

## 论著

## 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染调查及病原特征分析

杨慧,王猛,李冯,洪敏丽,徐李清,杜文旗,金玉娟  
(深圳市龙岗区疾病预防控制中心,广东深圳 518172)

**摘要:**目的 研究木耳、银耳、米/河粉等食品受唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的污染情况,阐明所分离唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的病原特征。方法 按照 GB 4789.29—2020,对7种食品共650份样品进行了培养,采用实时荧光定量PCR法检测 *bon* 基因簇,参照 GB 5009.189—2016 检测米酵菌酸,使用基因组测序分析唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种病原特征。结果 从650份样品中检出26株唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种,其中木耳中检出22株,检出率为15.71%。唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种菌株均携带 *bon* 基因簇和 *tox* 基因簇,基因簇中各基因在菌株之间具有高度相似度。耐药性分析显示所有菌株均携带有 *ceoA*、*ceoB* 和 *opcM* 这3个抗生素抗性基因。系统发育进化分析表明,分离得到的毒株与NCBI数据库中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种位于相同的进化分支,未发现显著突变。每个基因组包含167~184个碳水化合物代谢相关基因,且均具有完整的纤维素、几丁质、淀粉等多糖的完整代谢通路。结论 木耳易被唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染,需加强对木耳中该致病菌的风险监测。

**关键词:**唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种;米酵菌酸;风险监测;木耳;基因组

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)03-0207-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.03.001

**Contamination investigation and pathogenic characteristics analysis of *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans***

YANG Hui, WANG Meng, LI Feng, HONG Minli, XU Liqing, DU Wenqi, JIN Yujuan

(Shenzhen Longgang Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518172, China)

**Abstract: Objective** To investigate the contamination levels of foods such as wood ear, *Tremella fuciformis* (white jelly fungus), and rice noodles caused by *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*, and to elucidate the pathogenic traits of the isolated *Burkholderia cocovenenans* strains. **Methods** According to GB 4789.29—2020, a total of 650 samples from seven different food types were collected. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the *bon* gene cluster, while bongkrekic acid levels were measured according to GB 5009.189—2016. Genomic sequencing was performed to elucidate the pathogenic features of *Burkholderia cocovenenans*. **Results** Among the 650 samples, 26 strains of *Burkholderia cocovenenans* were detected, with 22 of these strains isolated from wood ear, resulting in a positive detection rate of 15.71%. All strains of *Burkholderia cocovenenans* harbored the *bon* and *tox* gene cluster. The antibiotic resistance analysis revealed that all the strains carry the three antibiotic resistance genes: *ceoA*, *ceoB*, and *opcM*. Phylogenetic analysis indicated that the strains isolated in this experiment belong to the same evolutionary clade as *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* in the NCBI database, and no significant mutations were observed. Each genome contained between 167 and 184 genes involved in carbohydrate metabolism, with comprehensive metabolic pathways for various polysaccharides, including cellulose, chitin, and starch. **Conclusion** Wood ear are susceptible to contamination by *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*, which underscores the need for enhanced risk monitoring of this pathogenic bacterium, particularly in wood ear.

**Key words:** *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*; bongkrekic acid; risk monitoring; wood ear; genome

收稿日期:2024-11-25

基金项目:深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS202100036)

作者简介:杨慧 女 主任技师 研究方向为病原微生物检测 E-mail:lhyh@qq.com

通信作者:金玉娟 女 主任技师 研究方向为病原微生物检测 E-mail:467650742@qq.com

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*)是伯克霍尔德菌属的一种革兰氏阴性菌,主要存在于变质的大米、玉米、薯类制品以及变质银耳、木耳中,能够引发食物中毒且致死率极高<sup>[1-3]</sup>。研究显示,该菌分泌的毒素主要有两种,即米酵菌酸(Bongkrekic acid, BA)和毒黄素(Toxoflavin, TF)<sup>[4]</sup>。一般认为,TF毒性相对较轻,BA才是食物中毒事件中导致死亡的主要原因。BA是一种线粒体毒素,能够与线粒体腺嘌呤核苷酸转运体(Adenine nucleotide translocator, ANT)结合,阻碍ADP与ATP在线粒体内膜上的转化,阻断正常的能量供应,使细胞死亡<sup>[5]</sup>。BA无臭无味,消费者难以察觉到食品是否被BA所污染。此外,由于BA热稳定性强,普通食品加工方式难以将其从食材中去除。因此,BA引起的食物中毒事件时有发生,如2015年1月,发生在非洲莫桑比克的中毒事件中,因食用了受BA污染的玉米饮品,造成了177人住院,75人死亡<sup>[6]</sup>。2020年10月,发生在黑龙江省中毒事件中,食用受污染“酸汤子”9人全部死亡<sup>[7]</sup>。据统计,该菌引起的食物中毒事件平均死亡率为41.80%,个别中毒事件中死亡率高达100%<sup>[8]</sup>。

碳水化合物作为重要的能源物质,对微生物在外部环境的定殖具有重要影响。比如TIAN等<sup>[9]</sup>研究发现枯草芽胞杆菌能够将蔗糖合成果聚糖,进而诱导细胞分泌表面活性素,显著促进该菌在植物根系上的定殖能力。同样,LOO等<sup>[10]</sup>发现糖转运蛋白在调控拟南芥根部微生物群落的纵向定殖中发挥了重要作用。CHU等<sup>[11]</sup>则是发现了浒苔多糖能够促进解淀粉芽胞杆菌在植物根际的定殖,其中,浒苔多糖一方面可作为微生物成膜信号,另一方面其葡萄糖残基也可用作碳源生成胞外多糖和聚γ谷氨酸盐等生物膜成分。唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种引发的食物中毒事件多由食用受污染的米粉、玉米、薯类等一些高碳水食物所引起,鉴于该菌的高危害性,深入研究不同食品受污染的情况,阐明该菌的碳水化合物代谢能力以及潜在的定殖原因尤为重要。这对于确保食品的安全性、保护消费者健康以及指导食品的处理加工具有至关重要的意义。

