第56卷 第2期
2026年2月

中国海洋大学学报
PERIODICAL OF OCEAN UNIVERSITY OF CHINA

56(2):060~070
Feb., 2026

马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物异养细菌的分离培养及分类鉴定*

黄 蓉[1], 刘荣华[1], 刘吉文[1,2], 张晓华[1,2]**

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛海洋科技中心海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘 要: 为探究马里亚纳海沟深部沉积物可培养异养细菌的多样性,本文以2020年7月从挑战者深渊10 816 m处采集的柱状沉积物为研究对象,选取沉积物表层及不同深度处采集的样品,尝试通过多种富集及分离培养方式提高极端环境样品中的海洋细菌可培养性,分别在4、16和28 ℃下,采用2种固体培养基(MA和R2A)直接涂布培养和3种富集培养基(IMB、IMB-DMSP和IMB-Rpf)富集培养,对获得的517株异养细菌进行16S rRNA基因序列比对,并对潜在新型细菌进行初步分类鉴定。研究发现,分离出的517株细菌分属于4门(变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes))、8纲、30目、42科、74属和144种。不同的富集策略可分离出不同的海洋细菌,利用IMB-Rpf培养基可培养出更多的微生物种类,复苏因子DMSP和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)培养液上清的添加对沉积物中不同的可培养微生物类群具有选择性富集效果,且不同深度沉积物之间的微生物类群存在差异。从上述4个门中共筛选出51株代表潜在新分类单元的细菌,其中包含3个潜在新属和41个潜在新种。这些潜在新分类单元的细菌大多数分离自添加了复苏因子的富集培养基,其中有2株属于鞘脂杆菌纲(Sphingobactenia),该纲细菌以往未在马里亚纳海沟沉积物中被分离出来。本研究结果将为后续科学研究提供大量的深海菌株资源,并为深海极端环境下微生物的分离和培养提供新思路。

关键词: 马里亚纳海沟;深部沉积物;异养细菌;富集培养;分离鉴定

中图法分类号: Q938.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5174(2026)02-060-11

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxb.20240313

引用格式: 黄蓉, 刘荣华, 刘吉文, 等. 马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物异养细菌的分离培养及分类鉴定[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2026, 56(2): 60-70.

Huang Rong, Liu Ronghua, Liu Jiwen, et al. Isolation and taxonomic identification of cultivable heterotrophic bacteria from deep sediment of the Mariana Trench[J]. Periodical of Ocean University of China, 2026, 56(2): 60-70.

马里亚纳海沟(Mariana Trench)是地球上最深的海沟,位于北太平洋西部,大部分区域水深超过8 km。挑战者深渊是马里亚纳海沟的最深处,深达11 km,被认为是海洋中最深的地方。这里环境极端恶劣,具有超高净水压力、持续低温和黑暗等特征。同时,马里亚纳海沟具有独特的漏斗状地貌与特殊的沉积作用,使之成为有机质的富集区,滋养着大量微生物,其中不乏尚未被分离鉴定的新型细菌[1]。

1976年,Morita等[2]率先从马里亚纳海沟沉积物中分离出耐压假单胞菌(*Pseudomonas bathycetes*),从此这一特殊环境中的微生物逐渐被培养和鉴定。现已发现马里亚纳海沟沉积物中生存着大量的深海细菌,包括非嗜极细菌和多种嗜极细菌,如嗜压菌[3-4],其中许多菌属于未被报道的新分类单元[5-8],这表明马里亚纳海沟沉积物中蕴藏着许多尚未被发现和鉴定的微生物。深海极端环境中的微生物可能拥有独特的生理和代谢特性,对这些微生物进行研究有助于揭示生命在极端环境中的演化路径和适应机制[9]。目前已有研究对深海微生物的培养方法进行探讨,但不同富集及分离培养条件对这些微生物的影响尚缺乏系统性的比较。

微生物富集培养是一种从复杂环境中分离出特定微生物的方法,该方法通过特定培养条件选择性地促进目标微生物种群的生长和增殖,最终分离出特定微生物[10-12]。该方法通过优化培养基成分和环境参数,增强了目标微生物的竞争优势,从而实现富集和纯化[13]。二甲基巯基丙酸内盐(Dimethylsulfoniopropionate,DMSP)是一种重要的海洋渗透调节剂,以往研究发现,马里亚纳海沟深海水体和沉积物中的细菌能

* 基金项目:国家自然科学基金项目(92251303);山东省自然科学基金项目(ZR2024JQ006)资助
Supported by the National Natural Science Foundation of China(92251303); the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2024JQ006)
收稿日期:2024-09-18;修订日期:2024-11-07
作者简介:黄 蓉(1999—),女,硕士生。E-mail: roe_hwang@163.com
** 通信作者:张晓华,女,博士,教授。E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

够合成 DMSP，用以抵抗深渊超高静水压力[14]。受低温和寡营养影响，海洋环境中的许多细菌处于活的非可培养状态（Viable but non-cultivable state，VBNC），这些细菌需要先从休眠状态中复苏，才能恢复可培养状态[15]。藤黄微球菌（*Mcrococcus luteus*）分泌的一种蛋白类复苏促进因子（Resuscitation-promoting factor，Rpf）具有肽聚糖水解酶活性[16]，能使休眠中的细菌复苏[17]。在未可培养细菌的细胞壁中，惰性肽聚糖取代了新生肽聚糖，形成茧状结构的被膜，而 Rpf 可溶解惰性细胞壁，从而促进 VBNC 细菌的复苏生长；Rpf 作用细胞壁后释放的小分子物质亦可作为信号物质参与后续复苏过程[18]。在一定条件下，Rpf 还可以刺激正常细胞，包括高 GC 含量革兰氏阳性菌的生长[19]。目前已有研究发现，添加藤黄微球菌培养液上清（含天然 Rpf）的培养基能够显著促进水体和土壤样品中的细菌生长，增加可培养细菌的数量和种类[16]。

本研究以 2020 年 7 月从马里亚纳海沟挑战者深渊 10 816 m 处采集的柱状沉积物为研究对象，采用多种培养策略，从不同深度的沉积物样品中富集和培养异养细菌，并对其进行分离纯化及 16S rRNA 基因鉴定，还通过对获得的潜在新型细菌进行初步分类鉴定明确其系统发育地位。本研究结果将为后续科学研究提供大量的深海菌株资源，并为深海极端环境下微生物的分离和培养提供新思路。

1　材料与方法

1.1 样品采集

本研究中，马里亚纳海沟挑战者深渊（11°19.904′N，142°12.083′E）沉积物样品是乘“东方红 3 号”科考船于 2020 年 7 月采集的，采样水深为 10 816 m，重力柱长约 7.5 m。样品采集后，在现场按照每段 50 cm 长度进行切割，储存至船载－80 ℃超低温冰箱。样品运送至实验室后，先置于 4 ℃下进行初步解冻，随后进行精细的样品切割。将采集的沉积物划分为浅层（0～28 cm，共 14 层）、中层（43～176 cm，共 8 层）及深层（200～700 cm，共 8 层）。称取沉积物样品约 0.4 g 于 10 mL 无菌氯化钠溶液（2%，*W*/*V*）中混匀，以作为沉积物原液。

