

DOI:10.13350/j.cjpb.220810

• 论著 •

云南省腾冲市 3 种常见蚊虫细菌群落结构及多样性研究^{*}

陈彬¹, 芦新焱¹, 杜春红², 姜丹丹^{3**}, 杨兴^{1**}

(1. 大理大学基础医学院, 云南大理 671000; 2. 云南省地方病防治所; 3. 大理大学公共卫生学院)

【摘要】 目的 探究腾冲市常见蚊虫自然携带的细菌群落结构多样性以及未知细菌。 **方法** 从云南省腾冲市同一地点随机捕捉的 3 种蚊虫, 分别为中华按蚊、三带喙库蚊、致倦库蚊。应用 Illumina NovaSeq 测序平台对这 3 种蚊虫自然携带的细菌 16S rRNA 基因的 V4 高变区进行高通量测序, 将测序数据进行处理分析后用于细菌微生物群落结构及多样性的分析和未知细菌的探究。 **结果** 获得可用于后续分析的 OTU 数目为 2 866 个, 通过绘制稀释曲线, 可以看出本次的测序深度能充分反映这 3 种蚊虫的实际菌群结构。3 种蚊虫及各组样品间既有共有的 OTUs, 也有特有的 OTUs; Alpha 和 Beta 多样性分析显示各蚊种及各组样品之间的物种组成丰度与相似性存在差异, 其中中华按蚊的菌群丰度和多样性高于其他两种蚊虫, 而三带喙库蚊和致倦库蚊的物种组成较为相似。通过对 3 种蚊虫菌群结构的分析, 在门水平上, 变形菌门、厚壁菌门、未明确细菌和放线菌门均是各蚊种共有的优势菌群, 但在各蚊种中相对丰度存在差异; 在属水平上, 各蚊种的优势菌属及其相对丰度均存在显著差异。同时发现菌群中存在葡萄球菌属、变形杆菌属、无形体属、支原体属等大量的致病菌和条件致病菌, 以及未知细菌。 **结论** 在同一环境下, 不同蚊种及同一蚊种不同个体分组之间的细菌微生物群落结构和多样性存在显著差异, 同时各蚊种均携带了致病菌和未知细菌, 对该地区的公共卫生安全具有潜在的隐患。

【关键词】 蚊; 菌群结构; 未知细菌; 高通量测序

【中图分类号】 R384.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)08-0917-07

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Aug.; 17(8):917-923.]

Study on bacterial community structure and diversity of 3 common mosquitoes in Tengchong City, Yunnan Province

CHEN Bin¹, LU Xin-yan¹, DU Chun-hong², JIANG Dan-dan³, YANG Xing¹ (1. Basic Medical College of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China; 2. Yunnan Institute for Endemic Diseases Control and Prevention; 3. School of Public Health, Dali University) ***

【Abstract】 Objective To investigate the bacterial community structure diversity and unknown bacteria naturally carried by common mosquitoes in Tengchong City. **Methods** The 3 species of mosquitoes were randomly captured from cattle houses around Tengchong port in Yunnan Province and identified as *Anopheles sinensis*, *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex quinquefasciatus*. Each sample DNA genome was extracted by CTAB method, and Illumina NovaSeq sequencing platform was used for high-throughput sequencing of the 3 species of mosquitoes bacterial 16S rRNA V4 region. The sequencing data were processed and spliced for the analysis of bacterial community structure diversity and the exploration of unknown bacterial. **Results** A total of 559 322 high-quality splicing Tags and 2 866 OTUs were obtained in this study. Rarefaction curves indicated that the sequencing depth of this time could fully reflect the actual bacterial community structure of the 3 species of mosquitoes. The 1 150 OTUs were common among the 3 species of mosquitoes, and the number of OTUs unique to *An. sinensis* was up to 425. There were also common OTUs and specific OTUs among each group of samples. The results showed that there were differences in the richness and similarity of species composition among mosquito species and sample groups. Alpha diversity analysis showed that the bacterial community abundance and diversity of *An. sinensis* were higher than in the other two species. Beta diversity analysis showed that the species composition of *Cx. tritaeniorhynchus* and *Cx. quinquefasciatus* were similar. Based on bacterial community structure analysis of the 3 species of mosquitoes, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *unidentified_Bacteria* and *Actinobacteriota* were the dominant bacterial at the phylum level, but there were differences in relative abundance among mosquito species. At the genus level, there were significant differences in the dominant bacterial genera and relative abundance of each mosquito species. *Staphylococcus* was the dominant genus of the 3 mosquito species. Meanwhile, a large number of pathogenic bacteria and

* **【基金项目】** 云南省科技厅应用基础研究项目(No. 2017FD139); 大理大学博士科研启动费项目(No. KYBS201604)。

** **【通讯作者】** 姜丹丹, E-mail: 895393410@qq.com; 杨兴, E-mail: yang08220013@163.com

【作者简介】 陈彬(1999-), 女, 云南玉溪人, 在读硕士, 主要从事人兽共患寄生虫病相关研究。E-mail: 3142266934@qq.com

conditionally pathogenic bacteria, as well as unknown bacteria, were found in the mosquito samples, such as *Staphylococcus*, *Proteus*, *Anaplasma* and *Mycoplasma*. **Conclusion** In the same environment, there were significant differences in bacterial community structure and diversity among different mosquito species and different individual groups of the same mosquito species. At the same time, all mosquito species carried pathogenic bacteria and unknown bacteria, which had a potential hazard to public health safety in the area.

