



日化产品中洋葱伯克霍尔德氏菌复合群(Bcc)的分类和神秘伯克霍尔德氏菌的耐药性研究

张淑瑶¹, 文霞¹, 苏皓庭¹, 黄迪¹, 陶宏兵², 陈漪汶¹, 谢小保^{1*}

- 1 广东省科学院微生物研究所 广东省微生物分析检测中心 华南应用微生物国家重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室 农业农村部农业微生物组学重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070
- 2 广东迪美生物技术有限公司, 广东 广州 510663

张淑瑶, 文霞, 苏皓庭, 黄迪, 陶宏兵, 陈漪汶, 谢小保. 日化产品中洋葱伯克霍尔德氏菌复合群(Bcc)的分类和神秘伯克霍尔德氏菌的耐药性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3616-3627.

ZHANG Shuyao, WEN Xia, SU Aiting, HUANG Di, TAO Hongbing, CHEN Yiwen, XIE Xiaobao. Typing and identification of *Burkholderia cepacia* complex and drug resistance of *Burkholderia aenigmatica* from daily chemical products[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3616-3627.

摘要:【目的】对从 2020–2022 年不同日化产品中分离的 29 株洋葱伯克霍尔德氏菌复合群 (*Burkholderia cepacia* complex, Bcc) 进行分类和分型, 另将 2020 年前来源于日化产品中 6 株被鉴定为 *Burkholderia lata* 的菌株进行分类更正。探究神秘伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia aenigmatica*) 的耐药性。【方法】本文主要应用多位点分型研究方法 (multilocus sequence typing, MLST), PCR 扩增 *atpD*、*gltB*、*gyrB*、*recA*、*lepA*、*phaC* 和 *trp B* 7 个管家基因片段, 将测序结果与 MLST 数据库中的数据比对分析, 获得菌株各管家基因的编号和 ST 型 (sequence type), 对本检测中心分离自日化产品的 Bcc 进行分型; 利用多位点序列分析 (multilocus sequence analysis, MLSA), 结合 MLST 中等位基因的核苷酸序列构建进化树, 从而对 Bcc 进行系统发育分析和鉴定。利用最小抑菌浓度法 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定 Bcc 对常见防腐剂 (1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰胺、卡松、苯甲酸钠、山梨酸钾) 和抗生素 (头孢他啶、卡那霉素、四环素) 的耐药性。【结果】本文 29 株 Bcc 菌株共有 5 个菌种类型 (*B. cenocepacia*、*B. contaminans*、*B. aenigmatica*、*B. vietnamiensis* 和 *B. stabilis*) 和 15 个不同分型, 分类过程中发现了 7 个新等位基因, 7 个新 ST 分型 (ST2118、ST2120、ST2122、ST2127、ST2128、ST2129 和 ST2130) 并鉴定了其种类。另将 2020 年前来源于

资助项目: 广东省重点领域研发计划 (2022B1111040002)

This work was supported by the Research and Development Plan for Key Fields of Guangdong Province (2022B1111040002).

*Corresponding author. Tel: +86-20-87137649, E-mail: xiaobaoxie@126.com

Received: 2023-01-13; Accepted: 2023-03-17; Published online: 2023-05-08

样品中 6 株被鉴定为 *Burkholderia lata* 的菌株用 MLST 法重新分类鉴定, 其鉴定结果均为 *Burkholderia aenigmatica*。11 株 *B. aenigmatica* 分离株中只有 1 株对头孢他啶耐药, 其他菌均对其不耐药, 分别有 9 株和 8 株 *B. aenigmatica* 对卡那霉素和四环素耐药。卡松和 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(1,3-dimethylmethylol-5,5-dimethylhydantoin, DMDMH)在最大允许量范围内能有效抑制 *B. aenigmatica* 的生长, 有 9 株 *B. aenigmatica* 表现出苯甲酸钠和山梨酸钾的耐药性。【结论】Bcc 的分类较为复杂且存在许多未知等位基因和分型, *Burkholderia aenigmatica* 已经成为污染日化产品的主要 Bcc 菌株。大部分 *B. aenigmatica* 对氨基糖苷类和四环素类抗生素具有耐药性, 大部分来自日化产品中的 *B. aenigmatica* 对苯甲酸钠和山梨酸钾均具有耐药性。

关键词: 洋葱伯克霍尔德氏菌复合群; 多位点序列分析; 神秘伯克霍尔德氏菌; 耐药性; 日化产品

Typing and identification of *Burkholderia cepacia* complex and drug resistance of *Burkholderia aenigmatica* from daily chemical products

ZHANG Shuyao¹, WEN Xia¹, SU Aiting¹, HUANG Di¹, TAO Hongbing², CHEN Yiwen¹, XIE Xiaobao^{1*}

¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application (Ministry of Agriculture and Rural Affairs), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Key Laboratory of Agricultural Microbiome (Ministry of Agriculture and Rural Affairs), State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Detection Center of Microbiology, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

