯的耐受性^[5]。橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)肠道内的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter freundii*)可以通过将有机磷农药敌百虫降解为水合氯醛和亚磷酸二甲酯的方式增强果蝇对于该农药的抗性^[6]。

底栖动物是水生态系统的重要组成部分,与水体环境相互影响。摇蚊是淡水生态系统中丰富度极高的无脊椎动物类群之一^[7],是水生昆虫群落的重要组成,隶属于双翅目长角亚目摇蚊总科,广布于全球各大生物地理分布区,已记述的种类超过 5 000 种^[8]。该物种可以促进水生生态系统碳循环,对水体环境中污染物变化极为敏感,其分布格局和生理形态变化等指标多应用于水质监测和水生生态评价^[9]。有研究发现,蚊虫肠道微生物群落在与宿主的互利共生过程中,对宿主的生命活动能够产生重要影响^[10]。红裸须摇蚊(*Prosilocerus akamusi* Tokunaga)为摇蚊科优势种,广泛分布于我国华北地区淡水环境中,在水生生态系统食物链中占有关键地位。该种具备适应性强、饲养容易、生活周期短的特点,是良好的水生昆虫供试对象^[11]。在前期研究中我们发现红裸须摇蚊幼虫肠道菌群在重金属铜或有机磷农药毒死蜱的胁迫下可以快速响应,导致肠道菌群结构发生改变^[12]。但有关肠道微生物在摇蚊幼虫生长发育、消化吸收、解毒代谢等方面发挥的具体作用未见详细报道,因此探究摇蚊幼虫肠道共生菌对宿主的潜在功能及其机制显得极为重要。

近年来通过使用抗生素处理来扰乱甚至去除昆虫肠道内共生菌已经成为评估肠道微生物

功能的重要手段。褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)肠道中沃尔巴克氏菌(*Wolbachia*)在四环素处理后大量减少,使得机体细胞色素 P450 基因 CYP4CE1 显著下调,造成虫体代谢吡虫啉能力受到干扰^[13]。咖啡螟虫(*Hypothenemus hampei*)经混合抗生素处理后,肠道组织微生态中假单胞菌属(*Pseudomonas*)相对丰度显著降低,导致该菌属咖啡因去甲基化酶基因表达量显著下降,个体代谢外源咖啡因过程受阻,产卵量显著降低^[14]。由此可见,抗生素一方面作为环境胁迫因子破坏昆虫肠道菌群生态平衡,间接影响宿主代谢,从而对个体健康产生不利影响;另一方面,抗生素可以抑制肠道内特定菌株的生长和繁殖,为进一步了解不同细菌发挥的直接作用提供思路。目前,通过使用抗生素处理来评估双翅目昆虫肠道微生态功能的研究尚未见报道。

共生菌对不同种类抗生素的敏感性存在差异,如革兰氏阳性菌能够被万古霉素和青霉素去除,革兰氏阴性菌对链霉素和庆大霉素高度敏感^[15]。利福平作为广谱抗生素,是国际上通过抑制昆虫内共生菌而深入研究其功能的通用且有效的方法。例如,利福平通过降低白蚁(*Reticulitermes flavipes*)体内革兰氏阳性菌的相对丰度而使体内沙雷氏菌属(*Serratia*)等革兰氏阴性菌占据主导地位,进而抑制个体免疫造成宿主寿命、产卵量以及体重的下降^[16]。使用利福平处理 Q 型烟粉虱(*Bemisia tabaci*)后,其卵期、若虫期及伪蛹期的发育历期均显著延长^[15]。因此,本研究以 16S rRNA 基因为分子标记,通过高通量测序技术比较分析利福平处理前后红裸须摇蚊幼虫肠道菌群差异变化,旨在揭示抗生素对于摇蚊幼虫肠道群落结构及相关功能的潜在影响,为后续精确研究肠道细菌及其对应的功能提供更加明确的方向。

1 材料与方 法

1.1 供试虫体采集及实验设计

2022 年 4–8 月, 在天津独流减河流域下游各采样点约 5–10 cm 深处随机采集摇蚊幼虫运送至实验室, 基于 Saether 的研究^[17]依据头壳中上颚齿和颊板的特征鉴定物种为红裸须摇蚊, 以头壳宽度鉴定龄期, 选取活性较高、体长一致的 4 龄红裸须摇蚊幼虫作为实验材料。将样品置于温度为(24±1) °C 的通氧透明塑料盒中, 光/暗周期设定为 16 h/8 h。所有样品在实验前均先置于无菌脱氯自来水中经历 24 h 驯化期, 并在实验过程中保持饥饿状态。利福平试剂(CAS:13292-46-1; 上海麦克林生化科技股份有限公司)用 10%乙醇作助溶剂的无菌二级水溶解, 配置成 1 g/L 实验浓度待用。

在预实验的基础上, 采用净水染毒法进行试验, 将摇蚊幼虫放入盛有 20 mL 1 g/L 利福平溶液^[12]的培养皿中(直径为 90 mm), 设置添加等量无菌脱氯自来水的培养皿为空白对照组, 每个处理组包含 30 只供试虫体, 实验组与空白对照组各设置 6 组重复, 实验过程中每 12 h 更换一次溶液, 并及时挑出死亡幼虫, 处理 48 h 后观察染毒现象并进行测定分析。将经抗生素处理后的摇蚊幼虫设定为肠道菌群缺失幼虫个体(gut microbiota deficient, GD), 在无菌脱氯自来水中培养 48 h 后的摇蚊幼虫为肠道菌群正常个体(conventional microbiota, CV)。

1.2 红裸须摇蚊幼虫肠道剖离及基因组 DNA 提取

取 CV 与 GD 两组各 15 只红裸须摇蚊幼虫用无菌二级水冲洗 3 遍以充分去除体表残留物, 并用 75%的酒精棉片轻轻擦拭幼虫体表约 30 s 去除幼虫体表细菌, 随后把虫体置于浓度为 0.25%的 NaClO 溶液中浸泡 1 min, 最后用

无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 3 次后备用。在无菌环境下, 使用灭菌后的手术刀将昆虫头部以及生殖节切掉, 用无菌细尖手术镊从虫体剩余部分中取出整个肠道及其内容物, 去除马氏管等组织后立即用无菌 PBS 溶液冲洗后迅速转移至装有 0.5 mL 无菌 PBS 溶液的离心管中备用。

