

·综述·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2017.02.011

环境微生物可培养性影响因素及培养方法研究进展

李晓丹, 屈建航*, 张璐洁, 李海峰

(河南工业大学 生物工程学院, 中国河南 郑州 450001)

摘要: 目前, 已知并能利用的微生物只是自然界微生物很小的缩影, 过低的可培养效率使人类在认识和利用微生物上处于瓶颈阶段。现综述了微生物活的非可培养状态及其检测方法, 阐述了微生物可培养性的影响因素, 探讨了提高微生物可培养效率的培养策略和方法进展, 以期为提高微生物的可培养性和菌种资源开发提供依据。

关键词: 微生物; 可培养性; 活的非可培养(VBNC)状态; 分离培养技术; 菌种资源

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)02-0154-05

Progresses on the Influence Factors of Culturability and Cultivation Strategies of Environmental Microorganisms

LI Xiao-dan, QU Jian-hang*, ZHANG Lu-jie, LI Hai-feng

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: At present, only a small part of the environmental microorganisms can be recognized and utilized, and the culturable efficiency becomes a bottleneck in making use of the microbial resources. To provide a basis for improving the culturability of microorganisms in the environment, the viable but non-culturable (VBNC) state and the detection methods, and influence factors of the culturability of microorganisms were summarized; the methods for improving the culturable efficiency were discussed.

Key words: microorganisms; culturability; viable but non-culturable (VBNC) state; isolation and cultivation techniques; strain resources

(*Life Science Research*, 2017, 21(2): 154~158)

微生物作为自然界生态系统的重要组成部分, 不仅在生态平衡中起着举足轻重的作用, 也是天然活性物质的重要来源^[1]。目前, 环境中微生物仅有 10%~20%被发现, 且可培养利用的仅 1%左右, 大量类群处于未知的非可培养状态, 未进行人工鉴定^[2]。因此, 环境微生物资源具有很大的开发潜力, 而提高可培养效率是核心和关键。

1 微生物活的非可培养(VBNC)状态

1.1 微生物 VBNC 状态及其研究价值

环境中的微生物可分为活的非可培养状态、受损状态、休眠状态、活的非可培养状态和死亡状

态^[3]。对环境中微生物进行传统分离培养研究时, 50%~90%的菌体保持代谢活性, 但在平板中不能形成肉眼可见的菌落, 导致培养效率不高^[4]。自然界存在着大量不能用传统分离培养方法进行分离培养的微生物类群, 但它们仍具有代谢活性, 被称为微生物活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态^[5], 这一概念由 Xu 等^[6]于 1982 年首次提出。微生物 VBNC 状态多是由于环境发生改变, 微生物的生存受到胁迫, 其细胞结构和形态发生变化, 虽具有代谢活性, 但目前实验室培养条件不能满足其正常生长繁殖, 采用现有培养条件无法分离得到^[7, 8]。

收稿日期: 2016-07-06; 修回日期: 2016-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370147, 31400103); 河南省高校科技创新团队支持计划(15IRTSTHN019); 河南省属高校基本科研业务费专项资金(2014YWQQ16)

作者简介: 李晓丹(1989-), 女, 河南禹州人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究, E-mail: xiaodan6060@126.com; * 通讯作者: 屈建航(1976-), 女, 河南南阳人, 博士, 河南工业大学副教授, 主要从事环境微生物学研究, E-mail: qjh_bata@163.com。

前期对微生物 VBNC 状态的研究多聚焦在病原菌方向,进入 VBNC 状态的病原菌不能正常人工培养,在食品卫生常规检测中易发生漏检等现象,对卫生安全的质量检测及防控造成风险^[9]。Gin 等^[10]发现某些处于 VBNC 状态的致病菌,在传统培养条件下不能生长,但由于仍存在部分代谢活性,依然会产生毒力因子。虽有研究证明在这种状态下部分微生物产生的毒力因子不具侵袭性,但因 VBNC 状态中多数微生物的相关机制尚未得到充分研究,所以有些微生物可能仍然保留着毒力因子的部分毒性^[11]。另一方面,微生物 VBNC 状态的研究有利于提高微生物的分离培养效率,从而培养出更多的新菌种,了解生理生化特征,获得代谢产品,发现新药物、新材料,使其应用于更广泛的领域^[12],或建立环境修复微生物资源库,使生物治理环境污染成为可能^[13]。