² Guangdong Demay Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To type and identify 29 strains of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) isolated from daily chemical products in 2020–2022, re-identify 6 isolates identified as *Burkholderia lata* from daily chemicals products before 2020, and reveal the antibiotic resistance of *Burkholderia aenigmatica* sp. nov. **[Methods]** Bcc isolates from daily chemical products were subjected to multilocus sequence typing (MLST). Seven housekeeping genes, *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC*, and *trpB*, were amplified by PCR. The sequencing results were compared with the data in MLST database to obtain the accession number of each housekeeping gene and the sequence type of each strain. Multilocus sequence analysis (MLSA) was employed to construct a phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of alleles in MLST. The resistance of Bcc to common preservatives (1,3-dimethylmethylol-5,5-dimethylhydantoin, kathon, sodium benzoate, and potassium sorbate) and antibiotics (ceftazidime, kanamycin, and tetracycline) were determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) method. **[Results]** The 29 Bcc isolates were identified as 5 species (*B. cenocepacia*, *B. contaminans*, *B. aenigmatica*, *B. vietnamiensis*, and *B. stabilis*) and typed as 15 sequence types. Seven new alleles and seven new sequence types (ST2118, ST2120, ST2122, ST2127, ST2128, ST2129, and ST2130) were identified in this study. The six *B. lata* strains from the samples before 2020

were re-identified as *B. aenigmatica* sp. nov. Only one of the 11 *B. aenigmatica* isolates was resistant to ceftazidime, and nine and eight *B. aenigmatica* isolates were resistant to kanamycin and tetracycline, respectively. Kathon and 1,3-dimethylmethylol-5,5-dimethylhydantoin (DMDMH) within the maximum permissible concentrations can effectively inhibit the growth of *B. aenigmatica*. Nine *B. aenigmatica* strains showed resistance to sodium benzoate and potassium sorbate. **[Conclusion]** The identification of Bcc is complex and there are unknown alleles and sequence types. *B. aenigmatica* has become the main Bcc species contaminating daily chemical products. Most strains of *B. aenigmatica* are resistant to aminoglycosides and tetracyclines. Most *B. aenigmatica* isolates from the daily chemical products have resistance to sodium benzoate and potassium sorbate.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex (Bcc); multilocus sequence typing (MLST); *Burkholderia aenigmatica*; drug resistance; daily chemical products

洋葱伯克霍尔德氏菌复合群(*Burkholderia cepacia* complex, Bcc)由至少 22 个基因不同但表型相似的革兰氏阴性物种组成^[1-3]。洋葱伯克霍尔德氏菌复合群的分类是复杂的和不断更新的, 研究者们采用各种各样的分子分型方法对其进行分类, 包括 16S RNA 基因、*recA* 以及多位点分型(multilocus sequence typing, MLST)。MLST 是全球公认的方法, 在物种水平上比其他方法有更高的分辨率。Bcc 的 MLST 方案于 2005 年开发, 并于 2009 年得到改进, 在全球用于 Bcc 的分型和评估种群结构。多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)利用 MLST 中等位基因位点的核苷酸序列进行系统发育分析, 被广泛应用于分离株间的鉴定和系统发育分析^[4]。

Bcc 在自然环境中无处不在, 个人洗护用品的 Bcc 污染常常与多个相关的机会性感染实例有关^[5-6]。为了保证日化产品质量和消费者安全, 厂家使用消毒剂和防腐剂来抑制微生物生长, 以期将微生物负荷降低到可接受的水平。防腐剂通过作用于微生物的细胞膜、细胞壁及酶等多个靶点, 破坏细胞的分裂, 抑制细菌生长和繁殖, 达到防腐的目的^[7]。菌种在抗菌剂作用下也发生耐药性的改变, 细菌对杀菌剂的暴露可以选择对杀菌剂敏感性降低的突变体, 而这些突变体往往表

现出对各种抗生素的敏感性降低, 表明杀菌剂可以在实验室条件下作为抗生素耐药性的驱动因子^[8]。Bcc 常常在日化产品的污染菌株中出现, 并占据一定的比例, 即使在有防腐剂或者低营养条件下仍能存活数月, 且对于防腐剂消毒剂有较强的耐药性^[9]。环境或工业污染中分离的 Bcc 菌株具有的耐药性基因可作为致病性 Bcc 菌株的重要耐药基因库来源, 因此研究工业污染物中分离的菌株耐药性和耐防腐剂性能对预防大面积疾病感染有重要作用。

神秘伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia aenigmatica*)为 2020 年重新分类的种^[2], 作为日化产品污染菌株的研究较少, 本文来自于日化产品的 *B. aenigmatica* 作为研究对象, 对其进行详细的分类分型, 并探究 *B. aenigmatica* 对部分抗生素和常见防腐剂的耐药性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MH 肉汤培养基 (Mueller-Hinton broth, MHB)、大豆酪蛋白琼脂培养基(soy casein agar, TSA)、非苛养非肠道革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒(API, 梅里埃生物)、AmPure Microbial DNA Kit (广州美基生物科技有限公司)。

实验用抗生素包括头孢他啶(β -内酰胺酶类)、硫酸卡那霉素(氨基糖苷类)、盐酸四环素(四环素类), 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 实验用防腐剂包括山梨酸钾和苯甲酸钠, 购自广东广试试剂科技有限公司, 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲(1,3-dimethylmethanol-5,5-dimethylhydantoin, DMDM 乙内酰脲或者 DMDMH)和卡松(甲基氯异噻唑啉酮:甲基异噻唑啉酮为 3:1), 购自阿拉丁试剂公司。

实验仪器和耗材主要有多功能酶标仪(BioTek synergy H1)、无菌 96 孔培养板和移液器等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种来源

从 2020–2022 年广东省微生物分析检测中心日化产品中分离出 29 株污染 *Bcc*; *B. cenocepacia* LMG 18828 和 *B. cepacia* ATCC 25416 作为本实验的参考菌株。

1.2.2 菌种培养和菌落形态观察

从甘油管中取 10 μ L 菌种保存液垂直滴于 TSA 平板上, 培养 48 h 后肉眼观察其菌落形态并拍照记录; 成功复苏后用 TSA 琼脂划线转接, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 1–2 代, 实验前转菌培养 18–24 h 后使用。

1.2.3 菌种鉴定

培养的纯菌落采用 API 20NE 进行菌种鉴定, 实验操作按照说明书进行。纯菌种培养物用 AmPure Microbial DNA Kit (广州美基生物科技有限公司)快速制备 DNA 溶液, 以通用引物对 27F/1492R 进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因片

