

BAKTERİLERİN CANLI AMA KÜLTÜRDE ÜRETİLEMİYEN FORMLARI**VIABLE BUT NON-CULTURABLE FORM OF BACTERIA****Olca ÖZÇAKIR¹**

ÖZET: İlk defa 1982 yılında kültürde üreyebilme özelliklerini kaybettikleri halde, metabolik aktiviteleri devam eden ve uygun koşullarda tekrar kültürde üreyebilme yeteneğine kavuşan bakterilerin varlığının ortaya konulması ile “canlı ama kültürde üretilmeyen bakteri (VBNC; viable but non-culturable)” kavramı tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pek çok insan patojeninin (*Campylobacter* spp., *E.coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*) bu forma sahip olduğu saptanmıştır. Bakterilerin VBNC formunun sütün pastörizasyonu ve suyun klorlanması gibi bazı dezenfeksiyon işlemleri ile de ortaya çıktığının gösterilmesi, konuya olan ilgiyi artırmıştır. Bu formdaki bakterilerin; tekrarlayan, dirençli ve etkeni gösterilemeyen enfeksiyonlarda rolü olabileceği düşünülmektedir. Ancak bakterilerin bu formunun patojeniteleri ve antibiyotik direnci ile tekrarlayan enfeksiyonlardaki rolünü göstermek için ileri çalışmalar yapılmalıdır. Bu derleme yazıda, canlı ama kültürde üretilmeyen bakterilerin önemi, morfolojileri, metabolik ve genetik özellikleri, patojeniteleri, yeniden kültürde üreyebilme özelliğini kazanmaları ve tanımlama yöntemleri tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: Canlı, kültürde üretilmeyen bakteri, morfoloji, genetik, patojenite, tanımlama.

ABSTRACT: Viable but non-culturable (VBNC) bacteria concept has been defined in 1982 when it has been shown that there exists bacteria whose metabolic activity continue and which can have the ability to reproduce in suitable conditions although they have lost their capability to reproduce in culture. Recent studies have shown that most of the human pathogens (*Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*) have VBNC form. The interest on this subject has increased due to the detection of some disinfection procedures such as pasteurization of milk and chlorination of water, cause bacteria to switch to VBNC form. It is thought that, the bacteria in this form may have an important role in recurrent and drug resistant infections as well as infections of unknown origin. However, advanced studies should be done to clarify the role of VBNC bacteria in the setting of recurrent

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ozcakir@hacettepe.edu.tr)

infections, together with their pathogenity and antibiotic resistance. In this review article, the importance of viable but non-culturable bacteria, their morphology, metabolic and genetic properties, pathogenity, resuscitation and identification have been discussed.

Key words: Viable non-culturable bacteria, morphology, genetic, pathogenity, identification.

GİRİŞ

Çevremizdeki mikroorganizmaların %99'undan fazlasının kültürü yapılamamaktadır^{1,2}. Klasik klinik mikrobiyoloji bilgilerine göre ise mikroorganizmalar üreyip kültürleri yapılabildiği sürece canlı kabul edilmektedirler^{1,3}. Ancak son yıllarda patojen mikroorganizmaların da canlı oldukları halde bazen kültürlerinin yapılamadığının fark edilmesi ile, bu konu üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Çevreye uyum ve çevre baskısından kaçabilmek için bu yolla bir adaptasyon mekanizması geliştiren bakteriler, "canlı ama kültürde üretilmeyen bakteriler (viable but non-culturable, VBNC)" olarak adlandırılmışlardır^{4,5}. VBNC kavramı ilk kez 1982 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Maryland Üniversitesi'nden Rita Colwell tarafından kültürde üreyebilme özelliklerini kaybettikleri halde, metabolik aktiviteleri devam eden ve uygun koşullarda tekrar kültürde üreyebilme yeteneğine kavuşan bakterilerin varlığını ortaya koyması ile tanımlanmıştır⁵.

