

RAMILA CRISTIANE RODRIGUES

**ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL EM *Salmonella enterica* SOROVAR
ENTERITIDIS DEFICIENTE NA SÍNTESE DE (p)ppGpp**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

RAMILA CRISTIANE RODRIGUES

**ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL EM *Salmonella enterica* SOROVAR
ENTERITIDIS DEFICIENTE NA SÍNTESE DE (p)ppGpp**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA EM: 08 de agosto de 2012

Marisa Vieira de Queiroz

Hilário Cuquetto Mantovani

Renata Aparecida Mendes

Maria Cristina Dantas Vanetti
(Coorientadora)

Míriam Teresinha dos Santos
(Orientadora)

À minha família, ao meu amor e aos amigos por todo apoio e incentivo.

DEDICO

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. “Porque d’Ele, e por Ele e para Ele são todas as coisas”.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela qualidade de ensino e infraestrutura para realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^ª. Míriam Teresinha dos Santos pela orientação, profissionalismo, competência e dedicação.

À Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti pelos anos de orientação e ensinamentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional.

Aos membros da banca Marisa Vieira de Queiroz, Hilário Cuquetto Mantovani e Renata Aparecida Mendes pelas sugestões que contribuíram pelo aprimoramento do trabalho.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela disponibilidade, sugestões e ajuda nas observações das amostras por microscopia de força atômica.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, que tanto contribuíram para a construção do meu conhecimento.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos dos laboratórios de Alimentos e Genética de Micro-organismos pelo apoio, troca de experiências, amizade e excelente convívio.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência, incentivo, dedicação e por todas as oportunidades que vocês me proporcionaram.

Ao meu amor, Evandro Martins, grande incentivador do meu crescimento profissional. Obrigada por compreender minha ausência, me apoiar e ensinar que um relacionamento só se constrói em cima de bases sólidas. Tenho a certeza que o olhar, o abraço e as demonstrações de afeto me deram força e entusiasmo para realização deste

trabalho. Aqui e para sempre eternizo a minha admiração e a minha enorme felicidade em poder compartilhar com essa pessoa tão maravilhosa os momentos mais marcantes da minha vida. Obrigada por me fazer tão feliz.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

RAMILA CRISTIANE RODRIGUES, filha de Sebastião Carlos Rodrigues e Elza Maria dos Santos Rodrigues, nasceu na cidade de Viçosa-MG, em 06 de setembro de 1984.

Em 2006 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, tornando-se bacharel em 23 de julho de 2010.

Em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, nível de mestrado, orientada pela Prof^ª. Míriam Teresinha dos Santos, na linha de pesquisa qualidade microbiológica dos alimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O patógeno <i>Salmonella</i>	3
2.2. Estratégias de sobrevivência de <i>Salmonella enterica</i> a condições de estresse	5
2.3. A resposta severa	7
2.4. Estado viável não cultivável (VNC)	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo	21
3.2. Quantificação relativa da expressão dos genes <i>mreB</i> e <i>rpoS</i>	21
3.2.1. Extração e purificação de RNA	22
3.2.2. Análise pela técnica de qRT-PCR	23
3.3. Indução ao estado viável não cultivável	24
3.4. Determinação da culturabilidade e da viabilidade celular	25
3.5. Caracterização morfológica	26
3.5.1. Obtenção das células para o preparo dos espécimes	26
3.5.2. Microscopia eletrônica de varredura	27
3.5.3. Microscopia de força atômica	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Expressão dos genes <i>mreB</i> e <i>rpoS</i> das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em condição de estresse nutricional e choque frio	29
4.2. Indução das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp ao estado viável não cultivável	31
4.3. Morfologia celular de <i>Salmonella</i> Enteritidis selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp	37
4.3.1. Células em fase logarítmica de crescimento	37

4.3.2. Células no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio	40
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo proposto para a síntese de (p)ppGpp por RelA	9
Figura 2. Modelo proposto para a síntese e degradação de (p)ppGpp por SpoT	10
Figura 3. Mecanismo de ação de (p)ppGpp sobre a RNA polimerase	11
Figura 4. Expressão relativa dos genes <i>mreB</i> e <i>rpoS</i> , avaliada por PCR em tempo real, das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp submetidas a estresse nutricional e choque frio em diferentes tempos	29
Figura 5. Culturabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS a 4 °C	32
Figura 6. Culturabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C	33
Figura 7. Viabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS a 4 °C	33
Figura 8. Viabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C	34
Figura 9. Imagens 3D de células das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento obtidas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina	38

Figura 10. Micrografias de células das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de policarbonato	39
Figura 11. Imagens 3D de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS a 4 °C observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina	41
Figura 12. Micrografias de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS a 4 °C observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de policarbonato	42
Figura 13. Imagens 3D de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagens e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina ..	43
Figura 14. Micrografias de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescido de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de policarbonato ..	44
Figura 15. Perfil topográfico das células das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados para realização do qRT-PCR	23
Tabela 2.	Culturabilidade e viabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp, mantidas em solução BPS a 4 °C, no momento da inoculação e no estado VNC	34
Tabela 3.	Culturabilidade e viabilidade das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp, mantidas em solução BPS adicionada de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C, no momento da inoculação e no estado VNC	35
Tabela 4.	Dimensões celulares das estirpes de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica e no estado VNC após indução em solução BPS e em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio, estimadas por meio de microscopia de força atômica	45

RESUMO

RODRIGUES, Ramila Cristiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto, 2012.

Estado viável não cultivável em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis deficiente na síntese de (p)ppGpp. Orientadora: Míriam Teresinha dos Santos. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Uelinton Manuel Pinto.

Salmonella enterica é um patógeno de origem alimentar capaz de entrar no estado viável não cultivável em resposta a condições ambientais adversas. *S. enterica* é capaz de produzir (p)ppGpp, um nucleotídeo responsável pelo controle da expressão gênica no nível da transcrição e da tradução, em condições de estresse nutricional. Em razão da expressão gênica determinada pelo acúmulo de (p)ppGpp, *S. enterica* suporta condições ambientais variadas. Este trabalho teve como objetivos: quantificar por PCR em tempo real a expressão dos genes *mreB*, relacionado ao citoesqueleto e, *rpoS*, que codifica genes de resposta ao estresse, de estirpes mutantes simples e duplo da *Salmonella* Enteritidis PT4 578 deficientes na síntese de (p)ppGpp, em razão de mutação no gene *relA*, que codifica uma GTP pirofosfoquinase, e, ou *spoT*, que codifica guanosina-3',5'-difosfato 3'-pirofosfohidrolase submetidas aos estresses nutricional e choque frio; induzir essas estirpes ao estado VNC em solução fosfato de Butterfield (BPS) acrescida ou não de cloreto de sódio a 4 °C e avaliar a morfologia dessas estirpes em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC. A expressão do gene *mreB* foi reduzida para ambas as estirpes mutantes (simples e duplo) após 25 dias em condição de estresse. No entanto, o mutante duplo apresentou um aumento na expressão do gene *rpoS* após 25 dias nesta mesma condição de estresse. As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes entraram no estado VNC após incubação em BPS acrescido ou não de cloreto de sódio a 4 °C em diferentes tempos. Estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes simples e duplo em fase logarítmica de crescimento apresentaram células filamentosas. Em vez disso, células VNC de mutantes simples e duplo mostraram redução no diâmetro, volume e comprimento e também transição da forma bacilar para a forma cocoide. Concluiu-se que a expressão dos genes *mreB* e *rpoS* das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes simples e duplo difere da estirpe selvagem. Houve também mudança da morfologia entre as células da fase log e células VNC das estirpes mutantes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. No entanto, a molécula de (p)ppGpp não é importante para indução e permanência no estado VNC desta bactéria.

ABSTRACT

RODRIGUES, Ramila Cristiane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012.

Viable nonculturable state in *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis deficient in (p)ppGpp synthesis. Advisor: Míriam Teresinha dos Santos. Co-advisors: Maria Cristina Dantas Vanetti and Uelinton Manuel Pinto.

Salmonella enterica is a foodborne pathogen able to enter in viable but nonculturable state (VNC) in response to adverse environmental conditions. *S. enterica* is capable to produce (p)ppGpp, a nucleotide responsible for controlling gene expression at the level of transcription and translation in nutritional stress conditions. Due to gene expression determined by the accumulation of (p)ppGpp, *S. enterica* supports various environmental conditions. The aims of this work were to quantify by real time PCR the expression of the genes *mreB*, related to the cytoskeleton, and *rpoS*, which codifies stress response genes, in single and double mutants of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 deficient in the synthesis of (p)ppGpp, due to the mutation on gene *relA*, which codifies a GTP pyrophosphokinase, and, or *spoT*, which codifies guanosine-3',5'-diphosphate 3'-pyrophosphohydrolase, submitted to nutritional stress and cold shock; to induce these strains to VNC state in Butterfield phosphate solution (BPS), in the absence or presence of sodium chloride at 4 °C and to evaluate the morphology of these strains in logarithmic growth phase and in VNC state. The expression of gene *mreB* was reduced in both mutant strains (single and double) after 25 days in stress condition. However, the double mutant presented an increase in *rpoS* gene expression after 25 days in the same stress condition. Wild and mutant strains of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 entered in VNC state after incubation in BPS in the absence or presence of sodium chloride at 4 °C, in different periods of time. Single and double mutant strains of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 in logarithmic growth phase presented filamentous cells. On the other hand, VNC cells of single and double mutants showed a reduction in diameter, volume and length and also transition from bacillary to coccoid form. In conclusion, the expression of *mreB* and *rpoS* genes in single and double mutant strains of *Salmonella* Enteritidis PT4 578 was different when compared to the wild strain. There was also alteration in the morphology of cells in log phase when compared to the VNC cells of mutant strains of *Salmonella* Enteritidis PT4 578. However, the (p)ppGpp molecule is not essential for induction and permanence of this bacterium in VNC state.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é um patógeno causador de doenças de origem alimentar em humanos e animais de sangue quente. Infecções causadas por esse micro-organismo resultam em febre entérica e salmonelose não tifoide. *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis destaca-se entre os mais de 2500 sorovares de *Salmonella* identificados por estar mais frequentemente associado a surtos de salmonelose em humanos.

