

Alkali pH'da *Escherichia coli*'nin VBNC Forma Geçişinde CusS-CusR İki Bileşikli Sisteminin Rolünün Araştırılması

Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ^{1*}, Cihan DARCAN²

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 11230, Bilecik, Türkiye

² Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 11230, Bilecik, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

E-mail: ozge.kaygusuz@bilecik.edu.tr

Orcid ID: 0000-0002-3652-4266

Araştırma Makalesi/Research Article

Geliş Tarihi/Received: 14.08.2021

Kabul Tarihi/Accepted: 17.11.2021

ÖZET

Canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) durum henüz moleküler mekanizması çözülmemiş bir süreçtir. Bu çalışmada iki bileşikli fosforlama sistemlerinden birisi olan CusS-R'nin alkalik pH (8.5) ortamında VBNC forma geçişte rollerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre hem *cusS* hem de *cusR* genlerinin nakavt edilmesi pH 7.2 de bir etki göstermezken, *E. coli*'nin alkali ortamda yaşamını sınırlamıştır. Yabani tip *E. coli* W3110'un plak sayımına göre t_{99} değeri 57 gün iken, bu değer *cusS* geni nakavt edildiğinde 31, *cusR* geni nakavt edildiğinde ise 34 gün olduğu tespit edilmiştir. Nakavt edilmiş olan genler plazmit ile tamamlandığında t_{99} değerinin *E. coli cusS* mutanlığı için 62 gün, *E. coli cusR* mutanlığı için 61 gün olarak tespit edilmiş olup bu değerler yabani tip *E. coli* ile benzerdir. Mutantlarda alkali pH'da görülen bu azalmanın VBNC oluşumundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için canlı hücre sayımları Live Dead sayımı, CTC sayımı ve DVC sayım metotları ile elde edilmiştir. Bu sayım sonuçlarına göre mutantların plak sayımlarında görülen azalmanın aslında VBNC forma giren bakterilerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Dolayısı ile *cusS* ve *cusR* genlerinin VBNC forma geçişte bir rolleri olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, *cusS/R*, Alkalik pH, VBNC, İki bileşikli fosforlama

Investigation of the Role of the CusS-CusR Two-Component System in the Transition to VBNC Form of *Escherichia coli* at Alkaline pH

ABSTRACT

The Viable but non-culturable (VBNC) state is a process whose molecular mechanism has not yet been resolved. In this study, it was studied whether CusS-R, one of the two-component phosphorylating systems, has a role in the transition to VBNC form in an alkaline pH (8.5) environment. According to the results obtained in the study, while knocking out both *cusS* and *cusR* genes did not have an effect at pH 7.2, it limited the survival of *E. coli* in an alkaline environment. The t_{99} value of wild type *E. coli* W3110 was 57 according to the plaque count, while this value was 31 days when the *cusS* gene was knockout and 34 days when the *cusR* gene was knockout. When the knocked out genes were completed with the plasmid, the t_{99} value was determined as 62 days for the *E. coli cusS* mutant and 61 days for the *E. coli cusR* mutant, which is similar to that of wild-type *E. coli*. To determine whether this decrease in alkaline pH in mutants is due to VBNC formation, live cell counts were obtained by Live Dead count, CTC count and DVC count methods. According to these counting results, it was determined that the decrease in the plaque counts of the mutants was actually caused by bacteria entering the VBNC form. Therefore, it was determined that the *cusS* and *cusR* genes do not have a role in the transition to the VBNC form.

Keywords: *Escherichia coli*, *CusS/R*, Alkaline pH, VBNC, Two component phosphorelay

Atıf için (Cite);

İzgördü, Ö.K., Darcan, C. (2021). Alkali pH'da *Escherichia coli*'nin VBNC Forma Geçişinde CusS-CusR İki Bileşikli Sisteminin Rolünün Araştırılması, *Recep Tayyip Erdogan University Journal of Science and Engineering*, 2(2), 36-50. Doi: 10.53501/rteufemud.982864

1. Giriş

Bakteriler yaşadığı çevresel ortamlarda sıcaklık değişimleri, osmolarite, güneş ışığı, pH, besin eksikliği gibi mevsimsel ve sirkadiyen değişikliklere maruz kalmaktadırlar (Barcina ve Arana, 2009; Darcan, 2012; Darcan ve Aydın, 2012). Çevresel koşullar elverişsiz hale geldiğinde ve uygun koşullar yeniden oluşana kadar bakteriler bu stresler altında yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmektedirler (Pinto vd., 2015). Bakterilerin geliştirdiği bu stratejilerden bir tanesi de canlı fakat kültürü yapılamaz bir durum olarak bilinen VBNC fenomenidir. Bu fenomen ilk olarak 1982 yılında Xu vd., tarafından nehir ağız sularında yapılan çalışmalarda tespit edilmiş ve yıllardır da bakterileri VBNC'ye indükleyen stres şartları, tespit yöntemleri ve moleküler mekanizmasının çözümüne yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen henüz tam anlamı ile aydınlatılamamıştır (Xu vd., 1982; Bodor vd., 2020; Ayrapetyan vd., 2018; Dong vd., 2020; Yoon ve Lee, 2020). 30 yılı aşkın süredir yapılan birçok çalışmada mikroorganizmaları VBNC ye indükleyen çok çeşitli stres faktörleri ve 100'den fazla bakteri/ mantar türünün VBNC'ye girdiği tespit edilmiştir (Pinto vd., 2015; Zhao vd., 2017; Ayrapetyan vd., 2018; Dong vd., 2020; Zhang vd., 2020; Ou vd., 2021). Mikroorganizmalar VBNC duruma girdiklerinde çevresel şartlara dirençlerini sağlayacak hem fiziksel hemde moleküler açıdan değişikliğe uğrarlar. VBNC hücrelerin morfolojileri (Takeda, 2011) ve hücre duvar yapıları (Signoretto vd., 2000) değişiklik gösterse de protein sentezi (Rahman vd., 1994), gen transkripsiyonu (Leo vd., 2000), zar bütünlüğü (Lloyd ve Hayes, 1995) ve solunum aktivitesi hala devam etmektedir (Oliver, 2005; Oliver, 2010; Li vd., 2014).

VBNC durumuna indüklenen bakterilerin hücre hacimlerinin küçüldüğü ve hücre zarfında değişimler olduğu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir (Signoretto vd., 2000; Li vd., 2016). Bakteriler VBNC duruma girdiklerinde çomak şekilli *S. typhimurium*, *H. pylori* ve *E. coli* gibi Gram negatif bakteriler kok ve benzeri forma

(Kumar ve Ghosh, 2019), *V. cholerae* gibi yay şekilli organizmalar da ise küresel form tespit edilmiştir (Dong vd., 2020). Gram pozitif bir organizma olan *Enterococcus faecalis* de ise VBNC hücrelerde hücre yüzeyi dalgalı bir görüntüye sahiptir (Signoretto vd., 2000). VBNC durum ile ilgili fizyolojik çalışmaların yanı sıra birçok çalışmada bakteriyi VBNC duruma indükleyen veya kontrol eden mekanizmaya yönelik çalışmalarda yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda alternatif sigma faktör RpoS (Boaretti vd., 2003; Kusumoto vd., 2012), LysR tipi transkripsiyonel düzenleyici OxyR (Kong vd., 2004; Li vd., 2014), alkil hidroperoksit redüktaz alt birimi AhpC (Asakura vd., 2007; Wang vd., 2013), glutatyon S-transferaz (GST) (Abe vd., 2007), süperoksit dismutaz SodA (Noor vd., 2009; Zhao vd., 2016), polifosfat kinaz 1 (PPK1) (Gangaiah vd., 2009) ve EnvZ (Darcan vd., 2003; Darcan, 2005) proteinleri tespit edilmiştir.