将取得的肠道组织使用已灭菌的 1 mL 玻璃匀浆器制成匀浆, 在 8 000 r/min 下离心 1 min 后, 使用 180 μ L 溶菌酶溶液(20 mg/mL)重悬沉淀, 在 3 h 后使用 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司, B518251]完成基因组 DNA 的提取, 并使用 Denovix DS-11 分光光度计检测抽提 DNA 的浓度以及纯度, 测得的 DNA 浓度范围在 15–20 ng/ μ L 之间, OD_{260} 与 OD_{280} 的比值均在 1.8–2.0 之间, 为合格样品, 置于–20 °C 保存。

1.3 细菌 16S rRNA 基因高通量测序

将合格样品送至北京百迈客生物科技有限公司, 基于 Illumina NovaSeq 测序平台进行高通量测序, 样品测序长度均值为 424 bp。使用 16S rDNA 基因序列的通用引物(338F: 5'-ACTCCTA CGGGAGGCAGCAG-3', 806R: 5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3')对 V3–V4 区^[18]进行扩增。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增程序设定为: 95 °C 3 min; 95 °C 40 s, 64 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。随后对 PCR 扩增产物进行纯化回收, 最终得到符合 Illumina NovaSeq 6000 测序要求的 DNA 样品。利用双末端测序的方法, 构建小片段文库进行测序得到原始图像数据文件, 经碱基识别分析转化为原始测序序列, 结果以 FASTQ 文件格式存储, 其中包含测序序列的序列信息以及其对应的测序质量信息。原始数据已上传至美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,

NCBI)序列读取存档(sequence read archive, SRA)数据库(BioProject ID: PRJNA855558)。

1.4 序列数据分析

使用 Trimmomatic v 0.33 软件^[19], 对测序得到的原始数据进行过滤。使用 cutadapt 1.9.1 软件^[20]进行引物序列的识别与去除, 得到不包含引物序列的 clean reads。利用 Usearch v10 软件^[21], 通过重叠(overlap)对每个样品的 clean reads 进行拼接, 然后根据不同区域的长度范围对拼接后数据进行长度过滤; 使用 UCHIME v4.2 软件^[22]鉴定并去除嵌合体序列, 得到最终有效数据。将有效数据照最小样品序列数对数据抽平后, 使用 Usearch 软件^[21]对 reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类并获得分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU)。

以 Silva.138 为参考数据库^[23]使用 Naive Bayes classifiers 结合比对的方法对特征序列进行分类学注释, 可得到每个特征对应的物种分类信息, 进而在各分类水平下(门、纲、目、科、属、种、OTU)统计各样品群落组成, 利用 QIIME 软件^[24]生成不同分类水平上的物种丰度表, 在 R 语言工具协助下绘制成样品各分类学水平下的群落结构图, 并以样品 α 多样性指数评估肠道细菌组成的均匀性和丰富度, 其中包括 Sobs、Shannon、Simpson、ACE、Chao1、Coverage 等指数。利用 Mothur 软件^[25]和 R 语言工具依据各样品的测序量在不同测序深度时的 Shannon 指数绘制稀释曲线, 以反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。使用 QIIME 软件^[24]进行 Beta 多样性分析, 比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度, 并基于 Bray-Curties 算法进行主坐标分析以比较样品间物种的相关性与差异性。收集各组相对丰度大于 0.1% 的 OTU 进行 Spearman 相关性分析, 筛选出相关系数大于 0.8 且 P 值小于 0.05 的 OTU, 利用 Cytoscape

软件^[26]绘制群落可视化相关性网络。利用 Tax4Fun 程序包^[27]对利福平处理前后的红裸须摇蚊幼虫肠道组织内的原核微生物群落功能进行预测。将前期测序获得的数据进行整理和分析, 获得 OTU 物种丰度表, 进而与 KEGG 数据库^[28]中已有类群进行比对分析。

1.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对 2 组多样性指数、各分类水平下细菌的相对丰度以及 2 组 KEGG 数据库中功能基因的相对丰度进行 Student's- t 检验。若 2 组间差异有显著性意义, 分别表示为 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) 和 $P < 0.001$ (***)。

2 结果与分析

2.1 样品测序信息概况

通过对利福平处理前后红裸须摇蚊幼虫肠道样品的 16S rRNA 基因 V3-V4 区序列进行测定, 共获得 956 824 条高质量的读取条目, 每个样品至少能够产生 79 423 条高质量有效序列, 测序长度主要分布在 400-440 bp 范围内。将相似度为 97% 有效序列进行操作分类单元聚类得到 820 个 OTU。在不同分类学水平对细菌群落组成进行统计, 发现正常红裸须摇蚊幼虫肠道(CV)组 6 个样品在门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)、OTU 各分类水平上细菌种类要明显高于利福平处理后幼虫肠道细菌群落(GD)组(表 1)。

2.2 物种多样性与丰富度分析

2.2.1 α 多样性分析

本研究采用 α 多样性分析正常红裸须摇蚊幼虫肠道(CV)及利福平处理后幼虫肠道细菌群落(GD)多样性趋势, 所有检测样品的 Coverage 指数(样品文库覆盖率)均在 99% 以上, 说明序列未检出可能性小, 测序结果可以准确且真实地反映微生物群落多样性。ACE 及 Chao1 指数反应

了样品中群落的丰富度, 在被测样品中, CV 组 ACE 平均值为 710.65, GD 组 ACE 平均值为 360.73; CV 组 Chao1 平均值为 715.24, GD 组 Chao1 平均值为 314.86; Shannon 指数用于反应群落的多样性, CV 组样本平均值高达 6.67, 而 GD 组样本平均值仅有 2.76。使用 Wilcoxon 秩和检验方法对 CV 与 GD 组 3 种 α 多样性指数分析得出, 1 g/L 利福平处理能够使肠道内细菌物种数量及相对丰度均显著下调 (** : $P < 0.01$, 图 1)。

2.2.2 β 多样性分析

采用 PCoA 方法对正常红裸须摇蚊幼虫肠道组织及利福平处理后肠道组织内的微生物组成差异进行聚类分析, 结果如图 2 所示。基于 Bray-Curtis 距离矩阵的 PCoA 主坐标分析表明, 主坐标轴 PC1、PC2 的解释度分别为 49.45% 及 17.01%。利用 Anosim 分析 PCoA 分析中 CV 组与 GD 组各样本点间的差异性, 得到 $R=0.998$, $P=0.008$, 说明组间差异显著, 即利福平处理后摇蚊幼虫肠道菌群结构发生了显著性改变。

表 1 红裸须摇蚊幼虫肠道菌群不同分类水平数据统计

Table 1 Sequencing information about gut microbiota derived from *Prosilocerus akamusi* larvae

