



# 人肠道梭菌和甲烷马赛球菌协同代谢甜菜碱和胆碱产甲烷研究

田栩萍<sup>1,2</sup>, 李凌燕<sup>3,4</sup>, 李洁<sup>3,4</sup>, 高健<sup>1,2</sup>, 邓锴<sup>1,2\*</sup>, 东秀珠<sup>3,4\*</sup>

- 1 湖北医药学院生物医学工程学院, 湖北 十堰 442000
- 2 湖北医药学院附属人民医院生殖医学中心, 湖北 十堰 442000
- 3 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101
- 4 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

田栩萍, 李凌燕, 李洁, 高健, 邓锴, 东秀珠. 人肠道梭菌和甲烷马赛球菌协同代谢甜菜碱和胆碱产甲烷研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3144-3156.

TIAN Xuping, LI Lingyan, LI Jie, GAO Jian, DENG Kai, DONG Xiuzhu. *Clostridium* and *Methanomassiliicoccus* isolated from human intestine synergistically convert betaine and choline to methane[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3144-3156.

**摘要:**【目的】根据人肠道富含胆碱和甜菜碱, 同时肠道微生物组中具有裂解胆碱和还原甜菜碱产三甲胺的细菌, 以及利用三甲胺产甲烷的古菌, 本研究探讨肠道细菌与古菌协同代谢甜菜碱和胆碱产甲烷的可能性。【方法】调查不同年龄段人群粪便中的 16S rRNA 基因多样性, 分析肠道中古菌的菌群组成; 利用定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 定量甲烷马赛球菌 (*Methanomassiliicoccus*) 特异的甲醇甲基转移酶基因 *mtaB* 和甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*) 及细菌的 16S rRNA 基因拷贝数, 分析肠道中甲基营养型产甲烷古菌及总细菌的含量; 宏基因组组装基因组 (metagenome-assembled genomes, MAGs) 分析携带甜菜碱还原酶基因 *grdH* 和胆碱裂解酶基因 *cutC* 的细菌组成。从粪便中分离代谢甜菜碱及胆碱产生三甲胺的细菌, 并与分离自人肠道的甲烷马赛球菌构建共培养物, 测定其协同转化甜菜碱和胆碱产甲烷的能力。【结果】年轻人粪便中含有甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*, 82.16%) 的甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*, 49.18%) 和甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*, 33.34%)、甲基营养型的甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*, 5.67%) 的甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*, 5.70%), 以及甲烷马赛球菌科 (*Methanomassiliicoccaceae*, 3.13%) 的甲烷马赛球菌属 (*Methanomassiliicoccus*, 3.14%)。而中老年人粪便中的甲烷古菌多样性较低, 也

资助项目: 国家自然科学基金(32070061)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070061).

\*Corresponding authors. DENG Kai, Tel/Fax: +86-719-8637123, E-mail: dkeanig@163.com;

DONG Xiuzhu, Tel/Fax: +86-10-64807413, E-mail: dongxz@im.ac.cn

Received: 2022-11-27; Accepted: 2023-04-10; Published online: 2023-04-12

未检测到甲烷马赛球菌。qPCR 定量分析显示年轻人比中老年人肠道的总古菌含量高 3.11 倍, 其中甲烷马赛球菌高 6.53 倍、甲烷八叠球菌高 5.52 倍, 总细菌含量高 2.90 倍。宏基因组分析组装了 229 个细菌基因组, 其中 42 个携带基因 *grdH* 和 *cutC*, 这些细菌属于毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和梭菌科(*Clostridiaceae*)等。从粪便中分离到恶名梭菌(*Clostridium malenominatum*) B8, 菌株 B8 与卢米尼甲烷马赛球菌(*Methanomassiliicoccus luminyensis*) B10 共培养物可降解 47.03% 的甜菜碱和 25.83% 胆碱, 并产生甲烷, 在培养液中检测到三甲胺先积累后被降解。【结论】人肠道细菌恶名梭菌 B8 和卢米尼甲烷马赛球菌 B10 可协同代谢甜菜碱和胆碱产甲烷, 推测它们在人肠道中可将部分食物中的甜菜碱和胆碱代谢产生甲烷。

关键词: 人粪便; 甜菜碱; 胆碱; 三甲胺; 梭菌; 甲烷马赛球菌

## *Clostridium* and *Methanomassiliicoccus* isolated from human intestine synergistically convert betaine and choline to methane

TIAN Xuping<sup>1,2</sup>, LI Lingyan<sup>3,4</sup>, LI Jie<sup>3,4</sup>, GAO Jian<sup>1,2</sup>, DENG Kai<sup>1,2\*</sup>, DONG Xiuzhu<sup>3,4\*</sup>

1 Biomedical Engineering College, Hubei University of Medicine, Shiyuan 442000, Hubei, China

2 Reproductive Medicine Center, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyuan 442000, Hubei, China

3 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] To explore the feasibility of using *Clostridium* and *Methanomassiliicoccus* from human intestine to synergistically convert betaine and choline to methane. [Methods] Illumina sequencing of the 16S rRNA gene was performed to survey the diversity of archaea in the feces from healthy people of 20–40 years old and over 40 years old. The *Methanomassiliicoccus*-specific *mtaB* gene and *Methanomassiliicoccus*-specific 16S rRNA gene were quantitated by quantitative PCR (qPCR) to quantify the trimethylamine-utilizing methanogens in human intestine. Metagenome-assembled genomes (MAGs) were reconstructed from metagenome data for the identification of the intestinal bacteria carrying the betaine reductase gene *grdH* and choline trimethylamine-lyase gene *cutC*. The bacteria that reduced betaine and choline were isolated from feces and used to construct the coculture with *Methanomassiliicoccus*. The potential of the coculture for producing methane from betaine and choline was then determined. [Results] The main methanogenic archaea in the intestine of the 20–40 years old included *Methanobrevibacter* (49.18%) and *Methanobacterium* (33.34%) affiliating to *Methanobacteriaceae* (82.16%), *Methanosarcina* (5.70%) of *Methanosarcinaceae* (5.67%), and *Methanomassiliicoccus* (3.14%) of *Methanosassilicoccaceae* (3.13%). The methanogen diversity was lower in the feces from the people over 40 years old, from whom *Methanosassilicoccaceae* was not detected. Quantitative PCR determined that the total

abundance of archaea and bacteria in the people of 20–40 years old was 3.11 and 2.90 folds, respectively, higher than in those over 40 years old. Specifically, the abundance of *Methanomassiliicoccus* and *Methanosarcina* was 6.53 and 5.52 folds higher, respectively. A total of 229 bacterial MAGs were obtained from the fecal specimens, in which 42 MAGs carried genes *grdH* and *cutC* and were affiliated to *Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae*, and *Clostridiaceae*. *Clostridium malenominatum* B8 was isolated from the fecal specimens. The co-culture of this strain with *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 in the medium with 20 mmol/L betaine or choline degraded 47.03% betaine and 25.83% choline to produce methane, during which trimethylamine was detected as the intermediate. **[Conclusion]** The human intestinal *Clostridium* B8 and *M. luminyensis* B10 synergistically convert betaine and choline to methane. Therefore, we hypothesize that they play a role in reducing the trimethylamine in human intestine.

