

Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Bakteriler ve Gıda Güvenliği Yönünden Önemi

Viable But Non Culturable Bacteria and Their Importance For Food Safety

N. Deniz AYAZ* İrfan EROL**

ÖZET

Bakteriler, uygun olmayan koşullarla karşılaşınca kendilerine özgü bir uyum mekanizması geliştirirler. Bu koşullarda bakteriler genellikle katı besi yerinde koloni oluşturma yeteneğini kaybederler fakat canlılıklarını korurlar. Bu duruma mikroorganizmalar için, canlı fakat kültürü yapılamayan (*Viable But Non Culturable, VBNC*) hal denir. Soğuğa maruz kalmak ve besin maddelerinin yokluğu bakterilerin VBNC hale girmelerine neden olan temel faktörlerdir. Çubuk formundaki Gram negatif bir bakteri VBNC hale girdiğinde kok veya kısa çubuk şekline dönüşmekte ve boyutu küçülmektedir. Bazı araştırmacılara göre VBNC hale geçmiş olan bakteriler uygun koşullarla karşılaşınca tekrar kültürü yapılabilir hale geçmektedirler ve bu durum *resuscitation* olarak adlandırılmaktadır. VBNC bakteriler arasında gıda güvenliği ve halk sağlığı yönünden önemli olan *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio cholerae* ve *Legionella pneumophila* gibi patojen bakteriler yer almaktadır. Son yıllarda VBNC bakteriler ile ilgili yapılan çalışmalar etkili, pratik ve duyarlılığı yüksek saptama metotlarının geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmış ve bunların neticesinde PCR, DVC (*Direct Viable Count*) gibi moleküler tekniklerin güvenilir metotlar oldukları vurgulanmıştır.

SUMMARY

*Abstract : When bacteria are exposed to conditions that are not suitable for growing, they present an adaptation strategy. The bacteria in such unsuitable conditions generally lose their growing abilities in culture media but they are still living. This is called, "viable but non culturable" (VBNC) state for microorganisms. Cold and low nutrient conditions, are the main factors for the bacteria to enter the VBNC state. When rod shaped Gram negative bacteria enter the VBNC state, they acquire a coccid or very short rod morphology and reduced in size. For some investigators, when VBNC state bacteria are exposed to suitable conditions for growing, they become culturable again, this is called "resuscitation". Inside the VBNC some foodborne pathogens such as *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio cholerae* and *Legionella**

Kabul Tarihi: 28.01.2005

* Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale

** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara

pneumophila are playing significant role in food safety and public health. In recent years, studies with VBNC state bacteria focused on for developing effective, practical and sensitive detection methods. So that some molecular technics such as PCR and DVC (Direct Viable Count) are mentioned as reliable methods.

GİRİŞ

Bakteriler, uygun olmayan koşullarla karşılaşınca kendilerine özgü bir uyum mekanizması geliştirirler (62). Bu koşullarda bakteriler genellikle katı besi yerinde koloni oluşturma yeteneğini kaybederler fakat canlılıklarını korurlar. Bu duruma mikroorganizmalar için, canlı fakat kültürü yapılamayan (Viable But Nonculturable ,VBNC) hal denir (75).

Soğuğa maruz kalmak ve besin maddelerinin yokluğu (42) bakterilerin VBNC hale girmelerine neden olan temel faktörlerdir. VBNC hale giren hücreler çevresel koşullara daha dayanıklı olmaktadır (51). VBNC halde bulunan ve insanlar için patojen olan birçok bakteri tespit edilmiştir. Bunlar arasında; *Campylobacter jejuni* (20), *Escherichia coli* (75) *Salmonella* Enteritidis (63), *Vibrio cholerae* (15) ve *Legionella pneumophila* (25) yer almaktadır. Gıda ve sulara ilişkin bu bakterilerin VBNC forma geçerken temel virülens faktörlerini ve yeniden üreyebilme özelliklerini koruyarak gıda güvenliği ve halk sağlığı yönünden ciddi tehlike oluşturabileceği bildirilmektedir.

Bu derlemede, halen tartışmalı bir konu olan VBNC'nin tanımı, morfolojik, metabolik, patojenik ve genetik özellikleri ile VBNC hale geçen bazı önemli patojen bakteriler ile bunların gıda güvenliği ve halk sağlığı yönünden önemleri ve VBNC bakterileri saptama teknikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Kültürü Yapılamayan Canlı Bakterilerin (VBNC) Tanımı

Terminolojide VBNC tanımı, kültür metotlarıyla tekrar elde edilemeyen fakat canlı olan ve hücresel aktivitelerini devam ettiren bakteriler için kullanılmaktadır (50, 62). Üç tip canlı fakat kültürü yapılamayan bakteriden söz etmek mümkündür. Birinci tip kültürü yapılamayan bakteriler, normal laboratuvar koşullarında kültürü yapılabilen fakat ısı, tuz, radyasyon, gibi çeşitli stres faktörleri etkisinde kültürü yapılamayan hale geçen bakterilerdir. Bu bakteriler kültürü yapılamadığı halde metabolik aktivite göstermektedirler. Bunlara VBNC (Viable But Nonculturable) veya aktif fakat kültürü yapılamayan (Active But Nonculturable, ABNC) bakteriler denilmektedir (75). İkinci tip kültürü yapılamayan bakteriler ise agarda veya buyyonda üreme kabiliyeti çok düşük olan bakterilerdir. Bunlar oligobakteriler (*Cycloclasticus oligotrophus*, *Marinobacter arcticus*) olup izole edilmeleri haftalar hatta aylar alabilmektedir (6, 11). Üçüncü tip kültürü yapılamayan bakteriler ise bilinen kültür koşullarında çoğalamayan ve bilinmeyen üreme koşulları olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Bunların çoğu simbiyotik bakteriler (*Vibrio shiloi*, *V. coralyticus*) olup identifikasyonları da ancak klonlama teknikleriyle mümkün olmaktadır (33).

