

# 应用 SHIME 模型研究肠道微生物对 13 种农产品中 腐霉利生物可给性的影响

魏东<sup>1,2</sup>, 冯文喆<sup>2</sup>, 邓雅静<sup>1,2</sup>, 肖金京<sup>2</sup>, 操海群<sup>2</sup>, 施艳红<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 安徽省农产品质量安全重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** 应用模拟人体胃肠消化的 SHIME (simulator of the human intestinal microbial ecosystem) 体外方法评价肠道菌群对不同农产品中腐霉利生物可给性的作用规律, 为正确评价农产品中农药残留健康风险提供理论依据。结果表明: 肠道菌群可使葡萄等 13 种农产品中腐霉利生物可给性降低 30.3%~97.2%, 其中以葡萄和大豆中供试农药残留生物可给性的影响较为显著; 膳食成分可增强肠道菌群对腐霉利生物可给性的影响, 菊粉作用下可使肠道菌群对葡萄中腐霉利生物可给性降低 39.6%。大肠杆菌是影响腐霉利生物可给性的主要优势菌, 36 h 时可使葡萄中腐霉利生物可给性显著降低 33.9%。

**关键词:** 农产品; 生物可给性; 腐霉利; 肠道菌群; 膳食成分

中图分类号: X592

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)01-0132-05

## Effects of gut microflora on procymidone bioaccessibility in 13 kinds of agricultural products by SHIME mode

WEI Dong<sup>1,2</sup>, FENG Wenzhe<sup>2</sup>, DENG Yajing<sup>1,2</sup>, XIAO Jinjing<sup>2</sup>, CAO Haiqun<sup>2</sup>, SHI Yanhong<sup>1,2</sup>

(1. School of Resources & Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Key Laboratory for Quality and Safety of Agricultural Products of Anhui Province, Hefei 230036)

**Abstract:** The simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) can be used *in vitro* gastrointestinal methods to determine the effects of gut microbiota on the procymidone bioaccessibility in different agricultural products, which can provide a theoretical basis for the reliable evaluation of potential health risks of pesticide residues in agricultural products. The results showed that gut microbiota could reduce the procymidone bioaccessibility by 30.3% - 97.2% in 13 agricultural products. Among the tested products, the pesticide residues bioaccessibility in grapes and soybeans were most significantly affected. Furthermore, dietary ingredients could enhance such kind of effect, for example, the addition of inulin could reduce the procymidone bioaccessibility in grapes by 39.6%. Otherwise, *Escherichia coli* was the superior bacteria of effects on procymidone bioaccessibility, which could result in a 33.9% decrease on the procymidone bioaccessibility in grapes after action for 36 h.

**Key words:** agricultural products; bioaccessibility; procymidone; gut microflora; dietary composition

农产品中农药残留对人体健康的危害越来越受到广泛关注, 农药残留膳食暴露评估是农产品安全性评价的关键<sup>[1-2]</sup>。目前评估农药残留对人体健康风险的残留分布数据主要是初级农产品中残留量或膳食摄入的食物中农药残留量, 忽略了人体膳食摄入食物后, 可以危害人体健康的农药残留仅是其可以从食物中释放至消化液的部分<sup>[3]</sup>。生物可给性

(Bioaccessibility, 即食物中农药残留在体内消化过程中可被释放至胃肠液的比值) 是准确评估农药残留实际暴露量的重要因素, 目前已广泛应用于重金属、真菌毒素以及多氯联苯 (PCBs)<sup>[4]</sup>、多环芳烃 (PAHs)<sup>[5]</sup>等有机污染物健康风险评估。

作为人体消化代谢的重要“器官”, 肠道菌群在食物消化、药物代谢及吸收等方面具有重要的作用<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972981) 资助。