段, PCR 原液送至北京擎科生物科技有限公司进行 Sanger 法测序, BLAST 比对序列确定菌株的属和种。

1.2.4 MLST 分型鉴定

将 API 鉴定结果和分子鉴定结果相结合, 先以 API 结果确定属于 *Bcc* 菌株, 进一步进行 16S rRNA 基因鉴定, 并将测序结果进行 BLAST 比对后, 筛选出分子鉴定结果 Max identity 达 99%–100% 的洋葱伯克霍尔德氏菌复合群 *Burkholderia* sp. 进行 MLST 鉴定。

MLST 中的 7 个管家基因的扩增, 引物序列来源于网站 *Bcc* PubMLST website (<https://pubmlst.org/Bcc/>), 如表 1 所示。MLST 引物反应条件: 96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 96 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 引物退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每个 50 μ L 扩增反应混合液包括: 25 μ L 2 \times Rapid *Taq* Master Mix (诺唯赞)、2.0 μ L 染色体 DNA (1–10 ng/ μ L)、2.0 μ L 上游引物(10 pmol/ μ L)、2.0 μ L 下游引物(10 pmol/ μ L), 19 μ L PCR 级 H₂O。

1.2.5 MLSA 进化树构建方法

串联 MLST 中的 7 个管家基因: *atpD* (443 bp)、*gltB* (400 bp)、*gyrB* (454 bp)、*recA* (393 bp)、*lepA* (397 bp)、*phaC* (385 bp) 和 *trpB* (301 bp), 标准菌株的 7 个管家基因从 <https://pubmlst.org/Bcc/> 下载, 利用 MEGA 11, 采用最大似然法和 GTRCAT 替代模型对串联序列进行比对, 在 bootstrap 检验中(1 000 次重复)关联类群聚集在一起的重复树的百分比, 得到系统发育树。

表 1 *Bcc* MLST 引物表

Table 1 *Bcc* MLST primers

Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Allele size (bp)
<i>atpD</i>	GTTCATCTGGCCGTACAC	AACGTGACGCTCGAAGTCC	443
<i>gltB</i>	CTTCTTCTTCGTCGCCGA	TTGCCGACGTAGTCGTTG	400
<i>gyrB</i>	ATCGTGATGACCGAGCTG	CGTTGTAGCTGTCGTTCC	454
<i>recA</i>	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	GACCGAGTCGATGACGAT	393
<i>lepA</i>	GGCATCAAGGAAGTACG	CTGCGGCATGTACAGGTT	397
<i>phaC</i>	AGACGGCTTCAAGGTGGT	ACACGGTGTGACCGTCA	385
<i>trpB</i>	CTGGGTCACGAACATGGA	CCGAATGCGTCTCGATGA	301

1.3 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)测定

1.3.1 药物配制

配制山梨酸钾、苯甲酸钠、DMDMH、卡松、头孢他啶、硫酸卡那霉素和盐酸四环素储备液，过滤除菌于 4 °C 冰箱避光保存，实验前稀释至所需浓度。

1.3.2 微量肉汤稀释法

将培养过夜的纯菌落挑至 MH 肉汤培养基中，调节菌液 OD_{600} 值为 0.08–0.13，再稀释 100 倍，此时菌液浓度约为 10^6 CFU/mL，于第 1 孔中加入抗菌药物(抗生素或防腐剂) 100 μ L，二倍稀释抗菌药物直至每行的第 10 孔，往 96 孔板中每行 1–11 列加入 100 μ L 菌液，第 12 列不加菌液只加 MH 肉汤，每行第 11 孔为阳性对照，每行第 12 孔为空白对照。

将 96 孔板置于 30 °C 培养箱中恒温培养 24 h，在确保阳性对照有明显生长以及空白对照无菌生长情况下，分别通过肉眼观察是否浑浊或沉淀和用酶标仪测定吸光值 OD_{600} 并换算成透光度，来判定和比较其 MIC 值，无菌生长的最低浓度定义为 MIC。

2 结果与分析

2.1 MLST 及菌种鉴定结果

2.1.1 新等位基因

在 BC09、BC13 和 BC16 中发现 4 个无法在

MLST 系统上匹配的基因，分别为 *gyrB*、*recA*、*lepA* 和 *trpB*，已上传至 pubMLST *Burkholderia cepacia* complex 系统中，经过 Eliza Depoorter (Laboratory of Microbiology, LM-UGent, Ghent University, Belgium)审核后，分配新的等位基因号为：*gyrB*-1351、*recA*-778、*lepA*-887 和 *trpB*-851 (表 2)，其基因序列已录入在 Bcc PubMLST website 系统中。新等位基因的发现丰富了 Bcc 数据库的基因数量，有助于更好地对 Bcc 进行分类。

2.1.2 MLSA 进化树的构建

本文中 BC02、BC03、BC09、BC13、BC16 和 BC21 以及 BC26、BC27、BC28 和 BC29 等均匹配不到分型，为了确认其具体的菌种，串联 MLST 中的 7 个管家基因：*atpD* (443 bp)、*gltB* (400 bp)、*gyrB* (454 bp)、*recA* (393 bp)、*lepA* (397 bp)、*phaC* (385 bp)和 *trpB* (301 bp)，采用最大似然法得到系统发育树(图 1)。

根据 MLSA 系统发育树聚类分析，本文中的大部分分离菌株主要聚类在 *B. cenocepacia*、*B. contaminans* 和 *B. aenigmatica*，其中 *B. aenigmatica* 占比最大。BC02、BC03 为新的 ST 分型，系统发育树中它们聚类在 *B. cenocepacia* 分支，BC09、BC13 和 BC16 聚类在 *B. aenigmatica* 分支，BC21 聚类在 *B. stabilis* 和 *B. pyrrocinia* 分支，与 *B. stabilis* 距离更近。新 ST 型菌 BC29 聚类在 *B. vietnamiensis* 分支，与 BC25、BC26、BC27、BC28 共同聚类在一个分支。编号为 BC216、

