细菌 Rpf 对 VBNC 状态细菌的复苏作用及在环境修复中的应用

付建辉[1]，陈吉祥[1*]，王永刚[2]，罗 旦[1]

（1.兰州理工大学 石油化工学院，甘肃 兰州 730050；2.兰州理工大学 生命科学与工程学院，甘肃 兰州 730050）

摘 要 微生物修复方法因其环境友好和高效性而得到广泛应用。自然条件下多数微生物处于难培养或活的非可培养（Viable but Non-culturable，VBNC）状态，仅约 1%的微生物可被纯培养。复苏促进因子（Resuscitation promoting factor，Rpf）作为一种细菌产生的细胞活性因子，能促进 VBNC 状态细菌的复苏，将其转变为可培养状态。本文综述了细菌 VBNC 状态的产生机理、Rpf 蛋白的功能及生物学活性，展望了 Rpf 在环境修复中的应用及所面临的难题，为微生物修复技术的发展提供新的思路。

关键词 活的非可培养状态；复苏促进因子；微生物修复；生物降解；环境污染

中图分类号 Q938.1+1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2026)01-0077-10

doi：10.3969/j.issn.1005-7021.2026.01.008

Resuscitation Effect of Bacterial Rpf on VBNC State Bacteria and Its Application in Environmental Remediation

FU Jian-hui[1], CHEN Ji-xiang[1*], WANG Yong-gang[2], LUO Dan[1]

(1.*School of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou* 730050;
2.*School of Life Sciences and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou* 730050)

Abstract Microbial remediation methods are widely used because of their environmental friendliness and efficiency. Most microorganisms are in the Viable but Non-culturable (VBNC) state under natural conditions, and only about 1% of microorganisms can be purely cultured. Resuscitation-promoting factor (Rpf), a cellular active factor produced by bacteria, can promote the resuscitation of VBNC state bacteria to a culturable state. The generation mechanism of bacterial VBNC state, the function and biological activity of Rpf protein were reviewed in this paper. The application of Rpf in environmental remediation and its challenge difficulties were also discussed in order to provide new ideas for the development of microbial remediation technology.

Keywords viable but non-culturable state; resuscitation-promoting factors; microbial remediation; biodegradation; environmental pollution

微生物修复是一项经济有效且环境友好的环境修复技术，该技术通过利用微生物的代谢活动改善和修复受污染或损害的环境[1]。这种方法可以有效地处理各种污染物，包括石油烃类[2]、重金属[3]、农药[4]和其他有机污染物[5]。例如在污水处理领域常用的活性污泥法和生物膜法，以及有机固废处理领域中的堆肥等工艺，其核心技术均为微生物修复。微生物修复技术的关键在于选择适用于不同污染环境的高效降解微生物，因此寻找具有高效污染物降解能力的菌株成为当前研究的焦点。自然界存在着丰富的微生物资源，传统的微生物分离方法只能获取

基金项目：国家自然科学基金项目（42267017）；甘肃省优秀研究生“创新之星”项目（2023CXZX-421）

作者简介：付建辉 男，博士研究生。研究方向为环境微生物学。E-mail：fujianhui10@163.com

* 通讯作者。男，教授，博士，博士生导师。研究方向为环境微生物学及分子生物学。E-mail：betcen@163.com

收稿日期：2025-03-02

微生物总量中很小的一部分,约占 1%左右[6],目前被有效描述的古细菌和细菌物种约 14 000 种,其分布在 3 500 个属和 38 个门中[7]。在这些物种中,约 97% 属于四个细菌门,包括拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Pseudomonadota)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinomycetota)[8],根据 16S rDNA 基因序列数据推算的古菌和细菌的总物种数约为 400 000 个,包括大约 60 000个属[9],然而地球上古菌和细菌物种的实际数量估计可能比这个数字高几个数量级[10],其中绝大部分微生物处于难培养或者不可培养状态。1982 年,Xu 等[11]通过对海洋和河口环境中的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)进行研究,首次提出了活的非可培养(Viable but Non-culturable,VBNC)状态概念,即当细菌处于低温、低营养、低盐等不利生存条件下时,会进入一种能够继续存活但无法通过传统培养方法培养的状态。这些数量庞大的处于难以培养或不可培养状态的细菌在环境保护、生物资源开发等领域具有巨大的应用潜力。复苏促进因子(Resuscitation promoting factor,Rpf)最初是在藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)培养液中发现的,它能够复苏处于 VBNC 状态的细菌,并促进菌体正常生长[12]。目前关于 Rpf 的应用主要集中在藤黄微球菌 Rpf 和红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)Rpf 上。研究表明[13-15],通过在多氯联苯污染土壤中加入含 Rpf 的藤黄微球菌培养液的上清液,不仅能显著提高多氯联苯降解效率、促进细胞生长,还可以从处理过的土壤中分离出假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)HR1、无色杆菌(*Achromobacter* sp.)HR2、念珠菌(*Candida* sp.)LN1 等多种降解细菌,丰富了土壤细菌多样性和微生物降解菌种资源库。Luo 等[16]纯化了红平红球菌 KB1 中的 Rpf 家族蛋白,进一步验证了这些蛋白对细菌生长和复苏过程的重要影响。Fu 等[17]研究表明,Rpf 蛋白对红平红球菌 KB1 的生长具有显著的促进作用,能够明显缩短该菌株进入对数生长期所需的时间,加入 10 nmol 和 100 nmol 重组 Rpf1 蛋白,菌株 KB1 在 48 h 内生长能力分别增加 301.70%和 382.28%。在石油污染土壤中,添加 Rpf1 蛋白也能够显著增加可培养微生物的种类和数量,在富集培养基中添加 0.40%(体积分数)的重组 Rpf1 和 Rpf2 使可培养菌的种类在属水平上相比空白对照组分别增加了 36.59%和 68.29%,为土壤生态系统的恢复提供了有力的支持[18-19]。通过添加 Rpf 蛋白还成功分离出多株高效石油降解细菌,其降解细菌对原油的降解率超过了 30.00%。这些发现强调了 Rpf 家族蛋白在微生物生态学和环境修复中的重要作用。鉴于 Rpf 在环境微生物修复中具有巨大的应用潜力和价值,本文重点综述 Rpf 的作用机制及其在环境修复中的关键作用。

