微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(9):908 - 914; 4 September 2013
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

活的但非可培养功能菌群对多氯联苯降解的探索进展

苏晓梅[1],丁林贤[2],沈超峰[1*]

[1]浙江大学环境与资源学院,杭州 310058

[2]浙江师范大学地理与环境科学学院,金华 321004

摘要:活的但非可培养(“viable but non-culturable”,简称 VBNC)状态是微生物应对各种环境压力的一种生存机制。面对日益严重的异生质污染问题,研究污染胁迫下 VBNC 状态菌的潜在环境功能具有重要意义。该文阐述了 VBNC 状态菌的研究现状,针对多氯联苯微生物降解存在的问题,重点介绍环境中潜在 VBNC 功能菌群的复苏培养。提出利用藤黄球菌(*Micrococcus luteus*)复苏促进因子(resuscitation-promoting factor,简称 Rpf)探索具有潜在多氯联苯降解功能的 VBNC 状态菌群,为多氯联苯高效降解菌群的筛选提供新思路。同时,结合 VBNC 状态菌絮凝、硝化除臭等方面的探索研究,对 VBNC 状态菌的潜在环境功能进行了展望。

关键词:活的但非可培养状态菌, 多氯联苯, 藤黄球菌复苏促进因子, 环境功能, 微生物资源

中图分类号:X172 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209 (2013) 09-0908-07

自然环境中存在大量的微生物,利用纯培养技术仅能对自然界中 0.01% - 10% 的微生物进行分离鉴定,尚有 90% 以上的微生物因处于活的但非可培养[1-2](“viable but non-culturable”,简称 VBNC)状态而未被认知。随着现代分子生物学技术的发展,基于非培养手段虽可以获取大量的微生物多样性及菌群结构信息,但是,微生物相关生态功能的研究仍然受到限制。因此,分离培养作为绝大部分微生物资源的 VBNC 状态菌及探索其潜在的相关功能,对于我们重新认识和评价微生物在食品发酵、农业和环保等领域中的作用具有重要指导意义。面对日益严重的异生质(xenobiotics)(尤其是 PCBs、PAHs 等持久性有机污染物)污染问题[3],研究污染物胁迫下细菌进入 VBNC 状态的生存机制、关注 VBNC 状态菌的可培养化,特别是潜在环境功能的研究,将为污染环境的微生物修复开拓新的应用前景。

多氯联苯(Polychlorinated biphenyls,PCBs)是《斯德哥尔摩公约》首批控制的持久性有机污染物(Persistent organic pollutants,POPs)之一,由于环境持久性及“三致”效应而成为目前广泛关注的典型有机污染物[4]。PCBs 属于高毒性、难降解有机污染物,可在自然环境中存在数十年以上,虽然已禁用多年,但它所造成的环境污染问题随着研究的深入而日益突出[5]。由于 PCBs 独特的化学稳定性,传统的物理和化学方法因存在低效、二次污染问题而限

基金项目:国家自然科学基金(41271334); 国家高技术研究发展计划(2012AA06A203);浙江省自然科学基金(LR12D01001)

* 通信作者。Tel: +86-571-88982016; Fax: +86-571-88982010; E-mail: ysxzt@zju.edu.cn

作者简介:苏晓梅(1987 -),女,安徽省宿州市人,博士研究生,主要从事持久性有机污染环境的微生物修复研究。E-mail: purple@zju.edu.cn

收稿日期:2013-01-28;**修回日期**:2013-05-09

制其在 PCBs 污染环境修复中的应用，微生物作为大量存在的自然资源，且微生物降解治理技术具有安全、高效、经济等特点，因此，筛选和构建高效 PCBs 降解菌成为修复 PCBs 污染环境的关键所在[6-7]。虽然关于 PCBs 的微生物降解已投入大量的研究工作，但大多仍限于实验室研究阶段，PCBs 高效降解功能菌种资源匮乏成为其推广应用的最大瓶颈。