Para sobreviver às condições de estresse do hospedeiro e realizar, com sucesso, todas as etapas do processo infeccioso, *S. enterica* requer a expressão de genes de virulência, expressos na entrada da fase estacionária e de maneira dependente da molécula sinal de resposta severa, ppGpp (guanosina 3',5'- bispirofosfato) e pppGpp (guanosina 3'-difosfato, 5'-trifosfato). O (p)ppGpp é um nucleotídeo de baixa massa molecular sintetizado por duas enzimas, RelA (GTP pirofosfoquinase) e SpoT (guanosina-3',5'-difosfato 3'-pirofosfohidrolase) que se acumula em condições de estresse nutricional, um mecanismo conhecido como resposta severa.

Em razão da expressão gênica determinada pelo acúmulo de (p)ppGpp, *S. enterica* suporta condições ambientais variadas. Em condições de estresse intenso, o patógeno pode adotar como estratégia de sobrevivência a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado estado viável não cultivável (VNC). Neste estado de latência, as células não apresentam crescimento em meios bacteriológicos de análise em que normalmente crescem e formam colônias, mas encontram-se vivas e metabolicamente ativas. A presença de células no estado VNC em alimentos é um problema de saúde pública preocupante, visto que nestas condições os micro-organismos não podem ser detectados em análises microbiológicas convencionais, porém ao entrarem em contato com fatores presentes no hospedeiro, podem retomar a culturabilidade e manter a virulência.

Células no estado VNC apresentam diversas mudanças fisiológicas e morfológicas. Dentre as alterações morfológicas destacam-se redução de tamanho e transição para a forma cocóide. Técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) têm sido utilizadas para observação da morfologia de células no estado VNC.

O método de PCR em tempo real tem sido amplamente utilizado para demonstrar a transcrição de genes de células no estado VNC. A síntese de mRNA não cessa em células nessa condição, o que confirma que as células mantêm a expressão gênica continuada e permanecem ativas metabolicamente.

A indução de células deficientes na síntese de (p)ppGpp ao estado VNC em condições de estresse osmótico já foi investigada em *Escherichia coli*, porém não há relatos na literatura que correlacionem VNC e (p)ppGpp em *Salmonella* sorovar Enteritidis em diferentes condições de indução a esse estado de dormência. As modificações morfológicas de células deficientes na síntese desse nucleotídeo no estado VNC não foram descritas na literatura, bem como a expressão de genes relacionados ao citoesqueleto e à resposta a estresse dessas células em condições de estresse nutricional.

Considerando a importância de se ampliar os conhecimentos sobre mecanismos de resistência e sobrevivência de *Salmonella* a condições adversas e compreender as alterações morfológicas e metabólicas de células deficientes na síntese de (p)ppGpp no estado VNC, os objetivos desse trabalho foram caracterizar a expressão dos genes *mreB* e *rpoS* de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 deficientes na síntese de (p)ppGpp, bem como induzir ao estado VNC e caracterizar morfológicamente essas células nesse estado e em fase logarítmica de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O patógeno *Salmonella*

Salmonella são bacilos gram-negativos, não formadores de esporo, anaeróbios facultativos, mesófilos, sendo a maioria móvel por meio de flagelos peritríquios e pertencentes à família Enterobacteriaceae (JAMES *et al.*, 2005; WAN NORHANA *et al.*, 2010). É um dos patógenos mais prevalentes e responsável por causar doenças de origem alimentar em todo o mundo. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, mais de um milhão de casos de infecção são causados por esse micro-organismo, ocasionando a morte de mais de 300 pessoas ao ano (CDC, 2011). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do total de surtos notificados ocorridos entre os anos de 1999 a 2008, 21,03% estavam associados à presença de *Salmonella* (BRASIL, 2008).

Atualmente, o gênero *Salmonella* encontra-se dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (REEVES *et al.*, 1989). Com base em sorotipagem, mais de 2500 sorovares de *Salmonella* já foram identificados, sendo que a maioria apresenta um grau de semelhança genética muito grande (POPOFF *et al.*, 2001; POPOFF, BOCKEMÜHL, e GHEESLING, 2003; HUR *et al.*, 2012). Dos sorovares identificados, mais de 99% são agrupados na espécie *S. enterica*, que é dividida em seis subespécies: *enterica*, *houtanae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *salamae* (WHO, 2007; BRENNER *et al.*, 2000).

A maioria das infecções causadas por *Salmonella* está associada à ingestão de alimentos contaminados, principalmente ovos, produtos a base de ovos, carne de frango, carne de porco, produtos lácteos, frutas e legumes (WAN NORHANA *et al.*, 2010; HUR *et al.*, 2012). Infecções causadas por *Salmonella* resultam desde síndromes brandas até casos mais graves, como os causados por *S. enterica* Typhi e Paratyphi, exclusivamente em humanos constituindo uma doença denominada febre entérica, que tem uma taxa de mortalidade alta (EFSA-ECDC, 2007). Nas salmoneloses não tifoides, causadas pelos demais sorovares, a pessoa infectada pode apresentar quadros de diarreia, febre, vômitos e dores abdominais que ocorrem entre 12 a 72 horas após o consumo de alimentos contaminados com gravidade variável (JAY *et al.*, 2005). *S.*

enterica subespécie *enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis são os sorovares mais frequentemente associados a surtos de salmonelose não tifoide em humanos (FINSTAD *et al.*, 2011).

Durante o processo infeccioso, *S. enterica* pode colonizar o trato intestinal e atingir o baço, o fígado e a medula óssea por meio da circulação linfática e sanguínea. A partir da ingestão, as bactérias sobrevivem ao pH do estômago, penetram o epitélio intestinal resultando em sintomas de diarreia com perda de eletrólitos, hemorragias, inflamação localizada e necrose. A passagem da bactéria através do revestimento intestinal é iniciada pela invasão bacteriana em enterócitos e células M das placas de Peyer, alcançando o tecido linfoide, local onde as células são logo internalizadas por macrófagos e linfócitos. Dentro de macrófagos ocorre a multiplicação do patógeno e o transporte de células para alcançar outros tecidos do hospedeiro, fenômeno denominado translocação. Os macrófagos infectados liberam grandes quantidades de citocinas do tipo α -TNF (fator α de necrose tumoral) e IL-1 (interleucina 1), responsáveis pelos sintomas de febre (MARCUS *et al.*, 2000; HANSEN-WESTER e HENSEL, 2001; SONG *et al.*, 2004).

A sobrevivência de *S. enterica* às condições estressantes do hospedeiro e o sucesso das etapas do processo de infecção requerem a expressão de vários genes agrupados em ilhas genômicas localizadas no cromossomo ou em plasmídeos, denominados Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI), certamente adquiridas por transferência horizontal gênica (MARCUS *et al.*, 2000). Dezessete SPIs já foram identificadas em *Salmonella*, sendo que as funções de SPI-1 e SPI-2, importantes no processo de virulência, têm sido mais extensivamente estudadas. SPI-1 codifica genes envolvidos na invasão de células do epitélio intestinal e SPI-2 codifica genes essenciais para a replicação na célula hospedeira (HUR *et al.*, 2012). Ambas, SPI-1 e SPI-2 codificam sistemas de secreção do tipo III (TTSS) requeridos para o processo de invasão celular (SONG *et al.*, 2004). Estudos sugerem que esses genes são coordenadamente regulados para garantir a sobrevivência e a propagação de *Salmonella* dentro do hospedeiro (ALTIER, 2005).

A virulência de *Salmonella* também é conferida pela expressão de genes localizados em plasmídeos, encontrados em sorovares de *S. enterica* pertencentes à subespécie *enterica*. Os plasmídeos de virulência de *Salmonella* variam em tamanho de 50-100 kb e os genes presentes no operon *spvRABCD* estão envolvidos na

sobrevivência de *Salmonella* no interior de macrófagos e no aumento da severidade da doença (RYCHLIK *et al.*, 2006).

Devido à importância de *Salmonella* como patógeno e associação em surtos, a legislação brasileira estabelece como padrão a ausência deste micro-organismo em 25 gramas de produto, ou seja, a contaminação de alimentos por este patógeno, independente da carga microbiana presente, os torna impróprios para o consumo (BRASIL, 2001).

Em condições ótimas de temperatura, pH, concentração de nutrientes, de oxigênio ou de solutos, *S. enterica* apresenta taxa de crescimento máxima. Entretanto, variações nessas condições podem alterar a taxa de crescimento máxima, representando uma condição de estresse para célula microbiana. *S. enterica* é capaz de sentir e responder rapidamente a diferentes estresses. A resposta a essas condições não afeta apenas o crescimento e a sobrevivência, mas influencia a virulência e a resistência a diversos antimicrobianos (SPECTOR e KENYON, 2012).

2.2. Estratégias de sobrevivência de *Salmonella enterica* a condições de estresse

Em condições de estresse devido à limitação por nutrientes, como carbono, fósforo e/ou nitrogênio, *Salmonella* depende de diferentes respostas fisiológicas para sobrevivência. Em carência de fonte de carbono, há alterações genéticas e fisiológicas referidas como resposta ao estresse nutricional (SSR – *Starvation Stress Response*). Nas primeiras horas de limitação de carbono, a célula evita a escassez nutricional por meio da regulação da utilização de fontes alternativas de carbono. Em razão da SSR, a célula microbiana altera o metabolismo celular, adotando estratégias como: (i) alteração do sistema de transporte de substrato para captação de nutrientes necessários do ambiente; (ii) síntese de enzimas para utilização de componentes celulares, como RNA, proteínas ribossômicas, lipídeos e peptidoglicano; (iii) produção de enzimas mais eficientes para o metabolismo de fontes de carbono remanescentes; (iv) síntese de proteínas de condensação cromossômica, protegendo a célula de danos; (v) síntese de enzimas que modificam componentes da membrana plasmática, do peptidoglicano e da membrana externa (tipo e quantidade de ácidos graxos e lipídeos de membrana ou lipopolissacarídeos da membrana externa) e (vi) síntese de enzimas para prevenir ou

reparar danos celulares como resultado da condição de estresse do ambiente (SPECTOR e KENYON, 2012).