Deniz suyunda, Darcan vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada EnvZ sensörünün VBNC forma geçişte çok önemli bir rolünün olduğu tespit edilmiştir. EnvZ sensörü nakavt edildiğinde *E. coli*'nin VBNC duruma girmediği belirlenmiştir. Ayrıca osmotik stres, alkali pH, osmotik koruyucu glisin betain ilavesi gibi farklı stres şartlarında da bu durum analiz edilmiş ve bu durumun değiştirmedığı tespit edilmiştir. Yani stres faktörleri değişse bile *E. coli envZ* mutantları VBNC duruma girmemektedir. Darcan çalışmasında bu durumu *envZ* mutantının dış ortamdaki stresleri algılayamadığından VBNC duruma girmek için gerekli mekanizmayı indükleyemediği yönünde değerlendirmiştir (Darcan, 2005; Darcan vd., 2003; Darcan vd., 2009). Dolayısı ile EnvZ'nin çevresel değişimleri algılayıp regülatörlere iletebilen osmosensör görevinden dolayı, hücrenin VBNC forma girebilmesi için gerekli moleküler mekanizmayı tetikleyebileceği ifade edilmiştir. Bu düşünceden yola çıkarak başka iki bileşik fosforlama sistemlerinin VBNC durum ile ilişkisinin olup olmayacağını araştırılması gerekmektedir. Literatürde başka iki bileşik fosforlama sistemlerinin VBNC ile ilişkisini gösteren çalışmalara rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu

çalışmada iki bileşikli fosforlama sistemlerinden birisi olan *cusS/R* iki bileşikli sistemin VBNC oluşumunda rolünün olup olmadığı araştırılmıştır.

CusS-R iki bileşikli fosforlama sistemi *CusS* sensör kinaz ve *CusR* cevap regülatöründen oluşan bir sistemdir. Bu sistem *Escherichia coli*'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bu iki bileşikli fosforlama sistemi periplazmadaki Cu'ı algılayarak *CusCFBA* mekanizmasını devreye sokar ve periplazmadan fazla bakırın detoksifikasyonunu gerçekleştirir (Munson vd., 2000; Petersen ve Moller, 2000; Stoyanov vd., 2001; Grass ve Rensing, 2001; Rensing ve Grass, 2003; Franke vd., 2003). *CusSR* aynı zamanda gümüş tarafından da indüklenerek gümüşe karşı korunmada da rol oynar. İki sistemin aerobik ve anaerobik şartlarda farklı çalışmaları da belirlenmiştir (Outten vd., 2001). VBNC ye indüklenme açısından çeşitli metallere olduğu gibi Cu varlığının da VBNC duruma indüklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Ordax vd., 2006). Ancak *cusS-R* iki bileşikli

fosforlama sisteminin VBNC ilişkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada *cusS-R* iki bileşikli fosforlama sistemi genlerinin VBNC oluşumunda rollerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* yabani tip ve mutant suşları Japonya- Keio Koleksiyonundan temin edilmiştir. Keio koleksiyonu, *E. coli* K-12 suşu BW25113'ün bir dizi tek gen nakavt mutantlarıdır. Bu koleksiyon sistematik ve genleri silinmiş bakteri mutantlarını içerir. Temin edilen suşlar ve bu çalışmada elde edilen mutant suşlar PCR ile doğrulanmış ve %20 gliserol içeren LB broth besiyerlerinde -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Elde edilen tüm suşlar Tablo 1'de, PCR doğrulamada kullanılan primerler Tablo 2'de, PCR reaksiyonu bileşenleri Tablo 3'de ve PCR döngü koşulları Tablo 4'de yer almaktadır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *E. coli* yabani tip ve mutant suşları

Table 1. Wild type *E. coli* and mutant strains used in this study

Suş numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabani tip	Lab stok
JW5082	BW25113 <i>cusS::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW0560	BW25113 <i>cusR::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW5082	<i>pnt3::cusS</i>	ASKA Klone
JW0560	<i>pnt3::cusR</i>	ASKA Klone
OK102	W3110 <i>cusS::km</i>	Darcan lab (TÜBİTAK 113T003)
OK 103	W3110 <i>cusR::km</i>	Darcan lab (TÜBİTAK 113T003)
OK 106	W3110 <i>cusS::km pnt3::cusS</i>	Darcan lab (TÜBİTAK 113T003)
OK 107	W3110 <i>cusR::km pnt3::cusR</i>	Darcan lab (TÜBİTAK 113T003)

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer listesi

Table 2. Primers list used this study

Evrensel K1 geri primeri	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'
W3110:: <i>cusS</i> ileri primeri	5' TATGCCGCCAACTTTACTCG 3'
W3110:: <i>cusR</i> ileri primeri	5' GTAGCTTCCCAGCAACAGTT 3'
<i>pnt3::cusS</i> ileri primeri	5' GCCGTCAGTAAGCCATTTTCAGCG 3'
<i>pnt3::cusS</i> geri primeri	5' CCAGCGGGTAATGTGATAACAAA 3'
<i>pnt3::cusR</i> ileri primeri	5' GCCAAACTGTTGATTGTCGAAGA 3'
<i>pnt3::cusR</i> geri primeri	5' CCCTGACCATCCGGCACCTCAAG 3'

Tablo 3. PCR reaksiyonu bileşenleri**Table 3.** PCR reaction components

10x ThermaPol Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 µl
10mM dNTP Mix (NEB)	0,2 µl
10µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
2mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µl
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µl
Bakteri süspansiyonu	1 µl
dH ₂ O	6,15 µl
Total	10 µl

Tablo 4. PCR reaksiyon koşulları**Table 4.** PCR reaction conditions

94 °C	3dk	1 döngü
94 °C	1dk	
58 °C	1dk	30 döngü
72 °C	1,5dk	
4 °C	10dk	1 döngü

2.2. Mutantların Eldesi

Keio koleksiyondan temin edilen *E. coli* BW25113 suşundaki hedef gen bölgeleri P1kc fajı ile transdüksiyon yöntemi kullanılarak *E. coli* W3110 suşuna aktarılmıştır. Böylelikle Tablo 1'de yer alan mutant suşlar elde edilmiştir. Transdüksiyon metodu Miller (1992)'ın kullandığı klasik transdüksiyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için *E. coli* BW25113 *cusS::km* (JW5082) ve *cusR::km* (JW0560) CaCl₂ (2.5 mM) ve kanamisin (25 µg/ml) antibiyotiği içeren LB broth içerisinde OD₆₀₀ değeri 0,4-0,45 absorbansa gelene kadar 37 °C çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra OD₆₀₀ değeri 0,4- 0,45 olan bakteri üzerine P1kc fajından eklenmiş ve 37 °C' de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında yaklaşık 50 °C olan soft agar (10 g/l tripton, 5 g/l yeast extract, 6 g/l KCl, 7 g/l agar)'dan 2,5 ml ve %50'lik glukoz stoğundan 25 µl eklenerek LB agar üzerine bu karışım yayılarak oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş ve daha sonra 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 2 ml LB broth ve 50 µl kloroform (Merck) petriye eklenerek 2 saat boyunca 4 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonrasında petrideki sıvı bakteri kültüründen 1 ml alınarak üzerine 50 µl kloroform eklenmiş ve 12000 rpm' de 5 dk +4 °C'

de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant (P1kc) +4 °C' de saklanmıştır.

P1kc fajı elde edildikten sonra 5 ml LB broth içerisine yabancı tip *E. coli* W3110 suşundan tek koloni ekim yapılmış ve OD₆₀₀ değeri 0,3'e gelene kadar 37 °C'de 160 rpm'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1 ml hücre ependorfa alınıp santrifüjlenmiş ve daha sonra pelet final konsantrasyonu %2 glukoz çözeltisi ve 2 mM CaCl₂ içeren LB broth (yıkama tamponu) ile 2 kez yıkanmış ve son olarak pelet 1 ml yıkama tamponu ile yeniden süspansiyon edilmiştir. Ardından süspansiyon edilen yabancı tip *E. coli* W3110 üzerine izole edilen P1kc fajından 5 µl eklenerek oda sıcaklığında 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra 12000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 0,1 ml yıkama tamponu eklenmiş ve kanamisin içeren Davis minimal agar üzerine hücreler aktarılmıştır. 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün üreyen bakteriler DM agardan Km' li LB agara aktararak 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Km'li LB agarda üreyen bakteriler tekrar final konsantrasyonu 25 µg/ml Km, 25 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranoside (Xgal) ve 5mM İzopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG) içeren LB agara ekilmiş ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üreyen kolonilerden mavi renk verenler seçilmiş ve Tablo 2'de verilen primerler kullanılarak PCR doğrulaması yapılmıştır. Doğrulanmış hücreler deneylerde kullanılmak üzere %20 gliserol içeren LB broth stoklarında -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.3. Transformasyon

