深海热液区微生物群落与环境适应性机理

赵维旻^{1,3}, 肖湘^{1,2,3*}

1. 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海), 珠海 519080;

3. 上海交通大学, 深部生命国际研究中心, 上海 200240

* 联系人, E-mail: zjxiao2018@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-09-28; 接受日期: 2021-12-02; 网络版发表日期: 2022-05-16

国家自然科学基金面上项目(批准号: 41776173)、国家自然科学基金创新研究群体项目(批准号: 41921006)、国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 42106087)和上海交通大学新进教师启动计划(批准号: 21X010500755)资助

摘要 深海热液区是最典型的深海高温环境, 其剧烈变化的理化环境成为热液微生物的主要能量来源, 支持着极大的生物量和生产力, 热液区是微生物物种多样性最丰富的环境. 生活在热液区周围的微生物同时面临深海高静水压, 以及热液喷口周围温度、pH、盐度、氧化还原度等多种环境因子的剧烈波动. 由于热液区的理化特性与早期地球环境有一定相似性, 因此被认为可能是生命起源的摇篮. 了解深海热液高温高压环境中生命的环境适应、生命边界和演化过程, 可以帮助人们了解类早期生命形态, 为探究生命起源、生命与地球协同演化以及探索域外生命提供重要的科学认知和理论基础. 在过去近40年, 已有大量针对深海热液微生物的研究报道和综述发表. 本文基于深海原位检测和实验室模拟技术发展带来的新认知, 由宏观到微观, 从热液生态系统形成与群落演替、多样性成因、多因子环境适应等三个方面系统综述了近年来围绕深海热液微生物的前沿研究, 并讨论了新技术发展带来的时间尺度在上述研究中的影响和意义.

关键词 深海热液, 极端微生物, 环境适应, 微生物群落, 多样性

深海一般指水深超过1000米的海洋环境. 它是地球上最大的生态系统, 占总海洋面积的90%以上. 高静水压是深海中最普遍的环境因子^[1]. 深海热液是最典型的深海高温环境, 具有极高的单位生产力和微生物量, 热液区微生物浓度是周围海水的 $10^4 \sim 10^5$ 倍, 是地球上微生物多样性最丰富的环境^[2,3]. 深海热液处于深海高压下, 从喷口喷出的高温(高达464℃)、酸性(pH 2~3)、富含还原性物质(如 Fe^{2+} , H_2S , H_2 等)的热液, 与周围低温(2~4℃)、偏碱性(~pH 8)、富含氧化性物质

(如 Fe^{3+} , O_2 等)的海水迅速交汇后, 在深海热液附近形成了剧烈变化的温度(2~464℃)、pH(2~8)、氧化还原度、盐度等理化梯度^[3~5]. 这一理化梯度是热液微生物的主要能量来源, 构建了与表层光合世界截然不同的黑暗生态系统, 同时也导致热液微生物需时刻面临多因子极端环境胁迫. 热液微生物在这种多因子胁迫下不断地适应、演化, 同时也改变着环境. 此外, 由于深海热液具有类早期地球环境的理化特性, 因此也被认为可能是生命起源的摇篮. 生活在深海热液中的(超)

引用格式: 赵维旻, 肖湘. 深海热液区微生物群落与环境适应性机理. 中国科学: 生命科学, 2022, 52

Zhao W S, Xiao X. Microbiome and environmental adaption mechanisms in deep-sea hydrothermal vents (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, doi: 10.1360/SSV-2021-0353

嗜热微生物往往处于进化树的根部, 被认为具有类早期生命的生理和代谢特性, 是研究地球早期生命、生命起源与演化的理想材料^[3]。

1977年, Scripps海洋研究所的科学家首先在加拉帕戈斯群岛(Galápagos Rift)^[6]发现深海热液系统。至今对该系统的研究已经持续了近40年。一直以来, 深海热液系统都是研究的热点, 积累和报道了大量相关研究, 这些研究主要包括微生物多样性、群落结构、极端微生物的分离培养、生理、适应、演化以及关键酶的结构、生化及功能等, 涵盖了从宏观到微观, 从公里级到纳米级的不同空间尺度。近年来, 随着对深海热液区认识的不断加深, 越来越多的热液区(超)嗜热微生物(细菌、古菌、病毒等)被成功分离^[7~11], 极大地拓宽了人们对热液区生命形态及其代谢多样性的认知。随着深海原位取样技术和实验室模拟技术的不断发展, 深海热液微生物的研究也逐渐从散点式的多样性研究, 逐步向系统化的生命过程研究迈进。

热液生态系统研究的关键目标之一是拓展人们对类早期生命形态的认知, 帮助理解生命和地球的协同演化, 为探究生命极限、起源和探索域外生命提供重要的理论和认知基础。相关的关键科学问题集中在: 深海热液独立生态系统建立过程与演替机制是什么? 深海热液丰富多样性的成因是什么? 以及, 深海热液微生物如何适应多因子极端环境? 本文将围绕上述深海热液微生物研究的三个关键科学问题, 基于深海原位检测和实验室模拟技术发展带来的新认知, 系统综述从宏观的热液生态系统形成和演替, 到种群水平的多样性成因, 再到微观细胞水平的多因子环境适应等三个空间维度的前沿研究。本文还将讨论这些新技术发展带来的新维度, 即时间尺度, 对深海热液微生物研究的影响和意义(图1)。

1 热液生态系统的形成与演替

硫化物烟囱体是深海热液区的代表性特征结构, 它是由喷发的超高温还原性热液与低温富氧海水混合造成的矿物沉淀聚集而成。海底热液区烟囱体的“生活史”(从形成到熄灭的过程)受海底地质活动的直接控制。在研究最多的EPR 9°N~10°N热液区域, 科学家曾通过两次相隔13年的海底热液喷发来了解大洋中脊的生长过程, 并在1991~1992年和2005~2006年两度尝试