1.2 微生物 VBNC 状态检测方法

微生物 VBNC 状态检测的目的在于确定活细胞的存在。目前,该领域的检测方法主要有分子生态学技术、活菌直接计数法、酶联免疫吸附技术、基于 PMA/EMA 处理的 PCR 法等。

1.2.1 分子生态学技术

分子生态学技术直接基于环境样品的基因组 DNA 鉴定微生物多样性和群落结构,同时结合传统分离培养方法,通过对微生物种群组成及生物信息学的比对分析,获得“未培养”的物种信息,揭示在常规分离培养中的“未培养”菌,为进一步研究环境中可培养微生物提供依据^[14]。目前,常用的分子生态学方法有变性梯度凝胶电泳、16S rRNA 基因克隆文库、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、宏基因组技术及核酸杂交等^[15, 16]。

1.2.2 活菌直接计数法(DVC)

活菌直接计数法(direct viable counting, DVC)技术能有效地证明 VBNC 状态细菌的存在。Kogure 等^[17]将荧光显微技术与涂布平板培养法相结合,设计出能较好地完成水环境中活细菌计数的活菌直接计数法,其原理是在细胞培养物中添加一定浓度的营养物和 DNA 合成抑制剂萘啶酮酸,利用萘啶酮酸抑制细菌的 DNA 复制,但是不干扰细胞中其他合成途径的正常进行,培养一段时间后,细菌伸长变大,荧光染色后,可以准确地进行细菌计数^[18]。涂布平板培养计数得到的仅是可培养的细菌,在进行涂布平板计数时同时采用

活菌直接计数,通过对比两种不同计数方法的计数结果差异可以判定 VBNC 状态的细菌。相关报道指出,以 DVC 技术检测的活菌数高出涂布平板培养法计数结果 2~3 个数量级,可准确检测到样品中活的非可培养细菌的数量,是目前活菌计数中常用的检测方法之一^[19]。

1.2.3 酶联免疫吸附(ELISA)技术

酶联免疫吸附技术(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)又称酶标法,是在免疫荧光技术和放射免疫分析技术基础上形成的,将抗原抗体反应的高度特异性和酶的高效催化作用相结合的一种免疫分析方法^[20]。该技术起始于 1971 年瑞典学者 Engvall 等^[21]将酶联免疫吸附试验用于免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)定量测定的报道。相关研究表明,进入 VBNC 状态的细菌保持着和正常生长细菌一样的表面抗原,基于这种抗原性,可利用抗体的特异性反应来判断 VBNC 细菌的存在,从而对其进行检测^[22]。

1.2.4 PMA/EMA 与 PCR 结合的检测方法

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)能透过死亡细菌的细胞膜与 DNA 结合,抑制 DNA 分子的 PCR 扩增。叠氮溴化乙锭(ethidium bromide monoazide, EMA)可与细胞受损后暴露的 DNA 结合,从而阻断 DNA 分子聚合酶链反应^[23]。因此,通过 PMA 或 EMA 处理后的样品中,只有活菌的基因可以被 PCR 扩增。随后通过与未处理的样品比较,并结合分子生态学等方法,可以获得活菌及 VBNC 状态菌的组成。如相关研究将 PMA 处理与 RF-LAMP (real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification)技术结合,快速检测出了样品中 VBNC 状态的副溶血弧菌^[24, 25]。

1.3 微生物可培养性的影响因素

1.3.1 培养基营养成分

传统的微生物分离培养选用的是富含营养的培养基,而自然环境中的微生物大多处于“贫营养”但营养元素丰富的状态^[26]。在环境微生物的分离培养中,富营养条件使微生物快速生长,代谢产物的大量积累会产生毒害作用,导致细菌的部分死亡。此外,环境中处于寡营养的细菌被转移到富营养但营养元素少的普通培养基上时难以适应,从而表现为一定程度的不可培养性^[27]。

