

深海热液区化能自养菌 *Caminiobacter profundus* 氢酶对环境因子的响应特点*

何培青¹ 岳文娟^{1,2} 黄晓航¹

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061;

2. 山东轻工业学院食品与生物工程学院 山东省微生物工程重点实验室 济南 250353)

提要 以深海热液区化能自养菌 *Caminiobacter profundus* 为对象, 采用扫描电镜和化学能谱分析, 研究了菌株表面形态和矿物元素沉积; 同时研究了菌株生长、甲基紫精(MV)还原的氢酶活性及膜结合的类型 I NiFe 氢酶基因(*hynL*)表达对盐度、pH 和温度几种环境因子变化的响应特点。结果表明, 菌株表面被 Si、Ca、S 和 Fe 等多种元素组成的矿物质层所包裹。不同条件下, 菌株生长、MV 还原的氢酶活性和 *hynL* 的表达趋势相一致, 其最适条件为盐度 30、pH 5.5 和 55℃ 培养温度。研究结果表明, 在环境改变时, *C. profundus* 通过调控 *hynL* 的表达, 以调整菌株的能量代谢, 维系菌株的生长繁殖。

关键词 深海热液区, 化能自养菌, *Caminiobacter profundus*, 氢酶, 环境因子

中图分类号 Q935

化能自养的氢细菌在深海热液区广泛分布, 是该生态系统的初级生产者, 在深海地球化学的物质与能量循环中起着重要的作用(Takai *et al*, 2005a)。这类氢细菌通过氢酶氧化热液流中喷发的 H₂ 获取能量, 将 CO₂ 转化为简单的有机质, 供自身及其它生物的生存需要。氢酶能可逆地催化 H₂ 的产生及 H₂ 的氧化: $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ 。氢酶分为 NiFe 氢酶、Fe 氢酶和无铁硫簇的氢酶等多种类型(Vignais *et al*, 2004)。其中类型 I NiFe 氢酶通常与膜结合, 由 HynS 和 HynL 两个催化亚基组成, 能催化 H₂ 氧化产生质子, 通过形成跨胞质膜的质子梯度参与能量的生成; 产生的电子在膜结合的电子载体中传递, 最终参与 ATP 的生成(Zbell *et al*, 2007)。

深海热液区是一个物理和化学环境急剧变化的区域, 该处栖息的微生物经历了高温热液流和低温冷海水混合时的物理及化学因素的大幅变化(Lowell *et al*, 1995; Luther *et al*, 2001)。McCollom(2000)采用热力学模式计算出深海热液区化能自养菌的初级生

产受到热液流中的 Fe、S 和 H₂ 等营养底物的制约。实验室前期的研究结果进一步阐明 H₂ 通过调控化能自养的氢细菌 *Caminiobacter profundus* 类型 I NiFe 氢酶的基因表达, 来影响菌株的生长和繁殖(岳文娟等, 2011), 这说明热液区氢细菌在物质能量代谢过程中可以感知, 适应并应对外界环境信号的变化。除了 H₂ 外, 氢细菌还经历了盐度、pH 值和温度等环境因子的急剧变化, 氢酶对这些因子变化的响应, 不仅制约着氢细菌自身的新陈代谢, 还将最终影响热液区生态系统的物质和能量转换过程, 目前该方面的研究在国内外尚未见报道。

Caminiobacter profundus strain DSMZ 15016 为源于大西洋中脊热液区, 中度嗜热的化能自养的氢细菌。与化能自养菌和光合细菌普遍采用卡尔文循环固定 CO₂ 不同(Shively *et al*, 2001; 杜翠红等, 2010), 该菌株采用还原性三羧酸循环固定 CO₂, 并以 H₂ 为唯一电子供体, 在以单质硫为电子受体时生成 H₂S (Miroshnichenko *et al*, 2004; Voordeckers *et al*, 2008)。

* 中国大洋矿产资源研究开发协会资助项目, DYXM-115-02-2-19 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目, 2011T04 号。何培青, 博士, 副研究员, E-mail: hepeiqing@126.com