**Keywords:** human intestine; betaine; choline; trimethylamine; *Clostridium*; *Methanomassiliicoccus*

人肠道微生物组中包括细菌、真菌、古菌及病毒，它们通过协同代谢及其与宿主相互作用，影响人的生理和疾病易感性<sup>[1]</sup>。当正常的肠道微生物组与宿主间的平衡被破坏后可能引发多种疾病<sup>[2]</sup>，如代谢疾病、自身免疫性疾病、神经系统疾病和心血管疾病等<sup>[3]</sup>。肠道微生物代谢宿主的食物产生短链脂肪酸、次级胆汁酸和吲哚酰硫酸盐等<sup>[4]</sup>，尤其是代谢未被吸收的膳食物质，如胆碱(choline)、甜菜碱(betaine)和 L-左旋肉碱，产生三甲胺(trimethylamine, TMA)。而三甲胺可被肝脏黄素单加氧酶(flavin monooxygenase, FMO)氧化成三甲胺 N-氧化物(trimethylamine N-oxide, TMAO)<sup>[5-6]</sup>。近年的研究表明 TMAO 可引起多种疾病，包括多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)、心血管疾病、动脉粥样硬化疾病(atherosclerotic, AS)、神经系统疾病和肾脏疾病等<sup>[7-10]</sup>。已知梭菌属(*Clostridium*)、真杆菌属(*Eubacterium*)和鼠孢菌属(*Sporomusa*)的细菌可将胆碱、L-肉碱、磷脂酰胆碱和甜菜碱还原成三甲胺<sup>[11-12]</sup>；拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和链球菌属(*Streptococcus*)的细菌可还原胆碱产生三甲胺；埃希氏菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属

(*Klebsiella*)和变形杆菌属(*Proteus*)的细菌能够转化 L-肉碱为三甲胺。这些细菌分别编码甜菜碱还原基因 *grdH*、胆碱裂解酶基因 *cutC/D* 和 L-肉碱代谢的肉碱单氧合酶基因 *cntA/B*<sup>[13]</sup>。同时人肠道微生物组中也有产甲烷古菌。产甲烷古菌是唯一代谢产生大量甲烷的生物，它们只利用简单的化合物，如三甲胺、甲醇、CO<sub>2</sub>或乙酸产甲烷；分离于河口沉积物的甲烷拟球菌属(*Methanococcoides*)菌株 Q3C 和甲烷叶菌属(*Methanolobus*)菌株 B1D 也可将季胺(如甜菜碱)脱甲基产甲烷<sup>[14]</sup>。已报道的人肠道甲烷古菌有史氏甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter smithii*)和斯氏甲烷球菌(*Methanosphaera stadtmanae*)<sup>[15-16]</sup>；2012 年 Dridi 等<sup>[17]</sup>从人粪便中分离出的卢米尼甲烷马赛球菌(*Methanomassiliicoccus luminyensis*, *M. luminyensis*) B10 利用 H<sub>2</sub> 还原 TMA 产生甲烷。但肠道中是否存在直接代谢甜菜碱、胆碱和肉毒碱的产甲烷古菌目前尚未知。系统发育学上，甲烷马赛球菌属于热原体目，故被称作甲烷古菌第七目<sup>[18]</sup>。尽管分子生态学调查发现甲烷马赛球菌目(*Methanomassiliicoccales*)有 3 个簇群<sup>[19]</sup>：“Ca. *Methanomassiliicoccus alvus*”簇(主要生活在动物消化道，也被称为肠道簇)、“M.

*luminyensis*”簇和“Lake Pavin”簇(后者主要在自然环境中发现, 也被称为环境簇)。但 *M. luminyensis* B10 是目前甲烷古菌第七目中唯一获得纯培养的菌株<sup>[20]</sup>。根据卢米尼甲烷马赛球菌 B10 能够代谢三甲胺, 如将古菌用于降低人肠道的三甲胺, 则可减少 TMAO 的产生, 从而降低多种疾病的风险<sup>[21]</sup>。

前期的宏基因组分析发现人肠道中产生三甲胺的细菌与甲烷马赛球菌的丰度存在正相关<sup>[22]</sup>, 但肠道中是否具有直接代谢季胺产甲烷的甲烷古菌, 或它们是否与细菌协同代谢胆碱和甜菜碱产甲烷尚未知。本研究通过物种多样性分析, 发现年轻人粪便中的甲烷马赛球菌的相对丰度均高于中老年人群, 宏基因组分析证明肠道中存在携带代谢胆碱和甜菜碱产三甲胺基因的细菌; 并从年轻人粪便的甜菜碱富集物中分离到 1 株还原甜菜碱产三甲胺的细菌 B8, 鉴定为恶名梭菌(*Clostridium malenominatum*)。菌株 B8 和分离自人肠道的卢米尼甲烷马赛球菌 B10 的共培养物能够转化甜菜碱和胆碱产甲烷。研究表明肠道中应存在协同代谢甜菜碱和胆碱产生甲烷的细菌和古菌, 它们的代谢可能对减少 TMAO 的积累有贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本研究所用人群粪便样本: 于 2021 年 6 月采集自 20–40 岁和 40 岁以上的健康人群粪便各 12 份。样品采集后迅速装入厌氧袋内, 保藏于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.2 菌株来源

恶名梭菌(*Clostridium malenominatum*) B8 分离来自年轻人粪便。卢米尼甲烷马赛球菌(*Methanomassiliicoccus luminyensis*) B10 (DSM 25720)购自德国微生物和细胞培养物保藏中心。

### 1.3 产甲烷菌培养基

#### 1.3.1 培养基储液

(1) 溶液 I 和 II:  $0.2\text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$  和  $0.2\text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 。(2) 无机盐储液(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6,  $\text{NaCl}$  6,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2。(3) 微量元素储液(g/L):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{ZnCl}_2$  0.05,  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{AlCl}_3$  0.05,  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  饱和溶液 1 mL, 浓  $\text{HCl}$  1 mL。(4) 维生素储液(g/L): 生物素 0.002, 叶酸 0.002, 盐酸维生素  $\text{B}_6$  0.01, 盐酸维生素  $\text{B}_2$  0.005, 维生素  $\text{B}_1$  0.005, 维生素  $\text{B}_3$  0.005, 维生素  $\text{B}_{12}$  0.005, 对氨基苯甲酸 0.005, 维生素  $\text{B}_5$  0.005。(5) MTV 储液由无机盐储液、微量元素储液和维生素储液以 48:1:1 (体积比)的比例均匀混合。(6)  $242\text{ g/L Na}_2\text{S}$  储液, 微量元素储液, 维生素储液, MTV 储液均经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  孔径滤膜过滤除菌后, 抽真空充氮气除氧, 其余储液除氧后,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min。