VBNC Hipotezine Alternatif Görüşler

Mikroorganizmaların VBNC halinin fizyolojik bir hal olduğunu savunan mikrobiyologlara (17, 19, 36, 50) karşın, Bogosian ve ark. (1998) VBNC olarak tanımlanan mikroorganizmaların aslında ölü olduklarını, Kell ve ark. (1998) bu mikroorganizmaların üremeleri için gerekli koşulların bilinmemesinden dolayı kültürlerinin yapılamadığını, Bloomfield ve ark. (1998) VBNC mikroorganizmaların kendilerini öldürdüklerini, Ray (1989) Liu (2000) ve Mackey (2000) ise bu mikroorganizmaların mikrobiyal sistemlerinin hasara uğramış, yaralı veya fonksiyonlarının baskılanmış olabileceğini, Mizunoe ve ark. (2000) bakterilerin ancak üremelerini desteklemeyen besi yerlerinde üreyemeyeceklerini ve bazı mikrobiyologlar da (32) VBNC halin doğal koşullarda oluşmadığını, laboratuvar koşullarında oluşturulduğunu yani bu halin fizyolojik bir hal olmadığını savunmuşlardır.

VBNC Bakterilerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Genel bir yaklaşım olarak VBNC, bakteriler için fizyolojik bir hal olarak değerlendirilmekte ve çoğu Gram negatif bakterinin uygun olmayan koşullara maruz kaldığında bu hale geçtiği bildirilmektedir (22). Bu form hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteriler için söz konusu olabilmektedir (17,50, 61).

1. VBNC Formdaki Bakterilerin Morfolojileri

Çubuk formundaki Gram negatif bir bakteri VBNC hale girdiğinde kok veya kısa çubuk şekline dönüşmekte ve boyutu küçülmektedir (27). Gram negatif bazı patojenler ile ya-

pılan çalışmalarda, *Vibrio* spp. (15), *Escherichia* spp. (75), *Salmonella* spp. (63), *Aeromonas* spp. (2), *Legionella* spp. (25), *Campylobacter* spp. (61) ve *Shigella* spp.'nin (26) VBNC haldeyken orijinal çubukcuğu veya spiral formlarının, küçük küresel forma dönüştüğü gözlenmiştir.

Signoretto ve ark. (2000) yapmış olduğu çalışmada VBNC haldeki logaritmik üreme ve durgunluk fazındaki *Enterococcus faecalis* 56R hücrelerinin mekaniksel dirençliliklerini karşılaştırmıştır. Sonuçta VBNC haldeki *E. faecalis* 56R hücrelerin, logaritmik üreme ve durgunluk fazındaki hücrelerden iki kat daha dayanıklı oldukları gözlemlenmiştir.

VBNC formdaki hücrelerin peptidoglikan yapısında normal olmayan biyokimyasal bir kompozisyon gözlenmiştir. Çapraz bağlı muropeptidlerde logaritmik üreme ve durgunluk fazdakilere kıyasla trimerlerde %24, tetramerlerde %37, pentamerlerde %65 ve en fazla da yaklaşık iki katı kadar (%95) oligomerlerde artış olduğu gözlenmiştir. Bu çapraz bağlı peptidoglikanlardaki artış, dimerlerde ve monomerlerde de azalışa neden olmuştur (21).

2. VBNC Formdaki Bakterilerin Metabolik Aktivitesi

Bazı mikroorganizmalar spor oluşturarak hayatta kalırken, spor oluşturamayan bazı mikroorganizmaların VBNC hale geçip düşük bir aktivite göstererek vejetatif halde canlılıklarını uzun süre korudukları bildirilmektedir (19).

V. cholerae'nin VBNC hale girdiğindeki metabolik aktivitesi substrat deneyleriyle araştırılmıştır. Sonuçta substratın eldesi VBNC hale giren bakterilerde azalmakta fakat durmaktadır. Bu da kültürü yapılabilişliğin kay-

bolduğunda mikroorganizmaların canlılığının, substrat eldesinin ve metabolik aktivitelerinin azaldığını fakat tamamen ortadan kalkmadığını göstermektedir (14).

VBNC haldeki bakteriler, uygun olmayan koşullarda canlılıklarını koruyabilmek adına ihtiyaçları olan enerjiyi sağlamak için alternatif bir metabolik aktivite göstermektedirler. Bu tarz aktivasyon fruktoz-bifosfat aldoz enzimi ile açıklanabilmektedir. Bu enzim, bakterilerin düşük azotlu ortamlarda üremesi halinde aktif hale geçmektedir. Fruktoz-bifosfat aldoz enzimi; glikoliz, glikoneogenezis, pentoz, fosfat, fruktoz, mannoz metabolizması ve karbon fikzasyonu gibi karbonhidrat metabolizmalarında öneme sahiptir (24).

3. VBNC Bakterilerin Yeniden Üreyebilme Özelliğine Kavuşması (Resuscitation)

VBNC halden tekrar kültürü yapılabilir hale dönüş konusunda birçok çalışma yapılmış olup (15,29,63) bu konuda iki farklı görüş bulunmaktadır. Bir görüşe göre, bakteri popülasyonunda az sayıda VBNC hale geçmemiş hücrenin tekrar üremesiyle popülasyondaki kültürü yapılabilir hücre sayısı artmakta (regrowth), diğer bir görüşe göre VBNC hale geçmiş olan bakteriler tekrar kültürü yapılabilir hale (resuscitation) geçmektedirler. Bütün bu yaklaşımlara karşın Oliver ve ark. (1995) yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, VBNC hale geçen bakterilerin tekrar kültürü yapılabilir hale geçtiklerini ortaya koymuşlardır.