通讯作者: 黄晓航, 研究员, 博士生导师, E-mail: xiaohanghuang@fio.org.cn

收稿日期: 2010-11-02, 收修改稿日期: 2011-04-19

本文通过扫描电镜及能谱分析,分析其菌体形态及矿物元素沉积;同时分析研究了菌株生长、甲基紫精还原的氢酶活性和类型 I NiFe 氢酶大亚基基因(*hynL*)的表达对盐度、pH 值和温度几种环境因子的响应特点及相互关系。本研究将为揭示深海热液区化能自养的氢细菌的物质能量代谢与环境因子的相互关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *Caminibacter profundus* strain DSMZ 15016, 源自德国微生物菌种保藏中心 DSMZ。培养基为德国微生物菌种保藏中心 DSMZ 提供的 DSMZ829 培养基 (http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium829.pdf, 2007), 其主要组成包括: 海盐 (Sigma Chemical Co.) 30g, NH_4Cl 1g, NH_2PO_4 0.35g, 2-N-吗啉乙烷磺酸(MES) 1.95g, 刃天青 0.5mg, NaHCO_3 1g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 20mg, 微量元素 SL-10 1ml, 维生素 1ml, 生长因子 1ml, H_2O 1000ml。

1.2 菌株培养

100ml Hungate-type 型厌氧瓶中加入 0.25g 升华硫, 间歇灭菌后加入 25ml 829 培养液, 厌氧瓶的气体空间充以 $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ (40 : 10 : 50, 200kPa)混合气体, 菌株接种量为 10% (V/V)。以盐度 30, 培养基终 pH 6.1, 培养温度 45°C 为基础培养条件。菌株生物量的测定采用光学显微镜(10×100)直接计数。

1.3 环境扫描电镜及能谱分析

菌株在基础培养条件下培养 72h, 将菌液以 12000r/min 离心后收集菌体, 冷冻干燥。采用带能谱的发射场扫描电镜 JSM-6700F(日本)对 Au 粉电镀过的微生物样品进行微区观察和化学成分分析。扫描电子显微镜的工作条件: 加速电压 20kV, 最大发射电流 300 μA ; INCA 能谱分析探头分辨率 133eV, 检测元素范围为 Be^4 — U^{92} 。

1.4 菌体生长对环境因子响应特点的测定

1.4.1 菌体生长对盐度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于盐度为 3、30 和 50 的培养基中培养, 在培养 3、6、9、12、24、48、72、96、120 和 144h 时取样, 测定菌体数量。

1.4.2 菌体生长对 pH 响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别于终 pH 值为 3.5、5.5、6.1 和 7.2 的培养基中培养, 在培养 3、6、9、12、24、48、72、96、120 和 144h 时取样, 测定菌体数量。

1.4.3 菌体生长对温度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于 25、35、45、50、55、60 和 65°C 温度下, 培养 24h 时取样, 测定菌体数量。

1.5 甲基紫晶(MV)还原的氢酶活性对环境因子响应特点的测定

1.5.1 氢酶活性对盐度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于盐度为 3、30 和 50 的培养基中, 培养 12、24、48 和 72h 时取样, 并测定氢酶活性。

1.5.2 氢酶活性对 pH 值响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于终 pH 值为 3.5、5.5、6.1 和 7.2 的液体培养基中培养 12、24、48 和 72h 时取样, 并测定氢酶活性。

1.5.3 氢酶活性对温度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于 25、35、45、50、55、60 和 65°C 培养 24h 时取样, 并测定氢酶活性。

1.5.4 甲基紫晶(MV)还原的氢酶酶活测定 氢酶活性参照 Takai 等(2005a)和岳文娟等(2011), 采用甲基紫精(MV)还原的方法测定。取 4.0ml 菌液, 离心后收集菌体, 首先以 200 μl 洗脱液(100mmol/L Tris-HCl, pH 7.8; 500mmol/L NaCl; 1mmol/L DTT)悬浮菌体, 离心后收集菌体, 然后加入 1.0ml 裂解液(100mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 1mmol/L DTT)裂解菌体。取 800 μl 裂解菌体, 加入 200 μl 的 5mmol/L 甲基紫晶(MV), 置于 H_2 环境中, 45°C 反应 20min, 立即用分光光度计测定 OD_{578} , 以在 N_2 环境中的反应作为对照。MV 还原的氢酶活力以每克蛋白每分钟生成的还原态 MV 含量表示[nmol/(min·g cell protein)]。蛋白含量采用 Folin-酚法测定, 以酪蛋白为标准。

1.6 荧光实时定量标准曲线的绘制

1.6.1 总 RNA 的提取和纯化 收集 10^8 个菌体细胞, 采用 Trizol 法(Invitrogen, USA)提取 RNA。采用 DNase (TaKaRa, 大连)去除 RNA 中的基因组 DNA, 反应条件: 37°C, 30min。通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260}/OD_{280} 比值检测 RNA 质量和纯度。