Final konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde kanamisin antibiyotiği içeren 2 ml LB broth besiyerine *E. coli* W3110 *cusS::km* ve *cusR::km* mutant suşlarından tek koloni ekim yapılarak 37 °C de bir gece inkübasyona bırakılmış ve transformasyon için ön kültür hazırlanmıştır. Daha sonra bu ön kültürden 9.9 ml SOB medium (20 gr/l bacto tryptone (BD), 5 g/l yeast extract, 5M NaCl 2 ml, 2M KCl 1,25 ml pH 7) üzerine 100 µl 2 M Mg⁺² ve ön kültürden 50 µl eklenerek

O.D₆₀₀ değeri 0,3'e gelene kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra büyüyen hücreler ile CaCl₂ yöntemi kullanılarak kompetant hücreler hazırlanmıştır. Hazırlanan kompetant hücreler üzerine 10-100 ng olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda gen spesifik plazmit eklenerek 45 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonlarına soğuk sıcak şoklaması yapılarak üzerlerine 0,8 ml SOC medium (2 ml SOB besiyerine 2M Mg⁺² dan 20 µl ve % 50'lik glikozdan 14,4 µl eklenir) eklenmiş ve 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler 5000 rpm 1 dk 4 °C'de santrifüj edilmiş ve pelet tekrar 100 µl SOC medium ile süspansiyon edilerek ampisilin antibiyotiği içeren LB agar üzerine yayılmıştır. Daha sonra petri bir gece 37 °C'de inkübe edilmiş ve petri üzerinde büyüyen koloniler seçilerek başka bir ampisilin antibiyotiği içeren petrilere master plate ekimi yapılarak bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Burada büyüyen hücreler ile PCR yapılarak hücrelerin gen bölgesini içerip içermediği PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Doğrulanmış hücreler deneylerde kullanılmak için %20 gliserol içeren LB broth stokları şeklinde - 80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.4. Yaşam Deneyleri

Yabani tip ve mutant suşlardan 20 ml'lik LB broth besiyerlerine ekim yapılmış ve bakteriler 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakterilerin yoğunluğu OD₆₀₀'de 1.0'e ayarlanmış ve santrifüj tüplerine 1 ml alınarak 10.000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bakteri peleti 2 kez ringer ile yıkanmış ve 1 ml ringerde süspansiyon edilmiştir. Bu bakteri süspansiyonlarından pH 7 ve 8.5 fosfat tampon içeren erlenlere başlangıç sayısı yaklaşık 10⁷ hücre olacak şekilde eklenmiş ve deneye başlanmıştır. Başlangıç saatindeki (0. Saat) bakteri sayısını belirlemek için erlenlerden 100 µl örnek alınarak 900 µl ringer solüsyonu ile 10⁴ e kadar seri dilüsyon metodu kullanılarak seyreltme işlemi yapılmış ve nutrient agar besiyerlerine bu sulandırmalardan 100 µl ekim yapılmıştır. Daha sonra hem ekim yapılan petri hemde erlenler 37

°C deki çalkalama olmaksızın inkübe edilmiştir. Petri 24 saat, erlenler ise 30 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Petri koloni oluşturan hücre sayıları elde edilmiş ve her 10 günde bir örnek alınarak aynı işlem tekrarlanmıştır. Ayrıca örnek alımı sırasında VBNC ye giren bakteri sayısını belirlemek için erlenlerden 1 ml örnek alınmış ve VBNC ye giren bakteri sayısı LIVE/DEAD bacLight kiti kullanılarak belirlenmiştir. LIVE/DEAD bacLight kiti membran bütünlüğüne sahip bakterilerin floresans mikroskop ile tespitinde kullanılmaktadır. Kit 2 farklı boya içermekte olup bu boyalar Propidium iyodid (PI) (kırmızı floresan nükleik asit boyası) ve SYTO 9 (yeşil floresan nükleik asit boyası)'dur. PI hasarlı membrana sahip olan yani ölmüş bakterileri boyarken, SYTO 9 sağlam membrana sahip olan yani canlı hücreleri boyamaktadır. PI ve SYTO 9 1-1 oranında karıştırılarak hazırlanmış ve yaşam deneyi erlenlerinden alınan örnekler bu boya karışımı ile karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bakteriyal süspansiyon polikarbonat membranlardan süzülerek membran üzerine aktarılmış ve bu membranlar görüntüleme öncesi havada kurutulmuştur. Kurutulmuş membranlar floresans mikroskopta incelenmiş ve en az 10 farklı alanın sayımı yapılarak ölü-canlı bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir.

2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen plak sayım sonuçları logaritmik değerlere dönüştürülmüş ve daha sonra bu değerler kullanılarak t₉₉ değerleri hesaplanmıştır. Yaşam deneyleri sonuçlarının istatistiksel analizi student T-Testi ile yapılmış ve p<0.05 sistemine göre önem derecesi belirlenmiştir.

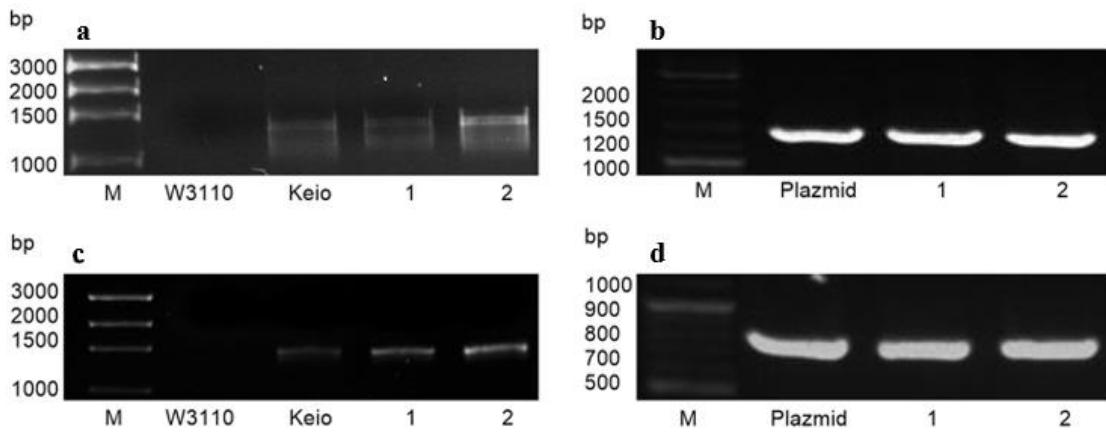
3. BULGULAR

3.1. Mutantların Doğrulanması

Çalışmada mutantlar elde edildikten sonra doğrulama için her bir genin kendisine ait olan ileri primeri ve universal k1 primeri kullanılarak PCR yapılmıştır. Elde edilen mutantların PCR

görüntüleri Şekil 1’de verilmiştir. Negatif kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak her bir genin Keio koleksiyondan alınan *E. coli* BW25113 mutantları kullanılmıştır. Şekil 1’de görüldüğü gibi *cusS::km* mutantının f-k1 primerleri ile elde edilmesi gereken bant büyüklüğü 1306 bp (Şekil 1-A), *cusR::km* mutantı için elde edilmesi gereken bant büyüklüğü 1403 bp (Şekil 1-C) olarak PCR ürünü elde edilmiştir. Tamamlama testleri için yukarıda elde ettiğimiz mutantlara keio koleksiyondan temin edilen ilgili genleri içeren plazmitler

transforme edilmiştir. Transformasyon sonrasında oluşan tamamlanmış mutant hücrelerde her bir gen için kendisine ait olan Tablo 2 de verilen ileri ve geri primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanmıştır. Elde edilen mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PCR görüntüleri Şekil 1B ve 1D’de verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlara aktarılan plazmitlerdeki *pnt3::cusS* geninin beklenen bant büyüklüğü 1489 bp (Şekil 1-B) iken *pnt3::cusR* geninin bant büyüklüğü 730 bp (Şekil 1-D) olup, bu büyüklüklerin jeldeki görüntülerde olduğu görülmektedir.