#### 1.3.2 产甲烷菌、梭菌的纯培养和二者共培养的基础培养基(1/L)

20 mL 溶液 I, 47 mL 溶液 II, 0.25 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.25 g peptone, 0.25 g L-Cys HCl, 3.92 g  $\text{NaHCO}_3$ , 2.925 g  $\text{NaCl}$ , 3–4 滴 0.1% 刃天青溶液, 蒸馏水补至 1 L。分装后经 8 个循环的抽真空充  $\text{N}_2$  除氧。除氧后充入  $1.0\times 10^4\text{ Pa}$  的  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20, 体积比)混合气。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、20 min 灭菌, 室温储存。在甲烷菌纯培养和共培养体系接种前加入 0.1 mL/5 mL  $\text{Na}_2\text{S}$  储液和作为辅酶及辅基, 参与能量代谢的 0.15 mL/5 mL MTV 储液, 梭菌接种前加入 0.1 mL/5 mL  $\text{Na}_2\text{S}$  储液。

#### 1.3.3 抗生素储液

100 mg/mL 氨苄西林钠(ampicillin sodium)溶液和 50 mg/mL 硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate)溶液,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  孔径滤膜过滤除菌后抽真空充氮气除氧。

## 1.4 主要试剂和仪器

### 1.4.1 主要试剂及耗材

Ex *Taq* PCR 体系(TaKaRa)、Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)、2.0 mL 样品瓶套装(Agilent)、DNA marker (北京庄盟国际生物基因科技有限公司)、SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (TOYOBO)。

### 1.4.2 主要仪器

厌氧抽换气装置(实验室设计)、厌氧操作箱(Thermo Fisher)、隔水式恒温培养箱(GHP-9270)、多功能样品均质器(Precellys 24 dual)、气相色谱(ShimadzuGC-14B)、气相色谱FID (Agilent 7890A)、气密性采样针(Vici)、实时荧光定量 PCR 仪(Eppendorf)、PCR 扩增仪(Long Gene)、电泳仪 (BIO-RAD)、NanoDrop Spectrophotometer [Thermo Fisher (ND-1000)]。

## 1.5 提取基因组 DNA

称取 0.5 g 粪便, 采用多功能样品均质器和 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒, 按照说明书操作步骤提取 DNA。用 NanoDrop ND-1000 检测提取的 DNA 浓度和纯度, 存于-20 °C 待用。

## 1.6 PCR 扩增及 qPCR 定量分析

### 1.6.1 *Methanomassiliicoccus* 特异的 *mtaB* 引物设计

从 NCBI 数据库获得已知的甲烷马赛球菌

和甲烷八叠球菌的 *mtaB* 基因序列, 用 CLUSTALW 软件进行多序列比对找到甲烷马赛球菌特异和保守的 2 个 DNA 片段, 进行引物设计 (表 1)。提取 *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 和 *Methanosarcina maize* zm-15 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 并将 PCR 产物测序鉴定正确性。

### 1.6.2 绘制 16S rRNA 基因拷贝数测定的标准曲线

16S rRNA 基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收, 然后连接到 pMD19-T 载体并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性单克隆于 LB 小管培养, 经质粒小提试剂盒纯化, 用限制性酶线性化质粒作为 PCR 扩增模板。将 DNA 模板 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-8</sup> 系列稀释, 用于测定定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 定量分析标准曲线。

### 1.6.3 qPCR 扩增体系及条件

SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix 试剂总体积 25  $\mu$ L: 12.5  $\mu$ L SYBR qPCR Mix, 0.5  $\mu$ L 50 $\times$ ROX, 各 0.5  $\mu$ L 引物 F 和引物 R, 5  $\mu$ L DNA 模板, 6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。qPCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 引物 *T<sub>m</sub>* 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 执行 30 个循环。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Targeting genes	Primer name	Sequence (5'→3')	Purpose	<i>T<sub>m</sub></i> /°C
Bacterial 16S rRNA <sup>[23]</sup>	Bac-27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	PCR	48
	Bac-1492R	GGTACCTTGTTACGACTT		
Archaeal 16S rRNA <sup>[24]</sup>	Arc-F	AGGAATTGGCGGGGAGCAC	PCR	53
	Arc-R	GCCATGCACWCCTCT		
Bacterial 16S rRNA V3+V4 <sup>[25]</sup>	Bac-341F	CCTAYGGGRBGCASCAG	qPCR	55
	Bac-806R	GGACTACNNGGTATCTAAT		
Archaeal 16S rRNA V3+V4 <sup>[26]</sup>	Arch-519F	CAGCCGCCCGGTA	qPCR	55
	Arch-915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT		
<i>Methanosarcinaceae</i> 16S rRNA <sup>[24]</sup>	MSC-F	TTAGCAAGGGCCGGCAA	qPCR	55
	MSC-R	TAGCGARCATCGTTTACG		
<i>Methanomassiliicoccus mtaB</i>	MtaB-F	GCTGATGCAGAAGTACCRYGA	qPCR	55
	MtaB-R	GTADCCRATRCCGAACAGCCA		

## 1.7 古菌多样性分析

### 1.7.1 16S rRNA 基因序列测定

用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取粪便样本 DNA 后, 送上海凌恩生物科技有限公司利用二代扩增子技术进行微生物多样性测序, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDC10018328。

### 1.7.2 物种多样性分析

根据每个样本的条形码序列信息, 使用内部 Perl 脚本按照以下标准对原始 fastq 文件进行解复, 标准是: (1) 在 10 bp 滑动窗口内平均质量分数小于 20 的任何站点截断 250 bp 的读数, 丢弃短于 50 bp 的截断读数。(2) 精确的条形码匹配, 引物匹配中的 2 个核苷酸不匹配, 包含模糊字符的读数被删除。(3) 仅有重叠长度超过 10 bp 的序列才根据其重叠序列进行组装, 无法组装的读数被丢弃。对通过的序列进行去重复并进行 Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 算法(推荐 QIME2), 以识别缺失突变和替换。对成对读取执行修整和过滤, 每次读取最多有 2 个预期错误(maxEE=2)。在合并配对读取和嵌合体过滤后, 通过 RDP 分类器分析每个 16S rRNA 基因序列(本文称为 Action Script Viewer, ASV)的系统发育关系(<http://rdp.cme.msu.edu/>)使用 70% 的置信阈值对 Silva (SSU132) 16S rRNA 数据库进行比较。

## 1.8 细菌宏基因组分析

### 1.8.1 Illumina 高通量测序

用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取粪便样本 DNA, 送上海凌恩生物科技有限公司进行 Illumina 高通量测序。

### 1.8.2 宏基因组分析

首先使用 metaWRAP<sup>[27]</sup>中的 read\_qc 模块对原始数据进行过滤和质控。使用 MEGAHIT v1.1.3<sup>[28]</sup>(默认参数)进行组装并连续去除短片段(<1 000 bp)。在 MetaWRAP 的分箱模块中同时

