

구리에 의해 유도된 VBNC 대장균의 특성

구형근 · 박상열 · 김숙경*

한국표준과학연구원, 삶의질 표준본부, 보건측정센터

Characterization of Viable But Nonculturable Condition of *Escherichia coli* Induced with Copper. Ku, Hyung-Keun, Sang-Ryoul Park, and Sook-Kyung Kim*. Health Metrology Center, Division of Metrology for Quality Life, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon 305-340, Korea – VBNC (Viable but nonculturable) state is an adaptive response of cells in adverse environments, which lead cell not grow on routine nutrient agar. In this study, we induced VBNC in *Escherichia coli* using copper and verify the characterization of it. After treatment of copper, we didn't detect any cells via plate cultivation, namely, colony forming unit (CFU) was zero. However, we identified the existence of VBNC by staining live cells with Live/Dead BacLight bacterial viability kit and counting them through flow cytometry. Then we isolated genomic DNA and RNA from VBNC-induced cells and analyzed the stability of them. Degradation of RNA is more severe than that of DNA and RNA is degraded as specific fragments. In addition, we showed the morphology of VBNC cell by Bio-Transmission Electron Microscope (Bio-TEM). VBNC cell showed impaired periplasmic space and inner and outer membrane were separated and the amount of cytosol were significantly decreased.

Key words: VBNC, *Escherichia coli*, copper, Bio-TEM

서 론

영양 고갈, 저온, 염분, 중금속 등과 같은 다양한 환경적 스트레스에 노출된 세균들 가운데 일부는 세포막이 온전하고 호흡 등의 대사활성은 유지되고 있지만, 일반적인 실험실 배양조건에서는 성장하지 못한다. 이처럼 살아있으나 집락을 이루지 못하는 세포의 상태를 viable but nonculturable (VBNC)라고 한다. VBNC는 1982년 그 개념이 처음 등장한 이래 일부의 그람 음성세균에서 VBNC 형성이 보고되고 있다[22]. VBNC 상태에 들어간 세포는 일반적으로 크기가 작아지고 세포벽과 세포막의 조성이 변하며 영양 수송, 호흡율, 고분자 합성 등의 감소가 일어난다[4, 15, 16]. 또한 죽은 세포에서는 ATP(adenosine tri-phosphate) 수준이 급격히 감소되는데 반해 VBNC 상태의 세포에서는 높게 유지되며 정상상태와 VBNC 상태의 유전자 발현 양상에도 차이가 있다는 연구결과가 있다[3, 10].

이러한 VBNC 상태는 그람 양성세균에서 볼 수 있는 포자형성과 비슷한 적응 기작으로 장시간 동안 세포가 생존하기 위한 수단이며 스트레스가 사라지면 소생(resuscitation)하여 일반 배지에서 배양이 가능하게 된다[21]. VBNC가 살아있는 세포라는 가장 확실한 증거가 되는 소생은 VBNC를 유도한 스트레스를 제거한다고 반드시 일어나지는 않

며 최근에는 세포 소생시 관여하는 신호물질에 관한 연구들이 진행되고 있다[2, 9]. 현재까지 약 60여 종의 미생물에서 VBNC 유도가 확인되었으며 *Campylobacter*속, *E. coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*속, *Shigella*속 그리고 *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*에서 보고되었다.

