论 文

一种导致伊蚊死亡的色素细菌的发现及致死机制的研究

童良琴^{1†}, 蔡珍^{2†}, 肖小平^{1,3}, 朱毅斌¹, 张仁利^{3*}, 程功^{1,3*}

1. 清华大学-北京大学生命科学联合中心, 清华大学医学院, 北京 100084;

2. 中国医科大学航空总医院, 北京 100012;

3. 深圳市疾病预防控制中心病原生物研究所, 深圳 518055

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: renlizhangszcdc@aliyun.com; gonghcheng@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2020-09-16; 接受日期: 2020-10-29; 网络版发表日期: 2020-12-03

国家重点研发计划(批准号: 2020YFC1200100)、国家自然科学基金(批准号: 31700148)和深圳“三名”病媒传染病防治研究项目(批准号: SZSM201611064)资助

摘要 蚊子是一类可携带并传播多种病原微生物的节肢动物, 近年来多种蚊媒病毒性传染病给人类经济健康造成了极大威胁。蚊虫肠道内存在大量的微生物, 这些肠道微生物与宿主保持着复杂的关系, 影响宿主的生殖、免疫等各项生理功能。本研究从肠道微生物入手, 在分离到的18株埃及伊蚊肠道菌中筛选出了一株可导致蚊子死亡的肠道菌——色素细菌, 饲喂含 2.78×10^8 CFU/mL该菌的蔗糖溶液可显著降低埃及伊蚊和白纹伊蚊的存活率。给埃及伊蚊饲喂不同浓度的色素细菌后发现, 色素细菌的杀虫作用具有浓度依赖效应。此外, 饲喂色素细菌可影响细胞骨架, 破坏中肠屏障, 增加中肠通透性, 使得微生物大量进入血淋巴中进而加速蚊子的死亡。组分研究发现, 其主要毒力因子可能是某些分泌蛋白, 饲喂上清液中的蛋白组分可显著降低埃及伊蚊的存活率, 该特性使其可能作为一种潜在的杀虫剂用于蚊虫防控。

关键词 埃及伊蚊, 色素细菌, 致死, 中肠屏障

作为一种常见的嗜血性昆虫, 蚊子可通过叮咬传播多种疾病。感染的蚊虫通过叮咬将病毒传播给宿主, 蚊子再通过吸食含病毒的血液来获取病毒, 蚊媒病毒在“宿主-蚊子”之间传播循环^[1]。由蚊媒传播的人类病毒达数百种之多, 每年可造成数亿人感染, 这些病毒感染可引起严重的人类疾病, 如出血热、关节炎和脑炎等, 严重者可导致死亡^[2-4]。除可传播病毒外, 蚊子

还可传播其他疾病, 由按蚊传播的疟疾是最重要的人类寄生虫病, 主要在热带和亚热带地区流行^[5]。据世界卫生组织统计, 仅2018年, 全球约出现2.28亿疟疾病例, 造成40.5万人死亡^[6]。对于大多数蚊媒病毒性传染病, 目前尚无疫苗或特效药^[7], 蚊媒控制仍是预防疾病的主要手段^[8]。

蚊子中肠是抵抗病毒入侵的第一道屏障, 蚊子肠

引用格式: 童良琴, 蔡珍, 肖小平, 等. 一种导致伊蚊死亡的色素细菌的发现及致死机制的研究. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 83–90
Tong L Q, Cai Z, Xiao X P, et al. Discovery and mechanistic study of an *Aedes aegypti* lethal bacteria *Chromobacterium* (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 83–90, doi: 10.1360/SSV-2020-0236

