



微生物 VBNC 状态形成及复苏机制

张硕, 丁林贤, 苏晓梅*

浙江师范大学地理与环境科学学院, 浙江 金华 321004

摘要: 99%以上的微生物因处于活的但非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态而无法分离培养。复苏促进因子(resuscitation-promoting factors, Rpf)是培养获取 VBNC 菌的最重要突破。结合课题组十余年从环境功能视角利用 Rpf 复苏培养 VBNC 菌的研究, 本文在阐述微生物 VBNC 状态的形成及复苏进展的基础上, 从 VBNC 菌形成及复苏过程出发, 探究“探索因子”与群体感应的内在关系。并总结了课题组利用 Rpf 所复苏培养的具有潜在环境功能的 VBNC 菌种。本论文将为揭示微生物 VBNC 状态的形成及复苏机制提供新的思路, 并为认识和重新评价 Rpf 法复苏培养 VBNC 菌在污染环境微生物修复中的作用提供理论依据。

关键词: VBNC, Rpf, 群体感应, “探索因子”, 环境功能

对不可培养微生物的培养及其机制的研究一直是微生物领域的研究热点和难点。活的但非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态是非芽孢形成菌抵御不良环境的生存机制^[1]。VBNC 状态广泛存在于已培养和未可培养的微生物中, 它是在特定条件下, 微生物不可分离培养的一种状态。据报道, 99%以上的微生物因处于 VBNC 状态而无法分离培养。因此, 研究 VBNC 状态形成及复苏的机制对于揭示不可培养微生物的存在机理具有重要意义。

目前, 微生物 VBNC 状态形成及复苏的机制

尚不明确。近年来 Epstein^[2]提出了一种“探索因子”假说, 假说中随机形成的“探索因子”有助于解释 VBNC 状态的形成及复苏。值得注意的是, 探索因子出现的随机性与群体感应(quorum sensing, QS)系统中活化细胞出现的随机性相类似。虽然 QS 调节的并非都是应激机制, 但其本质是种群密度或细胞直接向环境扩散速率的指标, 它可以发生在单个物种或不同物种之间, 也可以调节许多不同的过程^[3]。探究“探索因子”与群体感应的内在关系有望为揭示微生物 VBNC 状态的形成及复苏机制提供一定依据。

基金项目: 国家自然科学基金(41701354); 浙江省科技计划项目(2017F30030); 浙江省自然科学基金(LQ17D010002)

*通信作者。Tel: +86-579-82282273; E-mail: purple@zjnu.cn

收稿日期: 2017-08-23; 修回日期: 2017-11-05; 网络出版日期: 2017-11-28

微生物 VBNC 状态的诱导与复苏的研究主要集中于医学和流行病学领域。甚少研究关注潜在环境功能菌群的 VBNC 状态。近十余年, 我们课题组致力于利用藤黄球菌复苏促进因子 (resuscitation-promoting factor, Rpf) 复苏培养污染环境中潜在的 VBNC 功能菌群, 以提高土著微生物的活性及获得高效污染物降解菌。目前, 利用藤黄球菌 Rpf 从森林、海岛、沙漠土壤、富营养化水体、难降解有机废水及持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs) 污染环境等特殊生境中复苏培养 VBNC 菌 60 多属 100 余种, 且从中获得多种具有脱氮、除磷、除臭、絮凝、降解 POPs 等环境功能的高效菌种^[4-5]。另外, 课题组前期从菌株形态、酶活性及基因转录水平展开了联苯降解菌株进入 VBNC 状态及复苏机制的研究^[6]。

因此, 本文总结了课题组利用 Rpf 所复苏培养的具有潜在环境功能的 VBNC 菌种, 并从 VBNC 菌形成及复苏过程出发, 探究“探索因子”与群体感应的内在关系, 旨在揭示微生物 VBNC 状态的形成及复苏机制。同时为认识和重新评价 Rpf 法复苏培养 VBNC 菌在污染环境微生物修复中的作用提供理论依据。