【Key words】 mosquitoes; bacterial community structure; unknown bacteria; high-throughput sequencing

蚊虫是一类重要的医学昆虫,属于节肢动物门,共3亚科(巨蚊亚科、按蚊亚科、库蚊亚科)。分布广泛,种类繁多,迄今为止全世界已记录的蚊种多达3600种和亚种。其中大部分蚊类不仅吸血骚扰人类,而且还传播许多严重的疾病,包括流行性乙型脑炎、登革热、黄热病、疟疾等,是虫媒传染病的第一大媒介^[1-2]。大多数蚊类的孳生和繁殖均受生态环境的温度、湿度以及开发度的显著影响^[3-4]。云南省因其得天独厚的地理气候优势,使得物种多样性繁多而复杂,也为蚊类生长繁殖提供了优越的条件,是世界上蚊类种属最丰富的地区之一;同时云南地处我国西南边陲,与老挝、缅甸等国家接壤,腾冲作为重要的边境及旅游高度开发城市,人流量丰富,增加了外来蚊种及其携带的病原体入侵的机会,严重威胁我国的公共卫生安全,也加大了我国蚊媒传染病的防治力度和难度^[5-8]。

由于我国蚊虫种类及其相关病毒种类繁多,其中云南省的蚊种和相关病毒数量较多,是我国高流行地区之一^[9-10]。近年来,出现了多起新发及再发蚊媒传染病的流行,如寨卡病毒和登革病毒等均对人类健康造成了严重的威胁^[11]。同时还发生了一些新发的重大传染病流行,对我国乃至世界的人和动物的健康均造成了损伤,也对社会经济及稳定造成了严重的影响^[12-13]。反向病原学观点^[14-15]指出提早发现研究命名新的微生物能有效控制和预防新发传染病疫情,常见的携带大量微生物的媒介昆虫就包括数量庞大的蚊虫。面对随时会爆发的传染病,不管是大范围还是小面积,都或多或少对人类造成一定程度的危害,而传染病病原体多存在某种适合的机会借由某种媒介直接或间接的传染给人并致机体产生疾病^[14]。随着检测技术的不断发展,多种未知病原体逐渐被检出。细菌因其感染菌量和宿主免疫力情况而不易感染正常人,可当宿主免疫力下降时,就算是极少的菌量也可能大量繁殖使宿主感染发病。以往对蚊虫携带细菌的研究由于检测技术与方法的限制,媒介体内的共生菌也会对其携带的病原体产生一定的影响^[16]。常规的细菌分离培养方法工作量大、培养耗时长、成本高,而且一些丰度比较低、培养条件苛刻特殊但致病力强的细菌往往被忽视。因此,本研究运用了高通量测序技术对边境地区腾冲市的野生优势蚊种自然携带细菌的16S

rRNA基因的V4区域进行测定,分析其菌群结构和多样性。对该地区不同蚊种主要存在的菌群结构进行本底调查,及时的发现未知和外来的微生物,有助于了解不同蚊种与其各自共生微生物之间的关系,为新发、突发和未知蚊媒传染病的防控提供新思路;有助于提早建立新的病原菌数据库,早期采取应对措施,为预防重大突发虫媒传染病的发生提供防治依据。

材料与方法

1 样本采集

2020年8月在云南省腾冲市口岸周边牛房利用美国CDC诱蚊灯采集蚊虫,18:00放置,次日08:00收回,按照《云南蚊类志》检索表进行分类鉴定。经鉴定,共捕获3种蚊虫,均是云南及腾冲的优势蚊种,分别为中华按蚊、三带喙库蚊、致倦库蚊。采用简单随机抽样的方法,每种蚊各抽取30只,10只为1组,共计9组样品。

2 样本细菌DNA的提取和PCR扩增

对采集的9组蚊样本体表用75%酒精进行消毒。再用PBS缓冲液漂洗3次,每次5min,室温干燥备用。应用CTAB方法提取各样本基因组DNA,并利用2%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度。针对各组样本的16S rRNA基因V4区域进行PCR扩增,通用引物上游:515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCG-GTAA-3');下游:806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')。PCR反应体系共20μL,包括5×Phusion® High-Fidelity PCR master Mix with GC Buffer 4μL, dNTPs(2.5 mmol/L)2μL, TransStart® FastPfu DNA Polymerase(2.5 U/μL)0.5μL,上、下游引物各0.5μL, DNA模板2μL, ddH₂O补足至20μL。反应条件为:98℃预变性1min;98℃变性30s, 50℃退火30s, 72℃延伸30s,共30个循环;72℃延伸5min。由北京诺禾致源生物信息科技有限公司测序。