为此,本研究对7种食品的650份样品中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的分布情况进行了系统调查,并对所分离到的菌株进行基因组测序,揭示了不同类型食品的受污染情况,并通过基因组学手段揭示了该菌的病原特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

本研究于2023—2024年共采集650份样品,包括木耳140份、银耳60份、米/河粉190份、谷物120份、糕点100份、汤圆20份和酒酿20份。上述样品购自网上商城和深圳市龙岗区超市、农贸市场。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

ABI7500荧光定量PCR仪(美国赛默飞),VITEK MS微生物质谱检测系统(法国梅里埃),VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏系统(法国梅里埃),生物安全柜(新加坡ESCO),恒温培养箱。

GVC增菌液(广东环凯),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(mPDA,广东环凯),PCFA培养基(广东环凯),卵黄琼脂培养基(广东环凯),唐菖蒲伯克霍尔德氏菌荧光PCR检测试剂盒、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*bon*基因)荧光PCR检测试剂盒(深圳生科源),BA标准品(美国Sigma Aldrich),甲醇、乙腈(HPLC级,色谱纯,默克股份两合公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 NCBI数据库中唐菖蒲伯克霍尔德菌基因组的收集

以“*Burkholderia gladioli*”为关键词下载NCBI数据库中唐菖蒲伯克霍尔德菌的基因组序列,并记录每个菌株的来源(Isolate source)。使用CheckM2(v1.0.2)对所得基因组质量进行评估<sup>[12]</sup>,去除完整度小于90%或者污染度大于5%的基因组。使用Prodigal(v2.6.3)对蛋白质编码基因进行预测获得编码区序列<sup>[13]</sup>。以DMSZ11318的BA合成基因簇(*bonLJKFGABCDHIM*,NCBI登录号:JX173632)作为参考序列,通过Blast(v2.15.0+)寻找含有BA合成基因簇的基因组(相似度>90%,覆盖度>90%)。以MAFF327195的TF合成基因簇(*toxRABCDE*,NCBI登录号:AB040403)作为参考序列,通过Blast(v2.15.0+)寻找含有TF合成基因簇的基因组(相似度>90%,覆盖度>90%)。

#### 1.2.2 菌株的分离鉴定

按照GB 4789.29—2020《食品安全国家标准食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验》所描述的方法对样品中的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种进行检测。可疑菌落采用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定系统和VITEK MS微生物质谱检测系统进行鉴定。鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌的菌株,进一步通过检测产毒基因和BA确定其是否为唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种。*bon*基因的检测使用荧光定量

PCR 方法完成,当 Ct 值 $\leq 36.5$  时判定为阳性。BA 的含量按照 GB 5009.189—2023《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》(第二法液相色谱-质谱/质谱法)进行测定。

### 1.2.3 全基因组测序

使用十二烷基硫酸钠-十六烷基三甲基溴化铵法(Sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium bromide method, SDS-CTAB 方法)完成基因组 DNA 的提取,构建插入片段长度约为 350 bp 的测序文库,利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。使用 Fastp(v0.23.4)对 raw reads 进行过滤获得 clean reads,切除接头和标签序列,舍弃含有 N 的 reads,将 Q 值 $< 15$  的碱基判定为低质量碱基,舍弃低质量碱基占比大于 40% 的 reads。使用 Spades(v4.0.0)对 clean reads 进行基因组的拼接组装获得 scaffold,去除 scaffold 中长度 $< 1\ 000$  bp 的序列。将组装好的基因组提交至国家基因组科学数据中心(<https://ngdc.cnpc.ac.cn/>),登录号为 PRJCA036942。使用 CheckM2(v1.0.2)对基因组质量进行评估,使用 GTDB-tk(v2.1.1)对基因组进行分类<sup>[14]</sup>。使用 Abricate(v1.0.1)完成耐药基因(CARD 数据库)和毒力基因(VFDB 数据库)的预测<sup>[15-16]</sup>。

### 1.2.4 系统发育进化分析

使用 Snippy(v4.6.0)分析得到核心单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP),根据 SNP 位点信息利用 fasttree(v2.1.11)完成进化树的构建,并利用 iTOL(<https://itol.embl.de/>)完成可视化<sup>[17]</sup>。

### 1.2.5 基因簇相似度分析

按照 1.2.1 中描述的方法完成携带有 BA 合成基因簇和 TF 合成基因簇基因组的查找,使用 Usearch(v11.0.667)计算同一基因之间相似性。

### 1.2.6 碳水化合物代谢分析

将编码序列分别比对至 KEGG 数据库和 CAZY 数据库完成基因功能的注释和碳水化合物活性酶预测。碳水化合物活性酶分布热图使用 R(v4.1.1)中 pheatmap 包绘制完成。