使用 3 种分箱方法(CONCOCT v1.0.0<sup>[29]</sup>、MetaBAT2 v2.12.1<sup>[30]</sup>和 MaxBin2 v2.2.6<sup>[31]</sup>)用于获取初始宏基因组组装基因组(metagenome-assembled genomes, MAGs)。然后, 使用 metaWRAP 中的 bin\_refinement 模块将 3 个 MAGs 集合整合优化, 得到最终的 MAGs 集合。使用 GTDB Tk v1.0.2<sup>[32]</sup>(classywf 工作流, 默认参数)对 MAGs 进行物种分类注释, 使用 Prokka v1.13<sup>[33]</sup>和 KofamKOALA<sup>[34]</sup>注释蛋白功能。

## 1.9 测定培养物从三甲胺、胆碱和甜菜碱产甲烷

在 1.3.2 中的基础培养基中分别添加终浓度为 20 mmol/L 的三甲胺、胆碱和甜菜碱, 培养甲烷马赛球菌 B10、恶名梭菌 B8 和二者的共培养物。每种培养物设 3 个重复, 于 37 °C 静置培养; 每天测定培养物顶空的甲烷量, 纯培养物测定 27 d, 共培养物测定 13 d。

每天收集 200 μL 菌液离心(30 min, 4 °C)测定培养体系中三甲胺、胆碱和甜菜碱浓度, 共测定 13 d。

## 1.10 化学分析方法

### 1.10.1 气相色谱测定 CH<sub>4</sub>、H<sub>2</sub> 和 TMA

测定 CH<sub>4</sub>: 气相色谱仪 GC-4B, 色谱柱(国产 GDX-301, 2 m×4 mm, 60–80 目), 氢焰离子检测器(hydrogen flame ion detector, FID), N<sub>2</sub> 为载气。检测条件: 柱温 50 °C, 进样口温度 80 °C, 检测器温度 130 °C, 载气流量 40 μL。测定 H<sub>2</sub>: 气相色谱仪 AGILENT-8860, 色谱柱: AGILENT-8860, 操作条件: 色谱柱温度为程序升温, 60 °C 开始, 以 20 mL/min 速率保持 4.3 min, 再以 30 mL/min 速率运行 23.5 min; 进样口温度 200 °C; 参比流量 45 mL/min; 载气为 Ar<sub>2</sub>, 载气流量 2 mL/min; 进样量 1 mL, 无分流进样。测定 TMA: 气相色谱仪 7890A 色谱柱: DB-WAX 30 m×0.25 mm×0.25 μm (安捷伦); 操作条件: 色谱柱温度为程序升温, 40 °C 开始, 保持 0.5 min,

以 10 °C/min 速率从 40 °C 升到 60 °C, 以 5 °C/min 速率从 60 °C 升到 180 °C, 最后以 20 °C/min 速率从 180 °C 升到 230 °C; 进样口温度 200 °C; 载气为高纯 He (99.999%), 载气流量 1 mL/min; 进样量 2  $\mu$ L, 无分流进样。

### 1.10.2 高效液相色谱法测定甜菜碱和胆碱

Shim-pack GIS 亲水相互作用液相色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) 柱测定甜菜碱: 使用 Shim-pack GIS 亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m; ShimSen) 量化, 该柱在 30 °C 时以 1.0 mL/min 的流量下用乙腈/水 (85:15) 洗脱。使用 MCX (mixed-mode cation exchanger SPE column) 柱 (60 mg/3 mL; ShimSen) 对培养液 (200  $\mu$ L) 进行纯化, 用 0.22  $\mu$ m 尼龙离心机管过滤器 (科斯塔) 过滤, 并用 195 nm 波长的紫外线探测器进行分析。带电化学检测的反相 UltiMate 高效液相色谱法 (UHPLC-ECD, DIONEX UltiMate3000, RS Pump) 测定胆碱: 用 Hamilton 注射器手动注射。流动相 (pH 4.0) 由 90 mmol/L 磷酸二氢钠二水合物, 50 mmol/L 柠檬酸一水合物, 1.7 mmol/L 烷基磺酸盐, 50  $\mu$ mol/L 乙二胺四乙酸, 2 mmol/L 氯化钠和 8% 乙腈。检测器 (Thermo Scientific Ultimate

3000RS 电化学检测器, 带 6041RS 超安培电池 (6 070.3)、高效玻碳电极 (6 070.2)、6041RS 传感器和 Pd 参比电极) 设置为 150 mV 和柱 (Acclaim™ 120, C<sub>18</sub> 3 m 120 Å, 2.1 mm $\times$ 150 mm) 置于 8 °C。通过将其保留时间与真实参考化合物的保留时间进行比较来鉴定化合物。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同年龄段人群粪便中的古菌组成

对年轻人和中老年人粪便 16S rRNA 基因扩增子序列分析, 共注释到 1 482 个古菌的 ASV, 序列同源性分析鉴定为 7 门 12 纲 17 目 23 科 29 属的古菌。图 1 显示年轻人粪便中丰度较高的产甲烷古菌, 包括甲烷杆菌科 (*Methanobacteriaceae*, 82.16%) 的甲烷短杆菌属 (*Methanobrevibacter*, 49.18%) 和甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*, 33.34%)、甲烷八叠球菌科 (*Methanosarcinaceae*, 5.67%) 的甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*, 5.70%)、甲烷马赛球菌科 (*Methanomassiliococcaceae*, 3.13%) 的甲烷马赛球菌属 (*Methanomassiliococcus*, 3.14%) 和甲烷鬃菌科 (*Methanosaetaceae*, 1.94%)。而中老年人粪便中

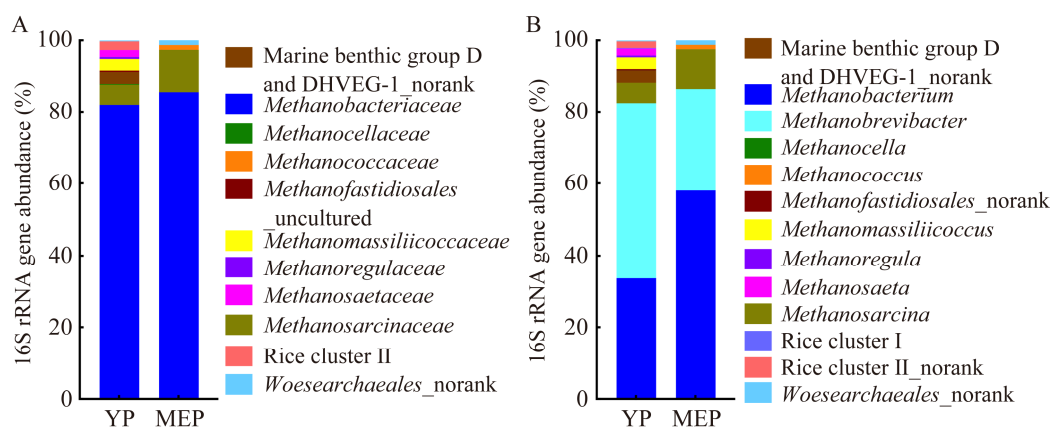


图 1 不同年龄段人群粪便中产甲烷古菌的组成

Figure 1 Composition of methanogenic archaea in feces from different aged people populations. A: Composition of methanogenic archaea family. B: Composition of methanogenic archaea genera. YP: Young people aged between 20 and 40 years; MEP: Middle-elder people aged over 40 years.