表 2 Bcc 新等位基因及其来源

Table 2 New alleles and source strains

No.	New alleles	Assigned ID	Species	Strain
1	<i>lepA</i>	887	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	BC09, BC13, BC16
2	<i>gyrB</i>	1351	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	BC09, BC13, BC16
3	<i>recA</i>	778	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	BC09, BC13, BC16
4	<i>trpB</i>	851	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	BC09, BC13, BC16
5	<i>gyrB</i>	1352	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	BC25, BC26, BC27, BC28
6	<i>trpB</i>	849	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	BC25, BC26, BC27, BC28
7	<i>gyrB</i>	1353	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BC03

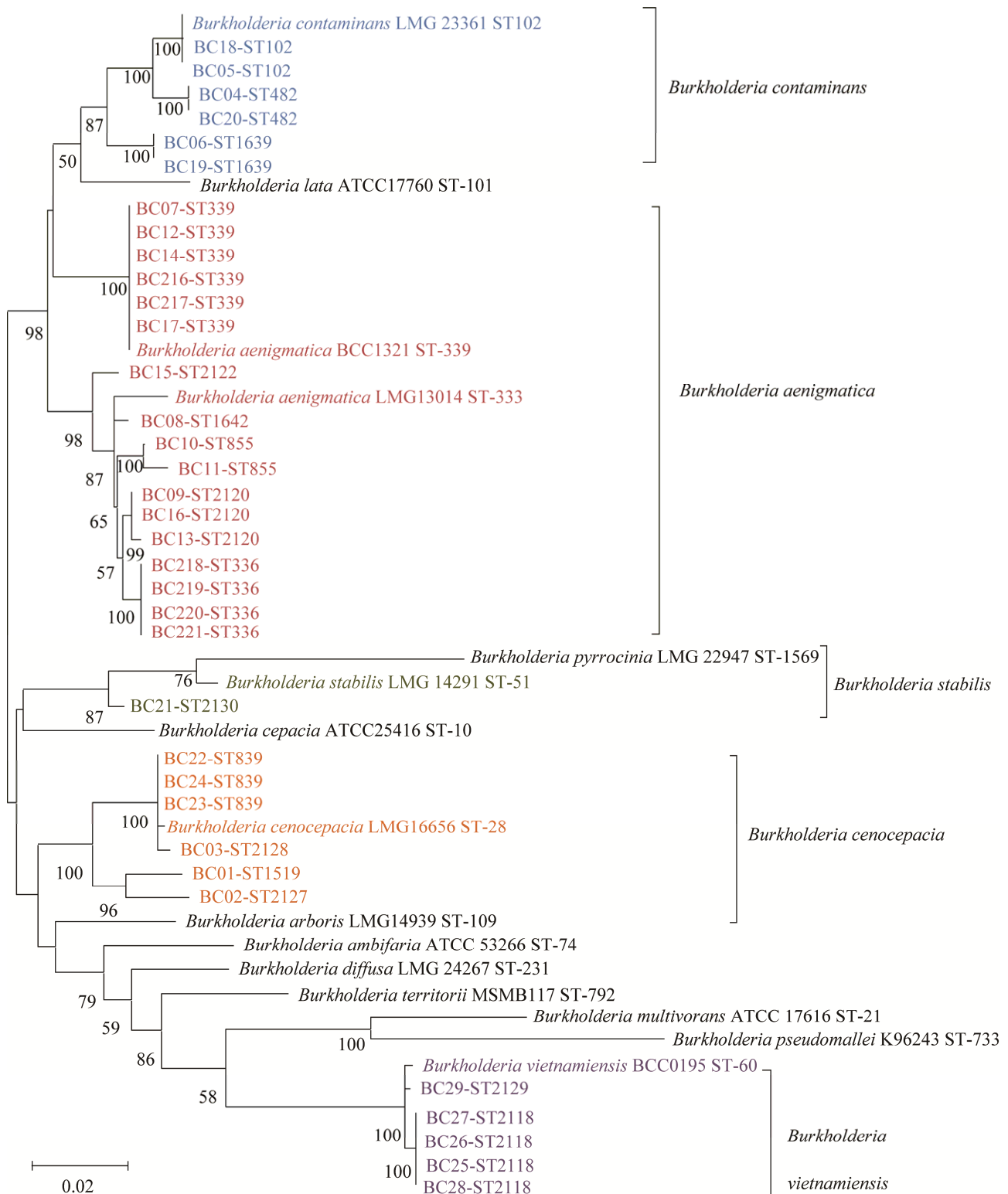


图 1 基于 Bcc 分离株 7 个管家基因片段的串联序列(2 760 bp)构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on the concatenated sequences (2 760 bp) of seven housekeeping gene fragments of Bcc isolates. Node values represent percent bootstrap confidence derived from 1 000 replicates. Bar, 0.02 substitutions per site.

