

Bakterie w stadium VBNC – zagrożenie dla zdrowia człowieka

IWONA PASZYŃSKA-WESOŁOWSKA, MICHAŁ BARTOSZCZE*

Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej, ul. Gdańska 147, 85-915 Bydgoszcz

*Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii,
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Paszyńska-Wesołowska I., Bartoszcze M.

Bacteria in the state of VBNC – a threat to human health

Summary

Bacteria in the state of VBNC are alive, but do not undergo division and do not grow on solid media. The transition of bacteria into the state of VBNC results from: the influence of physical or chemical factors exerted on them, ageing, differentiation, adjustment, self-destruction of metabolic, lysogeny. Discovering bacteria that was alive, but unable to grow, showed the imperfection of traditional culturing methods and the necessity of using new diagnostic techniques. In the light of the presented data, the standard culturing methods should be supplemented with selected genetic methods. If they are present in processed food, pasteurized milk or drinking water, bacteria in the state of VBNC may constitute a threat to human health.

Keywords: bacteria, state VBNC, human health

Liczne rodzaje bakterii w niekorzystnych dla siebie warunkach środowiskowych wytwarzają formy spoczynkowe – przetrwalniki, szczególnie odporne na czynniki środowiska, takie jak: wysoka temperatura, zmiany pH, ciśnienie osmotyczne, substancje chemiczne. Na przykład laseczki rodzaju *Bacillus* w niesprzyjających warunkach środowiska tworzą endospory, dzięki czemu mogą przetrwać w stanie uśpienia metabolicznego przez długi czas (2). U bakterii niewytwarzających przetrwalników wykazano (11), że w skrajnych warunkach bytowania przechodzą one w stan uśpienia, tzw. stadium VBNC (viable but nonculturable). Na istnienie stadium VBNC wskazał Colwell i wsp. w 1985 r. (4). Termin VBNC jest obecnie używany głównie dla określenia komórek występujących w niezadawalającym stanie fizjologicznym (12).

Charakterystyka komórek w stanie VBNC

Komórki bakteryjne w stanie VBNC są żywe, ale nie dzielą się i nie dają w związku z tym widocznego wzrostu na pożywkach (4, 19). Czas przechodzenia bakterii w postać VBNC może trwać od 48 godzin do kilku dni i objawia się zmianami w morfologii oraz fizjologii komórek bakteryjnych (6). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że komórki VBNC wykazują fizjologiczne oznaki życia (syntezę białek) i posiadają wykrywalne życiowe komponenty komórkowe (29). W stanie VBNC bakterie są zdolne do życia i wykazują pewną aktywność metaboliczną (23), przy czym jej poziom pozostaje wyższy u drobnoustrojów zjadliwych, czego przykładem jest

Campylobacter jejuni, który w stanie VBNC przybiera chorobotwórczą formę ziarniaka (14, 21). W stadium VBNC bakterie zachowują również zdolność do produkcji toksyn, co stwierdzono np. u enterotoksycznych szczepów *E. coli* (1).

Stan niehodowalności może stanowić genetycznie zaprogramowaną reakcję organizmu na określone czynniki środowiska (23). Zdolność przetrwania w skrajnie trudnych warunkach środowiska zaobserwowano tak u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Występowanie stadium VBNC stwierdzono u: *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophilla*, *Yersinia ruckeri*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* (1, 11, 19, 21). Bakterie w stadium VBNC przybierają kształt kulisty i mają mniejsze wymiary od ich form wegetatywnych. Tzw. miniaturyzację komórek stwierdzono np. u *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio vulnificus* (9, 15, 29). Aktywne bakterie *Vibrio vulnificus* mają długość 3 μm , a w stadium VBNC ich formy kokoidalne od 0,8 μm do 1,0 μm (15). Mniejsze rozmiary posiadają także komórki VBNC *Bacillus subtilis*, które wytwarzają białka, pozyskują energię z procesów biochemicznych oraz zachowują nienaruszoną błonę cytoplazmatyczną (1). Zmiany dotyczą także stabilizacji błony komórkowej, która stopniowo może ulegać pęknięciom (29), zmienia się skład białek i zawartość rybosomów. Tak np. *Vibrio vulnificus* wytwarza 40 nowych białek, nie stwierdzanych podczas wzrostu form wegetatywnych tej bakterii w warunkach laboratoryjnych (23). W składzie chemicznym błon podstawowe kwasy tłuszczowe sta-

nowią 60%, przy czym w stanie VNBC zwiększa się udział nowych kwasów długołańcuchowych. Zachodzące modyfikacje w składzie kwasów tłuszczowych błony cytoplazmatycznej charakterystyczne dla stanu VBNC są niezbędne dla utrzymania potencjału błony (16). Poziom ATP spada szybko wraz z obumieraniem komórek, przy czym u bakterii w stanie VBNC jak np. *V. vulnificus* pozostaje on wysoki, utrzymując się na tym poziomie nawet do czterech miesięcy (16).