的优势产甲烷古菌是甲烷杆菌科(85.52%)的甲烷短杆菌属(28.39%)、甲烷杆菌属(58.02%)和甲烷八叠球菌科(11.84%)的甲烷八叠球菌属(11.11%)。与年轻人相比,中老年人粪便中的甲烷古菌物种多样性较低;尽管两类人群粪便中均含有优势的  $H_2$  还原  $CO_2$  的甲烷短杆菌属和甲烷杆菌属,年轻人粪便中的甲基营养型产甲烷菌包括甲烷八叠球菌属和甲烷马赛球菌属,而中老年人粪便中无甲烷马赛球菌属。甲烷八叠球菌属和甲烷马赛球菌属的古菌均能从三甲胺产甲烷,但未报道它们利用甜菜碱或胆碱产甲烷,可能需要细菌的协同代谢。

## 2.2 不同年龄段人群粪便中古菌、甲基产甲烷古菌和细菌的含量

采用 qPCR 定量不同年龄段人群粪便中总古菌、从三甲胺产甲烷的甲烷八叠球菌特异的 16S rRNA 基因拷贝数和利用  $H_2$  还原甲基物质产甲烷的甲烷马赛球菌特异的甲醇转甲基酶基因 *mtaB* 拷贝数,从而分析不同年龄段人群肠道中从甲基物质产甲烷的古菌含量。图 2A 显示年轻人粪便中总古菌的 16S rRNA 基因拷贝数的中位值是 1 878.4 拷贝/g,是中老年人(602.7 拷贝/g)的 3.11 倍( $P<0.01$ );年轻人粪便中的甲烷马赛球菌甲醇转甲基酶的基因 *mtaB* (771.6 拷贝/g)含量是中老年人的 *mtaB* (118.16 拷贝/g)的 6.53 倍

( $P<0.01$ ) (图 2B), 甲烷八叠球菌的 16S rRNA 基因含量(615.86 拷贝/g)比中老年人的(111.53 拷贝/g)高 5.52 倍( $P<0.01$ ) (图 2C)。因而推测随着年龄增长,肠道中总古菌含量减少,随之代谢三甲胺产甲烷的古菌含量也降低。qPCR 定量分析发现,年轻人粪便中总细菌的 16S rRNA 基因拷贝数(中位值  $1.19\times 10^9$  拷贝/g)是中老年人(中位值  $3.99\times 10^8$  拷贝/g)的 2.90 倍( $P<0.05$ ) (图 2D)。

## 2.3 宏基因组分析不同年龄段人群粪便代谢甜菜碱和胆碱产三甲胺的细菌组成

为了解不同年龄段人群中代谢甜菜碱和胆碱产生三甲胺细菌的组成,本研究分析了各 12 个年轻人和中老年人粪便样本的宏基因组。宏基因组分析组装了 299 个完整度大于 50%、污染率低于 10%的细菌基因组(MAG),其中 33 个 MAG 含胆碱裂解酶编码基因 *cutC*、9 个 MAG 含甜菜碱还原酶的编码基因 *grdH* (表 2)。这些细菌分别属于毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、颤螺旋菌科(*Oscillospiraceae*)、脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)、双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)和瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)等。除小杆菌属(*Dialister*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)外,这些细菌均携带氢酶基因,说明它们可能发酵产生

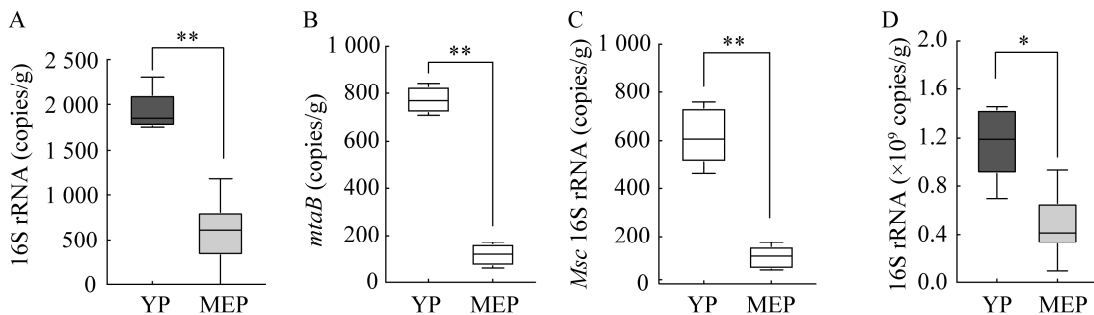


图 2 不同年龄段人群粪便中的基因含量

Figure 2 Gene content in feces from different aged people populations. A: Total archaea 16S rRNA gene copies. B: *Methanomassiliicoccus mtaB* gene copies. C: *Methanosarcina* 16S rRNA gene copies. D: Total bacterial 16S rRNA gene copies. YP: Young people aged between 20 and 40 years; MEP: Middle-elder people over 40 years. Triplicate experiments were performed (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ).



表 2 宏基因组学分析年轻人及中老年人粪便中含有 *cutC* 及 *grdH* 的细菌组成Table 2 Metagenomic analysis of the bacteria containing *cutC* and *grdH* in the feces of young and middle-aged and elderly people