该文阐述了 VBNC 状态菌的研究现状，针对 PCBs 微生物降解存在的问题，重点介绍环境中潜在 VBNC 功能菌群的复苏培养。提出利用藤黄球菌(*Micrococcus luteus*)复苏促进因子(resuscitation-promoting factor，简称 Rpf)复苏具有潜在 PCBs 降解功能的 VBNC 状态菌，为筛选 PCBs 高效降解菌群提供新思路。同时，结合 VBNC 状态菌絮凝、硝化除臭等方面的探索研究，对 VBNC 状态菌的潜在环境功能进行了展望。

1 VBNC 状态菌的研究现状

VBNC 状态最早由 Colwell 等[8]提出，即微生物在不良环境中细胞浓缩成球形，用常规的培养方法不能使其生长繁殖，但仍具代谢活性，当给予适宜条件时能够恢复其生长繁殖。已报道约 60 多种细菌可进入 VBNC 状态[9]。常见诱导微生物进入 VBNC 状态的因素可分为物理因素[10-11](如温度、湿度、渗透压、光照强度等)、化学因素[12-14](氧气浓度，营养成分、有害化学物质)及生物因素[15]。目前，VBNC 状态菌的形成机理尚不明确，存在两种假说[16-17]:一是认为该状态是细胞衰弱的表现，最终将走向凋亡;二是认为它是一种类似于孢子形成机制适应不良环境的生存策略。细菌进入 VBNC 状态后，其细胞形态、代谢活性及基因表达水平均将发生一系列的变化。我们对比了藤黄球菌培养 2 天与 1 年的菌数、菌落和细胞形态，发现经 1 年静置培养后，菌数从 10^9 CFU/mL 降至 10^3 CFU/mL，菌落明显变小、大小不均匀，且大量的菌体细胞已变形或解体[2]。目前，VBNC 状态菌已经成为流行病学、动物医疗免疫及食源性病原菌检测等领域的研究热点[18-19]。

VBNC 状态菌群作为自然界中未能开发利用的绝大部分微生物资源，对其形成机理、复苏培养及应用性能的研究具有重要意义。虽然关于细菌 VBNC 状态的形成和检测已经有大量的文献报道[1,9]，但主要集中于病原菌(*Mycobacterium tuberculosis*、*Campylobacter*sp.、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Helicobacter pylori*、*Legionella pneumophlia* 和 *Vibrio* sp.)，对于环境污染物如何诱导细菌进入 VBNC 状态，调控 VBNC 状态的相关功能基因及如何建立 VBNC 状态菌检测的统一标准等方面的研究较少。面对日益严重的环境污染问题，研究污染物胁迫下细菌进入 VBNC 状态后细胞形态、生理生化特性和基因表达的变化，关注 VBNC 状态菌的潜在环境功能，将为重新认识和评价微生物在污染环境修复、环境保护领域的作用提供新的科学依据。

2 PCBs 的微生物降解及潜在 VBNC 功能菌群

PCBs 污染环境的微生物修复以矿化或共代谢两种方式进行。一些低氯 PCBs 可以作为微生物自身生长和繁殖所需的碳源及能源而进行好氧降解。高氯(氯取代数≥5)PCBs 经厌氧脱氯后转化为低氯 PCBs，再进行好氧降解[20-21]。厌氧微生物通过催化还原反应将高氯 PCBs 转化为低氯或无氯的同系物，既可以降低 PCBs 的生物富集作用，又有利于好氧微生物的进一步降解。PCBs 污染环境的治理需联合厌氧脱氯和好氧降解 2 个过程[22]。Emma 等[22]发现污染土壤中 Aroclor1260 经 4 个月厌氧脱氯后，主要产物为 2,4-2,4-四氯联苯和 2,4-2,6-四氯联苯，再经 *Burkholderia* sp. LB400 好氧降解 28 天后，PCBs 的浓度由60 μg/g降为20 μg/g，说明厌氧-需氧生物处理工艺具有较好的可行性。采用适宜的厌氧-需氧生物处理工艺，综合考虑污染环境体系中脱氯与非脱氯微生物间的时空关联性及 PCBs 降解过程中不同功能菌群之间的复杂关系，使得 PCBs 降解过程中各不同功能菌群发挥其最佳性能。另外，针对不同 PCBs 污染环境，需结合其具体的环境生态因子，采用不同的降解微生物功能群，以实现 PCBs 污染环境的微生物修复。