VBNC BAKTERİLERİN ÖNEMİ

Bazı bakteriler; açlık, ısı değişikliği, osmotik basınç artışı ve oksijen konsantrasyonunda artış gibi çevresel baskılara maruz kaldıklarında fizyolojik olarak VBNC formuna girmektedirler. Bu konu ile ilgili en önemli bulgulardan birisi, sütün pastörizasyonu ve suyun klorlanması gibi işlemlerin de bakterilerin VBNC formuna geçmesine sebep olduğunun gösterilmesidir^{6,7}. Ayrıca gıdalarda bulunan bakteriler, gıdalara uygulanan ısıtma, kurutma, dondurma, tuzlama gibi işlemler sonucunda VBNC formuna geçebilmekte ve bu formdaki bakteriler klasik kültür yöntemleriyle tespit edilemediğinden halk sağlığı için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır⁸.

VBNC bakterilerin klinik mikrobiyolojik önemi ise, pek çok insan patojeninin de [*Campylobacter* spp., *E.coli* (EHEC suşları da dahil), *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*] bu formunun olduğunun gösterilmesidir⁸.

VBNC BAKTERİLERİN MORFOLOJİK, METABOLİK VE GENETİK ÖZELLİKLERİ

VBNC formuna giren bakterilerin boyutlarında genel olarak küçülme görülmektedir. Basil şeklindeki gram negatif bir bakteri VBNC forma geçtiğinde kok veya kokobasil şekle dönüşmektedir⁸⁻¹⁰. Elektron mikroskopla yapılan taramalarda, VBNC formdaki bir *Campylobacter pylori* suşunun kültürde üreyebilen *C.pylori* suşundan daha kısa ve ince olduğu gösterilmiştir¹¹. VBNC

formundaki bir *E.coli* suşunda peptidoglikanda çapraz bağların arttığı, DAP-DAP çapraz bağının üç kat arttığı, lipoprotein taşıyan murepeptidlerin arttığı, glikan zincirinin boyunun kısaldığı ve yüksek molekül ağırlıklı PBP (penisilin bağlayan proteinler) 1A, 1B, 2 ve 3' ün kaybolduğu gösterilmiştir¹². VBNC formundaki *Enterococcus faecalis* ile yapılan çalışmalarda ise, bakterinin mekanik hasara daha dayanıklı bir hücre duvarı olduğu saptanmış, peptidoglikan çapraz bağında artış ve oligomerlerin dimerlere göre sayısal artışı izlenmiştir¹³. Teikoik asit ve lipoteikoik asidin yapısında değişiklik olmazken, miktarının arttığı belirtilmektedir. Yine yapılan çalışmalarda, O-asetilasyonun arttığı ve sitoplazmik membranın yağ asidi kompozisyonunda değişiklikler olduğu ifade edilmektedir^{4,14}.

VBNC bakterilerin metabolik aktivitelerinde de azalma olmaktadır; besin transportu, respirasyon oranları ve makromolekül sentezinin azaldığı gösterilmiştir^{8,15}. Buna karşın biyosentez kaybolmamakta ve soğuk şok proteinleri üretilmektedir¹⁶. Ölüm ya da ölmek üzere olan hücrelerde azalan ATP düzeyleri, VBNC hücrelerde yüksek düzeyde kalmaktadır. VBNC hücrelerin otolitik aktiviteleri, aktif olarak çoğalan hücrelerden daha yüksektir⁸.

Üzerinde en çok tartışılan konu, VBNC bakterilerin ölüm öncesi hali mi, yoksa baskıdan korunma amacıyla genetik olarak programlanmış hücreler mi olduğudur. Yapılan çalışmalar, VBNC formuna geçişin genetik programlama ile ilgili olduğunu düşündürmektedir¹⁷. VBNC formunda gen ekspresyonunun devam ettiği gösterilmiş ve plazmidlerin korunduğu belirtilmiştir⁸.

