



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Derleme Makalesi

## Bakterilerde Yaşam Stratejisi Olarak Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum ve Önemi

Cihan DARCAN<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik,  
TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: cihan.darcan@bilecik.edu.tr

### ÖZET

Bu çalışmada farklılaşma özelliği olmayan (spor yada kist oluşturamayan) bakterilerin stres koşulları altında yaşamlarını devam ettirebilmek amacı ile oluşturdukları bir yaşam stratejisi olan dormansi durumu incelenmiştir. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (VBNC) hipotezi metabolik olarak aktif fakat bilinen laboratuvar metodları ile kültüre edilemeyen bakteriyel hücrelerin girmiş olduğu bir bölünememe durumunu tanımlamaktadır. Bu durum nedeni ile doğal ortamlardan bakterilerin izolasyonları ve sayımlarının yapılmasında büyük problemler vardır. Ayrıca henüz bütün bakterilere ve bütün şartlarda uygulanabilecek geleneksel bir metod geliştirilememiştir. İnsan sağlığı açısından oldukça önemli olan bu durumun çözülmesi gerekmektedir. Fakat VBNC'nin henüz genetik mekanizması bilinmemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Dormansi, Aktif fakat kültürü yapılamayan (VBNC), Stres

## Viable But Non Culturable State as a Survival Strategy in Bacteria and The Important of This State

### ABSTRACT

In this study, dormancy state which is a life strategy be able to maintain their lives under stress conditions of the bacteria which are not differentiating feature which can not form a sport or cyst) can be sustained under the stress conditions was investigated. The Viable But Non Culturable State (VBNC) hypothesis is metabolically active but not cultured in the bacterial cells by known laboratory methods. Due to this situation, there is a great problems in isolating and counting bacteria from natural environments. Furthermore, a conventional method that can be applied to both all bacteria and under all conditions has not yet been developed. This situation, which is very important for human health, needs to be solved. The genetic mechanism of VBNC is not yet known.

**Keywords:** Dormancy, Viable but non culturable (VBNC), Stres

## I. GİRİŞ

Çevredeki stres şartlarına bakterilerin direnci, karşı koyabilme yeteneklerine bağlıdır. Spor ya da kist oluşturma gibi farklılaşma özelliği olan bakteriler için, olumsuz şartları atlama genetik programları nedeni ile oldukça kolayken, genel olarak farklılaşmayan bakterilerde bu durum daha zordur. Farklılaşmayan bakteriler genetik programları ile farklı bir stres direnci geliştirebilirler. Bu direnç son 20 yılın en çok tartışılan ve üzerinde çalışılan konusu olan, aktif fakat kültürü yapılamayan (viable but nonculturable, VBNC, Dormansi) olarak adlandırılan hücre durumunu ortaya çıkarmıştır. VBNC oluşumunu bazı araştırmacılar bir yaşam stratejisi olarak önermektedirler ve farklılaşma cevaplarını sağlayan global kontrol ağlarının karıştığı bir yol olarak ifade etmişlerdir. Şartlar normale döndüğünde yeniden aktif hale geçebilmeleri için bakteriler bu programı geriye dönüştürebilirler. Bu durumda, canlılığın kültürü yapılamayan durumda devam ettiği ve VBNC cevabın farklılaşan bakterilerin (spor oluşturan) stres cevaplarına analog olduğu vurgulanmıştır [1]. Bazı araştırmacılar ise VBNC durumu stres şartları altında, sonuç olarak hücre ölümü ortaya çıkana kadar kademeli olarak hücrelerin zayıflaması ve bir nevi can çekişme şartı olarak tanımlamakta ve bu hücrelerin metabolik aktiviteyi sağlayabildikleri, solunum yapabildikleri fakat geriye dönüşümlerinin olmadığını ileri sürmektedirler [2]. Uzun zaman süresince bilim adamları arasında bakteriyal canlılık, hücrelerin kültürü yapılabilen durumu olarak ifade edilmiştir. Bakteriyal hücrelerin fizyolojik durumlarını kontrol etmeyi sağlayan direkt mikroskopik metotların kullanımı, VBNC adı verilen durumu ortaya çıkardıktan sonra canlılık tanımında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durumdaki hücreler geleneksel kültürel metotlar ile büyütülemezler, fakat bazı ölçülebilir aktivitelere veya fizyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Joux ve ark. (1997) çalışmaları sonucunda bakteriyal hücrelerin 6 farklı safhaya sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir [3].

1. safhada kültürü yapılabilen hücreler, 2. safhada gerçek solunumu olan, kültürü yapılamayan hücreler, 3. safhada gerçek solunumu olmayan fakat potansiyel solunum yapan hücreler, 4. safhada solunum göstermeyen fakat membran permeabilitesi sağlayan hücreler, 5. safhada membran permeabilitesini kaybetmiş fakat DNA da herhangi bir değişim olmadan hücre bütünlüğüne sahip hücreler, 6. safhada DNA'da bir değişim ile bütünlüğün bozularak sonunda lize olmuş veya nükleoid içermeyen hücrelerin olduğu belirtilmiştir. Mikroorganizmaların canlılığını ölçmek için kullanılacak bu safhalar ile ilgili problemlerin başında ölü ve canlı durum arasında açık bir sınır oluşturmadaki zorluklar gelmektedir [3].

VBNC durumu ilk olarak Xu ve ark. (1982)'nin *Escherichia coli* ve *Vibrio cholerae* ile deniz suyunda yaptıkları çalışmalarda ortaya çıkmıştır [4]. Deniz suyundaki bakterilerin kültürel ortamda yapılan sayımlarında, sayılarının hızlı bir azalma gösterdiğini, fakat mikroskopik sayılarının azalmadığını tespit etmişler ve bu sonuçlardan VBNC durum ile ilgili ilk verileri ortaya koymuşlardır [4]. Daha sonraki çalışmalar ile VBNC fenomeni çeşitli yazarlar tarafından ortaya konmuştur [5, 6]. Colwell ve ark. (1989) VBNC durumdaki bir bakteriyi, büyümeyi normal olarak destekleyen şartlarda hücre bölünmesini yapamayan, fakat metabolik olarak aktif bir hücre olarak tanımlamışlardır. Bu durum zor yaşam şartlarında canlı kalabilmek için bir yaşam stratejisi olarak görülmektedir [7].