道内存在大量微生物。研究表明, 蚊虫肠道微生物与宿主保持着复杂的关系, 可影响宿主的生殖、代谢和免疫等各项生理活动^[9]。蚊虫肠道微生物种类丰富, 其组成受生活环境、蚊种的影响较大^[10,11]。蚊虫肠道微生物主要分布在变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)^[12], 其中*Elizabethkingia meningoseptica*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*和*Klebsiella pneumoniae*是伊蚊(*Aedes*)肠道中较为常见的细菌^[10]。研究发现, 蚊虫肠道微生物对于其吸血后围食膜(peritrophic membrane)的形成和完整性至关重要^[13]。埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)中肠内的共生菌黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)可辅助DENV、ZIKV和SINV感染蚊虫^[14]。此外, 某些蚊虫肠道真菌, 如白僵菌(*Beauveria bassiana*)和绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)可缩短蚊虫寿命, 是潜在的生物杀虫剂^[15]。深入研究媒介蚊虫与肠道微生物菌群之间的相互作用将为蚊媒疾病的预防与控制提供新策略。本研究从蚊虫肠道微生物入手, 在埃及伊蚊中筛选到一株可使蚊虫致死的肠道菌——色素细菌, 喂食该菌两天内埃及伊蚊死亡率达80%。研究发现, 色素细菌可能破坏蚊子中肠屏障影响其通透性, 使得大量肠道微生物进入蚊子血淋巴中, 从而加速蚊子的死亡。对色素细菌的组分研究发现, 其所分泌上清液中的蛋白组分是导致埃及伊蚊死亡的关键组分。此外, 色素细菌也可有效杀灭白纹伊蚊, 是一种潜在的生物杀虫剂。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 蚊株。本研究所用埃及伊蚊(洛克菲勒株)蚊种由耶鲁大学惠赠, 白纹伊蚊(北京株)蚊种由中国疾病预防控制中心惠赠。所有实验动物操作均获得清华大学动物伦理委员会批准。

(2) 菌株。实验所用菌株均分离自埃及伊蚊中肠组织, 由本实验室分离并保存。

(3) 血液。本研究所用血液来自于20~30周岁身体健康的志愿者, 志愿者已填写知情同意书, 志愿者招募献血已获得清华大学伦理委员会批准。

(4) 实验试剂与仪器。青霉素/链霉素/两性霉素联合抗生素、PBS溶液购于Thermo Fisher Scientific公司

(美国), iFluorTM 647标记鬼笔环肽(Phalloidin)购自上海翊圣生物科技有限公司, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自罗氏(Roche)(瑞士), FITC-葡聚糖70 kD(FD70)、蔗糖购自Sigma公司(美国), Triton-X 100购自Solarbio公司(北京), 真空采血管购自BD公司(美国), 超滤离心管、0.22 μm 滤器购自Millipore公司(美国)。体外饲血系统(Hemotek, 英国), 冷冻注射平台(Bioquip, 美国), 玻璃拉针仪(Narishige, 日本), 显微注射器(Eppendorf, 德国), 酶标仪(Thermo Fisher Scientific), LSM780倒置激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)。

1.2 实验方法

(1) 蚊虫饲养。蚊幼虫饲养配方为0.1%肝粉及酵母提取物(3:2)溶液, 成蚊食物为葡萄干, 需要特殊处理使用蘸有10%蔗糖溶液的棉球。所有蚊虫饲养均于生物安全二级蚊媒室内的低温照明培养箱中进行, 保持28℃恒温, 80%湿度和12/12 h照明/暗夜周期。

(2) 蚊虫膜饲喂。将拉伸后的Parafilm膜套在喂食器上, 使用配套胶圈固定, 根据不同实验需要将血液或10%蔗糖溶液与菌悬液混合饲喂蚊虫。开启昆虫饲喂系统使混合物温度维持在37℃, 在黑暗条件下喂食35 min, 将蚊虫置于4℃麻醉, 分拣出吸食成功的蚊虫, 转移至新的蚊杯中, 置于培养箱中饲养。

(3) 蚊虫中肠免疫荧光染色。分别用10%蔗糖和含 2.78×10^7 CFU/mL色素细菌的蔗糖溶液饲喂蚊子, 14 h后取不同处理组的蚊子, 解剖蚊子取中肠组织置于含组织固定液的载玻片上, 4℃固定过夜。用PBS+0.1% Triton X-100+1% BSA的溶液封闭1 h, 后用PBS洗涤3次, 每次10 min。加入稀释好的iFluorTM 647标记的鬼笔环肽溶液, 室温避光染色1 h, 标记中肠中的F-actin。用PBS洗3次, 每次10 min, 然后加入DAPI溶液室温避光染色15 min, 标记细胞核。PBS洗涤3次, 每次10 min, 加入防淬灭剂后封片。在激光共聚焦显微镜下观察。iFluorTM 647激发/发射滤片(Ex/Em=650/665 nm)。

(4) 蚊子中肠通透性检测。将蚊子分为两组, 对照组饲喂1 mL含10%蔗糖和100 μL FD70 (36 mg/600 μL)的混合液, 实验组饲喂1 mL含10%蔗糖、色素细菌和100 μL FD70(36 mg/600 μL)的混合液。喂食16 h后, 将蚊虫前腹部刺穿一小孔, 在蚊虫胸腔注射4 μL 无菌PBS, 从前腹部刺穿小孔处获得蚊子血淋巴, 每两只蚊

子的血淋巴合并为一组. 用酶标仪检测血淋巴的荧光值. 将血淋巴液稀释后涂布于LB固体培养基上, 30℃培养过夜, 计算血淋巴中的细菌个数.