目前，PCBs 降解菌株的筛选菌源仅限于基于常规富集方法所能获得的仅占 0.01% -10% 的微生物菌群，大量的潜在功能菌群因处于 VBNC 状态而未被研究。PCBs 的多样性、降解特征及其污染环境

的复杂性决定 PCBs 污染的微生物修复需要依赖于具有各种底物专一性的混合微生物菌群的联合作用。现今虽已有较多 PCBs 降解菌的报道,包括革兰氏阴性菌: *Alcaligenes*、*Janibacter*、*Acinetobacter*、*Acidovorax*、*Cupriavidus*、*Comamonas*、*Enterobacter*、*Sphingomonas*、*Ralstonia*、*Burkholderia*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas*、*Achromobacter* 和革兰氏阳性菌: *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Nocardia*、*Bacillus*、*Micrococcus*、*Corynebacterium* 等[23-25],但由于存在低效、不稳定、成本高等缺点而仅限于实验室研究阶段。其中,PCBs 高效降解功能菌种资源匮乏成为其推广应用的最大瓶颈。构建 PCBs 降解工程菌及降解酶的固定化虽然是强化微生物修复 PCBs 污染环境的有效途径,但存在很多问题,如宿主细胞的选择、基因水平转移及固定化成本高等。所以,对于长期受 PCBs 污染的环境修复而言,最终将归宿于能存活在其中的土著微生物。微生物在 PCBs 污染环境中会产生应答的生理变化,如产生应激蛋白、氧化应激等[21]。Chávez[26] 等发现 *Pseudomonas* sp. B4 生长于不同氯苯类化合物(CBs)时,其应激蛋白 GroEL 的含量增加,表明在 PCBs 污染胁迫条件下,微生物能形成相应的生存机制而得以存活。目前,关于微生物降解 PCBs 的研究主要集中于其降解途径中相关的生化、酶促反应及功能基因,较少关注微生物在 PCBs 污染环境中的适应机制,对于污染环境中微生物生存状态及机制的研究将为探索和利用各种土著微生物潜在的环境功能提供一定的理论依据。

我们以浙江省台州地区某电子废弃物拆解厂附近土壤为研究对象,经 PCR-DGGE、优势条带的克隆转化、测序分析及同源性比较后,发现优势菌群主要归属于变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)和酸杆菌门(Acidobacteria)中的 16 个属,其中大部分菌群属于非可培养状态菌(Uncultured bacterium)。另外,我们以联苯为唯一碳源,利用常规富集培养法筛选 PCBs 降解菌,发现经传代培养 5-6 次所得的混合培养液 BP-Y 可在 36 h内将100 mg/L联苯完全降解,同时具有较好 PCBs 降解效果,在120 h内,对100 mg/L Aroclor1242 中的二氯代 PCBs 的降解率达 97.9%,对10 mg/L Aroclor1242 总量的降解率达 79.6%。但混合培养液 BP-Y 经平板分离,未获得较好的 PCBs 降解菌株。从而推测混合培养液中的 VBNC 状态菌在 PCBs 降解过程中可能起到关键性作用。因此,如何从作为自然环境中绝大部分(90% -99%)微生物资源的 VBNC 状态菌群中,寻找 PCBs 高效降解菌株及构建降解 PCBs 复合菌群成为打破现有的微生物降解 PCBs 应用瓶颈的关键所在。

3 复苏潜在 VBNC 功能菌群

直接逆转某些不利条件(如恢复培养温度、给予充足营养、解除污染物胁迫)可使 VBNC 状态菌复苏,但在实验室条件下,尚无可使所有 VBNC 状态菌恢复其生长能力的报道。另外,对于通过逆转不利条件获得的可培养菌群是 VBNC 细菌复苏所得,还是低浓度可培养细菌的重新生长仍存在争议。