3 数据处理与分析

样品被接收后,基于Illumina NovaSeq高通量测序平台测序,构建PCR-free文库,然后进行双末端(Paired-End)测序。根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据,截去Bar-

code 和引物序列后使用 FLASH(V1. 2. 7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)对每个样本的 reads 进行拼接,得到的拼接序列为原始数据(Raw Tags);参照 Qiime(V1. 9. 1, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html)的 Tags 质量控制流程将拼接得到的 Raw Tags,经过严格过滤处理得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags)。将获得的 Clean Tags 序列通过(<https://github.com/torognes/vsearch/>)与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列并将其去除,得到最终的有效数据(Effective Tags)。利用 Uparse 软件(Uparse v7. 0. 1001, <http://www.drive5.com/uparse/>)以 97%的一致性(Identity)将所有样本的全部 Effective Tags 聚类成为 OTUs(Operational Taxonomic Units),并用于后续的分析 and 物种注释。使用 Qiime(Version 1. 9. 1)软件计算相关指数,使用 R 软件(Version 2. 15. 3)绘制稀释曲线并进行 Alpha 和 Beta 多样性指数组间差异分析。

结 果

1 测序结果分析

9 组蚊虫样本共获得高质量拼接 Tags 559 322 条,平均每组样本 62 147 条,范围在 49 534~67 941 之间(表 1),均>5 000,表明测序结果可客观的反映蚊在自然状态下携带的微生物群落结构。A. S 为中华按蚊(*Anopheles sinensis*);C. T 为三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*);C. Q 为致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)。

表 1 9 组蚊虫样本测序结果

Table 1 Overview of the sequencing results from 9 mosquito samples			
样品名称 Sample Name	有效序列数 Effective Tags	有效碱基平均长度 AvgLen(nt)	(G+C)含量 (%)
A. S1	49 534	403	53. 24
A. S2	60 248	421	54. 02
A. S3	61 496	425	52. 21
C. T1	56 817	411	53. 68
C. T2	69 351	409	52. 73
C. T3	67 523	405	48. 38
C. Q1	60 629	411	49. 46
C. Q2	65 783	411	49. 75
C. Q3	67 941	426	55. 39

2 OTU 分析

以 97%的相似度将序列聚类成为 OTUs(Operational Taxonomic Units),共得到 2 866 个 OTUs,然后对 OTUs 序列与 Silva132 数据库进行物种注释。注释结果中,共有 1 237(43. 16%)个 OTU 注释到属水平。

通过绘制韦恩图(Venn Graph),可以分析不同蚊种以及不同样本组之间共有、特有的 OTUs。3 种蚊虫共有的 OTU 个数为 1 150 个,其中中华按蚊(A. S)

特有的 OTUs 个数最多,为 425 个(图 1A);A. S 组共有 511 个 OTUs,其中 A. S2 特有的 OTUs 最多,为 434 个;C. T 组共有 469 个 OTUs,其中 C. T1 特有的 OTUs 最多,为 636 个;C. Q 组共有 415 个 OTUs,其中 C. Q2 特有的 OTUs 最多,为 379 个(图 1B)。

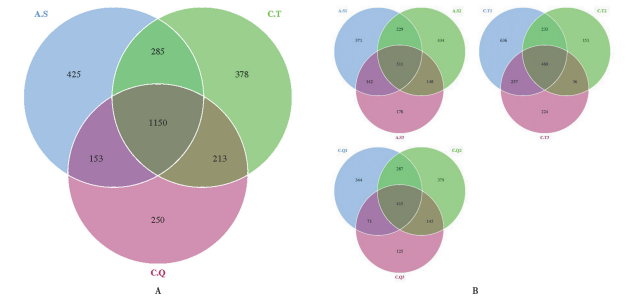


图 1 OTU 韦恩图
Fig. 1 OTU Venn diagram

3 Alpha 多样性分析

通过从样本中随机抽取一定的测序量数据与其所代表的物种数目(即 OTUs 数目)来构建稀释曲线(Rarefaction Curve),可以看出在随机抽取测序条数<10 000 条时,样本 OTUs 数目随着测序深度的增加而急剧增加;在条数为 15 000~20 000 条时,OTUs 数目增加缓慢,随后曲线趋向平坦进入平台期(图 2)。各样本的稀疏曲线直接反映了各样本当前的测序深度合适,每组样本的覆盖率均>99%,说明测序量充分(表 2),可以满足后续的菌群结构及多样性分析,足够反映样本中自然携带的细菌微生物多样性。并间接反映了样本中物种的丰富程度,中华按蚊(A. S)丰富度高于其他两种库蚊(图 2A),其中 C. T1 组样本的丰富度显著高于其他八组(图 2B)。通过比较各样本的 alpha 多样性指数,可以发现中华按蚊组的细菌物种丰富度和多样性要整体高于其他两种蚊虫(表 2)。