(5) 数据处理与分析. 实验动物均为随机分组, 实验前未使用统计学方法决定样本量. 在蚊虫死亡率统计实验中, 各组实验使用的蚊虫数目均标注在图上, 不同实验使用的统计方法根据实验需要不同, 采用非正态的Mann-Whitney分析或log-rank(Mantel-Cox)分析, 数据的处理及统计分析使用Graphpad Prism完成.

2 结果

2.1 埃及伊蚊致死菌株的筛选

首先, 利用16S rRNA基因测序方法在埃及伊蚊肠道内分离并鉴定了18株可培养的肠道细菌, 其中13株属革兰氏阴性菌, 5株属革兰氏阳性菌, 主要分布于变形菌门和厚壁菌门. 为研究这些菌株对蚊虫存活率的影响, 首先给埃及伊蚊喂食蘸有含抗生素的蔗糖溶液5天, 以清除埃及伊蚊肠道内的微生物. 在饥饿处理24 h后, 分别混合含不同菌株($A_{600}=1.0$)的菌悬液和血

液饲喂蚊虫, 记录4天内蚊虫的存活率. 结果显示, 埃及伊蚊对大多数细菌都有较高的耐受能力, 饲喂大多数细菌不影响埃及伊蚊的存活率(图1); 而饲喂色素细菌可降低埃及伊蚊存活率, 第2天埃及伊蚊死亡率达80%(图1), 即饲喂色素细菌可导致埃及伊蚊死亡.

2.2 色素细菌对多种蚊虫致死

为研究不同浓度色素细菌对蚊虫存活率的影响, 本实验给埃及伊蚊喂食不同浓度的色素细菌, 检测其对埃及伊蚊的致死效果. 结果表明, 喂食 2.78×10^7 CFU/mL、 2.78×10^6 CFU/mL和 2.78×10^5 CFU/mL色素细菌均可明显降低埃及伊蚊的存活率, 而喂食 2.78×10^4 CFU/mL色素细菌则对存活率无显著影响(图2A), 即色素细菌对埃及伊蚊的致死作用有浓度依赖效应. 此外, 为了更好地模拟自然条件, 在不清除蚊虫肠道微生物的情况下, 直接给蚊虫喂食含色素细菌(2.78×10^8 CFU/mL)的蔗糖溶液, 观察色素细菌对蚊虫的生存率的影响. 结果发现, 饲喂色素细菌1天后, 埃及伊蚊和白纹伊蚊的死亡率均达100%(图2B和C), 即饲喂色素细菌可导致多种蚊虫死亡.

图 1 埃及伊蚊致死菌株的筛选. 饲喂含菌悬液($A_{600}=1.0$)的血液对埃及伊蚊存活率的影响; n: 蚊虫数目

Figure 1 Screening of mosquitocidal bacteria in *Aedes aegypti*. The survival rate of *Aedes aegypti* fed on a mixture of blood and bacteria ($A_{600}=1.0$). n: number of mosquitoes

图 2 色素细菌对多种蚊虫致死。A: 饲喂不同浓度色素细菌对埃及伊蚊存活率的影响; B: 饲喂色素细菌对埃及伊蚊存活率的影响; C: 饲喂色素细菌对白纹伊蚊存活率的影响。n.s.: 无显著性差异; *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$

Figure 2 *Chromobacterium* is lethal to several mosquitoes. A: Effects of different concentrations of *Chromobacterium* to the survival rate of *Aedes aegypti*; B: effects of *Chromobacterium* on the survival rate of *Aedes aegypti*; C: effects of *Chromobacterium* on the survival rate of *Aedes albopictus*. n.s.: not significant; *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$

