DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250814003
引用格式: 何玉凤, 杨祖顺, 杨菁, 等. 云南省市售木耳、银耳中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌污染调查及毒力基因分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 146–154.
HE YF, YANG ZS, YANG J, *et al*. Investigation of *Burkholderia gladioli* contamination and analysis of virulence genes in commercially available *Auricularia* auricula and *Tremella fuciformis* in Yunnan Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 146–154. (in Chinese with English abstract).

云南省市售木耳、银耳中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌污染调查及毒力基因分析

何玉凤, 杨祖顺, 杨　菁, 罗荣爱, 马　妮, 陈　敏, 汤晓召*

[云南省疾病预防控制中心(云南省预防医学科学院), 昆明　650500]

摘　要: 目的　调查云南省 2022—2024 年食用菌中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)污染状况, 对分离菌株进行全基因组测序, 分析产毒菌株基因特征。**方法**　从云南省采集样品 724 份, 对分离鉴定得到的菌株进行二代全基因组测序, 分析其遗传特性、米酵菌酸生物合成相关 *bon* 基因簇携带情况。**结果**　724 份样品唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检出率为 12.85% (93/724), 其中木耳、银耳检出率分别为 13.20% (61/462)、12.87% (26/202), 无统计学差异(P>0.05)。该菌的污染有明显的地域差异性(P<0.05), 流通环节检出率无差异(P>0.05)。17 份样品中检出携带完整 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种, 但产毒能力有差异, 发现 2 株高产毒椰毒致病变种。系统发育分析表明 97 株分离株分在多支进化树上, 部分木耳和银耳中的分离株有明显的聚类倾向, *bon* 基因簇与核心基因组进化树高度一致。**结论**　云南省市售木耳、银耳中的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌污染有明显地域差异性, 应对高风险地州实施专项食品监测。

关键词: 木耳; 银耳; 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌; *bon* 基因簇; 米酵菌酸; 系统发育

Investigation of *Burkholderia gladioli* contamination and analysis of virulence genes in commercially available *Auricularia* auricula and *Tremella fuciformis* in Yunnan Province

HE Yu-Feng, YANG Zu-Shun, YANG Jing, LUO Rong-Ai, MA Ni,
CHEN Min, TANG Xiao-Zhao*

[*Yunnan Center for Disease Control and Prevention*
(*Yunnan Academy of Preventive Medicine*), *Kunming* 650500, *China*]

ABSTRACT: Objective　To investigate the contamination status of *Burkholderia gladioli* in edible fungi in Yunnan Province from 2022 to 2024, perform whole-genome sequencing on isolated strains, and analyze the genetic characteristics of toxin-producing strains. **Methods**　A total of 724 samples were collected from Yunnan Province.

收稿日期: 2025-08-14
第一作者: 何玉凤(1992—), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1977656199@qq.com
***通信作者:** 汤晓召(1989—), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1137406849@qq.com

The isolated and identified strains were subjected to second-generation whole-genome sequencing to analyze their genetic characteristics and the presence of *bon* gene clusters related to bongkrekic acid biosynthesis. **Results** The detection rate of *Burkholderia gladioli* in the 724 samples was 12.85% (97/724), the detection rates of *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis* were 13.20% (61/462) and 12.87% (26/202) (P>0.05), respectively, with no statistical difference (P<0.05). The contamination of this bacterium had obvious regional differences (P>0.05), and the detection rate in the circulation link had no difference. The 17 samples were found to contain *Burkholderia gladioli* pathovar cocovenenans carrying complete *bon* gene clusters, but with varying toxin-producing abilities, 2 highly toxic cocovenenans variants were identified. Phylogenetic analysis showed that the 97 isolates were distributed on multiple branches of the evolutionary tree, with some isolates from *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis* showing a clear tendency to cluster. The *bon* gene clusters were highly consistent with the core genome phylogenetic tree. **Conclusion** There are significant regional differences in the contamination of *Burkholderia gladioli* in commercially available *Auricularia auricula* and *Tremella fuciformis* across Yunnan Province. Targeted food monitoring shall be implemented in high-risk prefectures.

KEY WORDS: *Auricularia auricula*; *Tremella fuciformis*; *Burkholderia gladioli*; *bon* gene cluster; bongkrekic acid; phylogenetics

0　引　言

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)是一种广泛分布于自然界引起植物致病、人类食物中毒的革兰氏阴性需氧无芽孢短杆菌[1–2], 在土壤、水体和多种动物等生态位生存, 常与真菌和植物共生。该菌污染的食品在适宜的温湿度条件下, 短时间内会产生大量毒素, 人类食用污染过的食品就容易发生食物中毒[3–4], 主要包括地方性特色食品, 如家庭自制谷类发酵制品[5–7], 过夜泡发的木耳、银耳等[8–9]。