Tanaka ve ark. (2000)'nin çalışmalarında Japonya'daki Argawa nehrinden alınan su örneklerinde geleneksel metotlar ile yapılan koloni sayımlarında bakteri izole edemediklerini, fakat direkt floresans boyamalar ile aynı nehir suyu örneklerinde 103/ml kadar aktif bakterinin olduğunu göstermişler, buna göre bakterilerin büyük oranda VBNC durumda olduğunu ifade etmişlerdir [8]. Yine başka bir çalışmada yer altı sularındaki bakterilerden yalnızca %1'inin farklı kültürel ortamlarda tespit edilebildiği, birçok bakterinin solunum aktivitesi göstererek VBNC durumda olduğu ortaya konmuştur [9]. *Aeromonas*

hydrophila ile yapılan çalışmalarda, bu türün yaz aylarında 20-25 °C'deki su sıcaklıklarında sayıları yüksek çıkarken, kışın düşük sıcaklıklarda oldukça azaldığı hatta gözden kaybolduğu ifade edilmiştir [10]. Bu durumun bakterilerin ölümü yüzünden olmadığı, dormant durumları nedeni ile tespit edilemediği bildirilmiştir. Dolayısı ile çevresel şartlarda yaşam mücadelesi içindeki hücrelerin ölüm kalım arasında bir bölünememe durumuna geçerek korunmaya çalıştıkları görülmektedir.

#### A. VBNC'YE SEBEP OLAN FAKTÖRLER

Bakterilerin, sıcaklık, açlık, osmolarite, ışık gibi ekstrem çevre şartlarında VBNC duruma girdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir [11-15]. Farklı çevresel parametreler içinde açlık, VBNC durum için en çok çalışılan parametrelerden birisi olup bütün çalışmalar mikrokosmlarda yapılmıştır. Mikrokosm olarak yapay deniz suyu [4, 16], nehir suyu [17], göl suyu [18, 19], yeraltı suları [20] kullanılmıştır. Bazı bakterilerde açlık stresinin VBNC durum için bir faktör olmadığı tespit edilmiştir. Örneğin Oliver ve Wanucha (1989) çalışmalarında, 5 °C'de besinin bol olduğu durumda VBNC durumu gözlemişler ve VBNC için sıcaklığın önemli bir faktör olduğunu ifade etmişlerdir [21]. Yapılan başka bir çalışmada da VBNC duruma girmenin 25-37 °C arasında, 4-5 °C'den daha hızlı olduğu gösterilmiştir [22]. Besnard ve ark. (2000)'nin çalışmalarında da *Listeria monocytogenes*'in VBNC'ye girişi 20 °C'de 4-6 hafta iken, 4 °C'de 6-8 hafta olarak belirlenmiştir [23]. Düşük sıcaklığın kompleks ortamda olduğu gibi yapay deniz suyu içerisinde de *Vibrio vulnificus*'da VBNC durumu indüklediği gösterilmiştir [24]. Bakterileri VBNC duruma sokan diğer bir faktörde osmolarite olarak tespit edilmiştir. VBNC duruma girişte osmolaritenin etkisi, bakterilere göre farklıdır. Enterik bakteriler yüksek NaCl'lü ortamlarda daha hızlı VBNC duruma girmektedir. Roth ve ark. (1988), *E. coli*'nin %90'nının 0.8 M NaCl'de VBNC duruma girdiğini göstermişlerdir [25]. Xu ve ark. (1982)'da çalışmalarında *V. vulnificus*'un %5-%25 arasındaki NaCl konsantrasyonunda VBNC duruma girdiğini göstermişlerdir [4]. Aynı şekilde *L. monocytogenes*'in de NaCl'lü ortamda VBNC durumu ortaya konmuştur [23].

Özkanca ve ark. (2002) çalışmalarında ışığın fotosensitizer maddelerin varlığında *Salmonella typhimurium*'un dormanta girmesine neden olduğunu göstermişlerdir [26]. Fiksdal ve Tryland (1999)'da çalışmalarında farklı ışık şiddetlerinin *E. coli* hücrelerinin dormanta girmesine neden olduğunu ve bu durumda bakteride bazı enzimatik fonksiyonların devam ettiğini ifade etmişlerdir [27]. Muela ve ark. (2000) çalışmalarında UV ışığında [13], Pommepuy ve ark. (1996) ise güneş ışığında *E. coli* hücrelerinde VBNC durumun olduğunu göstermişlerdir [28].

#### B. VBNC'NİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

VBNC'ye ilişkin müzakerelerin en önemli noktası canlılığın belirlenmesidir. Yu ve Mcfeter (1994) bakterilerin canlılık durumlarını sadece bir test ile göstermenin riskli olduğunu ifade etmişlerdir [29]. Kültürü yapılamayan hücrelerin, uygun floresans probalar, flow sitometri veya epifloresan mikroskop kullanılarak, besin alımı, solunum, membran permeabilitesi, enzimatik aktiviteleri içeren hücresel fonksiyonlarının ölçülmesi ile canlılıkları ortaya konabilmektedir [3]. Buna rağmen VBNC durumu belirleyen çalışmaların çoğunluğu tek bir hücre fonksiyonunun ölçülmesini temel aldığı için kültürü yapılabilen ve canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) arasındaki geçiş durumunun mekanizması hala anlaşılammıştır [3, 30]. Kültürü yapılamayan hücrelerin canlılığını ölçmek için bir çok metod önerilmiştir. Ancak bütün çevresel şartlarda ve bütün bakterilerde uygulanabilecek bir metod geliştirilememiştir. Kullanılan metodlar ya hücresel aktiviteleri yada hücre bütünlüğünü temel almıştır. Bu metodlardan Radio işaretleme [31], INT ve CTC ile elektron taşıma aktivitesinin belirlenmesi [3, 32-

35], ve substrat cevabı veren bakterilerin mikroskopik sayımı [36-39] oldukça yoğun bir şekilde uygulanmıştır.