2.3 色素细菌导致埃及伊蚊死亡的机制

(1) 色素细菌可破坏蚊子中肠结构。上述研究表明, 饲喂一定剂量的色素细菌可引起蚊子的死亡。作为一种肠道微生物, 色素细菌喂食后首先进入蚊子中肠组织, 因此本实验首先检测了饲喂色素细菌后对蚊子中肠组织的影响。在给埃及伊蚊喂食 2.78×10^8 CFU/mL 色素细菌8 h后, 解剖埃及伊蚊取其中肠组织在体视显微镜下观察。实验发现, 和对照组相比, 饲喂色素细菌组的埃及伊蚊中肠组织严重皱缩, 失去韧性(图3A)。饲喂色素细菌后通过免疫荧光染色发现, 对照组蚊子中肠组织结构完整, 细胞骨架排列有序紧密; 而饲喂色素细菌的埃及伊蚊中肠结构被破坏, 细胞骨架破裂, 排列无规则(图3B)。以上结果表明, 饲喂色素细菌可影响细胞骨架, 破坏蚊子中肠结构。蚊子中肠作为第一道屏障, 在抵御细菌、病毒入侵的过程中发挥了重要作用, 若中肠屏障被破坏可能影响蚊虫的生理功能, 进而导致死亡。

(2) 色素细菌增加中肠屏障通透性。为进一步探究色素细菌对蚊虫中肠结构的影响与降低蚊虫存活率之间的关系, 本实验利用带有荧光标记的Dextran检测蚊虫中肠的通透性。给埃及伊蚊喂食含有荧光标记的

Dextran和色素细菌后, 若色素细菌可破坏蚊虫中肠屏障影响其通透性, 则可在血淋巴中看到Dextran含量的明显上升。实验结果表明, 与对照组相比, 饲喂色素细菌的埃及伊蚊血淋巴中荧光值显著升高(图4A)。同时检测血淋巴中的细菌含量可发现, 喂食了色素细菌的蚊虫血淋巴中细菌含量显著上升, 平均每只蚊虫血淋巴中约有3000 CFU的细菌(图4B)。之前的相关研究发现, 蚊子中某些肠道微生物过多转移至血淋巴中可能会加速蚊虫的感染与死亡^[16,17]。在饲喂色素细菌后, 蚊子的中肠屏障被破坏, 通透性增加, 导致大量肠道微生物进入血淋巴中, 进而加速埃及伊蚊的死亡。

2.4 鉴定色素细菌杀蚊的关键组分

细菌可通过分泌小分子代谢产物、大分子蛋白质, 释放胞内组分, 直接相互作用等方式影响宿主。为了探究色素细菌导致蚊虫死亡的关键组分, 本实验首先将细菌各个组分进行了分离。先将培养后的菌悬液离心, 离心后的上清液用0.22 μm 滤膜过滤后得到细菌培养液上清。同时将离心后的菌体进行超声破碎, 得到细菌裂解物。将以上两组分分别喂食埃及伊蚊, 同时设置菌悬液组作为阳性对照, 观察埃及伊蚊在4天内的存活率

图 3 色素细菌破坏埃及伊蚊中肠结构. A: 饲喂色素细菌后中肠组织的体视显微镜观察(10×); B: 饲喂色素细菌后中肠组织的免疫荧光染色, 图中红色表示鬼笔环肽染色的F-Actin, 蓝色表示DAPI染色的细胞核. 左1、左2(10×), 左3、左4(100×)

Figure 3 *Chromobacterium* affects *Aedes aegypti* midgut structure A: Microscopic observation of mosquito midgut after *Chromobacterium* feeding (10×); B: immunofluorescence staining of mosquito midgut after *Chromobacterium* feeding. Red fluorescence: F-Actin stained by Phalloidine, blue fluorescence: Nucleus stained by DAPI. Left 1, 2 (10×), left 3, 4 (100×)

图 4 色素细菌增加埃及伊蚊中肠通透性. A: 饲喂色素细菌对埃及伊蚊中肠通透性的影响; B: 饲喂色素细菌对埃及伊蚊血淋巴中细菌数量的影响. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 4 *Chromobacterium* affects *Aedes aegypti* midgut permeability A: Effects of *Chromobacterium* on *Aedes aegypti* midgut permeability; B: effects of *Chromobacterium* feeding on the number of bacteria in *Aedes aegypti* hemolymph. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

(图5A). 结果表明, 与菌悬液类似, 饲喂细菌培养上清液也可显著抑制埃及伊蚊的生存率(图5B), 说明色素细菌中发挥杀蚊作用的物质在细菌培养上清液中.