1 VBNC 状态细菌

VBNC 状态是一种微生物培养中普遍存在的现象,其在大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和霍乱弧菌中被首次发现以来,VBNC 状态被广泛用于描述微生物在面对压力环境时的生存策略(图 1)[20-22]。在 VBNC 状态下,细菌不能在实验室配制的标准培养基上生长,但仍保留其代谢功能和基因表达,同时细胞膜保持完整,但其形态会发生较大改变(图 2)[23-25]。VBNC 状态的细菌保留了恢复到活跃代谢状态的潜力,只需适当的环境条件和外部刺激即可复苏。理解 VBNC 状态对研究微生物在环境中的适应性、生存机制以及高效降解微生物的筛选和应用具有重要的科学价值[26]。

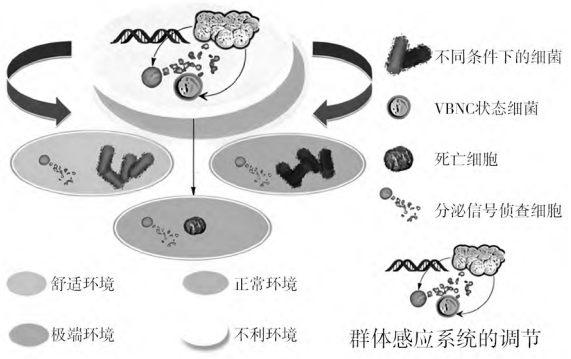


图 1 环境中细菌 VBNC 状态形成示意图[22]

Fig.1 Schematic representation of bacterial VBNC state formation in the environment[22]

现有研究表明,超过 100 种细菌能进入 VBNC 状态,常见的有弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)等,此外,一些真菌和古细菌也能进入此状态[27]。能够进入 VBNC 状态的大多为革兰阴性细菌,例如创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、弗氏柠檬酸杆菌

(*Citrobacter freundii*)、爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)[28]等。关于进入 VBNC 状态的革兰阳性细菌的研究相对有限，目前已知的报道主要包括嗜联苯红球菌(*Rhodococcus biphenylivorans*)[29]和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[30]等。

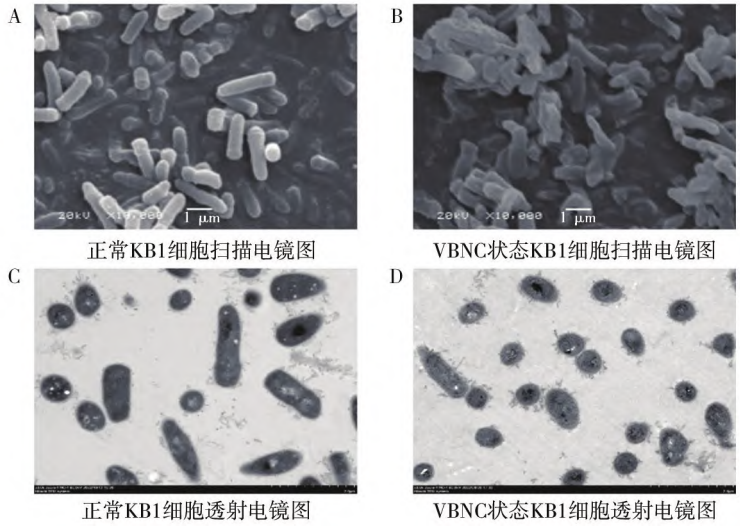


图 2 不同状态红平红球菌 KB1 细胞电镜观察[25]

Fig.2 Electron microscope observation of *Rhodococcus erythropolis* KB1 cells in different state[25]

正常细胞状态为对数生长期的 KB1；VBNC 状态为 2.5%(体积分数)苯诱导 18 h 后进入 VBNC 状态的 KB1

The normal state is KB1 in the logarithmic growth phase; The VBNC state is KB1 that enters the VBNC state after induction with 2.5%(v/v) benzene for 18 hours

细菌进入 VBNC 状态可能受到物理、化学和生物环境等多种因素的影响。物理因素包括高温、低温、高盐、低盐(渗透胁迫)、极端 pH 值、日照、辐射、干燥、脉冲电场和高压等。化学因素则涉及营养缺乏、抗生素压力、食品防腐剂、消毒剂、亚硝酸盐、重金属、有机污染物和其他有毒化合物的接触，以上各种因素均可能促使细菌从正常生长状态转变为 VBNC 状态[31]。生物因素也可能促使细菌进入 VBNC 状态。例如，研究发现棘形棘阿米巴虫(*Acanthamoeba castellanii*)能够诱导嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)进入 VBNC 状态[32]。