VBNC에 대해 가장 많은 연구가 진행된 *Vibrio*속 균주의 경우 VBNC를 유도하는 여러 환경적 조건에서부터 세포소생에 이르기까지 많은 연구가 진행되어 있으나 *E. coli*의 경우 최근에서야 관심을 가지고 연구가 진행되고 있다[12, 17]. VBNC 상태의 병원성 미생물 중 일부에서 병원성을 유지하고 있다는 연구결과가 있는데 대장균의 경우 O157과 같이 병원성 균주가 있어 공중위생상 매우 중요하기 때문에 VBNC 대장균의 특성에 관한 기초연구를 진행해야 할 필요성이 있다. 또한 최근의 연구들은 정상상태의 미생물과 VBNC 미생물에 대한 유전자 발현이나 단백질 발현양상을 비교하는 경향이 있다. 영양 고갈상태와 VBNC 상태에서의 단백질 발현이 다르다는 것이 proteomics 연구를 통해 밝혀졌으며 세포 외막에 존재하는 VBNC 특이 단백질을 찾으려는 시도 등이 보고되었다[7, 11, 19]. VBNC의 특성을 분자적 수준에서 이해하고 VBNC 특이 유전자나 단백질을 발견하면 이를 활용하여 일반적인 미생물 검출방법으로는 확인할 수 없는 VBNC 미생물을 쉽게 검출할 수 있게 되어 잠재적 병원성 미생물의 감염예방에 도움이 될 것이다.

*Corresponding author

Tel: 82-42-868-5342, Fax: 82-42-868-5801

E-mail: kimsk@kriss.re.kr

구리를 사용한 VBNC 유도는 *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti*, 그리고 *E. coli*에서 보고되었는데 [1, 5], 구리를 처리하는 것이 다른 스트레스를 통한 유도보다 단기간에 가능하기 때문에 본 연구에서는 대장균에 구리를 처리해 VBNC를 유도한 후 그 수를 계수하고 특성을 규명하는 연구를 수행하였다. VBNC 상태에 들어간 세포에서 보이는 flow cytometry 분석, genomic DNA와 RNA의 변화 그리고 세포 형태 등을 관찰하였다.

재료 및 방법

사용한 균주 및 VBNC 유도방법

실험에 사용된 균주는 *E. coli* KCTC 2134(생물자원센터, 한국생명공학연구원)이었다. Luria-Bertani 배지(1 L당 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g sodium chloride)에서 *E. coli*를 접종하여 600nm에서의 흡광도가(UV-1601 Shimadzu, Japan) 0.6(exponential phase)이 될 때까지 37°C에서 배양한 후 3500rpm에서 원심 분리하여 균체를 수확하였다. 분리된 균체를 0.9% NaCl로 3회 세척하고 각각 20 mL의 0.9% NaCl(500 μ M의 CuSO_4 를 처리한 것과 처리하지 않은 시료를 따로 준비)에 $1\sim 2 \times 10^8$ cells/mL 되도록 현탁한 후 25°C에서 진탕하였다. 정해진 시간 간격으로 시료를 채취하여 배양성(culturability)과 생육력(viability)을 결정하였다. 실험은 3회 반복하여 평균치를 결과로 사용하였다.

VBNC 확인을 위한 배양성과 생육력 결정

VBNC 유도된 *E. coli*의 배양성을 확인하기 위하여 집락 형성계수(colony forming unit, CFU)를 결정하였다. 500 μ M의 CuSO_4 를 처리한 시료와 대조군으로 CuSO_4 를 처리하지 않은 미생물 시료를 매일 일정량 채취하여 배지 당 100-200개의 집락이 생성될 수 있도록 적당히 희석하여 LB 배지에 도말하고 37°C 배양기에서 이틀간 배양한 후 그 수를 직접 계수하였다.

생육력은 LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes Inc, Eugene, Oreg.)를 사용하여 결정하였다. 1 μ L의 SYTO9 nucleic acid stain(3.34 mM)과 1 μ L의 Propidium iodide(20 mM)를 시료(10^6 cells/mL)에 처리한 후, 실온에서 빛을 차단하고 15분 이상 반응시킨 후 Flow cytometer(CyFlow, Partec, Germany)를 사용하여 계수하였다. Forward scattering과 side scattering을 이용해 대장균만을 선별하고 FL1(녹색형광)과 FL3(빨간색형광)을 이용해 각각 염색된 세포를 계수하였다.