4. VBNC Formdaki Bakterilerin Patojenitesi

Patojen mikroorganizmaların VBNC haldeyken infektivitelerini koruyup koruyamadıkları tam olarak açığa kavuşturulamamıştır.

Dolayısıyla bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar karşıt görüşleri yansıtmaktadır. Jones ve ark. (1991) yapmış oldukları bir çalışmada VBNC formdaki *Campylobacter jejuni*'nin infektivitesini koruduğunu belirtmişlerdir. Colwell ve ark. (1996) *Vibrio cholera* ile, Oliver ve Bockian (1995) *Vibrio vulnificus* ile yaptıkları çalışmalarda, bu bakterilerin infektivitelerinin VBNC hale girdikten sonra kısa bir süre daha devam ettiğini bildirmişlerdir.

Çeşitli patojen bakterilerle yaptığı çalışma neticesinde Magarinos ve ark. (1994), *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia ruckeri* ve *Pasteurella piscicida*'nın patojenitelerini koruduklarını buna karşın *Vibrio vulnificus* ve *Aeromonas salmonicida*'nın patojenitesini kaybettiği görüşünü savunmaktadır.

5. VBNC Formdaki Bakterilerin Genetik Özellikleri

Hücrelerin VBNC hale geçmelerinde hangi genetik faktörlerin etkili olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan bir çalışmada, *algU* ve kısmen *gacA* genlerinin *Pseudomonas fluorescens* CHAO-Rif'in dirençli olmasını önemli ölçüde sağladığı ve *algU* ve *gacA* genlerine sahip VBNC haldeki mikroorganizmaların fizyolojik olarak çevresel stres faktörlerine adaptasyon gösterdiği ortaya konmuştur (44).

Anaerobik metabolizma geni olan *anr*'nin oksijenin az olduğu ortamlara mikroorganizmaların adaptasyonunu sağladığı bildirilmektedir. Zimmermann ve ark. (1991) ile Mascher ve ark. (2003) *anr* geninin *P. fluorescens* CHAO-Rif'in oksijenin az olduğu

ortamlarda VBNC hale geçmesinde önem taşıdığını öne sürmüşlerdir.

RpoS (KatF), bakterilerin durgunluk fazına geçmesini ve çoklu stres faktörlerine direncini sağlayan bir gendir. Aerobik hücre üremesinde ve düşük ozmolaritede, *RpoS*'in kaybedilmesiyle durgunluk fazındaki hücrelerin kültürünün yapılabilmesinde çok ciddi şekilde düşmeler görülmüştür. *RpoS* varlığında *E. coli* ve *S. Typhimurium*'un hem logaritmik üreme hem de durgunluk fazında deniz suyuna direnç göstererek aerobik olarak üredikleri ve kültürlerinin yapılabilirdikleri bildirilmiştir. Bunun sebebi *RpoS*'in direnç mekanizması olarak açıklanmaktadır (48).

VBNC Hale Geçen Bakteriler

Bakterilerin VBNC hale girmelerinde sıcaklık, pH, O₂, besin maddeleri, bakterinin fizyolojik durumu, rutubet (22) ayrıca deniz suyu gibi yüksek tuz konsantrasyonu ve güneş ışınları gibi faktörlerin de önem taşıdığı bildirilmiştir (62). Bu etkenlere ek olarak yüksek miktarda bakırın, aerob bakteriler üzerine toksik etkili olduğu öne sürülmektedir (49). Bakır dışında spesifik bir kimyasal maddenin bakterilerin VBNC formuna geçmesine neden olduğuna ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır (1).

1. *Salmonella* spp.

Enterik bakteriler için deniz suyu; düşük sıcaklık, yüksek ozmotik basınç ve güneş ışığına bağlı oksidasyon çok etkili fizikokimyasal stres faktörleridir (3). Deniz suyunda, bu stres faktörlerine maruz kalan *S. Typhimurium*'un VBNC forma geçtiği bildirilmiştir (50). Antartika'da 54 gün soğuğa maruz kalmış *Salmonella* suşlarının hiç birinin

kültürü yapılamazken bakteriyel solunumun %90 olduğu, dolayısıyla bu bakterilerin VBNC formda fizyolojilerini korudukları bildirilmiştir (68).

2. *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae Tip1'in sıcaklığa, besin maddelerine, tuz konsantrasyonuna, oksijene ve hijyenik koşullara bağlı olarak VBNC hale geçtiği bildirilmiştir (26,57). Rahman ve ark. (1996) yapmış oldukları çalışmada, *S. dysenteriae*'nin 30°C'de inkübasyona bırakılmasıyla VBNC forma geçtiğini, sıcaklığın tekrar 37°C'ye getirilmesiyle de bakterinin yeniden invazyon yapabildiğini saptamışlardır.

3. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes'in de içinde bulunduğu Gram pozitif bakterilerin VBNC hale geçip geçmemelerine ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır. Besnard ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada, *L. monocytogenes*'in, CO₂ ve soğuk kombinasyonu ile strese sokulduğunda VBNC forma geçtiği gözlenmiştir. Buna karşın Li ve ark. (2003) 4°C'de CO₂'li ortamda 1 haftalık bir inkübasyondan sonra *L. monocytogenes*'in VBNC hale geçmediğini bakterilerin bir kısmının kültürü yapılabilirken bir kısmının öldüğünü ortaya koymuşlardır.