2 复苏促进因子(Rpf)

Rpf 首次发现于藤黄微球菌培养液的上清液中，随后在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)[33]、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)[34]、红平红球菌、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)[35]等细菌中均有发现。藤黄微球菌 Rpf 蛋白包含了 220 个氨基酸残基，其 N 端的保守结构域由 75 个残基组成，是具有溶菌酶活性的关键部分，而其 C 端由 109 个氨基酸残基组成可变区，其中包括 LysM 结构域，其可变区通过较短的连接区与细胞壁肽聚糖连接在一起。Nikitushkin 等[36]研究表明，保守的 Rpf 结构域在藤黄微球菌 Rpf 蛋白促生长和促复苏过程中起着重要的作用，而单独的 Rpf 保守域具有与完整 Rpf 相一致的生物学活性。

2.1 Rpf 家族蛋白及其生物学特性

Rpf 家族蛋白广泛分布于放线菌门的细菌中，如分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、微球菌属(*Micrococcus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)等。结核分枝杆菌中含有 5 个藤黄微球菌 Rpf 蛋白的同源基因，其分别编码 RpfA、RpfB、RpfC、RpfD 和 RpfE 五种蛋白[37]。RpfB 蛋白在结核分枝杆菌中扮演着至关重要的角色，它是唯一的结核分枝杆菌必需的 Rpf 蛋白。这个蛋白质的 C-末端包含了一系列功能性结构域，其中包括一个由 70 个氨基酸残基构成的保守 Rpf 结构域、一个 G5 结构域，以及三个 DUF348 结构域(图 3)。对结核分枝杆菌 RpfB 蛋白的结构研究揭示其 DUF348 结构域具有类似泛素的折叠结构，这些 DUF348 结构域与 G5 结构域间的紧密相

互作用表明它们在蛋白质的功能中发挥着关键作用[38]。Hett 等[39]研究表明,结核分枝杆菌的 RpfB 蛋白并非独立起作用,而是与 Rpf 相互作用蛋白(RipA)形成复合物。其中 RpfB 负责裂解细胞壁肽聚糖的糖苷键,而 RipA 作为一种内肽酶负责裂解肽聚糖的交联键,这两种蛋白质之间的相互作用促进了对细胞壁肽聚糖的协同水解。Sexton 等[40]研究表明,Rpf 能裂解 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡糖胺之间的糖苷键,在肽聚糖合成及 1,6-脱水-N-乙酰胞壁酸的形成过程中发挥重要作用。

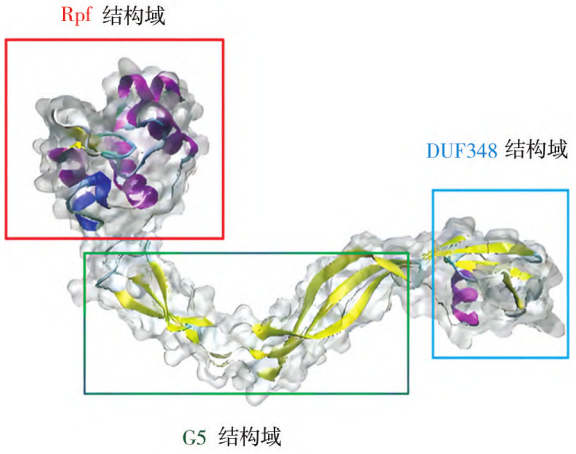


图 3 红平红球菌 KB1 的 Rpf2 蛋白三级结构模拟图

Fig.3 Simulation of the tertiary structure of *Rhodococcus erythropolis* KB1Rpf2 protein

Rpf 蛋白的细胞复苏功能与其溶菌酶活性密切相关。当谷氨酰胺或丙氨酸替换红平红球菌 Rpf1 中的谷氨酸活性位点 Glu54 时,其溶菌酶活性及复苏功能均有所减弱。当此位点被赖氨酸取代时,其溶菌酶活性完全丧失,且不能复苏 VBNC 状态的细胞。相似结果也在藤黄微球菌中观察到,其中赖氨酸和丙氨酸的替换导致溶菌酶活性基本丧失,这进一步证实了 Rpf 蛋白的溶菌酶活性对于细胞复苏过程的重要性[16,41],推测 Rpf 可能是通过其溶菌酶活性裂解细胞壁肽聚糖释放某些小分子产物作为信号分子,从而刺激细菌复苏。谷氨酸棒杆菌包含两个 *rpf* 家族基因,分别命名为 *rpf1* 和 *rpf2*。当这两个基因中的一个发生突变时,细胞的生长通常不受明显影响,当双基因同时发生突变时,菌株的生长速度显著减慢,导致休眠状态的细胞无法复苏并生长。将野生型、过表达 *rpf1* 或 *rpf2* 基因的谷氨酸棒杆菌对数生长期培养液的上清液加入到野生型和 *rpf* 单基因突变的谷氨酸棒杆菌培养液的上清液中,可以显著缩短其进入对数生长期时间[42]。Jungwirth 等[35]研究表明,谷氨酸棒杆菌 *rpf2* 基因的表达分别受调节子 GlxR、RamA 以及 RamB 三重转录调控。