1.2 培养基

本研究分离异养细菌采用的固体培养基为 MA（Marine agar）和 R2A（Reasoner’s 2A Agar）培养基，富集培养用的液体培养基为改良的 MB（Improved marine broth，IMB）培养基、添加 DMSP 的 IMB（IMB-DMSP）培养基和添加藤黄微球菌培养液上清的 IMB（IMB-Rpf）培养基（见表 1）。MA 培养基是一种专门用于培养海洋异养细菌的培养基，其成分模拟了海洋环境的盐浓度和养分。R2A 培养基较 MA 培养基的营养浓度更低，适用于分离寡营养环境下的海洋异养细菌。IMB 培养基是将 MB 培养基中的营养成分酵母提取物和蛋白胨分别稀释 5 倍和 25 倍，并添加丙酮酸钠和乙酸钠，以减少培养过程中优势菌代谢产生的过氧化物、自由基以及拮抗物质的毒害作用，从而诱导细菌从 VBNC 恢复。MA 培养基、R2A 培养基和 IMB 培养基的配置方法参考孙创等[20]提出的方法。

IMB-DMSP 培养基中添加了 DMSP，后者是一种重要的海洋渗透调节剂，可提高深海微生物在实验室培养中的适应性[14]。IMB-Rpf 培养基是在 IMB 培养基的基础上添加了 10%的藤黄微球菌培养液上清，该上清中含有具有肽聚糖水解酶活性的蛋白因子，能促进 VBNC 细菌的复苏，增加可培养细菌的数量[19]。藤黄微球菌培养液上清的制备方法参考李云琪等[16]提出的方法。

表 1　培养基及配方

Table 1　Media composition and formulations

培养基 Media	培养基配方 Media composition and formulations
MA 培养基 MA medium	蛋白胨 5 g、酵母提取物 1 g、$FePO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g、海水 1 L、琼脂 20 g（pH ＝7.6）
R2A 培养基 R2A medium	葡萄糖 0.5 g、R2A 专用蛋白胨 0.5 g、可溶性淀粉 0.5 g、酵母提取物 0.5 g、$C_3H_3NaO_3$ 0.3 g、酸水解酪素 0.5 g、海水 750 mL、蒸馏水 250 mL、琼脂 20 g（pH ＝7.5）
IMB 培养基 IMB medium	NH_4Cl 1.0 g、CH_3COONa 2.0 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、酵母提取物 0.2 g、蛋白胨 0.2 g、EDTA-Na_2 1.0 g、$C_3H_3NaO_3$ 1.1 g、海水 1 L、10 mL 2%（*W*/*V*）KH_2PO_4、10 mL 10%（*W*/*V*）$NaHCO_3$（pH ＝7.5）
IMB-DMSP 培养基 IMB-DMSP medium	NH_4Cl 1.0 g、CH_3COONa 2.0 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、酵母提取物 0.2 g、蛋白胨 0.2 g、EDTA-Na_2 1.0 g、$C_3H_3NaO_3$ 1.1 g、海水 1 L、10 mL 2%（*W*/*V*）KH_2PO_4、10 mL 10%（*W*/*V*）$NaHCO_3$、330 μL 200 mmol/L DMSP（pH ＝7.5）
IMB-Rpf 培养基 IMB-Rpf medium	NH_4Cl 1.0 g、CH_3COONa 2.0 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、酵母提取物 0.2 g、蛋白胨 0.2 g、EDTA-Na_2 1.0 g、$C_3H_3NaO_3$ 1.1 g、海水 880 mL、10 mL 2%（*W*/*V*）KH_2PO_4、10 mL 10%（*W*/*V*）$NaHCO_3$、100 mL 藤黄微球菌培养液上清（pH ＝7.5）

1.3 细菌的富集培养和分离纯化

对不同深度的沉积物样品均采用平板直接涂布法和富集培养法 2 种方式进行微生物分离培养。直接涂布培养方式如下：吸取 1 mL 沉积物原液，用生理盐水

(0.85%,*W*/*V*)按 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3} 和 10^{-4} 的浓度进行梯度稀释,分别吸取后 3 个稀释度的培养液 200 μL,涂布于 MA 和 R2A 平板上,分别置于 4、16 和 28 ℃恒温培养箱中静置培养,培养 3 和 7 d 后选取形态不同的单菌落,每个单菌落作为一株进行计数,采用四区划线法接种于新鲜的原固体培养基上,并在原温度下进行培养,将得到的单菌落继续采用划线法分离纯化 3 次,并进行菌种保藏。富集培养具体流程如下:取 500 μL 沉积物原液置于 30 mL IMB、IMB-DMSP 和 IMB-Rpf 培养基中,前者分别培养 3 和 7 d,后两者培养 21 d。富集培养结束后,自富集体系中吸取培养液 1 mL,同样用生理盐水按梯度稀释后涂布在 MA 和 R2A 培养基平板上,分别置于 4、16 和 28 ℃进行培养,培养 3 d 后进行异养细菌的分离纯化。

1.4 细菌基因组提取和 16S rRNA 基因序列扩增

采用煮沸法[21]进行细菌基因组 DNA 的提取,对于煮沸法难以提取其 DNA 的菌株,先采用酶解法[22]将细菌细胞裂解,再使用细菌基因组提取试剂盒(Fast-Pure Bacteria DNA Isolation Mini Kit-BOX 2,供应商:南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行提取。以提取的细菌 DNA 为模板,使用通用引物 B8F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 B1510R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)[23]进行 16S rRNA 基因扩增[24]。采用 BsuRI酶对 PCR 扩增产物进行酶切[25],经琼脂糖凝胶电泳观察条带,选取不同酶切带型的扩增基因送至华大基因有限公司(青岛)进行单向测序。

1.5 16S rRNA 基因序列比对与系统进化树构建

采用 Chromas 软件对测序得到的 DNA 峰图进行质量检查,然后将得到的高质量 16S rRNA 基因序列(≥311 nt)上传至 Ezbiocloud 数据库(http://www.ezbiocloud.net/)进行 BLAST 同源性序列比对(比对时间 2024 年 6 月)。以 16S rRNA 基因序列相似度 98.65%作为区分不同物种的阈值[26-27],若相似度大于 98.65%,则认为该菌株与其最相似菌株为同种,若相似度低于 98.65%,则被认为是潜在新菌[26]。下载最相似菌株的 16S rRNA 基因序列,用 Chromas 软件的 Clustal X 功能模块截齐,再利用 Mega7.0 软件选用邻接法构建系统进化树,并用 iTOL 在线软件(https://itol.embl.de/)进一步美化进化树[28]。在分得的 517 株异养细菌中,通过 16S rRNA 基因共鉴定出 144 个种,将每个种的代表性 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank 数据库,获得的登录号为 PQ248404—PQ248481、PQ524530—PQ524595。

2 结果

2.1 挑战者深渊沉积物可培养细菌的多样性

本研究采用多种培养策略,共从马里亚纳海沟挑战者深渊不同深度的沉积物样品中分离获得 517 株异养细菌。16S rRNA 基因测序结果表明,这些细菌分属于 4 门、8 纲、30 目、42 科、74 属、144 种。在门水平上,变形菌门(Proteobacteria,196 株,分属于 44 种,占比 30.56%)为最优势类群,其次为厚壁菌门(Firmicutes,174 株,分属于 37 种,占比 25.69%)、放线菌门(Actinobacteria,143 株,分属于 60 种,占比 41.67%)和拟杆菌门(Bacteroidetes,4 株,分属于 3 种,占比 2.08%)(见图 1(A))。在纲水平上,这些菌主要来自芽孢杆菌纲(Bacilli,174 株,37 种,25.69%)、放线菌纲(Actinomycetia,143 株,60 种,41.67%)、α-变形菌纲(Alphaproteobacteria,104 株,24 种,16.67%)和 γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria,91 株,19 种,13.19%)。鞘脂杆菌纲(Sphingobacteriia,2 株,1 种)、β-变形菌纲(Betaproteobacteria,1 株)、噬纤维菌纲(Cytophagia,1 株)和黄杆菌纲(Flavobacteriia,1 株)合计 5 株,占总菌种数的 2.78%(见图 1(B))。

