

研究报告

高通量测序探究啮食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫的肠道菌群结构

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*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】塑料废物处理是世界环境难题, 近期有研究报道黄粉虫可啮食聚苯乙烯泡沫塑料, 肠道细菌可能在黄粉虫生物降解塑料的过程中起重要作用。本文以啮食聚苯乙烯泡沫塑料的黄粉虫幼虫(*Tenebrio molitor*)为材料, 探究其肠道细菌的多样性和细菌群落组成。【方法】分别以聚苯乙烯泡沫塑料(聚苯乙烯组)和纸片(对照组)为唯一食物来源喂养黄粉虫幼虫, 在 90 d 后采集粪便样品, 对 16S rRNA 基因 V3–V4 区进行 PCR 扩增和高通量测序, 并以 PICRUST 进行肠道菌群的功能预测。【结果】饲喂期间, 两组黄粉虫均正常存活, 部分幼虫完成变态发育。泡沫塑料有明显的减重。样本测序共得到 144 258 条有效序列, 179 个 OTU, 共涉及 10 个门 111 个属。其中, 聚苯乙烯组黄粉虫的肠道细菌在属水平高丰度的是 *Alcaligenes* (35.9%)、*Brevundimonas* (12.3%)、*Myroides* (10.3%)。基于 16S rRNA 基因序列的功能预测表明, 在聚苯乙烯组中, 芳香类化合物的降解基因被明显富集。【结论】高通量测序揭示了啮食聚苯乙烯泡沫塑料的黄粉虫肠道菌群的多样性, 这对从黄粉虫肠道中分离高效降解聚苯乙烯的细菌具有指导意义。

关键词: 聚苯乙烯, 黄粉虫, 生物降解, 肠道菌群结构

Gut microbiota of polystyrene-eating mealworms analyzed by high-throughput sequencing

CHEN Guan-Zhou ZHANG Bai-Lu JI Meng-Meng WU Xiao-Gang ZHOU Jun-Yi
CHEN Jia-Nan WANG Yun TIAN Hao ZHANG Xiao-Jun*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Recently, researchers reported that polystyrene-eating mealworms (*Tenebrio molitor*) can degrade plastic and the key point might be gut microbiota, which may open a new way to solve the global plastic pollution problem. We try to explore the structure of microbial communities in the polystyrene-eating mealworms' gut. [Methods] Mealworms were divided into 2 groups fed with polystyrene or paper for 90 days. After that, bacterial community structure of their

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21177086); Shanghai International Collaboration Program (No. 12230706800)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

Received: April 14, 2017; Accepted: May 10, 2017; Published online (www.cnki.net): June 06, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21177086); 上海市国际合作项目(No. 12230706800)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-14; 接受日期: 2017-05-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-06

gut microbiota were studied by high-throughput sequencing targeting V3–V4 regions of 16S rRNA gene. PICRUSt was used to predict the community function based on their 16S rRNA gene sequences. **[Results]** In total, 144 258 high-quality sequences and 174 OTUs were obtained, which were classified into 111 genera in 10 phyla. The three most dominant bacterial genera in polystyrene-eating mealworms' gut were *Alcaligenes*, *Brevundimona* and *Myroides*, ranked by the relative abundance. The genes related to aromatic compounds degradation were significantly enriched in the polystyrene-eating group. **[Conclusion]** The result indicated the diversity of bacterial community in the gut of polystyrene-eating group, which may guide the isolation of the bacteria that can degrade polystyrene.