Şekil 1. Yabancı tip *E. coli* ve mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü. (a) *cusS::km*, (b) *cusS::pnt3*, (c) *cusR::km*, (d) *cusR::pnt3*

Figure 1. Gel electrophoresis image of wild-type *E. coli* and mutants. (a) *cusS::km*, (b) *cusS::pnt3*, (c) *cusR::km*, (d) *cusR::pnt3*

3.2. Yabancı tip ve Mutantların Büyüme Grafiği

Yabancı tip *E. coli* W3110 ve mutant suşlar NB besiyerlerinde 37 °C’de optimum sıcaklık değerinde ve 160 rpm de büyütülmüştür. 2 saat aralıklarla örnek alınarak OD₆₀₀ de spektrofotometrik okumalarla yabancı tip ve mutantların büyümeleri arasında bir fark olmadığı Şekil 2’de ortaya konulmuştur.

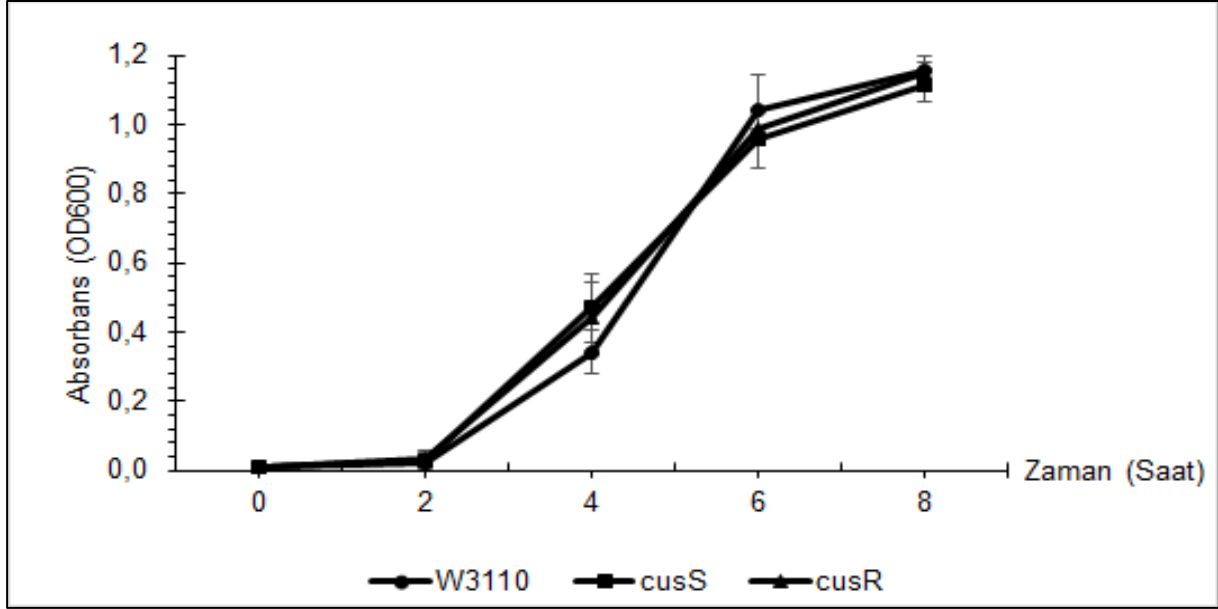
3.3. Yaşam Deneyi Sonuçları

Yaşam deneyleri pH 7 ve pH 8.5 fosfat tamponunda yapılmıştır. pH 7 de yapılan çalışmada 30 günlük inkübasyon sonucunda yabancı tip ile mutantlar arasında bir fark görülmezken pH 8.5 da ise mutantlarda logaritmik olarak bir azalma tespit edilmiştir. Dolayısı ile *cusS* ve *cusR* genlerinin alkali pH’da yaşam için

önemli oldukları görülmektedir (Şekil 3). Alkali pH’da yapılan yaşam deneylerinin plak sayımı sonucunda Şekil 4’de görüldüğü gibi *E. coli* de 6.37 logaritmadan 5.65 logaritmaya azalma görülürken, *cusS* mutant *E. coli* de 6.30 dan 4.69 logaritmaya, *cusR* mutant *E. coli* de ise 6.33 den 4.46 logaritmaya azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *cusS* ve *cusR* mutant *E. coli* hücrelerinin yabancı tipten daha kısa sürede azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra yabancı tip *E. coli* W3110, mutant suşlar ve komplement suşlara ait 2 logaritmik azalmanın tespit edildiği değerler Tablo 5’te yer almaktadır. Yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cusS/R* mutantları ile alkali pH’da yapılan çalışmanın 30. gün floresan mikroskop sayım sonuçları Şekil 5, 7 ve 9 da verilmiş olup, Şekil 6, 8 ve 10 da ise ölü ve canlı hücrelerin fotoğrafları yer almaktadır. Live Dead kiti ile

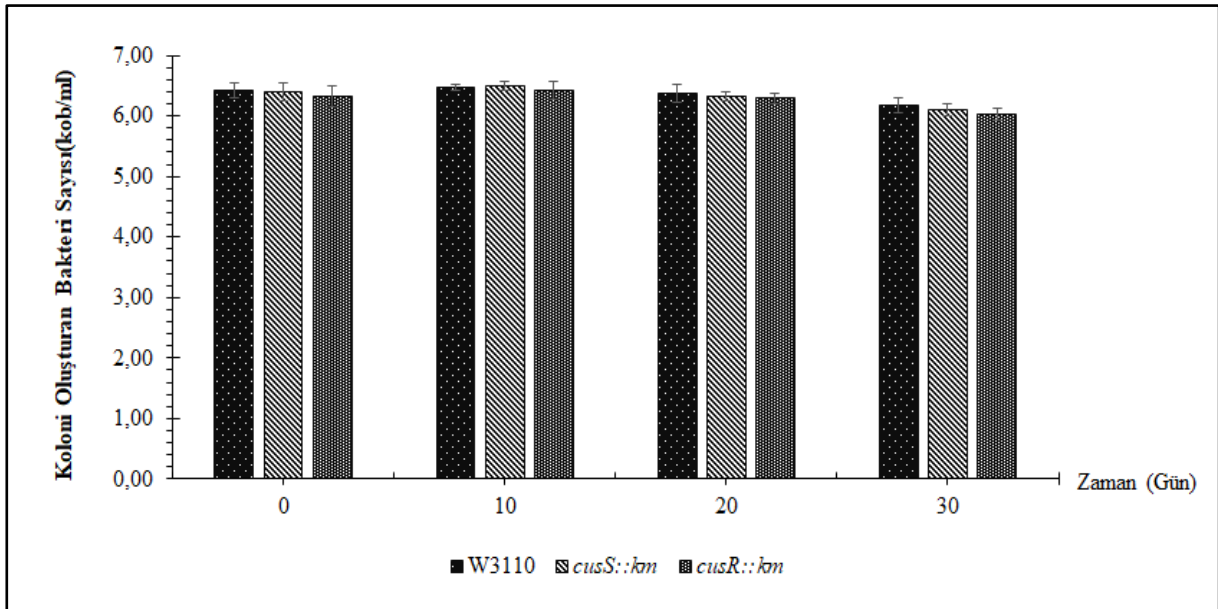
yapılan sayım sonuçlarına göre yabani tip *E. coli* 0.3 log. hücre VBNC ye girerken *cusS* mutant 1,41 log. *cusR* mutant ise 1.7 log. hücre VBNC ye girmiştir. CTC sayım sonuçlarına göre yabani tip *E. coli*'de 0.5 log. hücre VBNC ye girerken *cusS* mutant *E. coli*'de 1,5 log. *cusR* mutant *E. coli*'de ise 1.69 log. hücre VBNC ye girmiştir. Bu

sonuçlar plak sayımında meydana gelen azalmanın ölümden değil, hücrelerin VBNC ye girmesinden kaynaklandığını göstermektedir. *cusS* ve *cusR* mutantlarının yabani tipe göre daha çabuk azalmasının da bu hücrelerin VBNC forma girmesinden dolayı olduğunu göstermektedir.