Substrat cevabı veren bakterilerin mikroskopik sayım metodu (DVC) ilk kez Kogure ve ark. [1979] tarafından uygulanmıştır [36]. Bu metod, bakterilerin besin maddesi ile birlikte DNA sentezini engelleyen bir antibiyotik (nalidixic asit gibi) ilave edilerek belirli bir sıcaklıkta inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir. Sonucunda besin kullanarak metabolik fonksiyonlarını yerine getiren, ancak bölünemeyen, dolayısı ile normalden oldukça uzamış olan hücreler elde edilmektedir. Bu hücreler floresan bir boya olan Acridin orange ile boyanarak mikroskopta gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarla Salmonella spp'nin VBNC duruma girdiği farklı çevresel şartlar altında direk canlı sayımı metodu ile belirtilmiştir [40-41]. Uzamış hücrelerin oranı kültürü yapılabilen hücelere göre bir fark göstermemiş, bu durumla metabolik aktivite kaybı ve kültürünün yapılabirliğinin kaybı arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır (3). Ancak bazı çalışmalarda ise koloni sayımı ile direkt sayım arasında fark olduğu ve direkt sayım sonuçlarının fazla çıktığı bulunmuştur [37]. Joux ve ark. (1997) çalışmalarında S. typhimurium'u 19 gün yapay deniz suyunda inkübasyona bıraktıklarında açlık stresi ile önce kültürü yapılamaz duruma girdiği, aynı zamanda substrat cevabının kaybolduğu, daha sonra gerçek ve potansiyel solunum aktivitesini ve son olarakta membran permeabilitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir [3].

Elektron taşıma sistemi (ETS) canlılığın bir göstergesi olarak düşünüldüğünde, solunum aktivitesi ölçülerek canlılık tespiti yapılabilir. INT başta olmak üzere CTC, TTC, XTT gibi redoks boyaları deniz suları [16, 28], nehir suları [8], içme suları [42], mineral suları [43], atık sular [44], yer altı suları [33; 9], toprak [45], sediment [46], nehir biofilmlerini [42] içeren çevresel şartlarda yıllardır mikroorganizmaların solunum aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır. INT ve CTC boyaları bir elektron akseptörü olup, INT formazan ve CTC formazan olarak hücre içinde elektron taşıma zincirindeki dehidrogenaz enzimleri ile redüklenir [20]. Tetrazolium redoks boyaları ETS bileşikleri ile mikrobiyal oxidation ve redüksiyon reaksiyonlarından elektronları toplar ve intrasellüler olarak renklenmiş formazan çökeltileri şeklinde, metabolik olarak aktif mikroorganizmalarda birikir. Bu renklenmiş çökelti, direkt epifloresans mikroskopta veya hücre ekstraktları ile spektrofotometrik olarak belirlenebilir [29, 33]. Ayrıca bu metod sağlam nükleik asitlerin göstergesi olan Akridin orange direkt sayımı [37] veya DAPİ boyaması [47] ile birlikte kullanılır. CTC aerobik bakteriler için kullanılmasına rağmen anaerobik bakteriler ile de birkaç çalışma vardır. Bhupathiraju ve ark. (1999) çalışmalarında anaerobik bakterilerin INT ve TTC'yi redükleyebildiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada optimum konsantrasyonlarda CTC kullanıldığı zaman besin ilavesi olmadan CTC formazan kristali biriktirildiği tespit edilmiştir [48].

Canlılık ölçümlerinde ayrıca membran permeabilite özelliğide kullanılmaktadır. Live/Dead BacLight kiti bakteriyal membran bütünlüğünü ölçen iki renkli floresan bir boyadır ve nükleik asit boyaları içerir. Bu boyaların spektral karakterleri ve sağlıklı hücre membranından penetre olabileme yetenekleri farklıdır. Yeşil boya sağlam bakterilerden geçebilir, kırmızı boya ise 668 Da ağırlığında (propidium iodide) daha büyük bir moleküldür ve hasarlı membrandan geçebilir. Bakteriyal aktivitenin ölçülmesi için membran permeabilitesini temel almış bir boyama yöntemidir ve birçok çalışmada kullanılmıştır [35, 38]. VBNC durumunda bakterilerin canlılığını ölçmek için flow sitometri ile birlikte membran potansiyelinin bir indikatörü olarak Rhodamine 123 [49] ve Oxonol [27] boyalarının kullanıldığı yöntemler de geliştirilmiştir. Bu ölçümlerin büyük çoğunluğu koloni sayımları ile bir korelasyon ortaya koyduğu tespit edilmiştir [27, 49].

Bakterilerin canlılık aktivitelerinin belirlenmesinde Florogenik esterler de kullanılmıştır Florogenik esterlerden 6 carboxy fluorescein diacetat (6CPDA) hücrelerde esteraz aktivitelerini belirlemede kolayca uygulanabilen bir teknik olup birçok çalışmada kullanılmıştır [8, 50]. Esteraz aktivitesi ile 6CFDA hidroliz edilerek mavi ışık altında floresan olan 6 carboxyfluorescein (6CF) ortaya çıkararak hücrede birikir. P1 (propidium iodide) de inaktif hücre membranından içeri girerek çift iplikli nükleik asitlere bağlanır ve mavi ışık ile ortaya konur. Böylece aktif hücreler 6CFDA-P1 ikili boyaması ile ayrılabilir [50]. Lesne ve ark. (2000) çalışmalarında *S. typhimurium*'da canlılık ölçümü için Chemchrome V6 floresan boyasını kullanmışlardır [12]. Bu boya hücre içine diffüze olan ve floresan bir ürün veren esteraz enziminin hidroliz ettiği bir boyadır.

