

研究报告

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种食物中毒分离株的遗传特性研究

董银苹,王伟,江涛,徐进,李凤琴

(国家食品安全风险评估中心,国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 对1株引起聚集性米酵菌酸中毒的生吊面浆食品样品分离株唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)DBJ进行全基因组测序并分析,解析菌株产毒及致病的基因特征。方法 提取唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种DBJ基因组DNA,对菌株进行测序获得全基因组完成图,利用生物信息学分析手段对序列进行挖掘分析。结果 菌株DBJ基因组由两个染色体(G1和G2)和一个质粒(P)组成,其中两个染色体大小均为4 Mb左右,质粒大小约为300 kb。两个染色体的GC含量也相仿,约为68.0%,质粒则稍低为63.0%。进一步分析发现,G2染色体上存在产米酵菌酸的**bon**基因簇。遗传进化分析后发现,菌株DBJ在亲缘关系上与加拿大玉米分离株UCD-UG_CHAPALOTE最为接近,两株菌处在同一进化分支。且255株菌种中有31株携带**bon**基因簇的菌株,较不携带该基因的唐菖蒲伯克霍尔德菌有明显遗传进化倾向。结论 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种DBJ分离株基因组中携带产米酵菌酸的**bon**基因簇,是引起食物中毒的主要原因。

关键词:唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种;米酵菌酸;**bon**基因簇;食物中毒

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)01-0039-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.01.008

**Genetic characteristics of *Burkholderia gladiolus* pv. *cocovenenans*
isolated from poisonous food**

DONG Yinping, WANG Wei, JIANG Tao, XU Jin, LI Fengqin

(NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective Whole genome sequencing and analysis was conducted on a *Burkholderia gladiolus* pv. *cocovenenans* strain, isolated from raw corn flour sample which caused family agglutinative bongkrekic acid poisoning. The genetic characteristics of its virulence and pathogenicity were analyzed as well. **Methods** Genomic DNA was extracted from DBJ isolate, the whole genome sequencing was carried out. Bioinformatics method were used to mine and analyze the data obtained from sequencing. **Results** Two independent chromosomes (G1 and G2) and one plasmid (P) were found in DBJ isolate. The lengths of the chromosomes and plasmid were about 4 Mb and 300 kb respectively. The GC content of the two chromosomes was both around 68.0%, and that of the plasmid was slightly lower at 63.0%. The **bon** gene cluster was found on chromosome G2. The phylogenetic analysis showed that DBJ isolate and UCD-UG_CHAPALOTE stain which was isolated from corn sample in Canada were in the same clade. Among 255 strains, 31 carrying **bon** gene cluster and they had obvious genetic evolutionary tendency. **Conclusion** The **bon** gene cluster was located on the chromosome of *Burkholderia gladiolus* pv. *cocovenenans* DBJ, and it was the main pathogenic gene causing food poisoning in human.

Key words: *Burkholderia gladioli* pv *cocovenenans*; bongkrekic acid; **bon** gene cluster; food poisoning

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)是由我国科学家首次发现并命名的食源性致病菌。1953年我国黑龙江省首次报道因进食酵米面引起的食物中

毒事件,并于1961年从中毒的酵米面样品中分离到产毒病原菌,将其命名为“黄色菌”^[1]。1980年,基于对其表型特性的研究,又将该菌更名为酵米面黄杆菌(*Flavobacterium farinofermentans*),并于1984年首次从酵米面黄杆菌的代谢产物中检测到与米酵菌酸结构一致、当时被命名为“黄杆菌毒素A”的化学物质^[2-3]。随着对该菌研究的深入,1987年孟昭赫教授又将酵米面黄杆菌再次更名为椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Pseudomonas cocovenenans* subsp.