1 自然界中的不可培养微生物

不可培养微生物又被称为未被培养微生物, 它是针对可被纯培养微生物来说的一种相对性概念^[2,7]。早于 1898 年, 样品中微生物细胞数与固体培养基上所形成的菌落数之间存在差异的现象已被研究报道^[8]。1911 年, Amann 对这种差异进行了量化处理, 并且估计出不可培养的细胞数约是

可培养细胞数的 150 倍^[9]。随后, Staley 和 Konopka 在前人的研究基础上发现了“平板计数巨大异常 (great plate count anomaly)”这一重要现象, 该现象揭示了平板菌落计数与实际细胞计数之间的差异^[10]。随着分子生物学的发展, 越来越多的不可培养微生物利用测序手段被发现^[11]。微生物不可培养的原因较为复杂, 如个别微生物由于生长速度极慢或菌落极小而导致其无法短期生长至肉眼可见的水平^[12]。但大多数微生物不可培养的原因是研究者对微生物的生长条件及其规律性的认识严重不足, 未能揭示微生物之间错综复杂的关系, 从而无法模拟微生物之间的共生关系及其信息交流而使其无法分离获得^[13]。

针对微生物 VBNC 状态的形成研究对揭示自然界中不可培养微生物的形成机理具有重要意义。VBNC 状态的形成机制与芽孢形成相似, 均为一种可使自身获得最大存活期限的一种生存机制^[14-15], 它与芽孢形成的相同点为^[11]: (1) 形成原因: 均为抵御不良环境, 获得最长存活期的生存机制; (2) 可逆性: 两者均可逆, 在英文表达上, 芽孢萌发称为 germination, VBNC 细胞重新繁殖生长称为 resuscitation。但两者也存在明显的不同, 主要表现在 3 个方面^[11]: (1) 代谢活性: 芽孢观察不到代谢活性, 而 VBNC 细胞仍有呼吸、转录和蛋白合成等; (2) 形态: 芽孢干燥, 形态与正常细胞有明显区别, 而 VBNC 细胞与正常细胞的形态差别较小; (3) 存活时间: 芽孢相比 VBNC 细胞更能抵御不良环境。VBNC 状态的形成过程及相关机制的研究相对芽孢而言起步较晚, 自 1985 年 Colwell 发现微生物的 VBNC 状态后, 研究者才开始关注 VBNC 细胞的形成条件与发生机制^[15]。

2 细菌 VBNC 状态的形成条件与发生机制

在不良环境胁迫下细菌可进入 VBNC 状态, 具体表现为细胞浓缩成球形, 虽具代谢活性, 但常规培养基上无法分离获得, 当给予合适条件时即可以恢复生长繁殖能力^[15]。大量研究表明生存环境的改变可诱导微生物进入 VBNC 状态^[16-17]。Whitesides 等^[18]于 1997 年在 5 °C 低温下培养 *Vibrio vulnificus* 时发现, 虽然细胞总量保持不变, 但可培养细胞的数量下降至无法观察到的水平, 表明 *V. vulnificus* 在低温胁迫下进入了 VBNC 状态。随后, 杜萌等^[19]也验证了 *Vibrio alginolyticus* 在低温条件下可进入 VBNC 状态, 当温度升高、营养适当时该菌能恢复可培养状态。另外, 除温度外, 许多环境条件如水分、pH 值、渗透压、有害的化学物质等均能诱导细菌进入 VBNC 状态。在水生细菌中, 细菌通过进入 VBNC 状态以应对不良环境的现象较为显著, 如粪肠球菌在 2004 被首次证明可以依附于浮游生物表面进入 VBNC 状态, 同时, Signoretto 等^[16-17]也发现粪肠球菌菌株 56R 在海水和湖水中可以依附于桡足类浮游生物表面而在不良环境中长时间存活。