DNA, RNA 정제

CuSO_4 를 처리한 *E. coli* 배양액으로부터 날짜별로 2 mL의 시료를 채취한 후 3500 rpm에서 균체를 분리하였다. 그 후 DNeasy Tissue-Kit와 RNeasy mini kit(Qiagen, Germany)

를 이용하여 DNA와 RNA를 각각 정제한 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 DNA와 RNA의 상태를 관찰하였다.

투과전자현미경(Transmission Electron Microscope)

500 μ M CuSO_4 를 처리하여 VBNC를 유도한 지 6일과 12일이 지난 시료의 형태를 관찰하기 위해 대장균 시료를 2.5% glutaraldehyde(pH 7.3)을 포함하는 0.1 M phosphate buffer에서 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 그 후 시료를 1% osmium tetroxide로 후고정하고 Epon812에 embed한 후, ultramicrotome(Leica ultracut-cut, Germany)과 diamond knife(Diatome, Switzerland)로 얇게 잘라 uranyl acetate로 염색한 후 한국기초과학연구원의 생물전용 투과전자현미경인 Tecnai G² SPIRIT TWIN electron microscope(FEI, USA)를 사용하여 120 kV 전압으로 관찰하였다.

세포소생

여과막(cellulose nitrate, 0.2 μ m pore size, Whatman, USA)을 사용하여 VBNC 상태의 균체를 모으고 500 μ M 구리 농도의 5배의 EDTA를 처리하여 구리를 제거한 후 0.9% NaCl에 현탁하고 25°C에서 진탕 배양하였다. 다양한 시간간격으로 시료를 채취하여 LB 고체 배지에 균체를 도말하고 37°C 배양기에서 이틀간 배양한 후 세포소생을 관찰하였다.

결과 및 고찰

구리를 이용한 VBNC 상태 형성

대조군과 500 μ M 농도의 CuSO_4 를 함유한 0.9% NaCl 용액에 현탁한 *E. coli* 균주에 대해 날짜별로 집락 형성수와 생육력을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 시간이 지남에 따라 CFU는 급격히 감소하였으나 Flow cytometry 분석에 의한 생육력은 상대적으로 천천히 줄어들었다. 이 두 값의 차이가 VBNC 상태에 들어간 세포수가 된다. 500 μ M의 구리 처리 후 3일이 지나자 대부분의 *E. coli*가 VBNC 상태로 유도되었다.

일반적으로 많이 사용되는 VBNC 유도 방법인 저온(4°C)과 인공 바닷물 병용처리 방법은 매우 오랜 시간(80일 이상)이 소요되는 단점이 있어 본 연구에서는 구리를 처리하여 신속하게 VBNC를 유도하였다[5].

Flow cytometry 분석을 통한 VBNC 세포 distribution

대장균의 생육력을 측정하기 위해 사용한 LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit는 두 가지 핵산 염색 염료인 SYTO9(녹색)과 propidium iodide(PI, 빨간색)으로 구성되어 있다. 완전한 세포막을 지니는 미생물의 경우 PI는 투과하지 못하고 SYTO9만 투과해 밝은 녹색형광을 나타내고, 손상된 세포막을 지니는 미생물은 SYTO9과 PI 모두 투과해 약한 녹색형광과 붉은색 형광을 나타낸다. 이러한 원리를 이용해