收稿日期:2021-12-19

作者简介:董银苹 女 副研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: dongyinping@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

farinofermentans)^[4]。随着分子生物学技术的发展及其在微生物领域的应用,我国学者 1995 年又一次修改了该菌的分类学地位,将其定为伯克霍尔德菌属下的一个种,命名为唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种并一直沿用至今^[5]。

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种隶属于伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*),该属现有 25 个种,对人类致病的主要有洋葱伯克霍尔德菌(*B. cepacia*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*B. pseudomallei*)和唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*),其中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种可引起人类食物中毒^[6]。该菌污染食品后在适宜的环境条件下可迅速繁殖并产生有毒代谢产物米酵菌酸(Bongkrekic acid, BA)。米酵菌酸是一种高度不饱和、带有特殊分支结构的三羧基脂肪酸,耐热性强,120 ℃处理 1 h 仍不能被破坏,因此食物一旦被其污染,正常的家庭烹饪方法难以祛除,进食后即可引发中毒,病死率高达 68% ~ 100%。据不完全统计,近十年来我国由米酵菌酸导致的食物中毒死亡人数占细菌性食物中毒死亡总数的 38% 以上,居我国细菌性食物中毒死亡人数之首。

本研究就 1 株引起我国云南省聚集性米酵菌酸中毒,从生吊面浆样品中分离的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种菌株 DBJ 进行全基因组测序,并对菌株序列信息展开深入分析,以阐明该菌株产毒致病的机理,为食物中毒预防和溯源提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

生物安全柜(美国 Labconco),冷冻离心机(日本日立),普通 PCR 仪(BIO-RAD)。

PDA 培养基、脑心浸液培养基(北京陆桥技术责任有限公司),DNA 提取试剂盒(美国 Omega)。

1.2 菌株

分离株:唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(编号 DBJ)由国家食品安全风险评估中心微生物实验室保藏。

2014 年 7 月,云南省文山州广南县八宝镇发生一起食物中毒聚集性事件,中毒人数 20 人,造成 6 人中毒死亡。中毒发病急,有上腹不适、恶心、呕吐、头疼、全身无力、意识不清、抽搐、昏迷等临床表现,结合流行病学调查,怀疑由米酵菌酸中毒引起。检验人员从中毒者家中用来制作吊浆靶汤圆的生吊面浆中分离出唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种,命名为 DBJ,并于保菌管中-80 ℃保藏。

参考菌株序列:从 PATRIC 数据库中下载唐菖蒲伯克霍尔德菌基因序列共 254 个。分别来自中国、韩国、印度、澳大利亚、印度尼西亚、美国、英国、意大利、加拿大、巴西、津巴布韦等地,包含了临床、食品、环境、植物等多种分离基质。

1.3 全基因组测序

从保菌管中用无菌接种环取一环冻存液,划线接种于 PDA 培养基内,接种后的培养基于 37 ℃培养箱内培养 24 h。将复苏后的菌落纯培养后,取单菌落接种于脑心浸液培养基内,并于 37 ℃培养箱内培养 36 h。用 DNA 提取试剂盒提取培养物中的 DNA。提取后的 DNA 经质控合格后送往天津生物芯片公司,用 Pacific Biosciences sequel II 平台进行三代测序,获得菌株的全基因组序列完成图。

1.4 序列分析

测序后的数据经过 Hierarchical Genome Assembly Process(HGAP)分析流程进行基因组 *De novo* 组装并注释。用 SpeciesFinder^[7] 和 KmerFinder^[8] 对组装并注释后的 DBJ 分离株序列进行鉴定。用 Virulence factor database(VFDB)数据库预测序列内携带的毒力基因^[9],检测参数设置为 90% 匹配度和 95% 覆盖度。将 DBJ 基因组氨基酸序列与 COG 数据库进行序列同源性分析,获得菌株基因组编码功能信息。通过 BLAST 比对,找出分离株和参考序列中携带的 *bon* 基因簇,并分析基因簇的结构组成。以参考菌株唐菖蒲伯克霍尔德菌 ATCC 25417 为标准序列,构建 255 株唐菖蒲伯克霍尔德菌核心基因组系统发育进化树,并用 iTOL V6 (<https://itol.embl.de/>) 对构建的树文件进行可视化分析^[10-11]。

2 结果

2.1 分离株 DBJ 基因组特征

分离株 DBJ 的全基因组序列经 SpeciesFinder 和 KmerFinder 鉴定,均为唐菖蒲伯克霍尔德菌。测序结果显示,DBJ 菌株的基因组主要由三部分组成,包括两个染色体(G1 和 G2)和一个质粒(P)。两个染色体均为环状结构,大小相仿,分别为 4 004 752 bp 和 4 048 755 bp。环状质粒为 300 175 bp。从 GC 含量数据可见,除质粒的 GC 含量稍低,为 63.0% 外,两个染色体的 GC 含量也极为接近,分别为 68.0% 和 67.9%。详细基因组数据信息见表 1。