Keywords: Polystyrene, Mealworm, Biodegradation, Gut microbiota structure

石油化工生产的塑料废物污染是世界环境难题,大部分塑料一次性使用后即被丢弃。一般认为,因为塑料产品物理和化学结构稳定,其在自然环境里可能数十甚至数百年不会被分解^[1-2]。根据欧洲塑料工业协会(Plastics Europe)的数据,2015 年全球共消费 3.22 亿 t 塑料,其中聚苯乙烯类塑料占 6.9%。研究表明,聚苯乙烯在污泥、土壤、粪肥微生物群落里,4 个月仅降解 0.01%–3.00%^[3-5],通常被认为是不能被生物降解的^[1-3]。

黄粉虫(*Tenebrio molitor*)又叫面包虫,幼虫一般长 20 mm–25 mm,成虫是黑色甲虫。黄粉虫幼虫现已被人工大量饲养用作动物饲料或者提取化工原料^[6]。中学生陈重光在养鸟时发现,她铺在养黄粉虫幼虫盒子里的泡沫塑料上有细小的噬咬痕迹。沈叶红根据这一现象在实验室中观察到黄粉虫幼虫能取食聚苯乙烯泡沫塑料,且幼虫有明显的生长现象,并从啃食聚苯乙烯的黄粉虫幼虫肠道中分离出 8 株菌,但这 8 株菌并不能单独降解聚苯乙烯^[7]。Yang 等发现啃食聚苯乙烯泡沫塑料的黄粉虫幼虫能在 1 d 内有效降解聚苯乙烯,并能存活 1 个月以上^[8];他们还证明了其肠道微生物在此过程中的主导作用,同时在幼虫肠道中分离出一株以聚苯乙烯为唯一碳源进行生长的聚苯乙烯降解菌——微小杆菌 YT2 (*Exiguobacterium* sp. YT2)。在液体培养 60 d 的条件下,该菌能够降解 7.4%±0.4%的聚苯乙烯^[9]。以上研究表明,昆虫肠道内快速生物降解是开发生物降解高分子材料的可行途径之一。但是对于黄粉虫幼虫肠道内能够降解聚苯乙烯的菌群了解甚少,

而且尚未分离得到真正能高效降解聚苯乙烯的细菌。

近年来,高通量测序技术因其信息量大、快速、准确性不断提高等优势,促进了昆虫肠道菌群及其功能基因的研究^[10],被广泛应用于蜜蜂^[11]等昆虫的肠道微生物研究中。但是利用高通量测序技术对黄粉虫肠道微生物进行研究,在国内外鲜有报道。本研究通过 Illumina MiSeq 平台测序,测定黄粉虫幼虫肠道细菌的组成及其相对丰度,并通过比较不同饮食饲喂的黄粉虫肠道细菌种类和预测功能的差异,试图探索其肠道细菌在聚苯乙烯降解中的作用,为进一步分离出高效塑料降解菌作初步尝试。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验所用黄粉虫幼虫购自上海闵行花鸟市场,在室温(25±2) °C 的实验室环境下饲养。

1.2 主要试剂和仪器

Pfx DNA 聚合酶体系,美国 Invitrogen 公司; AMPure XP 磁珠,美国 Beckman 公司。MiSeq 测序仪,美国 Illumina 公司;核酸电泳仪,北京市六一仪器厂;金属浴、冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;真空冷冻干燥仪,美国 SAVANT 公司;凝胶成像系统,上海天能公司;PCR 仪,美国 ABI 公司;台式离心机,德国 Heraeus 公司。

1.3 黄粉虫的饲养

在室温(25±2) °C 的实验室环境下饲养黄粉虫,分为两组(除了饮食来源,其余条件均保持一致),

一组只饲喂纸片(对照组); 一组只饲喂泡沫塑料(聚苯乙烯组), 每组各 50 只。饲养过程中保持空气湿度 55%–70%, 每隔 72 h 喷洒一次无菌水。

1.4 收集粪便

饲喂 90 d 后, 采用无菌勺收集新鲜粪便, 冻存在 -80°C , 待后续实验使用。同时在饲喂过程中, 每 10 d 清洗一次培养罐, 保持培养罐的湿度、温度恒定。