4. *Campylobacter jejuni*

C. jejuni, VBNC formu halen tartışma konusu olan patojen bir bakteridir. Madema ve ark. (1992) yapmış oldukları çalışmada, 36 *C. jejuni* suşundan sadece 3'ünün (79, 85, Bf) VBNC forma geçtiğini bildirmişlerdir. Bu bakterilerin suda 4°C'de yaklaşık 15 günlük bir inkübasyonda VBNC forma geçtikleri, aynı koşullarda 25°C'de 3 günlük bir inkübasyonda

kültürü yapılabilmek özelliğini kaybettikleri bildirilmiştir. Tholozan ve ark. (1999) elektron mikroskopla yaptıkları bir çalışmada, *C. jejuni* 85 suşunun VBNC formunun kültürü yapılabilen formdan daha kısa ve ince olduğunu saptamışlardır.

5. *Yersinia enterocolitica*

Klor ve bakır stresi altında bulunan *Y. enterocolitica*'nın VBNC hale geçerek HeLa hücrelerine invaze olma kabiliyetini kaybetmesine rağmen, infektivitelerini korudukları fare modeliyle görülmüştür (67).

6. *Escherichia coli*

VBNC hal birçok Gram negatif bakteri için bildirilmekte olup, bunlar arasında *Escherichia coli* O157:H7'de bulunmaktadır (74). *E. coli* 'lerin %35 oranındaki tuzlu ortamda, 15°C'de 21 günde VBNC hale geçtikleri bildirilmiştir (12).

Pommepuy ve ark. (1996), *E. coli*'nin deniz suyunda güneş ışığına maruz kaldığında VBNC hale geçtiğini, ışığı görmeyen kontrol kaplarındaki *E. coli*'lerin ise tamamen kültürü yapılabılır halde olduklarını saptamışlardır.

7. *Vibrio spp.*

Ramaiah ve ark. (2002) yapmış oldukları bir çalışmada, *Vibrio harvei* ve *Vibrio fischeri*'nin kötü çevre koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmasıyla üreme yeteneğini hızla kaybederek VBNC hale geçtiklerini bildirmişlerdir. Tuz bazlı bir çalışmada, 15°C'de M9 tampon solusyonunda 20 günlük inkübasyondan sonra *V. cholerae* TSI-4 hücrelerinin VBNC hale geçtikleri gözlenmiştir (72).

Deniz suyundan kültürü yapılan *V. parahaemolyticus* 'ların durgunluk fazında ol-

dukları gözlenmiş ve bu durum *V. parahaemolyticus* 'lar için VBNC form olarak değerlendirilmiştir (62).

Oliver ve Bockian (1995) yapmış oldukları bir çalışmada, farelere VBNC formda enjekte edilmiş *V. vulnificus*'un hayvanları öldürdüğünü, dolayısıyla bu bakterilerin VBNC forma geçtikten sonra da en azından bir süre daha virülenslerini koruduğunu bildirmişlerdir.

8. *Aeromonas hydrophila*

Kış aylarında veya soğuk sularda *Aeromonas hydrophila* hücrelerinin ölü hallerine değil VBNC hale geçmiş formlarına rastlandığı bildirilmiştir (73).

9. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar üremeleri için uygun olmayan koşullarla karşılaştıklarında önemli bir hayatta kalma stratejisi olan VBNC forma geçmektedirler (36). Bu fazdaki bakteriler besi yerlerinde üreme ve koloni oluşturma kabiliyetini yitirmekte ancak canlılıklarını ve metabolik aktivitelerini sürdürmektedirler (37). Bu formdaki enterokokların kendilerine özgü gen yapıları, protein profili (24) ve hücre duvarı modifikasyonları olduğu hatta VBNC formdaki enterokokların patojenitelerini korudukları bildirilmiştir (55).

10. *Pseudomonas spp.*

Yüksek NaCl konsantrasyonunun (43) veya düşük oksijenli ortamın (7) *Pseudomonas* türlerinin VBNC hale geçmesinde etkili faktörler oldukları ortaya konmuştur.

In vitro koşullarda *Pseudomonas fluorescens* CHAO-Rif'in, düşük redoks potansiyelinde (230mV), yüksek NaCl seviyesinde (1,5M) ve oksijen azlığında VBNC hale geçtiği saptanmıştır. Topraktan yapılan örnek-

lemelerde bu bakterinin VBNC hale geçmesine genel olarak bütün çalışmalarda rastlandığı, ancak logaritmik üreme fazında olan hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda *Pseudomonas*'ların VBNC hale geçemedikleri ve öldükleri bildirilmiştir (43).

11. Diğer bakteriler

Helicobacter pylori (36) ve *Legionella*'nın (25) üremeleri için uygun olmayan koşullar altında VBNC hale geçtikleri, *Legionella pneumophila*'nın VBNC hale geçtikten sonra da virülensini koruduğu bildirilmiştir (25).

Sıvı ortamda bakır, *Ralstonia solanacearum*'un VBNC forma geçmesine neden olmaktadır. 5µM bakır sülfat bulunan ortamda hücrelerin %99.9'unun VBNC forma geçtiği bildirilmiştir (71).

Manahan ve Steck (1997) yaptığı çalışmada *Agrobacterium tumefaciens* 646 ve *Rhizobium meliloti* Rm 1021'in bakır içeren (60ppm) otoklavlanmış, filtre edilmiş içme suyuna inokule edildiğinde VBNC hale geçtikleri gözlenmiştir.

VBNC Formundaki Bakterilerin Su ve Gıda Güvenliği İle Halk Sağlığı Yönünden Önemi

VBNC formunun, insanlar için patojen olan bazı bakterilerin fizyolojik bir hali olduğu ve bakterilerin bu forma geçerken virülensleri ile yeniden üreyebilme yeteneklerini korudukları ve dolayısıyla insan sağlığını ciddi olarak tehdit ettiği bildirilmektedir (53).