作者简介: 魏东, 硕士研究生。E-mail: m13345568188@163.com

\* 通信作者: 施艳红, 教授。E-mail: shiyh@ahau.edu.cn

近年来, 国内外不少学者关注了环境污染物对肠道菌群的影响, 发现重金属和农药残留的膳食暴露显著影响人体肠道菌群的结构与功能, 进而诱导机体代谢、吸收和免疫等功能的失调。但是, 对于肠道菌群影响环境污染物生物可给性的研究报道较少, 且多集中于对有机污染物和重金属, 如 Sun 等发现肠道微生物可显著降低稻米中 As (砷) 的生物可给性<sup>[6]</sup>。Laird 等报道了肠道微生物对不同食物中 Hg 的生物可给性具有双重作用, 导致 Hg (汞) 在不同食物中生物可给性差异显著<sup>[7]</sup>。Alava 等研究发现肠道微生物对不同稻米中 As 的生物可给性差异显著 (精米 2%、印度香米 12%、半煮熟米 22%)<sup>[8]</sup>。农产品中的农药残留作为一类有机化合物, 经膳食摄入进入人体消化道, 在肠道菌群的作用下, 必然发生代谢与转化, 影响其生物可给性及对人体健康的风险。目前, 有关肠道菌群影响农产品中农药残留生物可给性的文献报道甚少, 值得深入开展研究。鉴于此, 作者以葡萄等 13 种农产品中常见的腐霉利为对象, 应用 SHIME (simulator of the human intestinal microbial ecosystem) 体外胃肠方法, 研究肠道菌群对不同农产品中供试农药生物可给性的影响, 以期探明影响农药残留生物可给性的主要肠道菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 农药标准品** 腐霉利 (Procymidone), 纯度 98.3%, 购于上海安谱实验科技股份有限公司。

**1.1.2 主要仪器和设备** 气相色谱串联质谱仪, Agilent 7890B-5977a, 购于美国安捷伦科技公司; 精密电子天平, AL104, 购于梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 无菌操作台, SW-CJ-1D, 购于上海博讯科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 供试农产品样品的制备** 将经残留分析确定不含供试农药的葡萄、大豆、香蕉、青椒、玉米、蟹味菇、紫薯、花生、洋葱、韭菜、柑橘、黄瓜和胡萝卜 13 种农产品, 清洗、均质后, 于  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥 72 h, 碾碎成粉末过 80 目筛。试验前, 加入适量的标准农药, 制备成添加有供试农药的农产品样品, 充分混匀, 待有机溶剂挥发后备用。

**1.2.2 肠道菌群的获取与培养** 人体粪便是目前众多学者获得肠道菌群的途径<sup>[9]</sup>。因此, 本试验采集 6 名 28 岁健康男性 (过去一年未食用过抗生素类药物) 的新鲜粪便, 用  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  灭菌 PBS (pH 7.0) 配成 20% 的粪便悬浮液, 充分混匀后用直径为 2 mm

的金属筛过滤, 除去大的食物颗粒。将获得的菌悬液用营养琼脂培养基于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下避光厌氧培养 24 h 后, 接种于 SHIME 模型的肠阶段, 每日通入氮气 15 min 以保证厌氧环境, 培养 3~4 周使肠道菌群达到稳定期后备用。通过对多组肠道菌群进行 16S rDNA 测序, 选取了肠道菌群丰度和结构差异最为显著的 A 和 B 作为供试菌群。

**1.2.3 农药残留生物可给性体外测定方法** 将 25 mL 肠液与 5 mL 培养稳定的肠道菌群悬浮液混匀, 添加 1 g 含供试农药残留的农产品样品, 迅速通入氮气 10 ~ 15 min 以保障充分厌氧环境, 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的恒温振荡仪, 模拟体外模拟胃肠消化蠕动; 分别于 2、4、8、12、16 和 24 h 定时取样, 进行农药残留量分析测定。并设置空白对照组, 在不含肠道菌群的肠液 (30 mL) 中添加相同量的含供试农药残留农产品样品。按照如下公式计算供试农药残留的生物可给性:

$$BA/\% = \frac{C_1 \times V_1}{CM} \times 100$$

式中: BA 为农产品中腐霉利在模拟肠液中的生物可给性;  $C_1$  为腐霉利在模拟肠液中的浓度,  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为模拟肠液的体积, L; C 为农产品中腐霉利的浓度,  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; M 为加入到反应体系中农产品的质量, kg。