表 2 9 组蚊虫样本的 Alpha 多样性指数

Table 2 The Alpha diversity index from 9 mosquito samples						
样品名称 Sample Name	运算分类 单元数目 OTUs numbers	香农 指数 Shannon index	辛普森 指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Overage
A. S1	1253	5. 89	0. 906	1376. 271	1384. 476	0. 995
A. S2	1322	5. 073	0. 861	1475. 498	1514. 379	0. 994
A. S3	979	3. 302	0. 607	1109. 599	1159. 643	0. 995
C. T1	1595	7. 7	0. 982	1723. 463	1726. 498	0. 995
C. T2	909	2. 278	0. 462	1057. 338	1157. 426	0. 994
C. T3	1006	1. 965	0. 305	1193. 135	1265. 907	0. 993
C. Q1	1117	3. 596	0. 656	1275. 292	1300. 565	0. 994
C. Q2	1226	3. 413	0. 623	1412. 731	1494. 377	0. 993
C. Q3	756	1. 879	0. 413	925. 534	1017. 645	0. 994

4 Bate 多样性分析

4. 1 PCoA 分析 基于 Weighted Unifrac 距离进行

主坐标分析(PCoA),展示了不同样本之间的菌群结构相似性,如果样本距离越接近,表示物种组成结构越相似(图3)。从图中可以看出,9组样本中有3组在PC1和PC2方向上与其他组均分散,说明这3组样本的结构差异较大,其中中华按蚊(A.S)有2组,致倦库蚊(C.Q)有1组,说明同种蚊虫不同个体之间的细菌群落结构存在差异。

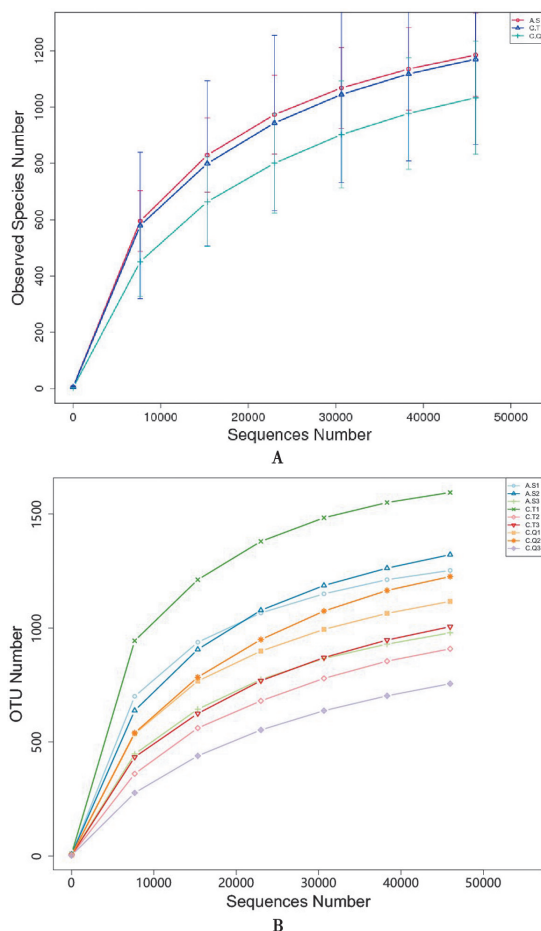


图2 稀释曲线
Fig. 2 Rarefaction curves

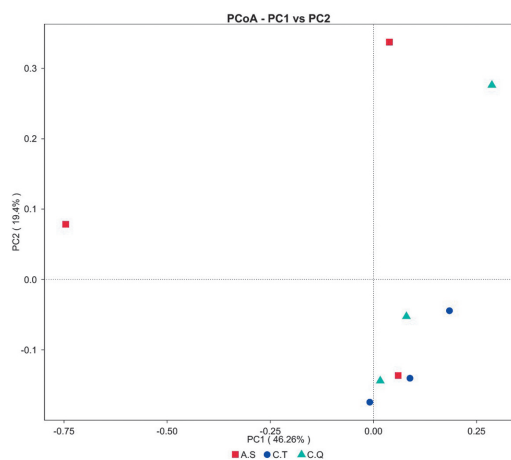


图3 基于 Weighted Unifracs 距离的 PCoA 分析
Fig. 3 The PCoA analysis based on weighted unifracs

4.2 UPGMA 聚类树分析 通过构建样本的 UPGMA 聚类树,来分析不同蚊种及不同样本之间在门水平相对丰度上的相似性(图4)。聚类分析显示,中华按蚊(A.S)与其他两种库蚊处于不同的分支,说明按蚊与库蚊的物种组成相似度较低,而属于同一属的两种库蚊蚊虫物种组成相似度相对较高(图4A);A.S1组为单独分支,A.S2组与C.Q3组处于一个分支,A.S3组与C.T1组处于一个分支,C.T3组与C.Q2组处于一个分支,说明就算属于同一蚊种,不同的个体分组之间物种组成仍存在显著的差异,其中A.S1、A.S2和C.Q3组样本与其他6组样本距离较远,物种组成存在较大差异(图4B)。