Bin	Completeness (%)	Contamination (%)	Gene	Family	Genus
YPbin.66	98.10	0.299	<i>cutC</i>	<i>Megasphaeraceae</i>	<i>Caecibacter</i>
YPbin.76	97.63	0.613	<i>cutC</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>
YPbin.135	94.58	2.721	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	AM51-8
YPbin.99	91.79	0.953	<i>cutC</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Bilophila</i>
YPbin.153	91.53	0.269	<i>cutC</i>	<i>Eggerthellaceae</i>	CAG-1427
YPbin.80	91.34	1.182	<i>cutC</i>	<i>Anaerovoracaceae</i>	<i>Copromorpha</i>
YPbin.126	91.15	0.671	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Enterocloster</i>
YPbin.18	90.70	1.677	<i>cutC</i>	<i>Anaerotignaceae</i>	<i>Anaerotignum</i>
YPbin.10	88.92	0.449	<i>cutC</i>	<i>Megasphaeraceae</i>	<i>Megasphaera</i>
YPbin.83	83.22	0.671	<i>cutC</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Evtapia</i>
YPbin.112	82.01	2.680	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	CAG-317
YPbin.91	77.75	3.154	<i>cutC</i>	<i>Butyricicoccaceae</i>	<i>Pseudobutyricococcus</i>
YPbin.107	72.63	0	<i>cutC</i>	<i>Anaerotignaceae</i>	<i>Anaerotignum</i>
YPbin.77	70.19	3.448	<i>cutC</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	CAG-103
YPbin.94	63.00	1.099	<i>cutC</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Oxalobacter</i>
YPbin.100	62.28	3.508	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Agathobacter</i>
YPbin.130	51.46	8.771	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Choladousia</i>
MEPbin.76	99.05	0	<i>cutC</i>	<i>Coprobacillaceae</i>	<i>Erysipelatoclostridium</i>
MEPbin.99	95.63	0.223	<i>cutC</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus C</i>
MEPbin.33	90.50	0.632	<i>cutC</i>	<i>Selenomonadaceae</i>	<i>Megamonas</i>
MEPbin.112	89.29	0.146	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium Q</i>
MEPbin.66	85.28	1.342	<i>cutC</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Faecousia</i>
MEPbin.135	82.24	5.172	<i>cutC</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
MEPbin.91	78.71	6.721	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnoclostridium B</i>
MEPbin.10	78.10	2.071	<i>cutC</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>
MEPbin.77	78.02	1.649	<i>cutC</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Peptococcus</i>
MEPbin.94	77.58	0	<i>cutC</i>	<i>Anaerovoracaceae</i>	<i>Copromorpha</i>
MEPbin.126	70.68	0	<i>cutC</i>	<i>Dialisteraceae</i>	<i>Dialister</i>
MEPbin.153	62.69	5.422	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Enterocloster</i>
MEPbin.100	61.40	5.263	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Eubacterium</i>
MEPbin.107	60.02	0	<i>cutC</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
MEPbin.130	56.80	9.340	<i>cutC</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>
MEPbin.18	55.26	1.754	<i>cutC</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Agathobacter</i>
YPbin.118	97.17	0.671	<i>grdH</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Negativibacillus</i>
YPbin.81	93.73	1.342	<i>grdH</i>	CAG-274	CAG-274
YPbin.34	83.06	1.644	<i>grdH</i>	<i>Acutalibacteraceae</i>	<i>Clostridium A</i>
YPbin.98	81.04	1.461	<i>grdH</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Sellimonas</i>
MEPbin.118	98.30	0	<i>grdH</i>	<i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	<i>Pyramidobacter</i>
MEPbin.34	97.17	0.116	<i>grdH</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium AP</i>
MEPbin.98	96.17	1.948	<i>grdH</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	RUG115
MEPbin.81	95.26	0.659	<i>grdH</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Enterocloster</i>
MEPbin.113	77.38	1.724	<i>grdH</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus A</i>

氢气。确实分别在甜菜碱和胆碱的粪便富集物的顶空测到微量氢气 $[(0.06\pm 0.01)$  mmol 和  $(0.05\pm 0.01)$  mmol]。宏基因组分析表明肠道中存在可能代谢胆碱及甜菜碱产生三甲胺的细菌。由于具有代谢甜菜碱和胆碱产三甲胺的细菌种类多,无法设计物种特异的甜菜碱还原酶编码基因 *grdH* 和胆碱裂解酶编码基因 *cutC* 扩增引物,因此无法定量肠道中这些细菌的丰度。

## 2.4 从人粪便中分离到利用甜菜碱和胆碱生长的细菌-恶名梭菌 B8

将 0.5 g 年轻人和中老年人的粪便,在厌氧箱中分别接种到以 20 mmol/L 的甜菜碱和 20 mmol/L 的胆碱为唯一碳源的基础培养基中,37 °C 培养 7 d 后传代;然后在含相应碳源的固体培养基上滚管分离,挑取数个单菌落。分析分离株的 16S rRNA 与恶名梭菌(*Clostridium malenominatum*) ATCC 25776 的 16S rRNA 基因同源率为 99%,因而将分离菌株鉴定为恶名梭菌,菌株编号为 B8。

梭菌 B8 在无甲基化合物的蛋白胨-酵母粉的基础培养基、和添加 20 mmol/L 三甲胺中可生长至  $OD_{600}$  为 0.25,而在添加 20 mmol/L 甜菜碱和胆碱的培养液中可生长  $OD_{600}$  至 0.32 和 0.30。说明甜菜碱和胆碱可微弱促进、但三甲胺不能促进梭菌 B8 的生长。另外,在上述培养物的顶空中测到约 0.03 mmol  $H_2$ ,表明梭菌 B8 代谢产生  $H_2$ 。

## 2.5 恶名梭菌 B8 与甲烷马赛球菌协同代谢甜菜碱和胆碱产甲烷

为了分析梭菌 B8 能否将甜菜碱和胆碱转化为三甲胺,并进一步被甲烷古菌转化为甲烷,本研究构建梭菌 B8 与卢米尼甲烷马赛球菌 B10 的厌氧共培养物,培养物分别以胆碱和甜菜碱为唯一碳源,并以梭菌 B8 和卢米尼甲烷马赛球菌 B10 的纯培养物为对照。上述培养物在 37 °C 培养 27 d,每天测定培养物顶空中的甲烷、甜菜碱、胆碱和三甲胺的浓度。结果发现梭菌 B8 虽然能以甜菜碱和胆碱为唯一有机碳源生长,但不产甲烷(图 3A);