1.5 提取总 DNA

使用第 90 天采集到的粪便, 采用参考文献[12]的方法进行菌群总 DNA 的提取。

1.6 肠道菌群 16S rRNA 基因 V3–V4 区建库和 Illumina 测序

测序实验按照 Illumina 指南进行, 并进行部分改进^[13]。首先对细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区片段进行扩增。引物是带测序接头的 V3–V4 区通用引物, 上游引物为 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3', 下游引物为 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'。用 Pfx DNA 聚合酶体系进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 1.6 \times Pfx 扩增缓冲液, 1 mmol/L MgSO_4 , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ V3–V4 区上下游引物, 10 ng 模板 DNA, 0.75 U Pfx DNA 聚合酶。PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 共 23 个循环; 72°C 8 min。PCR 产物主条带在 550 bp 左右, 参照操作指南利用 AMPure XP 磁珠对 25 μL V3–V4 区扩增产物进行纯化。利用 Nextera XT Index Kit 通过 Index PCR 在 V3–V4 区扩增产物两侧加上双端标签和 Illumina 测序接头, 产物主条带在 630 bp 左右。参照操作指南利用磁珠对 PCR 产物进行纯化。纯化产物测定浓度后, 所有样本等 DNA 量进行混合, 作为 Illumina MiSeq 上机文库。在测序平台上利用 MiSeq V3 试剂盒进行双端 300 bp 测序, 上样浓度为 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$, Phix 比例为 25%。

1.7 Illumina 测序数据的质控和生物信息学分析

同一条测序序列的上下游两端都从第一个质

量 q 值 ≤ 2 的碱基处截断。把两端序列合并成一条完整序列。舍弃完整长度小于 400 bp 且预期错误大于 0.5 的序列^[14]。利用 USEARCH^[14]对代表序列进行 OTU 划分。利用 UCHIME^[15]以 RDP 数据库(V9)为参照进行嵌合体筛查^[16]。再用 UPARSE^[17]全局比对算法按 97%相似性阈值将高质量序列归入相应的 OTU 中, 获得样本 OTU 矩阵表。之后的操作是基于 QIIME 平台(V1.8)进行^[18]。Alpha 多样性以 Shannon 多样性指数来表征。OTU 的代表序列用 FastTree 进行进化树构建, 在 RDP 数据库(分类器版本 V2.10)中按 80%阈值鉴定分类地位。

1.8 基于 16S rRNA 基因序列的菌群功能预测

PICRUSt (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 的原理是基于已测细菌基因组的 16S rRNA 基因序列, 作为推断相似细菌的功能基因谱的依据, 构建细菌域全谱系的基因功能预测谱, 最后将测序得到的菌群 16S rRNA 基因的类型和丰度“映射”到数据库中, 对菌群的代谢功能进行预测^[19]。在 QIIME 中使用 Greengenes 中最新的可用参考 OTU 数据库 (gg_13_5_otus) 划分 OTU, 后续步骤基于在线分析平台 (<http://picrust.github.io/picrust/>) 进行。

2 结果与分析

2.1 黄粉虫幼虫啮食聚苯乙烯泡沫塑料

两组黄粉虫都正常生长, 且部分幼虫能完成变态发育并能繁殖后代。如图 1 所示, 啮食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫会在泡沫中“打洞”且泡沫减重明显。

2.2 测序结果

高通量测序后, 切除引物序列并删除无法与 Index PCR 引物匹配的序列, 共得到 144 258 条(共 7 个样本, 平均每个样本得到 19 254 条); 设定参数使小于 10 条的 Unique 序列不参与 OTU 划分; 基于 UPARSE 算法, 以 97%的相似性划分出 183 个 OTU, 其中 4 个被认为是嵌合体而被移除, 最终获得 179 个 OTU。



图1 黄粉虫幼虫啮食聚苯乙烯泡沫塑料
Figure 1 Polystyrene-eating behavior of mealworms (*T. molitor*)

2.3 肠道细菌物种多样性评估

Shannon-Wiener 曲线利用各样品的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线, 以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。如图 2A 所示, 该测序深度下, 曲线已趋向平坦, 说明测序数据量足够大, 可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。同时对对照组的 Shannon 指数大于聚苯乙烯组(图 2B, 该图是在测序深度为 10 510 下所做, 经 *t*-test, $P < 0.01$, 两组 α -多样性差异显著), 这说明对照组的肠道菌群多样性显著高于聚苯乙烯组。