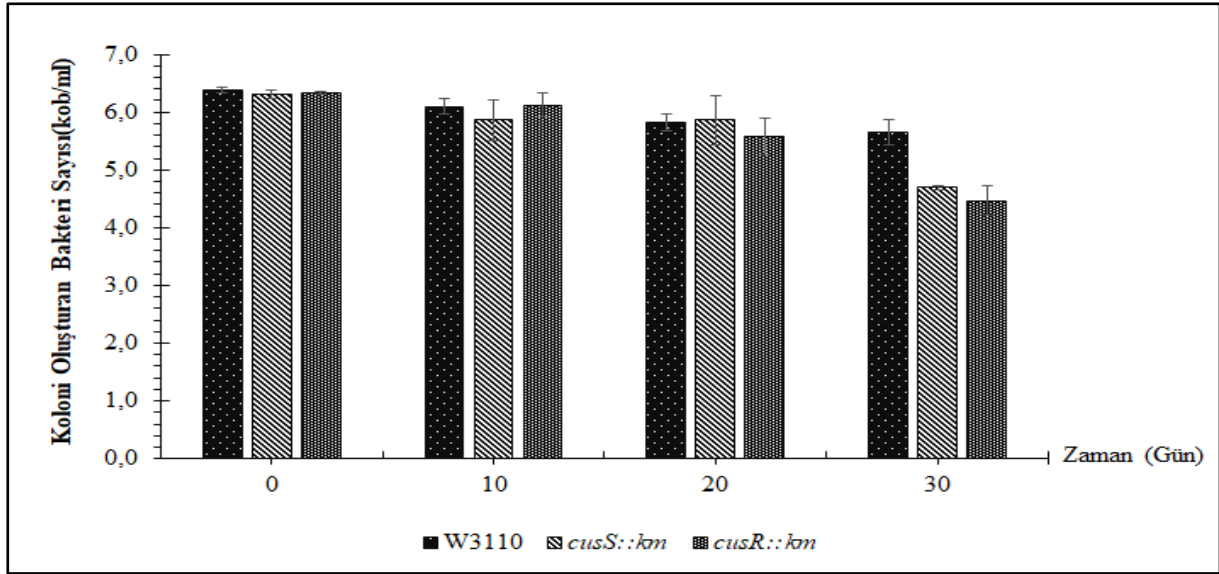
Şekil 2. Yabani tip ve mutant suşların büyüme grafiği

Figure 2. Growth plot of wild type and mutant strains



Şekil 3. Yabani tip *E. coli*, *cusS::km* ve *cusR::km* mutantlarının yaşamına nötral pH (7.0) etkisi

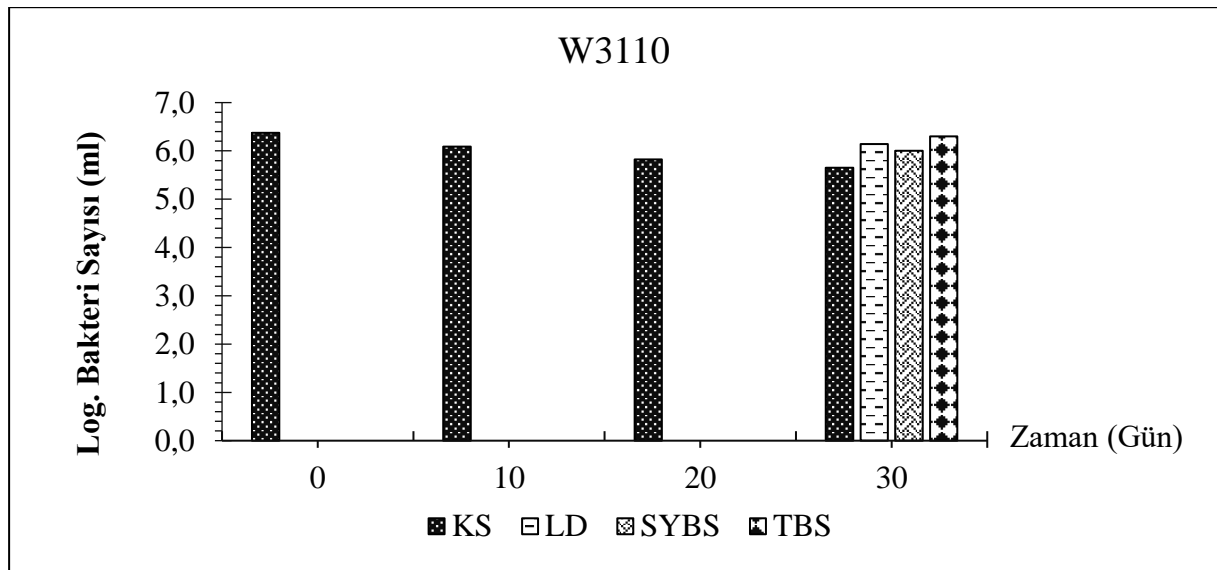
Figure 3. Effect of neutral pH (7.0) on the survival of wild-type *E. coli*, *cusS::km* and *cusR::km* mutants



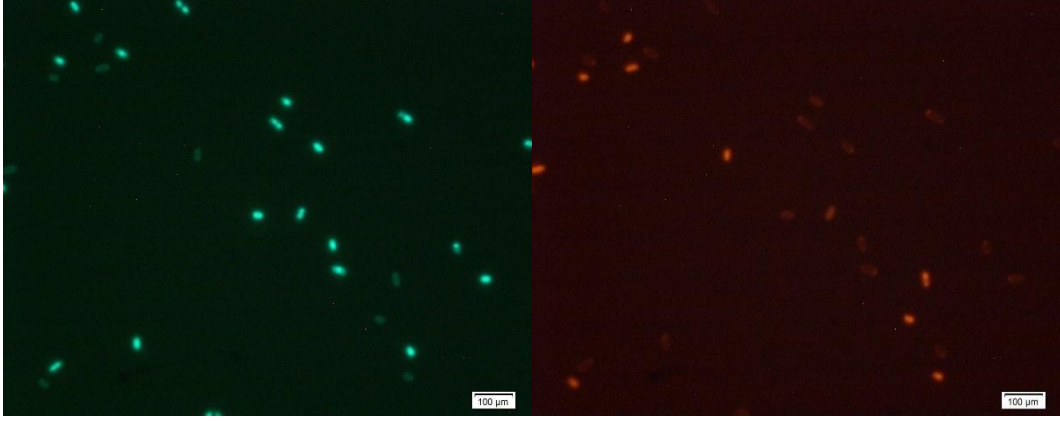
Şekil 4. Yabani tip *E. coli*, *cusS::km* ve *cusR::km* mutantlarının alkali pH (8.5) daki yaşama
 Figure 4. Effect of alkaline pH (8.5) on the survival of wild-type *E. coli*, *cusS::km* and *cusR::km* mutants

Tablo 5. Alkali pH'da yabani tip *E. coli*, *cusS::km* ve *cusR::km* mutantlarının t_{99} değerleri
 Table 5. t_{99} values of wild-type *E. coli*, *cusS::km* and *cusR::km* mutants at alkaline pH

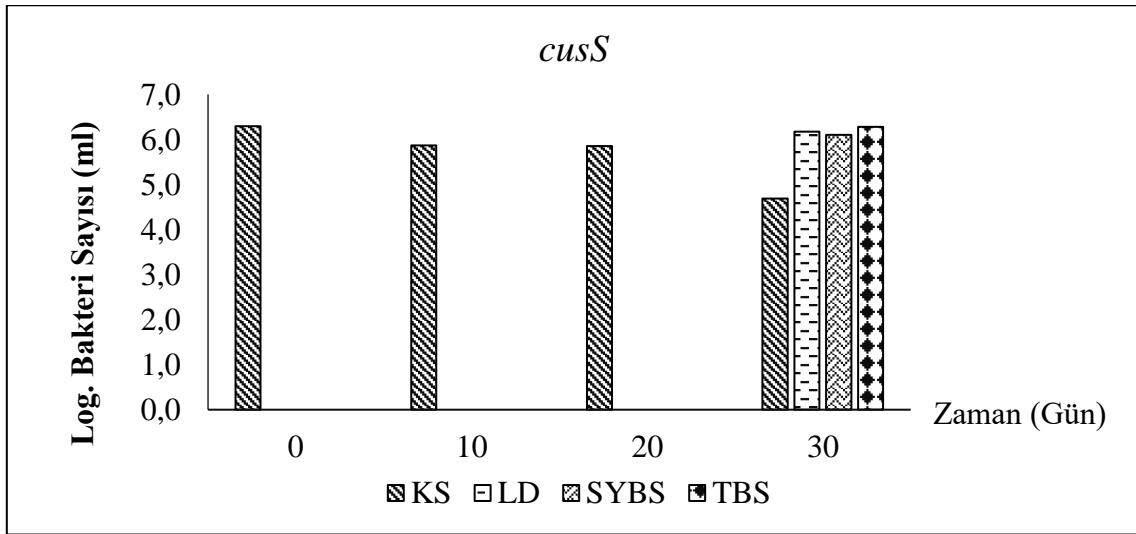
Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
pH 8.5	t_{99} (gün)	pH 8.5	t_{99} (gün)
W3110	≥ 60	W3110	≥ 60
<i>cusS::km</i>	30	<i>pnt3::cusS</i>	≥ 60
<i>cusR::km</i>	29	<i>pnt3::cusR</i>	≥ 60