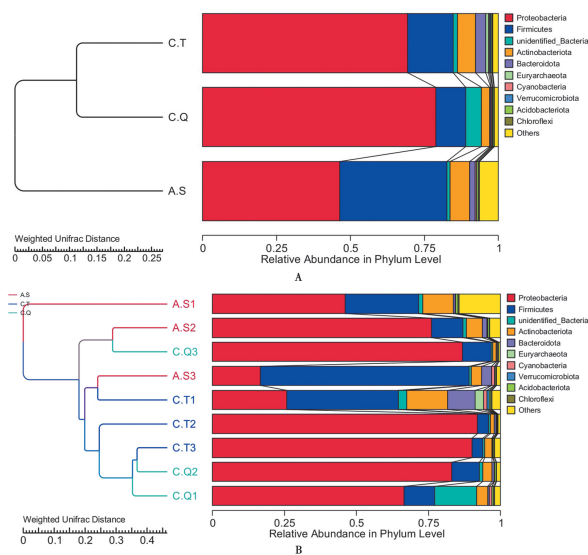


图4 UPGMA 分析
Fig. 4 Analysis of UPGMA

5 菌群结构分析

5.1 物种相对丰度差异分析 在门水平上,3种不同蚊虫自然携带的细菌群落隶属于54个门,其中优势菌群前4位均为变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、未明确细菌(*unidentified_Bacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*),但门的相对丰度有显著差异(图5)。变形菌门相对丰度最大,均为中华按蚊(A.S)、三带喙库蚊(C.T)和致倦库蚊(C.Q)的优势菌门,相对丰度分别为46.31%、69.35%、78.82%。

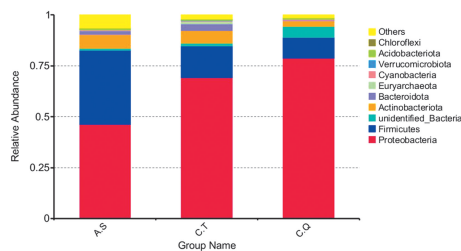


图5 门水平上物种相对丰度
Fig. 5 Species relative abundance of Phylum level

在属水平上,3种不同蚊虫自然携带的优势菌群属前5相对丰度有显著的差异(图6):中华按蚊(A. S)的优势菌属为葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 相对丰度为 24.20%,下同)、*Candidatus Lariskella* 属(9.54%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 5.77%)、狭义梭菌(*Clostridium_sensu_stricto_1*, 3.84%)和无形体属(*Anaplasma*, 3.41%);三带喙库蚊(C. T)的优势菌属为沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*, 29.51%)、巴尔通氏体属(*Bartonella*, 25.23%)、无形体属(2.96%)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*, 2.70%)和葡萄球菌属(1.61%);致倦库蚊(C. Q)的优势菌属为沃尔巴克氏体属(41.15%)、螺旋体科未定义属(*unidentified_Spirochaetaceae*, 4.57%)、不动杆菌属(4.51%)、葡萄球菌属(1.63%)和巴尔通氏体属(1.07%)。其中葡萄球菌属均为3种蚊虫的优势菌属,相对丰度分别为24.20%、1.61%、1.63%。

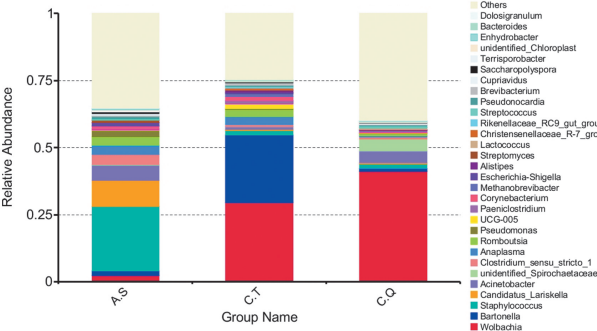


图6 属水平上物种相对丰度
Fig. 6 Species relative abundance of Genus level

5.2 物种丰度聚类图分析 通过对所有样本在属水平的物种注释及丰度信息,从物种和样本两个层面进行聚类,绘制热图(图7),纵向为样本信息,横向为丰度排名为前35的属,图中左侧为在门水平上的物种聚类树,能直观的看出各物种在各样本中的聚集情况,颜色越红表示对应样本中该物种的丰度越高,颜色越蓝表示对应样本中该物种的丰度越低。从图中可以看出,9组样本在所物种中的聚集情况存在差异,A. S1组相对丰度最高的有5属,A. S2组和 A. S3组各有1属;C. T1组有10属,C. T2组有1属,C. T3组无;C. Q1组有1属,C. Q2组有2属,C. Q3组无。说明同一蚊种不同个体分组之间的物种丰度存在较大差异(图7A)。3种不同蚊虫在所物种中的聚集情况也存在显著差异,中华按蚊(A. S)相对丰度最高有13属,三带喙库蚊(C. T)有8属,致倦库蚊(C. Q)有2属,说明不同蚊虫之间的物种丰度也存在较大差异(图7B)。