引起食物中毒的主要是唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种(*Burkholderia gladioli* pv. cocovenenans)[10], 其代谢产物米酵菌酸(bongkrekic acid, BA)和毒黄素(toxoflavin, TF)具有毒性, 一般认为米酵菌酸毒性强于毒黄素, 是引起食物中毒的主要原因[4]。米酵菌酸是一种高选择性的线粒体三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)/二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)载体抑制剂, 从线粒体基质内侧与腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)结合, 导致其构象发生变化进而抑制线粒体通透性转换孔的开放性, 阻碍 ADP 与 ATP 的交换, 阻断正常的能量供应, 导致细胞死亡[11–14]。米酵菌酸生物合成基因簇 *bonR1R2 LJKFGABCDEHIM* 编码蛋白I型聚酮合成酶[15–16], 在细胞内经过复杂的聚酮组装过程合成米酵菌酸, 其转录表达受调控基因 *bonR1* 和 *bonR2* 的调控。化学结构上米酵菌酸是一种带有特殊分支结构的高度不饱和三羧基脂肪酸, 耐热性强, 120 ℃处理 1 h 仍不能被破坏[17–18], 因此食物一旦被其污染, 常规的家庭烹饪方法不能有效去除, 进食后即可引发中毒, 死亡率在 68%~100%之间。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种是我国迄今为止发现的导致病死率最高的食源性致病菌, 且无相关特效药治疗其引起的食物中毒, 对消费者来说存在巨大的安全隐患[19]。

木耳和银耳作为中国传统药食两用菌, 在营养、药用及文化领域均具有独特价值[20–21], 随着消费者追求健康饮食需求扩大, 其消费量与日俱增。本研究从 2022 年至 2024 年共采集 724 份市售木耳、银耳和金耳, 对 3 类食品中分离到的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌进行全基因组测序和致病变种米酵菌酸合成 *bon* 基因簇分析, 以了解唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及其致病变种污染分布、遗传特征, 为评估木耳、银耳类食品食源性疾病风险和制定相应防治措施提供数据支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

2022—2024 年, 从云南省 13 个地州 56 个区县超市、农贸市场等零售环节采集 724 份木耳食品, 包括 462 份木耳、202 份银耳和 60 份金耳, 采集的样品, 在 0~4 ℃冷藏条件下保存, 4 h 内转运至实验室进行检测。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌标准菌株: CICC 10574、ATCC 33664(中国工业微生物菌种保藏中心); 97 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌分离自 2022—2024 年木耳、银耳、金耳等样品。

VITEK II Compact GN 鉴定卡(法国梅里埃公司); 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*bon* 基因)荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测试剂盒(深圳生科源公司); GVC 增菌液、改良马铃薯葡萄糖琼脂(modified potato dextrose agar, mPDA)、PCFA 培养基、卵黄琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)、革兰氏染色液、氧化酶试纸(北京陆桥技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

ATB VITEK II Compact 全自动微生物生化鉴定仪(法国梅里埃公司); Autoflex 飞行时间质谱微生物鉴定仪(德国布鲁克公司); BD240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); 1300SERIES A2 生物安全柜、7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株分离鉴定

采集的样品按照 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》进行检测, 可疑菌落先用飞行时间质谱初步批量筛选鉴定, 分离纯化后再次使用质谱进行鉴定, 阳性菌株进行实时荧光 PCR 仪确认菌株是否携带 *bon* 基因簇。将 *bon* 基因阳性的唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种接种于马铃薯葡萄糖半固体平板上进行 5 d 产毒培养, 米酵菌酸毒素粗提液浓度测定参考 GB 5009.189—2023《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》。

1.3.2 全基因组测序

将纯化后的菌株在 PDA 琼脂培养基培养 24 h 后, 取一环菌苔于无菌水中, 12000 r/min 离心 5 min 去上清获得的菌沉淀, 使用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 将质控合格的样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司完成测序。利用第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS), 基于 Illumina NovaSeq 测序平台, 对文库进行双末端(paired-end, PE)测序。使用 fastp[22]软件对原始下机数据(rawdata)进行过滤, 生成高质量序列, 使用 SPAdes[23]软件对测序数据进行从头组装。使用 Pilon 软件(http://github.com/broadinstitite/pilon/releases/tag/v.1.24) 进行单碱基矫正, 得到组装结果, 对组装后基因组的 K-mer 频率分布及 GC-Depth 分布进行评估, 使用 checkM (V2 版本)[24]软件评估组装完成的基因组完整程度和潜在的污染情况。

1.3.3 系统发育进化分析

采用 PGAP 软件(V1.2.1 版本)构建 97 个样本的泛基因组和核心基因组, 以参考菌株唐菖蒲伯克霍尔德菌 ATCC 25417 为标准序列, 构建唐菖蒲伯克霍尔德菌核心基因组系统发育进化树, 构树后在 itol 网站(https://itol.embl.de/)对进化树美化[25]。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。

1.4 数据处理

数据统计和分析使用 Excel (Microsoft Excel 2017), 检出率是否有统计学差异采用 SPSS19.0 软件的卡方检验。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与鉴定