2.2 Rpf 结构域及其附属结构域功能

Rpf 家族蛋白除了包含保守的 Rpf 结构域外,还具备多种其他附属结构域,例如 LysM、LytM、DUF348 和 G5 结构域(图 4)。目前许多附属结构域的功能还未经实验验证,而已通过实验验证的结构域包括天蓝色链霉菌中 RpfA 的 LysM 结构域和 RpfD 的 LytM 结构域,这些结构域影响着 Rpf 蛋白的溶菌酶活性。例如,当 RpfA 缺失 LysM 结构域时,其溶菌酶活性降至原蛋白的 70%,而 RpfD 中 LysM 和 LytM 双缺失后,溶菌酶活性仅为原蛋白的 30%,表明这些结构域可能通过影响蛋白与肽聚糖的结合能力来调节溶菌酶活性[40]。我们观察到 KB1 的 Rpf2 蛋白中 DUF348 结构域缺失会减弱其溶菌酶活性,且活性降低程度与缺失的 DUF348 结构域数量成正比。其他多个结构域的功能仍需进一步深入研究。

2.3 Rpf 可能的同系物裂解转糖基酶

裂解转糖基酶(Lytic Transglycosylase,LT)是一类糖苷酶,在不涉及糖原水解的情况下,能够裂解细菌细胞壁中肽聚糖结构,从而参与细菌细胞壁的形成和裂解过程。裂解转糖基酶在细胞壁回收和细胞壁抗生素检测的关键连接点发挥着关键作用。尽管它们的结构使其成为糖苷水解酶超家族的成员,但裂解转糖基酶的催化反应实际上是非水解性的。裂解转糖基酶的反应通过 N-乙酰基-N-乙酰-β-D-胞壁糖基(1,6-脱水-MURNAc)的分子内环化,在 NAM-NAG 糖苷键上裂解肽聚糖的多糖(图 5)[43]。这种转化是 LT 催化的标志,而 Rpf 与 LT 具有相同的 Glu 催化活性位点(图 6),在肽聚糖裂解中发挥相似的切割作用。但是大肠埃希菌中 slt70 蛋白的 Glu 催化活性位点为绝对保守,如将其替代,其酶活性将完全消失,而在 Rpf 中将其取代后,酶活性虽然大幅降低,但仍然保持部分酶活性及促生长和促复苏能力。

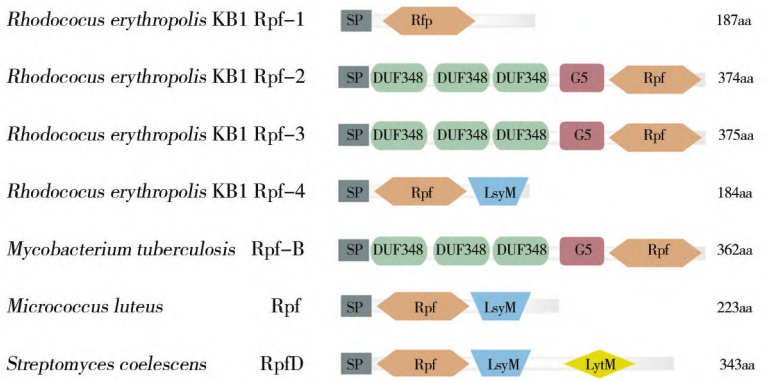


图 4　部分 Rpf 家族蛋白结构域示意图

Fig.4　Illustration of structural domains in selected Rpf family proteins

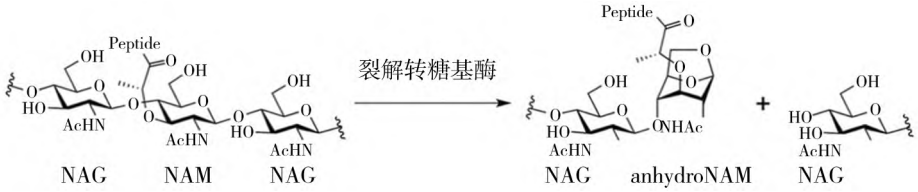


图 5　裂解转糖基酶作用机制

Fig.5　Mechanism of action of lytic transglycosylase

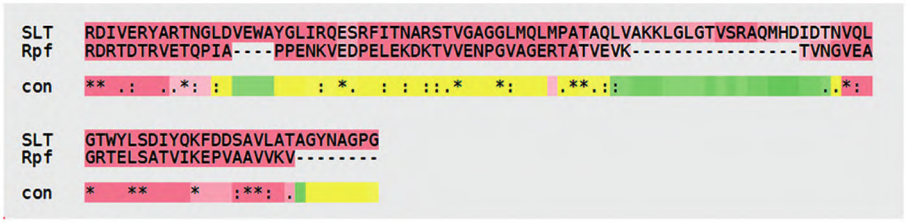


图 6　Rpf 与 SLT 结构域序列比对

Fig.6　Sequence alignment of Rpf and SLT domains

SLT 结构域序列选自大肠埃希菌的 slt70 蛋白；Rpf 结构域序列选自红平红球菌 KB1 的 Rpf1 蛋白

SLT domain sequence is selected from *Escherichia coli* slt70 protein; Rpf domain sequence is selected from *Rhodococcus erythropolis* KB1 Rpf1 protein