5.3 物种进化树分析 通过多序列比对得到前100属的代表序列来构建系统发育树,可以进一步研究在属水平的物种系统进化关系(图8)。从图中可以直观

的看出,各属细菌的进化关系并对未知细菌的种属起源进行追溯;以及各菌属在3种不同蚊虫中的丰度分布信息,其中葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 在中华按蚊(A. S)中的丰度显著高于三带喙库蚊(C. T)和致倦库蚊(C. Q),沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)在三带喙库蚊和致倦库蚊中的丰度显著高于中华按蚊,巴尔通氏体属(*Bartonella*)在三带喙库蚊中的丰度显著高于中华按蚊和致倦库蚊。

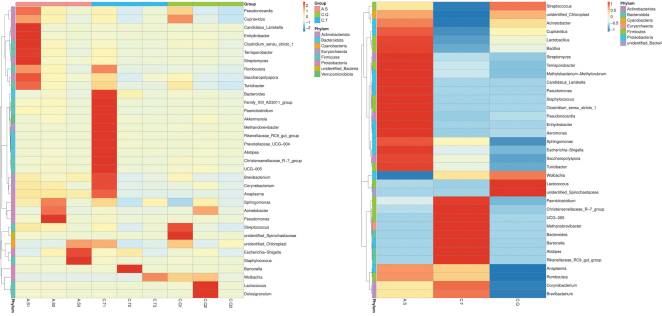
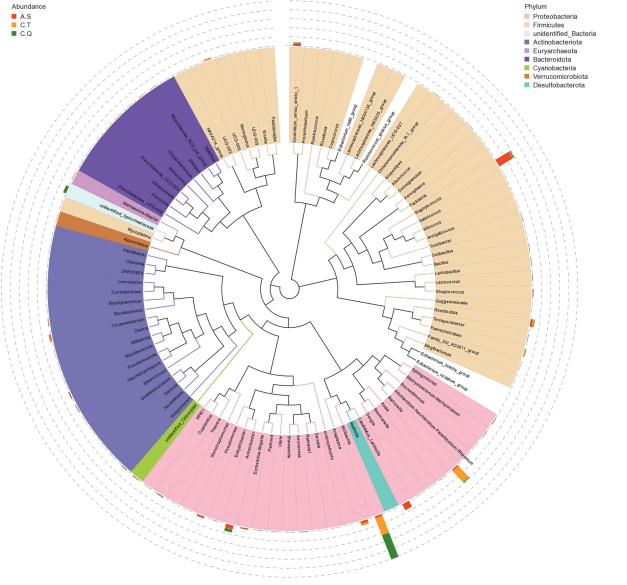


图7 物种丰度聚类热图
Fig. 7 Species abundance clustering heatmap



注:分支和扇形的颜色表示其对应的门,扇环外侧的堆积柱形图表示该菌属在不同蚊虫中的丰度分布信息。

图8 属水平上物种系统发育树

Note: The colors of branches and fan indicate the corresponding phylum, and the accumulation column diagram outside the fan ring indicates the abundance distribution information of the genus in different mosquito species).

Fig. 8 Species phylogenetic tree of Genus level

讨论

我国地势形态和气候条件复杂多样,生态环境舒适,适合人类生活居住,同样也适合各种蚊虫的孳生和存活。随着经济科技全球化的深入发展、“一带一路”战略的实施与发展、日益频繁的国家贸易往来和人员流动,使一些病媒生物(如苍蝇、蚊子、蜱等)以及其能

携带的病原体也产生了交流,极大地增加了媒介传染的病原体传入我国的风险,给我国公共卫生安全带来严峻挑战^[17]。而腾冲作为“一带一路”战略的重要边境城市,在与东南亚的多个国家的交流往来中,增加了由外来蚊虫叮咬而导致的未知、新发或再发传染病流行的风险^[11]。本研究通过高通量测序技术对腾冲市口岸周边牛房捕捉的3种常见蚊虫自然携带细菌的16S rRNA基因进行测序分析菌群多样性。

本研究采集的蚊虫样本,经鉴定分别为中华按蚊、三带喙库蚊、致倦库蚊,均为我国的优势蚊种。试验结果显示,3种蚊虫之间以及同一蚊种的3组样本之间共有和特有的OTUs个数均有差异,其中中华按蚊特有的OTUs个数最多。在Alpha多样性分析中,中华按蚊自然携带的微生物菌群丰富度和多样性高于三带喙库蚊和致倦库蚊。在Beta多样性分析中,UPGMA和PCoA分析显示,两种库蚊的物种组成较为相似;有3组样本(A、S有两组,C、Q有1组)与其他6组样本物种组成存在较大差异。物种丰度聚类热图同样表明了不同蚊种及个体之间在各菌属中的相对丰度有明显差异。以上研究结果表明,采自同一地区的不同蚊种及不同个体之间的微生物物种相对丰度和多样性存在较大差异,可能与蚊种的遗传、个体所处的环境所摄取的食物及不同发育阶段相关。有研究通过对果蝇喂食不同食物后发现果蝇的肠道菌群结构有明显的区别,表明环境以及食物会影响宿主内生微生物群体结构^[18]。有大量的研究表明,同一环境下不同个体之间的菌群存在差异^[19-20]。