跟踪检测热液区可溶性氯离子和磷随时间的变化^[12]。然而, 受限于技术条件, 研究者尚未能有效地追踪和预测深海热液的喷发和熄灭时间, 更无法持续跟踪调查同一个烟囱体从初始形成到完全熄灭过程中微生物群落的演替。因此, 长期以来无法清楚地研究热液烟囱体微生物生态群落和系统是如何形成和演替的, 这就要求研究者巧妙地利用间接手段来了解热液生态系统形成与演替。

1.1 热液生态系统原位重建

2006年, Alvin号潜水器在Juan de Fuca Ridge调查期间, Wang等人^[13]利用在热流上直接放置人工烟囱帽的方法, 实现了热液生态系统的原位重建, 模拟了新烟囱的生长并揭示了这一过程中微生物群落的快速演替。研究人员将一个天然烟囱体(4143-1)中的小烟囱进行人工切割, 并在切割后的热流顶部放置了一个人工锥形帽, 热流体直接通过中央开口排出, 15天后观察到盖子顶部形成一个新生长的热液烟囱体(Proto-O), 而在其帽盖内部形成了硬石膏和硫化物矿物(Proto-I)。他们通过基因芯片(GeoChip)、克隆文库和定量PCR的方法, 检测了这一过程中微生物的种群丰度和代谢多样性。研究表明, 新生长的烟囱体的微生物功能与原始烟囱体存在巨大差异, 新生长的烟囱体内、外的微生物群落也存在显著差异, 这说明在烟囱生长过程中, 微生物群落组成和主要功能发生着快速的变化。此外, 他们还发现了丰富的横向转移基因和错配修复基因, 这也印证了整个生态系统在快速演化。在人工烟囱帽生长的过程中, 研究人员还观察到与碳、硫和氮代谢相关的功能基因发生了显著变化, 由此推测, 热液生态系统的能量主要来源于硝酸盐还原偶联硫酸化反应。这些结果都表明, 热液微生物群落在代谢和生理上具有高度多样性, 并且微生物群落在热液烟囱形成的过程中会经历快速的适应和动态演替, 以响应热液喷口周围剧烈波动的温度和其他理化梯度。这种在同一喷口区域内微生物群落的快速演化因喷口而异, 持续时间从几天到几年不等^[14,15]。

1.2 微生物群落演替

绝大多数热液微生物群落研究关注的是正在喷发的活跃烟囱体, 因而人们对于熄灭数年至数千年烟囱体内的微生物群落演替知之甚少。最近, Hou等人^[16]报

道了第一个相关研究, 他们将一个精确知道熄灭时间的烟囱体(约7年前)和相同热液区域内另一个活跃烟囱体进行对比, 来探究烟囱体由活跃转变至熄灭状态过程中的微生物演替. 该研究比较分析了EPR 9°N~10°N热液区域内的上述两类烟囱体中微生物群落, 获取了全长16S rRNA基因和173个高质量宏基因组拼接基因组(metagenome-assembled genome, MAG). 基因和基因组证据显示, 活跃喷发的烟囱体中占主导地位的是通过还原性三羧酸循环途径(reductive tricarboxylic acid cycle, rTCA cycle)进行二氧化碳固定的自养微生物, 即*Campylobacteria*和*Aquificae*; 而近期熄灭的烟囱体中占主导的则是异养细菌(如*Delta-/Beta-/Alphaproteobacteria*和*Bacteroidetes*). 另外, 他们仅在近期熄灭的烟囱体中获得的*Gammaproteobacteria*类群中鉴定到可能用于介导硫化物氧化的代谢过程.

另一项研究对象是西南太平洋的马努斯海盆(Manus Basin)中已熄灭数千年之久(最长达 3183 ± 160 年)的硫化物烟囱体. 通过基于16S rRNA基因的群落分析与放射性碳测年、宏基因组和宏蛋白质组分析相结合, 研究者发现在大多数长期熄灭的烟囱群落中, 异养细菌(如*Delta-/Beta-/Alphaproteobacteria*和*Bacteroidetes*)处于优势地位. 研究者在异养细菌中的*Gammaproteobacteria*里找到了自养硫化物氧化过程, 其可能通过向细胞外转移电子促进了金属硫化物溶解. 鉴于这些*Gammaproteobacteria*进化枝在海洋环境中分布广泛, 研究者推测这种微生物主导的加速矿物氧化可能是海底元素循环的重要环节, 也是海底二氧化碳固定的重要能源^[17]. 两项研究对比可知, 熄灭长达数千年的烟囱体与近期熄灭的烟囱体在微生物群落组成和结构上有诸多相似, 暗示热液烟囱从活跃到熄灭再到长期熄灭的过程中, 微生物群落的演替可以在烟囱熄灭后的数年内完成, 并能保持稳定长达数千年.

此外, 在两项研究中均发现熄灭的烟囱中存在丰度较高的*Nitrospirae*. 但在对比近期熄灭和熄灭千年的烟囱中的*Nitrospirae*后, 研究者发现, 近期熄灭的烟囱体存在系统发育地位相对独特的*Nitrospirae*, 其系统发育学地位明显不同于长期熄灭的烟囱体中的类群, 这一类被命名为“硫化矿物”分支(“sulfide mineral” clade)^[17]. 这一分支在功能上与长期熄灭的烟囱体中的硫酸盐还原型*Nitrospirae*不同, 其*Nitrospirae*类群有利用硫化矿物的潜能, 可将氧气/亚硝酸盐/硫酸盐还

原与金属硫化物氧化相耦合, 因此, “硫化矿物”分支可能成为指示所栖息的烟囱体正处于熄灭后早期阶段的标志类群^[16].

在此基础上, 综合全球已报道不同状态烟囱体的微生物群落结构, Hou等人^[16]还发现并提出了热液区微生物群落的演替规律和模式, 即海底热液区微生物生态系统的演替主要受能量来源转换的控制; 典型的热液硫化物烟囱体从初始形成到完全熄灭的过程中, 栖息在其中的微生物群落从依靠喷发热液中电子供体来维持的“热液主控型”逐渐演变成由来自固体矿物电子供体支持的“矿物主控型”. 这种转换非常迅速, 可以在烟囱熄灭后的数年内完成, 并可以在千年尺度上保持稳定(图1E).