Son yıllarda enterokoklar salgınlara veya hayati tehlike yaratan solunum yolu infeksiyonlarına yol açmaları nedeniyle gide-

rek artan önem kazanmaktadır (37). Çünkü bu süreçte bazı enterokokların bazı antibiyotiklere karşı direnç kazandığı ortaya çıkmıştır. Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) sağlıklı kişilerden (23), çevreden, lağım sularından (70), hayvan dışkılarından ve hayvansal gıdalardan (37) saptanmıştır. Vankomisine dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* VBNC formdayken de antibiyotiklere direnç göstermekte ve uygun koşullar oluştuğunda tekrar üreme yeteneği göstermektedirler (37).

Vibrio cholerae, insanlar için önemli bir patojendir. Kontamine içme sularında bulunabilir ve bu yolla insanlara geçebilir. Bakteri, kontamine yüzey sularında genellikle VBNC formdadır (10). Ayrıca VBNC haldeki *V. vulnificus* hücrelerinin farelerde öldürücü infeksiyona neden olduğu saptanmıştır (51).

Wai ve ark. (2000) uzun süre VBNC halde olmasına karşın az sayıdaki *Aeromonas* ile kontamine suların insanlarda hastalık oluşturabildiğini saptamıştır.

Shigellosis'in, sıklıkla kontamine sular-
dan kaynaklandığı tespit edilmiştir (30). VBNC haldeki *Shigella dysenteriae*'nin tehlikeli olabileceği gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalarla saptanmıştır. VBNC halde bakteriyi alan gönüllülerde klinik belirtiler görülmüş ve kültürü yapılabilir formda *S. dysenteriae* izole edilmiştir (16).

E. coli, VBNC hale geçtikten sonra da patojenitesini korumakta, enterotoksin üretmekte (54) ve virülens plazmidlerini korumaktadır (12). Japonya'da enterohemorajik *E. coli* O157 (EHEC) ile kontamine olmuş özel olarak yüksek tuz konsantrasyonlu (%13) soya sosunda hazırlanmış somon balığı yumurtası 1998'de dört farklı yerde görülen 62 vaka ile

paniğe yol açmıştır. Bu olaylardan sorumlu tutulan gıdanın aynı firmaya ait olduğu ve gıdanın *E. coli* O157 ile kontaminasyonunun muhtemelen üretim aşamasında şekillendiği bildirilmiştir. Zira bu olayda şüpheli gıdadan *E. coli* O157'nin kültür teknikleriyle izolasyonu yapılamamıştır. Bu olayda üretimde kullanılan balık yumurtaları 9 ay boyunca dondurularak saklanmış ve dolayısıyla *E. coli* O157'lerin dondurma işlemi, donmuş muhafazanın etkisi ve yüksek tuz konsantrasyonundan dolayı kültürü yapılamaz hale geçtiği bildirilmiştir (64).

Salmonella enterica serotipi olan Oranienburg ile kontamine olan, kurutulmuş ahtapottan dolayı 1999'da Japonya'da bir panik yaşanmış ve 1500 insanda septisemi ve gastroenterit tablosu şekillenmiştir. Etken ile kontamine olan kurutulmuş ahtapottan yapılan bakteriyolojik kültürlerde herhangi bir bakteri izole edilememiş ve olaydan sorumlu bakterilerin VBNC formda olduğu bildirilmiştir (4).

Bu bilgiler ışığında, gıdalarda bulunan bakteriler, gıdalara uygulanan ısıtma, kurutma, dondurma, tuzlama vb. işlemler sonucunda VBNC forma geçebilmekte ve bu formdaki bakterilerde klasik kültür yöntemleriyle tesbit edilemediğinden halk sağlığı için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (36).

VBNC Formundaki Bakterileri Saptama Teknikleri

VBNC bakteriler, hücre üremesine bağlı standart tekniklerle tesbit edilemezken bazı canlılık belirtilerini göstermektedirler (50). Bu durum klasik kültür tekniğiyle yapılan çalışmaların yanlış negatif sonuçlar verme riskini arttırmaktadır (66).

VBNC hücrelerin tesbiti için uygulanan metotlar genellikle hücresel aktiviteye veya substrat eldesine dayalı metotlardır. Fakat bunlardan da kesin, doğru, güvenilir sonuçlar alınamamaktadır. VBNC formdaki *S. Typhimurium* ile enterohemorajik *E. coli* ancak 23S rRNA veya 16S'e dayalı problemlerle mRNA'nın tesbitine dayalı moleküler teknikler kullanılarak, PCR ile floresan tekniğiyle, mikroradyografi, epifloresan mikroskopisi (65) yöntemleriyle tespit edilebilmektedir. Ayrıca VBNC haldeki bakterilerin floresan vermesi esasına dayanan direkt canlı sayım (GFP; green fluorescent protein based DVC) metoduyla tespit edilebildiği bildirilmektedir (13).

VBNC bakterilerin tespitinde en çok direkt canlı sayım tekniği (DVC) kullanılmaktadır. Bu teknik DNA bulunan hücrelerin saptanması esasına dayanmaktadır. Bu teknik ilk olarak Kogure ve ark. (1979) tarafından bildirilmiştir. VBNC bakterilerin saptanmasında diğer bir metot ise hücrelerdeki depolanmış metabolik aktiviteyi ölçmek için çeşitli tetrazolium tuzları [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride ve 5-cyano-2,3-ditalyl tetrazolium chloride (CTC) en sık kullanılan tuzlardır] içerisinde çözünmeyen formazan kristallerinin hücresel akümüülasyonunu ölçme tekniğidir. Formazanın doğal yapısındaki floresandan dolayı canlı hücrelerin tespitinde CTC bileşikleri de kullanılmaktadır (60).