Anaerobik metabolizma geni olan *anr* geninin, oksijenin az olduğu ortamlarda mikroorganizmanın adaptasyonunu sağladığı bilinmektedir. Bu genin, *Pseudomonas fluorescens*'in spontan rifampisin dirençli mutanlığı olan CHAO-Rif'in, oksijenin az olduğu ortamlarda VBNC hale geçmesinde önem taşıdığı belirtilmektedir¹⁸. *algU* ve *gacA* genlerine sahip VBNC bakterilerin fizyolojik olarak çevresel baskı faktörlerine adaptasyon gösterdiği de ortaya konmuştur¹⁹. *RpoS* (KatF) geni ise, bakterilerin durgunluk fazına geçmesini ve çoklu baskı faktörlerine direncini sağlayan bir gendir. Aerobik hücre üremesinde ve düşük ozmolaritede, *RpoS*'in kaybedilmesiyle durgunluk fazındaki hücrelerin kültürde üremesinde azalma olmaktadır²⁰. Ayrıca PpGpp ve *RpoS* proteinlerinin varlığında, durgunluk fazında kültürde üreme özelliğinin, logaritmik faza göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur²⁰.

VBNC BAKTERİLERİN PATOJENİTESİ

VBNC formundaki bir bakterinin patojenitesini koruyup korumadığına dair çelişkili yayınlar vardır. Bu konunun klinik mikrobiyoloji açısından en önemli yönü, bu formda iken bakterilerin insanlarda hastalığa neden olup olmadığıdır. Daha da önemlisi, VBNC formunda insanlara bulaşan bir bakterinin insan vücudunda uygun koşulları bulup tekrar kültürde üreyebilen forma geçmesi ve hastalığı başlatıp başlatamayacağıdır. Hayvan ve gönüllü insan çalışmalarında, deneklere VBNC formunda *Vibrio cholerae* içirilmiş ve sonra dışkıdan aynı bakterinin kültürü yapılabilmektedir²¹. Oliver ve Bockian²², 5°C'de inkübe ederek VBNC formuna dönüştürdükleri *V.vulnificus*'u fareye inoküle ettikten sonra

farenin öldüğünü ve hem kan hem de periton boşluğundan aynı bakterinin izole edildiğini bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmalarda bakterilerin VBNC haline geçtikten hemen sonra deneklere verildiği, bu yüzden de VBNC değil de hasar görmüş hücrelerin enfektif olabileceğinden bahseden çalışmalar da vardır¹⁷.

Rahman ve arkadaşları²³ *S.dysenteriae* tip 1 ile yaptıkları çalışmalarda, bakterinin VBNC formunun HeLa hücre kültüründe sitopatojenik olduğunu ve ayrıca intestinal epitel hücrelerine tutunarak Shiga toksini oluşturduğunu göstermişlerdir. Pruzzo ve arkadaşları²⁴ VBNC formundaki *E.faecalis* hücrelerinin kalp ve üriner sistem hücre kültürlerine tutunabildiğini, ancak bu tutunmanın aktif olarak çoğalan hücrelere göre %50-70 az olduğunu belirtmişler; bakterilerin aktif forma geçmesiyle tutunmanın tekrar normale döndüğünü vurgulamışlardır.

1998'de Japonya'daki som balığı kaynaklı *E.coli* O157:H7 salgınına inceleyen Makino ve arkadaşları²⁵, salgına yol açan suşun VBNC formunda olduğunu ifade etmişlerdir. *Helicobacter pylori*'nin de kültürde üretilmeyen ve bulaştan sorumlu olduğu düşünülen kokoid şeklinin, bakterinin VBNC formu olduğu ve uygun bir konağa girinceye kadar doğada bu şekilde kaldığı belirtilmektedir²⁶. Ayrıca bu formun antibiyotiklere dirençli olup, tekrarlayan enfeksiyondan sorumlu olabileceği de düşünülmektedir⁸. Yapılan bir başka çalışmada, hem fare hem de insandan alınan idrar örneklerinde, VBNC formundaki bakterilerin bulunduğu ve bunların tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonlarının bir açıklaması olabileceği bildirilmektedir²⁷. *Legionella pneumophila* ve *Campylobacter jejuni*'nin de VBNC formuna geçtikten sonra virülansını koruduğu gösterilmiştir^{28,29}.