1.3 热液环境的原位检测和实验室模拟

在热液生态系统形成与演替研究被巧妙推进的同时, 近十年来, 热液流体的原位检测技术也在不断突破技术局限, 由此获得更为准确的热液原位高温高压下的理化参数. Zhang等人^[18]率先攻克了光学系统在热液区耐高温和高浓度颗粒附着影响等技术难题, 成功研制出国际上首台可耐受高达450℃高温的热液流体拉曼光谱探针. Li等人^[19]使用这一技术对冲绳海槽中部热液区三个高温热液喷口的流体(最高温度可达273℃)进行了原位拉曼光谱定量探测, 首次获得了高温热液流体中溶解二氧化碳及硫酸根离子的原位浓度, 其中同一热液喷口通过原位检测获得的二氧化碳浓度为保压取样后实验室检测到的二氧化碳浓度的3倍以上. 此外, 研究者开发了一系列可耐受高温(高达300℃)和高压(高达40 MPa)^[20-22]的原位化学传感器, 用于热液喷口流体的原位pH、溶解H₂和H₂S等的长期监测. 这些重要理化参数所提供的关键信息有助于更真实地还原热液微生物的生存环境.

除了原位检测技术, 实验室模拟培养技术让研究者可以通过模拟热液喷发的温度、压力、物质浓度等理化条件, 实现连续、可监测、可控的热液微生物系统研究. Zhang等人^[23]开发的实验室高温高压气液混合模拟流动培养装置可模拟原位热液的喷发, 并且可以同时控制温度、静水压、气体压力、气体组分、培养基成分和流速等多种环境参数, 为研究者在环境参数可控情况下了解热液微生物生态系统、长周期富集和分离培养特定热液微生物类群等研究提供了条件.

2 热液微生物多样性成因

在热液生态系统形成与消亡过程中, 微生物群落的演替显示出热液微生物丰富的多样性, 这种多样性既是物种多样性也是代谢多样性. 深海热液区是地球上微生物多样性最丰富的地区之一, 尤其存在着多样性极丰富的极端微生物, 因此热液区微生物多样性的成因一直是国际关注的热点研究方向. 加之深海热液具有类早期地球环境的理化特性, 被认为可能是生命起源的摇篮, 所以, 研究热液微生物多样性成因与演化, 或许是帮助人们理解生命起源和演化的关键.

全球分布的深海热液喷口是由微生物驱动的生态系统. 截至目前, 研究者没有发现宏生物在喷口处存活. 在高温和缺氧条件下, 样品采集, 微生物分离以及突变株系的实验室繁殖都有挑战性. 热球菌目 *Thermococcales* 是深海热液区一类占主导地位的古菌类群. 这类古菌位于进化树根部, 具有专性厌氧、超嗜热的独立生存和生活方式, 被认为是研究早期生命的良好模型之一, 也是深海热液区的代表性微生物^[24]. 针对其中的代表性菌株 *Thermococcus eurythermalis* A501, Gu等人^[25]设计了全新的培养方法, 在严格厌氧条件下进行突变积累实验: 从一个单克隆出发, 得到100个独立的实验组, 每天通过平板划线进行突变的积累, 经历超过314次细胞分裂; 在实验结束时, 对96个存活的实验组的基因组进行测序. 之后, 通过基因组分析和计算, Gu等人首次报道了这类深海热液区专性厌氧超嗜热古菌的无偏突变率. 此前Drake法则认为: 由于高温菌突变比中温菌突变更容易致死, 所以高温菌突变率应该更低, 即低突变率在高温环境下更有优势^[26], 该法则在高温菌突变率研究领域广受认同. 而 *T. eurythermalis* A501的突变积累实验表明, 深海热液超高温古菌A501的突变速率比所有已知的独立生存的原核生物的无偏突变率高1~2个数量级, 此结果推翻了长期被认可的Drake法则. 进一步对该种的多个菌株进行测序并计算出有效种群大小, 结果表明, *T. eurythermalis* A501的有效种群小于其他独立生存的原核生物1~2个数量级. 这些数据都说明, 该菌株的高突变率并不是自然选择的结果, 而是由随机遗传漂变驱动. 研究还发现, 基因组大小与突变率呈负相关, 与30个细菌和古菌的有效种群大小呈正相关, 这表明突变率增加和随机遗传漂变可能是驱动微生物基因组减少的两个重

要机制. 目前, 这一结果能否推广到热液口其他(超)嗜热微生物, 以及是否是热液口微生物的共同特征都尚待检验. 但该结果为深入研究深海热液区微生物多样性成因打开了一种新的思路: 与自然选择在常温环境中起决定性作用不同, 随机遗传漂变这类中性进化可能是热液区微生物在多重极端环境条件下形成多样性的主要原因(图1B).

3 热液微生物多重极端环境适应机制

如前文所述, 深海热液微生物有着与常温环境中不同的多样性成因, 表明环境因子对热液区生命的影响至关重要. 深海热液环境是典型的深海高温环境, 同时兼具高压、高温以及热液喷口周围剧烈波动的理化因子等环境胁迫条件, 生活在其中的微生物往往同时面临多因子极端环境胁迫. 了解热液微生物在多因子极端环境胁迫下的生存策略, 发现其在能量和资源有限, 且外部环境不断挑战生物大分子稳定极限的情况下, 保持细胞形态、结构、代谢和生物过程稳定性的方式, 是认知热液极端微生物环境适应机制的关键, 也是研究早期生命形态和生命极限的基础.