通过对3种蚊虫携带的细菌群落结构进行分析,发现各蚊种在门水平上的优势菌群一致,分别为变形菌门、厚壁菌门、未明确细菌和放线菌门,其中变形菌门相对丰度最大,均为各蚊种的优势菌门,与其他蚊虫^[21-22]、蜱^[23-24]及一些动物肠道菌群研究结果相一致^[25],表明变形菌门中的大多数细菌广泛存在于自然界中并发挥着生物生命活动必不可少的作用。在属水平上,各蚊种的优势菌属组成及相对丰度存在显著差异。且发现了大量的致病菌和条件致病菌,如葡萄球菌属、不动杆菌属、变形杆菌属(*Proteus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、狡诈菌属(*Dolosigranulum*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、无形体属、支原体属(*Mycoplasma*)和沙门菌属(*Salmonella*)等,在一定条件下可能感染人类和动物而致病,具有潜在的公共卫生安全隐患。其中无形体属中的边缘无形体(*Anaplasma marginale*)和血小板无形体(*Anaplasma platys*)以及支原体属中的牛嗜血支原体(*Mycoplasma wenyonii*)和待定种牛嗜血支原体(*Candidatus_Mycoplasma_haemobos*)均在3种蚊

虫的各组样品中检测到。姚明国等^[26]在2020年对云南省西北部地区家畜无形体感染情况进行了调查,发现腾冲市家庭养殖牛的边缘无形体和血小板无形体感染率最高,分别为14.62%和8.77%。有研究表明牛嗜血支原体和待定种牛嗜血支原体在牛体内的检出率很高^[27]。因此可以推测蚊在该地区牛无形体病和嗜血支原体的传播起到了重要的媒介作用,对该地区蚊虫自然携带的细菌群落结构及多样性的研究分析,有利于阐明该地区自然疫源性病原体存在的主要传播媒介,为该地区牛群检疫提供媒介依据,并提早采取灭蚊等防控措施。

同时在门水平与属水平上发现了多种不能明确的细菌。构建物种进化树可以对细菌的种属进行追溯,方便后期对未知细菌的来源及其他菌种亲缘关系的探索,根据它们的相似性及亲缘关系,可以用相关的药物作用于未知细菌所导致的疾病,达到准确、快速的治疗。两种库蚊的*Wolbachia*的相对丰度均显著高于中华按蚊,有研究表明,*Wolbachia*细菌可以通过调控蚊子的生殖和免疫来限制疟原虫在蚊体内的发育^[21,28],因此可以推测中华按蚊能作为疟疾主要传播媒介的原因可能是由于*Wolbachia*的相对丰度较常低。目前对*Wolbachia*及其他共生细菌微生物群对蚊子病毒和疟原虫感染的相互作用在不断的研究中,蚊体内的共生微生物群不仅对病毒和疟原虫有抑制作用^[29-33],还会影响蚊虫的生长、繁殖和媒介效能等^[34]。共生细菌的运用不仅能有效应对蚊虫和病原体的耐药性,还能缓解杀虫剂类农药带来的各种环境污染问题。本研究虽然检测出了未知的细菌,但无法对未知细菌进行全套基因组的检测,后续的相关研究中可以尝试将传统的培养技术和宏基因组二代测序技术相结合,便于更系统性的探索未知细菌的进化来源及其生物特性。

【参考文献】

- [1] 李文刚,赵敏. 虫媒传染病流行现状[J]. 传染病信息,2011,24(1):8-11.
- [2] Lee H, Halverson S, Ezinwa N. Mosquito-borne diseases[J]. Prim Care,2018,45(3):393-407.
- [3] 王学忠,杜尊伟,李菊昇,等. 不同生境蚊类生态学研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2005,16(2):98-100.
- [4] 余向华,徐毅,吴正可,等. 蚊媒传染病气象影响因素分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(1):61-63.
- [5] 董学书,周红宁,龚正达. 云南省蚊类的生物多样性特征[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2012,23(2):141-149.
- [6] 董学书,蔡福昌,周红宁,等. 云南省边境口岸蚊类调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2004,15(2):142-145.
- [7] 史书路,于长友,王雪娟,等. 蚊媒传染病传入我国风险及防控策略[J]. 口岸卫生控制,2015,20(1):5-6.
- [8] Xiao P, Han J, Zhang Y, et al. Metagenomic analysis of flaviviridae in mosquito viromes isolated from Yunnan province in China