Bir patojen varlığına maruz kalındığı zaman (biyolojik terörizm gibi) en önemli nokta bakterinin canlı ve aktif olup olmadığıdır. Bu nedenle öncelikli olarak canlılık noktasının belirlenmesi gerekir. *Bacillus anthracis* biyolojik terörizmin en büyük silahlarından birisidir. Canlılık tespiti için plak sayımında en az 18 saatlik bir süreç gerekir. Bu nedenle sporların canlılığının ölçümü için ETS sisteminin kullanılabilmesi yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur [35]. Bu çalışmada *B. cereus*, *B. coagulans*, ve *B. subtilis* sporlarının canlılığının CTC ve Live/Dead BacLight floresans boyaları kullanılarak 1 saatlik sürede tespit edilebileceği ortaya konmuştur.

Boyalarda bakteriyel plazma membranından elektriksel potansiyel gradientine bağlı olarak geçerek hücre içerisinde birikebilir. Negatif yüklenmiş bir molekül olan Oxonol aktif hücrelerden dışarı atılır, membran potansiyelini sağlayamayan ölü hücrelerden içeri girerek birikir [27, 51]. Aynı şekilde floresans nükleik asit boyası olan SYTOX Green'de plazma membran bütünlüğünün göstergesi olarak hücre ölümünün ortaya konmasında kullanılmıştır. SYTOX Green bozulmuş membranlardan geçebilir, sağlam membranları olan canlı hücrelerden geçemez [27, 52]. Atık sularda bakterilerin canlılıklarının hızlı belirlenmesi için floregenik substratlar kullanılarak enzim aktivitelerinin tespiti de önerilmiştir [8].

### *C. VBNC DURUMDA BAKTERİDE MEYDANA GELEN DEĞİŞMELER*

VBNC duruma girdikleri zaman bakterilerde meydana gelen değişimler ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Ancak bazı çalışmalardan elde edilen verilere göre çevresel şartlara dirençlerini sağlayacak bazı değişimler ortaya koymaktadırlar. Bu değişimler hücre duvarı ve membranının stabilizasyonunu arttıran, dolayısı ile hücrenin stabilitesini sağlayan özelliktedir. VBNC duruma giren hücrelerin membran kompozisyonunda değişimler rapor edilmesine rağmen büyük bir membran bütünlüğü sağladığı tespit edilmiştir. Örneğin uzun zincirli fatty asitler gösteren kültürü yapılabilen hücreler ile karşılaştırıldığında, temel fatty asit türlerinde %60 kadar bir azalma rapor edilmiştir [6]. Ayrıca başka bir çalışmada da *Micrococcus luteus*'da fosfolipit kompozisyonunun değiştiği gösterilmiştir [53]. VBNC olan hücrelerde lipit ve proteinlerin toplam miktarının hızlı bir şekilde azaldığı ve sitoplazmanın daha yoğunlaşmış olduğu belirtilmiştir [54]. Bu hücrelerde sitoplazmik membranda permeabilite kaybı ortaya çıkarken, hücre duvarı kalınlaşması, yoğun bir sitoplazma ve tam bir nükleoid içeren morfolojik bir bütünlük sağladığı gösterilmiştir [1]. Ayrıca permeabilite kaybını bakterilerin kültürlerinin yapılabilişliğinin kaybının nedenlerinden biri olarak ileri sürmüşlerdir [1]. *V. cholera*'nın VBNC hücrelerinin dış membranı ve hücre membranı, peptidoglikan tabakasının kalınlaşması ile bütünleşmiş olarak bulunmuştur (55). *Aeromonas salmonicida* ile yapılan bir çalışmada protein içeriği ve DNA'da azalma görülürken lipopolisakarit kaybı ortaya çıkmadığı tespit edilmiştir [56]. Yapılan başka bir çalışmada ise *V. vulnificus*'un kültürü yapılamayan hücrelerinin stabilitesi araştırılmış, bu tip hücrelerin sonikasyona dirençlerinde bir artış olduğu, bu direncin açığa uğramış

hücrelerin direncine benzediği ifade edilmiştir [57]. Bu nedenle hücre membranı ve duvarında meydana gelen bu değişimlerin hücreye uzun süreli stabilite ve direnç sağladığı ifade edilmiştir.

Birçok çalışmada VBNC hücrelerde RNA miktarının azaldığı vurgulanmıştır. VBNC olan *M. luteus* hücrelerinde DNA içeriğinin sabit kaldığı ancak RNA içeriğinin %50 azaldığı tespit edilmiştir [54]. Yapılan başka bir çalışmada *V. vulnificus*'un VBNC hücrelerinde ribozomal ve nükleik asit materyalinin azaldığı görülmüşken [1], Yamamoto ve ark. (1996) ise *Legionella pneumophila*'nın VBNC hücrelerinin büyük çoğunluğunun parçalanmış nükleik asitler içerdiğini göstermişlerdir [58].

Çomak şekilli gram (-) bakteriler VBNC duruma girdiğinde hücre hacimlerinin kok veya benzeri forma küçüldüğü, hücre zarfında değişimler olduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. *V. cholerae* ile yapılan bir çalışmada dış membranın bazı kısımları ayrılmış, kabarcık oluşumu ile dış ve iç membran arasında açıklık (yarık) meydana geldiği ifade edilmiştir [59]. Benzer değişimler *Helicobacter pylori* ile yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir [60]. Hartke ve ark. (1998) çalışmalarında *Enterococcus faecalis*'in VBNC durumunda dalgalı bir görüntüye sahip düzensiz bir hücre yüzey şekli ortaya koyduğunu ifade etmişlerdir [61]. Başka bir çalışmada ise çomak şekilli bölünebilen hücreler ile VBNC durumdaki kok şekilli *Helicobacter pylori* hücreleri karşılaştırıldığında, peptidoglikanın kimyasal kompozisyonunda önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir [62]. Yine başka bir çalışmada da, *E. faecalis*'de VBNC durumdaki bakterinin hücre duvarında kimyasal değişimler olduğunu, duvarda dimerlerden daha yüksek oranda oligomerler olması nedeni ile çapraz bağlantı oranının %39'dan %48'e çıktığını ifade etmişlerdir [63].