2022—2024 年共采集云南省各区县木耳、银耳等样品 724 份, 经增菌培养分离、纯化鉴定, 从 93 份样品中分离获得 97 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌, 其中从 4 份样品中各分离得到 1 株携带 *bon* 基因的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种、1 株不携带 *bon* 基因的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌。样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌总体检出率为 12.85%, 椰毒致病变种检出率为 2.35%。不同样品类别的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检出率无差异(χ^2=0.48, P>0.05), 椰毒致病变种检出率无差异(χ^2=4.21, P>0.05), 见表 1。

不同采样地的样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌总检出率存在显著性差异(χ^2=73.87, P<0.001)。普洱(29.55%)、玉溪(28.57%)、西双版纳(28.13%)等地阳性检出率显著高于楚雄、昭通、临沧、德宏等检出率为 0 的地区。从食品类别来看, 普洱(37.50%)、玉溪(32.05%)、西双版纳(28.13%)来源的木耳该菌检出率位居前三, 明显高于其他地州(χ^2=116.59, P<0.001); 大理(30.33%)、红河(28.57%)、普洱(20.00%)来源的银耳, 该菌检出率高于其他地州(χ^2=26.93, P<0.005); 昆明(30.00%)来源的金耳, 该菌检出率高于检出率均为 0 的其他地州(χ^2=13.33, P<0.005), 结果见表 2。农贸市场、超市、其他流通环节采集的样品, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检出率无差异(χ^2=5.69, P>0.05), 结果见表 3。

2.2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌基因组特征

本研究分离获得的 97 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌进行基因组测序, 从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中下载 ATCC 25417 全基因组信息作为参考菌株, 本研究组装完成的分离株基因组大小在 7.99~8.85 Mb 之间, GC 含量均为 68%, 基因个数在 6904~7673 个, 毒力因子数在 146~158 个, 耐药基因数在 82~95 个, 具体见表 4。

表 1 不同类型样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及椰毒致病变种检出情况

Table 1 Detection situation of *Burkholderia gladioli* and its pathovar cocovenenans in different types of samples

样品类别	样品数量/份	唐菖蒲伯克霍尔德菌阳性数量/份	检出率/%	唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种阳性数量/份	检出率/%
木耳	462	61	13.20	14	3.03
银耳	202	26	12.87	1	0.50
金耳	60	6	10.00	2	3.33
合计	724	93	12.85	17	2.35

表 2　不同采样地的样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检出情况

Table 2　Detection situation of *Burkholderia gladioli* in different sampling location

采样地点	木耳			银耳			金耳			合计		
	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%
楚雄	18	0	0.00	12	0	0.00	-	-	-	30	0	0.00
红河	60	4	6.67	35	10	28.57	7	0	0.00	102	14	13.73
昆明	51	6	11.76	20	3	15.00	20	6	30.00	91	15	16.48
文山	68	6	8.82	34	0	0.00	-	-	-	102	6	5.88
玉溪	78	25	32.05	27	5	18.82	-	-	-	105	30	28.57
昭通	36	0	0.00	34	0	0.00	-	-	-	70	0	0.00
大理	28	0	0.00	12	4	30.33	-	-	-	40	4	10.00
丽江	10	0	0.00	8	0	0.00	2	0	0.00	20	0	0.00
普洱	24	9	37.50	20	4	20.00	-	-	-	44	13	29.55
德宏	17	0	0.00	-	-	-	7	0	0.00	24	0	0.00
临沧	11	0	0.00	-	-	-	21	0	0.00	32	0	0.00
怒江	29	2	6.90	-	-	-	3	0	0.00	32	2	6.25
西双版纳	32	9	28.13	-	-	-	-	-	-	32	9	28.13
合计	462	61	13.20	202	26	12.87	60	6	10.00	724	93	12.85

注: -为没有相关数据。

表 3　不同流通环节样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检出情况

Table 3　Detection situation of *Burkholderia gladioli* in different circulation links

采样地点	木耳			银耳			金耳			合计		
	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%	样品数量/份	阳性数量/份	检出率/%
农贸市场	337	44	13.06	115	12	13.04	17	5	29.41	469	61	13.01
超市	98	13	13.27	45	6	13.33	6	0	0.00	149	19	12.75
其他	48	4	8.33	38	8	21.05	20	1	5.00	106	13	12.26
合计	483	61	13.20	198	26	12.87	60	6	10.00	724	93	12.85

表 4　唐菖蒲伯克霍尔德氏菌基因组特征

Table 4　Genomic characteristics of *Burkholderia gladioli*

菌株编号	分离源	基因组大小/Mb	GC 含量/%	拼接数目	N50	基因数量	毒力因子	耐药基因
TCPBN202403	木耳	8.32	68	90	253708	7266	153	88
TCPBN202406	木耳	8.29	68	115	242925	7200	156	91
TCPBN202411	木耳	8.40	68	125	226985	7361	157	92
TCPBN202413	木耳	8.59	68	143	233139	7537	157	92
TCPBN202415	木耳	8.26	68	96	251246	7169	153	88
TCPBN202420	木耳	8.43	68	90	246466	7335	153	88
TCPBN202421	木耳	8.57	68	125	209662	7423	156	94
TCPBN202427	木耳	8.33	68	101	304444	7261	154	88
TCPBN202429	木耳	8.51	68	122	244660	7448	157	91
TCPDL202318	银耳	8.66	68	135	304667	7484	158	89
TCPDL202337	银耳	8.85	68	131	365529	7647	157	89
TCPDL202338	银耳	8.78	68	137	304667	7596	158	89
TCPDL202339	银耳	8.66	68	134	386763	7466	157	90