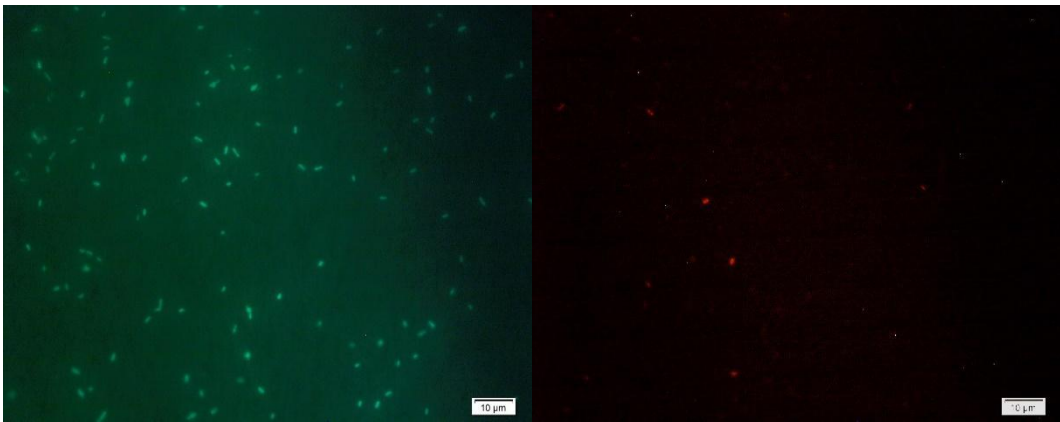
Şekil 5. Yabani tip *E. coli* nin alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)
 Figure 5. Bacterial counts of wild-type *E. coli* at alkaline pH (8.5) (KS: colony count, LD: Live Dead count, SYBS: Respiring bacteria count, TBS: Total bacteria count)



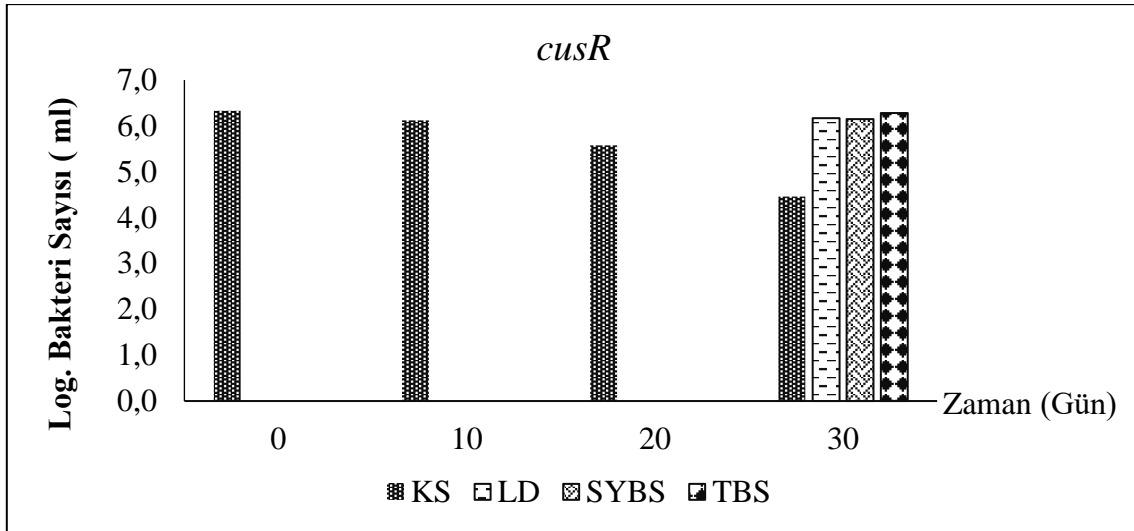
Şekil 6. Yabani tip *E. coli* de Live/Dead bakteri sayımının mikroskopik görünümü
 Figure 6. Microscopic view of Live/Dead bacterial count in wild-type *E. coli*



Şekil 7. *cusS::km* mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)
 Figure 7. Bacterial counts of the *cusS::km* mutant at alkaline pH (8.5) (KS: colony count, LD: Live Dead count, SYBS: Respiratory bacteria count, TBS: Total bacterial count)

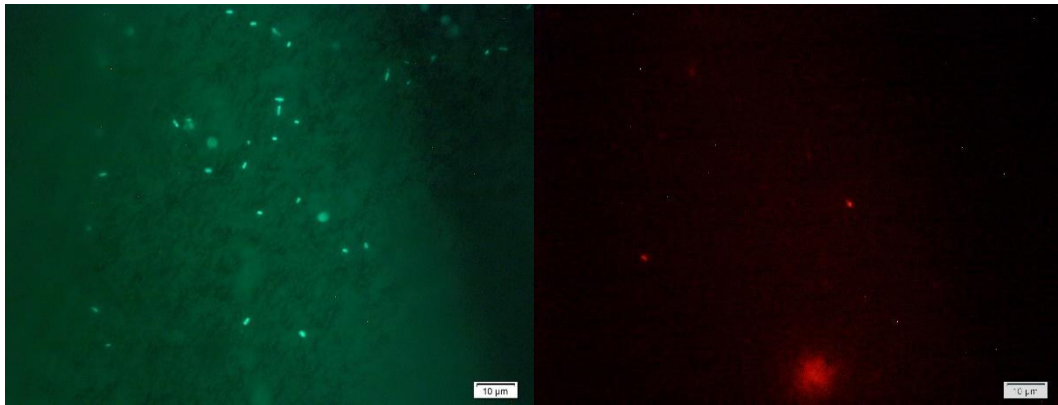


Şekil 8. *E. coli cusS::km* mutantta Live/Dead bakteri sayımının mikroskopik görünümü
 Figure 8. Microscopic view of Live/Dead bacterial count in the *E. coli cusS::km* mutant



Şekil 9. *cusR::km* mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)

Figure 9. Bacterial counts of the *cusR::km* mutant at alkaline pH (8.5) (KS: colony count, LD: Live Dead count, SYBS: Respiratory bacteria count, TBS: Total bacterial count)



Şekil 10. *E. coli cusR::km* mutantta Live/Dead bakteri sayımının mikroskopik görünümü

Figure 10. Microscopic view of Live/Dead bacterial count in the *E. coli cusR::km* mutant

4. Tartışma ve Sonuçlar

E. coli, doğal çevrelerde farklı birçok strese maruz kalmakta ve bu şartlarda VBNC forma geçerek korunmaya çalışmaktadır. Bu stres faktörlerinden birisi de pH değerindeki değişimlerdir. Literatüre bakıldığında *E. coli* ve gıda kaynaklı diğer patojenler üzerine pH etkisi ve VBNC ilişkisine dair birçok araştırma yer almaktadır. Ancak farklı pH seviyelerinde VBNC forma geçişte iki bileşik fosforlama sistemlerinin rollerine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır (Duffy vd., 2000; Gahan vd., 1996; Hijarrubia vd., 1996, Padan vd., 2004; Erdoğan ve Erbilir 2005, Vanhauteghem vd., 2013; Nowakowska ve Oliver 2013).