细菌培养上清液含有小分子化合物及大分子蛋白

质等, 为进一步探究其作用组分, 本实验利用超滤透析的方法, 将小分子化合物及大分子蛋白质根据分子量的大小进行分离, 同时设置高温灭活的大分子蛋白质组作为对照(图5C), 分别研究它们对蚊虫存活率的影响. 研

图 5 色素细菌对埃及伊蚊致死组分的鉴定。A: 实验流程图; B: 不同细菌组分对埃及伊蚊存活率的影响; C: 实验流程图; D: 不同上清液组分对埃及伊蚊存活率的影响。n.s.: 无显著性差异; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 5 Identification of lethal components in *Chromobacterium* A: Schematic representation of the study design; B: effects of different components of *Chromobacterium* on the survival rate of *Aedes aegypti*; C: schematic representation of the study design; D: effects of different components of *Chromobacterium* supernatant on the survival rate of *Aedes aegypti*. n.s.: not significant; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

究结果显示, 色素细菌分泌物中的有活性的蛋白质组分可显著降低蚊虫的存活率, 而小分子化合物和失活的蛋白质组分则对埃及伊蚊的生存无显著影响(图5D), 这表明, 色素细菌的毒力因子可能是某些分泌蛋白。

3 讨论

目前, 大多数蚊媒病毒性传染病均无特效药及疫

苗, 蚊媒控制是预防疾病的主要手段。传统的蚊媒防治策略主要利用化学杀虫剂灭蚊, 然而化学杀虫剂对其他生物及环境有较大影响, 长期喷洒化学杀虫剂还可能使蚊虫出现抗药性, 杀虫剂抗药性已在许多蚊子中广泛存在^[18-20]。因此, 环境友好型的生物防治逐渐受到人们的青睐。生物防治可针对蚊子生活周期的各个阶段进行干预, 如可通过在水中引入捕蚊鱼捕食蚊子幼虫来控制蚊子数量^[21], 还可通过释放大量的不育

或不能传播疾病的蚊子, 如携带沃尔巴氏体的蚊株来控制蚊媒传染病的传播^[22]; 此外, 还可通过向环境中投入某些蚊子致病菌来杀灭蚊虫, 如苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)^[23]、绿僵菌^[24]等。

色素细菌是一种革兰氏阴性菌, 之前研究发现色素细菌可抑制蚊虫肠道中多种细菌的生长^[25], 可降低冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 对疟原虫的易感性^[26], 色素细菌分泌的氨肽酶可降解登革病毒E蛋白而抑制登革病毒感染^[27]。在本研究中, 本课题组分离并鉴定出了一株新的色素细菌, 它和 *Chromobacterium haemolyticum* 的同源性为99.48%, 饲喂该菌可显著降低蚊虫

的存活率。深入研究发现, 饲喂色素细菌可破坏蚊虫中肠屏障, 增加中肠通透性使得大量肠道微生物进入蚊虫血淋巴中, 从而加速蚊虫的死亡。色素细菌关键毒力因子可能是其分泌的某些蛋白质。在接下来的工作中, 本课题组将对毒力因子进行进一步鉴定, 找到可导致蚊虫死亡的关键蛋白质, 对其作用机制进行进一步研究。除影响蚊虫生存率外, 还可进一步探究该毒力因子对蚊虫其他生理功能的影响, 如产卵能力、携带并传播病毒的能力等。基于发现的毒力因子, 利用某些工程菌表达该毒力因子, 构建转基因工程菌, 将会为蚊虫防控提供新的策略。