在革兰阴性菌中，含有 1,6-脱水 MurNAc 的胞肽是从周质通过跨膜蛋白 AMPG 进入细胞质[44]，这些胞肽在细胞质中被降解，降解产物用于 Lipid II 的生物合成。在细胞质中组装的 Lipid II 被传递到周质，用于肽聚糖的从头合成[45-46]。肽聚糖的合成、重塑和降解之间的完美平衡维持了细胞壁的完整性（图 7）[43]。革兰阳性菌的细胞壁与革兰阴性菌的细胞壁有显著的区别。尽管革兰阳性菌和革兰阴性菌的肽聚糖在结构和化学成分上非常相似，但革兰阳性菌细胞壁的多层外骨架更为厚实。此外，其他聚合物结构（尤其是脂磷壁酸、壁磷壁酸和荚膜多糖的聚合物结构）通过共价连接与革兰阳性菌细胞壁相结合。例如，革兰阳性枯草芽孢杆菌具有一个染色体编码的六个基因簇，与细胞壁循环有关[47]。然而，这些基因编码的蛋白质中却没有裂解转糖基酶。革兰阳性菌的裂解转糖基酶活性似乎仅限于肽聚糖生物合成过程中的肽聚糖链大小[48]，对于革兰阳性芽孢形成菌而言，尽管裂解转糖基酶对于孢子形成和发芽过程没有影响，Rpf 蛋白却对其具有显著影响[49]。目前关于 Rpf 与 LT 关系的研究还相对较少，需要进一步深入研究其结构和作用机制的异同。

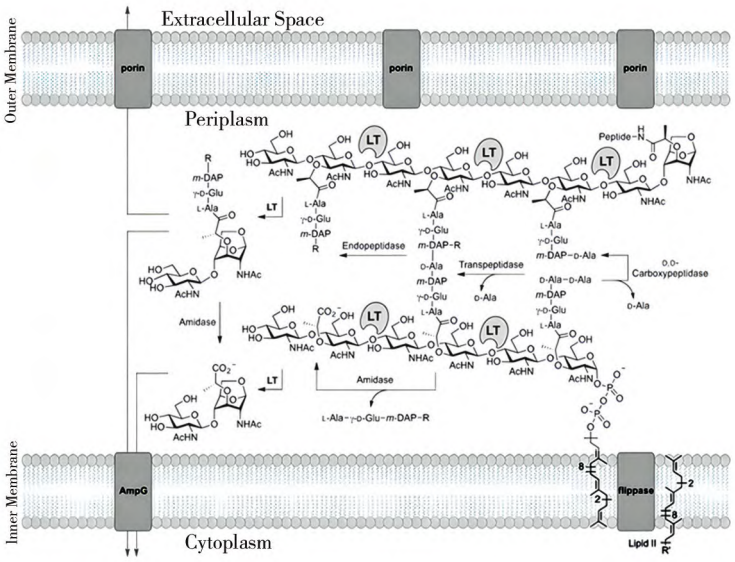


图 7 革兰阴性菌细胞壁再循环示意图[43]

Fig.7 Periplasmic events in Gram-negative cell wall recycling[43]

3 Rpf 在微生物修复环境污染中的应用

自细菌 VBNC 状态被发现以来,医学和流行病学领域已经对其进行了深入的研究,包括 VBNC 状态的诱导、形成和复苏机制的研究,并已将其研究成果应用于医疗和疾病防治等领域[50]。随着环境污染问题日益严重,自然环境中超过 99%的难培养和不可培养微生物已成为生物修复领域的重要种质资源,具有极大的开发潜力。在环境恶化或污染物的压力下,部分细菌通过进入 VBNC 状态来应对这些不利条件。进入 VBNC 状态是细菌的自我保护机制,能够在恶劣环境下维持生存,但其代谢活动极大降低,此时用传统的培养方法难以分离培养。当环境条件改善,适合细菌生长时,这些细菌就可以恢复代谢活性和降解污染物能力。Rpf 能够促进处于 VBNC 状态细菌的复苏,复苏的细菌细胞有助于促进污染物降解,提高修复效率。因此,利用 Rpf 复苏自然界中 VBNC 状态的细菌,并将其应用于污染土壤、河流和海洋的环境修复等领域,具有广阔的应用前景。

在土壤修复方面,Han 等[51]使用藤黄微球菌的 Rpf 成功复苏了一株降解多氯联苯(PCBs)的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) LS1,发现该菌株对 PCB 18 和 52 具有更好的降解能力,且该菌株可以长期存活在受 PCBs 污染的土壤中,并保持可培养状态,从而更有效地利用它们进行环境修复。Fu 等[17]研究了红平红球菌 Rpf2 在含油土壤中对可培养细菌多样性的促进作用,结果表明,纯化的 Rpf2 蛋白具有溶菌酶活性,添加纯化的重组 Rpf2 蛋白,利用其促生长和促复苏特性,显著提高了土著微生物的可培养数量与种类,进而提升了土著微生物的整体石油降解能力与可培养降解菌的多样性,最终成功分离出大量高效石油降解菌。对 VBNC 状态下细菌 PCBs 生物降解能力的研究发现,通过添加藤黄微球菌 Rpf 对嗜联苯红球菌 TG9T 菌株进行增殖从而提高 PCBs 降解率。表明外源 Rpf 可以刺激内源 *rpf* 基因同源的表达,从而唤醒进入 VBNC 状态的 TG9T 菌株,增加细胞数量并高效表达 PCBs 降解基因,进而有效降解 PCBs[29]。因此 Rpf 不仅能复苏土壤中 VBNC 状态细菌,并通过促进微生物生长增强土著微生物对污染物的降解能力,而且分离出的降解菌对土壤中污染物的胁迫具有良好的抵抗能力和存活性,表明 Rpf 在污染土壤的生物修复中具有重要价值。