1.6.2 反转录 取 0.25—0.5 μg RNA, 按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒(PrimerScript TMRT reagent Kit)说明书进行反转录。反转录引物: 25pmol 的 Random 6 mers, 反转录条件: 37°C 15min, 85°C 5s。获得的 cDNA 溶液直接用于荧光实时定量标准曲线的绘制及后续的荧光实时定量 PCR 定量实验。

1.6.3 荧光实时定量条件和标准曲线的绘制 荧光实时定量参照岳文娟等(2011)方法。实时定量引物

采用 16S rRNA (5'-AGAACCTTACCTGGGCTTGA-3', 5'-TCTTTGTCTCGCCATTGTA-3') 和 *hynL* (5'-GCTT CAGCAGCCATAACA-3', 5'-AATGAGGTTTACGCCA GA-3')。实验采用 MJ Research 公司的 PTC-100 型荧光实时定量 PCR 仪, 依照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM 说明书确立反应体系, 反应条件: 95°C 30s; 95°C 5s, 55°C 30s, 40 个循环; 熔解曲线反应条件为: 95°C 15s, 55°C 30s, 95°C 15s。PCR 反应结束后, 以初始模板不同稀释倍数的对数为横坐标, 检测到的荧光信号初始循环数 *C_t* 为纵坐标, 分别绘制 16S rRNA 基因和 *hynL* 基因标准曲线, 并计算这两个标准曲线的斜率和扩增效率。

1.7 *hynL* 基因表达量对环境因子响应特点的测定

1.7.1 *hynL* 基因表达量对盐度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于盐度为 3、30 和 50 的液体培养基中培养 12h 时, 取 10⁸ 个个体细胞, 于 4°C 12000r/min 离心 20min 后收集菌体, 并于 -80°C 保存。

1.7.2 *hynL* 基因表达量对 pH 值响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于终 pH 值为 3.5、5.5、6.1 和 7.2 的液体培养基中培养 12h, 参照 1.7.1 收集和保存菌体。

1.7.3 *hynL* 基因表达量对温度响应特点的测定 参照基础培养条件, 将菌株分别置于 25、35、45、50、55 和 60°C 温度下培养 12h, 参照 1.7.1 收集和保存菌体。

1.7.4 实时定量 PCR 检测 *hynL* 基因的相对表达 取不同条件下培养的菌体细胞, 参照“1.6”提取总 RNA 并反转录为 cDNA 后, 进行 *hynL* 基因表达的实时定量检测。以不添加逆转录酶的 RNA 作为荧光实时定量 PCR 反应的对照, 以排除基因组 DNA 污染的干扰。以 16S rRNA 基因作为内参, 以基础培养条件下, 培养 12h 时菌体的 *hynL* 表达量作为参照 (*C_t* = 1), 采用 CT 法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2001) 分析 *hynL* 基因表达的相对变化值。三次独立实验的结果取平均值 ± 标准误 (Mean ± SE)。

2 结果与分析

2.1 *C. profundus* 的扫描电镜观察和能谱分析

扫描电镜照片显示, 菌株外形成杆状, 长宽约 1×0.3μm, 细胞表面被厚的矿物质层所包裹(图 1)。能谱化学分析的结果显示, 菌株表面包裹的矿物元素主要包括 C(22.22%)、O(56.14%)、Si(13.96%)、Na(4.85%)、Mg(1.35%)、Ca(1.28%) 以及少量的 S(0.07%)

和 Fe(0.12%), 推测该菌株在深海热液区矿物沉积和形成过程中可能起着重要的作用。

2.2 菌体生长对环境因子的响应特点

2.2.1 菌株生长对盐度的响应特点

在不同盐度下培养的菌株, 在 0—3h 时均处于生长的延迟期,

彼此差别不大。12h 时, 在盐度为 30 时的菌株首先进入指数生长期; 在稳定期和衰亡期时, 其生物量也较其它浓度具有明显的优势。菌株生物量在盐度为 50 时较盐度为 30 时略低; 而在盐度为 3 时菌株未见明显的生长(图 2A)。

2.2.2 菌株生长对 pH 值的响应特点 菌株在 pH 5.5 条件下生长最快, 其次是 pH 6.1。在 pH 3.5 条件下, 菌株生物量除了在 6—24h 时间段略低于 pH 7.2 之外, 在其它时间段都较 pH 7.2 的为高。上述结果可以看出菌株适合在微酸性的环境中生长(图 2B)。