表 4(续)

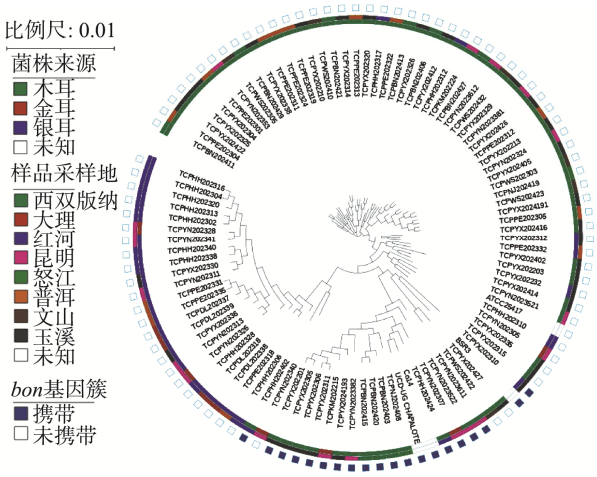
菌株编号	分离源	基因组大小/Mb	GC 含量/%	拼接数目	N50	基因数量	毒力因子	耐药基因
TCPHH202302	银耳	8.71	68	132	360664	7514	158	89
TCPHH202304	银耳	8.71	68	138	302237	7530	158	89
TCPHH202306	银耳	8.66	68	141	365530	7452	158	88
TCPHH202310	银耳	7.99	68	96	306192	6904	155	84
TCPHH202312	木耳	8.19	68	79	285188	7078	149	91
TCPHH202313	银耳	8.71	68	135	360664	7507	158	88
TCPHH202316	银耳	8.71	68	137	304667	7513	158	89
TCPHH202317	木耳	8.60	68	133	281299	7496	157	92
TCPHH202320	银耳	8.71	68	133	360589	7511	158	89
TCPHH202328	银耳	8.65	68	130	365530	7435	158	88
TCPHH202338	银耳	8.71	68	135	360600	7531	158	89
TCPHH202340	银耳	8.71	68	142	308418	7516	158	88
TCPHH202402	木耳	8.30	68	86	273336	7158	154	95
TCPHH202424	木耳	8.39	68	86	336827	7399	152	82
TCPKM202215	金耳	8.31	68	75	318191	7289	153	84
TCPKM202224	木耳	8.07	68	108	283949	7002	156	92
TCPNJ202408	木耳	8.54	68	123	248398	7495	146	85
TCPNJ202419	木耳	8.48	68	114	284593	7424	156	92
TCPPE202301	木耳	8.51	68	114	307308	7393	157	92
TCPPE202304	木耳	8.12	68	105	286345	7073	156	94
TCPPE202305	木耳	8.41	68	137	302812	7360	156	92
TCPPE202311	木耳	8.29	68	109	281286	7251	156	92
TCPPE202312	木耳	8.52	68	149	283442	7458	156	92
TCPPE202313	木耳	8.14	68	88	305808	7023	156	92
TCPPE202318	银耳	8.79	68	137	360465	7608	158	89
TCPPE202319	木耳	8.27	68	104	254184	7181	156	93
TCPPE202322	木耳	8.60	68	136	272223	7538	157	92
TCPPE202324	木耳	8.24	68	112	286960	7181	157	91
TCPPE202331	银耳	8.65	68	128	360594	7438	157	90
TCPPE202332	银耳	8.60	68	110	280037	7573	154	89
TCPPE202335	银耳	8.65	68	129	360566	7439	157	89
TCPWS202303	木耳	8.43	68	121	272906	7360	156	92
TCPWS202305	木耳	8.15	68	112	303487	7113	155	92
TCPWS202410	木耳	8.56	68	123	205873	7430	157	94
TCPWS202422	木耳	8.25	68	121	271032	7274	153	90
TCPWS202423	木耳	8.43	68	119	284593	7406	156	92
TCPWS202432	木耳	8.39	68	116	250286	7347	156	92
TCPYN202305	金耳	8.40	68	123	273540	7284	156	83
TCPYN202307	金耳	8.21	68	87	287724	7131	154	86
TCPYN202311	银耳	8.70	68	83	308418	7503	157	88
TCPYN202313	银耳	8.56	68	80	360669	7315	157	89
TCPYN202324	木耳	8.43	68	112	342049	7378	156	92
TCPYN202326	金耳	8.57	68	74	386644	7330	158	89
TCPYN202328	金耳	8.70	68	126	360729	7483	157	89
TCPYN2023381	木耳	8.38	68	98	342935	7304	156	93
TCPYN2023382	木耳	8.23	68	76	366985	7148	154	87
TCPYN202340	金耳	8.18	68	107	225143	6987	154	86
TCPYN202341	银耳	8.71	68	130	389534	7499	158	89