## 2 结果

### 2.1 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的检出率

将 650 份样品接入 GVC 增菌液,24 h 后将增菌液划线接种 mPDA 平板和 PCFA 平板培养。mPDA 平板上的可疑菌落呈紫色、淡紫色或者暗紫色,湿润,边缘整齐;部分可疑菌落形态较干燥,中心凸起呈草帽状。PCFA 平板上形成的可疑菌落呈灰白色、湿润、表面光滑、边缘整齐。每个平板挑取 5 个可疑菌落划线接种于卵黄琼脂平板上继续培养,可疑菌落表面光滑、湿润、菌落周围形成乳白色混浊环,对日光斜视可见环表面呈明显虹彩现象。对于形态符合上述特征,且革兰氏染色、氧化酶试验均为阴性的菌株,进一步利用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统和 VITEK MS 微生物质谱检测系统进行鉴定,从 650 份样品中共检出 154 株唐菖蒲伯克霍尔德菌。在此基础之上,利用荧光定量 PCR 方法,在其中 26 株中检出 *bon* 基因簇。将这 26 株唐菖蒲伯克霍尔德菌接种于马铃薯葡萄糖半固体平板上进行产毒培养,利用液相色谱-质谱/质谱法在其中均检出 BA,含量为 15.4~569.8  $\mu\text{g/L}$ 。因此判定这 26 株为唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种。所有样品的总检出率为 4.00%,其中木耳的检出率最高,为 15.71%(22/140);接下来为谷物(1.67%)、糕点(1.00%);米/河粉检出率为 0.53%(1/190)具体信息见表 1。

表 1 不同类型食品中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种检出情况

Table 1 Detection of *Burkholderia gladioli* in various food types

样品类型	样品份数	唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种株数/株	检出率/%	唐菖蒲伯克霍尔德菌(不产毒株)菌株/株	检出率/%
木耳	140	22	15.71	66	47.14
银耳	60	0	0.00	18	30.00
米/河粉	190	1	0.53	27	14.21
谷物	120	2	1.67	12	10.00
糕点	100	1	1.00	5	5.00
汤圆	20	0	0.00	0	0.00
酒酿	20	0	0.00	0	0.00
合计	650	26	4.00	128	19.69

### 2.2 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种病原特征

选取分离到的 18 株产米酵菌酸量高的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种(木耳:16 株,河粉:1 株,糕点:1 株)以及 5 株不产毒的唐菖蒲伯克霍尔德菌进行全基因组测序,其余 8 株未进行全基因组测序的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的 BA 产毒定

量检测结果分别为 15.4、18.6、20.5、23.5、26.8、47.3、67.2 和 70.2  $\mu\text{g/L}$ 。经过组装,共获得 23 个高质量基因组,均被鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌(表 2)。所得菌株基因组大小为 8.15~8.50 Mb,编码序列数为 6 969~7 326,GC 含量均为 68%,毒力因子数量为 27~30(表 2)。同时,这些菌株均携带有 *ceoA*、*ceoB*

和 *opcM* 这 3 个抗生素抗性基因,能够编码合成 *CeoAB-opcM* 外排泵,可将部分氨基糖苷类抗生素和氟喹诺酮类抗生素排出胞外,从而使其具有耐药性(表 2)。唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种与不产毒

唐菖蒲伯克霍尔德菌在基因组大小( $p=0.97$ , wilcoxon test)、编码区数量( $p=0.25$ , wilcoxon test)、GC 含量( $p=1$ , wilcoxon test)、毒力因子数量( $p=0.98$ , wilcoxon test)和抗生素抗性基因种类上均无明显差异。

表 2 唐菖蒲伯克霍尔德菌基因组特征

Table 2 Genomic characteristics of *Burkholderia gladioli*

菌株名称	分离源	产毒情况/( $\mu\text{g/L}$ )	基因组大小/Mb	Scaffolds 数目	N50	GC 含量	CDS 数	耐药基因	毒力因子数
2022155-1	木耳	324.7	8.42	83	248675	0.68	7 256	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
202232-1	木耳	89.5	8.40	86	352662	0.68	7 226	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29
202278-2	河粉	323.9	8.30	75	206404	0.68	7 048	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
202299-1	木耳	89.7	8.39	46	469176	0.68	7 217	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023013103	木耳	114.8	8.36	47	546687	0.68	7 202	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023022559-1	木耳	242.1	8.44	70	208187	0.68	7 203	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29
2023074491	木耳	76.3	8.47	75	280626	0.68	7 304	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29
2023076563	木耳	220.3	8.18	39	563082	0.68	7 015	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023078569	木耳	278.5	8.15	43	561849	0.68	7 001	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023081536	木耳	569.8	8.22	57	265644	0.68	7 034	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023084565	木耳	ND	8.38	59	336263	0.68	7 149	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023087571	木耳	99.1	8.24	59	272711	0.68	7 048	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023091490	木耳	ND	8.50	71	311258	0.68	7 163	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29
2023093503	木耳	ND	8.42	87	253808	0.68	7 213	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29
2023095518	木耳	127.8	8.34	47	439768	0.68	7 120	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023096567	木耳	554.8	8.38	72	181525	0.68	7 274	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023099534	木耳	131.6	8.47	52	328446	0.68	7 309	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023101537	木耳	259.3	8.48	50	351126	0.68	7 318	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023102523	木耳	ND	8.18	60	287356	0.68	6 969	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	30
2023108489	糕点	132.7	8.17	37	702214	0.68	7 010	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2023110560	木耳	ND	8.34	71	340565	0.68	7 066	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	27
2023111561	木耳	146.3	8.48	69	285545	0.68	7 326	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	28
2024003LGMJJ240703	木耳	145.8	8.45	60	276880	0.68	7 240	<i>ceoA/ceoB/opcM</i>	29