藤黄球菌复苏促进因子(Rpf)的发现是 VBNC 状态菌复苏的重要突破[27]。自 1993 年 Kaprelyants 等[28] 首次发现能促进细菌生长的胞外蛋白后,藤黄球菌 Rpf 是发现的第 1 个复苏促进因子,其分子质量为 16-17 kDa,氨基端是由75 个氨基酸残基组成的保守区,三级结构具有溶菌酶样折叠,形成一个能与寡聚糖结合的裂隙。它可以复苏多种革兰氏阳性菌(G^+),研究最多的是分枝杆菌属(*Mycobacterium*sp.)。我们发现藤黄球菌 Rpf 不仅对近缘的高 GC 革兰氏阳性菌有复苏作用,对低 GC 革兰氏阳性菌及部分革兰氏阴性菌(*Curvibacterfontana* sp.)也有较好的复苏促进功能[2, 29-30]。Mukamolova 等[31] 发现藤黄球菌 Rpf 不仅能使 VBNC 状态菌复苏,还可以刺激正常菌体的生长,其 *rpf* 基因是藤黄球菌不可或缺的关键基因。另外,Mukamolova 等[32] 证明藤黄球菌的 Rpf 具有胞壁溶解酶活性,其活性中心非常保守,预测该位点在细胞壁溶解过程中起到重要作用。对该蛋白的结构域预测以及核磁共振分析表明,其保守区具有溶菌酶样折叠,被称为 Rpf 样结构域。今后陆续发现同样具有 Rpf 样结构域的蛋白质,统称为 Rpf 蛋白家族。Rpf 蛋白家族主要包括五类:藤黄球菌的 Rpf、结核分枝杆菌的 Rpf、谷氨酸棒状杆菌的 Rpf、硬避菌门中的 Rpf 类似物。研究最多的是结核分枝杆菌中的5 种 Rpf 样蛋白,即 RpfA、RpfB、RpfC、RpfD 和 RpfE[33]。Panutdaporn 等[34] 在沙门氏菌(*Salmonella*

enterica)中发现复苏促进因子 YeaZ，与其它 Rpf 不同的是它虽然有序列相似性，但在结构上没有明显的关联，且无中间活性。近年来，利用 Rpf 复苏 VBNC 状态菌的研究主要集中于医学和流行病学领域中的潜在病原菌发现、疫苗研制，及农业系统中食源性病原菌的检测方面[35-37]。以寻找新的菌种资源及环境功能菌视角去研究 Rpf 对 VBNC 状态菌的复苏促进作用较为罕见。

目前，基于非培养方法可研究 PCBs 污染环境中微生物群落的组成、菌群的数量动态变化和活性，但不能获得在 PCBs 降解过程中起关键作用的功能菌群。因此，利用 Rpf 探索降解 PCBs 的处于 VBNC 状态的功能菌群至关重要，它将为重新认识和评价微生物群落在 PCBs 降解代谢中的作用提供科学依据，进而为明确 PCBs 降解机理及高效降解菌群的筛选提供新思路。我们以联苯为唯一碳源的无机盐培养基富集培养 PCBs 污染土壤，以菌体生长量(OD_{600})和联苯降解率为评价指标，对比处理组(添加 Rpf)和对照组(添加灭活后的 Rpf)富集液的联苯耐受浓度及联苯降解曲线，采用 PCR-DGGE 与平板分离技术分析两组富集液中菌群结构及可培养菌种的差异，从而研究 PCBs 污染土壤对 Rpf 的应答。结果表明，添加 Rpf 的处理组联苯耐受浓度会大幅度提高。在联苯浓度为1500 mg/L时，处理组联苯降解率为 95.8%，而对照组降解率则仅为 38.7%，当联苯浓度提高为3500 mg/L时，处理组联苯降解率降低至 62.1%，对照组降解率则急剧降低至 3.8%。当联苯浓度由1500 mg/L提高至3500 mg/L过程中，处理组 OD_{600} 由 2.42 降低为 1.10，而对照组由 0.30 降低为 0.03。另外，处理组富集液的菌群多样性较对照组有明显提高，处理组 Shannon-Weiner 指数为 2.11，而对照组仅为 1.76。且从处理组分离出从属 5 个菌属(*Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Alcaligenes*、*Achromobacter*)的 6 株菌株(GenBank 登陆号:KC577542-KC577547)，从而证实了 Rpf 对 PCBs 污染土壤中的联苯降解菌群有较好的复苏促进功能。