Sample	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	OTU
CV 1	21	43	113	200	378	541	750
CV 2	21	44	112	196	371	523	734
CV 3	21	44	114	205	395	568	785
CV 4	21	45	114	206	393	569	785
CV 5	20	39	97	170	309	444	569
CV 6	19	34	83	152	284	422	547
GD 1	13	18	46	81	137	176	229
GD 2	12	19	45	73	126	160	211
GD 3	14	20	45	74	129	159	193
GD 4	17	25	56	98	170	227	293
GD 5	15	20	47	86	142	178	218
GD 6	11	17	40	67	110	137	170

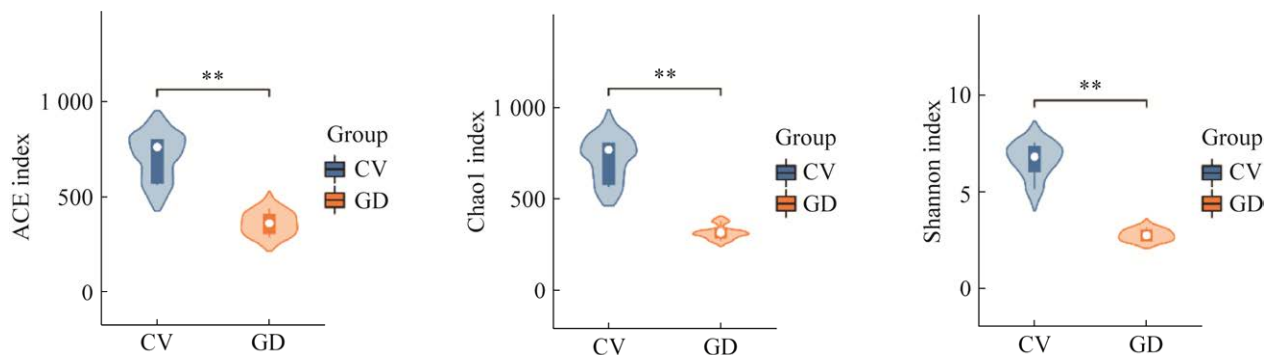


图 1 利福平处理后红裸须摇蚊幼虫肠道菌群 α 多样性分析

Figure 1 The alpha diversity of gut microbiota in chironomid larvae collected from wild (CV) and those challenged by 1 g/L rifampin solution (GD). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

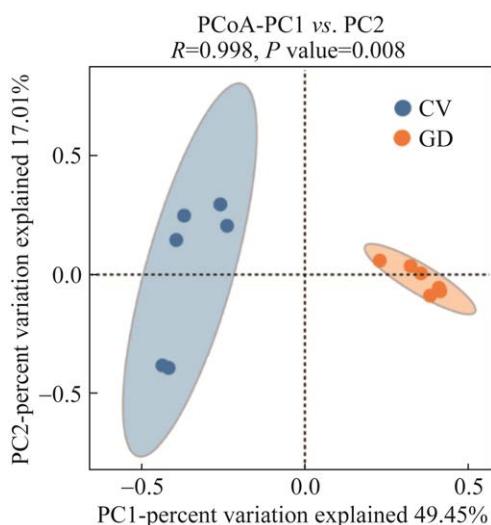


图2 肠道菌群的PCoA聚类分析

Figure 2 PCoA clustering analysis of the intestinal microbiota derived from two groups based on Bray-Curtis distance matrix.

2.3 利福平处理前后红裸须摇蚊肠道菌群的群落组成

2.3.1 基于门水平肠道内主要共生菌组成与结构分析

在去除掉丰度小于1%的OTU后,在CV与GD组鉴定到包括变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)及拟杆菌门(*Bacteroidota*)的3种共有优势菌门,经利福平处理后,拟杆菌门(*Bacteroidota*)丰度显著上升($P<0.05$),其相对丰度占比由18.99%上升至30.87%;脱铁杆菌门(*Deferribacterota*)的相对丰度由0.37%变化为14.61%,呈现显著上调的趋势($P<0.001$) (图3A、3B)。

2.3.2 基于属水平肠道内主要共生菌组成与结构分析

为了进一步比较2组幼虫肠道内优势菌属的差异,选取丰度排名前15的类群在属的分类阶元水平上进行后续分析。分类结果表明, CV组中透明颤菌属(*Vitreoscilla*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、理研菌科RC9肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、

unclassified_Muribaculaceae 为优势菌属,其相对丰度分别为7.58%、6.01%、5.67%、4.89%、4.18%,其余为肠杆菌属(*Enterobacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、沙雷氏菌属(*Serratia*),其相对丰度均在1.27%–2.97%之间。GD组理研菌科RC9肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)为绝对优势菌属,其相对丰度为30.50%,其次为芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、粘螺旋菌属(*Mucispirillum*)、寡单胞菌属(*Stenotrophomonas*),其相对丰度分别为21.40%、14.55%、7.05%,其余为泰泽雷拉菌属(*Tyzzarella*)、从毛单胞菌属(*Comamonas*)、透明颤菌属(*Vitreoscilla*)、未分类的伯克氏菌属(*unclassified_Burkholderiales*),其相对丰度在2.76%–3.63%之间。

对比发现绝大多数菌属的相对丰度都呈现出了下降的趋势,其中耶尔森菌属(*Yersinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*) ($P<0.01$)的相对丰度显著下降,理研菌科RC9肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*) ($P<0.001$)、芽孢杆菌属(*Brevibacillus*) ($P<0.05$)、粘螺旋菌属(*Mucispirillum*) ($P<0.001$)、泰泽雷拉菌属(*Tyzzarella*) ($P<0.05$)未分类的伯克氏菌属(*unclassified_Burkholderiales*) ($P<0.05$)的相对丰度呈显著上升的趋势(图3C、3D)。

2.4 基于OTU的摇蚊幼虫肠道菌群相关性网络分析

为评估2组微生物群落种间的关系,根据秩和检验得到基于OTU水平的差异物种绘制种间相关性网络图。

由图4可知, CV组内共筛选出由47个OTU组成的100个相关性关系,其中74%呈正相关关系,26%为负相关关系。网络中的节点主要属于变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)与放线菌门(*Actinobacteriota*), 占有节点的66%,