2.4 黄粉虫肠道细菌群落结构

为了探究聚苯乙烯组和对照组的肠道细菌结构的差异, 在 OTU 水平基于 Bray-Curtis 距离进行 PCoA 分析(图 3A)。两组的菌群结构差异显著, PCoA 1 解释了整体菌群 94.57% 的变异度, PCoA 2 解释了整体菌群 4.21% 的变异度。PCoA 1 可能是饮食来源的差异, 说明黄粉虫肠道菌群对泡沫塑料的降解潜力。聚苯乙烯组和对照组共得到 179 个 OTU, 两组有 51.1% 为共有 OTU, 但绝大部分是低丰度的。如果去掉相对丰度 $< 0.5\%$ 的 OTU, 两组则仅有 4 个共有 OTU。利用 RDP 分类器, 聚苯乙烯组面包虫肠道菌群在属水平上的分布如图 3B 所示, 对照组如图 3C 所示。聚苯乙烯组最多的是 *Alcaligenes*、*Brevundimonas* 和 *Myroidesae*, 所占比例分别为 35.9%、12.3% 和 10.3%; 对照组最多的是 *Serratia*、*Staphylococcus*、*Proteus* 和 *Brevibacterium*, 所占比例分别为 21.5%、15.8%、11.8% 和 7.8%。可以看出两者菌群分布明显不同。在属水平上的分析发现, 黄粉虫肠道细菌有不少序列不能确定到属水平, 这说明了黄粉虫肠道菌群的多样性, 特别是聚苯乙烯组黄粉虫肠道菌群, 可能有与塑料降解相关的未知的细菌类群。

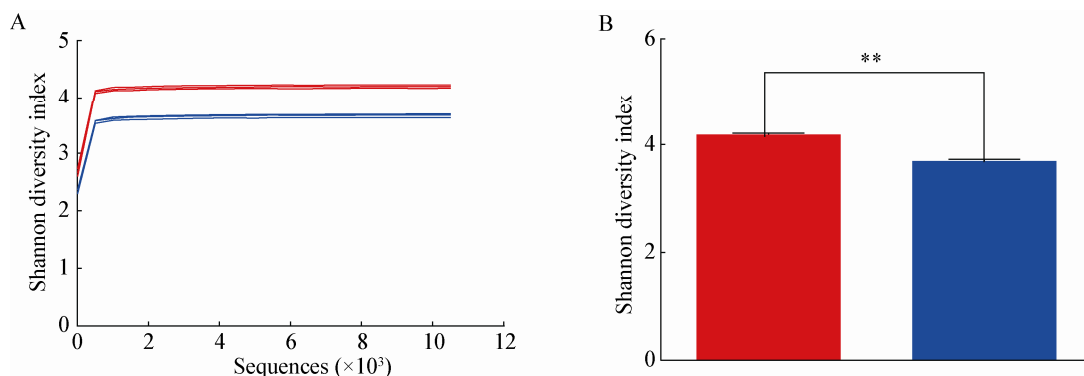


图2 香农多样性指数曲线
Figure 2 Shannon diversity index curves

注: A 表示两组的菌群多样性; B 为选取同一测序深度($n=10\ 510$)对比两组的菌群多样性。红色: 对照组; 蓝色: 聚苯乙烯组。

Note: Figure A represents the α -diversity within two groups. Shannon diversity index curve (B) reflects that α -diversity was significantly higher in paper eating group than that in plastic eating group. Red: Paper-eating group; Blue: Polystyrene-eating group.