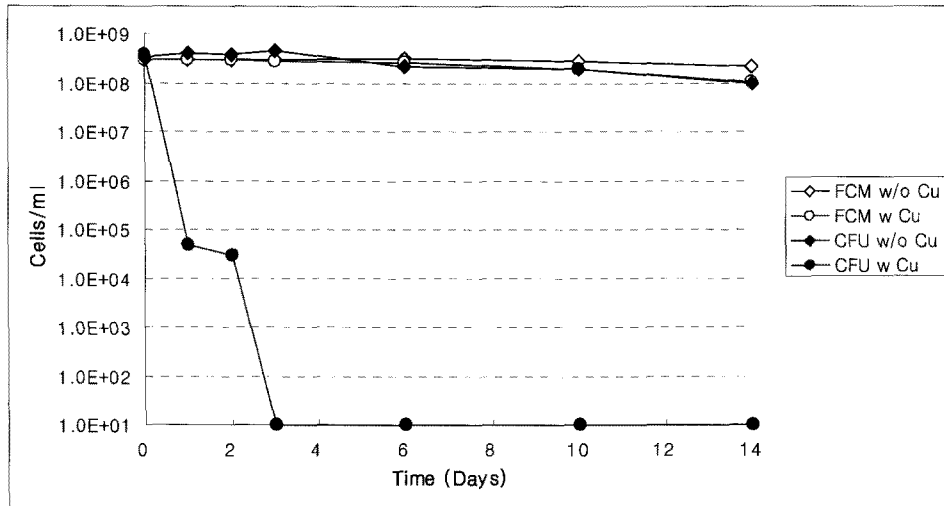


Fig. 1. VBNC induction by CuSO₄ in *E. coli*. Cells were suspended in 0.9% NaCl liquid cultures with (○) or without (◇) 500 μM CuSO₄. At various times, culturability (closed symbols) and viability (open symbols) were quantified.

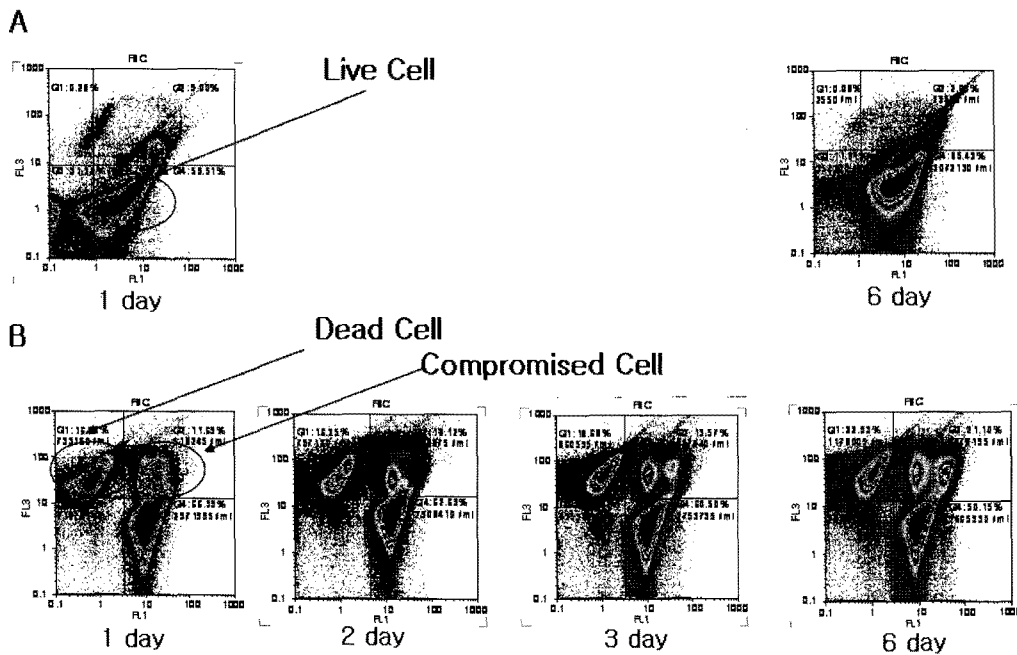


Fig. 2. Populations of *E. coli* cells at different viability stages measured by flow cytometry (FCM). A. Control, without CuSO₄ B. with CuSO₄ (500 μM) at various times *E. coli* treated CuSO₄ showed distinct FCM distribution compared with non-treated cells.

정상세포와 죽은 세포 그리고 손상된 세포의 구분제수가 가능하였다.