注:ND代表未检出

为了解 BA 和 TF 合成基因簇在唐菖蒲伯克霍尔德菌中的分布情况,从 NCBI 数据库中收集 331 个唐菖蒲伯克霍尔德菌基因组,过滤掉完整度<90%或污染度>5%的基因组后,共获得 320 个高质量基因组。通过 Blast 比对,对这 320 个高质量唐菖蒲伯克霍尔德菌基因组进行检索,结果显示 45 个含有 BA 合成基因簇(14%),318 个含有 TF 合成基因簇(99%),表明 TF 合成基因簇在唐菖蒲伯克霍尔德菌中的分布更为广泛(图 1A~1B)。在试验得到的 18 株唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种基因组中均发现典型的 BA 合成基因簇的存在,即 *bonLJKFGABCDHIM* (图 1A),而在不具有 BA 合成能力的唐菖蒲伯克霍尔德菌中未发现上述任何一个基因。唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的 BA 合成基因簇每个基因之间具有高度的相似性,平均相似度为 99.66%,其中 *bonI* 之间的相似度最高(99.71%~100%,平均:99.96%),*bonL* 次之(99.61%~100%,平均:99.90%),*bonD* 之间的相似性最低(87.42%~100%,平均:99.27%)(图 1C)。在本试验得到的 23 株细菌基因组中均检测到完整的 TF 合成基因簇 *toxRABCDE* (图 1A)。TF 合成基因簇各基因之间相似度同样较

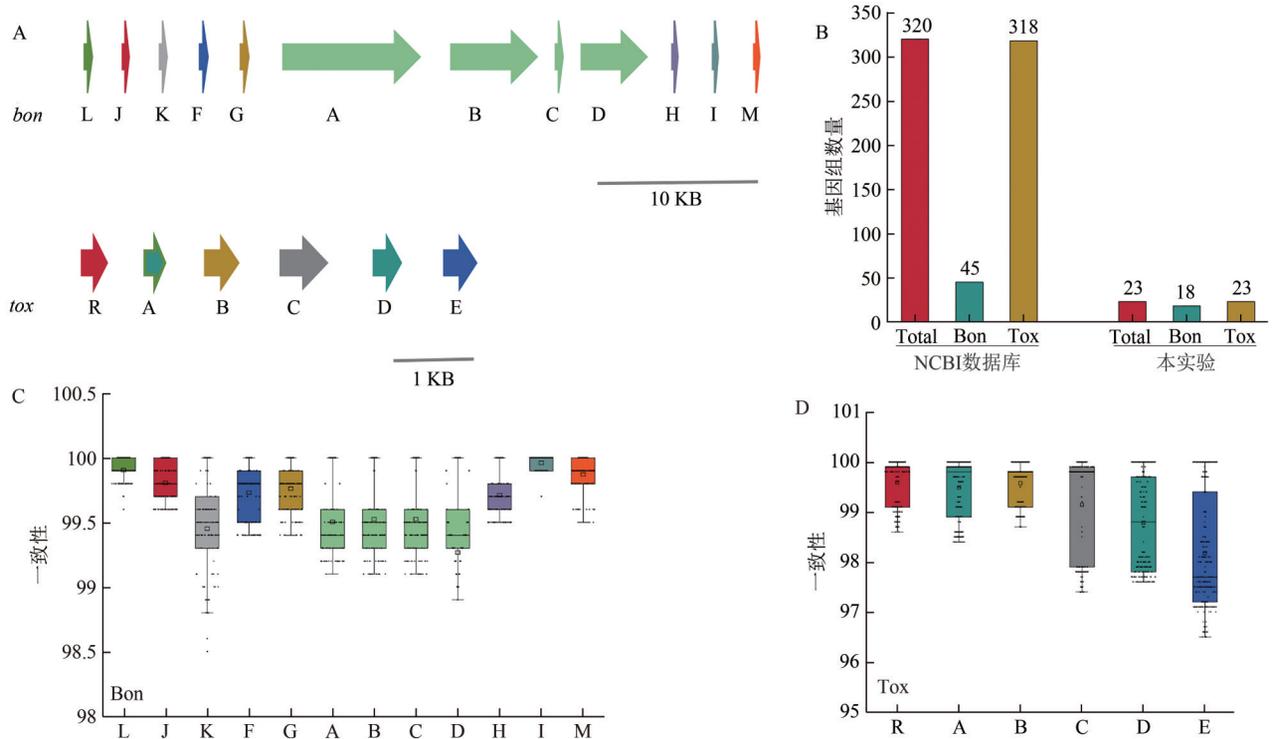
高,平均为 99.03%(图 1D)。

### 2.3 系统发育进化分析

将从 NCBI 数据库获得的 45 个携带有 BA 合成基因簇的基因组作为参考序列,与本试验中获得的 23 个唐菖蒲伯克霍尔德菌基因组一起根据核心 SNP 构建了系统发育进化树,如图 2 所示,5 株不分泌 BA 的唐菖蒲伯克霍尔德菌单独聚成一簇,表明其与唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种基因组差异较大。基因组相似度分析也表明,唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种菌株之间更为相似(99.08%~99.99%),而与不分泌 BA 的唐菖蒲伯克霍尔德菌差异较大(98.04%~98.14%)。从木耳中得到的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种分布在 6 个不同的簇中,并未展现出明显的聚集倾向,与其较为接近的参考基因组序列多分离自临床样本、玉米根茎、发酵玉米粉等不同食品(图 2),这表明定殖于木耳上的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种并未对木耳形成专一的偏好性。

### 2.4 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的碳水化合物代谢途径

通过 CAZy 数据库,从每株菌中发现 167~184 个



注:(A)BA合成基因簇(上)和TF合成基因簇(下)的结构;(B)BA合成基因簇和TF合成基因簇在唐菖蒲伯克霍尔德菌中的分布情况;  
(C)BA合成基因簇中各基因之间的相似性;(D)TF合成基因簇中各基因之间的相似性

图1 唐菖蒲伯克霍尔德菌BA和TF合成基因簇的结构和相似性

Figure 1 Structure and similarity of BA and Tox synthesis gene clusters in *Burkholderia gladioli*