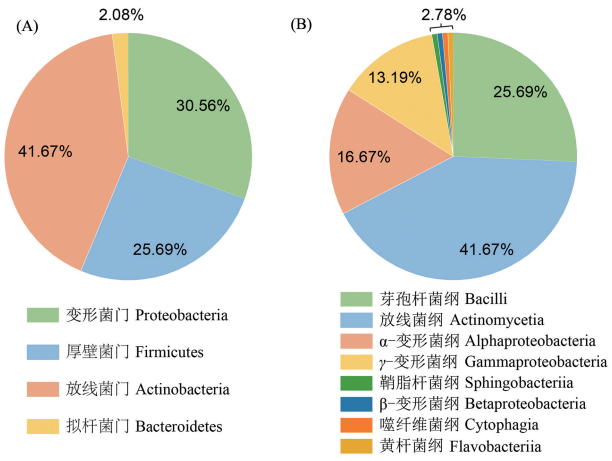


图 1 马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物可培养细菌门(A)和纲(B)水平群落组成

Fig. 1 The community composition of culturable bacteria at the phylum (A) and class (B) levels from sediment of the Challenger Deep of the Mariana Trench

在目水平上,隶属芽孢杆菌纲的芽孢杆菌目(Bacillales)是获得的可培养异养细菌数目和种类最多的目,共有 169 株(分属于 34 种),其后按细菌数目由高到低排列依次为假单胞菌目(Pseudomonadales,59 株,11 种)、微球菌目(Micrococcales,58 株,19 种)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales,45 株,9 种)、微杆菌目(Microbacteriales,42 株,12 种)、红细菌目(Rhodobacterales,32 株,9 种)、根瘤菌目(Rhizobiales,22 株,3 种)、海洋螺菌目(Oceanospirillales,21 株,3 种)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales,13 株,6 种)、Dermabacterales(7 株,2 种)、Brevibacteriales(6 株,6 种)、乳杆菌目

(Lactobacillales,5株,3种)、肠杆菌目(Enterobacterales,5株,1种)、柄杆菌目(Caulobacterales,4株,2种)、分枝杆菌目(Mycobacteriales,4株,4种)、Dermatophilales(4株,3种)、溶杆菌目(Lysobacterales,4株,3种)、Bogoriellales(3株,2种)、Geodermatophilales(2株,2种)和鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales,2株,1种)的细菌。除此之外,本研究还分离得到红螺菌目(Rhodospirillales)、噬纤维菌目(Cytophagales)、Cellulomonadales、链霉菌目(Streptomycetales)、Beutenbergiales、伯克氏菌目(Burkholderiales)、着色菌目(Chromatiales)、假诺卡氏菌目(Pseudonocardiales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)和莫拉氏菌目(Moraxellales)的菌株各1株。

本研究中最优势的芽孢杆菌纲中包含18个属,其中大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)为第一大属,共44株细菌,分属于2个种,第二大属为*Mammaliicoccus*(33株,1种)。此外,该纲还包括普里斯特氏菌属(*Priestia*,20株,1种)、*Cytobacillus*(14株,4种)、游动球菌属(*Planococcus*,12株,3种)、芽孢杆菌属(*Bacillus*,10株,4种)和伪芽胞杆菌属(*Fictibacillus*,10株,2种)等。第二大纲放线菌纲中包含29个属,包括农球菌属(*Agrococcus*,27株,4种)、微球菌属(*Micrococcus*,19株,2种)、节杆菌属(*Arthrobacter*,12株,3种)、*Citricoccus*(8株,1种)、微杆菌属(*Microbacterium*,8株,5种)、柠檬球菌属(*Leucobacter*,7株,3种)、小短杆菌属(*Brachybacterium*,7株,2种)、考克氏菌属(*Kocuria*,7株,4种)、谷氨酸杆菌属(*Glutamicibacter*,6株,1种)、短杆菌属(*Brevibacterium*,6株,1种)及类诺卡氏菌属(*Nocardioides*,6株,1种)等。α-变形菌纲中含有13个属,优势属包括袁其朋菌属(*Qipengyuania*,32株,4种)、副球菌属(*Paracoccus*,25株,7种)、*Aliihoeflea*(16株,1种)、*Cereibacter*(6株,1种)和*Pelagerythrobacter*(5株,1种)等。γ-变形菌纲中包括10个属,其中占比最高的是嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*,30株,1种),其后占比由高到低依次为*Stutzerimonas*(24株,1种)、色盐杆菌属(*Chromohalobacter*,13株,5种)、*Alloalcanivorax*(8株,2种)和*Mixta*(5株,1种)。此外,本文中分离自鞘脂杆菌纲的2株细菌均为*Pedobacter*属的*Pedobacter indicus*,而β-变形菌纲、噬纤维菌纲和黄杆菌纲各含有1株细菌,分别属于海洋杆菌属(*Pontibacter*)、马赛菌属(*Massilia*)和维诺格拉斯基氏菌属(*Winogradskyella*),且这5株细菌均为16S rRNA基因相似度小于98.65%的潜在新菌。

以上研究结果表明,马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物的可培养异养细菌具有极高的多样性。

2.2 挑战者深渊不同深度沉积物中可培养异养细菌的多样性

为比较不同深度沉积物样品中的可培养菌多样性,根据沉积物中理化参数的变化情况,本研究将所有样品划分为浅部(0～28 cm)、中部(43～176 cm)及深部(200～700 cm)三个组别。分析发现,从浅部泥样中分离出318株(70种)可培养细菌,其中包含12株(9种)潜在新菌,分属于变形菌门、厚壁菌门和放线菌门,其优势门为变形菌门;从中部泥样中分离出83株(28种)可培养细菌,其中包含13株(10种)潜在新菌,其优势门为厚壁菌门,优势纲为芽孢杆菌纲,潜在新菌率为35.71%;深部泥样中分离出116株(64种)可培养细菌,其中包含26株(21种)潜在新菌,其优势类群为放线菌门下的放线菌纲,其次为α-变形菌纲和芽孢杆菌纲,潜在新菌率为32.81%。

本研究分离获得的4个门中,变形菌门、厚壁菌门和放线菌门的细菌从浅部、中部和深部泥样中均可分离出,而拟杆菌门的细菌仅从中部和深部泥样中分离出。此外,从浅部、中部和深部泥样中均分离出芽孢杆菌纲、放线菌纲、α-变形菌纲和γ-变形菌纲,噬纤维菌纲和黄杆菌纲均仅从中部泥样中分离出,而鞘脂杆菌纲和β-变形菌纲均只从深部泥样中分离出。从不同深度中分离出的主要可培养微生物类群的差异可能说明,不同深度沉积物之间的微生物类群存在差异。