Czynniki wpływające na niehodowalność bakterii

Dotychczas poznano wiele czynników wpływających na niehodowalność bakterii, do których należą m.in. czynniki: chemiczne, fizyczne, ciśnienie osmotyczne, starzenie się, adaptacja i różnicowanie, autodestrukcja metaboliczna i lizogenia (1, 7, 16, 23). Czynniki te mogą być zabójcze dla bakterii, jeśli nie przejdą w stan VBNC (16). Tak np. *Vibrio cholerae* przechodzi w stan VBNC pod wpływem niskiej temperatury inkubacji, zmian stopnia zasolenia, braku substancji odżywczych, zróżnicowanych warunków tlenowych (27). U *Campylobacter* sp. w warunkach beztlenowych zaobserwowano zahamowanie podziałów komórkowych i przejście do stadium VBNC, w którym tworzą się niezdolne do namnażania się na pożywkach formy nitkowate (25). Istotne znaczenie dla osiągnięcia stanu niehodowalności mają zawarte w środowisku składniki odżywcze. Przy niedoborze niektórych z nich komórki *Campylobacter* sp. przekształcają się w kokoidalną formę VBNC. W przypadku komórek *C. jejuni* inkubowanych w temperaturze 4°C w środowisku z niedoborem składników odżywczych stwierdzono zmianę stosunku powierzchni do objętości komórek (P : V), prowadzącą do powstania komórek VBNC o mniejszych rozmiarach (14). W zależności od zawartości w środowisku niektórych substratów bakterie zmniejszają swoją objętość 15-300 razy, a średnia masa komórki zmniejsza się kilkakrotnie. Zjawisko to zaobserwowano u *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* sp. i *Vibrio cholerae* (3). Głodzone bakterie rzadko ulegają lizie, pozostają one strukturalnie niezmiennione i utrzymują na minimalnym poziomie metaboliczną integralność. Głodzenie prowadzi m.in. do redukcji rybosomalnego RNA bakterii, a w niektórych przypadkach do ekspresji specyficznych genów głodzenia. Tzw. białka głodowe powodują zwiększenie oporności bakterii na stres, dzięki czemu komórka bakteryjna w stadium niehodowalności, w przeciwieństwie do jej formy wegetatywnej, staje się bardziej oporna na wysoką temperaturę, H₂O₂, zakwaszenie i środki dezynfekujące. Wykazano, że adaptacja *L. monocytogenes* do niższych od biobójczych dawek etanolu, soli, kwasu, podwyższonej temperatury znacząco zwiększyła jej oporność na inaktywujące działanie tych czynników. Adaptację do czynników stresujących i ochronę krzyżową stwierdzono także w odniesieniu do *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (21). Brak skutecznego działania niektórych środków chemicznych na bakterie chorobotwórcze w stanie VBNC może utrudniać lub uniemożliwiać obiektywną ocenę stanu sanitarno-higienicznego placówek medycznych. Dezynfekcja może być także czyn-

nikiem stymulującym do przejścia w stan VBNC komórek biofilmu bakteryjnego w środowisku wodnym. Odkazanie przy użyciu promieniowania UV indukuje stan VBNC *E. coli* K-12 (28). Białka głodowe wpływają na uwalnianie się rodników tlenowych, których nadprodukcja prowadzi do przejścia komórki w stan VBNC. Wolne rodniki wpływają bowiem hamująco na procesy naprawcze w komórkach poddanych działaniu niekorzystnych czynników środowiskowych (21). Po wprowadzeniu bakterii do środowiska ubogiego w substancje organiczne, w krótkim czasie można zaobserwować zwolnienie tempa wzrostu w wyniku wydłużenia okresu międzypodziałowego i czasu generacji. Zmiana morfologii komórki zachodzi także pod wpływem stresu osmotycznego, co zaobserwowano np. u *V. anguillarum*, które przyjmuje okrągły kształt i mimo całkowitej utraty zdolności do tworzenia kolonii nadal podtrzymują swoje procesy metaboliczne (7).