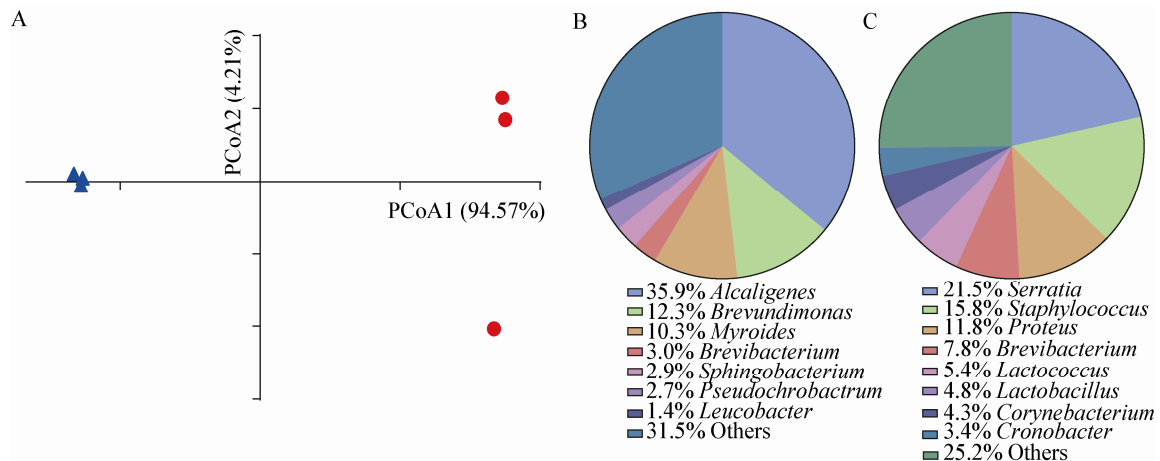


图3 基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析(A)及聚苯乙烯组(B)和对照组(C)黄粉虫的肠道细菌结构
Figure 3 Bray-Curtis PCoA plot (A) and the gut microbiota structure of Polystyrene-eating (B) and Paper-eating mealworms (C)

注: ●: 对照组; ▲: 聚苯乙烯组.

Note: ●: Paper-eating group; ▲: Polystyrene-eating group.

2.5 功能预测

通过 PICRUSt 对 16S rRNA 基因进行功能预测, 结果获得 328 个预测的功能, 功能通路中含有众多与芳香类和烷烃降解相关的基因。图 4 是与芳香族和烃类化合物降解功能相关的通路丰度热图。数值经 log 转化, 数据大小代表预测表达量的多少, 越大代表相关通路表达量越高, P 值为同一代谢通路组间 t -test 检验的结果, 其中*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。聚苯乙烯组的菌群在污染物降解相关通路的丰度显著高于对照组, 表明该组中芳香类化合物的降解基因携带菌得到明显富集。

3 结论与讨论

Yun 等^[10]对大量不同种昆虫(218 个种)的肠道菌群多样性的研究表明, 昆虫肠道中的优势菌群主要隶属于 Proteobacteria 和 Firmicutes 两大门。本文通过高通量测序发现, 在门水平对照组黄粉虫肠道中均包含 Proteobacteria 和 Firmicutes 两门的细菌, 对照组中此两门的丰度合计超过了 84%, 而在聚苯乙烯组的肠道菌群中 Firmicutes 丰度较低, 可能塑

料对它们的正常肠道菌群造成了较大的影响。

具颚的昆虫可以咀嚼和吃掉粮食的塑料包装^[20-22], 这一现象被来自不同国家和地区的研究人员在仓库和厨房等场景下发现。本研究在培养过程中观察到啮食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫会在泡沫中“打洞”(图 1), 泡沫塑料减重明显。沈叶红^[7]发现黄粉虫能取食聚苯乙烯泡沫塑料, 有明显的生长现象, 并采用 NA 与 LB 两种培养基对黄粉虫肠道微生物进行好氧培养, 在以聚苯乙烯为唯一食物来源的组中分离出 8 株菌, 分别是 *Stenotrophomonas*、*Serratia*、*Bacillus subtilis*、*Enterobacter* sp.、*Bacterium*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas maltophilia* 和 *Citrobacter*。在本研究中 *Serratia* 和 *Staphylococcus* 在对照组显著多于聚苯乙烯组, 同时它们在聚苯乙烯组相对丰度较低, 可能由于沈叶红^[7]采用的是好氧条件分离, 而我们测序反映的是肠道情况下的厌氧菌群, 这也暗示着之后分离要特别注意氧气条件。