在水环境修复方面,高盐度和含苯酚污水条件下,藤黄微球菌 Rpf 加速了污泥驯化的启动过程,并显著提高了耐盐性苯酚降解能力。高通量测序显示,Rpf 复苏的主要是放线菌门中的棒状

杆菌属(*Corynebacterium*)、拟杆菌门中的嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)和 *Petrimonas*,这些关键功能性菌群有助于在高盐度条件下更好地降解苯酚[52]。Su 等[53]发现,在膜生物反应器(Membrane Bio-Reactor,MBR)中添加 Rpf 能够提高有机污染物去除效率,复苏假单胞菌属的优势菌群,并且 Rpf 对 MBR 系统的生物响应性和稳定性都具有积极的影响。在水环境修复过程中,Rpf 蛋白能够增强相关功能菌群的活性,提高它们对污染物的去除效率,并增加处理系统的稳定性,有望为水环境修复领域提供有效的工具和策略。

目前的研究表明,在受污染的环境中,面对污染物的胁迫,部分微生物进入 VBNC 状态,进而削弱土著微生物群的降解能力。Rpf 能够复苏部分处于 VBNC 状态的微生物,使其恢复代谢和生长。在适宜条件下,Rpf 不仅能促进微生物的代谢重启,还可能有助于重新建立微生物群的生态平衡,进而增强环境的自净能力。在分子生物学层面上,Rpf 的作用机理研究仍然不够充分,未来的研究需要更深入地探讨 Rpf 的分子机制,以便更全面地理解其在环境修复中的作用方式,为环境保护和污染物降解提供更多科学依据。

4 Rpf 在环境生物修复中面临的挑战

Rpf 在实验室阶段的环境修复中取得了一些成功,但其实际应用时,原位修复仍然面临诸多挑战。环境因素是影响 Rpf 在环境微生物修复中应用的主要因素之一,其中包括 pH 值、温度、盐度、营养物质和有害化学物质等[54]。这些环境因素可能会影响 Rpf 的活性和稳定性,进而影响其在实际应用中的效果。为降低环境因素对 Rpf 活性和稳定性的影响,可采取以下策略:首先,优化环境条件,如控制 Rpf 应用温度和调整 pH 值,以维护其功能。其次,运用蛋白质工程技术(如定点突变或融合蛋白制造)提高 Rpf 的环境稳定性,同时采用稳定剂或包埋技术有效保护 Rpf 不受恶劣环境条件的影响。确保其活性和稳定性的核心在于优化应用策略,包括精确控制局部递送和合理安排使用时间。最后,研究 Rpf 的特性和环境适应性,以及开发新的、更稳定的突变体是提升其在环境修复中应用效果的关键。综合实施这些措施,能够有效提升 Rpf 在环境修复中的稳定性和效率。另一个影响 Rpf 在环境微生物修复中应用的因素是细菌种类。不同种类的细菌可能对 Rpf 的响应不同,其中一些细菌如放线菌门中的诺卡氏菌属、红球菌属、链霉菌属(*Streptomyces*)等更容易受到 Rpf 的刺激[55],而其他细菌可能需要更高的 Rpf 浓度以获得相同的响应。因此,在 Rpf 应用于环境微生物修复时,需考虑细菌种类及其对 Rpf 的响应。

此外,修复策略也是影响 Rpf 在环境微生物修复中应用的另一个重要因素。不同的环境和修复目标可能需要采用不同的修复策略。选择适当的修复策略可以最大程度地发挥 Rpf 的作用。因此,为了确保 Rpf 在不同环境修复策略中的有效性,需要采取一系列综合性措施来应对可能出现的挑战。首先,基于特定环境的污染特征和生态条件(如温度、pH 值等),合理选择生物修复策略。其次,在制定修复计划时,须综合考虑 Rpf 的生物活性需求,并尽可能地调整环境条件以优化其效果。此外,将 Rpf 与其他生物修复技术相结合,如微生物共降解和植物修复等,能够发挥协同作用,增强修复效率。

5 展 望

Rpf 在环境微生物修复中的应用可以涵盖多个方面。首先,结合 ProteinMPNN 的智能蛋白设计策略对 Rpf 进行序列重构,可定向提升其结构稳定性与催化性能,从而增强其在不同复杂环境中的工作效率与适应能力[56-57]。通过增强 Rpf 的热稳定性,可以使其在更多的环境中实现有效修复,从而扩展其在不同环境中的应用潜力。其次,结合定向进化和高通量筛选技术,可以开发出新的具有更高催化效率的 Rpf 突变体。此外,通过蛋白质工程改造,如通过蛋白质结构模拟和改造,可能增强其与其他环境修复相关酶的协同作用[58-59]。通过设计 Rpf 与特定分解酶结合的界面,可以在处理复杂污染物时形成高效的酶复合体。

未来的研究还应探索将 Rpf 与微生物群落工程相结合的可能性,通过定向调控微生物群落中的功能性微生物比例,来优化整体的环境修复效率[60]。例如通过在微生物修复工程中引入 Rpf 和特定的高效降解菌株,可以刺激特定微生物群

体,从而在石油、重金属等污染场景中实现更加有效的生物修复。这些策略不仅能够提高 Rpf 在环境修复中的应用效果,还将推动其在农业、工业以及城市管理中的广泛应用,如通过改善土壤微生物活性来促进作物生长,或在城市废水处理中通过生物降解提高处理效率。

参考文献:

[1] Kaya C, Uğurlar F, Ashraf M, et al. Microbial consortia-mediated arsenic bioremediation in agricultural soils: Current status, challenges, and solutions[J]. Science of the Total Environment, 2024, 917: 170297.