VBNC BAKTERİLERİN YENİDEN ÜREYEBİLME ÖZELLİĞİ KAZANMASI

Canlı ama kültürde üretilmeyen (VBNC) bakteri formlarının tekrar kültürü yapılabilen forma dönüşü konusunda iki farklı görüş bulunmaktadır. Bunlardan birincisine göre, bakteri popülasyonunda az sayıda VBNC hale geçmemiş hücreler mevcuttur ve bunların üremesiyle popülasyondaki kültürü yapılabilir hücre sayısında artış olmaktadır (re-growth; yeniden üreme). İkinci görüşe göre, VBNC forma geçmiş olan bakteriler, tekrar kültürde üreyebilir forma geçebilmektedirler (resuscitation; yeniden canlanma)³⁰. Pek çok bakterinin VBNC formuna geçtiği gösterilmiş olsa da, yeniden üreyebilme özelliğine kavuştuğu kanıtlanan az sayıda bakteri vardır. Resusitasyonun gösterilmesinin zor olması, her bakteri için farklı resusitasyon şartlarının gerekli olmasından kaynaklanıyor olabilir. Örneğin *L.pneumophila* besin kısıtlaması ile kolaylıkla VBNC formuna geçerken, resusitasyonu ancak *Acanthamoeba castellanii* isimli amip türü ile birlikte inkübe edildiğinde gerçekleşmektedir³¹. Resusitasyon ile ilgili çalışmalar en çok *V.vulnificus* ile yapılmıştır. Ocak ve Şubat aylarında sudan alınan örneklerdeki bakterilerin sıcaklığın düşük olduğu zamanlarda (<15°C) VBNC hale geçtikleri görülmüştür⁸. Buna karşın VBNC formundaki aynı bakterilerin, suyun sıcak olduğu (21°C) Ağustos ve Temmuz aylarında aynı suya konulduğunda hızlıca kültürde üreyebilir hale geçtikleri in vivo, in vitro ve in situ olarak gösterilmiştir⁸.

Resusitasyonla ilgili ilginç bir nokta da, besin kısıtlamasının VBNC forma geçişe sebep olmasına rağmen, VBNC popülasyonuna besin eklenmesinin, tekrar kültürü yapılabilir forma geçişi sağlamamasıdır¹⁷. VBNC bakterilerde

resusitasyon iki basamaktan oluşmaktadır³²; resusitasyon faktörünün varlığında VBNC hücreler durağan fazdan uyarılmakta veya hasar onarılmaktadır. Daha sonra da hücre çoğalmaya başlamaktadır. Resusitasyonun uyarılmasında; ısıda yükselme, ısı şok proteinleri, amonyum tuzlarının varlığı, kan ürünleri gibi özel besinlerin bulunması ve moleküler sinyallerin etkili olduğu düşünülmektedir. Resusitasyon faktörleri üç kategoride sınıflanabilir: 1. Çevresel baskının ortadan kaldırılması (uygun sıcaklığın ayarlanması, konak organizmaya ulaşılması gibi); 2. Hasarın tamiri ve replikatif fonksiyonun aktivasyonu (ısı şok proteinleri ve amonyum tuzları gibi); 3. Fizyolojik durumları regüle eden ve stimülatör olan sinyal moleküllerin varlığı³³. Gram pozitif ve negatif bakterilerde varlığı gösterilen ve substrat olarak peptidoglikanı kullanan Rpf (Resuscitation promoting factor)'ün bakteriler için potent bir uyandırıcı molekül olduğu belirtilmektedir. Rpf'ün muralitik aktivitesinin olduğu, lizozim ve litik transglikozidazlar ile zayıf dizi sekans homolojisinin bulunduğu ve peptidoglikan hidrolizi ile duvarın yeniden yapılanmasını sağlayarak canlanmayı başlattığı düşünülmektedir⁴. Yeniden canlanmada Rpf'ün aktivitesi, kesin olarak sadece *Micrococcus luteus* ve mikobakterilerde gösterilmiştir³³. Rpf'ü kodlayan *M.luteus*'ta bir gen, *M.tuberculosis*'de ise beş gen tanımlanmıştır. Ayrıca *M.luteus*'un Rpf'ünün *M.tuberculosis*'e de etkili olduğu belirlenmiştir.