BC217、BC218、BC219、BC220 和 BC221 的这 6 株为 2020 年前样品中被鉴定为 *B. lata* 的菌株^[10], 用 MLST 串联 7 个管家基因构建发育树, 发现其聚类于 *B. aenigmatica* 分支。2020 年 Depoorter 等^[2] 对 Bcc taxon K 重新分类后, 许多学者纷纷更改了对 *B. aenigmatica* 的误分类^[11-12], 大部分 *B. aenigmatica* 都被误分类为 *B. lata*。

2.1.3 新 MLST 分型以及菌种鉴定

虽然 16S rRNA 基因序列分析通常用于识别潜在的新分类群, 但该基因的分类学解析已不足以区分伯克霍尔德氏菌, 特别是 Bcc 的成员^[2], 通过 MLST 分型能详细分别出菌株种类, 本研究中的菌株的 MLST 分析共 15 个 ST 分型(表 3), 11 株 *B.*

aenigmatica (38%)、6 株 *B. cenocepacia* (21%)、6 株 *B. contaminans* (21%)、5 株 *B. vietnamiensis* (17%) 和 1 株 *B. stabilis* (3%)。根据 de Volder 等^[12]的研究, *B. contaminans* 和 *B. aenigmatica* 是工业产品和环境中最常见的污染物种。Cunningham-Oakes 等^[11]通过重新分类确定了 *B. aenigmatica* 是比 *B. lata* 占比更多的一种主要污染菌株。本研究从日化产品分离的 Bcc 菌株中占主要污染数量的是 *B. aenigmatica*。

通过 MLSA 进化树的聚类, BC02、BC03、BC09、BC13、BC16、BC21 以及 BC26、BC27、BC28 和 BC29, 这些无法匹配的菌株已经申请到新的分型号, 并匹配了相应的菌种(表 3 中加粗字体表示)。

表 3 Bcc 菌株的 ST 分型

Table 3 Sequence types of Bcc isolates

Strain	<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>trpB</i>	ST	Species
BC01	17	668	1 253	15	11	8	151	1 519	<i>B. cenocepacia</i>
BC02	107	155	343	67	11	41	252	2 127	<i>B. cenocepacia</i>
BC03	131	11	1 353	14	11	6	79	2 128	<i>B. cenocepacia</i>
BC04	151	192	245	152	158	173	151	482	<i>B. contaminans</i>
BC05	64	80	76	89	105	97	70	102	<i>B. contaminans</i>
BC06	538	572	864	489	668	406	529	1 639	<i>B. contaminans</i>
BC07	184	224	301	200	219	53	210	339	<i>B. aenigmatica</i>
BC08	180	210	579	146	213	162	217	1 642	<i>B. aenigmatica</i>
BC09	180	210	1 351	778	887	310	851	2 120	<i>B. aenigmatica</i>
BC10	180	403	600	146	415	317	217	855	<i>B. aenigmatica</i>
BC11	180	403	600	146	415	317	217	855	<i>B. aenigmatica</i>
BC12	184	224	301	200	219	53	210	339	<i>B. aenigmatica</i>
BC13	180	210	1 351	778	887	310	851	2 120	<i>B. aenigmatica</i>
BC14	184	224	301	200	219	53	210	339	<i>B. aenigmatica</i>
BC15	180	390	579	354	214	310	210	2 122	<i>B. aenigmatica</i>
BC16	180	210	1 351	778	887	310	851	2 120	<i>B. aenigmatica</i>
BC17	184	224	301	200	219	53	210	339	<i>B. aenigmatica</i>
BC18	64	80	76	89	105	97	70	102	<i>B. contaminans</i>
BC19	538	572	864	489	668	406	529	1639	<i>B. contaminans</i>
BC20	151	192	245	152	158	173	151	482	<i>B. contaminans</i>
BC21	25	140	159	293	219	10	62	2 130	<i>B. stabilis</i>
BC22	15	11	487	14	11	6	79	839	<i>B. cenocepacia</i>
BC23	15	11	487	14	11	6	79	839	<i>B. cenocepacia</i>
BC24	15	11	487	14	11	6	79	839	<i>B. cenocepacia</i>
BC25	191	103	1 352	23	36	11	849	2 118	<i>B. vietnamiensis</i>
BC26	191	103	1 352	23	36	11	849	2 118	<i>B. vietnamiensis</i>
BC27	191	103	1 352	23	36	11	849	2 118	<i>B. vietnamiensis</i>
BC28	191	103	1 352	23	36	11	849	2 118	<i>B. vietnamiensis</i>
BC29	28	103	173	23	36	11	81	2 129	<i>B. vietnamiensis</i>

A bold font in the table indicates the new ST type.

2.2 不同分型的菌落形态特征

B. cenocepacia 的 ST 分型有: ST1519、ST2127、ST2128 和 ST839, 从菌落形态上看 ST1519、ST2127 和 ST839 均为白色不透明菌落, 菌落表面光滑, ST2128 为淡黄色菌落(图 2)。 *B. contaminans* 的 ST 分型有: ST482、ST102、ST1639 和 ST482 为黄色菌落, ST102 和 ST1639 为白色菌落。 *B. aenigmatica* 的 ST 分型有: ST339、ST1642、ST2120、ST2122 和 ST855, 均为白色不透明菌落。 *B. vietnamiensis* 的 ST 分型有: ST2118、ST2129 和 ST2118 为白色菌落, ST2129 为淡黄色菌落。 *B. stabilis* 的 ST 分型有: ST2130, 为新的 ST 分型, 其菌落颜色为白色不透明, 与 *B. aenigmatica* 非常相似, 难以从肉眼上分辨。

2.3 神秘伯克霍尔德氏菌(*B. aenigmatica*) 的耐药性

2.3.1 抗生素对 *B. aenigmatica* 的抑制效果

B. cenocepacia 和其他 Bcc 成员对大多数临床相关抗生素表现出高水平的固有耐药性, Bcc 分离株的多重耐药包括喹诺酮类、氨基糖苷类和 β -内酰胺类药物等。 Bcc 细菌的多种抗生素耐药性被归因于细菌外膜的通透性降低、耐药结瘤细胞分裂家族的外排泵^[13]和抗生素修饰酶^[14]等。