3.1 多因子环境胁迫的“共适应”策略

深海热液是典型的(超)嗜热微生物的发现地. 最初这一区域的研究主要是通过寻找嗜热酶及特有的嗜热基因来试图揭示深海热液(超)嗜热微生物高温适应机制. 随着高压培养技术的发展, 以及过程中(超)嗜热嗜压菌不断被发现, 针对压力的研究成为新的热点. 期间, 通过寻找特有的嗜压基因来尝试回答(超)嗜热嗜压菌嗜压机制的研究思路逐步陷入了困境. Zhang等人^[23]收集整理了不同物种中已报道的应对高压、极端温度、高渗透压、酸、碱、能量短缺等胁迫条件的响应基因, 发现应对压力胁迫的基因和应对其他环境胁迫的基因有很大比例的重合. 基于这一发现, 他们提出了一个假设, 即深海中高压适应与温度、盐度、pH、氧化还原度等其他环境因子可能具有共同的适应机制.

Zhao等人利用深海高温高压模拟培养系统获得了一株具有深海热液代表性特点的菌株 *T. eurythermalis* A501, 该菌株的生长范围远超普通微生物和其他极端微生物, 其生长温度范围50~100℃, 生长pH范围4~9,

生长压力范围为0.1~70 MPa^[27]; 该菌株的基因组仅2.1 Mb, 且代谢途径相对简单^[28], 由此推测该菌株可能通过一种简单却高效的方式应对深海热液的多因子环境胁迫条件, 进而提出“多因子环境适应存在共同机制”的假说。

随后, Zhao等人^[29]对不同极端环境胁迫条件, 即在高压、高温、低温、酸、碱、高盐、低盐等条件下进行了定量蛋白组分析, 在A501的全蛋白组层面找到了多因子环境适应存在共同机制的证据。蛋白组(79.8%的基因组覆盖率)分析结果表明, 占总蛋白61.3%的显著差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)应对不止一个环境胁迫条件。统计学结果表明, 除低温和高盐条件外, 其他环境胁迫与响应蛋白密切相关。通过代谢途径富集, 研究者总结出A501菌株应对环境胁迫的普遍响应主要是在大分子的生物合成与保护、氨基酸的生物合成与代谢、离子转运及离子与蛋白结合活性等三个方面。同时, 研究揭示了特定的二重胁迫响应过程, 如低温和高压胁迫下的膜脂反应, 高渗和热胁迫下的信号转导, 而钠离子依赖的能量代谢可能是限制盐胁迫生长范围较窄的关键因素。在此基础上, 该研究还获得了针对各单一环境胁迫的独特响应机制, 其中以低温条件下的独特响应途径最多, 暗示了超嗜热微生物适应低温时在供能途径和抗氧化途径上可能存在瓶颈。研究发现, 多重胁迫下(三重胁迫及以上)共适应策略中的响应蛋白占总编码蛋白的33.5%, 而针对极端温度、pH、盐度和压力的特定双重胁迫响应, 或单一胁迫特有响应过程涉及的响应蛋白仅占总编码蛋白的0.22%~0.63%。该研究首次在全蛋白组水平验证了深海热液代表菌株中存在应对多因子环境胁迫的“共适应”机制(图1A), 为理解深海热液微生物的生存、适应提供了理论基础。

3.2 适应性的分子基础

过去近40年深海热液极端微生物适应机制的研究主要集中在高温和高压两个方面, 通过基因组、比较基因组、转录组、蛋白组、代谢组等多重组学, 配合酶学、生物化学、分子生物学等手段, 报道了大量深海热液微生物对高温、高压的胁迫响应, 直接或间接反应了高温、高压对细胞的影响。这些影响概括起来主要包括两个方面: 生物完整性和代谢可行性^[30]。其中, 生物完整性是完成代谢的分子基础, 而代谢可行

性决定了微生物生存和生长的边界条件, 同时也是微生物调整自身以适应和改变环境的方式。

(1) 生物完整性。生物完整性主要体现在水动力学、细胞膜和生物大分子稳定性等三个方面。其中, 水是细胞最主要的成分和溶剂, 是驱动蛋白折叠的动力同时也为生化反应的发生提供介质和环境; 细胞膜是胞内胞外的间隔, 维持细胞形态和内部环境的相对稳定; 而生物大分子(主要包括DNA、RNA和蛋白)的稳定是保证一切生化反应和生物过程的基础。总的来说, 热液周围的高温环境对微生物细胞最直接的影响在于破坏其生物完整性, 而深海高压则在一定范围内有助于细胞在高温下维持稳定。

水是一种特殊的无机分子, 液态水是所有细胞的最主要成分(>70%的湿重), 它在维持细胞功能和驱动所有生物过程方面有着不可替代的作用^[31]。当细胞被加热到100℃以上时, 通常需要高于大气压的压力来维持细胞间和细胞外的水保持液相, 否则水将无法继续作为介质和溶剂, 参与生物过程和生化反应。高温还会影响水的物理化学性质, 比如降低关键气体底物和/或产物(例如H₂, H₂S, CO₂, O₂等)的溶解度^[32]。相对于升高的温度, 高压对溶解度有相反的影响, 它有助于细胞维持气体底物的吸收和产物的去除。在最近的研究中, Li等人^[33]通过深海热液温度探针发现, 热液顶部流体的温度可超过该区域水深条件下的相分离温度。深海激光拉曼光谱原位检测表明, 热液流体顶部确实存在气态水(混有CO₂、CH₄、H₂S等气体组分), 而流体从顶部至底部依次为高温蒸汽相、热液流体与海水混合相以及底层的正常海水相, 这表明高温高压下热液流体中的水经历着复杂的物理化学过程。此外, 高温会扰乱水分子与胞内溶质形成的氢键网络及其他化学键, 而高压可在一定程度上增强氢键网络^[34], 从而有助于在高温下保持水-水和水-大分子之间的相互作用。迄今为止, 高温和/或HHP的大部分物理效应是根据纯溶剂或溶剂混合物(例如水和甘油)实验和/或计算模拟来确定的。近年来, 随着物理检测技术的发展, 细胞成分和活细胞内的水分子氢键网络引起了物理学家和生物学家的极大兴趣。Shrestha等人^[35]使用准弹性中子散射(quasielastic neutron scattering, QENS)技术研究超高压(100 MPa)在-53~80℃温度范围内对超嗜热古菌和中温菌中的无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase, IPPase)蛋白构象的水分子动力学影响, 发现