Em *Salmonella Typhimurium*, a SSR é regulada em nível global, por 3',5' monofosfato de adenosina (cAMP) com a sua proteína de receptora (CRP), ppGpp (guanósina 3',5'- bispírofosfato) e pppGpp (guanósina 3'-difosfato, 5'-trifosfato) e dois fatores sigma, σ^S e σ^E . Durante a SSR, as concentrações intracelulares de cAMP e (p)ppGpp se elevam (GÖRKE e STÜLKE, 2008). Assim, a formação do complexo cAMP-CRP permite ativar ou reprimir a expressão de vários genes em resposta à diminuição na concentração de glicose. Alguns desses genes estão envolvidos no transporte e utilização de fontes alternativas de carbono (SPECTOR, 1998). A molécula sinal (p)ppGpp e a proteína cofatora DksA regulam a expressão de genes durante a escassez de carbono na fase estacionária (HENARD *et al.*, 2010).

O fator σ^S , também denominado RpoS, regula genes em resposta geral ao estresse, ativando até 500 genes durante escassez nutricional e em resposta a mudanças no ambiente de um hospedeiro (HENGGE, 2009). Genes controlados pelo fator σ^S desempenham diversas funções como proteção contra estresse oxidativo, contra danos no DNA, osmoproteção, virulência, modificações morfológicas e termotolerância (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994; WEBER *et al.*, 2005;). O fator σ^E desempenha função relacionada à sobrevivência na fase estacionária e à resistência ao estresse oxidativo (TESTERMAN *et al.*, 2002).

Em resposta ao estresse osmótico, a célula bacteriana tenta manter a pressão de turgor apropriada pelo aumento ou diminuição da concentração de solutos no citosol e, ou periplasma. Em concentrações osmóticas altas, ocorre um movimento de moléculas de água através da membrana plasmática, ocasionando a perda de água a partir do citoplasma (DELAMARCHE *et al.*, 1999). O sistema de transporte de íons K^+ é induzido, resultando em acúmulo intracelular rápido destes íons. O aumento de íons K^+ é substituído pelo acúmulo de outros solutos compatíveis, moléculas polares e solúveis que não afetam as funções normais da célula. Esses compostos osmoprotetores incluem prolina, betaína, glicina, ectoína, trealose, colina e carnitina (BREMER e KRÄMER, 2000; POOLMAN *et al.*, 2002). Esses compostos são transportados do ambiente extracelular para dentro da célula ou sintetizados pela célula (ROEßLER e MÜLLER, 2001). A síntese de proteínas requeridas para o transporte de solutos compatíveis é controlada pelo fator σ^S . Se não há solutos compatíveis disponíveis para o transporte ou

se a quantidade não é suficiente para equilibrar a pressão osmótica, *Salmonella* sintetiza o dissacarídeo trealose como osmoprotetor. O operon *otsBA*, que codifica as enzimas responsáveis pela produção de trealose, trealose-6-fosfato sintase e trealose-6-fosfato fosfatase, é controlado pelo fator σ^S (HENGGE, 2008; DU *et al.*, 2011).

As bactérias possuem sistemas sensoriais para regular processos fisiológicos complexos com a finalidade de monitorar e se adaptar ao ambiente em que se encontram. Em condições extremas, a sobrevivência depende de mecanismos de adaptação como, por exemplo, a resposta severa (CHATTERJI e OJHA, 2001).

2.3. A resposta severa

A resposta severa (*stringent response*) é um mecanismo de sobrevivência da bactéria induzido quando nutrientes, como aminoácidos, carbono, nitrogênio e fosfato, são limitados ou em condições de estresse que ameaçam sua sobrevivência. Nessas condições, a bactéria pode economizar nutriente pela diminuição do metabolismo até que as condições necessárias ao crescimento sejam retomadas (WU e XIE, 2009). Sinais ambientais provocam mudanças na expressão gênica por meio de mecanismos de regulação da transcrição, como sistema de dois componentes, fatores sigma alternativos e repressores de transcrição. A percepção dos sinais ambientais e a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse e à virulência são cruciais para garantir a sobrevivência e a virulência de *S. enterica* (SHEN e FANG, 2012).

Muitos ambientes naturais, como oceanos, rios, aquíferos e solos são considerados ambientes pobres em nutrientes, porém capazes de abrigar determinados micro-organismos. Espécies de *Pseudomonas* são encontradas em solos, em que a matéria orgânica varia de 0,8 a 2,0%, e têm a capacidade de persistir por longo período em condições de limitação nutricional (MATIN, 1996). Bactérias patogênicas intracelulares, durante o processo de invasão, encontram ambientes com limitação de nutrientes no interior de macrófagos (SPECTOR e KENYON, 2012). Na indústria de alimentos, os processos de higienização de utensílios e equipamentos removem resíduos de alimentos, ocasionando uma condição de limitação da disponibilidade de nutrientes para os micro-organismos (SIMÕES, SIMÕES e VIEIRA, 2010).

Em resposta a estes diferentes estresses nutricionais, Cashel e Gallant (1969) demonstraram que há produção de ppGpp (guanosina 3',5'- bispirofosfato) e pppGpp (guanosina 3'-difosfato, 5'-trifosfato). Durante o crescimento em condições ideais, somente uma pequena quantidade de (p)ppGpp é produzida e esta molécula pode ser hidrolisada pela enzima (p)ppGpp pirofosfatase. Porém, em condições de escassez nutricional, grande quantidade de (p)ppGpp é produzida favorecendo a resistência das bactérias (CHATTERJI e OJHA, 2001).

A quantidade de (p)ppGpp produzida pela célula é modulada por duas classes de enzimas: uma enzima monofuncional sintetase e uma enzima bifuncional sintetase/hidrolase. Em *E. coli*, a enzima monofuncional foi denominada RelA e a bifuncional SpoT (DALEBROUX *et al.*, 2010).

O (p)ppGpp é um nucleotídeo de baixa massa molecular cuja síntese é regulada pela razão entre aminoacil tRNA e tRNA descarregado (HASELTINE e BOCK, 1973). Quando tRNA descarregado se encontra no sítio A da subunidade ribossomal 50S, a síntese proteica é paralisada e resulta em uma atividade progressiva de RelA e, conseqüentemente, síntese de (p)ppGpp (CHATTERJI e OJHA, 2001). RelA catalisa uma reação de fosforilação enzimática entre GDP e GTP a ppGpp e pppGpp, respectivamente, no qual ATP é usado como doador de fosfato. Devido a sua atividade catalítica, RelA é considerada uma (p)ppGpp sintetase (WU e XIE, 2009).

Um modelo para a síntese de (p)ppGpp mediada por RelA é apresentado na figura 1. Em condições de escassez de aminoácidos há um aumento na quantidade de tRNA descarregado na célula, que se liga fracamente ao sítio A do ribossomo, bloqueando-o (Figura 1A). RelA detecta o ribossomo bloqueado devido ao aumento da extensão do mRNA 3', que pode estimular a ligação de RelA (Figura 1B). Em seguida, RelA converte ATP e GTP a ppGpp e AMP na presença de tRNA descarregado no sítio A (Figura 1C). A síntese de (p)ppGpp por RelA não afeta a quantidade de tRNA descarregado ligado ao sítio A; a liberação do tRNA descarregado do sítio A seria um preparo deste sítio para a ligação do complexo ternário, quando não há mais condições de escassez de aminoácidos. Wendrich e colaboradores (2002) notaram que a fraca interação do tRNA descarregado com o sítio A é suficiente para a síntese de (p)ppGpp. RelA se liga ao ribossomo na ausência de (p)ppGpp, entretanto, a síntese de (p)ppGpp reduz significativamente a ligação de RelA ao ribossomo. Esses autores sugeriram que a conversão enzimática de ATP e GTP para (p)ppGpp é requerida para que haja uma

mudança conformacional de RelA, reduzindo sua afinidade pelo ribossomo. Após a síntese de (p)ppGpp, RelA se movimenta para o próximo ribossomo e a síntese de (p)ppGpp é repetida (Figura 1D). Concentrações elevadas de (p)ppGpp ativam a resposta severa. Após a interrupção da condição de estresse, tRNAs aminoacilados apresentam uma maior afinidade pelo sítio A do ribossomo, permitindo o deslocamento do tRNA descarregado do sítio A, reativando o processo de tradução (Figura 1E).

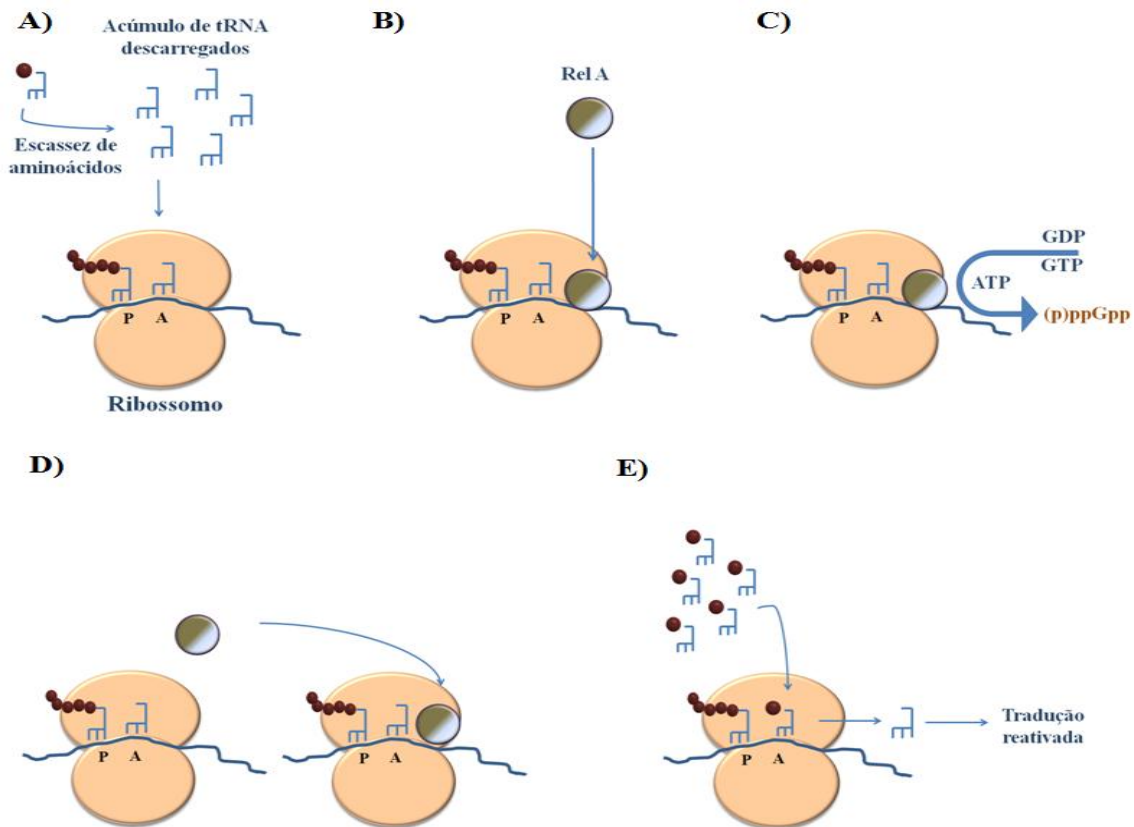


Figura 1. Modelo proposto para a síntese de (p)ppGpp por RelA. Modificado de POTRYKUS e CASHEL (2008).