头孢他啶属于 β -内酰胺类抗生素, 通过抑制细菌细胞壁合成而引起细胞死亡, Everaert 等^[14]的研究表明, Bcc 菌株对 β -内酰胺类抗生素的耐药性是由 β -内酰胺酶和非 β -内酰胺酶介导的耐药性机制介导的。作为工业环境和日化产品中最为常见的污染菌株, *B. aenigmatica* 对头孢他啶的 MIC 值范围为 1–16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 4), 根据《CLSI 2021 31st ed 抗微生物药物敏感执行标准》^[15]的折点, Bcc 物种的抗生素敏感性结果可以表示为敏感(S)、中间(I)和耐药(R), 11 株样品中有 9 株 MIC 小于等于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 为头孢他啶敏感菌株(S), 其中对头孢他啶最敏感的菌株为 BC14, 头孢他啶 MIC 为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。不同存活环境对 *B. aenigmatica* 的耐药性有一定的改变, 也有一些菌株提高了对头孢他啶的耐药性, BC17 对头孢他啶的 MIC 为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 为头孢他啶耐药菌株(R)。硫酸卡那霉素为氨基糖甙类广谱抗生素, 主要与细菌核糖体 30S 亚单位结合, 抑制细菌蛋白质合成, Bcc 对氨基糖甙类存在固有耐药性, 本次分离的神秘伯克霍尔德氏菌(*B. aenigmatica*)基本上属于耐药菌, 只有 BC15 对卡那霉素敏感, 可能是氨基糖苷类抗性基因丢失。大部分 *B. aenigmatica* 对四环素耐受, 只有 BC15 和 BC16 为中间耐受。



图 2 各 ST 分型的菌落形态

Figure 2 The colony morphology of each sequence type.

表 4 抗生素对神秘伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia aenigmatica*)的 MICTable 4 Minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics for *Burkholderia aenigmatica* ($\mu\text{g/mL}$)

Strain	Source	Species	Ceftazidime	Kanamycin	Tetracycline
LMG 18828	Type strain	<i>B. cenocepacia</i>	4 (S)	>640 (R)	>640 (R)
ATCC 25416	Type strain	<i>B. cepacia</i>	4 (S)	160 (R)	>320 (R)
BC07	Essence liquid	<i>B. aenigmatica</i>	4 (S)	>320 (R)	>320 (R)
BC08	Wet tissue	<i>B. aenigmatica</i>	4 (S)	32 (R)	32 (R)
BC09	Wet tissue	<i>B. aenigmatica</i>	4 (S)	>320 (R)	>320 (R)
BC10	Raw materials	<i>B. aenigmatica</i>	8 (S)	>640 (R)	320 (R)
BC11	Cream	<i>B. aenigmatica</i>	4 (S)	640 (R)	320 (R)
BC12	Toner	<i>B. aenigmatica</i>	4 (S)	>640 (R)	320 (R)
BC13	Toner	<i>B. aenigmatica</i>	8 (S)	>640 (R)	160 (R)
BC14	Concentrated purified liquid	<i>B. aenigmatica</i>	1 (S)	160 (R)	32 (R)
BC15	Wet tissue	<i>B. aenigmatica</i>	2 (S)	5 (S)	6 (I)
BC16	Wet tissue	<i>B. aenigmatica</i>	16 (I)	640 (R)	6 (I)
BC17	Body lotion	<i>B. aenigmatica</i>	32 (R)	40 (R)	50 (R)

(S), (I) and (R) in the table indicate the sensitivity, intermediate and resistance to antibiotics, respectively.

本文 *B. aenigmatica* 均来源于日化产品, 日化产品主要是采用防腐剂进行防腐, 因此本研究的大部分 *B. aenigmatica* 对头孢他啶不耐受, 但存在对四环素的耐药性以及氨基糖苷类的固有耐药性。BC07、BC12、BC14 和 BC17 同为 ST339 分型, 但抗生素耐药性差异很大, BC14 头孢他啶 MIC 为 1 $\mu\text{g/mL}$, 而 BC17 头孢他啶 MIC 高达 32 $\mu\text{g/mL}$ 。BC09 和 BC13 和 BC16 同为 ST2120, 它们的抗生素耐药性也不相同。说明即使是同一种菌种, 同一种分型, 不同的生存环境使得各菌株的耐药性有较大的差异。

2.3.2 防腐剂对 *B. aenigmatica* 的抑制效果

本研究菌株主要来自于日化产品中污染菌株, 探究它们对防腐剂的耐药性有助于指导防腐剂的添加和使用, 使产品更加不易被污染。卡松是目前使用较为广泛的一类防腐剂, 广谱杀菌抑菌性能, 广泛应用于洗发水、沐浴液、洗面奶和洗手液等淋洗类化妆品。其杀菌机理是与蛋白质的巯基反应、抑制活性物运输和葡萄糖氧化作用, 使细菌变性。卡松类防腐剂主要包括甲基异

噻唑啉酮(methylisothiazolinone, MI)、甲基氯异噻唑啉酮(methylchloroisothiazolinone, MCI)及 MCI 与 MI 的混合物^[16]。我国现行的《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中将卡松收录于准用防腐剂列表中, 并规定卡松最大允许使用量为 0.001 5%, 且仅限于淋洗类产品中使用^[17]。杨娟等^[18]报道从洗洁精中获得的洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*) MIC 为 20 $\mu\text{g/mL}$, 超出了使用限量, 可能是污染的微生物对卡松产生了耐药性。本研究中菌株卡松 MIC 为 0.2%–6.25%e-4 (表 5), 远远低于最大允许使用量 0.001 5%, 对卡松耐药性较差, 本研究中的菌株无来自洗手液或洗洁精等淋洗产品, 因此对卡松耐药性较差, 说明菌株对防腐剂的耐药性很大程度取决于产品中所使用的防腐剂。