超嗜热菌中的IPPase蛋白比中温菌中的蛋白有更快的弛豫动力学特征。Tros等人^[36]使用超快振动光谱和介电弛豫光谱观察活细胞内水分子的随机定向运动,发现大多数胞内水表现出与纯水相同的随机定向运动,而较小部分(约20%~45%)表现出较慢的定向动力学特征。而Martinez等人^[37]利用准弹性中子散射在超嗜热嗜压古菌中观察到胞内水分子的较慢运动可能与高压适应有关。尽管越来越多的物理学检测技术开始应用于蛋白和活细胞,但目前高温和/或高压下热液微生物胞内的水动力学研究仍处于起步阶段。不过,现有研究已逐步显示出水分子作为所有活细胞的溶剂,对高温、高压下生物大分子的正确折叠和细胞正常行使功能均有至关重要的作用,这些都有待进一步系统化的研究。

细胞膜是古菌和细菌最主要的区别,它使细胞能够维持一个相对稳定的内部环境,帮助微生物在面对极端或波动的外部环境时也能保持胞内环境相对稳定。细胞膜的流动性和通透性随着温度升高而增加,在高温极限下,膜蛋白聚集,膜蛋白活性降低,溶质通量降低,阳离子渗透性增加^[38]。因此,热液环境中的(超)嗜热微生物具有一些特殊的细胞膜组分,并通过改变膜脂组分来适应高温。例如,嗜热细菌通过增加磷脂分子中饱和脂肪酸的比例,增加磷脂烷基链的长度和增加异构化支链的比例来增强细胞膜的热稳定性^[39]。超嗜热古细菌则利用特殊的四醚(glycerol dibiphytanyl glycerol tetraethers, GDGT)形成单层膜结构来维持稳定, GDGT具有更高的机械强度,可以抵抗高温环境^[40];或是通过增加环戊烷结构和甘油骨架的糖基化修饰来维持细胞膜稳定^[41]。这些适应机制大多是通过改变膜脂及其组成来增强稳定性。一般来说,高压有助于帮助细胞在高温下保持细胞膜的完整性、流动性和通透性,与降温作用类似^[42,43],压力每增加10 MPa相当于温度降低13~21℃^[44]。简而言之,高温会增加膜的熵和其无序度,而高压会降低熵,因此高压可以将膜的流动性保持在相对稳定的范围内。除了高温、高压,膜脂组分也受酸、碱、高盐以及温度和压力波动等其他极端条件影响^[45~47]。尽管已经观察到热液微生物膜脂组分的变化,但这些组分变化影响热液微生物环境适应性的生物学机制尚不清晰,需要结合物理学和分析化学手段进一步深入研究。

在热液高温环境和温度波动下,许多生物分子,尤

其是生物大分子面临着稳定性被破坏的威胁,相关研究中最多的有关高温对生物大分子稳定性的影响。总的来说,高压有助于稳定DNA、RNA和蛋白质的结构,并使其在高温下正常发挥功能^[42,48,49]。此外,在多种极端环境适应研究中,分子伴侣和相容性溶质是被广泛报道的极端环境适应策略,属于应对各种环境压力(包括高温和高压)的“共适应”策略^[29]。分子伴侣是一类蛋白质,可与生物大分子结合,帮助维持其结构和功能,包括最常见的热休克蛋白和冷休克蛋白^[50],它们有助于蛋白质从头折叠^[51];而相容溶质则是一类增加细胞内水分活度以平衡细胞内外渗透压的小分子代谢物^[52],它们不干扰蛋白质的结构和功能,能减轻高离子浓度对酶活性的抑制作用。热液环境中的超嗜热古菌可从头合成和积累一些特殊的相容溶质,如二-肌醇-1,3-磷酸(L,L-di-myo-inositol 1,3-phosphate, DIP)、甘露糖基甘油酸酯(mannosylglycerate, MG)和环状2,3-二磷酸甘油酸(cyclic 2,3-bisphospho-D-glycerate, cDPG)^[53~55],这些超嗜热菌特异性相容溶质通常在最适和更高温度条件下合成和积累,并且能稳定大分子的结构,防止热变性^[29,56~58]。最近一项研究利用中子散射技术证明超嗜热嗜压古菌中的相容性溶质对整个蛋白质组具有保护作用^[59]。尽管研究已经鉴定且证明多种分子伴侣和相容溶质的积累及其从头生物合成途径与多种环境胁迫有关,但对于它们在体内的物理和生理作用,人们依旧知之甚少,尤其是其与代谢网络和胞内溶质环境的关系尚不清楚,由此留下了巨大的知识空白。

另外,在蛋白质结构水平,目前尚不知热液超嗜热古菌与嗜热细菌在全蛋白组水平上存在哪些异同。是否存在可以量化的结构差异(如氢键、盐桥、二硫键等的数目)。相同或类似功能的蛋白是否存在保守的结构倾向。这些问题的回答曾长期受限于蛋白结构解析。然而,随着人工智能算法的发展,高通量蛋白结构预测技术(如AlphaFold等)为全蛋白组水平的结构预测提供了可能,并且在进行微生物比较分析时,可以在序列水平比较的基础上实现结构比较,帮助人们进一步理解热液微生物环境适应的分子基础(图1A)。

(2) 代谢可行性。深海热液中的(超)嗜热微生物都是化学营养型,包括化能自养生物和化能异养生物。化能自养微生物主要是厌氧的,少数是微好氧的,它们通过H₂和S氧化以及S, SO₄²⁻, CO₂和NO₃⁻的还原获得能