4 VBNC 状态菌的潜在环境功能展望

前期我们利用最大可能数法(most probable number，MPN)研究了 68 种土样中 VBNC 状态菌对 Rpf 的响应，发现其中 28 种土样对 Rpf 有明显的应答(添加 Rpf 后可培养数增大 100 倍)，从有效样品中分离出 40 株菌株，分别归属于 *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Leifsonia*、*Bacillus*、*Nocardia*、*Kitasatospora*、*Streptomyces* 和 *Paenibacillus* 等不同属[2, 29]。其中部分菌属，如 *Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Nocardia*、*Bacillus* 是目前已知降解 PCBs 的重要功能菌群[23-25]。以复苏培养后的部分 VBNC 状态菌为菌源筛选具有较好絮凝功能的菌株，构建出产高效絮凝剂的复合菌群[38-40]。另外，我们利用 Rpf 从印染废水中分离出从属 *Cupriavidus* 和 *Gordonia* 菌属的菌株，并发现部分具有较强生物除臭及硝化脱氮功能的 VBNC 菌种。因此，基于环境功能及微生物资源角度，展开 Rpf 复苏 VBNC 状态菌的研究，对于寻找新的菌种资源及潜在的环境功能菌群具有重要意义。同时，为重新认识和评价微生物在污染环境修复、环境保护领域的作用提供新的科学依据。

从微生物资源及环境功能角度对 VBNC 状态菌的研究报道非常罕见，我们需重新审视 VBNC 状态菌群，并基于此而进行深入研究。首先，需关注各种污染环境中微生物是否因进入 VBNC 状态而未被认知，及 VBNC 状态的形成机理。如 PCBs 污染胁迫下微生物的 VBNC 状态，对其进入 VBNC 状态的生理生化性质及调控基因展开研究。其次，我们需深入研究不同污染环境中 VBNC 状态菌复苏培养的条件，使其恢复正常的生长繁殖功能。如利用 Rpf 复苏培养 PCBs 污染环境中的 VBNC 状态菌，采用 MPN 法及各种分子生物学手段研究潜在 VBNC 功能菌群对 Rpf 的应答，以此寻找 PCBs 高效降解菌株。再次，我们需考虑各种污染环境中 VBNC 菌群与可培养菌群间的互生与共生关系，及其与生态因子间的相互作用。如利用各种分子生物学技术研究 PCBs 污染环境中微生物群落的组成，综合考虑污染环境体系中 VBNC 状态菌与可培养微生物的时空关联性及 PCBs 降解过程中不同功能菌群之间的复杂关系，从而全面研究 PCBs 降解的混合功能微生物菌群。

参考文献

[1] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*,

2010, 34(4): 415-425.

[2] Ding LX, Su XM, Yokota, A. Research progress of VBNC bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7): 858-862. (in Chinese)
丁林贤，苏晓梅，横田明. 活的但非可培养(VBNC)状态菌的研究进展. 微生物学报，2011，51(7): 858-862.

[3] Beyer A, Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 201:137-158.

[4] Ma J, Qiu XH, Zhang JL, Duan XL, Zhu T. State of polybrominated diphenyl ethers in China: an overview. *Chemosphere*, 2012, 88(7): 769-778.

[5] Gomes HI, Ferreira CD, Ribeiro AB. Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Science of the Total Environment*, 2013, 445-446(15): 237-260.