Resusitasyonla ilgili olduğu düşünülen Sps (Stationary phase survival) proteini *E.coli*'de, YeaZ proteini ise *Salmonella*, *E.coli* ve *Thermotoga maritima*'da tanımlanmıştır. YeaZ'nin yapısının Rpf'e benzemediği ve Rpf'ün tersine türler arası çapraz aktivitenin de olmadığı belirtilmektedir. YeaZ'nin yapısının Gcp isimli, glikoporin A ve lökosit antijeni gibi glikozillenmiş hücre yüzey proteinlerini yıkan bir sialoglikoproteaza benzediği gösterilmiştir³³.

VBNC FORMUNDAKİ BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Canlı olduğu halde kültürde üretilmeyen ve koloni oluşturmayan bakterilerin canlılığının ispat edilmesi için, hücrenin bütünlüğünü, aktivitesini ve cevap verebilirliğini gösteren alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Akım (flow) sitometri ve floresan boyama tekniklerinin birlikte kullanılmasıyla, membran potansiyeli [Rhodamin 123, DIBAC₄(3)], membran bütünlüğü (SYTO 9/propidyumiodin/GFP), DNA ve RNA varlığı (SYTO), solunum aktivitesi (CTC), çevreye ve substrata cevap gibi parametreler incelenebilmektedir³⁴. Floresan boyama için, normal şartlarda floresans vermeyip, sağlam hücre membranından geçerek hücre içi esterazlar tarafından parçalandığında aktifleşerek floresans veren boyalar [ChemChrome B, fluorescein diasetat (FDA), calcein acetoxymetil ester (Calcein-AM), karboksi- fluorescein diasetat (CFDA)] da kullanılabilir³⁴.

Canlılığın belirlenmesinde moleküler yöntemlerden özellikle ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nükleik asit dizi temelli amplifikasyon (NASBA) yöntemleri kullanılmaktadır. PCR kullanıldığında, uzun hedeflerin kısa hedeflere göre canlılığın daha iyi bir göstergesi olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca mRNA'nın daha hassas ve kısa yarı ömürlü bir molekül olması nedeniyle DNA'ya göre canlılığı göstermede daha gerçekçi sonuçlar verdiği gösterilmiştir³⁴.

Bakterilerin kültürde üremeyen formlarının tanımlanmasında metagenom teknolojisi kullanılmaktadır³⁵. Metagenom yaklaşımında, pek çok bakteriden elde edilen genlerin hepsi tek bir genom gibi değerlendirilir. Toprakta ayrıştırılan bakteri topluluğunun DNA dizisi büyük parçalara ayrılıp, bu DNA dizileri yapay bir taşıyıcı moleküle enzimler yardımıyla eklenir. Yapay taşıyıcı *E.coli* 'ye yerleştirilir ve *E.coli*' nin yeni eklenen genlerin kodladığı proteinleri sentezlemesi sağlanır. Son olarak da sentezlenen proteinler incelenir. Bu teknoloji sayesinde doğadaki bakteriler tarafından sentezlenen antimikrobiyal etkili maddelerin ve çevre kirliliğini önleyici enzimlerin de bulunabileceği belirtilmektedir^{35,36}.