A enzima bifuncional SpoT responde a uma variedade de estímulos, como escassez de carbono, fosfato, metais e alterações no metabolismo de ácidos graxos. SpoT responde à inibição do metabolismo de ácidos graxos por meio de uma proteína acil carreadora (ACP), em que a interação entre (p)ppGpp e ACP é influenciada pela proporção da proteína ACP acilada e não acilada, permitindo à bactéria modular a biossíntese de ácidos graxos na célula (POTRYKUS e CASHEL, 2008). A proteína ACP transfere cadeias de ácidos graxos a enzimas responsáveis pela biossíntese de

fosfolipídeos e metabólitos secundários. SpoT interage com ACP em uma região não enzimática conhecida como domínio TGS. Durante a escassez de ácidos graxos, sinais metabólicos são enviados por meio da interação de ACP-SpoT, resultando em um aumento nas concentrações de (p)ppGpp. A interação ACP-SpoT modula tanto a atividade de sintetase (SD) quanto de hidrolase (HD) de (p)ppGpp (Figura 2). A hidrólise de (p)ppGpp regenera GTP ou GDP por uma reação dependente de íons Mn^{2+} , liberando pirofosfato (POTRYKUS e CASHEL, 2008; DALEBROUX *et al.*, 2010).

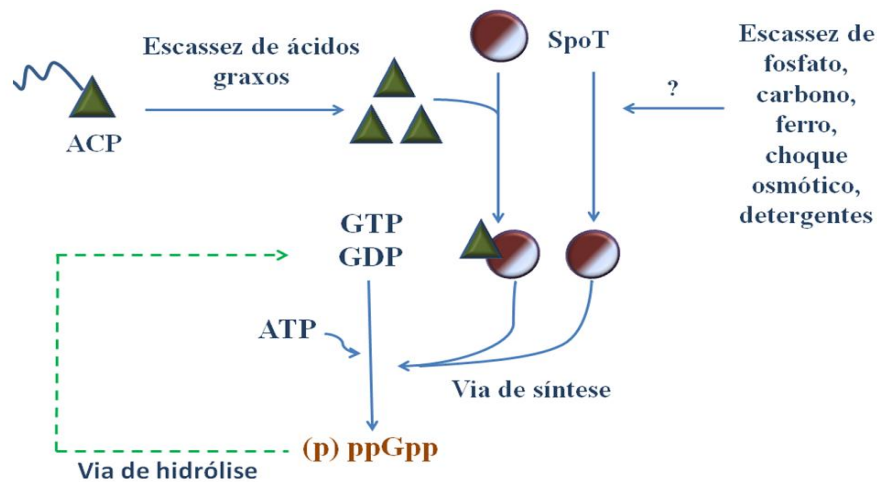


Figura 2. Modelo proposto para a síntese e degradação de (p)ppGpp por SpoT. Modificado de POTRYKUS e CASHEL (2008).

A síntese e degradação de (p)ppGpp por SpoT é importante para a célula, pois na ausência de SpoT, a bactéria não pode degradar o (p)ppGpp sintetizado por RelA e o acúmulo do nucleotídeo interrompe o ciclo celular normal (DALEBROUX *et al.*, 2010).

Em razão da resposta severa e da consequente elevação da concentração de (p)ppGpp na célula, dois efeitos são observados: (i) regulação negativa da síntese de rRNA e tRNA (LAZZARINI e DAHLBERG, 1971) e dos genes que codificam proteínas ribossomais, fatores traducionais, sintetases (DENNIS e NOMURA, 1974) e interrupção da síntese de componentes de membrana (DALEBROUX e SWANSON, 2012); e (ii) regulação de genes que codificam enzimas metabólicas, principalmente aquelas envolvidas na biossíntese de aminoácidos (ZHOU e JIN, 1998; WENDRICH *et al.*, 2002) e produção de fatores de resposta ao estresse (DALEBROUX e SWANSON, 2012). A redução da síntese de rRNA estável paralisa as principais atividades que

consomem energia da célula, como transcrição e tradução. Este período em que não há atividade metabólica permite que a célula utilize suas reservas de energia restantes para se adaptar às condições de estresse pela indução de genes específicos. Quando a adaptação é quase completa, a concentração de (p)ppGpp diminui e o crescimento é retomado (TOULOKHONOV *et al.*, 2001).

A molécula de (p)ppGpp se liga alostericamente nas porções N-terminal da subunidade β' e C-terminal da subunidade β da RNA polimerase (TOULOKHONOV *et al.*, 2001). Estudos na presença de concentrações crescentes de análogos fluorescentes de ppGpp (1-aminonaftaleno-5-sulfonado ppGpp e 8-azido guanine-3',5' bis-pirofosfato 8-azido-ppGpp) evidenciaram a ligação de ppGpp a um sítio específico da subunidade β da RNA polimerase de *E. coli* (REDDY *et al.*, 1995; CHATTERJI *et al.*, 1998).

A molécula de (p)ppGpp interage diretamente com a RNA polimerase em cooperação com o supressor DnaK (DksA), uma proteína que se liga ao canal secundário da enzima e amplifica a ação de (p)ppGpp. A transcrição também pode ser controlada por (p)ppGpp e DksA por um processo indireto conhecido como competição com o fator σ . Em fase de crescimento logarítmico, o fator σ^{70} , também conhecido como RpoD, atua sobre a RNA polimerase para iniciar a transcrição de operons necessários à síntese de proteínas, lipídeos e DNA. Durante a resposta severa, as concentrações elevadas de (p)ppGpp inibem a ligação da RNA polimerase à promotores dependentes do fator σ^{70} , como os promotores de rRNA e tRNA, permitindo que RNA polimerase permaneça disponível para se ligar a fatores σ alternativos que se acumulam em resposta a determinado estresse (Figura 3).

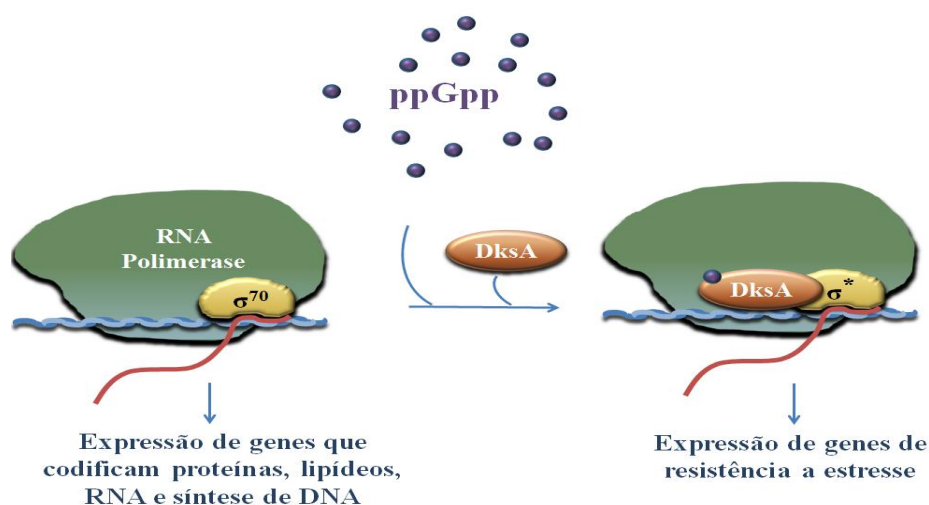


Figura 3. Mecanismo de ação de (p)ppGpp sobre a RNA polimerase. Modificado de DALEBROUX e SWANSON (2012).

O fator σ^S , também conhecido como RpoS, é um regulador central da expressão de genes produzido na fase estacionária, sendo importante para a resposta ao estresse e para a expressão de fatores de virulência em micro-organismos patogênicos. O fator σ^S permite o reconhecimento da região promotora de certos genes envolvidos na resposta a estresse em *E. coli*, *Salmonella* e outros micro-organismos pela RNA polimerase. Esse regulador atua em, aproximadamente, 500 genes durante a escassez nutricional e a várias condições de estresse, tais como temperatura e pH extremos, choque osmótico e potencial de oxirredução (HENGEE, 2009; SHEN e FANG, 2012). Em *E. coli*, o fator sigma RpoS depende da concentração de (p)ppGpp para sua expressão e função (LANGE *et al.*, 1995; MAGNUSSON, FAREWELL e NYSTRÖM, 2005).

A estabilidade do fator sigma RpoS é aumentada por (p)ppGpp por meio de mecanismos diretos e indiretos, impedindo indiretamente sua degradação por complexos citoplasmáticos conhecidos como proteossomos. Em *E. coli*, (p)ppGpp estabiliza o fator σ^S pela indução da expressão das proteínas IraP e IraD. Essas proteínas se ligam à proteína RssB, impedindo que essa proteína direcione o fator σ^S para o proteossomo ClpXP, responsável pela sua degradação (DALEBROUX e SWANSON, 2012).

Em resposta a danos à membrana celular, tais como presença de porinas deformadas na membrana e estresse metabólico, há atuação do fator σ^E , também conhecido como RpoE. O (p)ppGpp aumenta a atividade da proteína σ^E , dirigindo a expressão de genes no regulon σ^E em *E. coli* (DALEBROUX e SWANSON, 2012).

Estudos genéticos e bioquímicos confirmaram que (p)ppGpp controla a expressão de genes no nível da transcrição e tradução (CHATTERJI e OJHA, 2001). Consequentemente, a variação na quantidade de (p)ppGpp pode promover alterações na célula como diferenciação da morfologia celular, virulência, crescimento, produção de metabólitos secundários, formação de biofilme, mecanismo de *quorum sensing*, sobrevivência em condições de estresse, aumento na taxa de erro da tradução, diminuição do armazenamento de glicogênio e da taxa de produção de antibióticos (CHATTERJI e OJHA, 2001; BALZER e McLEAN, 2002; PIZARRO-CERDA e TEDIN, 2004; WU e XIE, 2009).