정상 상태의 대장균은 완전한 세포막을 가지고 있기 때문에 SYTO9만이 막 안으로 통과하여 핵산을 염색하여 FL1에서 강한 형광을 나타내었다(Fig. 2A). 구리를 처리한 대장균의 경우에는 시간이 경과함에 따라 정상 세포의 수는 감소하고 일부 세포막의 손상이 보이는 compromised cell 집단 (FL1과 FL3 모두 반응)과 죽은 세포 집단(FL3)이 나타났다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 구리에 의해 세포가 스트레스를 받게 되어 그 중 일부는 죽게 되고 일부는 VBNC 상태가 형

성되었음을 나타낸다. 구리 처리 후 3일 이상 경과했을 때 집락형성계수는 0으로 배양 가능한 미생물이 존재하지 않지만 flow cytometry 분석을 통해 여전히 많은 수의 세포가 VBNC 상태로 살아있음이 확인되었다.

VBNC 상태에서의 DNA와 RNA의 stability

VBNC 상태에 들어간 대장균의 genomic DNA(g-DNA)와 RNA를 분리하여 상태를 확인한 결과 Fig. 3에서의 같이 Cu에 노출된 시간이 경과할수록 g-DNA와 RNA 모두 붕괴가 진행됨을 확인하였다. RNA의 붕괴가 상대적으로 더 빨

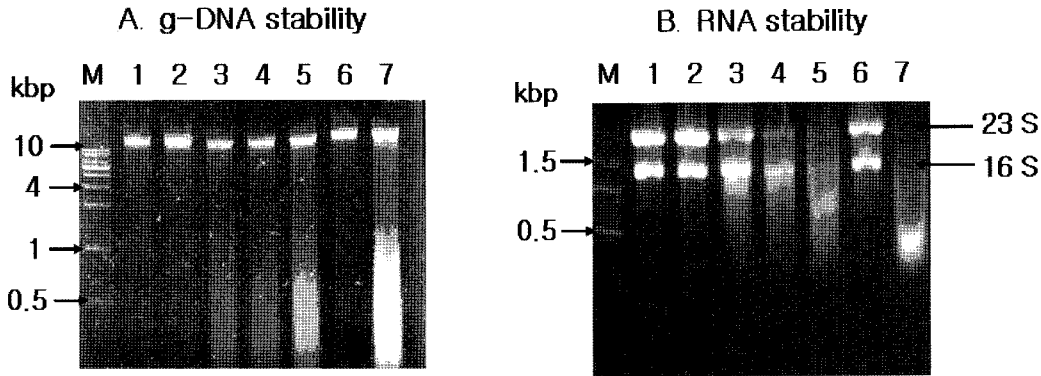


Fig. 3. Stability of genomic DNA and RNA from *E. coli* cells at different viability stages. A. DNA electrophoresis in 1% agarose gel. Lane M, molecular weight standards; lane 1, 0 day without Cu (control); lane 2, 0 day with Cu (500 μ M); lane 3, 1 day with Cu (500 μ M); lane 4, 2 days with Cu (500 μ M); lane 5, 3 days with Cu (500 μ M); lane 6, 6 days without Cu; lane 7, 6 days with Cu (500 μ M). B. RNA electrophoresis in 1% agarose gel. 23S rRNA and 16S rRNA are indicated by arrows.

리 진행되었으며 6일이 경과한 후에는 23S와 16S rRNA가 거의 보이지 않을 정도로 분해되었다. 하지만 비특이적인 RNA 분해효소에 의해 매우 작은 크기로 분해되는 것과는 다르게 일정한 크기가 유지되면서 분해되는 것이 관찰되었다. 이를 통해 VBNC 상태의 세포는 유전정보인 유전체 DNA는 상대적으로 잘 보존하면서 유리한 환경이 올 때까지 생존에 꼭 필요한 대사활동을 유지하기 위하여 생육력 유지에 불필요한 RNA는 분해하는 것으로 추정하였다.