碳水化合物降解相关基因,包含碳水化合物降解的全部六大类家族(图3),其中糖苷转移酶类(67~79)和糖苷水解酶类(59~67)的含量最为丰富,多糖裂解酶类的含量最少(3~4)(图3)。进一步分析发现,糖苷转移酶类主要来自GT4、GT2、GT51等16个不同的家族,糖苷水解酶主要来自GH23、GH13、GH3等22个不同的家族(图4)。GH23家族的糖苷水解酶主要包括溶菌酶、几丁质酶和肽聚糖裂解酶, GH13家族的糖苷水解酶许多成员则广泛参与淀粉和糖原的降解, GH3家族则包含许多能够降解纤维素的酶类。

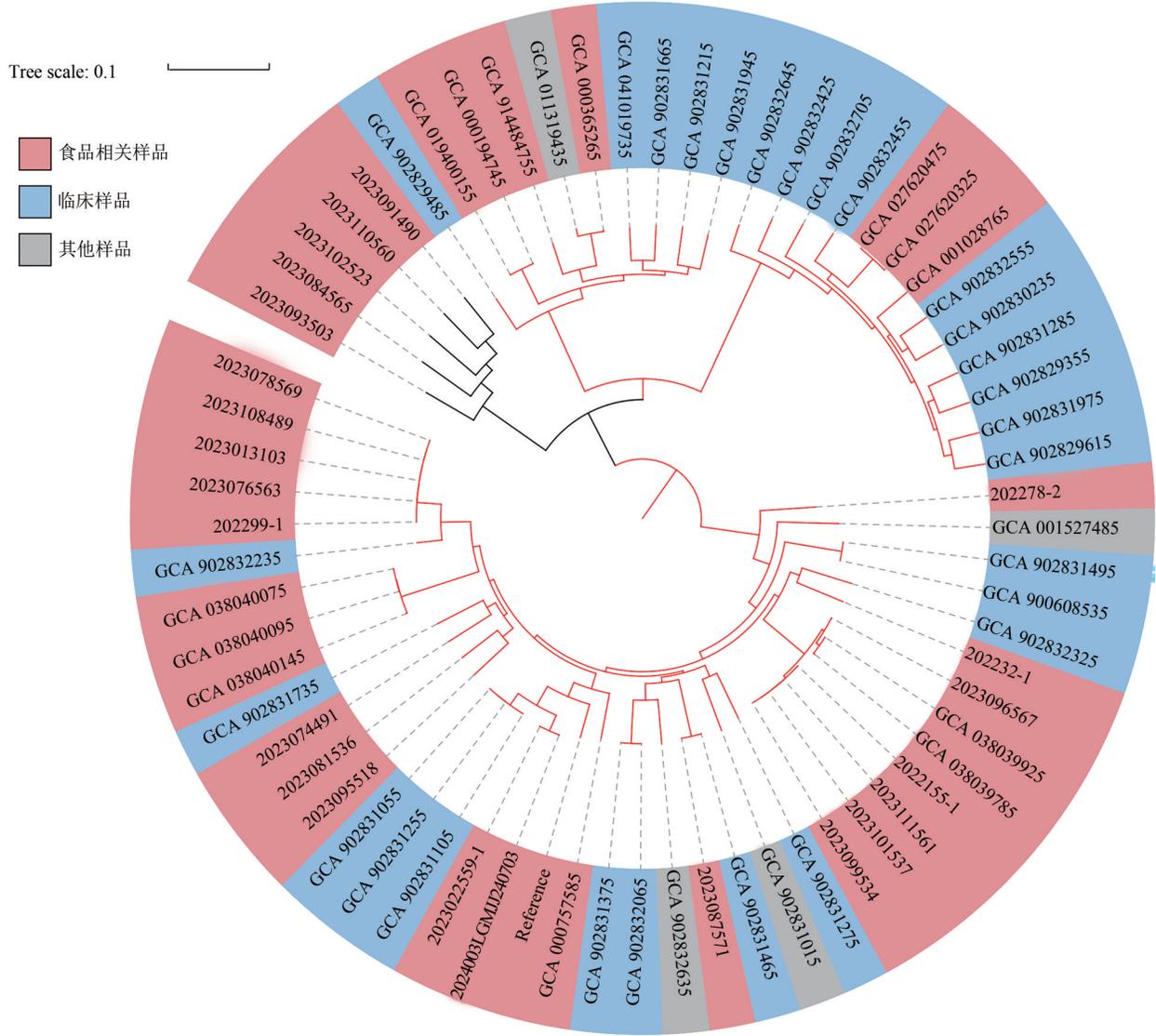
如图5所示,本试验得到的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种均具有完整的葡萄糖、木糖、岩藻糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、纤维素等多种糖类物质的代谢通路。同时,米/肠粉、糕点、木耳也是富含多糖的食品,比如淀粉、纤维素、木耳多糖(由葡萄糖、甘露糖、木糖等单糖组成的多糖)等,这些能为该菌所利用。因此,多样的碳水化合物代谢途径可能是唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种定殖于这些食品上的原因。

### 3 讨论

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种是一种发病率和死亡率极高的食源性致病菌,由其造成的食

物中毒事件时有发生。研究该菌在食品中的分布情况可为食品安全风险监测提供依据,确定污染来源,预防BA中毒事件的发生。比如一项针对鲜湿米粉生产销售全流程唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染的调查研究明确了米粉生产过程中该菌的污染来源,为预防污染措施的制定提供了关键证据<sup>[18]</sup>。一项对菌菇类食品中唐菖蒲伯克霍尔德菌污染调查发现,银耳易被唐菖蒲伯克霍尔德菌污染,提示需加强对银耳中该致病菌的风险监测<sup>[1]</sup>。木耳作为一种营养丰富、口感独特的食材,在日常生活饮食中扮演着重要的角色。近些年也发生过因食用木耳造成的BA中毒<sup>[19]</sup>。本研究发现木耳中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的阳性率最高,污染率远远高于银耳、米/河粉、糕点等食品,证明木耳易被该菌所污染,提示需加强对木耳中该菌的风险监测。