1.3.2 培养条件

由于对复杂化的自然环境缺乏足够的认识,实验室的分离培养无法再现微生物的自然生存条

件,如物理、化学及生物个体之间的相互作用等因素难以人工模拟^[28]。传统的微生物分离培养只是基于固体介质或液体介质将微生物置于恒温、恒湿或黑暗环境中,这些条件对微生物的分离培养本身就具有一定的选择性和偏爱性,从而影响了微生物的可培养性。

1.3.3 种群之间的依赖关系

微生物合成并释放自身诱导物质(auto-inducer, AI)来调节微生物群体,这一调控系统被称为群体感应^[29]。微生物通过识别这种信号来判断种群密度和周围环境变化,从而调节自身的生理状态,形成稳固的微生物系统^[30]。环境中微生物之间关系密切,相互联系,但常规的分离培养将环境中的微生物分隔成了独立的小单元,某些微生物因彼此间相互关系和信息交流的阻断而死亡,从而未能分离得到彼此依赖的细菌类群^[31]。

1.3.4 微生物生长速度的不均一性

微生物分离培养时,生长弱势群体的忽略也是影响可培养效率的重要因素。微生物的分离培养是利用微生物聚集生长出肉眼可见的菌落来完成的,一些生长速度过慢、达不到一定数目的细菌,往往只在固体介质上形成细胞集合而无法形成肉眼可观察的菌落,从而被忽略^[32]。把环境中正常生长的微生物移置人工培养条件下时,一些适合该条件的微生物会加快生长并占据主导优势,从而抑制了生长过慢的微生物。此外,一些透明性好、透光率高、菌落个体甚小的微生物也是传统分离培养被忽略的对象^[33]。

2 提高微生物可培养效率的方法及进展

2.1 培养基营养成分的改良

在人工培养基中,加入适当比例的自然环境样品营养基质,可得到更多的难培养的微生物。如吴月红等^[34]用寡营养陈海水培养基(LMEB培养基)分离水体微生物,相比普通培养基,营养成分浓度降低,更近似自然环境,抑制了因营养成分充足而快速生长的菌株,同时辅以少量生长因子的天然海水,提高微生物的可培养性。我们在研究湖泊沉积物的可培养细菌时,以寡营养 R₂A 培养基为基础,比较了添加泥浸汁对细菌可培养效率及组成多样性的影响,结果表明添加泥浸汁后,能更有效地分离其中的细菌,多样性提高。

在培养过程中,毒性氧的产生是毒害微生物的原因之一。在培养基里以多聚物为碳源可缓解

毒性氧的释放速度。同时,也可在培养过程中加入甜菜碱、丙酮酸钠或过氧化氢酶等具有毒性氧降解能力的化合物,减少微生物培养过程中产生的毒性氧^[35]。其中,丙酮酸钠对微生物可培养性恢复的效果最佳^[36]。此外,固体培养介质多选用琼脂作为凝固剂,而琼脂对部分微生物具有毒害作用,因此可采用其他毒害较小的凝固剂代替,如冷凝胶等^[37]。

2.2 培养方法的改进

2002年 Connon 等^[38]在稀释培养的基础上提出了高通量培养法(high-throughput culturing, HTC),将海水样品稀释到痕量后用 48 孔培养板对微生物进行培养,通过该方法分离培养得到的微生物远高于传统微生物分离培养法。高通量培养方法中的微囊包埋技术是一种较理想的培养技术,其明确的靶目标可提高微生物的可培养性,但成本较高,技术仍未成熟,有待进一步完善和普及^[39]。2016年 Ge 等^[40]设计了一套细胞培养系统,即纳米微孔生物培养室,该装置通过多孔墙互联互通,细菌可以在小室中生长,室与室之间可以进行彼此的化学交流,进而模拟自然环境来进行微生物的共培养,使微生物虽处于物理的隔离状态但仍能进行种间信息交流。将该系统应用于微生物的分离培养中,可解决因人工培养阻断了环境中微生物的信号交流而出现的不可培养现象,进而提高可培养效率。