2.2 功能基因注释

将唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 DBJ 分离株的基因组编码区氨基酸序列与 COG 数据库进行序列同源性比对,在两个染色体基因组中共注释

表 1 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 DBJ 分离株基因组信息

Table 1 Genomic information of *Burkholderia gladiolus* pv. *cocovenenans* DBJ isolate

参数	染色体 G1	染色体 G2	质粒 P
大小/bp	4 004 752	4 048 755	300 175
GC 含量/%	68.0	67.9	63.0
CDS 数量	3 347	3 561	292
rRNA 数量	6	9	0
tRNA 数量	8	57	0
CRISPR 数量	0	0	0

得到 6 730 个蛋白。其中 G1 染色体中含有 3 219 个蛋白,其功能主要与氨基酸转运与代谢、转录、碳水化合物转运与代谢、无机离子转运与代谢、能量合成及转化、细胞壁/细胞膜/包膜的合成、信号转导等相关。G2 染色体有 3 511 个蛋白,其功能主要与氨基酸转运与代谢、转录、碳水化合物转运与代谢、细胞壁/细胞膜/包膜的合成、能量合成及转化、无机离子转运与代谢、翻译/核糖体结构/生物合成等相关。

2.3 系统发育进化分析

将唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 DBJ 分离株的基因组与 254 株唐菖蒲伯克霍尔德菌参考

序列进行基于核心基因组的系统发育进化分析。核心基因组是指同一物种内绝大多数菌株中都存在的所有基因,多为功能基因和管家基因。本研究从 255 个唐菖蒲伯克霍尔德菌的基因组中共计获得了 4 131 个核心基因,基于此构建了系统发育进化树。图 1 进化树结果显示,分离株 DBJ 与参考序列 UCD-UG_CHAPALOTE 最为接近,处在同一个进化分支,参考株信息显示,该参考菌株分离自加拿大的玉米样品。DBJ 与 3 株美国临床样品分离株 BCC1661、BCC1665 和 BCC1686 及本实验室保藏的 1 株酵母面样品分离株 Co14 也较为接近。结合 *bon* 基因簇分析结果发现,上述进化关系接近的 6 株菌均携带米酵菌酸合成 *bon* 基因簇。值得注意的是,本研究使用的 255 株菌的基因组序列中有 31 株序列携带 *bon* 基因簇,其他 224 株菌不携带。在系统进化分析中,所有携带 *bon* 基因簇的菌株均聚集在一起,形成进化关系较紧密的三个分支(图 1 红色框内),有明显的同源进化倾向。因 DBJ 分离株携带产米酵菌酸 *bon* 基因簇,该分离株也可从基因进化上鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种。

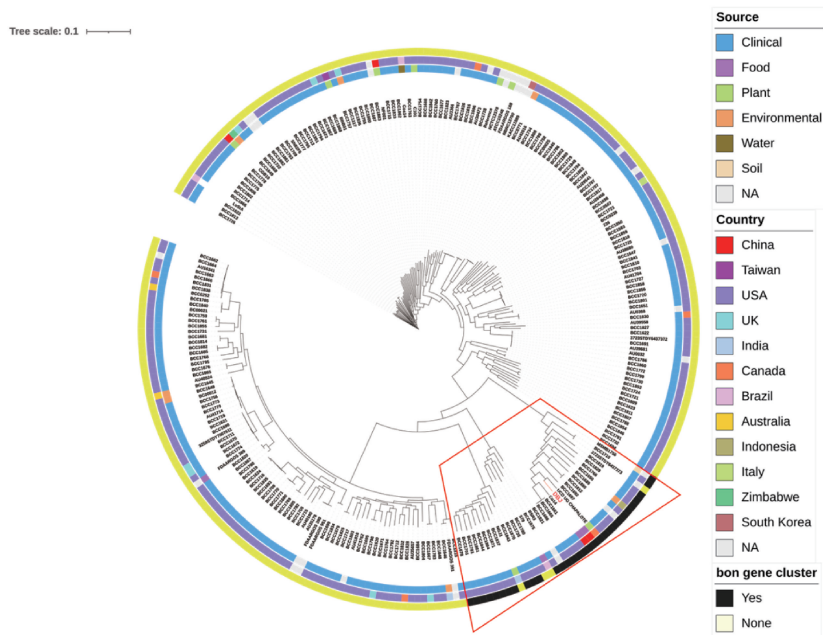


图 1 255 株唐菖蒲伯克霍尔德菌基于核心基因组构建的亲缘关系进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of 255 strains of *Burkholderia gladiolus* based on core genome