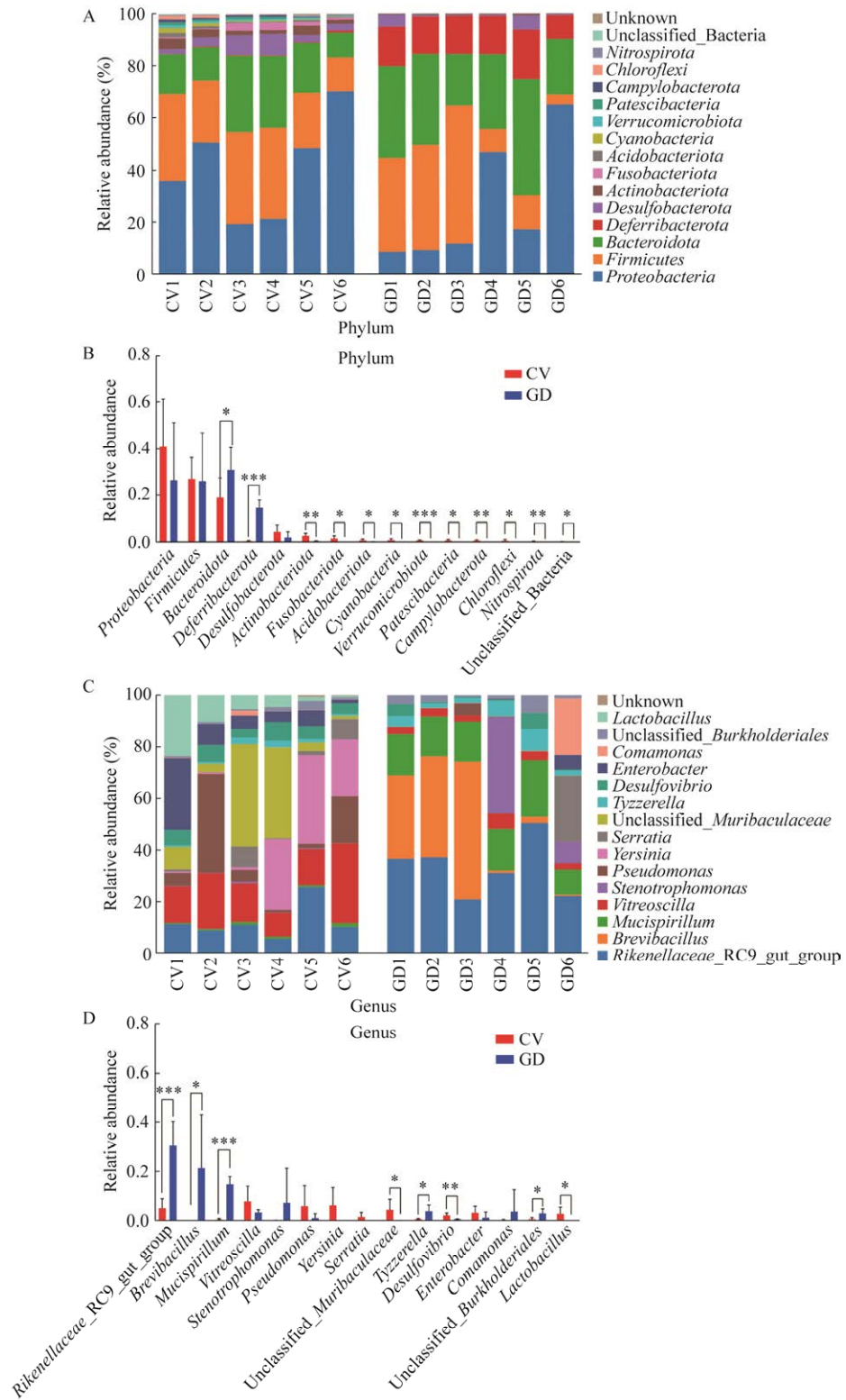


图 3 基于门(A、B)和属(C、D)水平的物种分布柱状图

Figure 3 Community bar-blot analysis presenting the relative abundance of microbial colonizers among tested samples at the phylum (A, B) and the genus level (C, D). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

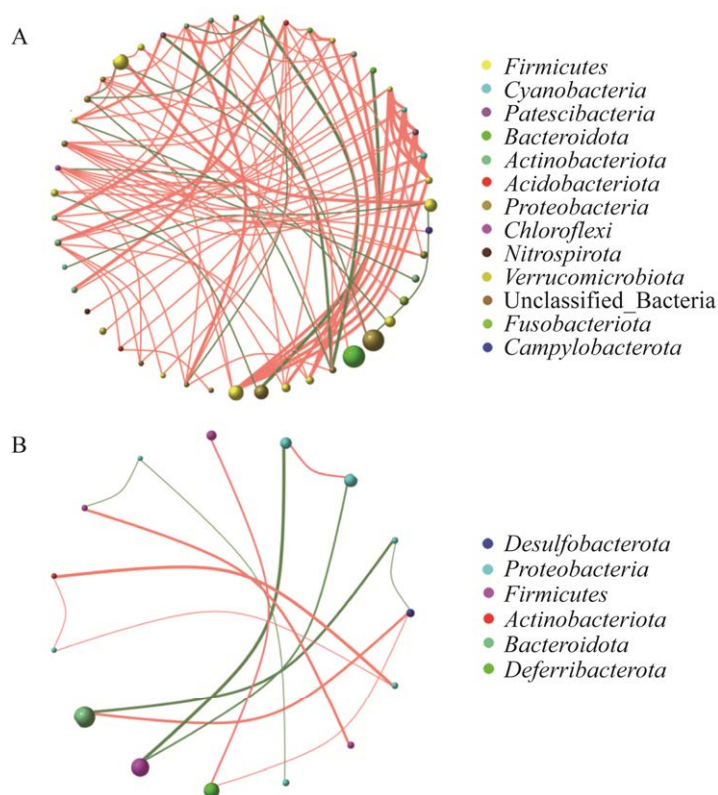


图 4 红裸须摇蚊幼虫肠道菌群的相关性网络图

Figure 4 Network analysis of gut microbiota in normal *Propisilocerus akamusi* larvae (A) and those treated with rifampin (B). Co-occurrence network of the OTUs with relative abundance higher than 0.1% in CV group (A) and GD group (B). The node size is proportional to the relative abundance of each OTU. Links between nodes present a strong correlation between the source and the target OTU (Spearman's correlation >0.8 or ≤ 0.8). Different node colors indicate different phylum to which the OTU belongs. Line color indicates direction, as shown in the legend.