本研究在唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种中均检测到的BA合成基因簇,而在不能分泌BA的5株细菌当中未发现BA合成基因簇中的任何一个基因,证明通过检测BA合成基因簇上某一特定基因的存在可作为判定唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的重要依据,这一策略也在日常实践中广泛采用<sup>[20]</sup>。此外,bon基因簇中的基因绝大部分在菌株之间具有很高的相似性,保守性较强,尤其是



注:外圈颜色代表菌株的来源;红色进化支代表含有 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德菌;黑色进化支代表不含有 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德菌

图2 基于核心SNP构建的系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree was constructed based on core SNP

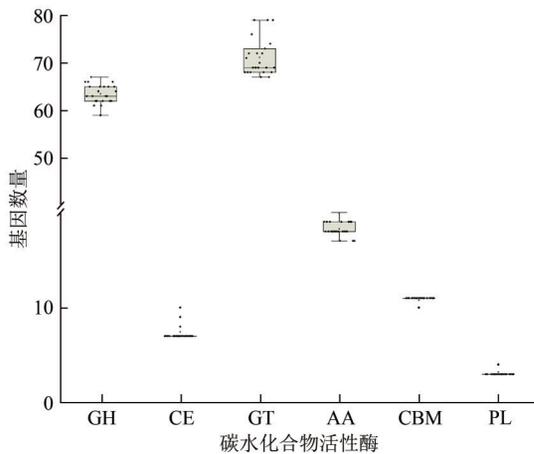


图3 23株唐菖蒲伯克霍尔德菌中碳水化合物活性酶数量  
Figure 3 Abundance of carbohydrate-active enzymes in 23 *Burkholderia gladioli* strains

*bonI*、*bonL* 和 *bonM* 基因,根据这些基因设计引物进行检测不易发生脱靶现象。

通过基因组分析,在唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种基因组中发现大量碳水化合物代谢相关的基因,并在其中发现了纤维素、几丁质、淀粉、肽聚糖等多种碳水化合物的完整代谢通路(图3~5)。碳水化合物作为重要的能量物质,丰富且完整的碳水化合物代谢通路赋予了该菌利用上述底物维持其正常生长能力,可能是其能够定殖/生长于米粉、木耳等富含碳水化合物食品中的一个重要因素。众所周知,纤维素和几丁质是自然界中含量最为丰富的两种多糖<sup>[21]</sup>,该菌基因组中蕴含有完整的几丁质、纤维素、淀粉等多糖的降解基因,能够赋予其适应多种环境的能力,这可能是该菌能够在环境中广泛分布的重要原因。研究也同样发现,唐菖蒲伯克霍尔德菌广泛分布在各种生境,如土壤、水和植物中,这可能与其底物利用范围广相关。本次调查发现,木耳受污染的频率最高,木耳中70%都是碳水