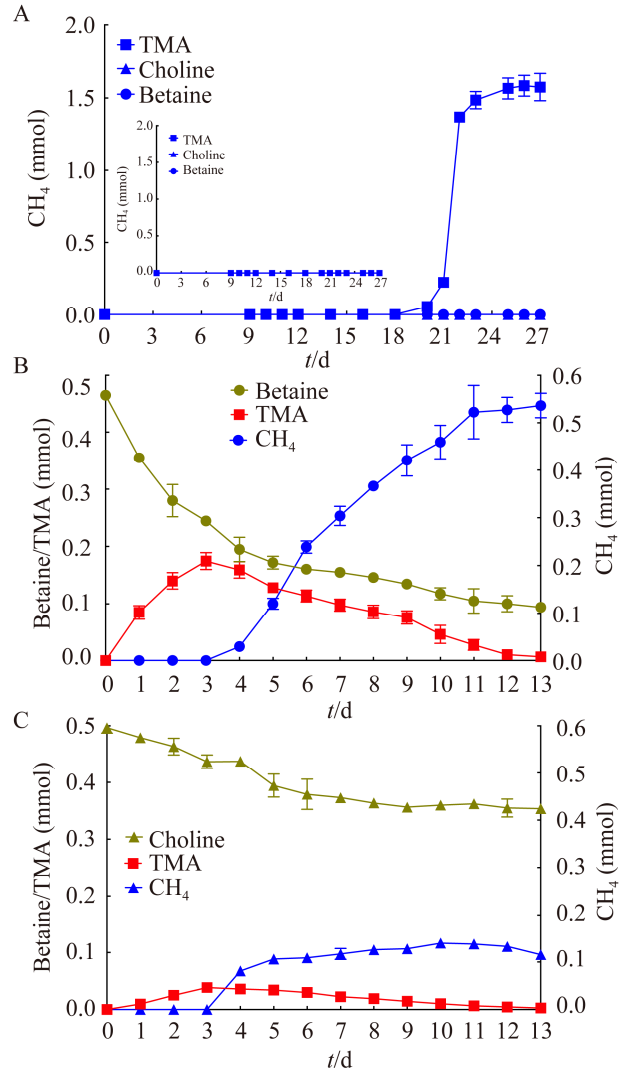


图3 甲烷马赛球菌 B10 和恶名梭菌 B8 的纯培养物及两株菌的共培养物从甜菜碱和胆碱产甲烷

Figure 3 Methanogenesis by the monocultures of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and *Clostridium malenominatum*, and the co-culture of two strains from betaine and choline. A: *M. luminyensis* B10 and *C. malenominatum* B8 (insert) were respectively grown in 20 mmol/L of trimethylamine plus 0.2 MPa hydrogen (TMA+ $H_2$ ), betaine or choline at 37 °C, methane production was monitored during culturing. B and C: Each 10% *M. luminyensis* and *C. malenominatum* was inoculated into the basal medium containing 20 mmol/L of betaine (B) and choline (C). The cocultures were grown at 37 °C, trimethylamine (TMA), betaine and choline were determined during culturing. Triplicated cultures were assayed for each type of cultures, averages and standard deviations are shown.

卢米尼甲烷马赛球菌 B10 只能在三甲胺培养基中产甲烷, 在甜菜碱和胆碱的培养基中既不生长也不产甲烷(图 3A); 只有两株菌的共培养物能够在甜菜碱(图 3B)和胆碱培养基中产甲烷(图 3C), 产甲烷速率分别为 0.10 mmol CH<sub>4</sub>/d 和 0.05 mmol CH<sub>4</sub>/d; 共培养物中 47.03%甜菜碱和 25.83%胆碱被降解, 甜菜碱降解量与产甲烷量的比例为 0.70, 胆碱降解量与产甲烷量的比例为 1.15, 并检测到三甲胺先积累后被降解。该实验证明梭菌 B8 可将甜菜碱和胆碱转化为三甲胺, 而甲烷马赛球菌可利用梭菌产生的 H<sub>2</sub> 还原三甲胺产生甲烷。

### 3 讨论与结论

本研究发现年轻人群粪便中存在氢营养型的产甲烷古菌(甲烷短杆菌属和甲烷杆菌属)、甲基营养型的甲烷八叠球菌属和甲烷马赛球菌属和乙酸营养型的甲烷鬃菌科; 而中老年人粪便中无甲烷马赛球菌属和甲烷鬃菌科, 因此推测随着年龄增长, 肠道中总古菌含量有可能减少, 随之代谢三甲胺产甲烷的古菌含量也降低。qPCR 定量分析也发现中老年人肠道总古菌和细菌量也降低, 古菌、尤其是代谢三甲胺的甲烷八叠球菌和甲烷马赛球菌含量显著降低。文献报道肠道中甲烷马赛球菌代谢谱虽没有甲烷八叠球菌广<sup>[35]</sup>, 只利用氢还原甲基产甲烷, 但其对甲基物质的亲和力远高于甲烷八叠球菌<sup>[36]</sup>, 因此推测肠道中氢还原甲基物质产甲烷的甲烷马赛球菌 (*Methanomassiliicoccus*) 比甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*) 对消除三甲胺更重要。因未检测到潜在的可直接代谢胆碱及甜菜碱产生甲烷的产甲烷古菌, 本研究通过宏基因组分析发现两类人群中均存在潜在的代谢胆碱和甜菜碱产生三甲胺的细菌, 如毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 和梭菌科 (*Clostridiaceae*) 等细菌。由于能够转化甜

菜碱和胆碱产三甲胺的细菌种类很多, 无法定量分析物种特异的甜菜碱还原酶编码基因 *grdH* 和胆碱裂解酶编码基因 *cutC*, 不能定量肠道中这些细菌的丰度。从年轻人粪便中分离到一株代谢甜菜碱和胆碱产生三甲胺的梭菌-恶名梭菌 B8, 将其与从人肠道分离的卢米尼甲烷马赛球菌 B10 共培养, 发现共培养物可将甜菜碱和胆碱转化产生甲烷。这说明肠道细菌与古菌的协同代谢有可能降解食物代谢产生的三甲胺, 从而降低与动脉粥样硬化相关的 TMAO 积累。

已知史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*) 和斯氏甲烷球菌 (*Methanosphaera stadtmanae*) 是人类肠道中优势的古菌<sup>[15-16]</sup>, 前者以 H<sub>2</sub> 或甲酸盐还原 CO<sub>2</sub> 产甲烷, 后者以 H<sub>2</sub> 还原甲醇或三甲胺产甲烷。最近从人肠道中分离的甲烷马赛球菌同样利用 H<sub>2</sub> 还原甲胺和三甲胺产甲烷<sup>[17]</sup>。微生物组分析显示人肠道中的甲烷马赛球菌与产生三甲胺的细菌的含量呈正相关<sup>[22]</sup>, 包括从健康人粪便中分离到的转化胆碱产生三甲胺的肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[37]</sup> 和从动物粪便中分离的将 L-肉碱转化为三甲胺的 *Emergencia timonensi*<sup>[38]</sup>。也有文献报道哺乳动物肠道中富含携带代谢甜菜碱和胆碱的关键基因 *grdH* 和 *cutC* 的厚壁菌门细菌<sup>[39]</sup>。本研究从年轻人粪便中分离的恶名梭菌 B8 属于厚壁菌门, 能够代谢甜菜碱和胆碱产生三甲胺, 而且与同样分离自人肠道的卢米尼甲烷马赛球菌 B10 协同代谢甜菜碱和胆碱产生甲烷。尽管本工作未分离到报道的其他的转化胆碱和 L-肉碱产三甲胺细菌以及与甲烷古菌的协同代谢作用, 但根据卢米尼甲烷马赛球菌 B10 能将细菌代谢产生的三甲胺转化为甲烷, 及近年来提出的“古菌益生菌”理念, 提示以古菌为益生菌用于预防动脉粥样硬化具有一定的可行性。