[6] Anyasi RO, Atagana HI. Biological remediation of polychlorinated biphenyls (PCB) in the environment by microorganisms and plants. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(82): 18916-18938.

[7] Borja J, Taleon DM, Auresenia J, Gallardo S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 2005, 40(6): 1999-2013.

[8] Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature Biotechnology*, 1985, 3(9): 817-820.

[9] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43(1): 93-100.

[10] Trevors JT, Bej AK, Mojib N, Elsas JD, Overbeek L. Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*, 2012, 16(2): 167-176.

[11] Chen H, Fu L, Luo L, Lu J, White WL, Hu Z. Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-Lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology*, 2012, 63(1): 64-73.

[12] Divol B, Toit MD, Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(3): 601-613.

[13] Bukh AS, Hansen NE, Roslev P. Detection and persistence of clinical *Escherichia coli* in drinking water evaluated by a rapid enzyme assay and qPCR. *Advances in Microbiology*, 2012, 2(3): 252-262.

[14] Reuter M, Mallett A, Pearson BM, Vliet AHMV. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2122-2128.

[15] Mote BL, Turner JW, Lipp EK. Persistence and growth of the fecal indicator bacteria *Enterococci* in detritus and natural estuarine plankton communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2569-2577.

[16] McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 25(1): 1-9.

[17] Nyström T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(3): 159-164.

[18] Dwivedi HP, Jaykus LA. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, 37(1): 40-63.

[19] Dinu LD, Bach S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(23): 8295-8302.

[20] Bedard DL. A case study for microbial biodegradation: anaerobic bacterial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls-from sediment to defined medium. *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62:253-270.

[21] Chavez FP, Gordillo F, Jerez CA. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(3): 309-320.

[22] Emma R, Lai VWM, Kuipers B, Cullen WR, Mohn WW. Sequential anaerobic-aerobic treatment of soil contaminated with weathered Aroclor 1260. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(1): 100-103.

[23] Ainiwaer A, Wang D, Zhou JT. Study progress on microbe characteristics of polychlorinated biphenyls biodegradation. *Shanghai Environmental Science*, 2000, 19(11): 519-522. (in Chinese)
艾尼瓦尔，王栋，周集体. 降解多氯联苯的微生物特性研究进展. 上海环境科学，2000，19(1): 519-522.

[24] Shuai JJ, Tian YS, Yao QH, Peng RH, Xiong F, Xiong AS. Identification and analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs)-biodegrading bacterial strains in

Shanghai. *Current Microbiology*，2010，61(5)：477-483.

[25] Shuai JQ，Xiong F，Peng RH，Yao QH，Xiong AS. Advance in biomediation of polychlorinated biphenyls. *Hereditas*，2011，33(3)：219-227.

[26] Chávez FP，Lünsdorf H，Jerez CA. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Applied and Environmental Microbiology*，2004，70(5)：3064-3072.

[27] Mukamolova GV，Kaprelyants AS，Young DI，Young M，Kell DB. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*，1998，95(15)：8916-8921.

[28] Kaprelyants AS，Kell DB. Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus-luteus* flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*，1993，59(10)：3187-3196.

[29] Ding LX. Studies on the isolation of viable but non-culturable bacteria and the phylogenetic analysis of the genus *Aquaspirillum*. The University of Tokyo，Ph D，Dissertation，2004.

[30] Ding LX，Yokota A. *Curvibacter fontana*sp. Nov.，a microaerobia bacteria isolated from well water. *Journal of General and Applied Microbiology*，2010，56:267-271.

[31] Mukamolova GV，Turapov OA，Kazarian K，Telkov M，Kaprelyants AS，Kell DB，Young M. The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology*，2002，46(3)：611-621.

[32] Mukamolova GV，Murzin AG，Salina EG，Demina GR，Kell DB，Kaprelyants AS，Young M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology*，2005，59(1)：84-98.

[33] Ruggiero A，Tizzano B，Pedone E，Pedone C，Wilmanns M，Berisio R. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor RpfB from *M. tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*，2009，385(1)：153-162.