SONUÇ

Çevresel faktörler ve gıda muhafaza tekniklerinin kontamine su ve gıdalarda bulunan bakteriler üzerine oluşturduğu stres etkisi, özellikle spor oluşturmeyen bakterilerin klasik

kültür teknikleriyle saptanamadıkları bir duruma girmelerine neden olmaktadır. VBNC olarak tanımlanan bu halde bakteriler, metabolik aktivite göstermekte ve patojenitelerini koruyabilmektedir. Dolayısıyla bu durum potansiyel halk sağlığı tehlikesi olarak algılanmaktadır. Bu sebepten dolayı son yıllarda VBNC bakteriler ile ilgili yapılan çalışmalar etkili, pratik ve duyarlılığı yüksek saptama metodlarının geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmış ve bunların neticesinde PCR, DVC gibi moleküler tekniklerin güvenilir metodlar oldukları vurgulanmıştır.

VBNC formdaki bakteriler üzerine daha detaylı çalışmalar yapılarak tartışmalı konuların açıklığa kavuşturulması ve VBNC formdaki mikroorganizmaların varlığının uygun metodlar kullanılarak su ve gıdalardan saptanmaları halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. ALEXANDER E, PHAM D, STECK T R (1999). *The viable but- nonculturable condition is induced by copper in Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 3754-3756.
2. ALLEIN-AUTIN D, AUSTIN B, COLWELL R R (1984). *Survival of Aeromonas salmonicida in river water*. FEMS Microbiol. Lett. **21**: 143-146.
3. ARANA L, MUELA A, IRIBERRI J, EGEE L, BARCINA I (1992). *Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in Escherichia coli in freshwater ecosystem*. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3903-3907.
4. ASAKURA H, WATARAI M, SHIRAHATA T, MAKINO S I (2002). *Viable but nonculturable Salmonella species recovery and systemic infection in morphine-treated mice*. J. Inf. Dis. **186**: 1526-1529.
5. BESNARD V, FEDERIGHI M, CAPPELIER J M (2000). *Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **31**: 77-81.
6. BIANCHI A, GIULIANO L (1996). *Enumeration of viable bacteria in the marine pelajik environment*. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 174-177.
7. BINNERUP S J, SORENSEN J (1993). *Long-term oxidant deficiency in Pseudomonas aeruginosa PAO303 results in cells which are non-culturable under aerobic conditions*. FEMS Microbiol. Ecol. **13**: 79 - 84.
8. BLOOMFIELD S F, STEWART G S A B, DODD C E R, BOOTH I R, POWER E G M (1998). *The viable but non-culturable phenomenon explained?* Microbiol. **144**: 1-3.
9. BOGOSIAN G, MORRIS P J L, O'NEIL J P (1998). *A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state*. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 1736-1742.
10. BRAYTON P R, TAMPLIN M L, HUQ A, COLWELL R R (1987). *Enumeration of Vibrio cholerae O1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count*. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2862-2865.
11. BUTTON D K, SCHUT F, QUANG P, MARTIN R, ROBERTSON B R (1993). *Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture :theory,procedures, and initial results*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 881-891.
12. BYRD J J, COLWELL R R (1990). *Maintenance of plasmids pBR322 and pUC8 in nonculturable*

- Escherichia coli in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2104-2107.
13. **CHO C J, KIM S J** (1999). *Green fluorescent protein based direct viable count to verify a viable but non-culturable state of Salmonella Typhi in environmental samples*. J. Microbiol. Met. **36**: 227-235.
14. **CHOWDHURY M A R, RAVEL J, HILL R T, HUQ A, COLWELL R R** (1994). *Physiology and molecular genetics of viable but nonculturable microorganisms*. 105-122. In: M. Levin, C. Grim, and J. Scott Angle eds. Biotechnology Risk Assessment: USEPA/USDA Environment Canada, University of Maryland, College Park, Maryland.
15. **COLWELL R R, BRAYTON P R, GRIMES D J, ROSZAK D B, HUG S A, PALMER L M** (1985). *Viable but nonculturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment implications for release of genetically engineered microorganisms*. Bio/Technology. **3**: 817-820. In: THOLOZAN J L, CAPPELIER J M, TISSIER J P, DELATTRE G, FEDERIGHI M (1999). *Physiological characterization of viable but nonculturable Campylobacter jejuni cells*. Appl. Environ. Microbiol. **65**(3): 1110-1116.
16. **COLWELL R R, TAMPLIN M L, BRAYTON P R, TAVGENS A L, TALL B D, HERRINGTON D, LEVINE M M, HALL S, HUG A, SACK D A** (1990). *Environmental aspects of Vibrio cholerae in transmission of cholerae*. p.327-343. In: R. B. Sack and R. Zinnaki eds. Advances on cholera and related diarrheas. Vol: 7, KTK. Scientific, Tokyo, Japan.
17. **COLWELL R R, HUQ H** (1994). *Vibrios in the environment: viable but nonculturable Vibrio cholerae*, 117-133. In: I. K. Wachsmith, O. Olsvik and P. A. Blake eds. Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives. ASM, Washington D.C.
18. **COLWELL R R, BRAYTON P, HERRINGTON D, TALL B, HUQ A, LEVINE M M** (1996). *Viable but nonculturable Vibrio cholerae O1 revert to a cultivable state in the human intestine*. World J. Microbiol. Biotech. **12**: 28-31. In: CARO A, GOT P, LESNE J, BINARD S, BALEUX B (1999). *Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable Salmonella Typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol. **65**(7): 3229-3232.
19. **COLWELL R R** (2000). *Bacterial death revisited*. p.325-342. In: Colwell, R. R. and D. J. Grimes eds. Nonculturable microorganisms in the environment ASM Press, Washington D.C.
20. **FAUCHÈRE J L, ROSENAU A, VERON M, MOYEN E N, RICHARD S, PFISTER A** (1986). *Association with HeLa cells of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from human feces*. Infect. Immun. **54**: 283-287.
21. **FORDHAM W D, GILVARG C** (1974). *Kinetics of cross-linking peptidoglycan in Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem. **259**:2478-2482.
22. **GREY B E, STECK T R** (2001). *The viable but nonculturable state of Ralstonia solanacearum may be involved in long term survival and plant infection*. Appl. Environ. Microbiol. **67**(9): 3866-3872.
23. **GORDTS B, VAN LAUDUYT H, IEVEN M, VANDAMME P, GOOSSENS H** (1995). *Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients*. J. Clin. Microbiol. **33**: 2842-2846.
24. **HEIM S, LLEO` M M, BONATO B, GUZMAN C A, CANEPARI P** (2002). *The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of Enterococcus faecalis, as*

- determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 6739–6745.
25. **HUSSONG D, COLWELL R R, O'BRIEN M, WEISS E, PERARSON A D, WEINER R M, BURGE W D** (1987). *Viable Legionella pneumophila not detectable by culture on agar media.* *Bio/Technology.* **5**: 947-950
26. **ISLAM M S, HASAN M K, MIAH M A, SUR G C, FELSTEIN A, VENKATESAN M, SACK R B, ALBERT M J** (1993). *Use of the polymerase chain reaction and flourescent antibody methods for detecting viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1 in laboratory microcosms.* *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:536-540.
27. **JIANG X, CHAI T J** (1996). *Survival of Vibrio parahaemolyticus at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells.* *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1300-1305.
28. **JONES D M, SUTCLIFFE E M, CURRY A** (1991). *Recovery of viable but non-culturable Campylobacter jejuni.* *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2477–2482.
29. **KELL D B, KAPRELYANTS A S, WEICHART D H, HARWOOD C R, BARER M R** (1998). *Viability and activity in readily culturable bacteria: A review and discussion of the practical issues.* *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**:169-187.
30. **KHAN M U, CURLIN G T, HUQ M I** (1979). *Epidemiology of Shigella dysenteriae type 1 infections in dacca (sic) urban area.* *Trop. Geogr. Med.* **31**: 213-223. **In: ISLAM M S, HASAN M K, MIAH M A, SUR G C, FELSTEIN A, VENKATESAN M, SACK R B, ALBERT M J** (1993). *Use of the polymerase chain reaction and flourescent antibody methods for detecting viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1 in laboratory microcosms.* *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:536-540.
31. **KOGURE K, SIMIDU U, TAGA N** (1979). *A tentative direct microscopic method for counting living bacteria.* *Can. J. Microbiol.* **25**:415–420.
32. **LEE K H, RUBY E G** (1995). *Symbiotic role of the viable but nonculturable state of Vibrio fischeri in Hawaiian coastal seawater.* *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:278-283.
33. **LEBARON P, BERNARD L, BAUDART J, COURTIES C** (1999). *The ecological role of VBNC cells in the marine environment.* *Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
34. **LI J, KOLLING G L, MATTHEWS K R, CHIKINDAS M L** (2003). *Cold and carbon dioxide used as multi-hurdle preservation do not induce appearance of viable but non-culturable Listeria monocytogenes.* *J. Appl. Microbiol.* **94**: 48-53
35. **LIU S V** (2000). *Viable but non-culturable (VBNC) microorganisms: A misnomer or a whistle-blower?* *Logical Biol.* **1**:17-20.
36. **LLEO` M M, BONATO B, TAFI M C, SIGNORETTO C, BOARETTI M, CANEPARI P** (2001). *Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but nonculturable state.* *J. Appl. Microbiol.* **91**:1095–1102.
37. **LLEO` M M, BONATO B, SIGNORETTO C, CANEPARI P** (2003). *Vancomycin resistance is maintained in Enterococci in the viable but nonculturable state and after division is resumed.* *Ant. Agent. Chem.* **47**(3):1154-1156.
38. **MACKEY B M** (2000). *Injured bacteria.* **In: BOGOSIAN, G., E. V. BOURNEUF** (2001). *In a*

- matter of bacterial life and death. *EMBO Reports*. **21**(91): 770-774.
39. MADEMA G J, SCHETS F M, VAN DE GIESSEN A W, HAVELAR A H (1992). Lack of colonisation of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 512-516.
40. MAGARINOS B, BARJA J L, TORONZO A E (1994). Evidence of adormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:180-186.
41. MANAHAN S H, STECK T R (1997). The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:29-38.
42. MARY P, CHIHIB N E, CHARAFEDINE O, DEFIVES C, HORNEZ J P (2002). Starvation survival of viable but nonculturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiol. Ecol.* **43**:250-258.
43. MASCHER F, HASE C, MOËNNE-LOCCOZ Y, DÉFAGO G (2000). The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens CHAO* does not promote strain persistence in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1662-1667.
44. MASCHER F, MOENNE-LOCCOZ Y, KEEL U S, KEEL C, HAAS D, DEFAGO G (2002). Inactivation of the regulatory gene *algU* or *gacA* affect the ability of biocontrol *Pseudomonas fluorescens CHAO* to persist as culturable cells in nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(4): 2085-2088.
45. MASCHER F, KEEL U S, HAAS D, DEFAGO G, LACCOZ Y M (2003). Persistence and cell culturability of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens CHAO* under plough pan conditions in soil and influence of the anaerobic regulator gene *anr*. *Environ. Microbiol.* **5**(2): 103-115.
46. McDONALD L C, KUEHNERT M J, TENOVER F C, JARVIS W R (1997). Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: Prevalence, sources, and public health implications. *Emerg. Dis.* **3**:311-317.
47. MIZUNOE Y, WAI S N, ISHIKAWA T, TAKADE A, YOSHIDA S (2000). Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahemolyticus* induced at low temperture under starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 115-120.
48. MUNRO P M, FLATAU G N, CLÉMENT R L, GAUTHIER M J (1995). Influence of the *RpoS* (*KatF*) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1853-1858.
49. NIES DH (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:730-750.
50. OLIVER J D (1993). Formation of viable but nonculturable cells p. 239-272. In: Kjelleberg S. ed. Starvation in bacteria. Plenum Press, New York
51. OLIVER J D, BOCKIAN R (1995). *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2620-2623.
52. OLIVER J D, HITE F, MCDUGALD D, ANDON N L, SIMPSON L M (1995). Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2624-2630.
53. OLIVER J D (2000). The public health significance of viable but nonculturable bacteria.