## 参考文献

- [1] LOZUPONE CA, STOMBAUGH JI, GORDON JI, JANSSON JK, KNIGHT R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota[J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 220-230.
- [2] LUPTON JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy[J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(2): 479-482.
- [3] DURACK J, LYNCH SV. The gut microbiome: relationships with disease and opportunities for therapy[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(1): 20-40.
- [4] JIN MC, QIAN ZY, YIN JY, XU WT, ZHOU X. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(4): 2343-2350.
- [5] DIN AU, HASSAN A, ZHU Y, YIN TY, GREGERSEN H, Wang GX. Amelioration of TMAO through probiotics and its potential role in atherosclerosis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(23-24): 9217-9228.
- [6] LI XS, WANG Z, CAJKA T, BUFFA JA, NEMET I, HURD A, GU XD, SKYE SM, ROBERTS AB, WU YP, LI L, SHAHEN CJ, WAGNER MA, HARTIALA JA, KERBY RL, ROMANO KA, HAN Y, OBEID S, LÜSCHER TF, ALLAYEE H, et al. Untargeted metabolomics identifies trimethyllysine, a TMAO-producing nutrient precursor, as a predictor of incident cardiovascular disease risk[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(6): e99096.
- [7] WANG SZ, YU YJ, ADELI K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 527.
- [8] HUANG JY, LIU L, CHEN CY, GAO Y. PCOS without hyperandrogenism is associated with higher plasma trimethylamine N-oxide levels[J]. *BMC Endocrine Disorders*, 2020, 20(1): 3.
- [9] YANG SJ, LI XY, YANG F, ZHAO R, PAN XD, LIANG JQ, TIAN L, LI XY, LIU LT, XING YW, WU M. Gut microbiota-dependent marker TMAO in promoting cardiovascular disease: inflammation mechanism, clinical prognostic, and potential as a therapeutic target[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1360.
- [10] YE ZX, CHEN LL, ZENG XC, FANG Q, ZHENG BJ, LUO CY, RAO T, OUYANG DS. TMAO as a potential biomarker and therapeutic target for chronic kidney disease: a review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 929262.
- [11] CAI YY, HUANG FQ, LAO XZ, LU YW, GAO XJ, ALOLGA RN, YIN KP, ZHOU XC, WANG Y, LIU BL, SHANG J, QI LW, LI J. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trimethylamine-producing *Lachnoclostridium* in promoting atherosclerosis[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2022, 8: 11.
- [12] RATH S, HEIDRICH B, PIEPER DH, VITAL M. Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 54.
- [13] FENNEMA D, PHILLIPS IR, SHEPHARD EA. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3(FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2016, 44(11): 1839-1850.
- [14] TICAK T, HARIRAJU D, ARCELAY MB, ARIVETT BA, FIESTER SE, FERGUSON DJ. Isolation and characterization of a tetramethylammonium-degrading *Methanococcoides* strain and a novel glycine betaine-utilizing *Methanobolus* strain[J]. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(2): 197-209.
- [15] BORREL G, BRUGÈRE JF, GRIBALDO S, SCHMITZ RA, MOISSE-EICHLINGER C. The host-associated archaeome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 622-636.
- [16] MOISSE-EICHLINGER C, PAUSAN M, TAFFNER J, BERG G, BANG C, SCHMITZ RA. Archaea are interactive components of complex microbiomes[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(1): 70-85.
- [17] DRIDI B, FARDEAU ML, OLLIVIER B, RAOULT D, DRANCOURT M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 8): 1902-1907.
- [18] MIHAJLOVSKI A, ALRIC M, BRUGÈRE JF. A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene[J]. *Research in Microbiology*, 2008, 159(7-8): 516-521.
- [19] GACI N, BORREL G, TOTTEY W, O'TOOLE PW, BRUGÈRE JF. Archaea and the human gut: new beginning of an old story[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(43): 16062-16078.
- [20] BECKER KW, ELLING FJ, YOSHINAGA MY, SÖLLINGER A, URICH T, HINRICHS KU. Unusual butane- and pentanetriol-based tetraether lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*, a representative

- of the seventh order of methanogens[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(15): 4505-4516.
- [21] FADHLAOUI K, ARNAL ME, MARTINEAU M, CAMPONOVA P, OLLIVIER B, O'TOOLE PW, BRUGÈRE JF. Archaea, specific genetic traits, and development of improved bacterial live biotherapeutic products: another face of next-generation probiotics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4705-4716.
- [22] de la CUESTA-ZULUAGA J, SPECTOR TD, YOUNGBLUT ND, LEY RE. Genomic insights into adaptations of trimethylamine-utilizing methanogens to diverse habitats, including the human gut[J]. *mSystems*, 2021, 6(1): e00939-e00920.
- [23] MORENO C, ROMERO J, ESPEJO RT. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2002, 148(Pt 4): 1233-1239.
- [24] YU Y, LEE C, KIM J, HWANG S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(6): 670-679.
- [25] PARULEKAR NN, KOLEKAR P, JENKINS A, KLEIVEN S, UTKILEN H, JOHANSEN A, SAWANT S, KULKARNI-KALE U, KALE MH, SÆBØ M. Characterization of bacterial community associated with phytoplankton bloom in a eutrophic lake in south Norway using 16S rRNA gene amplicon sequence analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173408.
- [26] COOLEN MJL, HOPMANS EC, WIC R, MUYZER G, SCHOUTEN S, VOLKMAN JK. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change[J]. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(10): 1151-1167.
- [27] URITSKIY GV, DIRUGGIERO J, TAYLOR J. MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 158.
- [28] LI D, LIU CM, LUO R, SADAKANE K, LAM TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly *via* succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [29] ALNEBERG J, BJARNASON BS, de BRUIJN I, SCHIRMER M, QUICK J, IJAZ UZ, LAHTI L, LOMAN NJ, Andersson AF. Binning metagenomic contigs by coverage and composition[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(11): 1144-1146.
- [30] KANG DD, FROULA J, EGAN R, WANG Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1165.
- [31] WU YW, SIMMONS BA, SINGER SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(4): 605-607.
- [32] PARKS DH, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL PA, RINKE C, MUSSIG AJ, HUGENHOLTZ PA. A complete domain-to-species taxonomy for bacteria and archaea[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(9): 1079-1086.
- [33] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [34] ARAMAKI T, BLANC-MATHIEU R, ENDO H, OHKUBO K, KANEHISA M, GOTO S, OGATA H. KofamKOALA: KEGG ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(7): 2251-2252.
- [35] THAUER RK, KASTER AK, SEEDORF H, BUCKEL W, HEDDERICH R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 579-591.
- [36] SPRENGER WW, HACKSTEIN JHP, KELTJENS JT. The competitive success of *Methanomicrococcus blatticola*, a dominant methylotrophic methanogen in the cockroach hindgut, is supported by high substrate affinities and favorable thermodynamics[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(2): 266-275.
- [37] HENG X, LIU WG, CHU WH. Identification of choline-degrading bacteria from healthy human feces and used for screening of trimethylamine (TMA)-lyase inhibitors[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 152: 104658.
- [38] KOETH RA, LAM-GALVEZ BR, KIRSOP J, WANG ZN, LEVISON BS, GU XD, COPELAND MF, BARTLETT D, CODY DB, DAI HJ, CULLEY MK, LI XS, FU XM, WU YP, LI L, DIDONATO JA, TANG WHW, GARCIA-GARCIA JC, HAZEN SL. L-carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(1): 373-387.
- [39] RATH S, RUD T, PIEPER DH, VITAL M. Potential TMA-producing bacteria are ubiquitously found in Mammalia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2966.