聚苯乙烯组丰度最高的 *Alcaligenes* 属(相对丰度为 35.9%), 可降解多种有机污染物^[23], 如苯氧基乙酸^[24]、对氯苯酚^[25]、原油^[26-30]等。特别是从被

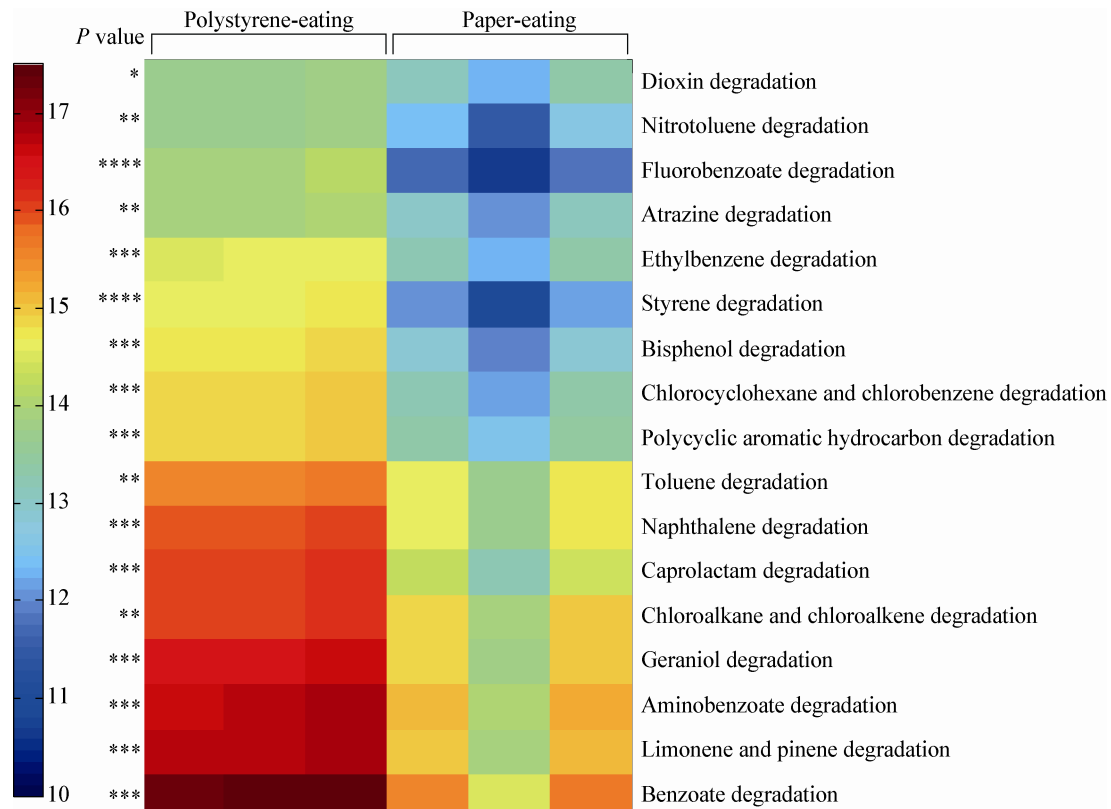


图 4 基于 KEGG 数据库与芳香族化合物和烷烃降解相关的基因预测热图

Figure 4 The heatmap of KO pathways related to aromatic compounds and alkane degradation based on KEGG pathway

石油污染的土壤、水等环境中分离出可降解原油的 *Alcaligenes* 属菌，说明该菌降解石油基塑料的潜力^[26-30]。同时 *Alcaligenes* 属在对照组中相对丰度极低，仅为 0.33%。