参考文献

- 1 Yu X, Zhu Y, Xiao X, et al. Progress towards understanding the mosquito-borne virus life cycle. *Trends Parasitol*, 2019, 35: 1009–1017
- 2 Weaver S C, Reisen W K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, 2010, 85: 328–345
- 3 Leta S, Beyene T J, De Clercq E M, et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis*, 2018, 67: 25–35
- 4 Huang Y J S, Higgs S, Vanlandingham D L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front Microbiol*, 2019, 10: 22
- 5 White N J, Pukrittayakamee S, Hien T T, et al. Malaria. *Lancet*, 2014, 383: 723–735
- 6 WHO. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization. 2019, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 7 Collins M H, Metz S W. Progress and works in progress: update on flavivirus vaccine development. *Clin Ther*, 2017, 39: 1519–1536
- 8 Benelli G, Jeffries C, Walker T. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. *Insects*, 2016, 7: 52
- 9 Gao H, Cui C, Wang L, et al. Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends Parasitol*, 2020, 36: 98–111
- 10 Terenius O, Lindh J M, Eriksson-Gonzales K, et al. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 80: 556–565
- 11 Coon K L, Brown M R, Strand M R. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Mol Ecol*, 2016, 25: 5806–5826
- 12 Minard G, Mavingui P, Moro C. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*, 2013, 6: 146
- 13 Rodgers F H, Gendrin M, Wyer C A S, et al. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006391
- 14 Wu P, Sun P, Nie K, et al. A gut commensal bacterium promotes mosquito permissiveness to arboviruses. *Cell Host Microbe*, 2019, 25: 101–112. e5
- 15 Scholte E J, Knols B G J, Samson R A, et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Sci*, 2004, 4: 19
- 16 Broderick N A, Raffa K F, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15196–15199
- 17 Wei G, Lai Y, Wang G, et al. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5994–5999
- 18 Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African anopheles mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol*, 2016, 32: 187–196
- 19 Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*, 2000, 45: 371–391
- 20 Naqqash M N, Gökçe A, Bakhsh A, et al. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res*, 2016, 115: 1363–1373
- 21 Kumar R, Muhid P, Dahms H U, et al. Biological mosquito control is affected by alternative prey. *Zool Stud*, 2015, 54: e55
- 22 Joubert D A, Walker T, Carrington L B, et al. Establishment of a *Wolbachia* superinfection in *Aedes aegypti* mosquitoes as a potential approach

- for future resistance management. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005434
- 23 Zhang Q, Hua G, Adang M J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Sci*, 2017, 24: 714–729
- 24 Scholte E J, Knols B G J, Takken W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol*, 2006, 91: 43–49
- 25 Ramirez J L, Short S M, Bachia A C, et al. *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and *in vitro* anti-pathogen activities. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004398
- 26 Saraiva R G, Huitt-Roehl C R, Tripathi A, et al. *Chromobacterium* spp. mediate their anti-*Plasmodium* activity through secretion of the histone deacetylase inhibitor romidepsin. *Sci Rep*, 2018, 8: 6176
- 27 Saraiva R G, Fang J, Kang S, et al. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12: e0006443

Discovery and mechanistic study of an *Aedes aegypti* lethal bacteria *Chromobacterium*

TONG LiangQin¹, CAI Zhen², XIAO XiaoPing^{1,3}, ZHU YiBin¹, ZHANG RenLi³ & CHENG Gong^{1,3}

¹ Tsinghua-Peking Joint Center for Life Sciences, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

² Aviation General Hospital of China Medical University, Beijing 100012, China;

³ Institute of Pathogenic Organisms, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

Mosquitoes are arthropod vectors for many pathogens, and mosquito-borne diseases have become a major human health and economic concern in recent years. There is a large amount of microbiota in the mosquito gut, which may influence multiple aspects of vector physiology, including reproduction, metabolism, and immunity. In this study, we mainly focus on mosquito-microbiota interactions. Among the 18 strains isolated from the *Aedes aegypti* midgut, we found that *Chromobacterium*, a gut commensal bacteria, could significantly decrease mosquito longevity. We fed specimens a sugar source containing *Chromobacterium* at a concentration of 2.78×10^8 CFU/mL, which resulted in the rapid mortality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Moreover, the entomopathogenic activity of *Chromobacterium* was dose-dependent. Mechanistic investigations revealed that *Chromobacterium* could impair the mosquito midgut barrier and increase midgut permeability, leading to the enrichment of bacteria in the hemolymph, thus accelerating mosquito death. Additionally, a components study revealed that proteins secreted by *Chromobacterium* led to mosquito death. The mosquitocidal activity of *Chromobacterium* makes it a potential candidate for the development of enhanced mosquito control strategies.

***Aedes aegypti*, *Chromobacterium*, mosquitocidal, midgut barrier**

doi: [10.1360/SSV-2020-0236](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0236)