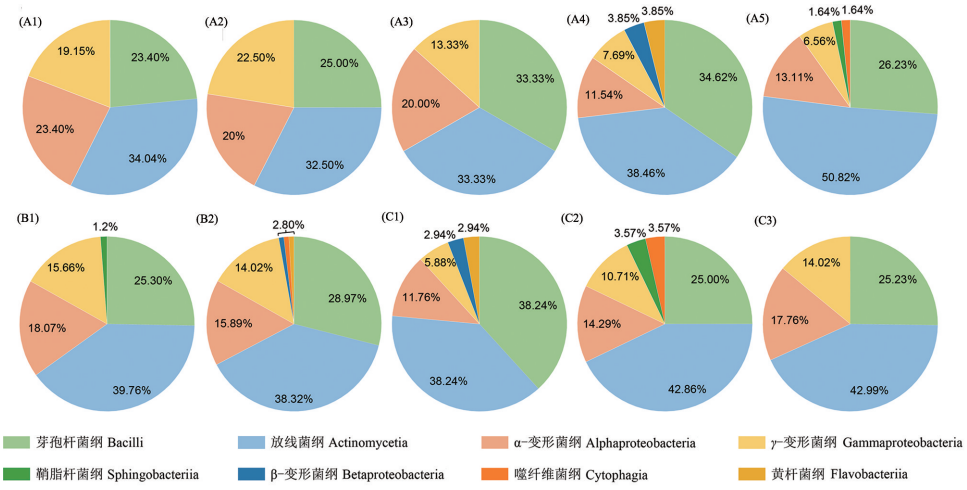
2.3 采用不同培养方法获得的异养细菌多样性

通过直接涂布、IMB培养基富集培养3和7d后这3种方式,分别分离获得94株(47种)、186株(41种)和44株(15种)可培养细菌,这些细菌均分属于变形菌门、放线菌门和厚壁菌门,变形菌门为直接涂布(41株,20种)和IMB培养基富集培养3d(100株,17种)2种方式所得可培养细菌的主要类群,而IMB富集培养7d后仅获得5种可培养微生物,分属于3个门。在纲水平上,这3种培养方式中均只分离出4纲(放线菌纲、芽孢杆菌纲、α-变形菌纲、γ-变形菌纲)。在直接涂布的样品中(见图2(A1)),放线菌纲(29株,16种,种占比34.04%)占比略高于其他3纲(芽孢杆菌纲(24株,11种,种占比23.40%),α-变形菌纲(17株,11种,种占比23.40%),γ-变形菌纲(24株,9种,种占比19.15%));在IMB培养基富集3d的样品(见图2(A2))中,α-变形菌纲(47株,8种,种占比20%)、γ-变形菌纲(53株,9种,种占比22.5%)和芽孢杆菌纲(57株,10种,种占比25%)为主要类群,放线菌纲(28株,13种,种占比32.5%)在菌株数量上占比最低,但具有最高的种数;从IMB富集培养基富集7d的样品(见图2(A3))中分离出9株α-变形菌纲(3种,种占比20%)、2株γ-变形菌纲(2种,种占比13.33%)、8株芽孢杆菌纲(5种,种

占比 33.33%)和 24 株放线菌纲(5 种,种占比 33.33%),放线菌纲的菌株占比远高于其他 3 纲。这说明富集过程中,微生物的类群随着时间变化产生差异。分别如图 2(A4)和图 2(A5)所示,利用 IMB-DMSP 和 IMB-Rpf 培养基富集培养这 2 种方式,分别分离出 79 株(26 种)和 104 株(61 种)可培养细菌,包括 4 株(3 种)拟杆菌门细菌,通过 IMB-Rpf 培养基富集培养而获得的最优势类群为放线菌门的放线菌纲(46 株,31 种,种占比 50.82%),而通过 IMB-DMSP 培养基富集培养而获得的细菌类群主要为放线菌纲(13 株,10 种,种占比 38.46%)及厚壁菌门的芽孢杆菌纲(58 株,9 种,种占比 34.62%),这说明不同的复苏因子添加可对泥样中不同的可培养微生物群体具有选择性富集效果。在上述 5 种培养方法中,IMB-Rpf 培养基分离获得的潜在新菌率最高(种占比 32.79%),其次为 IMB-DMSP 培养基(种占比 30.77%)。

此外,本研究采用 MA 和 R2A 平板培养基对挑战者深渊沉积物样品中的微生物进行分离培养。分别如图 2(B1)和图 2(B2)所示,两种培养基所获得的最优势门均为变形菌门,最优势纲均为芽孢杆菌纲(MA:89 株,33 种,种占比 25.3%;R2A:85 株,31 种,种占比 28.97%),但种类最多的纲为放线菌纲(MA:66 株,33 种,种占比 39.76%;R2A:77 株,41 种,种占比 38.32%)。其中,鞘脂杆菌纲(2 株,1 种,种占比 1.2%)仅在 MA 固体培养基中分离出,β-变形菌纲、噬纤维菌纲和黄杆菌纲仅在 R2A 培养基中被分离获得(各 1 种,总占比 2.8%(种占比))。本研究还将马里亚纳海沟深部沉积物微生物置于 4、16 和 28 ℃下进行分离培养,分离培养结果分别如图 2(B3)、图 2(B4)和图 2(B5)所示。在门水平上,4 和 16 ℃下均能分离培养出厚壁菌门(4 ℃:15 株,13 种,种占比 38.24%;16 ℃:16 株,7 种,种占比 25%)、放线菌门(4 ℃:16 株,13 种,种占比 38.24%;16 ℃:14 株,12 种,种占比 42.86%)、变形菌门(4 ℃:14 株,6 种,种占比 17.64%;16 ℃:17 株,8 种,种占比 28.57%)和拟杆菌门(4 ℃:2 株,2 种,种占比 5.88%;16 ℃:2 株,1 种,种占比 3.57%)的菌株,而以 28 ℃作为培养温度的环境中仅能培养出变形菌门(165 株,34 种,种占比 31.78%)、放线菌门(113 株,46 种,种占比 42.99%)、厚壁菌门(143 株,27 种,种占比 25.23%)的细菌,未分离出拟杆菌门的细菌。

总体上,相较于直接涂布,通过富集培养的方式从沉积物样中获得可培养微生物的种类明显更多,而不同的富集时间、不同复苏因子的添加,均可对培养出的微生物种类及潜在新菌数量产生影响。通过添加 DMSP 和藤黄微球菌复苏因子进行富集培养,使更多先前未曾被分离培养出的异养细菌得以生长。此外,本研究采用 MA 和 R2A 平板培养基对挑战者深渊沉积物样品中的微生物进行分离培养(见图 2(B1)和图 2(B2))。结果显示,利用这两种培养基培养所获得的最优势门均为变形菌门,最优势纲均为芽孢杆菌纲。其中,β-变形菌纲、噬纤维菌纲和黄杆菌纲仅在 R2A 培养基中被分离获得,鞘脂杆菌纲仅在 MA 固体培养基中被分离出。本研究还将马里亚纳海沟深部沉积物微生物置于 4、16 和 28 ℃下进行分离培养(见图 2(C1)—(C3)),在门水平上,4 和 16 ℃下均能分离培养出厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和拟杆菌门的菌株,而以 28 ℃作为培养温度的环境中仅能培养出变形菌门、放线菌门和厚壁菌门的细菌,未分离出拟杆菌门的细菌。



((A1) 直接涂布;(A2) IMB 培养基富集培养 3 d;(A3) IMB 培养基富集培养 7 d;(A4) IMB-DMSP 富集培养;(A5) IMB-Rpf 富集培养;(B1) MA 培养基;(B2)R2A 培养基;(C1) 4 ℃;(C2)16 ℃;(C3) 28 ℃。(A1) Direct plating; (A2) IMB medium for 3 days; (A3) IMB medium for 7 days; (A4) IMB-DMSP medium; (A5) IMB-Rpf medium; (B1) MA medium; (B2) R2A medium; (C1) 4 ℃; (C2) 16 ℃; (C3) 28 ℃.)