2.2.3 菌株生长对培养温度的响应特点 培养 24h 时, 菌株处于指数生长早—中期阶段, 菌体生物量随培养温度的升高呈上升趋势。55°C 时生物量最大, 为 3.3×10^7 cell/ml, 是 45°C 时的 1.53 倍和 25°C 时的 1.97 倍。当培养温度提高至 60°C 后, 随着培养温度升高菌体数量呈减少趋势, 为 2.56×10^7 cell/ml, 是 55°C 下的 77.7%; 而培养温度为 65°C 时, 数量仅为 1.73×10^7 cell/ml, 是 55°C 培养温度的 52.5% (图 2C)。

2.3 甲基紫晶(MV)还原的氢酶活性对环境因子的响应特点

2.3.1 MV 还原的氢酶活性对盐度的响应特点 Takai 等(2005a)阐明, 在深海热液区氢细菌细胞内的各类型氢酶中, 类型 I NiFe 氢酶为优势组分。因此, 本文采用 MV 还原的氢酶活性表示类型 I NiFe 氢酶的活性。研究表明, 不同盐度下, 菌株 MV 还原的氢酶活性均在培养 12—24h 阶段迅速提高, 24h 达到峰值, 之后迅速下降; 培养 24h 时, 30 盐度下的氢酶活性最高, 为 5.73nmol/(min·g cell protein)。从整体趋势也可以看出, 30 盐度下氢酶活性最高, 其次为 50 盐

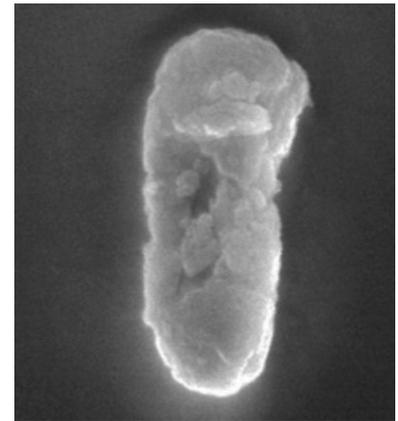


图 1 *C. profundus* 的扫描电镜形态
Fig.1 Scanning electron micrograph morphology of *C. profundus*

度和 3 盐度下(图 3A)。

2.3.2 MV 还原的氢酶活性对 pH 值的响应特点 在 pH 3.5—7.2 培养范围内, 菌株 MV 还原的氢酶活性大小依次为 pH 5.5 > pH 6.1 > pH 3.5 > pH 7.2。培养 24h 时, 菌株氢酶活性在 pH 5.5 培养条件下最高, 为 5.33nmol/(min·g cell protein), 分别为 pH 3.5 时的 1.83 倍和 pH 7.2 时的 12.23 倍(图 3B)。

2.3.3 MV 还原的氢酶活性对培养温度的响应特点 培养 24h 时, MV 还原的氢酶酶活随培养温度的提高呈上升趋势。55℃ 培养条件下酶活最高, 为 7.59nmol/(min·g cell protein), 分别是 45℃ 和 25℃ 时的 1.86 倍和 4.52 倍。当培养温度高于 60℃ 时, 随着培养温度继续升高, 氢酶的酶活呈现下降趋势(图 3C)。