İdil ve ark. (2010, 2011) yaptıkları çalışmalarda farklı dalga boylu ışık kaynaklarına maruz bırakıldığında oluşan fotooksidatif strese dolaylı hücrelerin dormanta girdikleri ancak kırmızı ışık altında bu duruma geçişin daha fazla olduğu ortaya konulmuştur [64, 65]. Ayrıca bu şartlar altında hücrelerin fotooksidatif stres altında oksidatif stres enzimlerinin azaldığını belirtmişlerdir [66].

VBNC oluşma mekanizması henüz çözülmüş değildir. Ancak Darcan (2005) [67] ve Darcan ve ark. (2003) [68] çalışmalarında gösterdikleri bir sonuç bu mekanizmanın çözümü için bir yol göstermiştir. Bu çalışmaların sonucuna göre porin proteinlerinin sentezini osmotik şartlara göre kontrol eden EnvZ osmosensörünün dormansi mekanizması ile bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Dolayısı ile çevresel sensörlerin etkisinin vbnc mekanizmasının oluşumunda bir rolü olduğu söylenebilir. Ayrıca aynı yazarlar çalışmalarında pH, osmolarite ve sıcaklık faktörlerinden bağımsız olarak bu mekanizmanın kontrol edildiğini ortaya koymuşlardır [69]. Dolayısı ile VBNC ve EnvZ arasındaki ilişkinin direkt bir ilişki olduğu ifade edilmiştir.

#### *D. VBNC DURUMUN HALK SAĞLIĞI AÇISINDAN ÖNEMİ*

Mikrobiyologların VBNC hücreler ile yaptıkları araştırmalarda en temel sorulardan biriside patojenite ile ilgilidir. VBNC olan bakterilerin yeniden canlanabilme yeteneğinde olup olmadığı ve patojenik organizmalardaki VBNC durumda virulans özelliği taşıyıp taşımadıkları en temel sorulardan birisidir. Potansiyel patojenitenin korunduğu birçok in vivo yeniden aktivite kazanma çalışmaları ile ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda kültürü yapılamayan hücrelerin hayvansal pasajlarda yeniden canlandığı, birçok durumda virulansını tekrar kazandığı ortaya konmuştur. *E. coli* VBNC hücreleri kültürü yapılamayan duruma dönüştürüldükten sonra tavşan ince bağırsağına verilmiş ve burada yeniden canlandıkları gösterilmiştir [70]. Ayrıca Pommepuy ve ark. (1996)'nın çalışmalarında da *E. coli*'nin patojenitesi VBNC durumda gösterilmiştir [28]. *Shigella dysenteria* VBNC hücreleri kültüre edilmiş

HeLa hücrelerinde biyolojik olarak aktif Shiga toxini sentezleyen ve bağırsak epitel hücrelerine tutunmayı sağlayan patojenik özelliği tekrar kazandığı bulunmuştur [71, 72]. Yine başka bir çalışmada da *Campylobacter jejuni* VBNC hücrelerinin, tavuk ve fare intestinal kısmına enjeksiyonundan sonra kültürünün yapılabirliği yeteneğini tekrar kazandığı gösterilmiştir [73]. Ancak bu durumun *in vitro*'da zenginleştirilmiş kültürlerde gözlenmediği vurgulanmıştır. Ayrıca *Aeromonas salmonicida* [74], *Vibrio vulnificus* [37]'da da virulans özelliği gösterilmiştir.

Yüksek tuz konsantrasyonu ile besinlerin korunması, besin kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde bir yol olarak uygulanırken, Japonya'da 1998 yılında enterohemorajik *E. coli* O157 ile kontamine olmuş tuzlanmış sazan balıkları nedeniyle meydana gelen 62 hastalık rapor edilmiştir. Bu ürünlerin 9 ay yüksek tuz konsantrasyonu ve derin dondurucuda canlı kalabilmesi, daha sonra insanlarda patojenite göstermesi ve geleneksel metodlar ile yapılan sayım ve teşhis yöntemlerinde ortaya çıkmamış olması, VBNC durumun sağlık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durumdaki VBNC bakterilerin patojenitelerini tekrar kazandığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [75].

### *E. VBNC BAKTERİLERİN YENİDEN AKTİVİTE KAZANABİLMESİ*

Kültürü yapılamayan hücre popülasyonuna besin ilavesi ile çok sayıda kültürü yapılabir hücrelerin görülmesi yeniden aktivite kazanma olarak ifade edilmiştir. Ancak VBNC hücrelerin yeniden canlanmaları ile ilgili raporlar şüphe ile karşılanmıştır. Birçok çalışmada rapor edilen VBNC durumdan kültürü yapılabir forma dönüşün, bir kaç canlı hücrenin büyümesinin sonucu olabileceği, dolayısı ile yeniden canlanma gibi görülebileceği ifade edilmiştir [57, 76]. Yeniden canlanmanın varlığı bir çok şartta ve bir çok bakteri türünde gösterilmişken aksine raporların varlığında görülmektedir. Kolling ve Matthews (2001)'in çalışmaları sonunda VBNC olan *E. coli*'nin bu durumdan çıkamadığını göstererek yeniden canlanmanın olmadığını ayrıca virulansında kaybettiğini ifade etmiştir [77].