原位富集培养法是一种新型的培养方法,该方法是通过设计装置,使得微生物能够先在原位的条件下获得富集生长,再完成进一步的纯培养^[41]。最经典的原位富集法是由 Kaerberlein 等^[42]设计的扩散盒培养法,通过设计一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连 0.1 μm 滤膜组成的扩散盒作为培养装置,将样品置于扩散盒中,在原位环境或模拟环境条件下进行培养,研究者采用这种方法培养出了在传统人工培养基上不能生长的微生物,提高了微生物的可培养性。I-tip 是另一种原位培养设计,该装置将黄枪头尾端密封,枪头内装有培养介质,尖端有酸洗玻璃球,玻璃球在不影响细菌进入的情况下可以阻止水中较大体积的原生动物侵入,将枪头插入海绵上进行原位培养,分离得到的菌株种类是直接平板培养法得到的两倍^[43],为丰富环境可培养细菌的多样性提供了方法借鉴。此外,根据微生物的生态环境条件及其特性,将多种分离培养方法相结合,设计合理的培养方

法和培养条件,也可提高微生物的可培养性^[44]。

2.3 VBNC 状态微生物的复苏

诱导已进入 VBNC 状态的微生物进入生长繁殖状态,称为 VBNC 状态的复苏^[45]。复苏并不是微生物进入 VBNC 状态的逆过程,同时也不是所有的细菌都可以复苏,而是指具有潜在的繁殖能力的细菌的再生长过程^[46]。微生物复苏促进因子(resuscitation-promoting factor, Rpf)可复苏进入 VBNC 状态的细菌^[47],某些真核细胞的提取液也能复苏 VBNC 状态的细菌^[48],无细胞上清液(cell-free supernatants, CFS)可以复苏 VBNC 状态的弧菌,而群体感应抑制剂肉桂醛可以延迟细菌 VBNC 状态的复苏^[49]。此外,相关研究发现,低温是大多数细菌进入 VBNC 状态的重要诱导因子,细菌在 4~6 °C 环境下更容易进入 VBNC 状态;相反,如果该细菌的最适温度较低,随着温度的升高低温生长的细菌会进入 VBNC 状态,因此在微生物培养时也可以通过改变温度对 VBNC 状态的微生物进行复苏^[50]。

3 总结及展望

传统的分离培养方法为微生物学的发展做出了突出贡献。菌物资源的获得一直是菌种开发利用的前提。因实验室培养条件的局限,当前环境微生物可培养效率过低,微生物活的非可培养状态成为一个限制性因素,但同时也为微生物研究及微生物种质资源的开发提供了新的研究视角。改善微生物分离培养方法、优化培养条件和营养条件,提高菌物可培养性,创造更适合微生物生长的环境,有助于挖掘微生物新资源,也必将成为未来微生物发展的必要环节。在现有如高通量培养、原位培养、共培养等新方法和思路的基础上,从多角度综合考虑微生物生长所需营养、条件、信息交流等因素,开发新的技术以提高微生物可培养性,并在后期的分离纯化过程中,减少人为误差,借助放大工具,建立更合理的方法,提高获得微生物纯培养的可能性,将是未来的一个发展趋势。

参考文献(References):

[1] 李昭,乔延路,范晓阳,等.南太平洋环流区底层水可培养细菌多样性研究[J].中国海洋大学学报(自然科学版)(Li Zhao, Qiao Yan-lu, Fan Xiao-yang, et al. Diversity of culturable bacteria in the bottom seawater of the South Pacific Gyre[J]. Periodical of Ocean University of China), 2014, 44(6): 52-59.

[2] 王宁,包慧芳,崔卫东,等.比什凯克盐碱土壤可培养细菌的多样性[J].微生物学通报(Wang Ning, Bao Hui-fang, Cui Weidong, et al. Diversity of bacteria isolated from saline alkali soil of Bishkek region in Kyrgyzstan[J]. Microbiology China), 2014, 41(9): 1733-1740.

[3] Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le Grand A, et al. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77600.

[4] 彭伶俐,王琴,辛明秀.自然界中不可培养微生物的研究进展[J].微生物学杂志(Peng Ling-li, Wang Qin, Xin Ming-xiu. Advanced in uncultivable microorganisms in nature[J]. Journal of Microbiology), 2011, 31(2): 75-79.

[5] Chen H R, Shen J, Pan G S, et al. Correlations between cyanobacterial density and bacterial transformation to the viable but nonculturable (VBNC) state in four freshwater water bodies[J]. Ecotoxicology, 2015, 24(7): 1459-1466.