SONUÇ

Bakterilerin canlı ama kültürde üretilemeyen (VBNC) formlarının, tekrarlayan, dirençli ve etkeni gösterilemeyen enfeksiyonlardaki rolü ve halk sağlığı açısından önemi giderek önem kazanmaktadır. Ancak şimdiye kadar kültür temelli çalışmaların, gerek salgın hastalıkları önlemede gerekse enfeksiyon etkenlerini tanımlamada yeterli olması, bakterilerin bu formlarının rutin laboratuvar işlemleri içinde pahalı yöntemler kullanılmak suretiyle tanımlanmasına gerek olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, VBNC formundaki bakterilerin patojeniteleri ve antibiyotik direnci ile tekrarlayan enfeksiyonlardaki rolünü göstermek için ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Yogita NS. Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. Curr Science 2005; 89: 1650.
2. Fernandez LA. Exploring prokaryotic diversity: there are other molecular worlds. Molecular Microbiol 2005; 55: 5-15.
3. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie van Leeuwenhoek 1998; 73: 169-87.
4. Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. Trends in Microbiol 2006; 14: 271-6.
5. Kogure K. Papers from the 4th medical microbiology interdisciplinary commission (MEMIC) symposium, 'viable but nonculturable microorganisms and emerging infectious diseases'. J Infect Chemother 2000; 6: 107.
6. Xu H, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbiol Ecol 1982; 8: 313-23.
7. Gunasekera TS, Sorensen A, Attfield PV, Sorensen SJ, Veal DA. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 1988-93.
8. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005; 43: 93-100.
9. Lleo M, Bonato MB, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the the viable but nonculturable state. J Appl Microbiol 2001; 91: 1095-102.
10. Jiang X, Chai TJ. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. Appl Environ Microbiol 1996; 62:1300-5.

11. Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Delattre G, Federicchi M. Physiological characterization of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 1110-6.
12. Signoretto C, Lleo MM, Canepari P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. Curr Microbiol 2002; 44: 125-31.
13. Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 1953-9.
14. Day AP, Oliver JD. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into viable but nonculturable state. J Microbiol 2004; 42: 69-73.
15. Porter J, Edwards C, Pickup RW. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. J Appl Bacteriol 1995; 4: 399-408.
16. McGovern VP, Oliver JD. Induction of cold responsive proteins in *Vibrio vulnificus*. J Bacteriol 1995; 177: 4131-3.
17. Bogosian G, Bourneuf EV. A matter of bacterial life and death. EMBO reports 2001; 2: 770-4.
18. Mascher F, Keel US, Haas D, Defago G, Loccoz YM. Persistence and cell culturability of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO under plough pan conditions in soil and influence of the anaerobic regulatory gene *anr*. Environ Microbiol 2003; 5: 103-15.
19. Mascher F, Moenne-Loccoz Y, Keel US, Keel C, Haas D, Defago G. Inactivation of the regulatory gene *algU* or *gacA* affect the ability of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO to persist as culturable cells in nonsterile soil. App Environ Microbiol 2002; 68: 2085-8.
20. Munro PM, Flatau GN, Clement RL, Gauthier MJ. Influence of the *RpoS* (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 1853-8.
21. Chaiyanan S, Chaiyanan S, Huq A, Maugel T, Colwell RR. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. Syst Appl Microbiol 2001; 24: 331-41.
22. Oliver JD, Rockian R. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 2620-3.
23. Rahman I, Shahamat M, Chowdhury MA, Colwell RR. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 115-20.
24. Pruzzo C, Tarsi R, Lleo MM, et al. In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*. Curr Microbiol 2002; 45: 105-10.
25. Makino SI, Kii T, Asakura H, et al. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? Appl Environ Microbiol 2000; 66: 5536-9.
26. Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, Battistelli M, Falcieri E, Baffone W. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. New Microbiol 2004; 27: 353-60.
27. Anderson M, Bollinger D, Hagler A, et al. Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 753-8.
28. Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, et al. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. Bio Technology 1987; 5: 947-50.
29. Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. J Gen Microbiol 1991; 137: 2477-82.
30. Oliver JD, Hite F, McDougald D, Andon NL, Simpson LM. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 2624-30.
31. Steinert M, Emody LR, Amann A, et al. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 2047-53.

32. Yamamoto H. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *J Infect Chemother* 2000; 6: 112-4.
33. Keep NH, Ward JM, Robertson G, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2555-9.
34. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods* 2003; 53: 175-83.
35. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 669-85.
36. Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics- the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 492-8.