目前, 细菌 VBNC 状态的发生机制尚不明确, 被广为研究探讨的主要有以下两种假说^[20-22]: 一是从细胞内的氧化损伤致细胞衰弱的角度解释了微生物不可培养的原因, 其假说的核心内容为细胞衰退导致其不可培养, 此假说与 VBNC 状态的阐释有分歧。另一种假说认为, 细菌的 VBNC 状态是类似于芽孢形成机制的一种应对不良环境的生存策略。面对微生物进入 VBNC 状态各异性, 微生物生存策略的假说具有一定的适用性。我们

也认为细菌的 VBNC 状态是属于非芽孢形成菌抵御不良环境的一种应激状态, 是一种智慧的生存机制。

3 VBNC 状态菌的复苏促进因子

VBNC 状态菌可被复苏培养是其重要的特性。Colwell 等^[15]于 1985 年最早发现藤黄球菌在生长过程中先出现停滞, 而后又重新恢复生长的现象。Kaprelyants 等^[23]于 1994 年发现高浓度的藤黄球菌在培养 3-6 个月后失去在琼脂平板上生长或形成菌落的能力, 但当添加其培养上清液后则可继续生长繁殖。1995 年, Mukamolva 等^[24]发现藤黄球菌培养至对数生长期后可分泌一种特殊能使自身恢复生长繁殖能力的因子, 并于 1998 年成功分离获得此蛋白, 将其命名为复苏促进因子 Rpf, 开启了 VBNC 状态菌复苏培养的新篇章^[25]。

在随后的研究中, Mukamolva 等^[25-26]发现产生 Rpf 蛋白的基因广泛存在于其他的高 G+C 的革兰氏阳性菌中, 从而发现 Rpf 蛋白家族。另外, Cohen-Gonsaud 等^[27]发现 Rpf 蛋白家族共享一个无特征函数的保守域, 模型预测表明 Rpf 蛋白家族均具有一个溶菌酶样的结构域, 并强调了一个在催化和底物结合中所涉及的保守残基。2005 年, Cohen-Gonsaud 等^[28]利用异核多维核磁共振技术成功解决了由结核分枝杆菌 Rv1009 分泌的 RpfB 蛋白的结构问题, 研究表明从结核分枝杆菌分泌出来的 RpfB 的结构域与溶菌酶具有同源性, 而且其结构与各种糖苷水解酶具有同源性, 从而得到保守的活性谷氨酸位点是细菌 VBNC 状态复苏的关键, 低聚糖的裂解是细胞休眠的信号, RpfB 可以裂解低聚糖等结论。2006 年, Mukamolva 等^[29]进一步揭示了藤黄球菌分泌的 Rpf 蛋白家族是一

种细胞壁水解酶,同时揭示了在 Rpf 蛋白的结构域中,保守谷氨酸残基不是影响 Rpf 蛋白活性的关键因素,更换一种或两种半胱氨酸残基可在 Rpf 蛋白的结构域中形成二硫桥键,Rpf 蛋白的活性会减弱,但不会完全消失,且 Rpf 蛋白的活性与其从所在菌的肽链中分离成键的能力相关,分离成键能力越强,活性越强。近年来,Nikitushkin 等^[30]报道指出分枝杆菌的 RpfB 和复苏促进因子相互作用蛋白的混合物与分枝杆菌的肽聚糖反应产物相同,均为一种二糖二肽,且利用合成的 1,6-脱水二糖二肽发现其是能够在 9–100 ng/mL 浓度范围内复苏休眠分枝杆菌细胞的最小结构。Ruggiero 等^[31–32]对 RpfB 的 5 个不同的结构域进行了研究,发现 RpfB 非催化结构域可能与细胞壁的蛋白质结合有关。