图 2 不同培养方法下的马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物纲水平可培养细菌多样性

Fig. 2 Diversity of culturable bacteria at the class level from sediment of the Challenger Deep of the Mariana Trench under different cultivation methods

2.4 马里亚纳海沟沉积物可培养细菌中的潜在新菌

本研究所获得的 517 株可培养异养细菌中，有 51 株细菌与其最相似物种的 16S rRNA 基因相似度不超过 98.65%，为潜在新分类单元(见表 2)，占本研究分离出的总菌株数量的 10.21%，且有 3 株细菌与其最相似物种的 16S rRNA 基因相似度不超过 94.50%，为潜在新属[29]。这些潜在新分类单元分属 4 门、8 纲、20 目、22 科、37 属、41 种。其中，绝大多数潜在新分类单元分离自富集培养基。将本研究分离培养获得的 51 株潜在新分类单元与其已知最相似菌株共同构建基于 16S rRNA 基因的邻接系统进化树，如图 3 所示。

表 2　从挑战者深渊沉积物中分离出的潜在新菌种类

Table 2　Diversity of potential novel bacteria isolated from Challenger Deep sediments

菌株编号 Strain number	门 Phylum	纲 Class	最相似菌株及编号 Top-hit taxon and strain	16S rRNA 基因相似度 16S rRNA gene similarity/%
RHL733	放线菌门	放线菌纲	*Serinibacter arcticus* K3-2	97.20
RHL038	放线菌门	放线菌纲	*Georgenia yuyongxinii* Z443	98.49
RHL014	放线菌门	放线菌纲	*Brevibacterium anseongense* Gsoil 188	98.50
HR031	放线菌门	放线菌纲	*Brachybacterium paraconglomeratum* LMG 19861	98.63
RHL285	放线菌门	放线菌纲	*Ornithinimicrobium tianjinense* B2	95.65
RHL198	放线菌门	放线菌纲	*Ornithinimicrobium tianjinense* B2	95.82
RHL565	放线菌门	放线菌纲	*Geodermatophilus obscurus* DSM 43160	98.17
RHL877	放线菌门	放线菌纲	*Agrococcus citreus* IAM 15145	98.65
RHL881	放线菌门	放线菌纲	*Leucobacter denitrificans* M1T8B10	97.30
HR048	放线菌门	放线菌纲	*Microbacterium foliorum* DSM 12966	96.87
R07	放线菌门	放线菌纲	*Microbacterium foliorum* DSM 12966	98.17
RHL776	放线菌门	放线菌纲	*Microbacterium murale* 1-Gi-001	98.38
RHL777	放线菌门	放线菌纲	*Microbacterium murale* 1-Gi-001	98.45
RHL440	放线菌门	放线菌纲	*Citricoccus alkalitolerans* YIM 70010	98.50
HR028	放线菌门	放线菌纲	*Kocuria atrinae* P30	98.53
HR012	放线菌门	放线菌纲	*Micrococcus endophyticus* YIM 56238	97.80
HR051	放线菌门	放线菌纲	*Micrococcus endophyticus* YIM 56238	98.40
HR036	放线菌门	放线菌纲	*Pseudarthrobacter enclensis* NIO-1008	98.12
HR043	放线菌门	放线菌纲	*Pseudarthrobacter humi* RMG13	90.30
RHL019	放线菌门	放线菌纲	*Marmoricola solisilvae* KIS18-7	96.60
RHL580	放线菌门	放线菌纲	*Nocardioides campestrisoli* MC1495	96.93
RHL734	放线菌门	放线菌纲	*Streptomyces tardus* P38-E01	98.26
RHL727	变形菌门	α-变形菌纲	*Mesorhizobium carmichaelinearum* ICMP 18942	97.66
RHL728	变形菌门	α-变形菌纲	*Mesorhizobium carmichaelinearum* ICMP 18942	97.90
RHL729	变形菌门	α-变形菌纲	*Mesorhizobium carmichaelinearum* ICMP 18942	97.90
RHL865-1	变形菌门	α-变形菌纲	*Cereibacter changlensis* DSM 18774	97.15
RHL866	变形菌门	α-变形菌纲	*Cereibacter changlensis* DSM 18774	97.43
HR034	变形菌门	α-变形菌纲	*Luteovulum sphaeroides* JA194	97.08
HR024	变形菌门	α-变形菌纲	*Paracoccus everestensis* S8-55	98.20
RHL847	变形菌门	β-变形菌纲	*Massilia niabensis* 5420S-26	97.92
RHL626	变形菌门	γ-变形菌纲	*Methylohalomonas lacus* HMT 1	92.34
RHL254-1	变形菌门	γ-变形菌纲	*Chromohalobacter israelensis* ATCC 43985	98.39
RHL103	变形菌门	γ-变形菌纲	*Pseudomonas songnenensis* NEAU-ST5-5	98.50
HR025	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Bacillus thaonhiensis* NHI-38	98.64
HR044-2	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Bacillus infantis* NRRL B-14911	98.28
R08	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Oceanobacillus kimchii* X50	95.09

续表 2

菌株编号 Strain number	门 Phylum	纲 Class	最相似菌株及编号 Top-hit taxon and strain	16S rRNA 基因相似度 16S rRNA gene similarity/%
R41	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Oceanobacillus kimchii* X50	96.82
RHL768	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Oceanobacillus kimchii* X50	98.57
R35	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Oceanobacillus profundus* CL-MP28	92.47
RHL266	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Pseudalkalibacillus berkeleyi* KMM 6244	97.15
RHL267	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Pseudalkalibacillus berkeleyi* KMM 6244	97.15
RHL268	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Pseudalkalibacillus berkeleyi* KMM 6244	98.02
RHL026	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Sutcliffiella halmapala* DSM 8723	98.50
RHL871	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Planococcus okeanokoites* IFO 12536	98.50
HR043-1	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Planococcus okeanokoites* IFO 12536	98.65
HR049	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Staphylococcus canis* H16/1A	97.44
HR030	厚壁菌门	芽孢杆菌纲	*Staphylococcus cohnii* ATCC 29974	98.65
RHL897	拟杆菌门	鞘脂杆菌纲	*Pedobacter indicus* SM1810	96.85
RHL892	拟杆菌门	鞘脂杆菌纲	*Pedobacter indicus* SM1810	97.07
HR019-1	拟杆菌门	噬纤维菌纲	*Pontibacter ruber* JC213	96.17
HR011	拟杆菌门	黄杆菌纲	*Winogradskyella echinorum* KMM 6211	97.00