2.4 *bon* 基因簇分析

将 31 株携带米酵菌酸合成 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德菌与标准 *bon* 基因簇进行比对,结果发现在 DBJ 分离株的 G2 染色体上存在典型的 *bon* 基因簇,其他 30 个参考序列中也发现不同组合的该基因簇。唐菖蒲伯克霍尔德菌携带的 *bon* 基因簇主要由 13 个基因组成,分别为 *bonL*、*bonJ*、*bonK*、*bonF*、

bonG、*bonA*、*bonB*、*bonC*、*bonD*、*bonE*、*bonH*、*bonI*、*bonM*。除 *bonA* 和 *bonB* 外,其余 11 个基因在 31 株菌中均普遍携带。本研究的分离株 DBJ 和参考序列 UCD-UG_CHAPALOTE、BCC1821、BCC1675、BCC1766 等携带全部的 13 个基因。而有 22 个参考序列缺少 *bonA*, 4 个参考序列缺少 *bonB*, 具体见图 2。

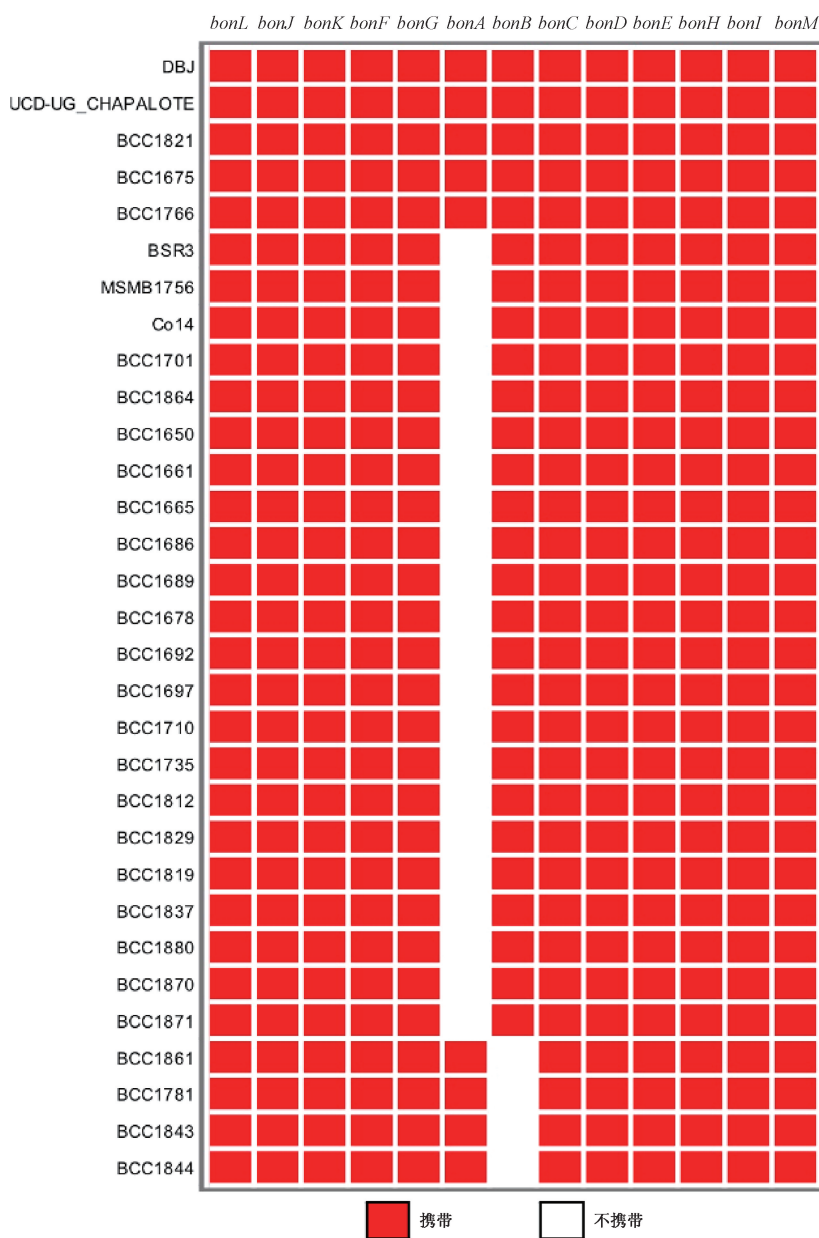


图 2 31 株唐菖蒲伯克霍尔德菌 *bon* 基因簇携带热图

Figure 2 Heat map of *bon* gene cluster of 31 strains of *Burkholderia gladiolus*

3 讨论

目前,由唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种引起的食物中毒主要发生在我国、印度尼西亚和非洲的莫桑比克^[12-13],其中绝大多数病例报道出自我国。现有数据显示,1953—1994 年间,我国共发生米酵菌酸引起的食物中毒 545 起,中毒人数 3 352 人,死亡 1 401 人,平均病死率为 41.8%,病例主要分布在黑龙江、吉林、辽宁、广西、四川、河北、内蒙古、山西、云南等省份。随着防控措施的加强和消费者防范意识的提高,该病的发病率自 1994 年后较前期明显下降,但病死率仍居高不下。自 1995 年至今,我国米酵菌酸中毒人数共 250 人,死亡 133 人,平均病死率为 53.2%,主要发生地为云南、四川、广西和东北三省,引起中毒的食品