Aeromonas hydrophila ile yapılan bir çalışmada pH 8.1 olan deniz suyunda 5 derecede hücreler inkübe edildiğinde 50-55 günde plak sayımının sıfırlandığı ancak mikroskopik sayım sonuçlarında hücrelerin VBNC forma geçiş gösterdiği tespit edilmiştir (Maalej vd., 2004). Jiang vd. (2014) *E. faecalis* ile yaptıkları çalışmada steril distile su, pH 9 ve pH 11 sodyum tamponları olmak üzere 3 farklı ortam kullanmışlardır. Steril distile su ortamında hücreler 30 gün içerisinde VBNC duruma indüklenirken, alkali pH ortamlarında bu süre 15 gün olmuştur (Jiang vd., 2014). *S. typhimurium* ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise pH 3.5-9.0 arasındaki pH değerlerinin VBNC durum üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analizler neticesinde alkali ve aşırı asidik ortamlarda *S. typhimurium*'un VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Zhang vd., 2021). Almagro- Moreno vd. (2015) *Vibrio cholerae* da virülans regülatör proteini *toxR* mutantları ile alkali pH'da VBNC durumu araştırmışlar ve *toxR* mutant hücrelerinin 48 saat içerisinde alkali pH'da hızlı bir şekilde VBNC duruma indüklendiğini tespit etmişlerdir (Almagro- Moreno vd., 2015). Benzer şekilde Jayakumar vd. (2020), *V. cholerae* hücrelerinin VBNC duruma girişi ile alakalı olarak pH dahil birçok abiyotik faktörlerin sinerjistik etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalar, alkali ve asidik pH'da nötral pH'ya nazaran VBNC hücrelerin oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca hücrelerin VBNC duruma girmesinde düşük sıcaklıklar ve alkali pH koşulları arasında sinerjik bir etkileşim olduğunu da tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca virülans regülatör protein *toxR*'nin de VBNC durum ile ilişkisi araştırılmış ve *toxR* geninin mutasyonunun hücre de VBNC ye girişi hızlandırdığı belirlenmiştir (Jayakumar vd., 2020). Almagro- Moreno vd. (2015) elde ettiği sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. Çalışmamızda nötral pH ortamına göre alkalın pH ortamında *E. coli* W3110 daha kısa sürede kültüre edilebilirlik özelliğini kaybetmiş ve burada kültüre edilemeyen hücrelerin aslında VBNC forma geçtikleri tespit edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca *cusS* ve *cusR* mutantlarının yabani tipe göre alkali ortamda yaşamının daha fazla etkilendiği ve genlerin nakavt edilmesinin bakterinin yaşamını sınırlandırdığını göstermiştir. Ancak bu mutantların VBNC forma geçmeleri nedeni ile kültürel sayım sonuçlarında azalma gösterdikleri görülmüştür. *P. syringae* ile yapılan bir çalışmada transkriptomik analiz sonucunda 6 genin iki bileşenli fosforlama sistemleri kapsamında olduğu ve ciddi bir düzeyde artış gösterdiği ifade edilmiştir. Dolayısı ile bu organizmada VBNC oluşumunda özellikle bu genlerin önemli rolleri olduğunu ifade etmişlerdir (Postnikova vd., 2015).

E. coli'nin VBNC durumuna geçişine pH etkisini araştıran çalışmaların genelde pH 4 ile 9 arasında değiştiği görülmektedir (Solic ve Krstulavic, 1992; Rigsbee vd., 1997; Darcan 2005; Darcan vd., 2009; Afari ve Hung, 2018). Zhao ve Matthews (2000) *E. coli* 0157:H7 ile yaptığı çalışmada pH'nın VBNC durum üzerine etkilerini araştırmıştır. Yapılan araştırma sonucunda *E. coli* 0157:H7 pH 4'e ayarlanmış fosfat tamponunda pH 7 ye göre kültürebilitesini daha hızlı kaybetmiş ve dolayısı ile daha fazla VBNC forma geçtiği belirlenmiştir. (Zhao vd., 1993; Leyer vd., 1995). pH seviyesi alkali değerlere doğru gittikçe *E. coli* hücrelerinde hassaslığın arttığı tespit edilmiştir (Joux vd., 1997). Joux vd gibi bazı bilim insanları da yapmış oldukları çalışmaların da deniz suyu pH'sının *E. coli* üzerine zararlı etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Darcan (2005) pH değeri 8.1-8.4 olan Karadeniz suyu ile ve pH'sını asidik ve nötral pH a ayarladığı deniz suyu karşılaştırdığı çalışmasında *E. coli* hücrelerinin asidik deniz suyu ve nötral deniz suyuna nazaran alkali deniz suyunda daha fazla etkilendiğini tespit etmiştir. Yine bu çalışmanın bir parçası olarak pH stresi varlığında yabani tip *E. coli* ve EnvZ-ompR iki bileşikli sisteminin mutantları ile yaşam deneyleri gerçekleştirmiş ve hücrelerin VBNC durum ile ilişkisi araştırmıştır. Yaptığı çalışma neticesinde *envZ* nin oldukça önemli bir rolü olduğunu tespit etmiştir. EnvZ bir sensör olarak dış ortamda meydana gelen osmotik değişimleri algılayarak regülatör proteine aktarır ve böylece hücrenin osmotik değişime karşı kendisini çeşitli genleri regüle ederek korumaya almasını sağlamaktadır. Bu sensör nakavt olduğunda *E. coli*'nin VBNC forma geçemediği tespit edilmiştir. Literatürde EnvZ dışında bazı proteinlerinde VBNC forma geçişle alakalı sonuçları yer almaktadır. Ancak bilinen bu proteinlerin hiçbiri VBNC'nin moleküler mekanizmasını tam olarak aydınlatamamaktadır.

Çalışmamızda *cusS-cusR* mutantları elde edilmiş, bu mutantların yabani tipe göre büyümesinde bir değişim olup olmadığı tespit

edilmiştir. Her iki genin nakavt edilmesinin bakterinin büyümesinde bir değişim meydana getirmediği belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda *cusS* ve *cusR* mutantlarının büyümesinde çalışmamızda olduğu gibi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (Larsen, 2011; Gudipaty ve Larsen 2012). Ancak *cusS-cusR* genlerinin nakavt edilmesi zengin besiyerinde büyümede bir farklılık oluşturmazken pH 8.5 fosfat tamponunda yabani tip *E. coli* ye göre hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. Yaşam deneyi sonuçlarına göre *E. coli* W3110 0.72 logaritmik azalma gösterirken *cusS* mutant 1.61 logaritmik, *cusR* mutant ise 1.87 logaritmik azalma göstermiştir. Elde edilen bu sonuçların doğruluğu komplementasyon testleri ile doğrulanmıştır. Dolayısı ile bu genlerin fosfat tamponunda alkali pH'da yaşam için önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir. Ancak VBNC ye girişte bir rolleri olmadığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda *E. coli* W3110 'nun alkali ortamda yaşamı için *cusS-R* genlerinin oldukça önemli olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca bu genlerin yaşam için önemli olmasının yanında alkali ortamdaki sayısal azalmanın VBNC forma geçişten kaynaklandığı ve bu forma geçişte *cusS-R* genlerinin rolünün olmadığı ortaya konulmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın bir kısmı 113T003 nolu TÜBİTAK projesi ile, bir kısmı ise 2018-02.BŞEÜ.25-01 numaralı Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi BAP projesi ile desteklenmiştir. Bu destek için hem TÜBİTAK hem de Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abe, A., Ohashi, E., Ren, H., Hayashi, T., Endo, H. (2007). Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*, *Microbiological Research*, 162, 130–138.
- Afari, G. K., Hung, Y. C. (2018). Detection and verification of the viable but nonculturable (VBNC) state of *Escherichia coli* O157:H7 and

Listeria monocytogenes using flow cytometry and standard plating, *Journal of Food Science*, 83, 1913–1920.