Roth ve ark. (1988) çalışmalarında 0.8 M NaCl'e maruz kaldığında *E. coli*'nin hızlı bir kültürünün yapılabirliği kaybına uğradığını, bu hücrelerin ATP'yi intrasellüler olarak biriktirdiğini ve osmotik koruyucu betain kültüre ilave edildiğinde yeniden canlandırıldığını ortaya koymuştur [78]. Ayrıca birkaç hücrenin büyüme olasılığını engellemek için kültüre kloramfenikol ilave edildiği zamanda aynı sonucun gözlendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca ısı şoku ile muamele edilen *V. cholerae*'nin VBNC hücrelerinin yeniden canlandığı gösterilmiştir [79]. Bu hücreler 86 günde VBNC yapılmış ve 1 dk 45 °C de tutulduktan sonra katı ortama ekildiğinde kültürünün yapılabirliğini tekrar kazandığı, ısı şoksuz bu durumun görülmediği ifade edilmiştir.

VBNC popülasyonlarının heterojen olduğu, canlı, kültürü yapılamayan ve ölü hücrelerden oluştuğu ifade edilmiştir. Ayrıca bu karışık popülasyonda canlı hücrelerin sentezlediği bir faktörün dormant hücrelerin yeniden canlanmasında rol aldığı ifade edilmiştir [80]. Dormant hücrelerin yeniden aktivite kazanmalarını sağlayan canlı hücrelerin sentezlediği bir faktör saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir [81]. Saflaştırılmış bu faktörün dormant *M. luteus* kültürlerinin ortamına ilave edildiğinde kontrole göre 100 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir [82]. Reissbrodt ve ark. (2002) çalışmalarında bakterilerin VBNC durumdan çıkışında önemli rolü olan canlı bakterilerin sentezlediği Oxyrase ve Ferrioxamine büyüme faktörlerini tespit etmişlerdir [83]. Ayrıca Enterobakteriyal otoindüser (AI) adını verdiği bir maddenin bakterinin dormant durumdan çıkışını sağladığını göstermiştir.

## II. SONUÇ

Sonuç olarak bakteriler çevresel stres koşulları altında kendilerini koruyabilmek için çeşitli yaşam stratejileri geliştirmektedirler. Bu stratejiler arasında Dormansi olayı çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Ayrıca VBNC duruma girdikten sonra hastalık yapma kapasitelerini tekrar kazanmakta veya hiç kaybetmemektedirler. Buna rağmen sadece VBNC hücreler hastalık yapmaya yeterli midir, yoksa VBNC durumdan çıktıktan sonra mı patojenite özelliklerini gösterdikleri konusunda henüz cevap bulunamamıştır. Açık olan nokta, başlangıçta VBNC olan hücreler bir konağa aktarıldıklarında aktive olduklarıdır. Bu durumda bilinen kültürel metotlarda olmayan bazı indükleyici faktörler konak içerisinde yeniden canlanmayı sağladığı ve VBNC döngüden çıkışı sağlayabildiği görülmektedir. Doğru ve güvenilir bir metodun çevresel örneklerdeki canlı bakterilerin toplam sayısını tahmin etmede hala geliştirilememesi halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle dormansinin mekanizmasının çözülmesi ve bu durumdaki bakterilerin tespiti için güvenilir, her şartta ve her bakteri grubu için uygulanabilecek yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu yöntemlerin geliştirilebilmesi içinde dormansi mekanizmasının çözülmesi gerekmektedir.

## III. KAYNAKLAR

- [1] D. McDougald, S. A. Rice, D. Weichart and S. Kjelleberg, "Nonculturability: adaptation or debilitation?," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 25, pp. 1-9, 1998.
- [2] G. Bogosian, P. J. Morris and J. P. O'neil, "A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 5, pp. 1736-1742, 1998.
- [3] F. Joux, P. Lebaron and M. Trouselier, "Succession of cellular states in a *Salmonella Typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 22, pp. 65-76, 1997.
- [4] H. S. Xu, N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Atwell, D. J. Grimes and R. R. Colwell, "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment," *Microbial Ecology*, vol. 8, pp. 313-323, 1982.
- [5] S. Kjelleberg, M. Hermansson and P. Marden and G. W. Jones "The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment." *Annual Review Microbiology*, vol. 41, pp. 25-49, 1987.
- [6] K. Linder and J. D. Oliver, "Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 55, no. 11, pp. 2837-2842, 1989.
- [7] R. R. Colwell, I. T. Knight, C. Somerville, S. Shults and C. W. Kaspar, "Viable but non-culturable phenomenon in relationship to starvation/survival, "Injury", and strategies for survival of bacteria in the environment." *Recent Advances in Microbial Ecology, 5<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*, Japan, pp. 85-88, 1989



- [8] Y. Tanaka, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry," *Journal Applied Microbiology*, vol. 88, pp. 228-238, 2000.
- [9] A. Ultee, N. Souvatzi, K. Maniadi and H. König, "Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany," *Journal Applied Microbiology*, vol. 96, pp. 560-568, 2004.
- [10] A. A. Gavriel, J. P. Landre and A. J. Lamb, "Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland," *Journal Applied Microbiology*, vol. 84, pp. 383-392, 1998.
- [11] D. Weichart, D. McDougald, D. Jacobs and S. Kjelleberg, "In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 7, pp. 2754-2758, 1997.
- [12] J. Lesne, S. Berthet, S. Binard, A. Rouxel and F. Humbert, "Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 60, pp. 195-203, 2000.
- [13] A. Muela, J. M. Garcia-Bringas, I. Arana and I. Barcina, "The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: the relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation," *Microbial Ecology*, vol. 39, pp. 65-71, 2000.
- [14] M. Ordax, E. Marco-Noales, M. M. López and E. G. Biosca, "Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Nonculturable State", *Applied Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 5, pp. 3482-3488, 2006.
- [15] T. Vattakaven, P. Bond, G. Bradley and C. B. Munn, "Differential Effects of Temperature and Starvation on Induction of the Viable-but-Nonculturable State in the Coral Pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 72, pp. 6508-6513, 2006.
- [16] G. Caruso, M. Mancuso and E. Crisafi, "Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *Escherichia coli* in seawaters." *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, pp. 225-233, 2003.
- [17] K. P. Flint, "The long-term survival of *Escherichia coli* in river water," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 63, pp. 261-270, 1987.
- [18] R. Özkanca, "Survival and physiological status of *Escherichia coli* in lake water under different nutrient conditions." Ph. D. Dissertation, Department of Biological Sciences, University of Warwick, England, 1993.
- [19] R. Özkanca, "Metabolik olarak aktif fakat kültürü yapılmayan *Escherichia coli*'nin göl suyundaki yaşamı ve determinasyonu," *Turkish Journal of Biology*, vol. 20, pp. 87-97, 1996.