**1.2.4 主要菌群对供试农药残留生物可给性的影响** 分别选取大肠杆菌和乳酸杆菌 2 种肠道优势菌为对象, 分别用 MRS (man rogosa sharpe) 及 LB (Luria-Bertani) 培养基以 3% 的接种量活化 3 次后, 取单一菌落接种至 50 mL 已灭菌的培养液, 厌氧培养 24 h 后备用。按 1.2.3 操作, 将其与含供试农药残留的农产品样品于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧条件下振荡温浴 4、8、12、16、24 和 36 h 后, 定时取样, 并进行农药残留量分析测定。

**1.2.5 膳食成分对肠道菌群影响农药残留生物可给性** 选取菊粉、白藜芦醇、蛋白质和植物油为代表性膳食成分, 分别将其添加到含供试肠道菌群的肠液 (30 mL) 中, 添加量为 0.1 g, 迅速通入氮气保证充分的厌氧环境, 并按照按 1.2.3 操作, 将其与含供试农药残留的农产品样品于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧条件下振荡温浴, 定时取样, 进行农药残留量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同农产品中腐霉利生物可给性的测定

葡萄等 13 种农产品中腐霉利生物可给性的测定结果表明 (图 1): 腐霉利在花生、大豆和葡萄中的

生物可给性相对较低，分别为 30.3%、31.4%和 35.6%；而在蟹味菇、辣椒和洋葱中的生物可给性较高，分别为 93.0%、94.0%和 97.2%。其在不同农产品中生物可给性的差异可能与食物膳食成分有关。

### 2.2 肠道菌群对不同农产品中腐霉利生物可给性的影响作用

选取生物可给性相对较低的葡萄、紫薯、大豆和花生为代表，研究肠道菌群对供试农产品中农药残留生物可给性影响。结果（图 2）表明，肠道菌群对 4 种农产品中腐霉利生物可给性的影响存在时间效应，相较于对照组，肠道菌群作用下的农产品生物可给性随消化时间呈降低趋势，其中以葡萄和花生最为显著，培养 24 h 后，肠道菌群可使葡萄和花生中腐霉利生物可给性在 24 h 时降低 32.2%和