DMDMH 具有广谱抗菌活性, 可通过抑制革兰氏阴性和阳性细菌、酵母菌及霉菌等起到防腐作用, 主要应用于化妆品、洗涤用品和纺织品中^[19]。我国现行的《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中规定 DMDMH 最大允许使用量为 0.6%,

表 5 防腐剂对神秘伯克霍尔德氏菌的 MIC

Table 5 Minimal inhibitory concentration (MIC) of preservatives for *Burkholderia aenigmatica* (%)

Strain	Source	DMDMH (0.6%) ^a	Kathon (e-4) (0.001 5%) ^a	Sodium benzoate (0.5%) ^a	Potassium sorbate (0.6%) ^a
LMG 18828	Type strain	0.013	0.390	0.400	0.200
ATCC 25416	Type strain	0.013	0.780	0.200	0.100
BC07	Essence liquid	0.050	1.560	0.800	0.400
BC08	Wet tissue	0.025	1.560	0.200	0.200
BC09	Wet tissue	0.006	0.195	0.800	0.800
BC10	Raw materials	0.100	6.250	0.800	0.800
BC11	Cream	0.100	1.560	0.400	0.800
BC12	Toner	0.200	1.560	0.800	1.600
BC13	Toner	0.025	0.780	0.800	0.800
BC14	Concentrated purified liquid	0.100	3.125	0.800	0.400
BC15	Wet tissue	0.025	0.195	0.400	0.400
BC16	Wet tissue	0.013	0.195	0.800	0.800
BC17	Body lotion	0.100	0.390	1.600	1.600

^a: The maximum level for use according to the safety and technical standards for cosmetics (2015 edition).

本研究中 DMDMH 对神秘伯克霍尔德氏菌 *B. aenigmatica* MIC 为 0.006 25%–0.2%, 小于 0.6%, 说明 DMDMH 在最大允许使用量内能很好地抑制 *B. aenigmatica* 生长。除了 BC09 和 BC16 之外, 其他菌株 MIC 均高于标准菌株 LMG 18828 和 ATCC 25416, 这些来自日化产品的菌株对 DMDMH 的抗性增加, 这与 Rushton 等的研究一致^[6], BC09、BC13 和 BC16 为同一 ST 分型, 它们对 DMDMH 的耐药性并不相同, 这可能取决于它们内在的防腐剂耐药性和稳定的适应性变化, 如外排增强等^[6]。

苯甲酸钠是苯甲酸的钠盐, 是广泛应用于食品、药物、化妆品、牙膏、香料、烟叶和饲料的防腐剂^[20]。山梨酸钾是由国际粮农组织与世界卫生组织共同推荐的一种安全高效的防腐剂, 能够用于食品、饮料、烟草、农药及化妆品等各个行业^[21]。我国现行的《化妆品安全技术规范》(2015 年版) 中规定苯甲酸钠和山梨酸钾的最大允许使用量分别为 0.5% 和 0.6%, 本研究中苯甲

酸钠和山梨酸钾对 *B. aenigmatica* 的 MIC 为 0.1%–1.6%, 标准菌株 LMG 18828 和 ATCC 25416 的 MIC 小于最大允许使用量, 但分离菌株大部分 MIC 都超出了最大允许使用量, 除了 BC08 和 BC15 外, 其他菌株均表现出对苯甲酸钠和山梨酸钾的耐药性。

综上所述, 卡松和 DMDMH 作为常见的日化产品防腐剂, 对 *B. aenigmatica* 具有很好的抑菌效果, 但在有效抑菌范围内来自日化产品中的 *B. aenigmatica* 对 DMDMH 的抗性有所增加。本研究中来自日化产品的 *B. aenigmatica* 对苯甲酸钠和山梨酸钾这 2 种防腐剂具有较强的耐药性, 仅使用苯甲酸钠或山梨酸钾的其中一种并不能很好地对产品进行有效防腐。因此, 在实际生产中需要充分考虑 *B. aenigmatica* 对防腐剂发生耐药的可能性, 设计出更加优化的防腐体系, 定期检查微生物污染问题, 及时发现 Bcc 耐药菌并调整防腐剂方案。

3 结论与展望

本文利用 MLST 法对来自日化产品的 Bcc 进行分类分型,发现了新的等位基因并确立了新的分型,充实了 Bcc 数据库,使 Bcc 分类更加详细化,不同的管家基因可能主导了 Bcc 不同的功能,新的等位基因和分型预示着 Bcc 新菌株各方面的进化方向,为 Bcc 污染预防、耐药性逆转和 Bcc 疾病预防提供基础研究。Bcc 分类一直较为复杂,目前尚存在很大的更新空间,本文对 2020 年以前本单位收集的部分 Bcc 分类进行了校正,尽可能正确分类 Bcc 并研究其分类意义。

本文还对 2020 年重新分类的 Bcc 菌株神秘伯克霍尔德氏菌 *B. aenigmatica* 进行了耐药性研究,实验证明,尽管不在含有抗生素的环境中生长,大部分 *B. aenigmatica* 对氨基糖苷类和四环素类抗生素均具有耐药性,同时 *B. aenigmatica* 对日化产品中常见的防腐剂具有耐药性,这可能成为致病性 Bcc 菌株的重要耐药基因库来源,本实验室将进一步研究其耐药机理和耐药逆转的方向,以期减少 Bcc 对日化的污染和对人类健康的影响。