- [20] P. B. Hatzinger, P. Palmer, R. L. Smith, C. T. Penarrieta and T. Yoshinari, "Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria," *Journal of Microbiology Methods*, vol. 52, pp. 47-58, 2003.
- [21] J. D. Oliver and D. Wanucha, "Survival of *Vibrio vulnificus* at reduced temperatures and elevated nutrient," *Journal of Food Safety*, vol. 10, pp. 79-86, 1989.
- [22] D. M. Rollins and R. R. Colwell, "Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 52, pp. 531-535, 1986.
- [23] V. Besnard, M. Federighi and J. M. Cappelier, "Evidence of viable but nonculturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPİ double staining," *Food Microbiology*, vol. 17, pp. 697-704, 2000.
- [24] I. Barcina, J. M. Gonzalez, J. Iriberry and L. Egea, "Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 55, pp. 246-251, 1989.
- [25] W. G. Roth, M. P. Leckie and D. N. Dietzler, "Restoration of colony forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 54, pp. 3142-3146, 1988.
- [26] R. Özkanca, N. Şahin, K. Işık, E. Kariptaş and K. P. Flint, "The effect of toluidine blue on the survival, dormancy and outer membrane porin proteins (OmpC and OmpF) of *Salmonella typhimurium* LT2 in seawater," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, pp. 1097-1104, 2002.
- [27] L. Fiksdal and I. Tryland, "Effect of UV light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* β-D-galactosidase activity and other potential viability parameters," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 87, pp. 62-71, 1999.
- [28] M. Pommepuy, M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R. R. Colwell, et al., "Retention of Enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 12, pp. 4621-4626, 1996.
- [29] F. P. Yu and G. A. McFeters, "Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 2462-2466, 1994.
- [30] A. Villarino, A. L. Toribio, B. M. Brena, P. A. D. Grimont and O. M. Bouvet, "On the relationship between the physiological state of bacteria and rapid enzymatic assays of fecal coliforms in the environment," *Biotechnology Letters*, vol. 25, pp. 1329-1334, 2003.
- [31] D. B. Roszak and R. R. Colwell, "Survival strategies of bacteria in the natural environment," *Microbiological Reviews*, vol. 51, no. 3, pp. 365-379, 1987.
- [32] R. Zimmermann, R. Iturriaga and J. Becker-Birck, "Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 36, pp. 926-935, 1978.

- [33] G. G. Rodriguez, D. Phipps, K. Ishiguro and H. F. Ridgway, "Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 58, no. 6, pp. 1801-1808, 1992.
- [34] W. Baffone, B. Citterio, E. Vittoria, A. Casaroli, R. Campana, et al., "Retention of virulence in viable but nonculturable halophilic *Vibrio* spp.," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 89, pp. 31-39, 2003.
- [35] C. Laflamme, S. Lavigne, J. Ho and C. Duchaine, "Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, pp. 684-692, 2004.
- [36] K. Kogure, U. Simidu and N. Taga, "A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 25, pp. 415-420, 1979.
- [37] J. D. Oliver and R. Bockian, "In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 7, pp. 2620-2623, 1995.
- [38] A. S. Braux, J. Minet, Z. Tamanai-Shacoori, G. Riou, and M. Cormier, "Direct enumeration of injured *Escherichia coli* cells harvested onto membrane filters," *Journal of Microbiology Methods*, vol. 31, pp. 1-8, 1997.
- [39] D. Yokomaku, N. Yamaguchi and M. Nasu, "Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 12, pp. 5544-5548, 2000.
- [40] D. B. Roszak and R. R. Colwell, "Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count," *Applied Environmental Microbiology* vol. 53, no. 12, pp. 2889-2983, 1987.
- [41] R. A. N. Chmielewski and J. F. Frank, "Formation of viable but nonculturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 20, pp. 380-384, 1995.
- [42] G. Schaule, H. C. Flemming, and H. F. Ridgway, "Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 3850-3857, 1993.
- [43] R. Ramalho, J. Cunha, P. Teixeira, and P. A. Gibbs, "Improved methods for enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters," *Journal of Microbiology Methods*, vol. 44, pp. 97-103, 2001.
- [44] J. D. Van Elsas, P. Kastelein, P. M. De Vries and L. S. Van Overbeek, "Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 47, pp. 842-854, 2001.
- [45] W. Yu, W. K. Dodds, M. K. Banks, J. Skalsky and E. A. Strauss, "Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 3367-3372, 1995.