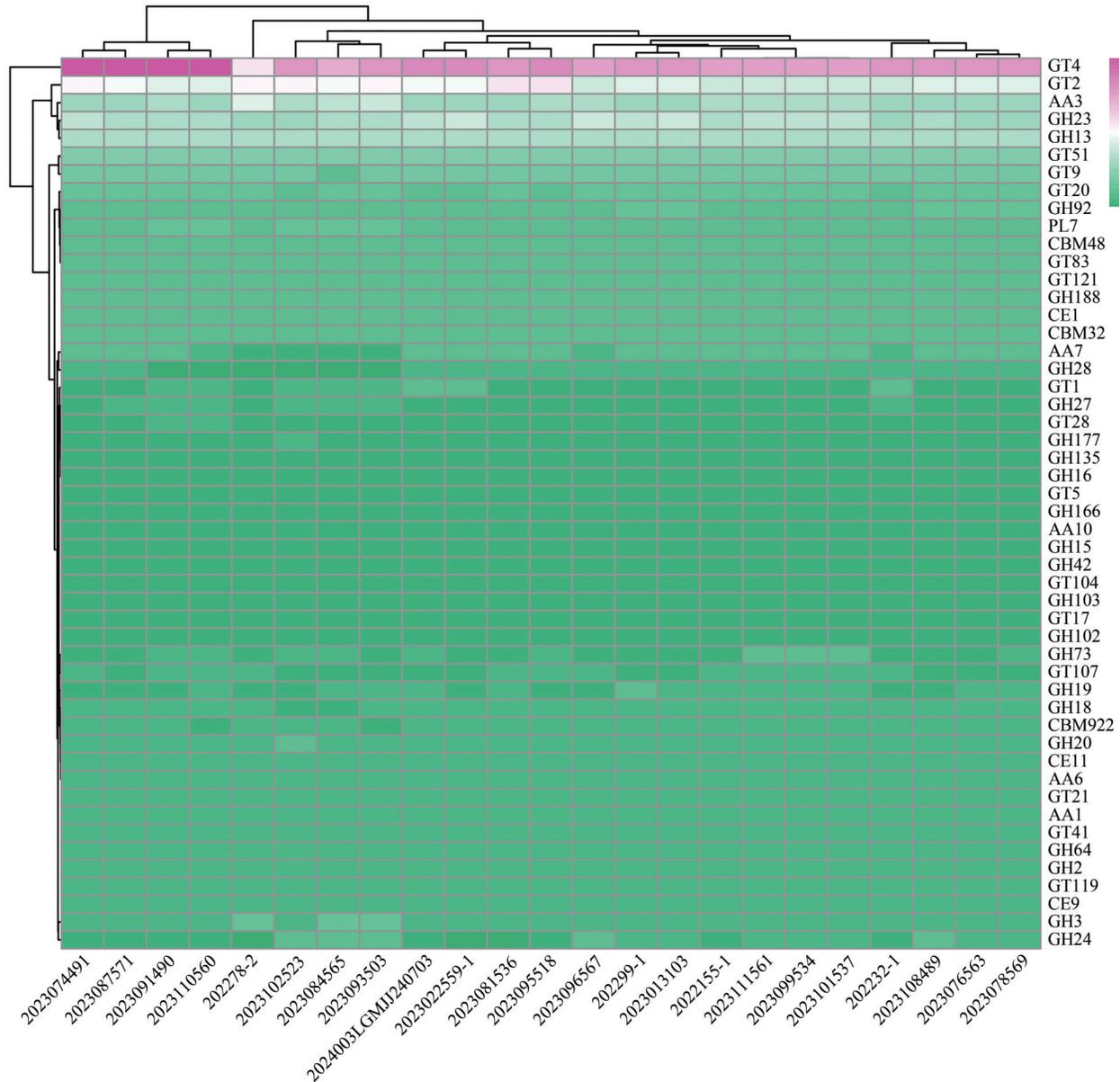


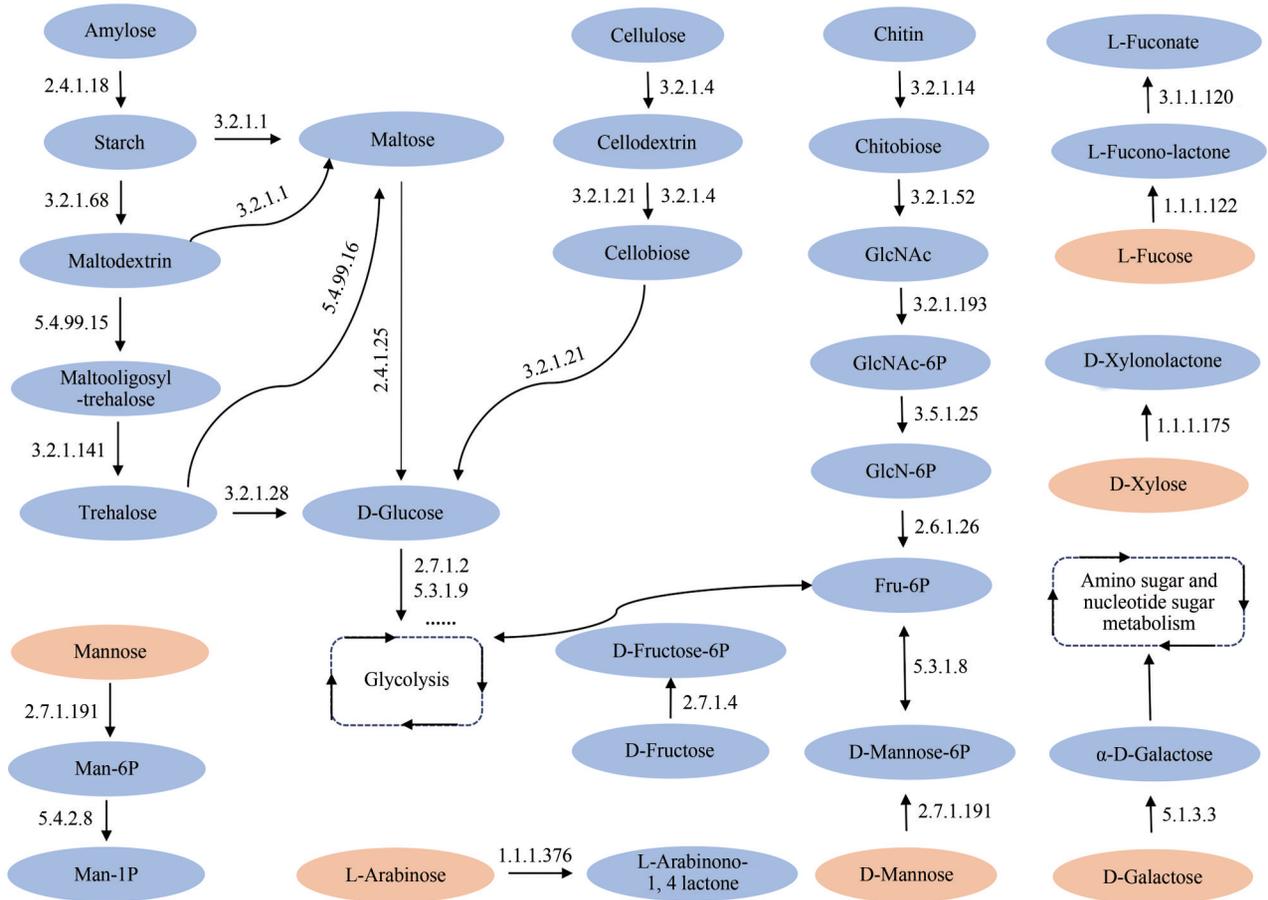
图4 唐菖蒲伯克霍尔德菌中碳水化合物活性酶家族分布热图

Figure 4 Heatmap shows the distribution of carbohydrate-active enzyme families in *Burkholderia gladioli* strains

化合物,其中主要包括纤维素、木耳多糖(由葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖等单糖组成的糖类物质)等,而唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种中均存在相应的代谢基因,因此只要条件合适,该菌便可利用木耳进行增殖。鉴于唐菖蒲伯克霍尔德菌在环境中广泛存在,木耳在户外生长过程中很容易被该菌所定殖。除此之外,本研究所得唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种在系统发育进化树上分布较为分散,表明其对木耳可能没有特定的偏好性,这可能也与其广泛的底物利用特性相关。虽然本研究中的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种大部分是从木耳中分离得到的,但其基因组中GH13家族的糖苷水解酶数量尤为丰富,GH13家族的酶以降解淀粉为特征<sup>[22]</sup>,表明其很可能也会在玉米、米