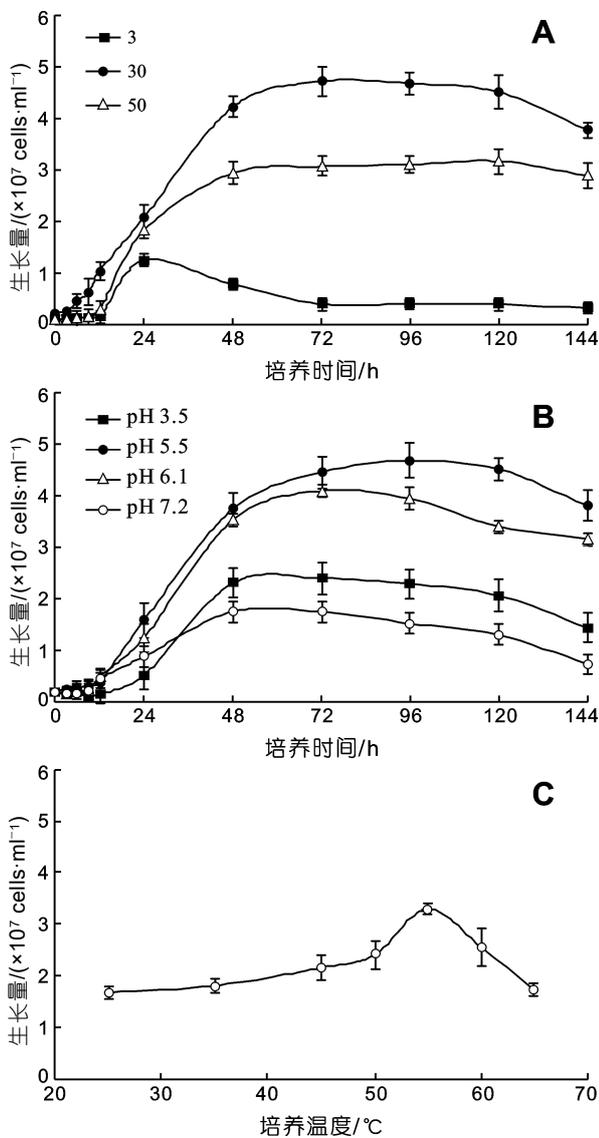


图 2 *C. profundus* 生长对环境因子的响应

Fig.2 Growth of *C. profundus* in response to environmental factors
A. 不同盐度, B. 不同 pH, C. 不同培养温度(培养 24h)

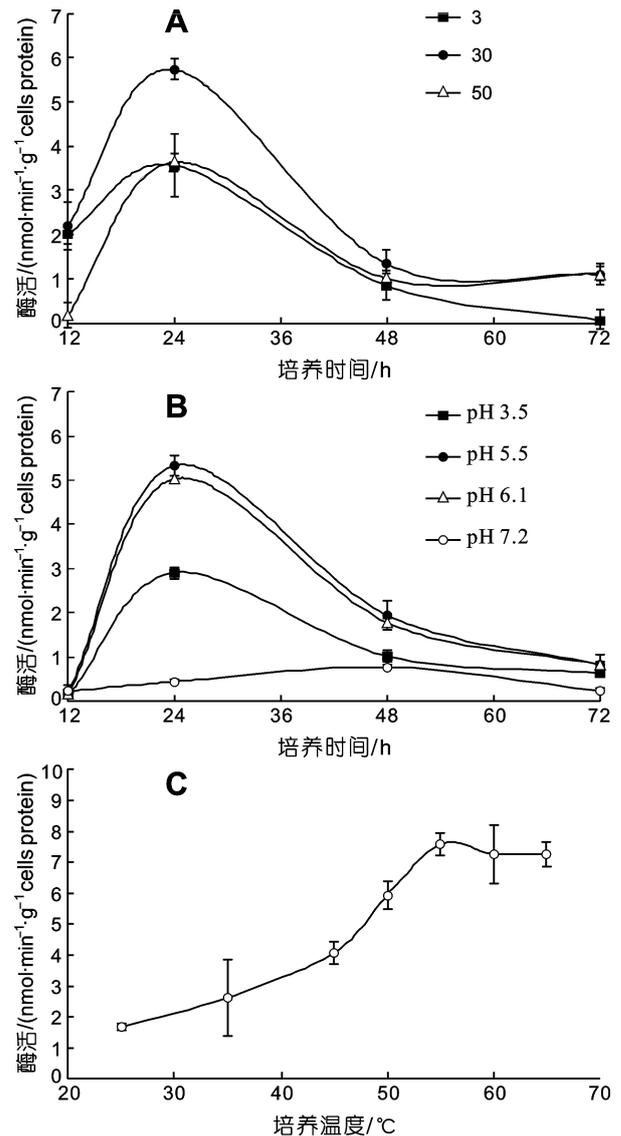


图 3 *C. profundus* 甲基紫精还原的氢酶活性对环境因子的响应

Fig.3 Methyl viologen reducing hydrogenase activity of *C. profundus* in response to environmental factors
A. 不同盐度, B. 不同 pH, C. 不同培养温度(培养 24h)

2.4 *hynL* 基因表达对环境因子的响应特点

2.4.1 荧光实时定量 PCR 标准曲线 通过荧光实时定量 PCR 获得循环数与荧光相对强度的 S 型动力学曲线。熔解曲线可以看出 *hynL* 基因和 16S rRNA 分别在 83℃ 和 89℃ 左右出现单一峰, 表明均被特异性地扩增。16S rRNA 基因和 *hynL* 基因标准曲线的斜率分别为 -3.129 和 -3.083, 相关系数 RSq 分别为 0.999 和 0.992, 扩增效率分别为 108.7% 和 113.4%。说明该体系可以用于荧光实时定量 PCR 分析。