也是细菌群落的优势菌门。与此同时，GD 组内共筛选出由 15 个 OTU 组成的 14 个相关性关系，其中有 57% 呈正相关关系，43% 呈负相关关系。筛选出的具强相关性关系的物种以变形菌门 (*Proteobacteria*) 与厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为主，占所有节点的 73%。

利福平处理后幼虫肠道内呈相关性的菌群数量显著变少，菌群间相互关系显著变弱且呈强正相关的比例显著变小，揭示肠道菌群稳定型变弱，其中变形菌门 (*Proteobacteria*) 与厚壁菌门 (*Firmicutes*) 可能对于肠道菌群的稳定起着极重要的作用。

2.5 基于 Tax4Fun 的摇蚊幼虫肠道菌群功能注释及预测

本研究对 2 组幼虫肠道菌群测序数据用 Tax4Fun 法进行菌群基因功能预测，实现了 SILVA 数据库注释的 OTU 物种分类与 KEGG 数据库中原核生物代谢功能的有机结合，从而分析利福平在幼虫代谢过程中具有的潜在功能，结果如图 5 所示。

在 Level 1 水平上，2 组幼虫肠道菌群基因与 6 类代谢通路相关，其中有 3 类通路具有显著性差异，细胞过程 (cellular processes) 在利福平处理后相对丰度显著上调 ($P < 0.01$)，而基因信

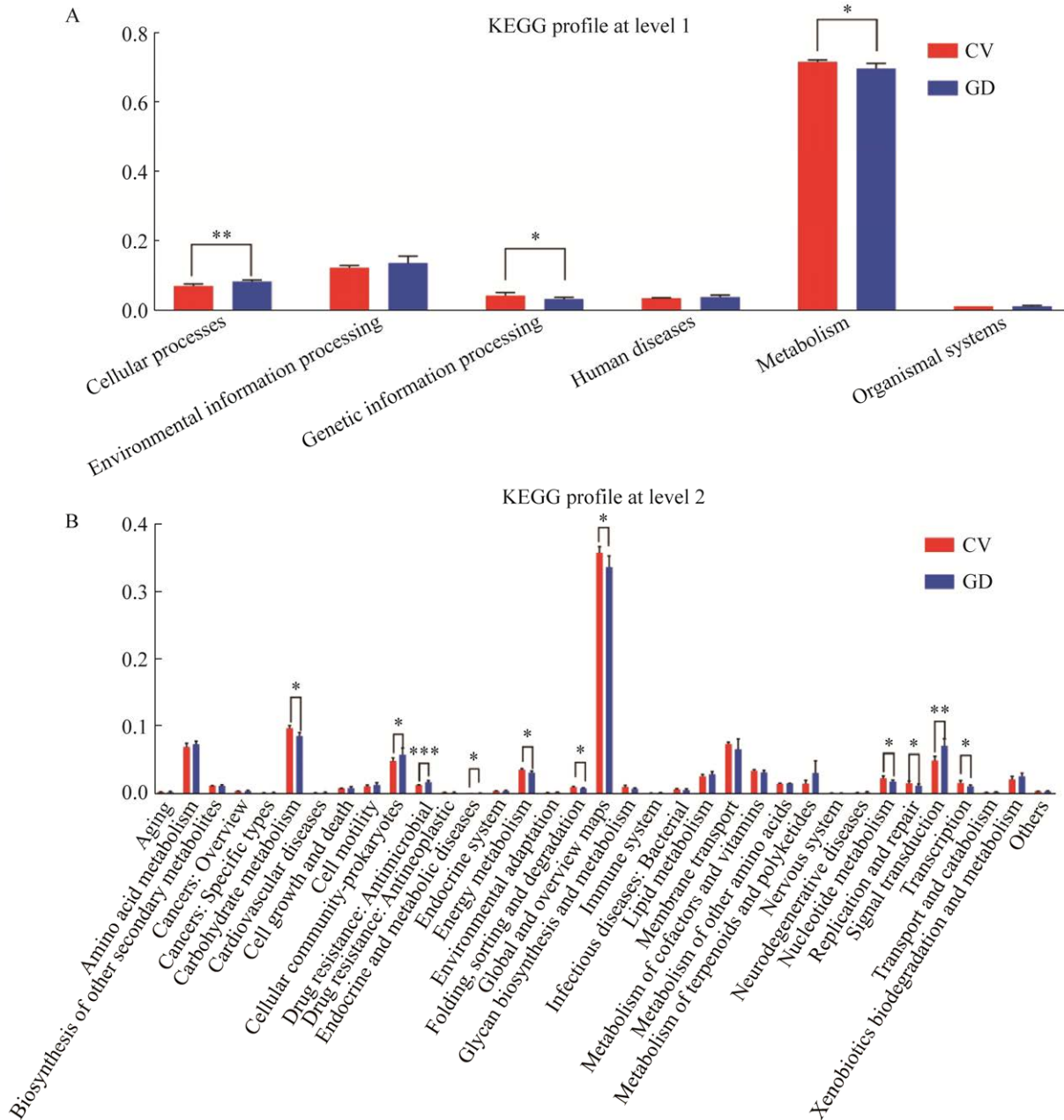


图 5 KEGG 代谢途径差异分析柱状图

Figure 5 Relative abundance of gut microbial genes that exhibit significant difference at level 1 (A) and level 2 (B) in KEGG pathway annotation. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

息处理(genetic information processing) ($P<0.05$)、新陈代谢(metabolism) ($P<0.05$) 2 类通路在利福平处理后相对丰度均显著下降($P<0.05$)。同时我们发现该菌群基因与人类疾病(human diseases)、环境信息处理 (environmental

information processing)、生物体系统(organismal systems)等功能均呈现一定相关性。

在 Level 2 水平上, 2 组幼虫肠道菌群基因与 35 类代谢通路相关, 其中有 11 类代谢通路具有显著性差异, 与新陈代谢相关的 3 类通路

碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism) ($P < 0.01$)、能量代谢(energy metabolism) ($P < 0.01$)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism) ($P < 0.05$) 在利福平处理后均显著下调, 原核细胞群落(cellular community-prokaryotes) ($P < 0.05$)、信号转导(signal transduction) ($P < 0.01$) 通路显著上升, 而折叠分类和降解(folding, sorting and degradation) ($P < 0.05$)、全局和概述图谱(global and overview maps) ($P < 0.05$)、复制修复(replication and repair) ($P < 0.05$)、翻译(translation) 通路均显著下降 ($P < 0.05$)。同时还发现菌群中涉及内分泌和代谢疾病(endocrine and metabolic diseases) ($P < 0.05$) 的基因丰度在利福平处理后显著下降, 而与抗生素耐药性(drug resistance: antimicrobial) ($P < 0.001$) 相关的基因丰度显著上升。

3 讨论

昆虫肠道微生物与昆虫个体具有密切且稳定的协作共生关系, 参与昆虫营养吸收、免疫防御、生长发育、解毒代谢等相关生理过程^[1]。合适的抗生素能够从一定程度上干扰、抑制甚至消除昆虫肠道内共生菌, 为进一步研究“肠道细菌-昆虫宿主”相互关系奠定技术基础。因此, 本研究选用代表性水生昆虫红裸须摇蚊为研究对象, 采用高通量测序技术对利福平处理前后的幼虫肠道菌群 16S rRNA 基因片段 V3-V4 区进行测序, 揭示抗生素作为外源因子对摇蚊幼虫肠道内细菌群落的直接影响。通过比较群落组成、特定菌株丰度变化及预测相关功能, 进一步分析平衡且稳定的肠道微生态对摇蚊宿主的潜在作用。