VBNC 미생물의 형태

대장균의 VBNC 형태를 관찰하기 위하여 한국기초과학지원연구원의 생물전용 투과전자현미경 장비를 사용하였다. CuSO_4 처리에 의해 유도된 VBNC 미생물은 대조군에 비해 주변세포질(periplasmic space)이 온전하지 못하며 세포 외막과 세포 내막이 분리되는 특징과 세포 내 물질의 양이 현저히 감소되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 이는 필수 유전자와 단백질을 제외한 세포 내 물질을 제거하여 대사량을 최소한으로 유지하며 장기 생존을 대비하고자 하는 VBNC 고유의 특성 때문으로 생각되었다. Cu 처리 6일째와 12일째를 관찰하였는데 12일째의 미생물에서 더 심한 형태의 변화가 관찰되었다.

VBNC 미생물의 외형을 더 잘 관찰하기 위해 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 사용한 다른 연구팀의 연구결과를 통해, *Erwinia amylovora*의 경우 정상 상태에서는 막대형이지만 VBNC 상태에서는 외막이 보다 두꺼워지고 세포의 크기가 조금 더 커지며 형태의 변형이 확인되었고, *Vibrio* 속 균주에서는 막대형에서 원형으로의 형태 변형 등이 보고되었다[13, 18].

세포 소생에 대한 결과

VBNC 상태의 세포가 죽은 것이 아니라 살아있다는 가장 확실한 증거는 세포소생이다. 이를 확인하기 위해 기존의 알

려져 있는 방법을 모두 사용하였다. VBNC를 유도하는데 사용한 Cu를 EDTA를 사용하여 제거한 후 0.9% NaCl에 현탁하고 날짜별로 LB 고체배지에 도말하여 성장성을 확인하였으나 소생되어 형성된 집락이 관찰되지 않았다. EDTA 보다 Cu를 제거하는데 더욱 효과적이라고 보고된 배즙, King's Broth media를 이용하였으나 역시 세포소생은 확인할 수 없었다[13].

세포소생에 관해서는 여러 주장이 있다. 단순히 가한 스트레스를 제거하는 것만으로도 세포소생이 일어난다는 보고[6], 세포소생시 사용되는 영양배지에서 활성 산소나 라디칼이 만들어져 VBNC 세포에 독성이 있기 때문에 이를 제거하는 물질을 함께 넣어주면 세포소생이 된다는 보고[20]. 또한 세포소생에 관여하는 신호물질이 있고 이를 통해 세포소생이 일어난다는 보고 등이 있다[15]. 반면 최근의 연구결과에서 *E. coli*에 대해 위에서 언급한 모든 방법을 사용해보아도 세포소생이 잘 되지 않았다는 보고가 있으며[2] 이는 우리의 연구결과와 일치하는 것이다.

VBNC에 대해 가장 많은 연구가 진행된 것은 *Vibrio*속의 균주로서, VBNC를 유도하는 여러 환경적 조건에서부터 세포소생에 이르기까지 많은 연구가 진행되어 있다[12, 17]. 반면 *E. coli*의 경우 vibrio 균주에 비해 아직 연구가 많이 진행되지 않아 지속적 연구가 필요하다. 또한 병원성 세균의 경우에도 VBNC상태에 들어간다고 알려져 있는데 이러한 VBNC 상태의 병원성 미생물 중 일부는 병원성을 유지하고 있다는 연구결과가 있다. VBNC 미생물을 접종한 쥐가 죽거나 VBNC 미생물이 들어있는 물을 섭취한 쥐가 죽었다는 보고가 있다[8]. 이처럼 VBNC 미생물은 공중위생상 매우 중요하기 때문에 유도와 관련한 분자생물학적 기작과 그 특성에 관한 기초 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 *E. coli*에 CuSO_4 를 처리해 VBNC 상태를 유도하고 이의 특성을 조사하였다. 그 결과, VBNC 상태의 세포는 g-DNA는 상대적으로 적게 붕괴되고 RNA는 빠른