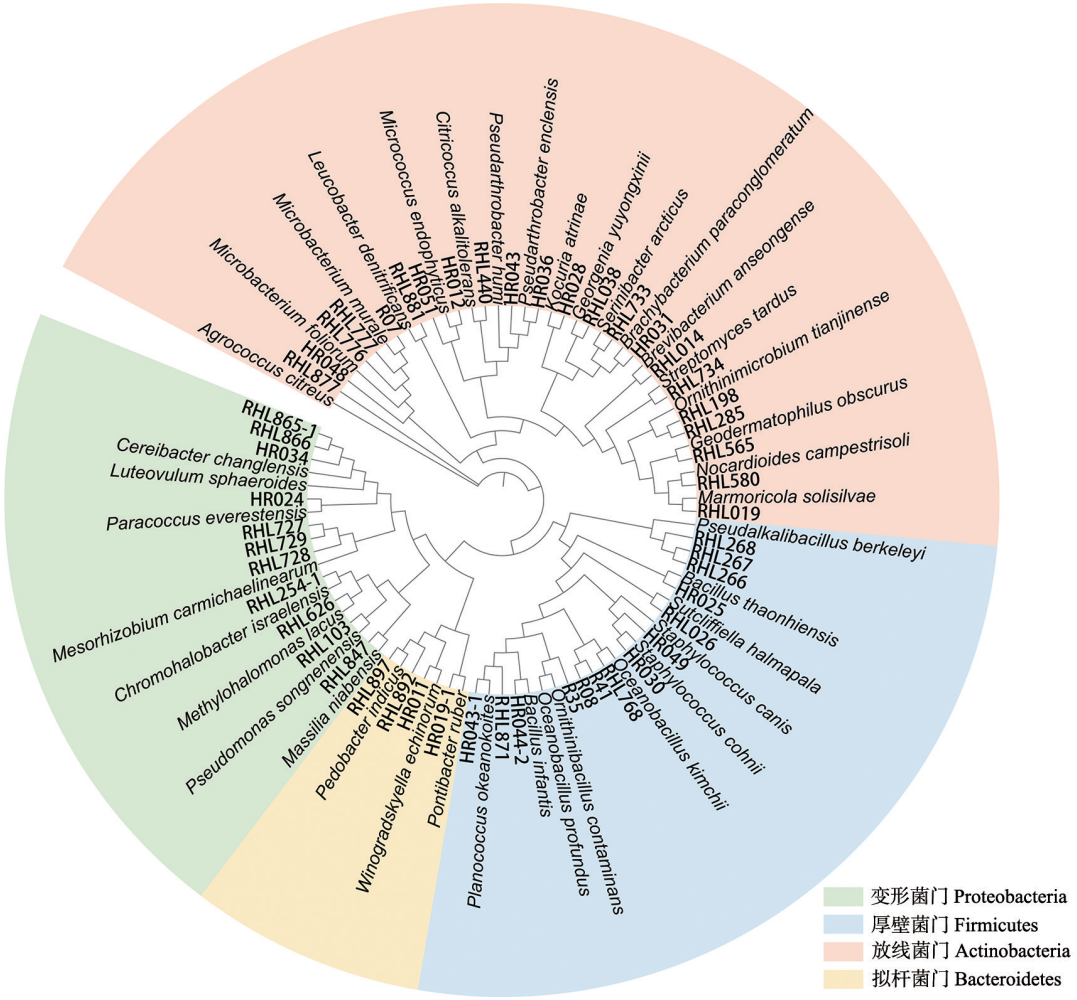


图 3 马里亚纳海沟挑战者深渊沉积物可培养潜在新菌与参考菌株的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of candidatus novel bacteria isolated from sediment of the Challenger Deep of the Mariana Trench and their closest relatives based on 16S rRNA gene sequences

在门水平上，放线菌门有 22 株(分属于 20 种)潜在新菌，占潜在新菌总量的 37.50%，其后依次为厚壁菌门(14 株，10 种)和变形菌门(11 株，8 种)，有 4 株(3 种)为拟杆菌门的细菌。

在纲水平上，根据 16S rRNA 基因比对结果，初步确定这 51 个潜在新菌分属放线菌纲(22 株，20 种)、芽孢杆菌纲(14 株，10 种)、α-变形菌纲(7 株，4 种)、γ-变形菌纲(3 株，3 种)、鞘脂杆菌纲(2 株，1 种)、黄杆菌纲(1 株)、β-变形菌纲(1 株)和噬纤维菌纲(1 株)。

这些潜在新菌分别隶属 37 个属，包括芽孢杆菌目中的大洋芽孢杆菌属(4 株，2 种)、*Pseudalkalibacillus*(3 株，1 种)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*，2 株，2 种)、游动球菌属(2 株，1 种)以及 *Cytobacillus*、*Sutcliffiella* 和芽孢杆菌属(各 1 株)；微杆菌目中的微杆菌属(4 株，2 种)以及农球菌属和柠檬球菌属(各 1 株)；微球菌目中的假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*，2 株，2 种)、微球菌属(2 株，1 种)以及 *Citricoccus* 和考克氏菌属(各 1 株)；根瘤菌目中的中生根瘤菌属(*Mesorhizobium*，3 株，1 种)；红细菌目中的 *Cereibacter*(2 株，1 种)以及副球菌属和 *Luteovulum*(各 1 株)；来自 Dermatophilales 纲的鸟氨酸微菌属(*Ornithinimicrobium*，2 株，1 种)和来自鞘脂杆菌目的 *Pedobacter*(2 株，1 种)，以及丙酸杆菌目下属的 *Marmoricola* 和类诺卡氏菌属(各 1 株)。除这些属外，还有 *Stutzerimonas*、小短杆菌属、乔治菌属(*Georgenia*)、短杆菌属、海洋杆菌属、*Geodermatophilus*、*Streptomyces*、*Serinibacter*、色盐杆菌属、马赛菌属、*Methylohalomonas* 和维诺格拉斯基氏菌属各 1 株。另有 3 株细菌分属 3 个潜在新属。

3　讨论

在门水平上，本研究获得的可培养细菌分属于变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门，与林钰等[28]在马里亚纳海沟 5 381～6 300 m 水深的沉积物中分离出的主要门类一致，也与马里亚纳海沟南端 4 500 m 水深的沉积物中的微生物主要群落相同[30]，但与 Liu 等[31]通过高通量测序在马里亚纳海沟沉积物中发现的主要门类具有较大差别。Liu 等[31]在马里亚纳海沟深部沉积物的主要微生物类群为绿弯菌门(Chloroflexi)，其次为放线菌门、浮霉菌门(Planctomycetota)、Patescibacteria 和变形菌门，这种差别或许源于研究手段的差异，本研究中分离出的细菌为可培养的微生物类群，而高通量测序采用的沉积物中的 DNA 含有来源于未被培养的微生物类群、死亡类群或胞外的 DNA。在纲水平上，此次分离得到的微生物主要来自芽孢杆菌纲、放线菌纲、α-变形菌纲和 γ-变形菌纲，与以往在马里亚纳海沟沉积物中被分离出的异养细菌的优势菌群一致[28]，但在本研究中，芽孢杆菌纲是马里亚纳海沟沉积物中的最优势类群，而非以往研究中的 γ-变形菌纲[25,32-34]。造成这一现象的原因可能有两个方面。一方面，这可能与海沟沉积物不同层次的环境特征有关。林钰等[28]的研究发现，马里亚纳海沟沉积物中，γ-变形菌纲在沉积物表层的相对丰度远高于深层，芽孢杆菌纲和放线菌纲则呈现相反趋势；Liu 等[31]对马里亚纳海沟沉积物中微生物多样性的研究同样呈现该趋势。表层沉积物具有更高的含氧量，且有机物浓度更高，使得专性或兼性好氧的 γ-变形菌纲的细菌更具竞争优势，而放线菌纲和芽孢杆菌纲的细菌大多为兼性厌氧并具有高 GC 含量的革兰氏阳性菌，对极端环境具有较强的耐受性，因此在含氧量和有机物浓度较低的海沟深层沉积物中具有更强的竞争力。另一方面，与以往研究中对马里亚纳海沟沉积物异养细菌的分离培养相比，本研究采用了 R2A 寡营养培养基作为分离培养基之一。该培养基中的可溶性淀粉可吸附细菌代谢过程中的有毒副产物，减少这些物质对微生物的抑制作用；该培养基中的丙酮酸钠则具有抗氧化作用，有助于受损微生物的功能的修复；此外，本研究还增加了添加各类复苏因子的富集培养过程，这些复苏因子使原本在极端环境下产生芽孢或者进入 VBNC 的芽孢杆菌纲和放线菌纲的细菌得以复苏，造成培养结果的差异。