Gilan 分离出能够降解聚苯乙烯的纯菌 C208 (*Rhodococcus ruber*)，该菌的降解率可达 8%^[31-32]。在我们的结果中，尽管也检测到 *Rhodococcus* 属菌，但丰度非常小。说明 Gilan 在好氧条件下分离的降解细菌类型，可能并不是肠道环境中发挥主要降解功能的细菌。Atiq 等从埋放聚苯乙烯膜的土壤中分离出 6 种细菌菌株，这些菌株以聚苯乙烯作为唯一碳源并在膜上粘附、生长^[33]。他们通过检测胞外环境中代谢物，发现细菌分离株 *Paenibacillus urinialis* NA26、*Bacillus* sp. NB6 和 *Pseudomonas aeruginosa* NB26 能够从聚苯乙烯的复合分子中提取一些碳，

但该过程非常缓慢，并且塑料没有发生显著的化学变化。相似的细菌类型也在本研究的样品中被检测到，其中聚苯乙烯组检测到 *Rhodococcus*、*Microbacterium*、*Paenibacillus* 和 *Bacillus*，而 *Pseudomonas* 在聚苯乙烯组和对照组均被检测到，但丰度都很低。

Kathiresan 等从来自红树林土壤中分离出的聚乙烯和塑料降解微生物^[34]，其中效率较高的细菌为 *Pseudomonas* sp. 和 *Moraxella* sp.，这两种菌在本次测序中也被发现。Yang 等^[22]首次以全面证据揭示了蜡虫肠道内存在有效降解聚乙烯塑料的细菌，他们从啃食聚乙烯塑料袋的蜡虫肠道中分离出两株可以利用聚乙烯作为唯一碳源进行生长的细菌：*Bacillus* spp. YP1 和 *Enterobacter asburiae* YT1；60 d 液体培养试验表明，聚乙烯膜的减重可达 10%，残

留物的分子量明显降低, 在液体培养基中检测出大量水溶性的低分子量中间产物。本研究中也检测到 *Bacillus* 和 *Enterobacter*。Yoshida 等通过筛选能够分解坚硬塑料的细菌候选者, 发现使用 PET (聚对苯二甲酸乙二醇酯) 作为能量源的菌株 *Ideonella sakaiensis* 201-F6, 能够在 30 °C 下经过 6 个星期完全降解 PET 薄膜, 并发现分离菌株 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 的两种酶能将 PET 分解成为简单的分子结构^[35]。上述 3 篇文章为分离出塑料降解纯菌后的研究提供思路指导。Shahnawaz 等分离出 3 株聚乙烯降解菌分别属于 *Bacillus*、*Lysinobacillus* 和 *Streptomyces*^[36]。本文的研究中在聚苯乙烯组只检测到 *Bacillus* 属细菌。尽管还没有分离获得, 但本研究中聚苯乙烯饲喂组丰度最高的 *Alcaligenes* 属细菌可能是潜在的重要聚苯乙烯降解菌。

利用 PICRUSt 可以基于菌群 16S rRNA 基因的测序数据对菌群的功能进行预测, 被广泛应用于实际研究中, 如多环芳烃污染土壤中微生物降解荧蒽的代谢网络的重建^[37], 全尺寸厌氧污泥消化池中微生物代谢功能的预测^[38]。Wu 等通过 PICRUSt 预测了吸烟人群和未吸烟人群的口腔菌群, 发现共有 83 个基因功能代谢通路存在显著差异, 吸烟大大降低了碳水化合物和能量代谢、异型生物质降解等代谢通路的含量^[39]。本研究利用该方法, 找到 17 个与芳香族化合物和烷烃降解相关的代谢通路, 说明了喂食聚苯乙烯的黄粉虫肠道中细菌参与塑料降解。

约 100 d 饲养过程中, 两组黄粉虫均正常存活, 聚苯乙烯组泡沫塑料有明显的减重。通过连续饲喂聚苯乙烯塑料, 黄粉虫的肠道中富集了一批与聚苯乙烯分解有关的细菌。这些细菌类型与纸片饲喂虫子的肠道菌差异显著, 有关塑料降解相关基因的携带细菌类型在聚苯乙烯组明显得到富集。