- In: Colwell, R. R. and D. J. Grimes eds. Nonculturable microorganisms in the environment ASM Pres, Washington D.C.
54. POMMEPUY M, BUTIN M, DERRIEN A, GOURMELON M, COLWELL R R, CORMIER M (1996). *Retention of enteropathogenicity by viable but non culturable Escherichia coli exposed to seawater and sunlight.* Appl. Environ. Microbiol. **62**:4621-4626.
55. PRUZZO C, TARSİ R, LLEO M M, SIGNORETTO C, ZAMPINI M, COLWELL R R, CANEPARI P (2002). *In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable Enterococcus faecalis.* Curr. Microbiol. **45**:105-110.
56. RAHMAN I, SHAHAMAT M, KIRCHMAN P A, RISSEK-COHEN E, COLWELL R R (1994). *Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1.* Appl. Environ. Microbiol. **60**:3573-3578.
57. RAHMAN I, SHAHAMAT M, CHOWDHURY M A R, COLWELL R R (1996). *Potential virulence of viable but nonculturable Shigella dysenteriae Type-1.* Appl. Environ. Microbiol. **62**:115-120.
58. RAMAIAH N, RAVEL J, STRAUBE W L, HILL R T, COLWELL R R (2002). *Entry of Vibrio harveyi and Vibrio fischeri into the viable but nonculturable state.* J. Appl. Microbiol. **93**:108-116.
59. RAY B (1989). *Injured index and pathogenic bacteria.* CRC Press, Boca Raton, FL.
60. RODRIGUEZ G G, PHILIPPS D, ISHIGMO K, RIDGWAY H F (1992). *Use of a flourescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria.* Appl. Environ. Microbiol. **58**:1801-1808.
61. ROLLINS D M, COLWELL R R (1986). *Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment.* Appl. Environ. Microbiol. **52**:531-538.
62. ROSZAK D B, GRİMES D J, COLWELL R R (1984). *Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems.* Can. J. Microbiol. **30**: 334-338.
63. ROSZAK D B, COLWELL R R (1987). *Survival strategies of bacteria in the natural environment.* Microbiol. Rev. **51**: 365-379.
64. SEMANCHEK J J, GOLDEN D A (1998). *Influence of growth temperature on inactivation and injury of Escherichia coli O157:H7 by heat, acid, and freezing.* J. Food Prot. **61**:395-401.
65. SHERIDAN G E C, MASTERS C I, SHALLERROSS J A, MACKEY B M (1998). *Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells.* Appl. Environ. Microbiol. **64**:1313-1318.
66. SIGNORETTO C, LLEO M M, TAFI M C, CANEPARI V W P (2000). *Cell wall chemical composition of Enterococcus faecalis in the viable but nonculturable state.* Appl. Environ. Microbiol. **66**:1953-1959.
67. SINGH A, YEAGER R, MCFETERS G A (1986). *Assessment of in vivo revival, growth, and pathogenicity of Escherichia coli strains after copper- and chlorine- induced injury.* Appl. Environ. Microbiol. **52**:832-837.
68. SMITH J J, HOWİNGTON J P, MCFETERS G A (1994). *Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment.* Appl. Environ. Microbiol. **60**:2977-2984.

69. THOLOZAN J L, CAPPELIER J M, TISSIER J P, DELATTRE G, FEDERIGHI M (1999). *Physiological characterization of viable but nonculturable Campylobacter jejuni cells*. Appl. Environ. Microbiol. **65**(3): 1110-1116.
70. TORRES C, REGUERA J A, SANMARTIN M J, PEREZ-DIAZ J C, BAQUERO F (1994). *VanA-mediated vancomycin-resistant Enterococcus spp. in sewage*. J. Antimicrob. Chemother. **33**:553-561.
71. VAN OVERBEEK L, EBERL L, GIVSKOV M, MOLIN S, VAN ELSAS J (1995). *Survival of and induced stress resistance in, carbon- starved Pseudomonas fluorescens cells residing in soil*. Appl. Environ. Microbiol. **61**:4202-4208.
72. WAI S N, MORIYA T, KONDO K, MISUMI H, AMAKO K (1996). *Resuscitation of Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock*. FEMS Microbiol. Lett. **136**:187-191.
73. WAI S N, MITZUNOE Y, TAKADE A, YOSHIDA S (2000). *A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation and low temperature induced nonculturable cells of Aeromonas hydrophila*. Arch. Microbiol. **173**:307-310.
74. WANG G, DOYLE M P (1998). *Survival of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in water*. J.Food Prot. **6**:662-667.
75. XU H S, ROBERTS N C, ADAMS L B, WEST P A, SIEBLING R J, HUG A, HUG M I, RAHMAN R, COLWELL R R (1984). *An indirect fluorescent antibody staining procedure for detection of Vibrio cholerae serovar O1 cells in aquatic environmental samples*. J. Microbiol. Meth. **2**: 221-231.
76. ZIMMERMANN A, REIMMANN C, GALIMAND M, HAAS D (1991). *Anaerobic growth and cyanide synthesis of Pseudomonas aeruginosa depend on anr a regulatory gene homologous with fnr of Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **5**:1483-1490.