本研究采用 IMB 培养基及添加了各种复苏因子的 IMB 培养基对样品进行富集培养，分离出大量适于寡营养环境的芽孢杆菌和放线菌。IMB 培养基是在 MB 培养基的基础上进行改良的寡营养培养基，可以更好地模拟海洋的寡营养环境[35]。在常规的富营养培养基中，部分生长速度较快的微生物会在培养初期大量增殖，进而抑制了一些生长速度较慢的稀有微生物，使许多稀有的未培养微生物在富营养环境中难以被分离[36]。此外，高浓度的营养物质对一些寡营养微生物具有毒性作用[37]。IMB 培养基将 MB 培养基中的主要营养物质酵母提取物和蛋白胨进行稀释，并进行一段时间的富集培养，使得低丰度或难以培养的菌株得到增殖的机会，最终被分离出来，从而提高了可培养海洋细菌的多样性。此外，IMB 培养基中添加的丙酮酸钠和乙酸钠可降低培养过程中优势细菌种类代谢产生的过氧化物、自由基和一些拮抗物质的毒害作用，并诱导细菌从 VBNC 复苏[20]。本研究发现，采用 IMB 培养基富集培养 3 d 的样品中可培养微生物类群同直接涂布和富集 7 d 的样品差异较大，这说明是否富集培养以及富集培养时间的不同能影响分离出的海洋细菌的种类。

除利用 IMB 培养基直接富集培养外，本研究还分别采用添加了 DMSP 和藤黄微球菌培养液上清作为复

苏因子的 IMB-DMSP 培养基和 IMB-Rpf 培养基进行富集培养。DMSP 是一种重要的海洋渗透调节剂，DMSP 可提高深海微生物对深海高静水压力的耐受性[14]。通过在 IMB 培养基中添加 DMSP，可以更好地模拟海洋环境的自然条件，从而提高深海微生物在实验室的可培养性[38]。本研究中，芽孢杆菌纲是 IMB-DMSP 培养基富集培养获得的主要微生物类群，说明 DMSP 可能激活了芽孢杆菌的特定代谢途径，使其占据了优势地位。藤黄微球菌培养液上清中的 Rpf 蛋白具有肽聚糖水解酶活性，可对细菌细胞壁进行溶解，使休眠状态的细菌再次生长[16-18]。目前已有研究表明，Rpf 因子可促进水体和土壤中一些高 GC 含量的革兰氏阳性菌的复苏生长，增加可培养细菌的多样性[16]。此外，由于 Rpf 蛋白对放线菌也具有很好的复苏效果，可明显提高放线菌的分离效率[39-40]，这与从本研究中发现的 IMB-Rpf 培养基中优势类群为放线菌纲的结果相符。本研究还发现，在添加了复苏因子的富集培养基中获得的潜在新种率显著高于未添加复苏因子的富集培养基和直接分离培养方式，表明复苏因子对于激活处于休眠状态的微生物至关重要，能够提高深海微生物的可培养性，使研究者能够分离出更多的微生物新类群。

本研究分离到的 517 株异养细菌中，有 51 株细菌（分属于 41 种）为潜在新分类单元，占本次实验中分离出的总菌株数的 10.21%。值得注意的是，这 51 株潜在新分类单元绝大多数分离自富集培养后的样品，说明添加了复苏因子的富集培养方式有效提高了可培养微生物的多样性。本研究中分离出的 4 株拟杆菌门细菌均为潜在新分类单元，其中有 2 株菌株属于鞘脂杆菌纲，该纲细菌以往未在马里亚纳海沟沉积物中被分离出[28]。这 2 株细菌均分离自深层泥样，由此可推断，这 2 株细菌可能与挑战者深渊深部沉积物的特殊生境有关。

4 结语

本研究通过多种培养策略，从马里亚纳海沟深部沉积物中分离出了大量的、高度多样的异养细菌，且包含潜在新分类单元。研究结果揭示了该极端深海环境中微生物群落的高度多样性，为后续科学研究提供了大量的菌株资源，对于深海微生物菌种资源库的扩充具有重要意义。此外，多种富集和分离条件为深海极端环境下微生物的分离和培养提供了新的思路。

参考文献：

[1] 李毅，党研茹，任雪冰，等. 马里亚纳海沟可培养水生细菌的多样性[J]. 微生物学报，2021，61(6)：1383-1398.
Li Y，Dang Y R，Ren X B，et al. Diversity of culturable aquatic bacteria at different depths of the Mariana Trench[J]. Acta Microbiologica Sinica，2021，61(6)：1383-1398.

[2] Morita R Y. Survival of bacteria in cold and moderate hydrostatic pressure environments with special reference to psychrophilic and barophilic bacteria[C]// Gray T R G，Postgate J R. The Survival of Vegetative Microbes：26th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge：Cambridge University Press，1976：279-298.

[3] Takami H，Inoue A，Fuji F，et al. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench[J]. FEMS Microbiology Letters，2006，152(2)：279-285.

[4] Ludwig H. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology[M]. Berlin，Heidelberg：Springer Berlin Heidelberg，1999：17-20.

[5] Nogi Y，Kato C. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov.，a new barophilic bacterial isolate[J]. Extremophiles，1999，3(1)：71-77.

[6] Liu J，Zhang W Y，Li X G，et al. Bacterial community structure and novel species of magnetotactic bacteria in sediments from a seamount in the Mariana volcanic arc[J]. Scientific Reports，2017，7(1)：17964.

[7] Yang S S，Li X G，Xiao X，et al. *Sphingomonas profundi* sp. nov.，isolated from deep-sea sediment of the Mariana Trench[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2020，70(6)：3809-3815.

[8] Pathom-Aree W，Nogi Y，Ward A C，et al. *Dermacoccus barathri* sp. nov. and *Dermacoccus profundi* sp. nov.，novel actinomycetes isolated from deep-sea mud of the Mariana Trench[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2006，56(10)：2303-2307.

[9] 汤伟，张军，李广善，等. 深海极端微生物菌群及代谢产物多样性的研究进展[J]. 微生物学报，2019，59(7)：1241-1252.
Tang W，Zhang J，Li G S，et al. Diversity of extremophiles and metabolites in the deep-sea[J]. Acta Microbiologica Sinica，2019，59(7)：1241-1252.

[10] Gambelli L，Guerrero-Cruz S，Mesman R J，et al. Community composition and ultrastructure of a nitrate-dependent anaerobic methane-oxidizing enrichment culture[J]. Applied and Environmental Microbiology，2018，84(3)：e02186-17.

[11] Kemnitz D，Kolb S，Conrad R. Phenotypic characterization of Rice Cluster Ⅲ archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture[J]. Environmental Microbiology，2005，7(4)：553-565.

[12] Kataoka N，Tokiwa Y，Tanaka Y，et al. Enrichment culture and isolation of slow-growing bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，1996，45(6)：771-777.

[13] 郑宁. 沿海沉积物细菌的富集培养及菌株 28AX09 的生理和基因组学研究[D]. 济南：山东大学，2023.
Zheng N. Enrichment Culture of Bacteria from Coastal Sediments and Physiological and Genomic Studies of Strain 28AX09[D]. Jinan：Shandong University，2023.

[14] Zheng Y F，Wang J Y，Zhou S，et al. Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in marine aphotic and high-pressure environments[J]. Nature Communications，2020，11

(1)：4658.

[15] Mu D S，Liang Q Y，Wang X M，et al. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. Microbiome，2018，6(1)：230.

[16] 李云琪，王宇辉，李小锦，等. 藤黄微球菌 Rpf 因子对土壤细菌可培养物种分离效果的影响[J]. 河北大学学报，2019，39(1)：63-68.
Li Y Q，Wang Y H，Li X J，et al. Effects of Rpf factor of *Micrococcus luteus* on the isolation of soil culturable species[J]. Journal of Hebei University，2019，39(1)：63-68.

[17] Mukamolova G V，Kaprelyants A S，Young D I，et al. A bacterial cytokine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，1998，95(15)：8916-8921.

[18] Mukamolova G V，Turapov O A，Kazarian K，et al. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor[J]. Molecular Microbiology，2002，46(3)：611-621.