2.4.2 *hynL* 基因表达对盐度的响应特点 已有报道, 菌株在培养 12h 时的指数生长早期, *hynL* 基因表

达量达到最大值(岳文娟等, 2011)。本实验中培养 12h 时, *hynL* 基因的表达量在盐度为 30 时最高, 分别是盐度为 3 和 50 时的 12.66 倍和 8.13 倍, 说明盐度变化对 *hynL* 的表达影响较大(图 4A)。

2.4.3 *hynL* 基因表达对 pH 值的响应特点 菌株培养 12h 时, *hynL* 基因的表达量在 pH 3.5—6.1 时较高, 其中在 pH 5.5 最高; pH 7.2 时 *hynL* 的表达量明显降低, 仅为 pH 5.5 时的 3.9%。说明菌株的 *hynL* 基因适合在酸性的培养条件下表达(图 4B)。

2.4.4 *hynL* 基因表达对培养温度的响应特点 菌株培养 12h 时, *hynL* 的表达量随温度的升高而大幅提高, 55℃ 时 *hynL* 的表达量达到峰值, 分别为 45℃ 和

25℃ 培养条件下的 5.39 倍和 28.37 倍。当培养温度升至 60℃ 时, 氢酶的表达量下降为 55℃ 时的 41.0% (图 4C)。

3 讨论与结论

扫描电子显微镜的研究发现, *C. profundus* 细胞表面被矿物质层所包裹。能谱化学分析进一步表明, 菌体表面的矿质层含有大量 Si 和 O, 可能形成二氧化硅矿物层。彭晓彤等(2007)通过扫描电镜、透射电镜及能谱化学分析也发现, 中印度洋洋脊 Edmond 热液场的微生物表面的矿质层由大量二氧化硅组成, 并提示该热液场中部分二氧化硅的沉积过程与微生物活动密切相关。Ca 元素在 *C. profundus* 表面也有一定程度的积累。有报道认为, 光合细菌吸收和固定无机碳源 HCO_3^- 时, 可使细胞外微环境的 pH 值升高并碱化, 导致碳酸盐在菌体表面的沉淀(Merz, 1992; Thompson *et al*, 1990)。因此可以推断 *C. profundus* 氧化 H_2 产生的能量在驱动 HCO_3^- 进行碳同化作用的同时, 也参与了菌株表面 Ca 的富集和沉淀。能谱化学分析还表明, *C. profundus* 细胞表面有少量 S 和 Fe 元素分布, 提示氢酶催化 H_2 产生的 H^+ 与单质硫反应生成 H_2S , 并与海水中的 Fe^{2+} 反应, 在菌体表面生成 FeS 沉淀, 这也解释了实验过程中所观察到的菌体沉淀呈黑色的原因。上述结果说明, *C. profundus* 菌株氢酶参与的物质能量代谢过程与矿物元素沉积密切相关。

已报道, 微生物氢酶的生物合成受到底物 H_2 、 O_2 、氧化还原态、不同碳源和氮源等因子的调控, 说明微生物具有调整代谢途径以适应新的环境和能量需求的能力(Vignais *et al*, 2004)。作者前期的研究结果也表明: 环境中 H_2 浓度的变化可以影响 *C. profundus* 的 *hynL* 基因的表达, 说明其能量代谢可以感知、响应并应对外界环境条件的变化(岳文娟等, 2011)。本研究进一步阐明了盐度、pH 和温度变化对深海热液区微生物氢酶合成的影响。研究发现, *C. profundus* 在盐度为 30 时 *hynL* 的表达量最高, 过高及过低的盐度均可以抑制其表达。Van Niel 等(2003)的研究结果也表明高盐浓度可以抑制氢酶活性; Dutta 等(2005)认为, 在高盐浓度时, 菌体需要消耗能量将 Na^+ 泵出细胞外, 从而抑制了氢酶的生物合成。在本研究中, pH 也可以影响 *C. profundus* 的 *hynL* 基因表达。较中性的 pH 7.2 而言, pH 3.5—6.1 的微酸性环境可以诱导其表达, 这与 Park 等(1999)报道的酸性条件可诱导肠道病原菌 *Salmonella typhimurium* 氢酶