Istotnym czynnikiem stymulującym bakterie do przejścia w stan VBNC jest także temperatura otoczenia. Zaobserwowano, że obniżenie temperatury poniżej 10°C wydłuża przeżywalność bakterii allochtonicznych w stadium VBNC. *E. coli* w temperaturze 8°C przeżywa 54 dni inkubacji, podczas gdy w temperaturze 20°C w tym samym czasie inkubacji bakterie te obumierały (26).

Hodowla bakteryjna zdolna jest do odbierania sygnałów ze środowiska, które mogą wpływać na ekspresję genów na etapie transkrypcji i translacji, prowadząc niekiedy do zmian morfologicznych i przejścia w stan niehodowalności (19). Na określone właściwości fizjologiczne bakterii wpływają sygnały molekularne. Istnieje wiele substancji sygnałowych, zwanych autoinduktoraми i mechanizmów ich przekazywania. Bakterie Gram-dodatnie uwalniają do środowiska sygnały białkowe, wykorzystując dwuskładnikowy system detekcji i odpowiedzi na obecność autoinduktora (13). Przekazywanie sygnału odbywa się na zasadzie kaskady fosforylacji i defosforylacji. U bakterii Gram-ujemnych najlepiej poznany jest system komunikacji międzykomórkowej złożony m.in. z niskocząsteczkowych substancji chemicznych laktonów homoseryny, rodziny syntaz autoinduktora LuxR oraz białkowych regulatorów transkrypcyjnych LuxR (13, 24). Substancje sygnałowe, wydzielane przez bakterie są konieczne do przywrócenia do życia uśpionych komórek. Po dodaniu do płynnej pożywki swoistego supernatantu hodowli uzyskuje się powrót życia form VBNC *Micrococcus luteus* (11). Uszkodzenie DNA jest czynnikiem hamującym namnażanie się bakterii, a w efekcie inicjacji procesów reperacyjnych mogą powstać komórki niezdolne do wzrostu.

Istotnym czynnikiem stymulującym przejście do stanu VBNC jest wiek komórek. Tak np. bakterie *Vibrio* sp. przechodziły w stan VBNC z fazy logarytmicznego wzrostu przez około 10 dni, a dojrzałe komórki z fazy stacjonarnej przez miesiąc (16). Liczba „hodowalnych” kolonii eksponowanych na działanie jednego lub wielu czynników stresujących wykazywała regularny spadek jednostek tworzących kolonie, podczas gdy ogólna liczba kolonii pozostawała na tym samym poziomie. Analizy tego typu mogą być użyteczne dla ilustracji zjawiska niehodowalności (16).

Środowisko bytowania bakterii w stanie VBNC

Bakterie zdolne do życia, a niedające się hodować stwierdzono w wodzie morskiej i rzekach, a także w glebie; niektóre z nich są chorobotwórcze dla organizmów żywych. Naturalna mikroflora autochtoniczna wód nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka, gdyż bakterie wodne giną w temperaturze powyżej 25°C. Zagrożenie stanowią jednak bakterie mezofilne, wprowadzane do wody wraz ze ściekami i przystosowane do wzrostu w temperaturze 35-37°C. W środowisku wodnym u bakterii poddanych stresowi obserwuje się wolniejsze namnażanie się, wydłużenie czasu generacji oraz spowolnienie innych procesów życiowych. Rodzimą mikroflorą środowiska wodnego jest *V. cholerae*, który przechodzi w stan VBNC w efekcie spadku temperatury poniżej 4°C podczas inkubacji przez 45 dni i braku substancji odżywczych (16, 23, 27).

Obserwacje bakterii glebowych wykazały związek pomiędzy głodzeniem energetycznym a karłowatością komórek, których liczba wzrastała wraz z końcem okresu wegetatywnego roślin. Przyjmuje się, że 90-99% bakterii glebowych można określić jako VBNC; są one strukturalnie nieuszkodzone, metabolicznie kompetentne i posiadają nieuszkodzony genom. Komórki *Pseudomonas fluorescens* mogą pozostawać w glebie w stanie VBNC ponad rok (16).