表 4(续)

菌株编号	分离源	基因组大小/Mb	GC 含量/%	拼接数目	N50	基因数量	毒力因子	耐药基因
TCPYN2023521	木耳	8.58	68	108	303186	7463	153	91
TCPYN2023522	木耳	8.02	68	87	288321	6956	154	85
TCPYN202353	木耳	8.30	68	117	272907	7258	156	90
TCPYN2023611	木耳	8.46	68	97	298576	7481	154	88
TCPYN2023612	木耳	8.46	68	100	356719	7413	156	93
TCPYX202201	木耳	8.25	68	79	288009	7219	153	85
TCPYX202203	木耳	8.32	68	102	346460	7216	154	92
TCPYX202210	木耳	8.56	68	110	277787	7435	157	94
TCPYX202213	木耳	8.45	68	120	303849	7440	156	92
TCPYX202232	银耳	8.04	68	93	298743	6970	152	83
TCPYX202304	木耳	8.40	68	103	345925	7313	157	91
TCPYX202305	木耳	8.25	68	79	316674	7220	153	85
TCPYX202306	木耳	8.25	68	73	443567	7234	153	85
TCPYX202310	银耳	8.36	68	139	215928	7382	155	87
TCPYX202311	木耳	8.25	68	73	443567	7225	153	85
TCPYX202312	银耳	8.50	68	126	220896	7415	156	90
TCPYX202314	木耳	8.14	68	87	305808	7010	156	92
TCPYX202315	木耳	8.11	68	78	349155	7076	157	85
TCPYX202320	木耳	8.14	68	89	305808	7030	156	92
TCPYX202325	木耳	8.26	68	98	330649	7254	157	92
TCPYX202326	木耳	8.35	68	113	334156	7326	152	90
TCPYX202329	木耳	8.38	68	103	304174	7318	156	93
TCPYX202330	银耳	8.72	68	133	360675	7545	157	89
TCPYX202335	木耳	8.20	68	101	325370	7165	157	83
TCPYX202336	银耳	8.85	68	139	304664	7673	158	89
TCPYX202338	木耳	8.31	68	118	278948	7283	156	93
TCPYX202402	木耳	8.28	68	101	305833	7238	154	90
TCPYX202405	木耳	8.43	68	122	259546	7361	155	91
TCPYX202412	木耳	8.18	68	94	258850	7063	148	89
TCPYX202414	木耳	8.37	68	91	302680	7333	153	89
TCPYX202416	木耳	8.43	68	104	262530	7349	156	89
TCPYX2024191	木耳	8.40	68	138	302806	7368	156	92
TCPYX2024193	木耳	8.18	68	79	318191	7157	153	85
TCPYX202422	木耳	8.31	68	99	330649	7310	157	91
TCPYX202426	木耳	8.37	68	124	207912	7321	155	92
TCPYX202427	木耳	8.45	68	158	157260	7370	157	93

2.3　分离株之间系统发育进化分析

为了评估本研究分离获得的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌之间的遗传差异和系统发育关系, 从数据库中获取 4 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌基因组作为参考序列, 与从样品中分离的 97 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌基因组进行基于核心基因组的系统发育进化分析。如图 1 所示, 部分唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在木耳和银耳中有明显的聚类倾向, 在城市之间无明显聚集性。16 株携带 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种聚集同一分支, 另外 1 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种聚集在相近的分支上, 形成 2 个进化关系紧密的分支, 有明显的同源进化倾向。来源于同一样品的不同分离株亲缘关系较远, 如 TCPYN2023381 和 TCPYN2023382, TCPYN2023521 和 TCPYN2023522, TCPYN2023611 和 TCPYN2023612, TCPYX2024191 和 TCPYX2024193, 其中 1 株是唐菖蒲伯克霍尔德氏菌, 另 1 株是椰毒致病变种。玉溪的 4 株和版纳的 3 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种聚集在