参考文献

- [1] de SMET B, MAYO M, PEETERS C, ZLOSNIK JEA, SPILKER T, HIRD TJ, LiPUMA JJ, KIDD TJ, KAESTLI M, GINTHER JL, WAGNER DM, KEIM P, BELL SC, JACOBS JA, CURRIE BJ, VANDAMME P. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(7): 2265-2271.
- [2] DEPOORTER E, de CANCK E, PEETERS C, WIEME AD, CNOCKAERT M, ZLOSNIK JEA, LiPUMA JJ, COENYE T, VANDAMME P. *Burkholderia cepacia* complex taxon K: where to split?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1594.
- [3] MARTINA P, LEGUIZAMON M, PRIETO CI, SOUSA SA, MONTANARO P, DRAGHI WO, STÄMMLER M, BETTIOL M, de CARVALHO CCCR, PALAU J, FIGOLI C, ALVAREZ F, BENETTI S, LEJONA S, VESCINA C, FERRERAS J, LASCH P, LAGARES A, ZORREGUIETA A, LEITÃO JH, et al. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 14-20.
- [4] PETER, V, PETER D. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(2): 87-95.
- [5] LEONG LEX, LAGANA D, CARTER GP, WANG QN, SMITH K, STINEAR TP, SHAW D, SINTCHENKO V, WESSELINGH SL, BASTIAN I, ROGERS GB. *Burkholderia lata* infections from intrinsically contaminated chlorhexidine mouthwash, Australia, 2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(11): 2109-2111.
- [6] RUSHTON L, SASS A, BALDWIN A, DOWSON CG, DONOGHUE D, MAHENTHIRALINGAM E. Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(7): 2972-2980.
- [7] 王萍, 柳玉红. 我国化妆品用防腐剂及分析方法的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2007, 24(7): 557-559. WANG P, LIU YH. Cosmetics preservatives and analysis methods used in China[J]. *Journal of Environment and Health*, 2007, 24(7): 557-559 (in Chinese).
- [8] CONDELL O, IVERSEN C, COONEY S, POWER KA, WALSH C, BURGESS C, FANNING S. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3087-3097.
- [9] ROSE H, BALDWIN A, DOWSON CG, MAHENTHIRALINGAM E. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63(3): 502-510.
- [10] WEN X, XIE XB, ZHANG SY, SUN TL, LIU JX, LI WR. *Burkholderia cepacia* complex in personal care products: molecular epidemiology and susceptibility to preservatives[J]. *Journal of Cosmetic Science*, 2020, 71(3): 133-148.

- [11] CUNNINGHAM-OAKES E, POINTON T, MURPHY B, CAMPBELL-LEE S, WEBSTER G, CONNOR TR, MAHENTHIRALINGAM E. Genomics reveals the novel species placement of industrial contaminant isolates incorrectly identified as *Burkholderia lata*[J]. *Microbial Genomics*, 2021, 7(4): 000564.
- [12] de VOLDER AL, TEVES S, ISASMENDI A, PINHEIRO JL, IBARRA L, BREGLIA N, HERRERA T, VAZQUEZ M, HERNANDEZ C, DEGROSSI J. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from industrial processes and contaminated products in Argentina[J]. *International Microbiology*, 2021, 24(2): 157-167.
- [13] KATHERINE AR, HERBERT PS. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species[J]. *Drug Resistance Updates*, 2016, 28: 82-90.
- [14] EVERAERT A, COENYE T. Effect of β -lactamase inhibitors on *in vitro* activity of β -lactam antibiotics against *Burkholderia cepacia* complex species[J]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2016, 5(1): 44.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100 Ed31, 2021.
- [16] 陈岑, 崔邴周, 高艳琳, 程巧鸳. 淋洗类化妆品中异噻唑啉酮类防腐剂使用情况分析[J]. *日用化学品科学*, 2022, 45(3): 26-31, 57.
CHEN C, CUI BZ, GAO YL, CHENG QY. Analysis on the use of isothiazolinone preservatives in rinse-off cosmetics[J]. *Detergent & Cosmetics*, 2022, 45(3): 26-31, 57 (in Chinese).
- [17] 陈国帅, 陈晓云, 林婉微. 《化妆品安全技术规范》准用防腐剂列表解读[J]. *日用化学品科学*, 2016, 39(9): 37-42.
CHEN GS, CHEN XY, LIN WW. Interpretation of preservatives in safety and technical standards for cosmetics[J]. *Detergent & Cosmetics*, 2016, 39(9): 37-42 (in Chinese).
- [18] 杨娟, 刘永龙, 林芮, 梁健, 陈娟, 黄小莱, 邱晓颖. 几种常用防腐剂对日化产品中腐败微生物抑制效果研究[J]. *工业微生物*, 2016, 46(4): 34-37.
YANG J, LIU YL, LIN R, LIANG J, CHEN J, HUANG XM, QIU XY. Effect evaluation of antiseptic preservatives commonly used in cosmetic products[J]. *Industrial Microbiology*, 2016, 46(4): 34-37 (in Chinese).
- [19] 袁晓倩, 茹歌, 陈丹丹, 王柯, 郑荣. 化妆品中防腐剂 1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲的水解机理及测定方法研究[J]. *香料香精化妆品*, 2020(1): 51-54, 58.
YUAN XQ, RU G, CHEN DD, WANG K, ZHENG R. Study on the hydrolysis mechanism and determination method of 1,3-dihydroxymethyl-5,5-dimethylhydantoin in cosmetics[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2020(1): 51-54, 58 (in Chinese).
- [20] 刘广源, 孙晨亮. 新型牙膏防腐剂的防腐研究[J]. *口腔护理用品工业*, 2018, 28(1): 8-10.
LIU GY, SUN CL. Study on anticorrosion of new toothpaste preservative[J]. *Oral Care Industry*, 2018, 28(1): 8-10 (in Chinese).
- [21] 任剑豪, 吴卫国. 山梨酸及其钾盐防腐效果的研究进展[J]. *南方农业*, 2017, 11(17): 77-78.
REN JH, WU WG. Research progress on anticorrosion effect of sorbic acid and its potassium salt[J]. *South China Agriculture*, 2017, 11(17): 77-78 (in Chinese).