3.1 红裸须摇蚊幼虫肠道菌群结构与组成分析

基于 OTU 注释结果分析, 12 个样品共获得 21 门、45 纲、114 目、206 科、395 属、569 种、

820 个 OTU, 测序深度达到 99% 以上, 其结果可以有效反映出红裸须摇蚊幼虫肠道细菌群落组成。在门水平上, 利福平处理前后变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*) 以及拟杆菌门(*Bacteroidota*) 的丰度均占比较大, 优势明显, 其余门类占比较小, 这与早期研究中报道的在摇蚊(*Chironomus transvaalensis*) 与跳虫(*Proisotoma minuta*) 肠道中存在的核心菌门具有一致性^[29]。变形菌门(*Proteobacteria*) 是昆虫肠道中的优势菌群, 它们中某些特定细菌类群可以通过去除污染物中的氨氮、硝酸盐以及亚硝酸盐来达到净化有机物等污染物的目的, 从而使宿主对环境产生较强的适应能力^[30-31]。

3.2 利福平处理降低摇蚊幼虫肠道菌群多样性且改变特定细菌组成

α 与 β 多样性分析发现, 与正常组对比, 利福平处理后的摇蚊幼虫肠道群落多样性及整体丰度均呈现显著性下降趋势, 证实利福平能够降低红裸须摇蚊肠道群落多样性, 抑制特定菌株的生长繁殖。抗生素处理草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)、梨小食心虫(*Grapholita molesta*)、介体灰飞虱(*Laodelphax striatellus*) 等昆虫的研究均表明抗生素会改变宿主体内微生物的群落结构, 降低宿主肠道菌群的多样性水平并促使微生物在个体间的差异减小, 这与我们的研究结果具有相似性^[32-34]。

在环境因子胁迫下, 具有特殊功能的细菌种类可能会加快繁殖以帮助宿主抵御环境变化, 而其他菌株相应减少, 以达到群落平衡^[35]。在门水平上, 抗生素处理后拟杆菌门(*Bacteroidota*) 和脱硫弧菌门(*Desulfobacterota*) 的相对丰度显著上调, 分别从 18.99% 上调至 30.87% 以及从 0.37% 上调至 14.61%, 诸多研究曾报道这 2 个门中含有部分利福平抗性菌群^[34,36]。Kerry 等^[35] 在研究中发现, 投放抗生素后养殖池中具抗生

素抗性的细菌数量显著增加,这从侧面反映了环境或底栖生物组织中存在抗生素耐受细菌,可能是由于微生物存在内在抗性基因,或随机突变表达潜在抗性基因而导致宿主耐受现象的出现。与此同时,红裸须摇蚊幼虫肠道内不动杆菌门(*Actinobacteriota*) ($P<0.01$)、梭杆菌门(*Fusobacteriota*) ($P<0.05$)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*) ($P<0.05$)的相对丰度呈显著下降的趋势。

在属水平上,幼虫肠道菌群缺失样品中理研菌科 RC9 肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*) ($P<0.001$)、粘螺旋菌属(*Mucispirillum*) ($P<0.001$)、泰泽雷拉菌属(*Tyzzera*) ($P<0.05$)显著上调,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*) ($P<0.01$)相对丰度呈下降趋势,说明它们的生长受利福平抑制。理研菌科 RC9 肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)属于拟杆菌门理研菌科,该类群含还原酶家族,可以产氢以选择性中和细胞毒性,内源性氢可以抑制促炎因子^[37-38]。利福平处理后,理研菌科 RC9 肠道群(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)相对丰度在短期内上调,推测该变化能够辅助机体应对肠道群落紊乱导致的急性氧化应激^[39]。假单胞菌属(*Pseudomonas*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)在正常组内平均丰度分别为 5.7%、6.0%及 1.3%,而经利福平处理后平均丰度均低于 0.01%。我们对于利福平处理前后的红裸须摇蚊幼虫肠道菌群进行分离培养,并对各单菌落进行测序以确定菌物,其中包含假单胞菌属(*Pseudomonas*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)菌种。利福平处理能够完全抑制筛选出的可培养细菌(未发表数据),这与本研究测序结果趋势吻合。假单胞菌属(*Pseudomonas*)在阿莫西林和庆大霉素处理后丰度下降,家蝇(*Musca domestica*)发育进

程减缓^[40]。耶尔森菌属(*Yersinia*)的相对丰度在 K_2CrO_4 处理后相对丰度上升,使摇蚊(*Chironomus transvaalensis*)对重金属铬具有一定的抗性^[41]。与此同时,经利福平处理后的红裸须摇蚊幼虫对于有机磷农药毒死蜱胁迫表现出抗性下降的特点^[42],本研究发现脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)相对丰度显著减少($P<0.01$),该菌种可以通过将农药进行转化而使宿主具有耐农药的特征^[43],提示其丰度变化可能与个体抗逆性相关。上述菌株在摇蚊肠道群落内可能发挥相似作用,有利于维持宿主个体的健康及环境适应性。

3.3 利福平干扰红裸须摇蚊幼虫肠道细菌群落内相互作用关系

微生物群落通过其中的相互作用来维持生态系统功能和结构的稳定性^[44]。在我们的共线性网络中,大多数节点属于变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*),也是红裸须摇蚊幼虫肠道中的优势菌群,表明它们可能是影响微生物群落稳定性的重要因素。已有研究证明,相对丰度较高的微生物通过其数量的改变影响微生物群落的结构组成与多样性^[45]。红裸须摇蚊幼虫肠道菌群相关性网络图表明,利福平处理之后红裸须摇蚊幼虫肠道菌群间正相关比例增加,菌群间相互关系减少,菌群结构稳定性大幅下降。我们的结果进一步证明,环境可以通过改变微生物群落中微生物间相关性的数量与具正相关关系的比例来改变菌群的稳定性^[46]。由此推断,环境引起的微生物群落改变可能会通过间接引发宿主生理状态的紊乱而导致不良后果的出现。