[6] Xu H S, Roberts N, Singleton F L, 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.

[7] Um H Y, Kong H G, Lee H J, et al. Altered gene expression and intracellular changes of the viable but nonculturable state in *Ralstonia solanacearum* by copper treatment[J]. Plant Pathology Journal, 2013, 29(4): 374-385.

[8] Fu B, Jiang Q, Liu H B, et al. Occurrence and reactivation of viable but non-culturable *E. coli* in sewage sludge after mesophilic and thermophilic anaerobic digestion[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(2): 273-279.

[9] Magajna B A, Schraft H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts[J]. Food Control, 2015, 50: 45-50.

[10] Gin K Y, Goh S G. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*[J]. Water Research, 2013, 47(10): 3315-3328.

[11] Alleron L, Khemiri A, Koubar M, et al. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins[J]. Water Research, 2013, 47(17): 6606-6617.

[12] 王楨,李阳,车帅,等.北极海洋沉积物中可培养细菌及其多样性分析[J].海洋学报(中文版)(Wang Zhen, Li Yang, Che Shuai, et al. Diversity analysis of culturable bacteria isolated from marine sediments of Arctic[J]. Acta Oceanologica Sinica (in Chinese)), 2014, 36(10): 116-123.

[13] 刘志培,刘双江.我国污染土壤生物修复技术的发展及现状[J].生物工程学报(Liu Zhi-pei, Liu Shuang-jiang. Development of bioremediation in China—a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2015, 31(6): 901-916.

[14] Aydin S, Shahi A, Ozbayram E G, et al. Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations[J]. Biore-source Technology, 2015, 192: 735-740.

[15] Ravin N V, Mardanov A V, Skryabin K G. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms[J]. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(5): 431-439.

[16] 李明源,陈芸,古丽巴哈尔·萨吾提.冰川微生物菌群分布及多样性研究技术进展[J].生命科学研究(Li Ming-yuan, Chen Yun, Sawut Gulbahar. Advance in community distribution of glacial microbe and research techniques for diversity[J]. Life Science Research), 2015, 19(4): 357-361.

[17] Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(3): 415-420.

[18] 许兵,徐怀恕.水生细菌荧光显微计数法的应用和发展[J].微生物学通报(Xu Bing, Xu Huai-shu. Application and development of fluorescence microscopic counting method for aquatic bacteria[J]. Microbiology China), 1993, 20(6): 357-362.

[19] Besnard V, Federighi M, Cappelletti J M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 31: 77-81.