A concentração alta de (p)ppGpp na célula diminui a concentração de rRNA e tRNA. Como a síntese de RNA está relacionada com a taxa de crescimento de um organismo, percebe-se que o (p)ppGpp afeta o crescimento em bactérias. A regulação da

taxa de crescimento depende da transcrição do operon *rrn* e acredita-se que (p)ppGpp altera a seletividade do promotor devido a uma alteração conformacional na enzima (CHATTERJI e OJHA, 2001).

É provável que (p)ppGpp também atue na regulação de genes envolvidos na formação do citoesqueleto. Xiao e colaboradores (1991) verificaram a influência de (p)ppGpp na morfologia celular de *E. coli* Δ spoT submetida à condição de privação de nutrientes, observando a presença de células mais alongadas do que as da estirpe selvagem. Esses pesquisadores verificaram que células cultivadas em meio rico restauravam a morfologia celular normal. Células de *E. coli* deficientes na síntese de (p)ppGpp devido à interrupção dos genes *relA* e *spoT* apresentaram filamentação celular em fase logarítmica de crescimento após cultivo em meio rico (MAGNUSSUM *et al.*, 2007).

Para a sobrevivência a condições adversas, as bactérias devem ser capazes de suportar o estresse e adotar estratégias até que as condições ideais de crescimento sejam retomadas. Quando os nutrientes são escassos ou em diferentes condições de estresse, alguns gêneros de bactérias iniciam o processo de formação de esporos (esporulação) resultando na produção de uma estrutura de alta resistência. O esporo formado é metabolicamente inerte, sendo caracterizado por suas propriedades de resistência à dessecação, calor, radiação, oxidação, ação de compostos tóxicos dentre outras condições adversas (HOON, EICHENBERGERZ e VITKUP, 2010). No entanto, bactérias não formadoras de esporo podem adotar outras estratégias de sobrevivência a condições de estresse, como a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado estado viável não cultivável (OLIVER, 2005).

2.4. Estado viável não cultivável (VNC)

No início da década de 1980, Xu e colaboradores (1982) observaram que *Vibrio cholerae* e *E. coli*, em condições adversas, mantinham atividade celular detectável, embora não fossem cultiváveis pelos métodos de cultivo disponíveis. Esses pesquisadores definiram esse fenômeno como estado viável não cultivável (VNC). No estado VNC, a bactéria não apresenta crescimento em meios bacteriológicos de análise de rotina em que normalmente cresce e forma colônias, mas encontra-se viva e

metabolicamente ativa (OLIVER, 2000b). Células no estado VNC apresentam baixa atividade metabólica, porém, em alguns casos, são capazes de retomar o crescimento em meio de cultura sem que haja aumento do número total de células por um fenômeno denominado ressuscitação (REISSBRODT *et al.* 2002; OLIVER, 2005; PANUTDAPORN *et al.*, 2006).

Mais de 60 espécies bacterianas foram relacionadas como capazes de entrar no estado VNC (OLIVER, 2005). Essas espécies incluem bactérias gram-negativas como *Aeromonas hydrophila*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* (incluindo *E. coli* O157:H7), *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, diversas estirpes de *Salmonella* e *Shigella* spp., *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e bactérias gram-positivas não formadoras de esporo como *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Lactococcus lactis* (OLIVER, 2005; BALASUBRAMANIAN, STUART e WEIMER, 2007; LIU *et al.*, 2008; OLIVER, 2010). A entrada no estado VNC também foi observada em células eucarióticas, como em leveduras deterioradoras de vinho como *Brettanomyces* (SERPAGGI *et al.*, 2012), *Candida stellata*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Zygosaccharomyces bailii* (DIVOL e LONVAUD-FUNEL, 2005).

Há grande preocupação quanto à presença de patógenos no estado VNC em água ou em alimentos devido ao fato desses micro-organismos não serem detectados pelos procedimentos laboratoriais de rotina, podendo resultar em diagnóstico falso negativo da amostra analisada. Patógenos no estado VNC podem retomar a culturabilidade e manter a virulência ao entrarem em contato com fatores presentes no hospedeiro, sendo responsáveis por surtos de infecções alimentares (OLIVER, 2010). As condições de estresse as quais os alimentos são submetidos durante o processamento e estocagem e até mesmo os procedimentos de higienização das superfícies de contato com alimentos nas indústrias podem induzir a entrada no estado VNC (MILLET e LONVAUD-FUNEL, 2000; GUNASEKERA *et al.*, 2002; PENEAU *et al.*, 2007). No Japão, foi notificado um surto envolvendo um alimento a base de salmão preparado com elevada concentração de sal contaminado com *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 no estado VNC (MAKINO *et al.*, 2000). Dessa forma, alimentos considerados seguros após análises laboratoriais utilizando métodos convencionais podem apresentar risco

potencial de infecção se contaminados com micro-organismos patogênicos no estado VNC. Bactérias no estado VNC também são encontradas em amostras de água para consumo (LIU *et al.*, 2008).

Ensaio são utilizados para evidenciar a viabilidade celular por meio da investigação de várias funções celulares, tais como respiração e integridade de membrana (KOGURE, SIMIDU e TAGA, 1979; CAPPELIER *et al.* 1997; RUDI *et al.*, 2005). A utilização de técnicas moleculares permitiu a demonstrar a transcrição de genes e a síntese e,ou modulação de proteínas no estado VNC (LLEÒ *et al.*, 2000; HEIM *et al.*, 2002; YARON *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006; MUELA *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010a; MISHRA, TANEJA e SHARMA, 2012).

Diversos fatores químicos e ambientais são capazes de induzir células ao estado VNC, sendo que o tempo de entrada nessa condição varia de acordo com o micro-organismo, a condição de estresse e o estado fisiológico da população. Condições como escassez de nutrientes (GHEZZI e STECK, 1999; BESNARD *et al.*, 2000; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003; MAALEJ, DENIS e DUKAN, 2004; WONG *et al.*, 2004; COOK e BOLSTER, 2007; MISHRA, TANEJA e SHARMA, 2012), temperaturas baixas ou altas (WOLF e OLIVER, 1992; OLIVER, 2000; BESNARD *et al.*, 2002; WONG e WANG, 2004; ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006), elevação ou diminuição da concentração osmótica (XU *et al.*, 1982; ROTH, LECKIE e DIETZLER, 1988; MAKINO *et al.*, 2000), concentração de oxigênio (KANA *et al.*, 2008), presença de metais pesados (MANAHAN e STECK 1997; ALEXANDER, PHAM e STECK., 1999; GHEZZI e STECK, 1999; GREY e STECK, 2001; ORDAX *et al.*, 2006), condições ácidas (CHAVEERACH *et al.*, 2003; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006; CUNNINGHAM, O'BYRNE e OLIVER, 2009) e exposição à radiação ultravioleta (GOURMELON, CILLARD e POMMEPUY, 1994; POMMEPUY *et al.*, 1996; CARO *et al.*, 1999) são fatores já identificados como responsáveis pela indução do estado VNC.

Células de *S. enterica* sorovar Typhimurium DT104 foram capazes de entrar no estado VNC após 273 dias de incubação em solução tampão fosfato 0,0735 mM mantida a 5 °C (GUPTA *et al.*, 2003). A presença de células de *S. enterica* Dublin e *S. enterica* Oranienburg no estado VNC foi detectada após incubação em solução contendo 7% de cloreto de sódio a 37 °C num período de 5 e 3 dias, respectivamente,

indicando que esses sorovares de *Salmonella* possuem diferentes tempos para entrada no estado VNC induzido pela mesma condição de estresse osmótico (KUSUMOTO, ASAKURA e KAWAMOTO, 2012). Asakura e colaboradores (2002) também verificaram a indução de células de *S. enterica* Oranienburg ao estado VNC após incubação em solução contendo 7% de cloreto de sódio a 4 °C por 24 horas.

Floresta (2006) detectou parte da população de *S. enterica* Enteritidis CCS3 no estado VNC após dez dias de inoculação em solução fosfato de Butterfield (BPS) adicionada de 1,02 M de cloreto de sódio mantida a 5 °C. *Salmonella* Enteritidis CCS3 mantida em solução BPS acrescida de 1,2 M de cloreto de sódio a 4 °C perdeu a culturabilidade, mas manteve a viabilidade, após 120 dias de incubação, enquanto as células de *Salmonella* Typhimurium mantidas nessas mesmas condições entraram no estado VNC após 40 dias de incubação (MENDES, 2009).

Células no estado VNC apresentam alterações fisiológicas e morfológicas importantes. Tais células geralmente apresentam alterações no metabolismo celular como redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas. No entanto, a concentração de ATP e o potencial de membrana permanecem elevados (PORTER *et al.*, 1995; OLIVER, 2010).

Diversas modificações na composição de ácidos graxos de membrana de células em VNC são observadas. Por exemplo, a composição de ácidos graxos de membrana de *V. vulnificus* é alterada durante a entrada no estado VNC em água do mar artificial. Essa resposta fisiológica tem a finalidade de manutenção da fluidez de membrana para sobreviver à condição de estresse. Células em que a síntese de ácidos graxos é inibida não sobrevivem, indicando que o metabolismo de ácidos graxos é essencial durante a entrada das células no estado VNC (DAY e OLIVER, 2004). Carmo (2012) verificou que células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 no estado VNC apresentaram perfil de ácidos graxos diferente das células em condição ótima de crescimento e similar ao perfil de células submetidas ao estresse frio, porém o perfil das células VNC não apresentou alteração com o aumento do tempo de permanência dessas células no estado VNC. Esse mesmo autor observou aumento de ácidos graxos insaturados (AGI) e manutenção da proporção de ácidos graxos saturados (AGS) das células no estado VNC quando comparada às células controle, indicando maior fluidez da membrana.