3.4 利福平处理后细菌群落的代谢功能与耐药性相关

通过 Tax4Fun 对摇蚊幼虫肠道菌群基因的 KEGG pathway 注释发现菌群基因功能与碳水化合物代谢和氨基酸代谢明显相关,这与陈建

秀等^[47]对于跳虫的研究结果具有高度相似性,这可能与摇蚊幼虫主要以底泥中的藻类、真菌、树叶、动植物残骸以及淤泥为食相关^[48-49]。此外,本研究样本中涉及内分泌和代谢疾病(endocrine and metabolic diseases)的基因丰度在利福平处理后显著下降($P < 0.05$),而与抗生素耐药性(drug resistance: antimicrobial)相关的基因丰度显著上升($P < 0.001$),这表明在红裸须摇蚊幼虫肠道内很可能存在耐药性和致病性(或潜在致病性)菌株^[29]。然而想要进一步确定它们的肠道内是否存在这些菌株,还需要结合传统培养法对这些菌株进行进一步分离鉴定。这一结果再次有力地证明了摇蚊幼虫肠道中的微生物群落可以在抵御不利因素方面发挥关键作用。然而,基于16S rRNA基因片段的Tax4Fun分析并不能取代全基因组来完全说明其中真正存在的功能,因此,这些功能是否与利福平的外界影响存在直接相关性以及肠道细菌是否在该过程中发挥着具体作用还有待通过宏基因组学或其他技术手段进一步研究。

4 结论

在本研究中,我们利用16S rRNA基因测序技术首次对利福平处理前后红裸须摇蚊幼虫肠道微生物群落进行了研究,确定了以变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)以及拟杆菌门(*Bacteroidota*)为核心的菌群。1 g/L利福平处理改变了摇蚊幼虫肠道菌群结构及多样性,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)相对丰度呈下降趋势。此外,利福平处理使摇蚊幼虫肠道内群落相互关系变弱,结构稳定性大幅降低。预测差异代谢通路比较结果揭示抗生素处理后,红裸须摇蚊幼虫肠道内与内分泌和代谢类疾病相关功能的

基因丰度显著下降,同时与抗生素抗药性相关功能基因丰度显著上升。根据这些发现,我们认为使用利福平干扰摇蚊幼虫肠道微生态环境,为探寻水生昆虫肠道群落在个体生长发育、营养吸收、免疫调节、解毒代谢等方面的潜在功能提供更多的线索与思路。同时,研究外源污染物胁迫下摇蚊幼虫肠道微生物环境可以促进了解耐污种应对环境污染具有的抗性机制,并为进一步研究机体的解毒过程提供理论依据。

参考文献

- [1] AKMAN GE, DOUGLAS AE. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 276(1658): 987-991.
- [2] SELA R, HALPERN M. Seasonal dynamics of *Chironomus transvaalensis* populations and the microbial community composition of their egg masses[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(24): fnaa008.
- [3] SELA R, LAVIAD-SHITRIT S, HALPERN M. Changes in microbiota composition along the metamorphosis developmental stages of *Chironomus transvaalensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 586678.
- [4] 王婉强. 家蝇对铅的耐受性及转运机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2021. WANG WQ. Study on tolerance and transport mechanism of lead in *Musca domestica*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [5] ARÉVALO-CORÉS A, MEJIA-JARAMILLO AM, GRANADA Y, COATSWORTH H, LOWENBERGER C, TRIANA-CHAVEZ O. The midgut microbiota of Colombian *Aedes aegypti* populations with different levels of resistance to the insecticide lambda-cyhalothrin[J]. *Insects*, 2020, 11(9): 584.
- [6] CHENG D, GUO Z, RIEGLER M, XI Z, LIANG G, XU Y. Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 13.
- [7] ARMITAGE PD, CRANSTON PS, PINDER LCV. *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges*[M]. London: Springer Dordrecht, 1980.