注: 注释圈由内向外依次是菌株来源食品类别、样品采集州市, 外圈的方框表示是否携带 *bon* 基因。

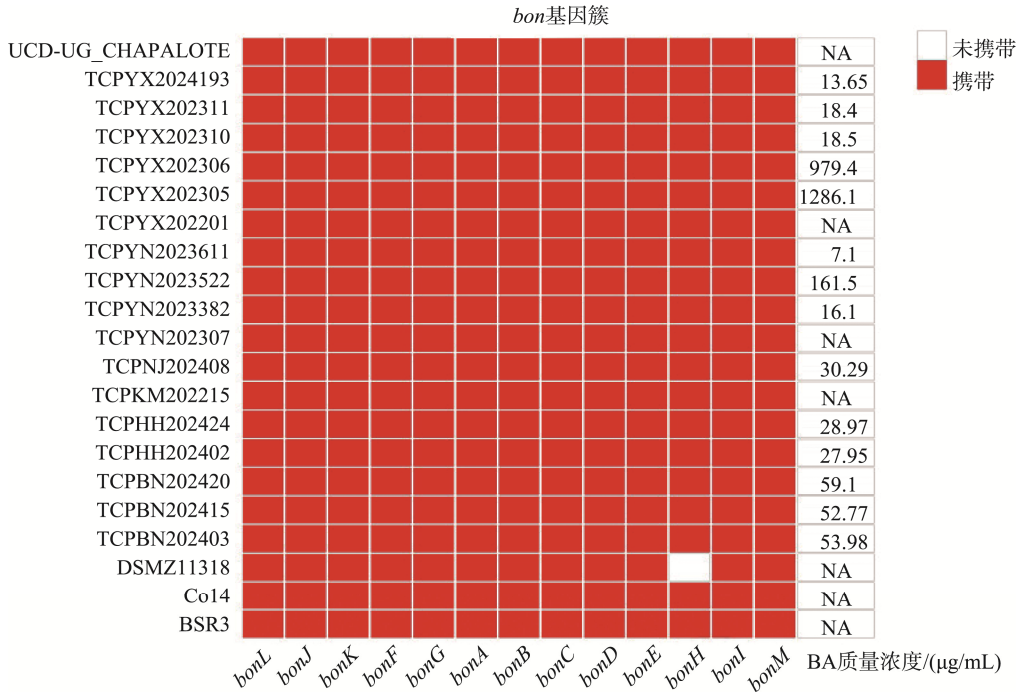
图 1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌基于核心基因组的系统发育进化树

Fig.1 Phylogenetic evolutionary tree of *Burkholderia gladiolus* based on core genome

亲缘关系更近的分支, 分离株 TCPHH202424、TCPYN202307 与加拿大玉米样品分离株 UCD-UG_CHAPALOTE、中国酵米面样品分离株 Co14 在同一分支, 结合 *bon* 基因簇分析结果发现, 4 株菌均携带米酵菌酸合成 *bon* 基因簇。

2.4 产米酵菌酸表型和 *bon* 基因簇分析

通过 PCR 鉴定 *bon* 基因簇阳性的 17 株菌通过 BLAST 比对, 分析其携带 *bon* 基因簇情况。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*。将 17 株携带米酵菌酸合成的 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种、数据库中 4 株携带 *bon* 基因簇的菌株与标准 *bon* 基因簇进行比对获得 *bon* 基因簇热图(图 2)。本研究的 17 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种均携带完整的 *bon* 基因簇, 但产米酵菌酸能力不同, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种产米酵菌酸检出质量浓度在 7.1~1286.1 μg/mL 之间, 其中菌株 TCPYX202305、TCPYX202306 产米酵菌酸能力较强, 检出质量浓度分别为: 1286.1 μg/mL、979.4 μg/mL。



注: NA 表示无相关数据。

图 2 21 株唐菖蒲伯克霍尔德菌 *bon* 基因簇携带热图

Fig.2 Heat map of *bon* gene cluster of 21 strains of *Burkholderia gladiolus*

3 讨论与结论

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种是一种致病性极强的食源性致病菌, 由其引发的食源性疾病具有极高的发病率和死亡率。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种易污染地方特色发酵玉米面制品、木耳、银耳和金耳等食品。本研究结果显示云南省地区 724 份样品中有 93 份检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌, 检出率 12.85%低于成都[26]、深圳[27]等地区。可能和以下原因相关: (1)本研究样品 9.39%是干制品, 干燥过程(晒干/烘干)导致水分活度显著降低, 使细菌难以存活, 而成都样品 100%是新鲜样品。(2)云南食用菌多来自本土, 而成都、深圳的样品可能更多依赖外省输

入, 在长途运输或中转仓储中二次污染风险升高。本研究中木耳、金耳中椰毒致病变种检出率为 3.03%~3.33%, 提示云南省木耳金耳食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种存在一定程度污染, 需加强对此类食品中该菌的风险监管。

通过对云南省不同地州、不同食品类别及流通环节的样品进行大规模检测, 深入揭示了唐菖蒲伯克霍尔德氏菌污染分布的流行病学特征。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的检出率存在极其显著的地域性差异(χ^2=73.87, P<0.001), 污染模式具有明显的“食品-地域”特异性, 这表明污染的发生是病原菌、宿主(食品)和局部环境(地州)3 者共同作用的结果。农贸市场、超市与其他流通环节的检出率无显著差异(P>0.05), 这说明污染并非主要发生在终端销售环节, 而是更早地存在于生产、加工或批发等上游链条。基于以上发现, 对高污染区实施更频繁、更严格的专项监测, 开展溯源调查, 从栽培基质、灌溉用水、采收后处理到本地加工场所, 逐一排查关键污染点。制定良好农业规范和良好生产规范: 针对高风险地区, 推广并规范食用菌的干燥、包装和储存流程, 重点控制水分活度和环境湿度。