4 VBNC 状态菌的复苏机制探讨

目前,虽然针对 Rpf 作用机制研究较多,但是探究 VBNC 状态菌复苏的内在机制相对较少。当微生物细胞处于 VBNC 状态时,应该同时存在一种类似于侦察兵的探索细胞(scout cells),这些探索细胞被研究者们称作“探索因子”,是 VBNC 状态菌复苏的关键^[2,7]。“探索因子”是随机被唤醒的,在某些菌种中,“探索因子”可分泌某种信号分子从而诱导周围休眠细胞的复苏生长^[2]。Burger 等^[33]验证了微生物生命周期“探索因子”模型,其内容为:在生长环境允许的条件下,不同菌种或同一菌种的休眠细胞均无特定的生长延滞期,其在随机的时间间隔内启动生长,其中“探索因子”细胞出现的随机性是该模型的关键,也是与群体感应系统作用机制相关联的核心内容。

群体感应是细菌感知种内与种间数量变化而引发适应性调节的系统。该系统是由酶催化合成信号分子,通过扩散或转运系统到达细胞外,一旦达到一定浓度,即被膜上的感应系统识别,从而引起受体蛋白的构象或基因的变化^[3]。细菌通常利用群体感应系统编排基因表达程序,并以此作为集体行为的基础^[34]。群体感应系统中存在随机出现的活化细胞,此细胞将有利于适应某种环境的表现型首先在此群体间传递^[34]。从这个角度看“探索因子”出现的随机性与群体感应系统中活化细胞出现的随机性相似,由此推测,不可培养微生物的“探索因子”假说与群体感应系统的作用机制存在一定的联系。而且研究表明,Rpf 蛋白主要对高 G+C 革兰氏阳性菌,特别是放线菌门具有复苏促进作用,同时 *rpf* 基因是藤黄球菌生长繁殖所必需的基因,且控制放线菌门中大部分菌种的生长繁殖^[29–35]。另外,随着研究的深入,越来越多的 *rpf* 类似基因在多个菌种中被发现^[36],*rpf* 基因有可能存在于群体感应系统的活化细胞中,由其表达并传递。综上可推断,群体感应系统可能在细菌 VBNC 状态的形成及复苏过程中起重要的调控作用。不同微生物对不同环境胁迫因子的应对方式相同,微生物根据“探索因子”反馈的信息通过群体感应进行自我调节^[37]。当生存环境发生不利变化时,“探索因子”最先做出反应,并分泌信号分子作用于其他细胞,促使其他细胞进入 VBNC 状态而抵御不利环境。而当胁迫因子解除时,“探索因子”则分泌另外一种信号分子,如 Rpf 蛋白,促使部分 VBNC 状态细胞复苏,而未能感受到信号分子的 VBNC 细胞则衰退直至死亡(图 1)。