46.4%。相较两组肠道菌群的影响作用，A 组肠道菌群在体外培养 8 h 内对大豆和花生中腐霉利的生物可给性影响较为明显。

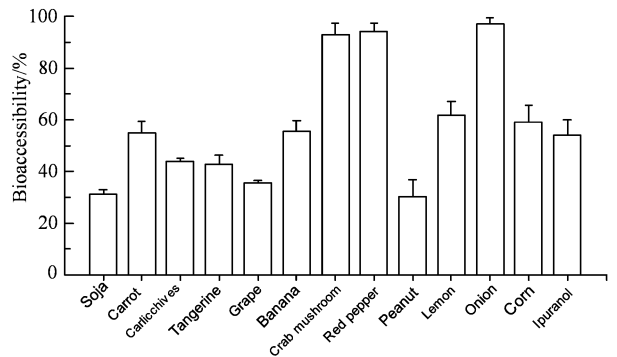


图 1 13 种农产品中腐霉利生物可给性评价

Figure 1 Bioaccessibility of procymidone in 13 kinds of agricultural products

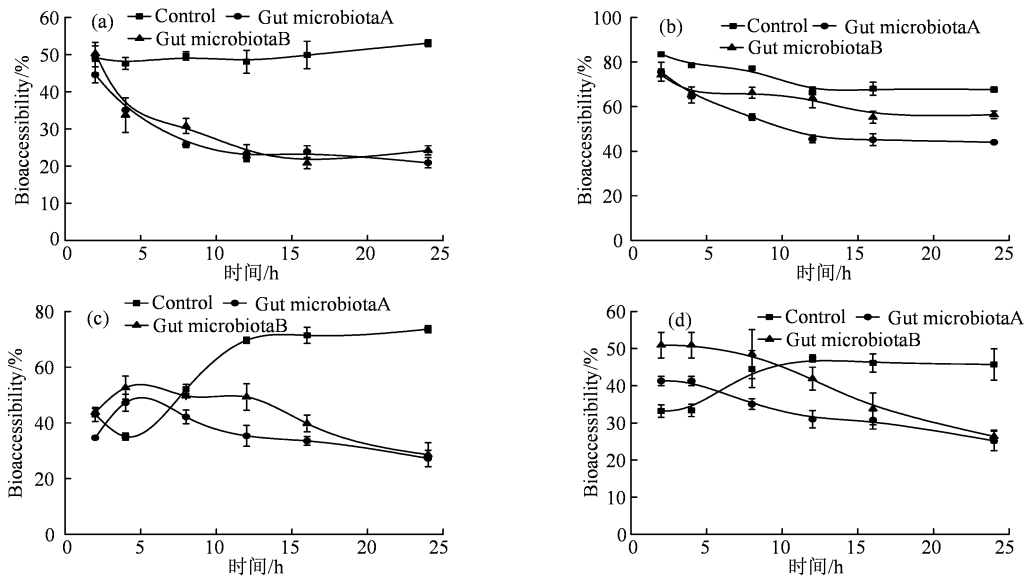


图 2 肠道菌群对葡萄 (a)、紫薯 (b)、大豆 (c) 和花生 (d) 中腐霉利的生物可给性的影响

Figure 2 Effects of gut microbiota on the bioaccessibility of procymidone in grape (a), inpuranol (b) soybean (c) and peanut (d)

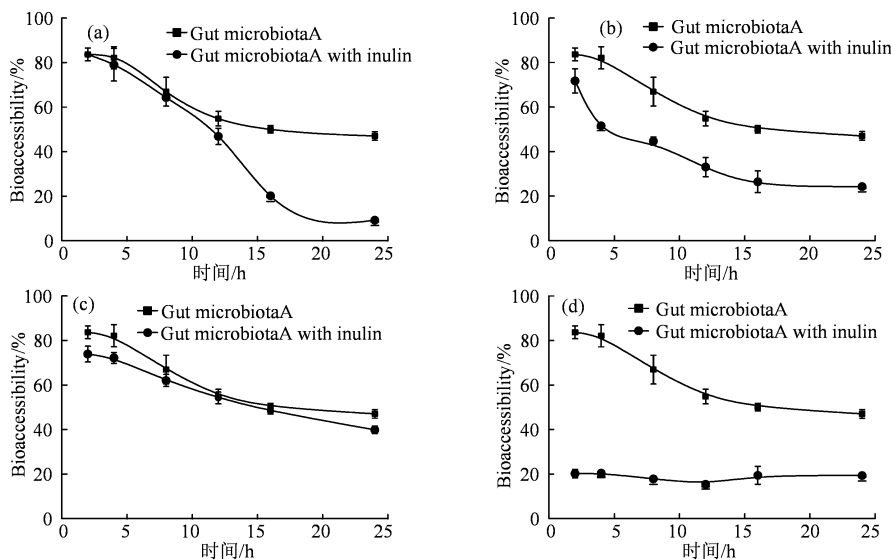


图 3 菊粉 (a)、白藜芦醇 (b)、蛋白质 (c) 和植物油 (d) 对肠道菌群影响腐霉利生物可给性的作用规律

Figure 3 Effects of inulin (a), resveratrol (b), protein (c) and vegetable oil (d) on the bioaccessibility of procymidone in gut microbiota

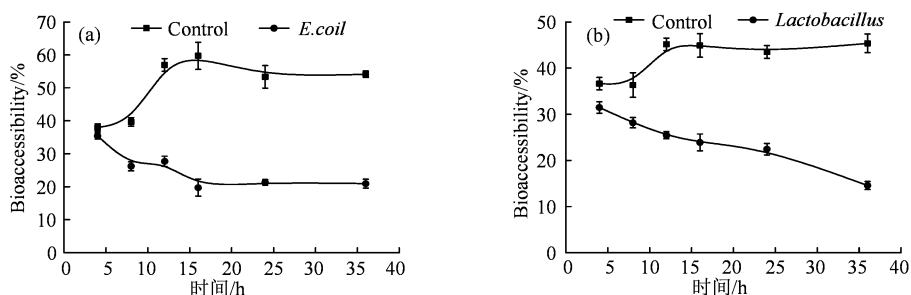


图 4 主要菌群大肠杆菌 (a) 和乳酸杆菌 (b) 对腐霉利生物可给性的作用规律

Figure 4 Effects of *Escherichia coli* (a) and *Lactobacillus* (b) on bioaccessibility of procymidone