- Almagro-Moreno, S., Kim, T. K., Skorupski, K., Taylor, R. K. (2015). Proteolysis of virulence regulator ToxR is associated with entry of *Vibrio cholerae* into a dormant state, *PLOS Genetics*, 11, 1005145.
- Asakura, H., Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S., Makino, S.-I. (2007). Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but non-culturable state, *Microbiology and Immunology*, 51, 875. doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03969.x.
- Ayrapetyan, M., Williams, T., Oliver, J.D. (2018). Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells, *Journal of Bacteriology*, 200 (20), 00249-18.
- Barcina, I., Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria?, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8, 245–255.
- Boaretti, M., del Mar Lleo, M., Bonato, B., Signoreto, C., Canepari, P. (2003). Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state, *Environmental Microbiology*, 5, 986–996.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, E. G., Kis, A. E., Laczi, K., Bende, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19, 1–22. doi: 10.1007/s11157-020-09522-4.
- Darcan, C. (2005). Karadeniz suyunda pH, osmolarite ve açlık stresinin *E. coli*'nin dış membran porin protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması, Doktora tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Türkiye.
- Darcan, C. (2012) Expression of OmpC and OmpF porin proteins and survival of *Escherichia coli* under photooxidative stress in Black Sea water, *Aquatic Biology*, 17 (2), 97-105.
- Darcan, C., Aydın E. (2012) Fur-mutation increases the survival time of *Escherichia coli* under photooxidative stress in aquatic environments, *Acta Biologica Hungarica*, 63 (3), 399-409.
- Darcan, C., Özkanca R., İdil Ö., Flint K.P. (2009). 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*, 58, 307–17.
- Darcan, C., Özkanca, R., İdil Ö., Flint K.P. (2003). Survival of nonspecific porin-deficient mutants

- of *Escherichia coli* in black sea water, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 380-385.
- Dong, K., Pan, H. X., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y. T., Liao, X. J. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, F 19, 149–183.
- Duffy, G., Riordan, D.C.R., Sheridan, J.J., Call, J.E., Whiting, R.C., Blair, I.S., McDonald, D.A. (2000). Effect of pH on survival, thermotolerance, and verotoxin production of *Escherichia coli* 0157:H7 during simulated fermentation and storage, *Journal of Food Protection*, 63, 12-18.
- Erdoğan, O., F. Erbilir. (2005). Resistance of *Escherichia coli* to acid and alkali pH, *Annals of Microbiology*, 55, 91–95.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., Nies D. H. (2003). Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 3804–3812.
- Gahan, C.G.M., O'Driscoll, B., Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods during milk fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3 128-3 132.
- Gangaiah, D., Kassem, I. I., Liu, Z., Rajashekara, G. (2009). Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7838–7849.
- Grass, G., Rensing, C. (2001). CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 902–908.
- Gudipaty, A. S., Larsen, A., S., Rensing, C., Mcevoy, M.M. (2012). Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS, Published in final edited form as, *FEMS Microbiol Letters*, 330 (1), 30–37.
- Hijarrubia, M.J., Lazaro, B., Sunen, E., Fernandez-Astorga, A. (1996). Survival of *Vibrio vulnificus* under pH, salinity and temperature combined stress, *Food Microbiology*, 13, 193-199.
- Jayakumar J, Balasubramanian D, Reddi G, Almagro-Moreno S. (2020). Synergistic Role of Abiotic Factors Driving Viable but Non-culturable *Vibrio cholerae*, *Environmental Microbiology Reports*, 12(4), 454–65.
- Jiang, Y., Yan, P., Liang, J. (2014). Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state, *Genetics and Molecular Research*, 14, 14790–14801. doi: 10.4238/2015.November.18.44.
- Joux, F., Lebaron, P., Troussellier, M. (1997). Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms, *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 65-76.
- Kong, I. S., Bates, T. C., Hülsmann, A., Hassan, H., Smith, B. E., Oliver, J. D. (2004). Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*, *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 133–142.
- Kumar, S.S., Ghosh, A.R. (2019). Assessment of Bacterial Viability: A Comprehensive Review on Recent Advances and Challenges, *Microbiology (U.K.)*, 165, 593–610.
- Kusumoto, A., Asakura, H., Kawamoto, K. (2012). General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*, *Microbiology and Immunology*, 56, 228–237. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00428.x>.
- Larsen A. (2011). Growth Studies of The Copper Sensing Histidine Kinase, CusS. (Thesis), *University of Arizona*.
- Leyer, G.J., Wang, L.L., Johnson, E.A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* 0157:H7 increases survival in acidic foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3752-3755.
- Li H, Xu Z, Zhao F, Wang Y, Liao X. (2016). Synergetic effects of high-pressure carbon dioxide and nisin on the inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 180-186.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver J.D., Faucher, S.P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 5, 258.
- Lleo` Reissbrodt, R., Heier, H., Tschape, H. (2000). Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar typhimurium from soil and water microcosms, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4128–30.
- Lloyd, D., and Hayes, A.J. (1995) Vigour, vitality and viability of microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 133: 1–7.
- Maalej S, Gdoura R, Dukan S, Hammami A, Bouain A. (2004). Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature,

- Journal of Applied Microbiology*, 97, 557–65. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02336.x.
- Miller, J. H. (1992). Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W., O'Halloran, T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, 182, 5864–5871.
- Noor, R., Murata, M., Yamada, M. (2009). Oxidative stress as a trigger for growth phase-specific σ E-dependent cell lysis in *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17, 177–187.
- Nowakowska, J., Oliver, J. D. (2013). Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state, *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 213–222. doi: 10.1111/1574-6941.12052.
- Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria, *Journal of Microbiology*, 43, 93–100.
- Oliver, J.D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 415–425.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., Lopez, M.M., Biosca, E.G., (2006) Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state, *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3482–3488.
- Ou, A., Wang, K., Mao, Y., Yuan, L., Ye., Chen L., Zou Y., Huang, T. (2021). First Report on the Rapid Detection and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Viable but Non-culturable (VBNC) Under Food Storage Conditions, *Frontiers in Microbiology*, 11, 615875. doi: 10.3389/fmicb.2020.615875.
- Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V. (2001). The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (33), 30670–30677.
- Padan, E., Tzuberly, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A., Galili, L. (2004). NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺-antiporter, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658, 2–13.
- Petersen, C., Moller, L. B. (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P- type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator CopR, *Gene*, 261, 289–298.
- Pinto, D., Santos, M. A., Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms, *Critical Reviews in Microbiology*, 41, 61–76.
- Postnikova O.A., Shao., Mock N.M., Baker C.J., Nemchinov L.G. (2015). Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Frontiers in Microbiology*, 6,1419.
- Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A. (1994). Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3573–8.
- Rensing, C., Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment, *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 197–213.
- Rigsbee, W., Simpson, L.M., Oltver, J.D. (1997). Detection of the viable but nonculturable state in *Escherichia coli* 0157:H7, *Journal of Food Safety*, 16, 225–262.
- Signoretto, C., Lleo, M.D., Tafi, M.C., Canepari, P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1953–9.
- Solic, M., N. Krstulovic. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater, *Marine Pollution Bulletin*, 24, 411–416.
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., Brown, N.L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA, *Molecular Microbiology*, 39, 502–511.
- Takeda, Y. (2011). *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, *Proceedings of the Japan Academy Series B*, 87, 1–12.
- Vanhautehem, D., Janssens, G. P., Lauwaerts, A., Sys, S., Boyen, F., Cox, E. (2013). Exposure to the proton scavenger glycine under alkaline conditions induces *Escherichia coli* viability loss, *PLoS One*, 8, 60328. doi: 10.1371/journal.pone.0060328.
- Wang, H.W., Chung, C.H., Ma, T.Y., Wong, H.C. (2013). Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3734–3743.
- Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, DJ. Grimes, and RR. Colwell. (1982). Survival

- and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment, *Microbial Ecolog*, 8, 313-323.
- Yoon, J.H., Lee, S.Y. (2020). Characteristics of viablebut- nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* induced by nutrient deficiency at cold temperature, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1570076>.
- Zhang X. H., Ahmad W., Zhu X.Y., Chen J., Austin B. (2020). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms, *Marine Life Science & Technology*, 3, 189-203.
- Zhang, L., Jiang, L., Nie, X., Liao, H. (2021). Factors affecting the occurrence of viable but non-culturable state in *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* during therosonication and prevent it with sodium pyruvate, *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 2244–2254.
- Zhao, L., Matthews, K.R. (2000). Influence of starvation, temperature, and pH on culturability of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Food Safety*, 20, 193-2.
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.W., Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 8, 580.
- Zhao, F., Wang, Y., An, H., Hao, Y., Hu, X., Liao, X. (2016). New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 induced by high-pressure CO₂, *mBio*, 7, 00961– 00916.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Besser, R.E. (1993). Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2526-2530.