[2] Zhou N, Guo H, Liu Q, et al. Bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil with the nitrate-reducing bacterium PheN7 under anaerobic condition[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 439: 129643.

[3] Zhong X, Chen Z, Ding K, et al. Heavy metal contamination affects the core microbiome and assembly processes in metal mine soils across Eastern China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130241.

[4] Sarker A, Nandi R, Kim JE, et al. Remediation of chemical pesticides from contaminated sites through potential microorganisms and their functional enzymes: Prospects and challenges [J]. Environmental Technology & Innovation, 2021, 23: 101777.

[5] Wang L, Du X, Li Y, et al. Enzyme immobilization as a sustainable approach toward ecological remediation of organic-contaminated soils: Advances, issues, and future perspectives[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2023, 53(18): 1684-1708.

[6] Wang X, Deng Z, Gao J. Exploring the antibiotic potential of cultured 'unculturable' bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2024, 32(2): 124-127.

[7] Reimer LC, Vetcininova A, Carbasse JS, et al. Bac*Dive* in 2019: Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D631-D636.

[8] Parte AC. LPSN-List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(6): 1825-1829.

[9] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(4): 225-240.

[10] Lennon JT, Locey K. More support for Earth's massive microbiome[J]. Biology Direct, 2020, 15(1): 5.

[11] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323.

[12] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(15): 8916-8921.

[13] Yang Y, Zhang Q, Lin Q, et al. Unveiling the PCB biodegradation potential and stress survival strategies of resuscitated strain *Pseudomonas* sp. HR1[J]. Environmental Pollution, 2024,344:123320.

[14] Shi J, Yang Y, Zhang S, et al. New insights into survival strategies and PCB bioremediation potential of resuscitated strain *Achromobacter* sp. HR2 under combined stress conditions[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 465: 133242.

[15] Xie M, Xu L, Zhang R, et al. Viable but nonculturable state of Yeast *Candida* sp. strain LN1 induced by high phenol concentrations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(18): e01110-21.

[16] Luo D, Chen J, Xie G, et al. Enzyme characterization and biological activities of a resuscitation promoting factor from an oil degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* KB1[J]. PeerJ, 2019, 7: e6951.

[17] Fu J, Chen J, Wang Y, et al. Promoting effect of the recombinant resuscitation promoting factors-2 of *Rhodococcus erythropolis* on petroleum degradation and cultivable bacterial diversities of the oil-contaminated soils[J]. Letters in Applied Microbiology, 2022, 74(3): 462-469.

[18] Wang X, Chen J, Wang Y, et al. Promoting resuscitation of the VBNC bacteria and enrichment of naphthalene-degrading bacteria from oil-contaminated soils with the Rpf4 from *Rhodococcus erythropolis* KB1[J]. Geomicrobiology Journal, 2022, 39(10): 916-924.

[19] 付建辉, 陈吉祥, 王永刚, 等. 红平红球菌 KB1 resuscitation-promoting factor 促进污染土壤细菌石油降解性能及可培养细菌多样性[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(3): 569-576.

[20] Zhu L, Shuai X, Xu L, et al. Mechanisms underlying the effect of chlorination and UV disinfection on VBNC state *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 127228.

[21] Luo K, Hu X, Li Y, et al. Revealing the mechanism of citral induced entry of *Vibrio vulnificus* into viable but not culturable (VBNC) state based on transcriptomics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 416: 110656.

[22] 张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制[J]. 微生物学报, 2018, 58(8): 1331-1339.

[23] Pazos-Rojas LA, Cuellar-Sánchez A, Romero-Cerón AL, et al. The viable but non-culturable (VBNC) state, a poorly explored aspect of beneficial bacteria[J]. Microorganisms, 2023, 12: 39.

[24] Liu J, Yang L, Kjellerup BV, et al. Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial

survival strategy[J]. Trends in Microbiology, 2023, 31(10): 1013-1023.

[25] 陈诗源, 陈吉祥, 王永刚, 等. 苯诱导石油降解红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)KB1 形成 VBNC 状态及复苏特征研究[J]. 环境工程, 2024, 42(1): 184-190.

[26] Zhang XH, Ahmad W, Zhu XY, et al. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: Implications for cultivating uncultured marine microorganisms[J]. Marine Life Science & Technology, 2021, 3(2): 189-203.

[27] Dong K, Pan H, Yang D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(1): 149-183.

[28] 陈飞飞, 陈吉祥, 王永刚, 等. 氧化胁迫诱导苍白杆菌 JP1 形成 VBNC 状态及其特征[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(5): 21-27.