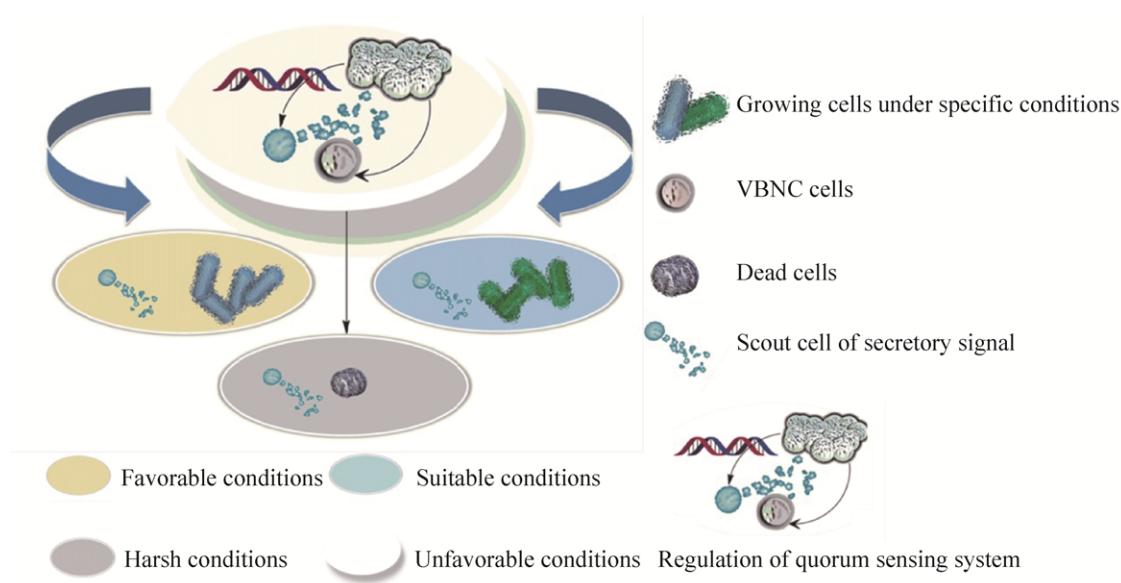


图 1. 细胞 VBNC 状态的形成及复苏机制示意图

Figure 1. Schematic diagram of mechanism of formation and resuscitation of VBNC cells.

5 Rpf 复苏培养具有潜在环境功能的 VBNC 状态菌

目前, Rpf 复苏促进 VBNC 状态菌的研究主要集中于潜在病原菌的发现及疫苗研制。我们课题组首次将 Rpf 蛋白应用于污染环境修复方面的研究, 对探究 VBNC 状态菌的潜在环境功能具有重要贡献。Su 等^[4,38]基于藤黄球菌 Rpf 成功从多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)高污染区分离出多株 PCBs 降解菌, 并获得一株红球菌属的新种, 命名为 *Rhodococcus biphenylivorans* sp. TG9^T。另外, 课题组基于改进的最大或然数(most probable number, MPN)法, 利用藤黄球菌 Rpf 复苏培养 60 多属 100 余种 VBNC 菌株, 部分菌株所构建的系统发育树见图 2。

图 2 中 37 个菌株归类于 Proteobacteria (变形菌门)、Actinobacteria (放线菌门)和 Firmicutes (厚壁菌门) 3 个门, 及 Alphaproteobacteria (α -变形菌纲)、Betaproteobacteria (β -变形菌纲)、

Gammaproteobacteria (γ -变形菌纲)、Actinobacteria (放线菌纲)和 Bacilli (芽孢杆菌纲) 5 个菌纲。其中, 归属于 Gammaproteobacteria 的 *Pseudomonas* 属及 Actinobacteria 菌纲的 *Rhodococcus* 属等菌种在环境污染修复领域具有重要的意义。如 Vaidya 等^[39]报道了 *Pseudomonas* sp. ASDP1、*Burkholderia* sp. ASDP2 和 *Rhodococcus* sp. ASDP3 这三株菌联合培养可降解高分子量的多环芳烃。Mishra 等^[40]利用 *Rhodococcus ruber* 9C 进行生物脱硫, 发现其最优脱除效率达 29%。Carvajal 等^[41]利用 *Rhodococcus* 属的细菌选择性去除吸附在氧化铝、二氧化硅和海泡石中的二苯并噻吩以及 4,6-二甲基苯并噻吩分子中的硫, 而不产生气态污染物。而且, Su 等^[38,42]研究表明含 Rpf 的藤黄球菌胞外分泌物显著促进 *Rhodococcus* 及 *Pseudomonas* 属的菌群生长, 其中 Actinobacteria 门的 *Rhodococcus* 属及其他的非可培养菌可能是其中可被复苏的 PCBs 高效降解菌群。