仍以家庭自制谷类发酵制品为主^[14-18]。尤其在 2020 年,黑龙江鸡西一家庭聚餐中 9 人食用了被米酵菌酸污染的自制“酸汤子”中毒并全部死亡,这也是近期由该菌引起的最严重的一次中毒事件。

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种引起的食物中毒主要是由菌株产生的米酵菌酸引起的。米酵菌酸是一种无色无味的多不饱和聚酮化合物,无色无味,进入机体后主要抑制细胞内腺嘌呤核苷酸转运体(Adenine nucleotide translocator, ANT)。ANT 又称 ADP/ATP 转运酶和载体,位于线粒体内膜上,主要功能是从线粒体向细胞质提供 ATP,以交换细胞质中的 ADP,从而维持细胞正常功能所必需的能量。ANT 一旦被米酵菌酸结合,结构随之改变,

ADP 与 ATP 在线粒体内膜上的交换被阻断,致使 ATP 生成减少或不产生,继而影响整个细胞内依赖 ATP 的生理功能,最终导致细胞死亡。由于米酵菌酸结合的 ANT 表达主要在心脏、肺、大脑、肝脏等重要组织和器官中,因此一旦引起中毒,患者多死于重要器官的衰竭。

目前国内外对唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的致病机理研究较少,本实验室前期对米酵菌酸中毒食品分离株 Co14 的研究显示,该菌由两个染色体及一个质粒组成,编码米酵菌酸的基因是以 *bon* 基因簇的形式存在于菌株 Co14 主染色体上。由大小相似的两个染色体组成的基因组在食源性致病菌中较为罕见,有研究认为,其中一条为主染色体,包含了与细菌基本生命活动相关的关键基因,而与环境适应性等其他活动相关的基因则位于其他染色体(或称其为次级染色体)或质粒上。除主染色体以外的其他染色体进化较快,可提高菌株的环境适应性,也有报道认为次级染色体是由质粒进化而来^[19-20]。本研究的 DBJ 菌株基因组成也和 Co14 菌株类似,有两个染色体和一个质粒,米酵菌酸产毒基因簇位于 G2 染色体内,且基因簇包含了全部 13 个基因。