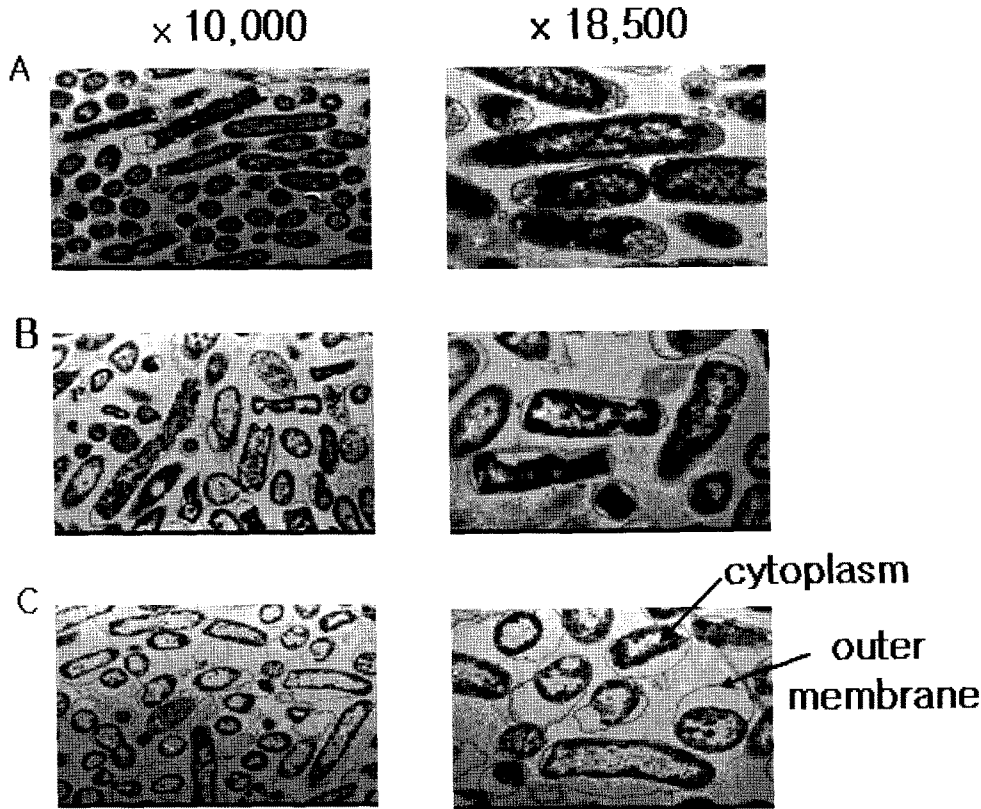


Fig. 4. Bio-TEM images of *E. coli* KCTC 2134 with and without CuSO₄. A. Control, without CuSO₄ B. 6 days with CuSO₄ (500 μM) C. 12 days with CuSO₄ (500 μM). *E. coli* with CuSO₄ treated showed reduced amount of cytosol and its inner and outer membranes were separated compared with control.

속도로 붕괴가 일어났으며 특히 특정 크기로 붕괴됨을 관찰하였다. 세포의 내막과 외막은 분리되었고 세포질의 양은 현저하게 줄어들었다. 이러한 결과를 통해 VBNC 세포가 대사 활성을 최대한으로 억제하되 유전정보는 상대적으로 잘 보호하고 있음을 알 수 있다. 아직까지 *E. coli* 균주의 VBNC 상태에 대한 유전적, 분자생물학적 정보는 명확히 밝혀져 있지 않아서 향후 본 연구팀은 VBNC *E. coli*에서 특이적으로 발현되는 유전자나 VBNC 상태를 유도하는 유전자를 찾는 연구를 진행할 계획이다.

genomic DNA와 RNA를 분리하고 이들의 안정성을 관찰하였는데 DNA에 비해 RNA의 붕괴가 많이 진행되었음을 확인할 수 있었고 RNA의 붕괴는 특정크기로 붕괴되는 것으로 관찰되었다. 또한 생물전용 투과전자현미경(Bio-Transmission Electron Microscope, Bio-TEM)을 통해 VBNC 세포의 형태를 관찰하였는데 VBNC 상태에서는 정상상태에 비해 periplasmic space가 온전하지 못하고 세포 내막과 세포 외막이 분리되었으며 세포질의 양이 현저히 감소됨이 관찰되었다.