[29] Ye Z, Li H, Jia Y, et al. Supplementing resuscitation-promoting factor (Rpf) enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Rhodococcus biphenylivorans* strain TG9T[J]. Environmental Pollution, 2020, 263: 114488.

[30] Yang D, Jiang Z, Meng Q, et al. Analyzing the pressure resistant, sublethal injury and resuscitable viable but non-culturable state population of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lactiplantibacillus plantarum* under high pressure processing[J]. Food Research International, 2023, 173: 113336.

[31] Ye C, Chen C, Feng M, et al. Emerging contaminants in the water environment: Disinfection-induced viable but non-culturable waterborne pathogens[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 461: 132666.

[32] Rahman M, Abd H, Romling U, et al. Aeromonas-Acanthamoeba interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(5): 1449-1457.

[33] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*: Autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(3): 623-635.

[34] Kwan JMC, Qiao Y. Mechanistic insights into the activities of major families of enzymes in bacterial peptidoglycan assembly and breakdown[J]. ChemBioChem, 2023, 24(7): e202200693.

[35] Jungwirth B, Emer D, Brune I, et al. Triple transcriptional control of the resuscitation promoting factor 2 (*rpf2*) gene of *Corynebacterium glutamicum* by the regulators of acetate metabolism RamA and RamB and the cAMP-dependent regulator GlxR: Regulation of *rpf2* expression[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 190-197.

[36] Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of actinobacteria[J]. Biochemistry (Moscow), 2016, 81(13): 1719-1734.

[37] Verma A, Ghoshal A, Dwivedi VP, et al. Tuberculosis: The success tale of less explored dormant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 1079569.

[38] Ruggiero A, Squeglia F, Romano M, et al. Structure and dynamics of the multi-domain resuscitation promoting factor RpfB from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2017, 35(6): 1322-1330.

[39] Hett EC, Chao MC, Steyn AJ, et al. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(3): 658-668.

[40] Sexton DL, Herlihey FA, Brott AS, et al. Roles of LysM and LytM domains in resuscitation-promoting factor (Rpf) activity and Rpf-mediated peptidoglycan cleavage and dormant spore reactivation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(27): 9171-9182.

[41] Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, et al. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(1): 84-98.

[42] Hartmann M, Barsch A, Niehaus K, et al. The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(4): 299-312.

[43] Dik DA, Marous DR, Fisher JF, et al. Lytic transglycosylases: Concinnity in concision of the bacterial cell wall[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 52(5): 503-542.

[44] Oluwole AO, Corey RA, Brown CM, et al. Peptidoglycan biosynthesis is driven by lipid transfer along enzyme-substrate affinity gradients[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 2278.

[45] Kuk ACY, Mashalidis EH, Lee SY. Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2017, 24(2): 171-176.

[46] Hummels KR, Berry SP, Li Z, et al. Coordination of bacterial cell wall and outer membrane biosynthesis[J]. Nature, 2023, 615(7951): 300-304.

[47] Martinez-Bond EA, Soriano BM, Williams AH. The mechanistic landscape of Lytic transglycosylase as targets for antibacterial therapy[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2022, 77: 102480.

[48] Banks EJ, Lambert C, Mason SS, et al. An mltA-like lytic transglycosylase secreted by *Bdellovibrio bacteriovorus* cleaves the prey septum during predatory invasion[J]. Journal of Bacteriology, 2023, 205(4): e00475-22.

[49] Sexton DL, St-Onge RJ, Haiser HJ, et al. Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in

the germination and growth of *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(5): 848-860.

[50] Van Loon W, Gomez MP, Jobe D, et al. Use of resuscitation promoting factors to screen for tuberculosis infection in household-exposed children in the Gambia[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 469.

[51] Han Z, Lin Q, Zhang S, et al. High PCBs mineralization capability of a resuscitated strain *Bacillus* sp. LS1 and its survival in PCB-contaminated soil[J]. Science of the Total Environment, 2023, 856: 159224.

[52] Su X, Wang Y, Xue B, et al. Resuscitation of functional bacterial community for enhancing biodegradation of phenol under high salinity conditions based on Rpf[J]. Bioresource Technology, 2018, 261: 394-402.

[53] Su X, Wang Y, Xue B, et al. Impact of resuscitation promoting factor (Rpf) in membrane bioreactor treating high-saline phenolic wastewater: Performance robustness and Rpf-responsive bacterial populations [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 357: 715-723.

[54] Gong X, Lu H, Wu J, et al. Enzymatic properties and biological activity of resuscitation-promoting factor B of *Rhodococcus* sp. (GX12401)[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 965843.

[55] Kapinusova G, Lopez Marin MA, Uhlik O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1089630.

[56] Sumida KH, Núñez-Franco R, Kalvet I, et al. Improving protein expression, stability, and function with ProteinMPNN[J]. Journal of the American Chemical Society, 2024, 146(3): 2054-2061.

[57] Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using proteinMPNN [J]. Science, 2022, 378(6615): 49-56.

[58] Berhe MH, Song X, Yao L. Improving the enzymatic activity and stability of a lytic polysaccharide monooxygenase[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): 8963.

[59] Dinmukhamed T, Huang Z, Liu Y, et al. Current advances in design and engineering strategies of industrial enzymes[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 1: 15-23.

[60] Rafeeq H, Afsheen N, Rafique S, et al. Genetically engineered microorganisms for environmental remediation [J]. Chemosphere, 2023, 310: 136751.