参 考 文 献

- [1] Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean[J]. *Science*, 2015, 347(6223): 768-771
- [2] Gautam R, Bassi AS, Yanful EK. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 141(1): 85-108
- [3] Guillet JE, Regulski TW, McAneney TB. Biodegradability of photodegraded polymers. II. Tracer studies of biooxidation of Ecolyte PS polystyrene[J]. *Environmental Science & Technology*, 1974, 8(10): 923-925
- [4] Sielicki M, Focht DD, Martin JP. Microbial degradation of [¹⁴C] polystyrene and 1,3-diphenylbutane[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, 24(7): 798-803
- [5] Kaplan DL, Hartenstein R, Sutter J. Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(3): 551-553
- [6] Ye XQ, Liu DH, Hu C. Some factors' effects on the solubility of protein from yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae[J]. *Journal of Zhejiang University (Science)*, 2001, 2(4): 436-438
- [7] 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)
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
- [8] Yang Y, Yang J, Wu WM, et al. 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] Yang Y, Yang J, Wu WM, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 2. Role of gut microorganisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(20): 12087-12093
- [10] Yun JH, Roh SW, Whon TW, et al. 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
- [11] Engel P, Martinson VG, Moran NA. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(27): 11002-11007
- [12] Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2802-2813
- [13] Zhang QP, Wu YQ, Wang J, et al. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27572
- [14] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [15] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [16] Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D633-D642
- [17] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998

- [18] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [19] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821
- [20] Gerhardt PD, Lindgren DL. Penetration of packaging films: film materials used for food packaging tested for resistance to some common stored-product insects[J]. *California Agriculture*, 1954, 8(6): 3-4
- [21] Riudavets J, Salas I, Pons MJ. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2007, 43(4): 564-570
- [22] Yang J, Yang Y, Wu WM, et al. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(23): 13776-13784
- [23] Don RH, Pemberton JM. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145(2): 681-686
- [24] Pieper DH, Reineke W, Engesser KH, et al. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134[J]. *Archives of Microbiology*, 1988, 150(1): 95-102
- [25] Westmeier F, Rehm HJ. Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptiv immobilized *Alcaligenes* sp. A7-2[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 26(1): 78-83
- [26] Lal B, Khanna S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 81(4): 355-362
- [27] Westlake DWS, Jobson A, Phillippe R, et al. Biodegradability and crude oil composition[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1974, 20(7): 915-928
- [28] Toledo FL, Calvo C, Rodelas B, et al. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29(3): 244-252
- [29] Zahed MA, Aziz HA, Isa MH, et al. Kinetic modeling and half life study on bioremediation of crude oil dispersed by Corexit 9500[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185(2/3): 1027-1031
- [30] Liu J, Huang XF, Lu LJ, et al. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(1/3): 466-473
- [31] Gilan I, Hadar Y, Sivan A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(1): 97-104
- [32] Sivan A, Szanto M, Pavlov V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(2): 346-352
- [33] Atiq N, Ahmed S, Ali MI, et al. Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(14): 1537-1541
- [34] Kathiresan K. Polythene and plastics-degrading microbes from the mangrove soil[J]. *Revista De Biologia Tropical*, 2003, 51(3/4): 629-633
- [35] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199
- [36] Shahnawaz M, Sangale MK, Ade AB. Rhizosphere of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. as a landmark for polythene degrading bacteria[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(14): 14621-14635
- [37] Zhao JK, Li XM, Ai GM, et al. Reconstruction of metabolic networks in a fluoranthene-degrading enrichments from polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318: 90-98
- [38] Gao J, Liu GJ, Li HP, et al. Predictive functional profiling using marker gene sequences and community diversity analyses of microbes in full-scale anaerobic sludge digesters[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(7): 1115-1127
- [39] Wu J, Peters BA, Dominianni C, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(10): 2435-2446