Células em VNC apresentam modificação no proteoma. Muela e colaboradores (2008) verificaram que um grande número de proteínas da membrana externa de *E. coli*

no estado VNC foi alterado, sendo que a maioria dessas proteínas apresentou massa molecular menor que 29 kDa, fato que pode ser atribuído a um aumento da proteólise e, ou *turnover* de proteínas para se adaptar às condições ambientais adversas. Entretanto, proteínas exclusivas do estado VNC não foram detectadas. Estudo do proteoma de *E. faecalis* demonstrou que o perfil de proteínas de células VNC difere daquelas em fase exponencial de crescimento ou em condições de escassez nutricional (HEIM *et al.*, 2002). Foi verificado o aumento da expressão de genes que codificam para quatro proteínas (fator de alongação, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, peroxirredoxina e uma proteína conservada com função desconhecida) em *Vibrio parahaemolyticus* no estado VNC, o que sugere que estas proteínas desempenham importante função na indução ou manutenção do estado VNC (LAI *et al.*, 2009).

Outras alterações fisiológicas como a presença de antioxidantes têm sido associadas ao estado VNC. Por exemplo, verificou-se que a atividade da enzima superóxido dismutase não é detectável em células de *V. parahaemolyticus* no estado VNC (WONG *et al.*, 2004b). Algumas mudanças no peptidoglicano de células no estado VNC também tem sido observadas, como aumento no grau de ligações cruzadas e um encurtamento no comprimento médio da cadeia de glicano em comparação com células em divisão (COSTA *et al.*, 1999; SIGNORETTO, LLEÓ e CANEPARI, 2002). Células em VNC mantêm a captação e incorporação de aminoácidos. Rahman e colaboradores (1994) verificaram que células de *Shigella dysenteriae* tipo 1 no estado VNC mantêm a capacidade de absorção e incorporação de metionina.

Alterações morfológicas também são observadas em células no estado VNC, como redução de tamanho (OLIVER, 2000b; FLORESTA, 2006, CARMO 2012) e transição para a forma cocóide (GUPTE *et al.*, 2003; ALBERTINI *et al.*, 2006; CHIU, CHEN e WONG, 2008; CARMO, 2012). A manutenção da morfologia bacilar das células é devido a expressão do gene *mreB*. A proteína MreB é homóloga à actina em organismos eucarióticos, relacionada ao citoesqueleto, e apresenta função importante em células procarióticas submetidas a condições de estresse, alterando sua organização espacial, incluindo morfologia, arquitetura subcelular e localização de macromoléculas. As transições morfológicas das bactérias são importantes para sua adaptação e sobrevivência (CHIU *et al.*, 2008). Essa proteína é responsável por direcionar a localização da síntese da parede celular e sua modificação, de uma maneira similar ao que é postulado para a actina em levedura (KRUSE *et al.*, 2005). Em células de *Vibrio*

parahaemolyticus sob condições normais, MreB forma filamentos helicoidais, porém em células no estado VNC as hélices de MreB se encontravam frouxas, distribuídas por toda a porção celular e fragmentadas em filamentos curtos, não formando as hélices responsáveis pela morfologia celular. A manutenção dessas células no estado VNC ocasionou a despolimerização dos filamentos de MreB, indicando que essa proteína é altamente dinâmica. A expressão do gene *mreB* em células VNC se manteve constante durante os períodos iniciais, apresentando diminuição posteriormente (CHIU *et al.*, 2008). A diminuição da expressão desse gene também foi verificada em células de *H. pylori* (THOMPSON *et al.* 2003) e *B. subtilis* (LEVIN *et al.*, 1992, EYMANN *et al.*, 2002) em condições de limitação nutricional, indicando a influência de condições de estresse na manutenção da expressão de genes relacionados à morfologia celular.

A utilização de técnicas moleculares permitiu a demonstração da transcrição de genes de células no estado VNC. Técnicas, como PCR em tempo real, tem se mostrado uma importante ferramenta em análises quantitativas, tanto de DNA, para a verificação de alterações no número de cópias (BIÈCHE *et al.*, 1998; KÖNIGSHOFF *et al.*, 2003), bem como de RNA, para a averiguação de alterações na expressão gênica (SCHOSTAK *et al.*, 2006). Esse método dispõe os resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR convencional, a qual apresenta somente resultados qualitativos e ainda requer a detecção em gel, após eletroforese (NOVAIS, PIRES-ALVES e SILVA, 2004). A técnica de PCR em tempo real permite verificar a ocorrência de ampliações inespecíficas a partir da análise da curva de dissociação, avaliando se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido à diferença das temperaturas de *melting* (T_m) de cada produto, de acordo com o número e composição de bases. Os resultados de PCR em tempo real são expressos em Ct, que indica a quantificação de sequências alvos amplificadas pela reação da polimerase. Assim, genes expressos em quantidade elevada possuem valor de Ct baixos, enquanto genes de menor expressão apresentam valores de Ct elevados (NOVAIS, PIRES-ALVES e SILVA, 2004).

Vários trabalhos demonstraram que a síntese de mRNA não cessa em células nessa condição, o que confirma que as células mantêm a expressão gênica continuada e permanecem ativas metabolicamente (LLEÒ *et al.*, 2000; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; LIU *et al.*, 2008). Entre esses trabalhos cita-se o de Gunasekera e colaboradores (2002) quando células de *E. coli* e *Pseudomonas putida* no estado VNC inoculadas em

leite foram capazes de expressar o gene *gfp* após o processo de pasteurização. Em estudos realizados com células de *V. cholerae* O1 induzidas ao estado VNC em água de lago esterilizada foi verificado aumento da expressão dos genes *DNA polymerase II*, *fliG*, *flaC*, *ABC transportador*, *relA* e *fadL-3*. Esses genes codificam para polimerase B, proteína G presente no flagelo bacteriano, proteínas de montagem do filamento, transportadores ou sistemas de captação de ferro, síntese de ppGpp (guanosina 3',5'-bispirofosfato) e pppGpp (guanosina 3'-difosfato, 5'-trifosfato) e proteína transportadora de cadeias de ácidos graxos, respectivamente. Genes relacionados à virulência, como *ctxA* e *tcpA*, também foram expressos em células de *V. cholerae* O1 no estado VNC (MISHRA, TANEJA e SHARMA, 2012). Heim e colaboradores (2002) verificaram a expressão continuada dos genes *tsf* e *pbp5*, que codificam as proteínas EF-Ts e a proteína de ligação à penicilina, em células de *E. faecalis* no estado VNC.

A transcrição do gene *rpoS* foi detectado em células VNC de *E. coli* (BOARETTI *et al.*, 2003), em *Vibrio vulnificus* (SMITH e OLIVER, 2006), em *V. parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005) e em *V. cholerae* (ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006). O gene *rpoS* influencia positivamente a culturabilidade e a viabilidade de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium inoculadas em meio oligotrófico constituído de água do mar a 4 °C em fase estacionária de crescimento (MUNRO *et al.*, 1995). Os fatores de transcrição *rpoA-E*, *rpoH*, *rpoN*, *rpoS* e *rpoZ* apresentam expressão constitutiva em células de *V. cholerae* no estado VNC (ASAKURA *et al.*, 2007). Em *V. parahaemolyticus*, a expressão do gene *rpoS* foi maior na segunda semana da indução ao estado VNC, do que nas células em fase exponencial (SMITH e OLIVER, 2006). Coutard e colaboradores (2007) demonstraram a expressão do gene *rpoS* em células de *V. parahaemolyticus* no estado VNC. Liu e colaboradores (2010a) também verificaram a expressão do gene *rpoS* em células de *E. coli* O157:H7 no estado VNC. Kusumoto, Asakura e Kawamoto (2012) observaram que os sorovares de *Salmonella* Oranienburg, Dublin e Typhimurium deficientes na síntese de RpoS foram induzidas ao estado VNC em 7% de NaCl mais rapidamente que as estirpes selvagens e que a superexpressão do gene *rpoS* retarda a entrada no estado VNC.

A expressão de genes relacionados a diferentes fatores de virulência em células no estado VNC já foram demonstrados. Liu e colaboradores (2010b) verificaram maior expressão dos genes *stx1* e *stx2*, que codificam toxinas shiga-like em *E. coli* O157:H7 no estado VNC em relação às células cultiváveis. *E. coli* O157:H7 no estado VNC

apresentou expressão dos genes *mobA*, *rfbE* e *stiI* relacionados a mobilidade celular, síntese do antígeno O157 e da toxina shiga 1, respectivamente (YARON e MATTHEWS, 2002). Smith e Oliver (2006) observaram a expressão do gene *vvhA* que codifica uma hemolisina, considerada um fator de virulência importante, em *V. vulnificus* no estado VNC. *V. vulnificus* induzido ao estado VNC em água do mar artificial mantém a expressão do gene de virulência *vvhA*, que codifica uma citotoxina-hemolisina e confere patogenicidade a esse micro-organismo (SAUX *et al.*, 2002). Vora e colaboradores (2005) verificaram a expressão de genes que codificam toxinas (*ctxAB*, *rtxA*, *hlyA*, *tl*, *tdh* e *vvhA*) e genes de virulência (*tcpA* e TTSS) em células de *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus* O3:K6, *V. vulnificus* e *V. mimicus* induzidas ao estado VNC em água do mar artificial a 4 °C, indicando a retenção do potencial patogênico desses organismos. Nilsson e colaboradores (2002) mostraram a expressão dos fatores de virulência *CagA*, *VacA* e *UreA* por células de *H. pylori* no estado VNC. Tais dados fornecem evidência que micro-organismos patogênicos não só são capazes de entrar e persistir no estado VNC, mas podem manter virulência.

Há poucas informações que correlacionam a entrada no estado VNC e a síntese de (p)ppGpp. Um estudo realizado por Munro e colaboradores (1995) verificou que a estirpe selvagem de *E. coli* crescidas em alta osmolaridade mantêm a culturabilidade até oito dias em água do mar, enquanto mutantes $RelA^- SpoT^+$ e $RelA^- SpoT^-$ perderam a culturabilidade rapidamente. Após oito dias de incubação, a estirpe selvagem apresentou um percentual de células viáveis de 42%, enquanto que os mutantes $RelA^- SpoT^+$ e $RelA^- SpoT^-$ apresentaram um percentual de células viáveis de 5% e 0,2%, respectivamente, indicando que em *E. coli* a síntese do (p)ppGpp é importante para manutenção da culturabilidade e viabilidade em condições de estresse nutricional e osmótico (MUNRO *et al.*, 1995).