Stadium VBNC jest zjawiskiem często obserwowanym wśród patogenów, takich jak: *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Legionella*, *E. coli*, które nie dają się hodować, aż do chwili przeniesienia ich do środowiska stymulującego ich ożywienie (3). Obszerne dane dotyczące występowania komórek VNCB w żywności zawarte są w pracy Olivera (17). Wśród 59 różnych bakterii przechodzących w stan VNCB znajdują się m.in.: *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Czynniki stymulujące powrót bakterii VBNC do stadium wegetatywnego

Bakterie w stadium VBNC mogą powrócić do stanu pełnej aktywności metabolicznej w korzystnych dla nich warunkach środowiskowych. Chorobotwórczy szczep *Escherichia coli* w stadium VBNC po wnikięciu do organizmu zwierzęcego przekształca się w formę wegetatywną o wysokiej zjadliwości (20). Pobrany płyn jelitowy królika, któremu uprzednio wstrzyknięto zawiesinę bakteryjną w stadium VBNC zawierał zdolne do hodowania *V. cholerae* (16). Płyn jelitowy królika, któremu uprzednio wstrzyknięto zawiesinę *V. cholerae* w stadium VBNC zawierał zdolne do namnażania się bakterie (16). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku *V. vulnificus* i *Campylobacter jejuni* (19).

Pełna aktywność metaboliczna komórek VBNC *V. vulnificus* wracała wraz ze zmianą temperatury inkubacji. Podwyższenie temperatury inkubacji ponad 10°C spowodowało powrót zdolności *V. vulnificus* do namnażania się na podłożach (16). W warunkach laboratoryjnych bakterie te mogą uzyskać pełną aktywność po wprowadzeniu do pożywki induktorów, jak np. oksydazy, co

wykazano również w odniesieniu do *Salmonella enterica* i *Citrobacter freundii* (18).

Substancje sygnałowe, wydzielane przez bakterie są konieczne do przywrócenia do życia uśpionych komórek. Wykazano ponadto (5), że obecność w środowisku specyficznych molekuł sygnałowych jest niezbędna dla przejścia w stan VBNC i reanimacji komórek *V. vulnificus*, co może świadczyć o tym, że reakcje te są zaprogramowane genetycznie. W procesie reaktywacji komórek VBNC dochodzi także do naprawy uszkodzeń, dzięki czemu rozpoczyna się proces namnażania się komórek bakteryjnych (29). W związku z tym, że nie został do końca poznany mechanizm odwracalności tego zjawiska, część autorów uważa stadium VBNC za zdegenerowaną postać komórki na drodze do śmierci. Inna z tez sugeruje, że są to zmiany odwracalne, jednakże do pewnego etapu, którego przekroczenie prowadzi do destrukcji komórki (19).

Metody identyfikacji w stanie VBNC

W związku z tym, że bakterie VBNC nie wykazują zdolności do wzrostu i tworzenia kolonii na pożywkach stałych, nie mogą być wykorzystane dla wykrycia obecności tych drobnoustrojów w badanej próbce. Tak np. podczas liczenia pod mikroskopem komórek *Vibrio cholerae* wykazano, że ich liczba była o 200 do 5000 razy wyższa w porównaniu do liczby kolonii wyrosłych na płytkach (23). Bakterie takie mogą być wykryte dopiero po zastosowaniu testów cytologicznych (m.in. z oranżem akrydyny), cytometrii przepływowej, PCR lub hybridacji DNA (10, 21).

Różnica pomiędzy liczbą komórek, jaka może być wykryta metodą mikroskopową, a liczbą jednostek tworzących kolonie w standardowych metodach może być regularnie monitorowana i oceniana (23). Tak np. rozbieżne wyniki uzyskano przy identyfikacji szczepów *E. coli* w próbce wody metodą PCR i tradycyjną metodą hodowlaną. Próbkę wody uprzednio poddana została inkubacji w temperaturze 4°C, a badania prowadzono przez okres miesiąca. Na początku eksperymentu wyniki uzyskane obydwojema metodami były podobne, lecz w miarę upływu czasu liczba komórek wykrywanych metodą hodowlaną gwałtownie spadła, podczas gdy techniką PCR, obecność *E. coli* w badanej próbce wody wykrywano nawet po miesiącu (22).

Metody biologii molekularnej umożliwiają wykrycie i identyfikację bakterii w próbce, co ma istotne znaczenie w dochodzeniach epidemiologicznych, mających na celu znalezienie dowodów na klonalne pochodzenie izolatów wyhodowanych z różnych źródeł. Poznanie źródła zakażenia i dróg rozprzestrzeniania się drobnoustrojów pozwala na skuteczne zwalczanie infekcji. Wśród metod biologii molekularnej w identyfikacji i różnicowaniu komórek w stanie VBNC znalazły zastosowanie takie techniki, jak: RFLP (restriction fragment length polymorphism), PFGE (pulse field gel electrophoresis), AFLP (amplification fragment length polymorphism), PCR (polimerase chain reaction) (5, 21, 23).