- [46] L. M. Proctor and A. C. Souza, "Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) active cells and cell specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments," *Journal of Microbiology Methods*, vol. 43, pp. 213-222, 2001.
- [47] S. Ullrich, B. Karrasch, H. Hoppe, K. Jeskulke, and M. Mehrens, "Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride." *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62 (12), pp. 4587-4593, 1996.
- [48] V. K. Bhupathiraju, M. Hernandez, D. Landfear and L. Alvarez-Cohen, "Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria," *Journal of Microbiology Methods*, vol. 37, pp. 231-243, 1999.
- [49] A. S. Kaprelyants and D. B. Kell, "Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 72, pp. 410-422, 1992.
- [50] N. Yamaguchi, and M. Nasu, "Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 83, pp. 43-52, 1997.
- [51] R. Lopez Amaros, J. Comas and J. Vives Rego, "Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide and oxonol," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 2521-2526, 1995.
- [52] B. L. Roth, M. Poot, S. T. Yue and P. J. Millard, "Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 53, pp. 2889-2983, 1997.
- [53] G. V. Mukamolova, S. S. Kormer, N. D. Yanopolskaya and A. S. Kaprelyants, "Properties of dormant cells in stationary phase cultures of *Micrococcus luteus* during prolonged incubation," *Mikrobiologiya* (Russian), vol. 64, pp. 284-288, 1995.
- [54] G. V. Mukamolova, A. S. Kaprelyants and D. B. Kell, "Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 67, pp. 289-295, 1995.
- [55] K. Kondo, A. Takade and K. Amako, "Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 123, pp. 179-184, 1994.
- [56] I. Effendi and B. Austin, "Dormant/unculturable cells of fish pathogen *Aeromonas salmonicida*," *Microbial Ecology*, vol. 30, pp. 183-192, 1995.
- [57] D. Weichart and S. Kjelleberg, "Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*," *Microbiology*, vol. 142, pp. 845-853, 1996.
- [58] H. Yamamoto, Y. Hashimoto, and T. Ezaki, "Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 20, pp. 149-154, 1996.

- [59] X. Jiang and T. J. Chai, "Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 1300-1305, 1996.
- [60] G. Donelli, C. Matarrese, B. Fiorentini, T. Dainelli, E. Taraborelli, et al., "The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori*," *FEMS Microbiology Letters*, vol.168, pp. 9-15, 1998.
- [61] A. Hartke, J. C. Giard, J. M. Laplace and Y. Auffray, "Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 64, pp. 4238-4245, 1998.
- [62] K. Costa, G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, et al., "The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells of spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall," *Journal of Bacteriology*, vol. 181, pp. 3710-3715, 1999.
- [63] C. Signoretto, M. M. Lleo, M. C. Tafi, and P. Canepari, "Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 5, pp. 1953-1959, 2000.
- [64] O. Idil, R. Özkanca, C. Darcan and K.P. Flint, "Escherichia coli: Dominance of red light over other visible light sources in establishing viable but nonculturable state," *Photochemistry and Photobiology*, vol.86, no. 1, 104-109, 2010.
- [65] O. Idil, C. Darcan and R. Ozkanca, "The effect of UV-A and different wavelengths of visible lights on survival of *Salmonella typhimurium* in seawater microcosms," *Journal of Pure Applied Microbiology*, vol. 5, no. 2, pp. 581-592, 2011.
- [66] O. Idil, C. Darcan, T. Ozen and R. Ozkanca, "The effect of UV-A and various visible light wavelengths radiations on expression level of *Escherichia coli* oxidative enzymes in seawater," *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 226-232, 2013.
- [67] C. Darcan, "Karadeniz suyunda pH, osmolarite ve açlık stresinin *Escherichia coli*'nin dış membran protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması," Doktora tezi, Biyoloji Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye, 2005.
- [68] C. Darcan, R. Özkanca and K. P. Flint, "Survival of nonspecific porin-deficient mutants of *Escherichia coli* in black sea water," *Lett. App. Microbiol*, vol. 37, pp. 380-385, 2003.
- [69] C. Darcan, R. Ozkanca, O. Idil and K. P. Flint, "Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water," *Polish Journal of Microbiology*, vol. 58, no. 4, pp. 307-317, 2009.
- [70] D. J. Grimes, and R. R. Colwell, "Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi tropical ocean water," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 34, pp. 161-165, 1986.

- [71] L. Rahman, M. Shahamat, P. A. Kirchman, E. Russek-Cohen and R. R. Colwell, "Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but non-culturable *Shigella dysenteriae* type 1," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 3573-3578, 1994.
- [72] L. Rahman, M. Shahamat, M. A. Chowdhury and R. R. Colwell, "Potential virulence of viable but non-culturable *Shigella dysenteriae* type 1," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 115-120, 1996.
- [73] J. M. Cappelletti, C. Magras, J. L. Jouve and M. Federighi, "Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models," *Food Microbiology*, vol. 16, pp. 375-383, 1999.
- [74] J. A. W. Morgan, G. Rhodes and R. W. Pickup, "Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 874-880, 1993.
- [75] S. I. Makino, T. Kii, H. Asakura, T. Shirahata, T. Ikeda, et al., "Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted Salmon roe?" *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 12, pp. 5536-5539, 2000.
- [76] J. A. W. Morgan, P. A. Cranwell, and R. W. Pickup, "Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 57, pp. 1777-1782, 1991.
- [77] G. L. Kolling and K. R. Matthews, "Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 9, pp. 3928-3933, 2001.
- [78] W. G. Roth, M. P. Leckie and D. N. Dietzler, "Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 54, pp. 3142-3146, 1988.
- [79] S. N. Wai, T. Moriya, K. Kondo, H. Misumi and K. Amako, "Resuscitation of *Vibrio cholerae* 01 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 136, pp. 187-191, 1996.
- [80] A. S. Kaprelyants, G. V. Mukamolova and D. B. Kell, "Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 115, pp. 347-352, 1994.
- [81] T. V. Votyakova, A. S. Kaprelyants and D. B. Kell, "Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase; the population effect," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 9, pp. 3284-3291, 1994.
- [82] D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood, and M. R. Barer, "Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 73, no. 2, pp. 169-187, 1998.
- [83] R. Reissbrodt, I. Rienaeker, J. M. Romanova, P. P. E. Freestone, R. D. Haigh, et al. "Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and enterohemorrhagic *Escherichia coli*

from the viable but nonculturable state by heat stable enterobacterial autoinducer.” *Applied Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 10, pp. 4788-4794, 2002.