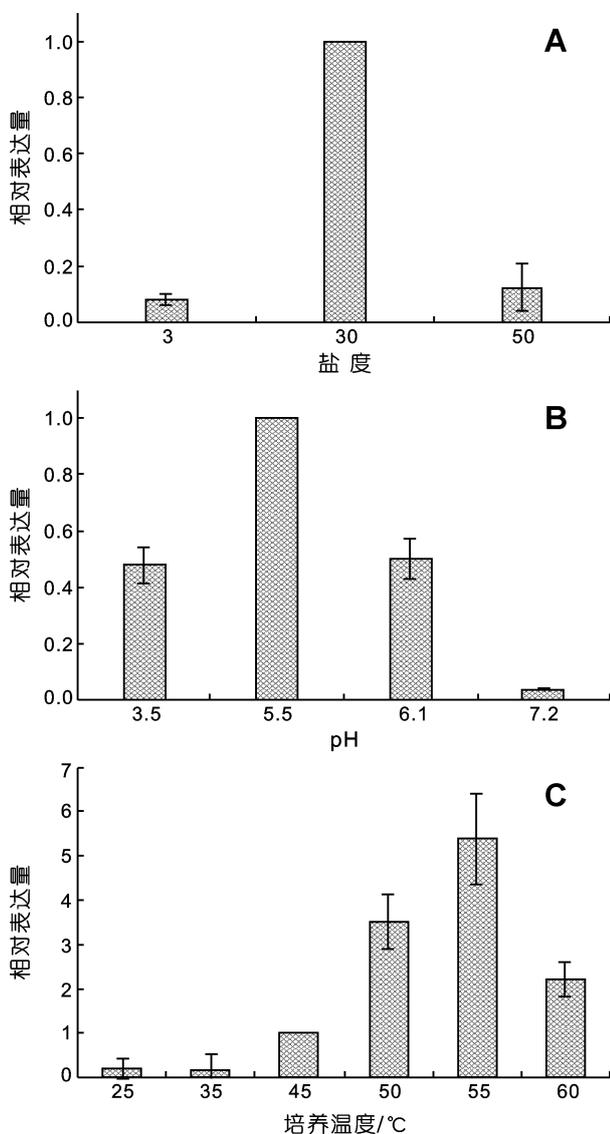


图 4 *C. profundus* *hynL* 基因表达对环境因子的响应

Fig.4 Expressions of *hynL* of *C. profundus* in response to environmental factors

A. 不同盐度, B. 不同 pH, C. 不同培养温度(培养 12h)

基因操纵子活化的结果一致。本研究的结果也支持了目前热液区氢细菌多偏好于偏酸性生长环境的报道 (Alain *et al*, 2002; Takai *et al*, 2004, 2005b, 2006; Voordeckers *et al*, 2005)。这可能与 *hynL* 基因的表达受酸性环境的诱导有关, 也与深海热液区低 pH 值的地理特征相一致 (王丽玲等, 2008)。本研究还发现, *C. profundus* 的 *hynL* 表达也受环境温度变化的影响, 表达的最适温度与菌株生长的最适温度相一致。Stintzi (2003) 在研究食源性致病菌 *Campylobacter jejuni* NiFe 氢酶 *hydAB* 基因时也得出过类似的结论, 即 *hydAB* 的表达受到培养温度调控, 适合表达的温度范围与生长的适宜温度相一致。上述结果还说明, 尽管深海热液区氢细菌的氢酶基因在结构组成与其它来源的微生物的氢酶有很大的差异 (Takai *et al*, 2005a), 但它们对环境信号可能仍具有相同的响应特征和调控机制。

综上所述, *C. profundus* 氢酶基因的表达受不同盐度、pH 和温度的影响, 其表达趋势与菌株生长和氢酶酶活的变化趋势相一致。以上结果说明, 外界条件变化时, *C. profundus* 通过调控 *hynL* 基因的表达, 以调整代谢所需的能量, 满足菌株生长和繁殖的需要。这可能是化能自养的氢细菌对热液区急剧变化的环境条件和能量需求所做出的迅速而高效的分子响应机制。