另外, 由图 2 可知, Rpf 蛋白不仅对高 G+C

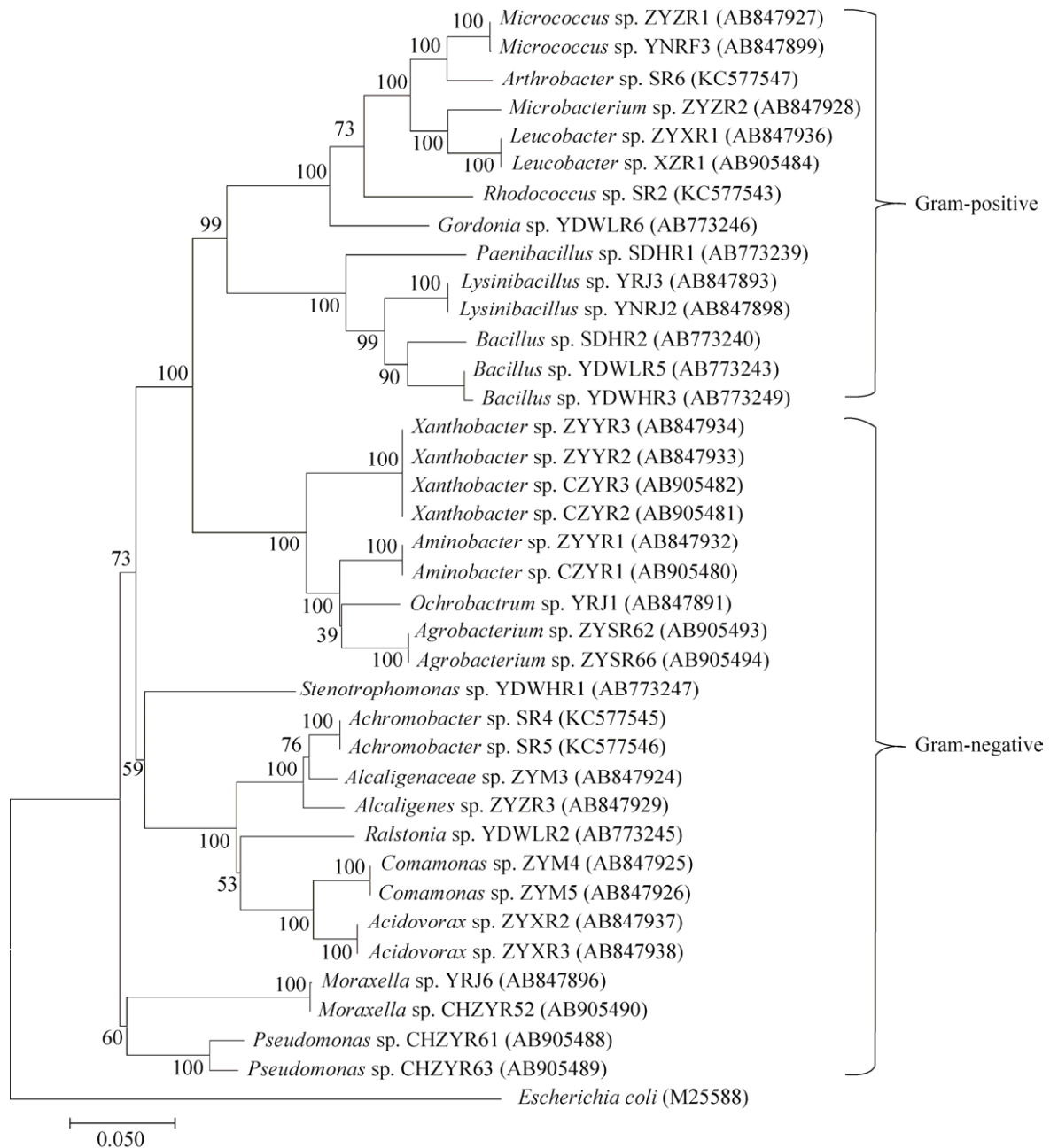


图 2. 基于藤黄球菌 Rpf 复苏培养所获得菌株的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic analysis of bacteria resuscitated by Rpf of *Micrococcus luteus* based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bootstrap values ($n=1000$) of above 50% are shown at the nodes. Kimura-5 distances were derived from a distance matrix to construct an optimal unrooted tree using the Neighbour-Joining method. Bar, 5% sequence divergence.