量^[60]。化能异养型(超)嗜热菌的代谢途径主要以肽类和糖类作为底物, 它们的能量代谢非常多样化, 可利用如 Fe^{3+} 、 CO_2 、 NO_3^- 、不同氧化态的硫化物, 甚至是质子等不同种类电子受体^[60], 有些微生物的电子传递链包含不止一种电子受体, 在外部电子受体存在的情况下, 底物将被氧化为 CO_2 和/或通过发酵转化为其他小分子有机物(如乙酸盐、丙酸盐、醇等)^[60]。(超)嗜热菌在其代谢网络中有一些特殊的、应对极端高温的方式, 但它们仍然面临着化学反应不平衡、有毒代谢物的积累以及温度扰动引起生化反应失效等挑战, 例如, 电子和能量载体(ATP/ADP, NAD(P)^+ 等)均会在高温下自发降解^[61,62]。而根据阿伦尼乌斯模型, 温度是驱动生化反应最有影响的参数, 高温可使某些中温下难以发生的化学反应变得可行, 如甲酸和水转化为碳酸氢盐和氢的供能反应^[63]。但与此同时, 温度升高也会破坏代谢途径中的各个生化反应的平衡, 这可能导致代谢网络中不同代谢途径受温度影响的程度不同, 因此热液高温下可能发生代谢通路间的开启或关闭, 研究者也曾观察到高压胁迫下的这种代谢转变^[30]。就目前研究现状而言, 无论是高温、高压或其他环境因子, 对其导致的代谢影响的研究尚不足, 与生物完整性的研究相比, 环境适应的代谢影响还需要更多单菌、简单群落间的定性以及定量的系统研究。

4 讨论与展望

深海热液系统自1977年首次被发现至今^[6], 近40年来围绕热液区微生物的研究已逐步形成一个研究体系: 在空间上, 实现跨度从千公里级的宏观尺度到纳米级的微观尺度, 覆盖了从元素循环、生态系统、群落、种群、单菌再到细胞内分子水平。截至目前, 研究最多的主要是宏观尺度上的微生物群落结构及多样性和微观尺度上单菌细胞内的生物大分子稳定性及酶学特征, 这些研究描摹了热液区微生物的种类、进化地位、潜在功能以及特定微生物内部的分子特征。然而, 在很长时间内受技术条件的限制, 深海热液微生物的多样性和分子机制的研究只能停留在静态, 且这两部分研究是相对割裂的, 与原位环境中动态的、相

互关联的状态不完全相符, 由此可能造成一定程度上的认知盲区或误读。热液系统的原位探测技术和实验室高温高压流动模拟技术的发展, 推动了深海热液微生物的研究从静态的、条件不可控的、不可连续监测的, 转向动态的、可控的、可连续监测的系统研究。新技术的发展还给深海热液微生物研究引入了新的维度, 即时间尺度。

因此, 我们在此提出并呼吁, 与其他生态系统一样, 热液生态系统研究在关注空间尺度之余, 还需要关注微观和宏观层面的时间尺度。在微观上, 热液微生物对环境响应过程中水动力学驱动的蛋白折叠发生在“飞秒”级, 而生物过程和代谢途径对环境因子的响应发生在“天”尺度以下(图1A); 在这种适应过程中, 碱基替换和突变发生在“秒”尺度, 而突变的积累需要“天-月”纪的传代过程(图1B), 突变积累到一定程度便形成了种间的分化, 即形成了多样性; 随着共同祖先在“亿年”尺度上的演化, 逐渐形成今天在多样性研究中观察到的样子(图1C)。而在宏观上, 热液时刻经历着高温流体的喷发和与周围低温海水的交换, 这一过程导致热液原位存在“秒-天”尺度的温度波动。本实验室一项未发表的研究通过气液混合高压模拟流动设备模拟了这种温度波动, 并在持续培养原始热液微生物群落长达数月之后, 发现这种温度波动会定向富集出一个相对简单的群落, 而这个富集群落的温度耐受上限远高于群落中的单菌(图1D), 目前这一研究仍在进行中。这种温度波动在热液生态系统形成的早期对微生物群落有重要影响, 热液生态系统的形成在“天-年”尺度内, 微生物群落从形成初期的快速变化逐渐趋于成熟、稳定; 当烟囱体在活跃存续数十年之后熄灭, 熄灭后微生物群落逐步发生演替, 在数年内趋于稳定, 并在“年-千年”尺度上保持稳定, 同时在更大的空间尺度上(千公里)对整个深海的碳、氮、硫循环产生千年以上的影响(图1E)。因此, 在今后深海热液区微生物的研究中, 需要借助原位检测和实验室模拟技术, 关注体系稳定存在的时间以及不同状态之间的变化过程, 基于此才能解析群落结构、功能、多样性、演化和适应性的过程和机理, 定量其速率, 评估其影响, 并以时间为切入点, 以今鉴古, 重构早期生命的起源与演化历史。