本研究在 2022—2024 年不同城市采集的木耳、银耳、金耳中均检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌, 对分离到的菌株进行全基因组测序和系统发育进化树发现这些菌株聚在多个进化分支, 部分菌株在木耳和银耳中呈现显著聚类倾向, 表明宿主类型是驱动遗传分化的核心因素。这可能源于宿主细胞壁组分(如银耳富含的甘露糖、木耳的 β-葡聚糖)对细菌表面受体或代谢通路的差异化选择[28]。携带 *bon* 基因簇的 17 株菌高度同源, 提示负责合成米酵菌酸毒素的 *bon* 基因簇可能通过垂直遗传在特定谱系中稳定传递, 而非频繁的水平转移, 与前人关于该基因簇位于染色体非移动区域的发现一致[29]。系统发育分析显示 *bon* 基因簇与核心基因组进化树高度一致, 支持其垂直遗传模式。因此, 云南玉溪、版纳毒力菌株的聚集更可能是区域性克隆扩张(如共同污染源传播)而非独立获得毒力基因, 反映本地农产品流通或环境, 如种植用水中的持续污染源, 需加强这些地区食用菌的毒力菌株监测。同一样品同时分离出亲缘关系较远的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌和椰毒致病变种, 可能是因为生产、储存或运输过程中接触不同环境源导致多菌株共存, 这与其他报道结果一致[30], 这一现象提示: 单一分离株的检测可能低估样品中病原菌的多样性, 建议对高风险样品进行多菌落测序分析。

通过对 17 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种产米酵菌酸能力和 *bon* 基因簇分析发现, 17 株分离株均携带完整的 *bon* 基因簇, 12 株分离株产米酵菌酸质量浓度在 7.1~161.5 μg/mL 之间。来自玉溪的 2 株产毒较强的菌株, 米酵菌酸检出质量浓度分别为: 979.4 μg/mL、1286.1 μg/mL, 这些菌株产毒能力差异表明 *bon* 基因簇的存在是米酵菌酸合成的必要不充分条件。即使基因簇完整, 其表达可能受调控元件或表观遗传因素影响[4,31], 菌株遗传背景的分化和环境营养因子的协同是驱动高毒表型的核心机制。此结果提示需结合基因组表型与环境因子建立更精准的风险评估模型[32]。

本研究通过对 2022—2024 年不同类型食用菌检测发现, 木耳(13.20%)、银耳(12.87%)、金耳(10.00%)均不同程度受唐菖蒲伯克霍尔德氏菌污染。该菌的污染是一个由地域和食品种类共同作用, 污染源主要位于流通环节之前。针对普洱、玉溪、西双版纳、大理、红河、昆明等高风险区域, 应对高污染食品类别进行连续监管和监测。结合全基因组测序发现污染菌株系统发育进化的多样性, 木耳和银耳中存在优势克隆群菌株污染情况, 提示需加强生产过程中消毒防控管理。本研究中有 17 份样品检出携带完整 *bon* 基因簇的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌椰毒致病变种, 鉴于该菌在合适的环境条件下会产生米酵菌酸, 说明食用此类食品存在一定食源性中毒的风险, 提示需要加强唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在木耳等食用菌中的监测, 减少食物中毒事件的发生。

参考文献

[1] JIAO Z, KAWAMURA Y, MISHIMA N, *et al.* Need to differentiate lethal toxin-producing strains of burkholderia gladioli, which cause severe food poisoning: Description of *Burkholderia gladioli* pathovar cocovenenans and an emended description of *B. gladioli* [J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47(12): 915–925.

[2] YUAN MD, HAN RW, BAI L, *et al.* Recent advances in the characterization of *Burkholderia gladioli* pv. cocovenenans and its toxin production [J]. Food Reviews International, 2023, 40(3): 867–882.

[3] GAO B, DENG H, WANG Y, *et al*. Detection methods and control measures of *Burkholderia gladioli* and its toxins: A review [J]. Journal of Food Science, 2025, 90(2): e17668.

[4] PENG Z, DOTTORINI T, HU Y, *et al*. Comparative genomic gnalysis of the foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. cocovenenans harboring a bongkrekic acid biosynthesis gene cluster [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628538

[5] 李晓琍, 杨祖顺, 国译丹, 等. 椰毒假单胞菌酵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.
LI XL, YANG ZS, GUO YD, *et al.* Isolation and identification of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. farino fermentans from food poisoning accident [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(1): 36–39.

[6] 周帼萍, 梁泉, 黄庭轩, 等. 云南省文山州广南县吊浆粑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.
ZHOU GP, LIANG Q, HUANG TX, *et al*. Etiology analysis of an outbreak caused by fermented corn flour in Guangnan County, Wenshan City, Yunnan Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(1): 71–75.

[7] ZHANG H, GUO Y, CHEN L, *et al.* Epidemiology of foodborne bongkrekic acid poisoning outbreaks in China, 2010 to 2020 [J]. PLoS One, 2023, 18(1): e0279957.