含量的革兰氏阳性菌具有复苏促进作用,对低 G+C 含量的革兰氏阳性菌属,如 *Bacillus* 也具有复苏促进的功效,同时对革兰氏阴性菌 *Alcaligenes*、

Comamonas、*Pseudomonas*、*Moraxella* 等菌属也具有有良好的复苏促进作用。基于此可知,虽然藤黄球菌 Rpf 蛋白并不是所有微生物类群的复苏促

进因子, 但其可刺激细胞分泌类似 Rpf 的信号分子使不可培养微生物获得可培养性能的机制是相对一致的, 即表明微生物 VBNC 状态的复苏统一受一类细胞调控。

6 展望

本文探究“探索因子”与群体感应的内在关系以期微生物 VBNC 状态形成及复苏机制的研究提供新的思路, 从而为揭示不可培养微生物的存在机理提供一定理论基础。因此, 由上述思路展开 VBNC 状态的形成及复苏机制的研究尚待进行。另外, 针对污染环境微生物修复技术应用的瓶颈, 展开 Rpf 蛋白促进污染环境中土著功能菌群的活性及复苏培养潜在功能菌种的研究非常重要。它将为挖掘高效降解有机污染物的 VBNC 菌种及其潜在新种资源提供新的途径, 并为重新认识和评价作为绝大部分微生物资源的 VBNC 菌群在 POPs 降解及环保领域中的作用提供新的科学依据, 同时为微生物降解治理技术在 POPs 污染土壤修复中的应用开辟新的前景。

参考文献

- [1] Pinto D, Santos MA, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 61–76.
- [2] Epstein SS. Microbial awakenings. *Nature*, 2009, 457(7233): 1083.
- [3] Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, 2011, 111(1): 28–67.
- [4] Su XM, Liu YD, Hashmi MZ, Hu JX, Ding LX, Wu M, Shen CF. *Rhodococcus biphenylivorans* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(1): 55–63.
- [5] Yu XY, Zhang L, Ren B, Yang N, Liu M, Liu XT, Zhang LX, Ding LX. *Arthrobacter liuii* sp. nov., resuscitated from Xinjiang desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(3): 896–901.
- [6] Su XM, Sun FQ, Wang YL, Hashmi MZ, Guo L, Ding LX, Shen CF. Identification, characterization and molecular analysis of the viable but nonculturable *Rhodococcus biphenylivorans*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18590.
- [7] Epstein SS. The phenomenon of microbial uncultivability. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(5): 636–642.
- [8] Winterberg H. Zur Methodik der Bakterienzählung. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1898, 29(1): 75–93.
- [9] Amann J. Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskops. *Centralbl Bakteriologie*, 1911, 29: 381–384.
- [10] Staley JT, Konopka A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39(1): 321–346.
- [11] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309(1): 1–7.
- [12] Eichorst SA, Breznak JA, Schmidt TM. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2708–2717.
- [13] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review in Microbiology*, 2001, 55(1): 165–199.
- [14] Cano RJ, Borucki MK. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old dominican amber. *Science*, 1995, 268(5213): 1060–1064.
- [15] 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.
- [16] Signoretto C, Burlacchini G, del Mar Lleò M, Pruzzo C, Zampini M, Pane L, Franzini G, Canepari P. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6892–6896.
- [17] Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, Canepari P. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2756–2761.
- [18] Whitesides MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1002–1005.
- [19] Du M, Chen JX, Zhang XH, Li AJ, Li Y. Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus*