粉等富含淀粉的食物中大量增殖。

本研究通过对650份不同类型的样品进行了研究,发现木耳受唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染的风险最高。鉴于该菌在合适的环境条件下会产生BA,说明食用木耳存在一定引起食源性疾病的风险,提示需要加强该菌在木耳中的监测,以预防中毒事件的发生。基因组分析发现,唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种均存在**bon**基因簇,且该基因簇各基因之间具有很强的保守性。本研究中,89%的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种分离自木耳。木耳中的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种存在多种来源,且底物利用范围较广,因此,尽管木耳中存在该菌可利用的多糖成分,但该菌并未对木耳形成专一的偏好性。



注:橘红色椭圆代表存在于木耳中的成分,数字代表酶的EC编号

图5 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种中部分碳水化合物代谢通路

Figure 5 Some carbohydrate metabolic pathways in *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans*

参考文献

[ 1 ] 黄伟峰, 范道勇, 黄永燕, 等. 菌菇类食品中唐菖蒲伯克霍尔德菌污染调查及病原特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(5): 517-521.  
HUANG W F, FAN D Y, HUANG Y Y, et al. Contamination investigation and pathogenic characteristics analysis of *Burkholderia gladioli* in mushroom foods[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(5): 517-521.

[ 2 ] 杨庆文, 国译丹, 周惠新, 等. 云南省首起唐菖蒲伯克霍尔德菌食物中毒的鉴定与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(17): 3363-3367.  
YANG Q W, GUO Y D, ZHOU H X, et al. Identification and analysis of the first *Burkholderia gladioli* strain from food poisoning in Yunnan[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(17): 3363-3367.

[ 3 ] 张俊梅. 一起因食用变质银耳引起的椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒调查报告[J]. 中国医药指南, 2015, 13(3): 286.  
ZHANG J M. Investigation report on a food poisoning caused by *Pseudomonas cocoonum* subsp. *Fermented rice flour* caused by eating deteriorated tremella fuciformis [J]. Guide of China Medicine, 2015, 13(3): 286.

[ 4 ] 彭子欣, 陈雪, 李孟寒, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病型菌株 Co14 毒力相关基因解析[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6): 558-562.  
PENG Z X, CHEN X, LI M H, et al. Analyzing the virulence factor biosynthesis genes of a foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* strain Co14 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(6): 558-562.

[ 5 ] MOEBIUS N, ROSS C, SCHERLACH K, et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli* [J]. Chemistry & Biology, 2012, 19: 1164-1174.

[ 6 ] MD E S G, MSPH K C, MD A M K, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in Mozambique: the first documented bongkrekic acid poisoning in Africa [J]. Clinical Infectious Diseases, 2018, 66(9): 1400-1406.

[ 7 ] YUAN Y, GAO R, LIANG Q, et al. A foodborne bongkrekic acid poisoning incident-Heilongjiang Province, 2020[J]. China CDC Weekly, 2020, 2(51): 975-978.

[ 8 ] ANWAR M, KASPER A, STECK A R, et al. Bongkrekic acid—a review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. Journal of Medical Toxicology, 2018, 13: 173-179.

[ 9 ] TIAN T, SUN B B, SHI H W, et al. Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization [J]. The ISME Journal, 2021, 15: 2723-2737.

[ 10 ] LOO E P I, DURAN P, PANG T Y, et al. Sugar transporters spatially organize microbiota colonization along the longitudinal root axis of *Arabidopsis* [J]. Cell Host & Microbe, 2024, 32(4): 543-556.

[ 11 ] CHU D P, WANG X Q, FAN J J, et al. *Ulva prolifera*

- polysaccharide enhances the root colonisation by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Cas02[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 1(299): 120171.
- [12] CHKLOVSKI A, PARKS D H, WOODCROFT B J, et al. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning [J]. *Nature Methods*, 2023, 20: 1203-1212.
- [13] HYATT D, CHEN G L, LOCASCIO P F, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [14] PARKS D H, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL P A, et al. A complete domain-to-species taxonomy for bacteria and archaea [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 1079-1086.
- [15] JIA B, RAPHENYA A R, ALCOCK B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45: 566-573.
- [16] CHEN L, ZHENG D, LIU B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44: 694-697.
- [17] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49:293-296.
- [18] 雷蕾, 赵凌国, 孙健, 等. 2021—2022年深圳鲜湿米粉生产销售全流程唐菖蒲伯克霍尔德菌污染调查分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2024, 36(6): 699-706.
- LEI L, ZHAO L G, SUN J, et al. Investigation and analysis of *Burkholderia gladioli* contamination in the whole process of production and sales of fresh wet rice noodles [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2024, 36(6): 699-706.
- [19] 赵凌国, 雷蕾, 孙健, 等. 一起米酵菌酸中毒事件的病因学诊断[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(3): 606-610.
- ZHAO L G, LEI L, SUN J, et al. Etiology diagnosis of a food poisoning incident caused by bongkrekic acid [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2022, 34(3): 606-610.
- [20] 王晓雯, 陈晶, 陈国培, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病型实时荧光PCR方法的建立[J]. *食品科技*, 2022, 47(1): 330-335.
- WANG X W, CHEN J, CHEN G P, et al. Developing a novel method detecting *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenans* by real-time fluorescent PCR [J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(1): 330-335.
- [21] WANG M, ZHENG N, LI X, et al. Enrichment pretreatment expands the microbial diversity cultivated from marine sediments [J]. *Microorganisms*, 2023, 11: 2771.
- [22] DRULA E, GARRON M L, DOGAN S, et al. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50: 571-577.