- [8] 齐鑫, 马勇军, 潘志祥. 水环境中的摇蚊幼虫研究进展[J]. 台州学院学报, 2008, 30(6): 38-42.
 QI X, MA YJ, PAN ZX. Progress about chironomid larvae in water environment[J]. Journal of Taizhou University, 2008, 30(6): 38-42 (in Chinese).
- [9] 任淑智. 北京地区河流中大型底栖无脊椎动物与水质关系的研究[J]. 环境科学学报, 1991, 11(1): 31-46.
 REN SZ. Investigation on macroinvertebrate community and water quality in steams in Beijing area[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 1991, 11(1): 31-46 (in Chinese).
- [10] 公茂庆, 刘宏美, 臧传慧. 蚊虫肠道微生物多样性及其功能的研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2022, 33(4): 608-612.
 GONG MQ, LIU HM, ZANG CH. Research progress on diversity and function of mosquito gut microbe[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2022, 33(4): 608-612 (in Chinese).
- [11] 舒凤月, 孔亮, 王赛迪, 訾芳芳. 山东南四湖摇蚊幼虫群落结构及其对富营养化过程的指示[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(1): 141-146.
 SHU FY, KONG L, WANG SD, ZI FF. Chironomid larva community and indication to eutrophication progress in Lake Nansi, Shandong, China[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2013, 19(1): 141-146 (in Chinese).
- [12] SUN ZY, SUN WW, AN JT, XU HX, LIU Y, YAN CC. Copper and chlorpyrifos stress affect the gut microbiota of chironomid larvae (*Prosilocerus akamusi*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 244: 114027.
- [13] CAI T, ZHANG YH, LIU Y, DENG XQ, HE S, LI JH, WAN H. *Wolbachia* enhances expression of NICYP4CE1 in *Nilaparvata lugens* in response to imidacloprid stress[J]. Insect Science, 2021, 28(2): 355-362.
- [14] CEJA-NAVARRO JA, VEGA FE, KARAOZ U, HAO Z, JENKINS S, LIM HC, KOSINA P, INFANTE F, NORTEN TR, BRODIE EL. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee[J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 1-9.
- [15] 苏奇, 潘慧鹏, 王少丽, 吴青君, 徐宝云, 张友军. 三种抗生素对 B 型和 Q 型烟粉虱内共生菌的去除效果比较研究[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(1): 190-196.
 SU Q, PAN HP, WANG SL, WU QJ, XU BY, ZHANG YJ. A comparative study of the removal of endosymbionts in *Bemisia tabaci* biotypes B and Q using three antibiotics[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(1): 190-196 (in Chinese).
- [16] ROSENGAUS RB, ZECHER CN, SCHULTHEIS KF, BRUCKER RM, BORDENSTEIN SR. Disruption of the termite gut microbiota and its prolonged consequences for fitness[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4303-4312.
- [17] SAETHER OA. Glossary of chironomid morphology terminology (*Diptera: Chironomidae*)[J]. Entomologica Scandinavica Supplement, 1980, 14: 1-51.
- [18] FADROSH DW, MA B, GAJER P, SENGAMALAY N, OTT S, BROTMAN RM, RAVEL J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. Microbiome, 2014, 2(1): 6.
- [19] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [20] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet Journal, 2011, 17: 10-12.
- [21] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [22] EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, QUINCE C, KNIGHT R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [23] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(database issue): 590-596.
- [24] HALL M, BEIKO RG. 16S rRNA gene analysis with QIIME2[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1849: 113-129.
- [25] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, LESNIEWSKI RA, OAKLEY BB, PARKS DH, ROBINSON CJ, SAHL JW, STRES B, THALLINGER GG, van HORN DJ, WEBER CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [26] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN N, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [27] ABHAUER KP, WEMHEUER B, DANIEL R, MEINICKE P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2882-2884.
- [28] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, KAWASHIMA M, ISHIGURO-WATANABE M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022: gkac963.
- [29] 陈伟, 陈霞, 李娟, 马欣然, 崔薇, 渠凤甜, 谢桂林, 赵红庆. 三种跳虫肠道菌群的多样性分析及功能预测[J]. *昆虫学报*, 2020, 63(4): 450-461.
CHEN W, CHEN X, LI J, MA XR, CUI W, QU FT, XIE GL, ZHAO HQ. Diversity analysis and function prediction of gut microbiota in three springtail species[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63(4): 450-461 (in Chinese).
- [30] 宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 梁峰. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性[J]. *生物技术*, 2015, 25(5): 481-486.
SONG ZQ, WANG L, LIU XH, LIANG F. Diversities of *Firmicutes* in four hot springs in Yunnan and Tibet[J]. *Biotechnology*, 2015, 25(5): 481-486 (in Chinese).
- [31] 王皓, 钱琪卉, 丁瑞睿, 钟耀华, 周春晓, 王振, 巫厚长. 复合潜流人工湿地对农村生活污水的净化效果及其微生物群落结构特征[J]. *安徽农业大学学报(自然科学版)*, 2021, 47(6): 962.
WANG H, QIAN QH, DING RR, ZONG YH, ZHOU CX, WANG Z, WU HZ. Performances of a hybrid horizontal subsurface-flow constructed wetland system treating on rural domestic sewage and its microbial community structure characteristics[J]. *Journal of Anhui Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2021, 47(6): 962 (in Chinese).
- [32] CHEN Y, ZHOU H, LAI Y, CHEN Q, YU XQ, WANG X. Gut microbiota dysbiosis influences metabolic homeostasis in *Spodoptera frugiperda*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 727434.
- [33] ZHANG X, LI TP, ZHOU CY, ZHAO DS, ZHU YX, BING XL, HHUANG HJ, HONG XY. Antibiotic exposure perturbs the bacterial community in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*[J]. *Insect Science*, 2020, 27(5): 895-907.
- [34] ZHANG X, WANG X, GUO Z, LIU X, WANG P, YUAN X, LI Y. Antibiotic treatment reduced the gut microbiota diversity, prolonged the larval development period and lessened adult fecundity of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)[J]. *Insects*, 2022, 13(9): 838.
- [35] KERRY J, COUNE R, GILROY D, HINEY M, SMITH P. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy[J]. *Aquaculture*, 1996, 145(1/4): 31-39.
- [36] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 417-433.
- [37] HATHOUT AS, ALY SE. Biological detoxification of mycotoxins: a review[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 905-919.
- [38] CHEN X, ZUO Q, HAI YD, SUN XJ. Lactulose: an indirect antioxidant ameliorating inflammatory bowel disease by increasing hydrogen production[J]. *Medical Hypotheses*, 2011, 76(3): 325-327.
- [39] NI QR, ZHANG P, LI Q, HAN ZY. Oxidative stress and gut microbiome in inflammatory skin diseases[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 849985.
- [40] LI T, ZHANG Q, ZHANG X, WAN Q, WANG S, ZHANG R, ZHANG Z. Transcriptome and microbiome analyses of the mechanisms underlying antibiotic-mediated inhibition of larval development of the saprophagous insect *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 223: 112602.
- [41] SENDEROVICH Y, HALPERN M. The protective role of endogenous bacterial communities in chironomid egg masses and larvae[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2147-2158.
- [42] SUN ZY, LIU Y, XU HX, YAN CC. Genome-wide identification of P450 genes in chironomid *Prosimulium akamusi* reveals candidate genes involved in gut microbiota-mediated detoxification of chlorpyrifos[J]. *Insects*, 2022, 13(9): 765.
- [43] DELLA-NEGRA O, CHAUSSONNERIE S, FONKNECHTEN N, BARBANCE A, MUSELET D, MARTIN DE, FOUTEAU S, FISCHER C, SAAIDI PL,

- le PASLIER D. Transformation of the recalcitrant pesticide chlordecone by *Desulfovibrio* sp. 86 with a switch from ring-opening dechlorination to reductive sulfidation activity[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1-14.
- [44] 周石磊, 黄廷林, 张春华, 白士远, 何秀秀. 基于 MiSeq 的好氧反硝化菌源水脱氮的种群演变[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(4): 1125-1135.
ZHOU SL, HUANG TL, ZHANG CH, BAI SY, HE XX. Bacterial community structures of aerobic denitrification bacteria nitrogen removal process in source water experiment by using MiSeq high-throughput sequencing technique[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(4): 1125-1135 (in Chinese).
- [45] XIONG W, JOUSSET A, GUO S, KARLSSON I, ZHAO QY, WU HS, KOWALCHUK GA, SHEN QR, LI R, GEIGEN S. Soil protist communities form a dynamic hub in the soil microbiome[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(2): 634-638.
- [46] HERNANDEZ DJ, DAVID AS, MENGES ES, SEARCY CA, AFKHAMI ME. Environmental stress destabilizes microbial networks[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(6): 1722-1734.
- [47] 陈建秀, 麻智春, 严海娟, 张峰. 跳虫在土壤生态系统中的作用[J]. *生物多样性*, 2007, 15(2): 154-161.
CHEN JX, MA ZC, YAN HJ, ZHANG F. Roles of springtails in soil ecosystem[J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(2): 154-161 (in Chinese).
- [48] CUMMINS KW, KLUG MJ. Feeding ecology of stream invertebrates[J]. *Feeding Ecology of Stream Invertebrates*, 1979, 10: 147-172.
- [49] HENRIQUES-OLIVEIRA A, NESSIMIAN J, DORVILLE L. Feeding habits of chironomid larvae (*Insecta: Diptera*) from a stream in the Floresta Da Tijuca, Rio de Janeiro, Brazil[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2003, 63(2): 269-281.