- reveals genes from dengue and zika viruses[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018(8):359.
- [9] Xia H, Wang Y, Atoni E, et al. Mosquito-associated viruses in China[J]. Virol Sin, 2018, 33(1):5-20.
- [10] Atoni E, Zhao L, Hu C, et al. A dataset of distribution and diversity of mosquito-associated viruses and their mosquito vectors in China[J]. Sci Data, 2020, 7(1):342.
- [11] 李小溪, 谭钧元, 张昕, 等. 新发和再发虫媒传染病[J]. 传染病信息, 2020, 33(5):456-461.
- [12] Wang T, Sun Y, Qiu HJ. African swine fever: an unprecedented disaster and challenge to China[J]. Infect Dis Poverty, 2018, 7(1):111.
- [13] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(13):1199-1207.
- [14] 徐建国. 反向病原学[J]. 疾病监测, 2019, 34(7):593-598.
- [15] Xu J. Reverse microbial etiology: A research field for predicting and preventing emerging infectious diseases caused by an unknown microorganism[J]. J Biosaf Biosec, 2019, 1(1):19-21.
- [16] 杨文旭, 杨亚明. 高通量测序技术在按蚊共生微生物研究中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1):122-126.
- [17] 孙洪清, 肖宏, 陈良. 重视蚊媒传染病[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(9):1-3.
- [18] Chandler JA, Lang JM, Bhatnagar S, et al. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system[J]. PLoS Genet, 2011, 7(9):e1002272.
- [19] 南春燕, 马雅军, 徐建农, 等. 中华按蚊幼虫肠道细菌宏基因组的组成研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(1):114-119.
- [20] 王丹丹. 中华按蚊肠道细菌分子多态性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [21] Zoure AA, Sare AR, Yameogo F, et al. Bacterial communities associated with the midgut microbiota of wild *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(1):211-224.
- [22] Rani A, Sharma A, Rajagopal R, et al. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector[J]. BMC Microbiol, 2009(9):96.
- [23] 韩娜, 张琳, 张雯, 等. 长角血蜱细菌群落结构及多样性研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2016, 27(5):426-431.
- [24] Zolnik CP, Prill RJ, Falco RC, et al. Microbiome changes through ontogeny of a tick pathogen vector[J]. Mol Ecol, 2016, 25(19):4963-4977.
- [25] 曹乐天, 王璐阳, 张艺凡, 等. 不同生活环境天鹅肠道菌群的多样性分析[J]. 野生动物学报, 2020, 41(4):989-999.
- [26] 姚明国, 江佳富, 高子厚, 等. 云南西北部地区家畜无形体感染的分子流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(8):678-684.
- [27] Hornok S, Sugar L, Fernandez de Mera IG, et al. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates; the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1):98.
- [28] 刘同凯, 张忠, 张瑞玲. 共生菌 *Wolbachia* 在蚊媒传染病防控方面的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(11):1122-1125.
- [29] Johnson KN. The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes[J]. Viruses, 2015, 7(11):5705-5717.
- [30] Pereira TN, Carvalho FD, Rugani JN, et al. Mayaro virus: The Potential Role of Microbiota and *Wolbachia* [J]. Pathogens, 2021, 10(5):525.
- [31] Wang S, Ghosh AK, Bongio N, et al. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(31):12734-12739.
- [32] Boissi re A, Tchioffo MT, Bachar D, et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(5):e1002742.
- [33] Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(5):e1000423.
- [34] 王晓明, 吴焜, 陈晓光, 等. 蚊虫共生微生物群落多样性及功能的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(3):305-312.

【收稿日期】 2022-02-20 【修回日期】 2022-05-18

(上接 916 页)

- [16] 库尔班尼沙·阿马洪, 刘辉, 李锦田, 等. 细粒棘球绦虫葡萄糖转运蛋白 GLUT3 的生物信息学分析及系统发育树[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8):910-916.
- [17] Chan M, Sim TS. Functional analysis, overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(1):188-196.
- [18] Ernest I, Callens M, Uttaro A, et al. Pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*: overexpression, purification, and functional characterization of wild-type and mutated enzyme[J]. Protein Expression Purification, 1998, 13(3):373-382.
- [19] Ernest I, Callens M, Opperdoes F, et al. Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme[J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 64(1):43-54.
- [20] Xia N, Ye S, Liang X, et al. Pyruvate Homeostasis as a Determinant of Parasite Growth and Metabolic Plasticity in *Toxoplasma gondii* [J]. mBio, 2019, 10(3):e00898-19.
- [21] Chan M, Sim T. Functional analysis, overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(1):188-196.
- [22] Xiao S, Feng J, Yao M. Effect of antihydrid drugs on carbohydrate metabolism of metacystode of *Echinococcus granulosus* [J]. Chin Med J, 1995, 108(9):682-688.
- [23] Schormann N, Hayden K, Lee P, et al. An overview of structure, function, and regulation of pyruvate kinases [J]. Protein Sci: a publication Protein Soc, 2019, 28(10):1771-1784.

【收稿日期】 2022-03-17 【修回日期】 2022-06-03