致谢 感谢上海交通大学的张曼萍博士在本文成文过程中对语言润色的帮助。

参考文献

- 1 Xiao X, Zhang Y, Wang F. Hydrostatic pressure is the universal key driver of microbial evolution in the deep ocean and beyond. *Environ Microbiol Rep*, 2021, 13: 68–72
- 2 Ohara Y, Reagan M K, Fujikura K, et al. A serpentinite-hosted ecosystem in the Southern Mariana Forearc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2831–2835
- 3 Martin W, Baross J, Kelley D, et al. Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 805–814
- 4 Le Bris N, Sarradin P M, Pennec S. A new deep-sea probe for in situ pH measurement in the environment of hydrothermal vent biological communities. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Papers*, 2001, 48: 1941–1951
- 5 Koschinsky A, Garbe-Schönberg D, Sander S, et al. Hydrothermal venting at pressure-temperature conditions above the critical point of seawater, 5°S on the Mid-Atlantic Ridge. *Geology*, 2008, 36: 615–618
- 6 Lonsdale P. Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Res*, 1977, 24: 857–863
- 7 Wang L, Lai Q, Jebbar M, et al. Complete genome sequence of *Methanofervidicoccus* sp. A16, a thermophilic methanogen isolated from Mid Cayman Rise hydrothermal vent. *Mar Genomics*, 2020, 53: 100768
- 8 He T, Li H, Zhang X. Deep-sea hydrothermal vent viruses compensate for microbial metabolism in virus-host interactions. *mBio*, 2017, 8: e00893-00817
- 9 François D X, Godfroy A, Mathien C, et al. *Persephonella atlantica* sp. nov.: how to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats. *Syst Appl Microbiol*, 2021, 44: 126176
- 10 Lim J K, Kim Y J, Yang J A, et al. *Thermococcus indicus* sp. nov., a Fe(III)-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from the Onnuri Vent Field of the Central Indian Ocean ridge. *J Microbiol*, 2020, 58: 260–267
- 11 Fukushi M, Mino S, Tanaka H, et al. Biogeochemical implications of N₂O-reducing thermophilic *Campylobacteria* in deep-sea vent fields, and the description of *Nitratiruptor labii* sp. nov. *iScience*, 2020, 23: 101462
- 12 Fornari D, Von Damm K, Bryce J, et al. The East Pacific Rise between 9°N and 10°N: twenty-five years of integrated, multidisciplinary oceanic spreading center studies. *Oceanography*, 2012, 25: 18–43
- 13 Wang F, Zhou H, Meng J, et al. Geochip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4840–4845
- 14 Huber J A, Butterfield D A, Baross J A. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 1585–1594
- 15 Nercessian O, Reysenbach A L, Prieur D, et al. Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environ Microbiol*, 2003, 5: 492–502
- 16 Hou J, Sievert S M, Wang Y, et al. Microbial succession during the transition from active to inactive stages of deep-sea hydrothermal vent sulfide chimneys. *Microbiome*, 2020, 8: 102
- 17 Meier D V, Pjevac P, Bach W, et al. Microbial metal-sulfide oxidation in inactive hydrothermal vent chimneys suggested by metagenomic and metaproteomic analyses. *Environ Microbiol*, 2019, 21: 682–701
- 18 Zhang X, Du Z, Zheng R, et al. Development of a new deep-sea hybrid Raman insertion probe and its application to the geochemistry of hydrothermal vent and cold seep fluids. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Papers*, 2017, 123: 1–12
- 19 Li L, Zhang X, Luan Z, et al. *In situ* quantitative Raman detection of dissolved carbon dioxide and sulfate in deep-sea high-temperature hydrothermal vent fluids. *Geochem Geophys Geosyst*, 2018, 19: 1809–1823
- 20 Ding K, Seyfried W E. In situ measurement of pH and dissolved H₂ in mid-ocean ridge hydrothermal fluids at elevated temperatures and pressures. *Chem Rev*, 2007, 107: 601–622
- 21 Tan C, Ding K, Seyfried W E, Jr, et al. An *in-situ* chemical sensor system for cabled ocean observatory applications at hydrothermal vents. In: Sivcev S, Coleman J, Adley D, et al., eds. Oceans 2015-MTS/IEEE Washington. Oceans'15 MTS/IEEE Washington. Washington. 2015. New York: IEEE. 2015. 15798511
- 22 Tan C, Jin B, Ding K, et al. A long-term *in situ* calibration system for chemistry analysis of seawater. *J Zhejiang Univ Sci A*, 2010, 11: 701–708

- 23 Zhang Y, Li X, Bartlett D H, et al. Current developments in marine microbiology: high-pressure biotechnology and the genetic engineering of piezophiles. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 33: 157–164
- 24 Zhao W S, Xiao X. Life in a multi-extreme environment: *Thermococcales* living in deep sea hydrothermal vents (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 470–481 [赵维旻, 肖湘. 多重极端环境中的生命: 深海热液中的超嗜热古菌 *Thermococcales*. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 470–481]
- 25 Gu J, Wang X, Ma X, et al. Unexpectedly high mutation rate of a deep-sea hyperthermophilic anaerobic archaeon. *ISME J*, 2021, 15: 1862–1869
- 26 Drake J W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7160–7164
- 27 Zhao W, Zeng X, Xiao X. *Thermococcus eurythermalis* sp. nov., a conditional piezophilic, hyperthermophilic archaeon with a wide temperature range for growth, isolated from an oil-immersed chimney in the Guaymas Basin. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65: 30–35
- 28 Zhao W, Xiao X. Complete genome sequence of *Thermococcus eurythermalis* A501, a conditional piezophilic hyperthermophilic archaeon with a wide temperature range, isolated from an oil-immersed deep-sea hydrothermal chimney on Guaymas Basin. *J Biotechnol*, 2015, 193: 14–15
- 29 Zhao W, Ma X, Liu X, et al. Cross-stress adaptation in a piezophilic and hyperthermophilic archaeon from deep sea hydrothermal vent. *Front Microbiol*, 2020, 11: 2081
- 30 Yang S, Lv Y, Liu X, et al. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by anaerobic methanotrophic archaea. *Nat Commun*, 2020, 11: 3941
- 31 Ling G N. The physical state of water in living cell and model systems. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 125: 401–417
- 32 Golubev V, Ivlev D, Nikiforov M Y, et al. Method of calculation of gas solubility in water-salt systems at various temperatures and pressures. *Izv Vyssh Uchebn Zaved, Khim Khim Tekhnol*, 2014, 57: 73–77
- 33 Li L, Zhang X, Luan Z, et al. Hydrothermal vapor-phase fluids on the seafloor: evidence from *in situ* observations. *Geophys Res Lett*, 2020, 47: e85778
- 34 Root L J, Berne B J. Effect of pressure on hydrogen bonding in glycerol: a molecular dynamics investigation. *J Chem Phys*, 1997, 107: 4350–4357
- 35 Shrestha U R, Bhowmik D, Copley J R D, et al. Effects of pressure on the dynamics of an oligomeric protein from deep-sea hyperthermophile. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13886–13891
- 36 Tros M, Zheng L, Hunger J, et al. Picosecond orientational dynamics of water in living cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 1–7
- 37 Martinez N, Michoud G, Cario A, et al. High protein flexibility and reduced hydration water dynamics are key pressure adaptive strategies in prokaryotes. *Sci Rep*, 2016, 6: 32816
- 38 Lande M B, Donovan J M, Zeidel M L. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J Gen Physiol*, 1995, 106: 67–84
- 39 Imanaka T. Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles. *Proc Jpn Acad Ser B*, 2011, 87: 587–602
- 40 Chong P L G. Archaeobacterial bipolar tetraether lipids: physico-chemical and membrane properties. *Chem Phys Lipids*, 2010, 163: 253–265
- 41 Ulrikh N P, Gmajner D, Raspor P. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84: 249–260
- 42 Daniel I, Oger P, Winter R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem Soc Rev*, 2006, 35: 858–875
- 43 Simonato F, Campanaro S, Lauro F M, et al. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J Biotechnol*, 2006, 126: 11–25
- 44 Somero G N. Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annu Rev Physiol*, 1992, 54: 557–577
- 45 Boyd E S, Hamilton T L, Wang J, et al. The role of tetraether lipid composition in the adaptation of thermophilic archaea to acidity. *Front Microbiol*, 2013, 4: 62
- 46 Kates M. Biology of halophilic bacteria, part II. *Experientia*, 1993, 49: 1027–1036
- 47 Cario A, Grossi V, Schaeffer P, et al. Membrane homeoviscous adaptation in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1152
- 48 Chong P L G, Zein M, Khan T K, et al. Structure and conformation of bipolar tetraether lipid membranes derived from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* as revealed by small-angle X-ray scattering and high-pressure FT-IR spectroscopy. *J Phys Chem B*, 2003, 107: 8694–8700
- 49 Chong P L G, Ravindra R, Khurana M, et al. Pressure perturbation and differential scanning calorimetric studies of bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophys J*, 2005, 89: 1841–1849
- 50 Melnikov E E, Rotanova T V. Molecular chaperones. *Russ J Bioorg Chem*, 2010, 36: 1–10
- 51 Hartl F U, Martin J. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5: 92–102