- VIB283. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(3): 283–288.
- [20] McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(1): 1–9.
- [21] Nyström T. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(1): 17–23.
- [22] Nyström T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(3): 159–164.
- [23] Kaprelyants AS, Mukamolova GV, Kell DB. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 115(2-3): 347–352.
- [24] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Kell DB. Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 67(3): 289–295.
- [25] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(15): 8916–8921.
- [26] Mukamolova GV, Kormer SS, Kell DB, Kaprelyants AS. Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor. *Archives of Microbiology*, 1999, 172(1): 9–14.
- [27] Cohen-Gonsaud M, Keep NH, Davies AP, Ward J, Henderson B, Labesse G. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29(1): 7–10.
- [28] Cohen-Gonsaud M, Barthe P, Bagnéris C, Henderson B, Ward J, Roumestand C, Keep NH. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(3): 270–273.
- [29] 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*, 2006, 59(1): 84–98.
- [30] Nikitushkin VD, Demina GR, Shleeva MO, Guryanova SV, Ruggiero A, Berisio R, Kaprelyants AS. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS Journal*, 2015, 282(13): 2500–2511.
- [31] Ruggiero A, Squeglia F, Romano M, Vitagliano L, de Simone A, Berisio R. Structure and dynamics of the multi-domain resuscitation promoting factor RpfB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2017, 35(6): 1322–1330.
- [32] Ruggiero A, Squeglia F, Romano M, Vitagliano L, de Simone A, Berisio R. The structure of Resuscitation promoting factor B from *M. tuberculosis* reveals unexpected ubiquitin-like domains. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2016, 1860(2): 445–451.
- [33] Buerger S, Spoering A, Gavriš E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3221–3228.
- [34] Pappenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576–588.
- [35] 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.
- [36] Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors: Commentary. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(3): 238–243.
- [37] Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(8): 2478–2483.
- [38] Su XM, Liu YD, Hashmi MZ, Ding LX, Shen CF. Culture-dependent and culture-independent characterization of potentially functional biphenyl-degrading bacterial community in response to extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(3): 569–578.
- [39] Vaidya S, Jain K, Madamwar D. Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*, 2017, 7(1): 29.
- [40] Mishra S, Panda S, Pradhan N, Satapathy D, Biswal SK, Mishra BK. Insights into DBT biodegradation by a native *Rhodococcus* strain and its sulphur removal efficacy for two Indian coals and calcined pet coke. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 120: 124–134.
- [41] Carvajal P, Alejandro Dinamarca M, Baeza P, Camú E, Ojeda J. Removal of sulfur-containing organic molecules adsorbed on inorganic supports by *Rhodococcus Rhodochrous* spp.. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(2): 241–245.
- [42] Su XM, Zhang Q, Hu JX, Hashmi MZ, Ding LX, Shen CF. Enhanced degradation of biphenyl from PCB-contaminated sediments: the impact of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1989–2000.

Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms

Shuo Zhang, Linxian Ding, Xiaomei Su*

College of Geography and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

Abstract: It is estimated that the majority (>99%) of microorganisms resist cultivation because they are in a viable but non-culturable (VBNC) state. Resuscitation-promoting factors (Rpf) are one of the most important breakthroughs in the cultivation of VBNC bacteria. In the past decade, our group focused on resuscitation of VBNC bacteria by Rpf for exploring their potential environmental functions. Incorporated our previous studies in this mini-review, we provided the overview of formation and resuscitation of VBNC bacteria, and explored the relationship between “scout cells” and quorum-sensing based on the process of formation and reversion of VBNC cells. Moreover, we also summarized the VBNC bacteria possessed potential environmental functions which were previously isolated from various environments with Rpf addition. This review provides not only a new insight into revealing the mechanisms of formation and resuscitation of VBNC bacteria, but also a theoretical basis for understanding and re-evaluating the role of Rpf method in the application for environmental bioremediation.

Keywords: viable but non-culturable, resuscitation-promoting factors, quorum-sensing, “scout cells”, environmental functions

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41701354), by the Special Fund for the Zhejiang Research Academy of Environmental Science (2017F30030) and by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (LQ17D010002)

*Corresponding author. Tel: +86-579-82282273; E-mail: purple@zjnu.cn

Received: 23 August 2017; Revised: 5 November 2017; Published online: 28 November 2017