São necessários estudos visando esclarecer a influência do (p)ppGpp na morfologia celular e na entrada de células de *S. enterica* no estado VNC, bem como implicações na culturabilidade e viabilidade dessa estirpe em condições de estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, de Patógenos Alimentares e Genética Molecular de Micro-organismos pertencentes ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Bactérias utilizadas e condições de cultivo

Foram utilizadas a estirpe selvagem *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 578, isolada de peito de frango, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e as estirpes mutantes *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* (MATA, 2012). As culturas foram estocadas em caldo Luria Bertani (LB) (triptona 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) pH 7,4 e armazenadas em microtubos contendo 20% de glicerol esterilizado à -20 °C. Antes de cada experimento, a estirpe selvagem foi reativada em caldo LB, com incubação a 37 °C, por 18 horas. Os mutantes *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* foram reativados em caldo LB acrescido de 25 µg/mL de antibiótico gentamicina e gentamicina + cloranfenicol, respectivamente e incubados a 37 °C, por 18 horas.

3.2. Quantificação relativa da expressão dos genes *mreB* e *rpoS*

A quantificação da expressão dos genes *mreB* relacionado ao citoesqueleto e *rpoS* que codifica um fator sigma alternativo foi avaliada nas estirpes selvagem e mutantes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 deficientes na síntese de (p)ppGpp em condição de estresse nutricional e frio. Para isso, as estirpes foram pré-ativadas em tubos contendo 3 mL de caldo LB a 37 °C durante 24 ± 2 horas e transferidas para placas de Petri contendo ágar XLD ou ágar LB acrescido ou não de antibióticos específicos. Após incubação das placas a 37 °C durante 24 ± 2 horas, uma colônia

isolada foi transferida para tubos contendo 3 mL de caldo LB. Após incubação a 37 °C durante 12 ± 2 horas, alíquotas de 400 µL das culturas de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 40 mL de caldo LB e cultivadas até DO_{600nm} entre 0,1 e 0,2, correspondente à fase log de crescimento. As culturas foram centrifugadas (Sorvall RT 6000D, Du Pont Company, USA) para obtenção das células e, posteriormente, lavadas em 40 mL de solução salina 0,85% durante 15 minutos a 2723 g, por três vezes. Após a lavagem, as culturas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% e inoculadas em 1 litro de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com AOAC (1998), contendo 7,35 mmol. L⁻¹ de KH₂PO₄ e mantidas a 4 °C nos tempos 0, 7 e 25 dias. O experimento foi realizado com duas repetições em duplicata.

3.2.1. Extração e purificação de RNA

Amostras das células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS por até 25 dias foram coletadas em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha) a 16743 g por 30 minutos. As células foram ressuspensas em solução BPS e, novamente, sedimentadas em microtubos de 1,5 mL por centrifugação por 5 minutos a 6000 g em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha) para extração de RNA total.

O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de Tri@Reagent (Sigma-Aldrich, USA) por 30 segundos em vortex e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para lisar as células. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio gelado foram adicionados, seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por 2 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos, a 4 °C para separação das fases hidrofílica e hidrofóbica. A fase hidrofílica contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionado de 500 µL de isopropanol gelado e homogeneizado para mistura completa do reagente. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação do RNA e centrifugadas a 15000 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao microtubo foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 7500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi deixado secar ao ar para

evaporação do etanol. Posteriormente, o RNA extraído foi ressuspensionado em 40 µL de água Milli-Q® - DEPC (dietilpirocarbonato).

A concentração de RNA total foi estimada por leitura em espectrofotômetro Ultrospec® 3000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra) a 260 nm e 280 nm para cálculo da razão. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). A eliminação do DNA contaminante na amostra foi feita por tratamento com RQ1 DNase livre de RNase (Promega), de acordo com a recomendação do fabricante.

3.2.2. Análise pela técnica de qRT-PCR

Os oligonucleotídeos desenhados a partir dos genes de interesse, *mreB* e *rpoS*, e de referência endógena (*sdiA* que codifica um auto-indutor do mecanismo de *quorum sensing*) estão apresentados na Tabela 1. Após o tratamento com DNase, o cDNA foi sintetizado a partir de 200 ng do molde de RNA purificado e 1,0 µL de oligonucleotídeos randomizados por reação. A solução foi aquecida a 70 °C por 5 minutos no termociclador, colocada em banho de gelo por 5 minutos e centrifugada a 7500 g por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 4,0 µL do tampão da enzima 5X, 1,0 µL de dNTPs, 0,5 µL de Recombinante RNasin®, 1,0 µL de transcriptase reversa e água Milli-Q® - DEPC para completar o volume de 20 µL. O processo de amplificação reversa foi feito diretamente no termociclador (Master Gradient, Eppendorf – Germany) com o primeiro passo, referente ao anelamento, a 25 °C por 5 minutos, o segundo passo, referente à extensão a 42 °C por 2 horas e o último passo para a inativação da transcriptase reversa a 70 °C por 15 minutos.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para realização do qRT-PCR

Oligonucleotídeos	Sequências 5'→3'	Produto da PCR
<i>sdiA</i> 2(RTPCR)-L	ACACAGCGGCTGGAATTTG	100 pb
<i>sdiA</i> 2(RTPCR)-R	ACGCCGGAGGATAAGTGGTA	
<i>mreB</i> 2(RTPCR)-L	CGACGAAGCCATCATTAAATTACG	100 pb
<i>mreB</i> 2(RTPCR)-R	CGGATAAGCGGAACCGATTT	
<i>rpoS</i> 1(RTPCR)-L	ATCCGTGCAGTCGAGAAGTT	100 pb
<i>rpoS</i> 1(RTPCR)-R	GGTTCATAATCGCCCGTTC	

O qRT-PCR foi realizado numa reação com volume de 25 µL contendo 1,0 µL do molde de cDNA, 0,2 µM dos respectivos oligonucleotídeos, 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) e 9,5 µL de Milli-Q® - DEPC. A reação foi realizada com o primeiro passo a 50 °C por 2 minutos, segundo passo de 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Todos os produtos da reação apresentaram 100 pb e foram avaliados quanto a eficiência de amplificação em reações de qRT-PCR.

As amplificações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços no sistema "Detection System Real Time" PCR BIORAD CFX96. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e o cálculo de quantificação relativa foi realizado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sendo que o gene usado como referência endógena foi utilizado como normalizador das condições, possibilitando o cálculo da expressão relativa dos genes de interesse.

Os dados de fluorescência foram processados usando o *software* SDS (ABI) e fornecendo valores-limite de ciclo para cada amostra.

A ocorrência de amplificações inespecíficas foi verificada a partir da análise da curva de dissociação. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

3.3. Indução ao estado viável não cultivável

Para indução das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp ao estado VNC foi realizado procedimento de ativação conforme descrito no item 3.2. As culturas foram centrifugadas (Sorvall RT 6000D, Du Pont Company, USA) para obtenção das células e, posteriormente, lavadas em 40 mL de solução salina 0,85% durante 15 minutos a 2723 g, por três vezes. Após a lavagem, as culturas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% e inoculadas em 1 litro de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com AOAC (1998), contendo 7,35 mmol. L⁻¹ de KH₂PO₄, adicionada ou não de 0,6 M de cloreto de sódio. Os frascos inoculados foram mantidos a 4 °C.

Alíquotas foram retiradas periodicamente para avaliação da culturabilidade e viabilidade celular.

3.4. Determinação da culturabilidade e da viabilidade celular

A culturabilidade foi avaliada por meio do plaqueamento em ágar tripticaseína e soja (TSA) utilizando a técnica de microgotas (MORTON, 2001). As placas de TSA foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Quando as contagens atingiam o limite de detecção da técnica, correspondente a valores abaixo de 10^3 UFC.mL⁻¹, foi utilizado o plaqueamento em superfície (MORTON, 2001), após a concentração de alíquotas de 2 a 10 mL de cada frasco por centrifugação durante 20 minutos a 2723 g em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha) e ressuspensão das células em 1 mL de solução salina 0,85%. As placas de TSA foram incubadas a 37 °C por até 72 horas. Para as amostras que não apresentaram formação de colônias após 72 horas de incubação, um volume de 10 mL foi inoculado em 10 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) concentração dupla e incubado a 37 °C por 48 horas. A perda da culturabilidade foi indicada pela ausência de turvação do meio.

A viabilidade celular foi avaliada por contagem direta de células viáveis ao microscópio de epifluorescência utilizando o *kit* LIVE/DEAD® BacLight (Molecular Probes), de acordo com as instruções do fabricante. Para determinação de células viáveis, 1 mL das amostras foi centrifugado por 20 minutos a 10000 g em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha). O centrifugado foi então ressuspendido em 300 µL de solução salina 0,85% e a suspensão foi corada com 1 µL da mistura contendo partes iguais dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio, responsáveis por avaliar a integridade da membrana. O corante SYTO 9, que fluoresce verde, penetra em todas as células, viáveis e não viáveis. O iodeto de propídio penetra apenas nas células que apresentam danos na membrana, fazendo com que estas apresentem fluorescência vermelha ao microscópio de epifluorescência, diferenciando assim as células viáveis das células mortas. Após 15 minutos de incubação na ausência de luz, uma alíquota de 10 µL das amostras foi transferida para lâmina, coberta com lamínula e observada ao microscópio de epifluorescência Olympus BX 50, utilizando o filtro WG. Quando as amostras apresentavam contagem de células viáveis inferior a 10^4 células. mL⁻¹, que corresponde ao limite de detecção da técnica, alíquotas de 1 a 10 mL foram centrifugadas por 20 minutos a 10000 g, ressuspendidas em 1 mL de solução salina 0,85% e coradas com 3 µL da mistura contendo partes iguais dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio. Após a incubação por 15 minutos, as amostras foram filtradas em

membrana de polycarbonato preta (Millipore) de 13 mm de diâmetro e com poro de 0,2 µm. A membrana foi então colocada em lâmina, coberta com lamínula e observada em microscópio de epifluorescência.

A determinação de células viáveis por mililitro de amostra foi calculada pela fórmula:

$$CV. \text{ mL}^{-1} = \frac{\text{média de células por campo} \times FM \times FD}{\text{alíquota (mL)}}$$

onde, FM corresponde ao fator do microscópio (2066 para amostra filtrada utilizando membrana de polycarbonato preta e 12732,4 para amostra aplicada diretamente em lâmina) e FD corresponde ao inverso da diluição da amostra.

O percentual de células viáveis foi determinado considerando a contagem inicial de células cultiváveis em relação à contagem de células viáveis no estado VNC. A determinação de células cultiváveis e viáveis foi realizada em duplicata, utilizando três repetições biológicas.