-
- 52 Bohnert H J, Shen B. Transformation and compatible solutes. [Sci Hortie](#), 1998, 78: 237–260
- 53 Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2006, 72: 623–634
- 54 Santos H, Lamosa P, Faria T Q, et al. The physiological role, biosynthesis, and mode of action of compatible solutes from (hyper) thermophiles. In: Gerday C, Glansdorff N, eds. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. Washington, D.C: ASM Press, 2007. 86–103
- 55 Antranikian G, Egorova K. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. In: Gerday C, Glansdorff N, eds. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. Washington, D.C: ASM Press, 2007. 359–406
- 56 Santos H, da Costa M S. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. [Environ Microbiol](#), 2002, 4: 501–509
- 57 Michoud G, Jebbar M. High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. [Sci Rep](#), 2016, 6: 1
- 58 Cario A, Jebbar M, Thiel A, et al. Molecular chaperone accumulation as a function of stress evidences adaptation to high hydrostatic pressure in the piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. [Sci Rep](#), 2016, 6: 1–8
- 59 Salvador-Castell M, Golub M, Martinez N, et al. The first study on the impact of osmolytes in whole cells of high temperature-adapted microorganisms. [Soft Matter](#), 2019, 15: 8381–8391
- 60 Schönheit P, Schäfer T. Metabolism of hyperthermophiles. [World J Microbiol Biotechnol](#), 1995, 11: 26–57
- 61 Jaenicke R, Sterner R. Life at high temperatures. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al., eds, *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006. 167–209
- 62 Hachisuka S I, Sato T, Atomi H. Metabolism dealing with thermal degradation of NAD⁺ in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. [J Bacteriol](#), 2017, 199: e00162-17
- 63 Kim Y J, Lee H S, Kim E S, et al. Formate-driven growth coupled with H₂ production. [Nature](#), 2010, 467: 352–355

Microbiome and environmental adaption mechanisms in deep-sea hydrothermal vents

ZHAO WeiShu^{1,3} & XIAO Xiang^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519080, China;

3 International Center for Deep Life Investigation (IC-DLI), Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

The deep-sea hydrothermal vents are typical deep-sea high-temperature environments. The sharp physical and chemical gradients around the hydrothermal vents serve as energy sources for microorganisms living there, and support great biomass and productivity. As a result, deep-sea hydrothermal vents possess the most abundant microbial diversity on the Earth. Microorganisms living around the hydrothermal vents are faced with multiple environmental stresses, such as deep-sea high hydrostatic pressure, as well as fluctuations of temperature, pH, salinity, redox stage and so on. Because their physical and chemical characteristics are similar to those of early earth, hydrothermal vents are considered to be a potential candidate for the origin of life. Understanding the environmental adaptation, life boundary and evolution process of microorganisms living under the extreme conditions of deep-sea hydrothermal vents can help us realize how early life survive on the ancient Earth, which provides scientific cognition and theoretical foundation for exploring origin of life, revealing co-evolution of life and earth, and even investigating extraterritorial life. In the past four decades, studies on the deep-sea hydrothermal vents have produced a large number of research articles and reviews. Compared with previous reviews, this review is based on the new cognition due to developing techniques in deep-sea *in-situ* exploration and laboratory simulations. We systematically generalized recent cutting-edge researches, from macro to micro scales, in three aspects: formation and succession of the ecosystem in hydrothermal vent, formation of microbiological diversity, and environmental adaptation of microorganisms to the multiple extreme conditions. Besides focusing on the spatial scale, we also called on researchers to pay attention to the significance and impacts of time scales in research areas as mentioned above, with support from the new techniques.

deep-sea hydrothermal vent, extremophile, environmental adaptation, microbiome, diversity

doi: [10.1360/SSV-2021-0353](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0353)