[8] 张俊梅. 一起因食用变质银耳引起的椰毒假单孢菌酵米面亚种食物中

毒调查报告[J]. 中国医药指南, 2015, 13(3): 286–287.
ZHANG JM. Investigation report on a food poisoning caused by *Pseudomonas cocoanum* subsp. fermented rice flour caused by eating deteriorated tremella fuciformis [J]. Guide of China Medicine, 2015, 13(3): 286–287.

[9] 申屠平平, 朱珈慧, 徐小民, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查[J]. 上海预防医学, 2019, 1(6): 466–468.
SHENTU PP, ZHU JH, XU XM, *et al*. A food poisoning incident caused by pseudomonas cocovenenans subspfarinofermentans [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2019, 31(6): 466–468.

[10] 王海燕, 宋曼丹, 王建, 等. 广东省首起米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.
WANG HY, SONG MD, WANG J, *et al.* Identification of thepathogen in rice noodles in relation to food poisoning caused by bongkrekic acid in Guangdong Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 394–398.

[11] TODISCO S, DINOIA MA, ONOFRIO A, *et al.* Identification of new highly selective inhibitors of the human ADP/ATP carriers by molecular docking and *in vitro* transport assays [J]. Biochemical Pharmacolog, 2016, 100: 112–132.

[12] YAMAMOTO A, HASUI K, MATSUO H, *et al*. Bongkrekic acid analogue, lacking one of the carboxylic groups of its parent compound, shows moderate but pH-insensitive inhibitory effects on the mitochondrial ADP/ATP carrier [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2015, 86(5): 1304–1322.

[13] HALESTRAP AP, BRENNER C. The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death [J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(16): 1507–1525.

[14] ANWAR M, KASPER A, STECK AR, *et al.* Bongkrekic acid—a review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. Journal of Medical Toxicology, 2017, 13(2): 173–179.

[15] ROHM B, SCHERLACH K, HERTWECK C. Biosynthesis of the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ATPase) inhibitor bongkrekic acid in *Burkholderia gladioli* [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8(7): 1520–1522.

[16] 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6): 558–562.
PENG ZX, CHEN X, LI MH, *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.

[17] 卢宇剑, 刘华良. 米酵菌酸的相关检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3273–3280.
LU YJ, LIU HL. Research progress on related detection methods of bongkrekic acid [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(8): 3273–3280.

[18] JENSEN RO, SCHULZ F, ROUX S, *et al*. Phylogenomics and genetic analysis of solvent-producing clostridium species [J]. Scientific Data, 2024, 11(1): 432.

[19] 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.

[20] WU F, YUAN Y, MALYSHEVA VF, *et al*. Species clarification of the most important and cultivated *Auricularia* mushroom “Heimuer”: Evidence from morphological and molecular data [J]. Phytotaxa, 2014, 186(5): 241.

[21] 张振文, 姚方杰, 张作达, 等. 基于木薯茎杆屑栽培的黑木耳品质评价[J]. 云南农业大学学报, 2022, 37(2): 330–335.
ZHANG ZW, YAO FJ, ZHANG ZD, *et al*. Evaluation on the quality of *Auricularia auriculas* based on dust of cassava stalks [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2022, 37(2): 330–335.

[22] CHEN S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp [J]. iMeta, 2023, 2(2): e107.

[23] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, *et al.* Using SPAdes de novo assembler [J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 70(1): e102.

[24] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, *et al.* Check: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes [J]. Genome Research, 2015, 25(7): 1043–1055.

[25] 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.

[26] 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(5): 517–521.
HUANG WF, FAN DY, HUANG YY, *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.

[27] 杨慧, 王猛, 李冯, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2025, 37(3): 207–215.
YANG H, WANG M, LI F, *et al*. Contamination investigation and pathogenic characteristics analysis of *Burkholderia gladioli* pv. cocovenenans [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2025, 37(3): 207–215.

[28] XU Y, DONG Q, ZHANG S, *et al*. Lignocellulose adaptation drives polysaccharide biosynthesis in tremella fuciformis: Metabolomic and proteomic insights into Cazyme regulation [J]. Frontiers in Fungal Biology, 2025, 15(1): 134.

[29] CHENY, LIU C, LI F, *et al*. Genetic stability and horizontal transfer assessment of the bongkrekic acid biosynthesis gene cluster in *Burkholderia gladioli* [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 2194.

[30] NIU C, SONG X, HAO J, *et al*. Identification of *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* in black fungus and efficient recognition of bongkrekic acid and toxoflavin producing phenotype by back propagation neural network [J]. Foods, 2024, 13(2): 351.

[31] HAO G, HUANG XL, ZHU WJ, *et al.* Pan-genome analysis of the *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* reveal the extent of variation in the toxigenic gene cluster [J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104249.

[32] HU JR, XUE YC, ZHANG JH, *et al*. A highly virulent BA-producing *Burkholderia gladioli* strain linked to a fatal foodborne outbreak in China, 2020 [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2025, 131: 105760.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)