系统发育进化分析发现,携带 *bon* 基因簇的 31 株唐菖蒲伯克霍尔德菌在进化关系上有明显的同源进化倾向,表明产毒株在遗传学上可能具有相同祖先株。值得注意的是,在世界范围内仅中国、印度尼西亚和非洲的莫桑比克有该菌引起的中毒报道,而 30 株公开发表的携带 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德菌中有 24 株源于美国临床分离株、1 株源于加拿大玉米样品分离株(也是本研究 DBJ 菌株在进化关系上最相近菌株 UCD-UG_CHAPALOTE),但却未见人类中毒相关报道。究其原因,一是可能与各国的食物制作方式和饮食习惯不同有关,导致菌株虽携带产毒基因但未表达。唐菖蒲伯克霍尔德菌主要在玉米及椰子发酵类食品中最宜生长并产毒。二是与各国对中毒病例的临床表现认知和诊断能力各异,由此导致对中毒疾病的误报和漏报。三是从遗传学角度分析,菌株的产毒基因簇是否存在突变及缺失、基因簇所处的不同基因环境等是否会影响菌株的产毒等还需要进一步挖掘和分析,并经产毒实验佐证。鉴于我国民间的饮食习惯以及该菌的危害,建议加强监测,及时发现危险因素,预防食物中毒的发生。

参考文献

- [1] 金家香. 发霉变质发酵米面食物中毒的病原学研究的初步报告[J]. 卫生防疫工作, 1963, 第 41 号: 21-26.
- [2] 醉米面中毒病因研究协作组. 醉米面中毒病因的研究: 发现一种新的食物中毒菌: 醉米面黄杆菌 (*Flavobacterium farinifermentans* n. sp.) [J]. 中国医学科学院学报, 1980, 2 (2): 77-82, 147.
- [3] 胡文娟, 陈晓明, 王玉华, 等. 醉米面黄杆菌毒素 A 的提纯及鉴定[J]. 卫生研究, 1984, 13(4): 34-37.
- [4] 孟昭赫, 苏翠华, 李兆普, 等. 醉米面黄杆菌与椰毒假单胞菌的对比研究[J]. 卫生研究, 1987, 16(6): 17-22.
- [5] ZHAO N, QU C, WANG E, et al. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al. 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) comb. nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 600-603.
- [6] 王海燕, 宋曼丹, 王建, 等. 广东省首起米面粉米酵菌酸中毒病原菌鉴定研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 394-398.
- [7] LARSEN M V, COSENTINO S, LUKJANCENKO O, et al. Benchmarking of methods for genomic taxonomy [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(5): 1529-1539.
- [8] HASMAN H, SAPUTRA D, SICHERITZ-PONTEN T, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(1): 139-146.
- [9] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [10] TREANGEN T, ONDOV B, KOREN S, et al. Rapid core-genome alignment and visualization for thousands of intraspecific microbial genomes [J]. Genome Biology, 2014, 15(11): 524.
- [11] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): 293-296.
- [12] GUDO E S, COOK K, KASPER A M, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in Mozambique: The first documented bongkreki acid poisoning in Africa [J]. Clinical Infectious Diseases, 2017, 66(9): 1400-1406.
- [13] FALCONER T M, KERN S E, BRZEZINSKI J L, et al. Identification of the potent toxin bongkreki acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak [J]. Forensic Science International, 2017, 270: e5-e11.
- [14] 李晓琳, 杨祖顺, 国译丹, 等. 椰毒假单胞菌醉米面亚种食物中毒的病原分离鉴定 [J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28 (1): 36-39.
- [15] 彭子欣, 李凤琴. 唐菖蒲伯克霍尔德菌米酵菌酸生物合成机制 [J]. 卫生研究, 2020, 49(2): 336-338.
- [16] 周帼萍, 梁泉, 黄庭轩, 等. 云南省文山州广南县吊浆粳食物中毒事件的病原学分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(1): 71-75.
- [17] 范璐, 栾杰. 云南省一例唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌醉米面亚种)食物中毒事件调查分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8098-8101.
- [18] 董国富. 椰毒假单胞菌醉米面亚种食物中毒 8 例 [C]. 中华医学会: 中华医学会急诊医学分会第 17 次全国急诊医学学术年会论文集, 2014: 325.
- [19] BOCHKAREVA O O, MOROZ E V, DAVYDOV I I, et al. Genome rearrangements and selection in multi-chromosome bacteria *Burkholderia* spp [J]. BMC Genomics, 2018, 19 (1): 965.
- [20] MULLINS A J, JONES C, BULL M J, et al. Genomic assemblies of members of *Burkholderia* and related genera as a resource for natural product discovery [J]. Microbiology Resource Announcements, 2020, 9(42): e00485-e00420.