요 약

VBNC(Viable but nonculturable)란 생존에 불리한 환경 하에서 살아 있으나 일반 영양배지에서 자라지 못하는 미생물의 상태를 나타낸다. 본 연구는 구리를 이용해 *Escherichia coli*에서 VBNC를 유도하고 이의 특성을 살펴보았다. 구리를 처리한 후 전통적인 평판 배양법에 의한 집락 형성계수(colony forming unit, CFU)를 측정한 결과 배양되지는 않으나, Live/Dead BacLight bacterial viability kit 염색 후 유세포계수기로 측정한 결과 살아있는 미생물로 계수되어 VBNC 상태가 확인하였다. VBNC 유도된 미생물로부터

감사의 글

본 연구는 2007년 바이오 측정표준 확립을 위한 신개념 바이오 측정기술(공공기술연구회, 연구책임자: 박상열) 세부 과제로 수행되었습니다. 또한 생물전용 투과전자현미경의 사용 및 관찰을 도와주신 한국기초과학연구소의 권희석 박사님께 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Alexander, E., D. Pham, and T. R. Steck. 1999. The viable-

- but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3754-3756.
2. Arana, I., M. Orruno, D. Perez-Pascual, C. Seco, A. Muela, and I. Barcina. 2007. Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**: 1-11.
 3. Beumer, R. R., J. de Vries, and F. M. Rombouts, 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 153-163.
 4. Day, A. P. and J. D. Oliver. 2004. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J. Microbiol.* **42**: 69-73.
 5. Grey, B. and T. R. Steck. 2001. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5325-5327.
 6. Gupte, A. R., C. L. De Rezende, and S. W. Joseph. 2003. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6669-6675.
 7. Heim, S., M. M. Lleo, B. Bonato, C. A. Guzman, and P. Canepari. 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.
 8. Jones, D. M., E. M. Sutcliffe, and A. Curry. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2477-2482.
 9. Keep, N. H., J. M. Ward, G. Robertson, M. Cohen-Gonsaud, and B. Henderson. 2006. Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2555-2559.
 10. Lleo, M. M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto, and P. Canepari. 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4564-4567.
 11. Muela, A., C. Seco, E. Camafeita, I. Arana, M. Orruno, J. A. Lopez, and I. Barcina. 2008. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**: 28-36.
 12. Oliver, J. D., L. Nilsson, and S. Kjelleberg. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2640-2644.
 13. Ordax, M., E. Marco-Noales, M. M. Lopez, and E. G. Biosca. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3482-3488.
 14. Porter, J., C. Edwards, and R. W. Pickup. 1995. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 399-408.
 15. Pujol, M., E. Badosa, and E. Montesinos. 2007. Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 186-193.
 16. Signoretto, C., M. M. Lleo, and P. Canepari. 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* **44**: 125-131.
 17. Smith B. and J. D. Oliver. 2006. In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1445-1451.
 18. Vattakaven, T., P. Bond, G. Bradley, and C. B. Munn. 2006. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6508-6513.
 19. Vora, G. J., C. E. Meador, M. M. Bird, C. A. Bopp, J. D. Andreadis, and D. A. Stenger. 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 19109-19114.
 20. Wai, S. N., Y. Mizunoe, A. Takade, and S. Yoshida. 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.
 21. Whitesides, M. D. and J. D. Oliver. 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1002-1005.
 22. Xu, H. S., N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, and R. R. Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313-323.

(Received June 24, 2008/Accepted Aug. 5, 2008)