### 2.3 膳食成分对肠道菌群影响农药残留生物可给性的作用规律

选取菊粉、白藜芦醇、蛋白质和植物油为代表性膳食成分, 研究其对肠道菌群影响供试农药残留生物可给性的作用规律。结果(图 3)表明, 蛋白质和白藜芦醇对腐霉利生物可给性影响相对较小, 相较于其他 3 种膳食成分, 菊粉可显著增强肠道菌群对葡萄中供试农药生物可给性的影响, 在其作用下可使葡萄中腐霉利生物可给性降低 37.6%。可见菊粉是影响肠道菌群降低葡萄中供试农药生物可给性的最主要的膳食成分。

### 2.4 肠道优势菌对供试水果中腐霉利生物可给性的影响

研究大肠杆菌、乳酸杆菌两种主要肠道优势菌对葡萄中腐霉利生物可给性影响作用。结果(图 4)表明, 大肠杆菌和乳酸杆菌对腐霉利均具有时间效应。消化初期 8 h 内, 主要菌群影响下的腐霉利生物可给性于对照组无明显差异; 12 h 后, 主要菌群对腐霉利生物可给性呈显著降低效果, 且于 36 h 时可使其分别降低 33.9% 和 32.0%。以上结果表明, 大肠杆菌和乳酸杆菌是影响腐霉利生物可给性的主要优势肠道菌。

## 3 讨论与结论

肠道菌群可产生水解酶、氧化还原酶、转移酶等代谢酶, 对口服药物以及黄酮类、萜类、生物碱类、蒽醌类化合物等天然产物具有强大的代谢转化能力<sup>[10-12]</sup>。近年来研究表明肠道菌群可显著影响重金属、真菌毒素以及有机污染物生物可给性。本文采用 SHIME 体外胃肠模拟法, 研究了肠道菌群对葡萄等 13 种农产品中常见的腐霉利生物可给性的影响。结果表明肠道菌群可使葡萄、大豆、紫薯和花生中的腐霉利生物可给性分别降低 32.2%、46.4%、9.9% 和 19.8%。大肠杆菌是影响腐霉利生物可给性的主要优势肠道菌, 其可使葡萄中腐霉利生

物可给性显著降低 33.9%。表明肠道菌群是影响农药残留生物可给性的重要因素。

食物基质成分的不同对环境污染生物可给性的影响具有显著差异。Cai 等发现淡水鱼和蔬菜中多氯联苯生物可给性分别为 2.0%~3.0% 和 25.0%~27.0%, 差异显著<sup>[3]</sup>。Yu 发现在体外消化模型中不同的食物对 PBDEs 生物可给性在 13 种供试食物中有不同的影响, 多溴联苯醚生物可给性差异显著 (2.6%~41.3%), 且与脂肪和碳水化合物的含量呈正相关, 蛋白质和膳食纤维的含量呈负相关<sup>[14]</sup>。本文通过膳食成分的添加, 发现在菊粉作用下可使肠道菌群对葡萄中腐霉利生物可给性显著降低 39.6%, 其主要因素可能是菊粉能够保持肠道中有益菌的数量平衡, 促进肠道益生菌的产生, 肠道微生物也可以利用其产生 SCFAs, 调节肠道 pH 值, 进而降低农药在肠道中的暴露风险。

基于肠道菌群在不同膳食营养成分的干预下, 可显著降低农药残留生物可给性, 建议人们在日常饮食中可提高对不同膳食成分的摄入。

### 参考文献:

- [1] 李安, 王北洪, 潘立刚, 等. 北京市蔬菜中农药残留现状及慢性膳食暴露评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1164-1169.
- [2] CLAEYS W L, SCHMIT J F, BRAGARD C, et al. Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption[J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 508-516.
- [3] HUR S J, LIM B O, DECKER E A, et al. In vitro human digestion models for food applications[J]. Food Chem, 2011, 125(1): 1-12.
- [4] MARCINKEVICIUS E V, SHIRASU-HIZA M M. Message in a biota: gut microbes signal to the circadian clock[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(5): 541-543.
- [5] ZIMMERMANN M, ZIMMERMANN-KOGADEEVA M, WEGMANN R, et al. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes[J]. Nature, 2019, 570(7762): 462-467.