Wykazano, że nowe gatunki bakterii w stanie VBNC, izolowane z odchodów ludzkich, częściowo korelują z sekwencją 16S rDNA *Campylobacter*, w związku

z czym zaproponowano nazwać tę bakterię – *Candidatus Campylobacter hominis*, wskazując, że nie może być ona hodowana klasycznymi metodami, dotychczas stosowanymi dla bakterii jelitowych z grupy *Campylobacter* (21).

Zagrożenia dla zdrowia człowieka

Bakterie w stadium VBNC stanowią niewątpliwie zagrożenie dla zdrowia człowieka, gdyż występują one w otaczającym nas środowisku, także w żywności i wodzie pitnej (21, 23). Bakterie w środowisku wodnym znajdujące się w stanie VBNC wykazują pewną aktywność metaboliczną, lecz nie są wykrywane klasycznymi metodami hodowlanymi (3). Należy także brać pod uwagę możliwość transferu materiału genetycznego z bakterii w stanie VBNC do innych mikroorganizmów żyjących w tym samym środowisku. Procesy dezynfekcji, jakim poddawana jest woda pitna, mogą wywoływać dodatkowo indukcję stanu VBNC. Szczepy patogenne lub oportunistyczne w stanie VBNC mogą stanowić poważny problem zdrowotny, gdyż charakteryzują się zwykle większą zjadliwością w porównaniu do wyjściowych form vegetatywnych (21).

Zagrożenie bakteriami w stanie VBNC związane jest z ich zdolnością (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella sp.*) do przechodzenia ze stanu VBNC w formy vegetatywne i wywołania choroby po wniknięciu do organizmu człowieka (18, 24). Komórki VBNC wykazują również większą aniżeli formy vegetatywne oporność na działanie antybiotyków (8). Na podkreślenie zasługuje fakt, że procesy uznane za w pełni skuteczne, jak: pasteryzacja mleka oraz chlorowanie wody, czasami mogą prowadzić do przejścia komórek w stan VBNC (16) i stwarzać w konsekwencji potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Przeprowadzono badania na ochotnikach, przyjmujących pokarm zakażony *V. cholerae* w stanie VBNC, u których po 48 h wykazano obecność bakterii w próbkach kału. Zakażono szczepami w stanie VBNC *Campylobacter jejuni* żywności, która po podaniu myszom doprowadza do śmierci tych zwierząt (16). *Campylobacter sp.* w środowisku bogatym w składniki odżywcze, pod wpływem stresu osmotycznego przechodzi w postać VBNC. W organizmie człowieka bakterie te powracają do pierwotnej postaci, wykazując przy tym wysoką patogenność. Nawet niezdolne do namnażania się w warunkach laboratoryjnych oraz w samej żywności bakterie VBNC po dostaniu się za pośrednictwem żywności do organizmu człowieka mogą być powodem wystąpienia zachorowań. W procesach przetwórstwa żywności, mikroflora (w tym również bakterie chorobotwórcze) poddawana jest ciągłym czynnikom stresogennym, co sprzyja przechodzeniu bakterii w stan VBNC (21).

Piśmiennictwo

1. Barer M. R., Smith R. J., Cooney R. P.: Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *J Infect. Chemother.* 2000, 6, 108-111.
2. Bielawska-Drózd A., Niemcewicz M., Bartoszcze M.: The Evaluation of Methods for Detection of Bacillus Anthracis Spores in Artificially Contaminated Soil Samples. *Polish J. Environ. Stud.* 2008, 17, 5-10.
3. Colwell R. R.: Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 2000, 6, 121-125.

4. Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B., Huq S. A., Palmer L. M.: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* 1985, 3, 817-820.
5. Coutard F., Lozach S., Pommepuy M., Hervio-Heath D.: Real-Time Reverse Transcription-PCR for Transcriptional Expression Analysis of Virulence and Housekeeping Genes in Viable but Nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after Recovery of Culturability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 5183-5189.
6. Cuny C., Dukan L., Frayssse L., Ballesteros M., Dukan S.: Investigation of the First Events Leading to Loss of Culturability during *Escherichia coli* Starvation: Future Nonculturable Bacteria Form a Subpopulation. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 2244-2248.
7. Eguchi M., Fujiwara E., Miyamoto N.: Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation? *J. Infect. Chemother.* 2000, 6, 126-129.
8. Ehrlich G. D., Veeh R., Wang X., Costerton J. W., Hayes J. D., Hu F. Z., Daigle B. J., Ehrlich M. D., Post J. Ch.: Mucosal Biofilm Formation on Middle-Ear Mucosa in the Chinchilla Model of Otitis Media. *JAMA* 2002, 287, 1710-1715.
9. Jiang X., Chai T. J.: Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at Low Temperatures under Starvation Conditions and Subsequent Resuscitation of Viable, Nonculturable Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1300-1305.
10. Kaprelyants A. S., Kell D. B.: The use of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualization of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. *J. Microbiol. Methods* 1993, 17, 115-122.
11. Kaprelyants A. S., Mukamolova G. V., Votyakova T. V., Davey H. M., Kell D. B.: Dormancy in non-sporulating bacteria: its significance for environmental monitoring. [w:] Stopa P. J., Bartoszcze M. A.: Rapid Methods for Analysis of Biological Materials in the Environment. Kluwer Academic Publishers 2000, 49-65.
12. Kell D. B., Kaprelyants A. S., Weichart D. H., Harwood C. R., Barer M. R.: Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998, 73, 169-187.
13. Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P., Willem M. de Vos: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 1997, 24, 895-904.
14. Lazaro B., Carcamo J., Audicana A., Perales L., Fernandez-Astorga A.: Viability and DNA Maintenance in Nonculturable Spiral *Campylobacter jejuni* Cells after Long-Term Exposure to Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4677-4681.
15. Nilsson L., Oliver J. D., Kjelleberg S.: Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *J. Bacteriol.* 1991, 173, 5054-5059.
16. Oliver J. D.: The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 43, 93-100.
17. Oliver J. D.: Viable but Nonculturable Bacteria in Food Environments, [w:] Fratamico P. M., Bhunia A. K., Smith J. L. (eds.): Food Borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK 2005, 99-112.
18. Reissbrodt R., Rienecker I., Romanova J. M., Freestone P. P. E., Haigh R. D., Lyte M., Tschäpe H., Williams P. H.: Resuscitation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the Viable but Nonculturable State by Heat-Stable Enterobacterial Autoinducer. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 4788-4794.
19. Rice S. A., McDougald D., Kjelleberg S.: *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response. *J. Infect. Chemother.* 2000, 6, 115-120.
20. Rivers B., Steck T. R.: Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary infection and antibiotic therapy. *Urol. Res.* 2001, 29, 60-66.
21. Rowan N. J.: Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo vadis? *Trends. Food Sci. Technol.* 2004, 15, 462-467.
22. Rust A., Köster W.: New Paths in the Analysis of Drinking Water Quality. *EAWAG news* 2003, 56, 18-19.
23. Sardesai Y. N.: Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. *Current Sci.* 2005, 89, 1650.
24. Schaefer A. L., Hanzelka B. L., Eberhard A., Greenberg E. P.: Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Probing Autoinducer-LuxR Interactions with Autoinducer Analogs. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 2897-2901.
25. Sellars M. J., Hall S. J., Kelly D. J.: Growth of *Campylobacter jejuni* Supported by Respiration of Furmarate, Nitrate, Trimethylamine-N-Oxide, or Dimethyl Sulfoxide Requires Oxygen. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 4187-4196.
26. Smith J. J., Howington J. P., McFeters G. A.: Survival, Physiological Response, and Recovery of Enteric Bacteria Exposed to a Polar Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 6, 2977-2984.
27. Sung H. H., Chen C. K., Shih P. A., Hsu P. Ch.: Induction of Viable but Nonculturable State in *Vibrio cholerae* O139 by Temperature and Its Pathogenicity. *Journal of Food and Drug Analysis* 2006, 14, 265-272.
28. Villarino A., Rager M. N., Grimont P. A. D., Bouvet O. M. M.: Are UV-induced nonculturable *Escherichia coli* K-12 cells alive or dead? *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 2689-2695.
29. Yamamoto H.: Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. *J. Infect. Chemother.* 2000, 6, 112-114.

Adres autora: por. mgr Iwona Paszyńska-Wesołowska, Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej, ul. Gdańska 147, 85-915 Bydgoszcz; e-mail: mikro_biolog@wp.pl