参 考 文 献

- 王丽玲, 林景星, 胡建芳, 2008. 深海热液喷口生物群落研究进展. 地球科学进展, 23(6): 604—612
- 杜翠红, 刘静雯, 周集体, 2010. 沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶基因克隆及其在大肠杆菌中的表达. 海洋与湖沼, 41(3): 319—321
- 岳文娟, 何培青, 刘同军等, 2011. 深海热液区化能自养菌 *Caminibacter profundus* 氢酶及其对 H₂ 的响应特点. 微生物学通报, 38(5): 702—708
- 彭晓彤, 周怀阳, 姚会强等, 2007. 中印度洋洋脊 Edmond 热液场 Fe、Si 沉淀与微生物的关系. 科学通报, 52: 2529—2534
- Alain K, Querellou J, Lesongeur F *et al*, 2002. *Caminibacter hydrogenophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. Int J Syst Evol Microbiol, 52: 1317—1323
- Dutta D, De D, Chaudhuri S *et al*, 2005. Hydrogen production by cyanobacteria. Microb Cell Fact, 4: 36
- Edwards K J, Saunders N A, 2001. Real-time PCR used to measure stress-induced changes in the expression of the genes of the alginate pathway *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl Microbiol, 91: 29—37
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods, 25: 402—408
- Lowell R P, Rona P A, Von Herzen R P, 1995. Sea-floor hydrothermal systems. J Geophys Res-Sol Ea, 100: 327—352
- Luther G W, Rozan T F, Taillefer M *et al*, 2001. Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. Nature, 410: 813—816
- McCullom T M, 2000. Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes. Deep-Sea Res, 47: 85—101
- Merz M U E, 1992. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. Facies, 26: 81—102
- Miroshnichenko M L, Haridon S L, Schumann P *et al*, 2004. *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Int J Syst Evol Microbiol, 54(1): 41—45
- Park K R, Giard J C, Eom J H *et al*, 1999. Cyclic AMP receptor protein and TyrR are required for acid pH and anaerobic induction of *hyaB* and *aniC* in *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 181(2): 689—694
- Shively J M, English R S, Baker S H *et al*, 2001. Carbon cycling: the prokaryote contribution. Curr Opin Microbiol, 4: 301—306
- Stintzi A, 2003. Gene expression Profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. J Bacteriol, 185(6): 2009—2016
- Takai K, Campbell B J, Cary S C *et al*, 2005a. Enzymatic and genetic characterization of carbon and energy metabolisms by deep-sea hydrothermal chemolithoautotrophic isolates of epsilonproteobacteria. Appl Environ Microbiol, 71(1): 7310—7320
- Takai K, Hirayama H, Nakagawa T *et al*, 2005b. *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. Int J Syst Evol Microbiol, 55: 183—189
- Takai K, Nealson K H, Horikoshi K, 2004. *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the ε-Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field. Int J Syst Evol Microbiol, 54: 25—32
- Takai K, Suzuki M, Nakagawa S *et al*, 2006. *Sulfurimonas parvalvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and

- emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 1725—1733
- Thompson J B, Ferris F G, 1990. Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake-water. *Geology*, 18: 995—998
- Van Niel E W J, Claassen P A M, Stams A J M, 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol Bioeng*, 81(3): 255—262
- Vignais P M, Colbeau A, 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol*, 6(2): 159—188
- Voordeckers J W, Do M, Hügler M *et al*, 2008. Culture dependent and independent analyses of 16S rRNA and ATP citrate lyase genes: a comparison of microbial communities from different black smoker chimneys on the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles*, 12:627—640
- Voordeckers J W, Starovoytov V, Vetricani C, 2005. *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(2): 773—779
- Zbell A L, Benoit S L, Maier R J, 2007. Differential expression of NiFe uptake-type hydrogenase genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 153: 3508—3516

CHARACTERISTICS OF HYDROGENASE FROM DEEP-SEA HYDROTHERMAL CHEMOAUTOTROPHIC *CAMINIBACTER PROFUNDUS* IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL FACTORS

HE Pei-Qing¹, YUE Wen-Juan^{1,2}, HUANG Xiao-Hang¹

(1. Key Laboratory of Marine Bioactive Substance, the First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, 250353)

Abstract Hydrogenases play important roles in material and energy transfer in deep-sea hydrothermal microbial ecosystem. In this paper, chemolithoautotrophic *Caminibacter profundus* in deep-sea hydrothermal was studied. The surface morphology and mineral deposition of the strain were analyzed by scanning electron microscopy and chemical spectrum. The bacterial growth, methyl viologen (MV)-reducing hydrogenase activities and gene expressions of membrane-bound type I NiFe hydrogenase large subunit (*hynL*) in response to several environmental factors as salinity, pH and temperature, were also studied. The results showed that the strain surface was covered with minerals layers composed of Si, Ca, S, Fe, and other elements. The strains growth, MV-reducing hydrogenase activity demonstrated similar patterns with *hynL* gene expression under different conditions. The optimum conditions were salinity 30, pH 5.5 and 55°C culture temperature. The results suggested that *C. profundus* can regulate *hynL* expression in response to the changes of environment to adjust metabolic energy, as well as the growth and propagation.

Key words Deep-sea hydrothermal, Chemolithoautotrophic, *Caminibacter profundus*, Hydrogenase, Environmental factors