[34] Panutdaporn N，Kawamoto K，Asakura H，Makino SI. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2. *International Journal of Food Microbiology*，2006，106(3)：241-247.

[35] Nikitushkin VD，Demina GR，Kaprelyants AS. Effect of secreted Rpf protein on intracellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures. *Microbiology*，2011，80(2)：143-149.

[36] Kaprelyants AS，Mukamolova GV，Ruggiero A，MakarovVA，Demina GR，Shleeva MO，Potapov VD，Shramko PA. Resuscitation-promoting factors (Rpf)：in search of inhibitors. *Protein and Peptide Letters*，2012，19(10)：1026-1034.

[37] Riano F，Arroyo L，Paris S，Rojas M，Friggen AH，Meijgaarden KEV，Franken KLMC，Ottenhoff THM，Garcia LF，Barrera LF. T cell responses to DosR and Rpf proteins in actively and latently infected individuals from Colombia. *Tuberculosis*，2012，92(2)：148-159.

[38] Su XM，Shen XY，Ding LX，Yokota A. Study on the flocculability of the *Arthrobacter* sp.，an actinomycete resuscitated from the VBNC state. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*，2011，28(1)：91-97.

[39] Su XM，Zhang HF，Ding LX，Shen XY，Yokota A. Optimized culture medium and culture conditions for multiple bioflocculant-producing microorganisms. *Journal of Huazhong Normal University*(*Natural sciences*)，45(3)：450-455.(in Chinese)
苏晓梅，张慧芳，丁林贤，申秀英，横田明. 产絮凝剂复合菌群的培养基及培养条件优化. 华中师范大学学报(自然科学版)，2011，45(3)：450-455.

[40] Su XM，Zhang HF，Shen XY，Ding LX，Yokota A. Characteristics of MAC37 produced by multiple bioflocculant-producing microorganisms and its application in adhesive wastewater. *Research of Environmental Sciences*，25(3)：340-344.(in Chinese)
苏晓梅，张慧芳，丁林贤，申秀英，横田明. 复合菌群产絮凝剂 MAC37 的特征及其在黏合剂废水中的应用. 环境科学研究，2012，25(3)：340-344.

Potential of viable but non-culturable bacteria in polychlorinated biphenyls degradation—A review

Xiaomei Su[1], Linxian Ding[2], Chaofeng Shen[1*]

[1] Department of Environmental Engineering, College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

[2] College of Geography and Environmental Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: The state of "viable but non-culturable" (VBNC) is a survival strategy adopted by microorganisms when exposed to environmental stress. With the increasingly serious problem of xenobiotics pollution, enhanced microbial processes that exploit the potential of microbes to remediate polychlorinated biphenyl-contaminated environments have been developed. Microorganisms represent a significant advance with respect to the transformation and degradation of polychlorinated biphenyls in the environment. It is of great importance to study the potential function of VBNC bacteria in polluted environment. In this paper, current research status of VBNC bacteria is summarized, and resuscitation of VBNC bacteria to potentially stimulate microbial degradation of pollutants is discussed in detail. Furthermore, we put forward a novel approach to explore the potential of VBNC bacteria for polychlorinated biphenyls degradation using resuscitation promoting factor (Rpf) of *Micrococcus luteus*. The novel efficient method is helpful for excavating and obtaining highly desirable polychlorinated biphenyls degrading microorganisms. Moreover, the prospect of VBNC bacteria to other environmental remediation fields, such as flocculation and nitrification deodorant, is addressed.

Keywords: viable but non-culturable state bacteria, polychlorinated biphenyls, resuscitation-promoting factor of *M. luteus*, environmental function, microbial resources

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41271334), by the National High Technology Research and Development Program of China (2012AA06A203) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LR12D01001)

* Corresponding author. Tel: +86-571-88982016; Fax: +86-571-88982010; E-mail: ysxzt@zju.edu.cn

Received: 28 January 2013 / Revised: 9 May 2013