- [6] SUN G X, VAN DE WIELE T, ALAVA P, et al. Arsenic in cooked rice: effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract[J]. *Environ Pollut*, 2012, 162: 241-246.
- [7] LAIRD B D, SHADE C, GANTNER N, et al. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration[J]. *Sci Total Environ*, 2009, 407(23): 6003-6008.
- [8] ALAVA P, TACK F, LAING G D, et al. Arsenic undergoes significant speciation changes upon incubation of contaminated rice with human colon micro biota[J]. *J Hazard Mater*, 2013, 262: 1237-1244.
- [9] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [10] FENG R, SHOU J W, ZHAO Z X, et al. Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12155.
- [11] BRAUNE A, BLAUT M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 216-234.
- [12] GUO L N, QIAO S S, HU J H, et al. Investigation of the effective components of the flowers of *Trollius chinensis* from the perspectives of intestinal bacterial transformation and intestinal absorption[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1747-1758.
- [13] CAI X L, CHEN X C, YIN N Y, et al. Estimation of the bioaccessibility and bioavailability of Fe, Mn, Cu, and Zn in Chinese vegetables using the in vitro digestion/Caco-2 cell model: the influence of gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2017, 8(12): 4592-4600.
- [14] YU Y X, LI J L, ZHANG X Y, et al. Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1): 301-308.

## 茶树生物学与资源利用国家重点实验室揭示茶树 MYB 转录因子家族调节 茶树次生代谢物合成等方面的功能多样性分子机制

茶树生物学与资源利用国家重点实验室赵剑课题组在国际期刊《植物学杂志》上发表题为《MYB 转录因子家族参与茶树次生代谢和叶片发育以及胁迫响应的分子机制》(Diverse roles of MYB transcription factors in regulating secondary metabolite biosynthesis and shoot development and stress response in tea plants (*Camellia sinensis*)) 的研究论文, 系统研究了 MYB 转录因子家族参与茶树几种特征性次生代谢物合成调控、茶树幼叶嫩茎发育及对逆境胁迫响应的调控过程的部分分子机制。

茶叶幼嫩芽叶中含有丰富多样的次生代谢产物, 然而这些种类多样且含量极高的次生代谢物的合成如何与茶树顶稍发育被协同调控目前还不清楚。茶树基因组中共鉴定到 221 个 MYB 成员, 包括 1R、2R 和 3R 三种类型。这些 MYB 基因具有明显的组织特异性表达, 可能参与调控茶树特征性化合物合成, 对茶叶风味和健康功效起重要作用。

该研究通过进化树分析, 筛选了茶树中所有可能参与调控黄酮类化合物合成的 MYB 转录因子, 结合大量转录组和代谢组数据关联分析、酵母双杂交/BiFC 实验, 拟南芥遗传互补等实验, 分析研究了候选 MYB 基因的功能。对 MYB 抑制子参与这些过程的调控也做了分析, 发现茶树的 MYB 抑制子结构和表达特征, 并对关键转录因子调控花青素和表皮毛发育进行了功能验证。胡萝卜素对茶叶的感官品质也有重要贡献。该研究通过代谢和转录组关联分析、结合同源搜索等, 重点对参与调控胡萝卜素合成的 MYB 转录因子进行了筛选和功能鉴定。该研究鉴定到一个 R2R3 MYB 转录因子 MYB110 参与调控茶树胡萝卜素合成, 并在茶树叶片和烟草叶片中对其功能进行了验证。进一步研究发现, 茶树 TT8 基因也参与了胡萝卜素合成调控, 且二者都处于茶树基因组选择消除区域, 可能受到了环境和人工选择。酵母双杂交、BiFC 以及启动子激活试验表明 MYB110、TT8、WD40 等蛋白互作, 以蛋白复合体的形式, 调控胡萝卜素代谢途径结构基因。此外, 该研究还通过生物信息学初步分析和预测了 MYB 转录因子家族参与茶树茶毫发育、根毛发育、气孔发育、次生代谢(萜类化合物、咖啡碱、茶氨酸咪唑类物质合成)、多种逆境胁迫响应过程中的可能功能。