- [20] Parashar D, Paingankar M S, Sudeep A B, *et al.* Assessment of qPCR, nested RT-PCR and ELISA techniques in diagnosis of Chikungunya[J]. *Current Science*, 2014, 107(12): 2011–2013.
- [21] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871–874.
- [22] 徐怀恕, 黄备, 祁自忠, 等. 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的细胞形态研究—活的非可培养状态细胞[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版(Xu Huai-shu, Huang Bei, Qi Zi-zhong, *et al.* Study on cell morphology of viable but nonculturable *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1997, 27(2): 187–190.
- [23] Bellehumeur C, Boyle B, Charette S J. Propidium monoazide (PMA) and ethidium bromide monoazide (EMA) improve DNA array and high-throughput sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 222(6): 182–191.
- [24] 陈传, 凌霄, 郭震, 等. LAMP 技术在食源性病原微生物检测中的应用[J]. 生命科学研究(Chen Chuan, Ling Xiao, Guo Zhen, *et al.* The application of LAMP technology in detection for forborne pathogenic microorganisms[J]. *Life Science Research*, 2014, 18(2): 140–144.
- [25] Zhong Q P, Tian J, Wang B, *et al.* PMA based real-time fluorescent LAMP for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state[J]. *Food Control*, 2016, 63: 230–238.
- [26] 邱玉兰, 井晓欢, 杨季芳, 等. “非可培养细菌”培养策略研究进展[J]. 浙江万里学院学报(Qiu Yu-lan, Jing Xiao-huan, Yang Ji-fang, *et al.* The research progress in cultivation strategies of uncultivated bacteria[J]. *Journal of Zhejiang Wanli University*, 2014, 27(3): 78–88.
- [27] Wu B, Liang W L, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: e1005145.
- [28] 袁志辉, 王健, 杨文蛟, 等. 土壤微生物分离新技术的研究进展[J]. 土壤学报(Yuan Zhi-hui, Wang Jian, Yang Wen-jiao, *et al.* Progress in cultivation research on soil microbes[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51(6): 1183–1191.
- [29] Sturbelle R T, Avila L F, Roos T B, *et al.* The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (EPEC) virulence factors[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(3): 245–252.
- [30] 徐芳, 李军, 段云飞, 等. 细菌群体感应信号网络及其应用[J]. 生物学杂志(Xu Fang, Li Jun, Duan Yun-fei, *et al.* Quorum sensing signaling networks in bacteria and the potential application[J]. *Journal of Biology*, 2014, 31(4): 77–81.
- [31] 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报(Wang Bao-jun, Liu Shuang-jiang. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6–17.
- [32] Su X M, Chen X, Hu J X, *et al.* Exploring the potential environment functions of viable but non-culturable bacteria[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(12): 2213–2218.
- [33] 冀世奇. 海洋微生物高通量培养和分选技术的建立及应用[D]. 济南: 中国海洋大学(Ji Shi-qi. The Establishment and Applications of High-throughput Cultivating and Sorting Method for Marine Microorganisms[D]. Jinan: Ocean University of China), 2011.
- [34] 吴月红, 韩正兵, 张心齐, 等. 南极普里兹湾可培养浮游细菌群落结构研究[J]. 极地研究(Wu Yue-hong, Han Zheng-bin, Zhang Xin-qi, *et al.* Community composition of Antarctic bacterioplankton isolated from the Prydz Bay, Antarctica[J]. *Chinese Journal of Polar Research*, 2014, 26(2): 222–229.
- [35] Jallouli W, Zouari N, Jaoua S. Involvement of oxidative stress and growth at high cell density in the viable but nonculturable state of *Photobacterium temperate* ssp. *temperata* strain K122[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(5): 706–713.
- [36] Morishige Y, Fujimori K, Amano F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 180–186.
- [37] 陈丽媛, 徐冲. 微生物培养技术研究进展[J]. 微生物学杂志(Chen Li-yuan, Xu Chong. Advanced in microbial technology on cultivation[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(6): 93–95.
- [38] Connon S A, Giovannoni S J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3878–3885.
- [39] Olabisi R M. Cell microencapsulation with synthetic polymers[J]. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2015, 103(2): 846–859.
- [40] Ge Z F, Girguis P R, Buie C R. Nanoporous microscale microbial incubators[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(3): 480–488.
- [41] Steinert G, Whitfield S, Taylor M W, *et al.* Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria[J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(5): 594–603.
- [42] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [43] Jung D, Seo E Y, Epstein S S, *et al.* Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(2): 417–423.
- [44] 周楠, 姜成英, 刘双江. 从环境中分离培养微生物: 培养基营养水平至关重要[J]. 微生物学通报(Zhou Nan, Jiang Cheng-yang, Liu Shuang-jiang. Cultivation of microorganisms from environments: nutrient level of the culture medium is of great importance[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1057–1081.
- [45] Cellini L. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(19): 5575–5582.
- [46] 郭慧玲, 邵玉宇, 高妹冉, 等. 细菌活的非可培养状态研究[J]. 中国乳品工业(Guo Hui-ling, Shao Yu-yu, Gao Shu-ran, *et al.* Research on the viable but non-culturable (VBNC) state of bacteria[J]. *China Dairy Industry*, 2014, 42(1): 31–36.
- [47] Su X M, Liu Y D, Hu J X, *et al.* Optimization of protein production by *Micrococcus luteus* for exploring pollutant-degrading uncultured bacteria[J]. *SpringerPlus*, 2014, 3: 117.
- [48] Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Mizuno T, *et al.* Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state[J]. *MicrobiologyOpen*, 2014, 3(2): 239–246.
- [49] Ayrapetyan M, Williams T C, Oliver J D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable *Vibrios*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(8): 2478–2483.
- [50] Kong H G, Bae J Y, Lee H J, *et al.* Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109792.