[19] 张宇帆，刘彤彤，周鹏，等. Rpf 蛋白：一种激活休眠状态放线菌的复苏促进因子[J]. 微生物学通报，2021，48(10)：3872-3883.
Zhang Y F，Liu T T，Zhou P，et al. Rpf protein：A resuscitation-promoting factor for reactivating dormant actinomycetes[J]. Microbiology China，2021，48(10)：3872-3883.

[20] 孙创，王金燕，张钰琳，等. 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性[J]. 微生物学报，2021，61(4)：845-861.
Sun C，Wang J Y，Zhang Y L，et al. Exploring the diversity of cultivated bacteria in the Western Pacific waters through improved culture media[J]. Acta Microbiologica Sinica，2021，61(4)：845-861.

[21] 冯广达，陈美标，羊宋贞，等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较[J]. 华南农业大学学报，2013，34(3)：439-442.
Feng G D，Chen M B，Yang S Z，et al. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification[J]. Journal of South China Agricultural University，2013，34(3)：439-442.

[22] 苏丽婷，梁景龙，郭小建，等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 仲恺农业工程学院学报，2011，24(1)：15-19.
Su L T，Liang J L，Guo Z J，et al. Comparison of methods for DNA extraction in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering，2011，24(1)：15-19.

[23] Weisburg W G，Barns S M，Pelletier D A，et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology，1991，173(2)：697-703.

[24] Du R，Yu M，Cheng J G，et al. Diversity and sulfur oxidation characteristics of cultivable sulfur oxidizing bacteria in hydrothermal fields of Okinawa Trough[J]. Acta Microbiologica Sinica，2019，59(6)：1036-1049.

[25] 刘荣华. 马里亚纳海沟表层沉积物可培养微生物多样性及四株深海新菌的分类鉴定[D]. 青岛：中国海洋大学，2020.
Liu R H. Diversity of Culturable Bacteria in the Surface Sediments of Mariana Trench and Taxonomic Analysis of Four Deep-Sea Novel Bacteria[D]. Qingdao：Ocean University of China，2020.

[26] Kim M，Oh H S，Park S C，et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2014，64(Pt_2)：346-351.

[27] Varghese N J，Mukherjee S，Ivanova N，et al. Microbial species delineation using whole genome sequences[J]. Nucleic Acids Research，2015，43(14)：6761-6771.

[28] 林钰，刘荣华，周顺，等. 马里亚纳海沟沉积物可培养异养细菌的多样性及其 DMSP 降解能力[J]. 微生物学报，2021，61(4)：828-844.
Lin Y，Liu R H，Zhou S，et al. Diversity of culturable heterotrophic bacteria from sediments of the Mariana Trench and their ability to degrade dimethylsulfoniopropionate(DMSP)[J]. Acta Microbiologica Sinica，2021，61(4)：828-844.

[29] Yarza P，Richter M，Peplies J，et al. The All-Species Living Tree project：A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. Systematic and Applied Microbiology，2008，31(4)：241-250.

[30] Li Y J，Cao W R，Wang Y，et al. Microbial diversity in the sediments of the southern Mariana Trench[J]. Journal of Oceanology and Limnology，2019，37(3)：1024-1029.

[31] Liu J W，Li D W，He X X，et al. A unique subseafloor microbiosphere in the Mariana Trench driven by episodic sedimentation[J]. Marine Life Science & Technology，2024，6(1)：168-181.

[32] Liu J W，Zheng Y F，Lin H Y，et al. Proliferation of hydrocarbon-degrading microbes at the bottom of the Mariana Trench[J]. Microbiome，2019，7(1)：47.

[33] Nunoura T，Nishizawa M，Hirai M，et al. Microbial diversity in sediments from the bottom of the Challenger Deep，the Mariana Trench[J]. Microbes and Environments，2018，33(2)：186-194.

[34] Tarn J，Peoples L M，Hardy K，et al. Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench[J]. Frontiers in Microbiology，2016，7：665.

[35] 田甜，李冬梅，戴世鲲，等. 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养[J]. 微生物学通报，2009，36(7)：1031-1039.
Tian T，Li D M，Dai S K，et al. Culture methods of the oligotrophic marine microbes[J]. Microbiology China，2009，36(7)：1031-1039.

[36] 韩东东，郝振宇，高广海，等. 寡营养细菌及其生态作用和应用的研究进展[J]. 微生物学通报，2012，39(4)：526-535.
Han D D，Hao Z Y，Gao G H，et al. Ecological function of oligotrophic bacteria and their applications in the environment[J]. Microbiology China，2012，39(4)：526-535.

[37] 张崇邦，黄立南，栾天罡，等. 寡营养细菌及其在环境科学中的应用[J]. 应用生态学报，2005(4)：773-777.
Zhang C B，Huang L N，Luan T G，et al. Oligotrophic bacteria and their applications in environmental science[J]. Chinese Journal of Applied Ecology，2005(4)：773-777.

[38] McParland E L，Lee M D，Webb E A，et al. DMSP synthesis genes distinguish two types of DMSP producer phenotypes[J]. Environmental Microbiology，2021，23(3)：1656-1669.

[39] Puspita I D，Kitagawa W，Kamagata Y，et al. Increase in bacterial colony formation from a permafrost ice wedge dosed with a *Tomitella biformata* recombinant resuscitation-promoting factor protein[J]. Microbes and Environments，2015，30(2)：151-156.

[40] 赵雅慧. 红树林放线菌的分离鉴定及其 *rpf* 基因复苏活性研究

[D]. 南宁：广西民族大学，2020.
Zhao Y H. Isolation and Identification of Mangrove Actinomycetes and Its Resuscitation Activity of *rpf* [D]. Nanning: Guangxi Minzu University, 2020.

Isolation and Taxonomic Identification of Cultivable Heterotrophic Bacteria from Deep Sediment of the Mariana Trench

Huang Rong[1], Liu Ronghua[1], Liu Jiwen[1,2], Zhang Xiaohua[1,2]
(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China)

Abstract: To investigate the diversity of culturable heterotrophic bacteria in deep-sea sediments from the Mariana Trench, this study focused on a sediment core collected from the Challenger Deep at a depth of 10 816 meters on July, 2020. Samples from the surface and various depths within the sediment core were selected, and multiple enrichment and isolation techniques were employed to enhance the culturability of marine bacteria from extreme environments. Cultivation was performed at three temperatures (4, 16, and 28 ℃) using two solid media (MA and R2A) for direct plating, and three enrichment media (IMB, IMB-DMSP, and IMB-Rpf) for selective cultivation. A total of 517 strains of heterotrophic bacteria were obtained, and preliminary identification of potentially novel bacterial taxa was conducted based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The results revealed that the isolated 517 strains belonged to 4 phyla (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes), 8 classes, 30 orders, 42 families, 74 genera, and 144 species. Different enrichment strategies yielded distinct bacterial isolates, with the IMB-Rpf medium enabling the recovery of a broader diversity of microbial species. The addition of revival factors such as DMSP and supernatants from *Micrococcus luteus* had selective enrichment effects on various culturable microbial populations in the sediments. Additionally, compositional differences in the cultured bacterial species were observed among different sediments depths. 51 strains from the 4 phyla represented potential new taxonomic units, including 3 potential new genera and 41 potential new species. Notably, 2 strains of them belonged to the class Sphingobacteriia, which have not previously been isolated from Mariana Trench sediments. The research results will provide a substantial resource of deep-sea bacterial strains for future scientific studies and offer new insights into the isolation and cultivation of microorganisms from extreme deep-sea environments.

Key words: Mariana Trench; deep sediment; heterotrophic bacteria; enrichment culture; isolation and identification

责任编辑 高 蓓