3.5. Caracterização morfológica

3.5.1. Obtenção das células para o preparo dos espécimes

A morfologia das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia de força atômica. Para obtenção das células em fase logarítmica, as estirpes foram pré-ativadas em tubos contendo 3 mL de caldo LB a 37 °C durante 24 ± 2 horas e transferidas para placas de Petri contendo ágar XLD ou ágar LB acrescido ou não de antibióticos específicos. Após incubação das placas a 37 °C durante 24 ± 2 horas, uma colônia isolada foi transferida para tubos contendo 3 mL de caldo LB. Após incubação a 37 °C durante 12 ± 2 horas, alíquotas de 400 µL das culturas selvagem e mutantes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 40 mL de caldo LB e cultivadas até DO_{600nm} entre 0,1 e 0,2, correspondente à fase logarítmica de crescimento. As células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e

mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp após indução ao estado VNC em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio sob refrigeração a 4 °C foram obtidas conforme o procedimento descrito no item 3.3.

3.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

Um volume de 40 mL das culturas de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento foi centrifugado em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG, Alemanha) durante 10 minutos a 11627 *g* a 4 °C e, posteriormente, as células foram lavadas em 40 mL de solução salina 0,85%, por duas vezes. Alíquota de 1,5 mL das suspensão de células na fase logarítmica e de 40 mL das amostras contendo células das mesmas estirpes no estado VNC foram filtrada em membrana de policarbonato branca (Millipore) com poro de 0,22 μm . A membrana contendo os espécimes foi fixada com solução de glutaraldeído a 5% por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas seis lavagens de 10 minutos cada em tampão PBS 0,05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 6,8 a 7,2). A etapa de desidratação consistiu de tratamentos seriados em etanol, nas porcentagens de 30, 50, 70, 80 e 95 por 10 minutos cada e três tratamentos de 10 minutos em etanol 100%. As membranas foram transferidas para secador ao ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD[®], Bal Tec, modelo 30), para a desidratação total. Posteriormente, os espécimes foram metalizados em metalizador (Balzers[®], modelo FDU 010) para posterior observação ao microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430 VP) e registro das imagens. A preparação e observação dos espécimes foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais.

3.5.3. Microscopia de força atômica

Para o preparo das amostras, as células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio sob refrigeração a 4 °C foram concentradas por centrifugação a 13000 *g* por 30 minutos a 4 °C em centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf AG,

Alemanha) e lavadas com tampão fosfato de sódio (50 mmol. L⁻¹, pH 6,5) por cinco vezes consecutivas. O centrifugado foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio (50 mmol. L⁻¹, pH 6,5) e as células espalhadas em lâminas de vidro (1 cm x 1 cm), previamente higienizadas, esterilizadas e secas ao ar em capela de fluxo laminar. Solução de poli-l-lisina (Sigma) foi utilizada para melhorar a adesão das células sob a lâmina. Para isso, as lâminas higienizadas e esterilizadas foram mergulhadas em solução de poli-l-lisina e mantidas por cinco minutos. As lâminas foram secas a 25 °C por 24 horas e, posteriormente, utilizadas para inoculação das células a serem observadas. As dimensões celulares, altura, diâmetro, comprimento e volume, foram estimadas a partir das imagens de três células isoladas escolhidas ao acaso obtidas por meio do microscópio de força atômica NT-MDT. As medidas de topografia foram realizadas utilizando-se o modo intermitente. As análises de microscopia de força atômica foram realizadas no laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Expressão dos genes *mreB* e *rpoS* das estirpes de *Salmonella* Enteritidis selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em condição de estresse nutricional e choque frio

Os pares de oligonucleotídeos utilizados *sdiA*, *mreB* e *rpoS* apresentaram eficiência entre 90% a 100%, caracterizando ausência de contaminantes na amostras.

O controle negativo e a análise da curva de *melting* realizados com a reação de PCR confirmaram a ausência de ampliações inespecíficas e de acúmulo de dímeros de oligonucleotídeos.

O cálculo de quantificação relativa foi realizado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os resultados obtidos por meio das reações de PCR em tempo real foram organizados na Figura 4.

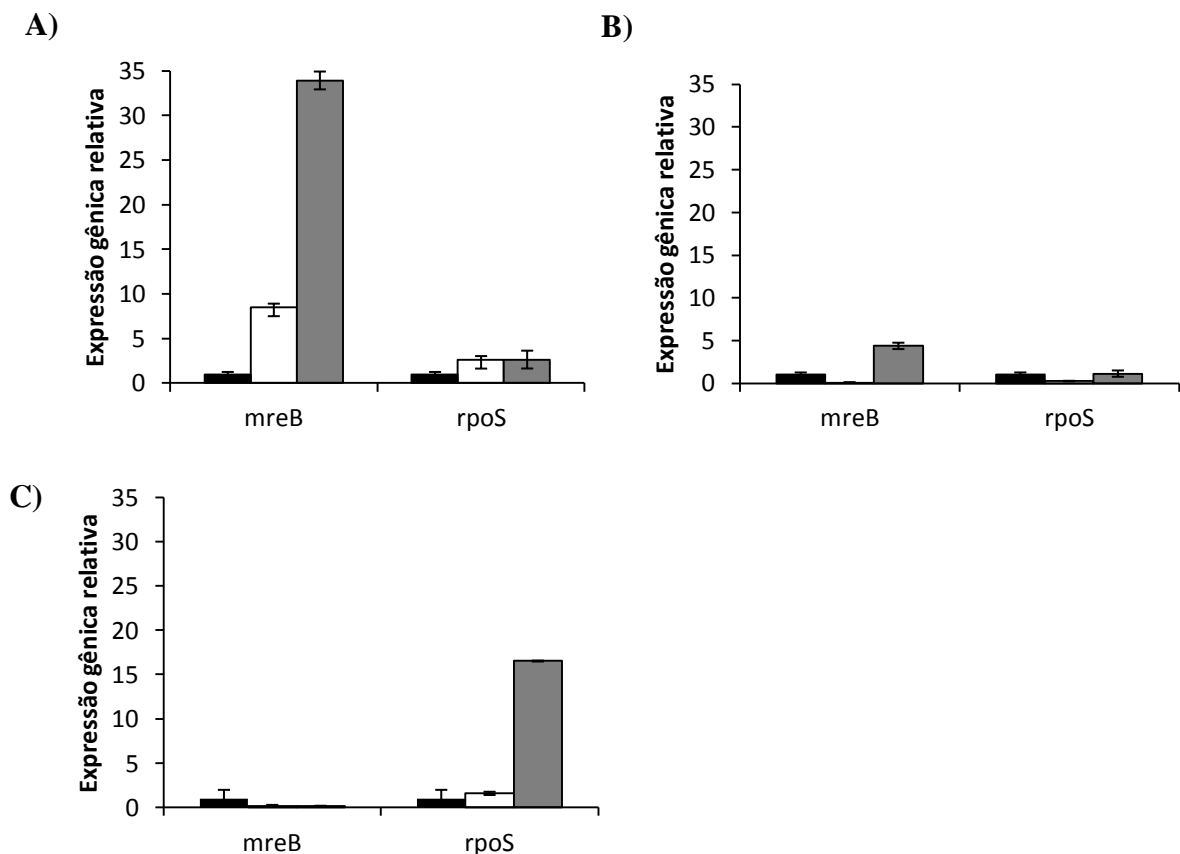


Figura 4. Expressão relativa dos genes *mreB* e *rpoS*, avaliada por PCR em tempo real, das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp submetidas a estresse nutricional e choque frio em diferentes tempos. (A) 0 dias; (B) 7 dias e (C) 25 dias; (■) Selvagem; (□) Mutante simples (*relA::aacC1*) e (■) Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*).

Os dados desta figura representam uma comparação entre a expressão gênica relativa de cada gene alvo encontrado na estirpe de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem, utilizada como calibrador da reação, com relação às estirpes mutantes. Uma relação igual a 1 significa que o gene está presente na mesma quantidade; já uma relação maior ou menor que 1 denota um aumento ou uma diminuição da expressão do gene avaliado, respectivamente.

A análise dos resultados de expressão gênica relativa medida pela técnica de PCR em tempo real revelou aumento da expressão relativa dos genes *mreB* e *rpoS* das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes simples e duplo, no momento da inoculação em solução BPS, quando comparado à expressão relativa desses genes na estirpe selvagem. O aumento da expressão relativa do gene *mreB* nas estirpes mutantes pode sugerir relação com a filamentação celular.

Após sete dias de inoculação em solução BPS a estirpe mutante simples *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (*relA::aacC1*) apresentou uma diminuição de 93,4% da expressão relativa do gene *mreB* e 75,3% da expressão relativa do gene *rpoS* quando comparada à estirpe selvagem. Porém, a estirpe mutante duplo *relA::aacC1; spoT::cat*, que não acumula (p)ppGpp apresentou aumento da expressão relativa desses genes quando comparado à estirpe selvagem.

Após vinte e cinco dias em condições de estresse nutricional e choque frio as estirpes mutantes simples e duplo apresentaram uma diminuição da expressão relativa do gene *mreB* de 88,2% e 84,5%, respectivamente, quando comparada à estirpe selvagem. Porém, as estirpes mantiveram um aumento da expressão relativa do gene *rpoS* de 1,6 e 16,5 vezes quando comparada à estirpe selvagem.

Sabe-se que a concentração de (p)ppGpp é importante para ajudar a controlar a quantidade de RpoS na célula, aumentando a concentração de RpoS várias vezes em condições de estresse nutricional ou entrada na fase estacionária. A ausência de (p)ppGpp prejudica ou retarda severamente o acúmulo de RpoS (GENTRY *et al.*, 1993). Curiosamente, a estirpe de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutante duplo, deficiente na síntese de (p)ppGpp, apresentou um aumento da expressão relativa do gene *rpoS* de 16,5 vezes quando comparada à estirpe selvagem. É proposto um acúmulo lento de RpoS nas estirpes mutantes, conforme relatado em mutantes de *E. coli* deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase estacionária de crescimento (HIRSCH e ELLIOTT, 2002). Porém, resultados contraditórios foram relatados por outros autores

em *E. coli*. Células de *E. coli* deficientes na síntese de (p)ppGpp, devido a mutação nos genes *relA* e *spoT*, inoculadas em meio oligotrófico artificial e mantidas a 4 °C apresentaram expressão do gene *rpoS* apenas no momento da inoculação, não sendo detectado esse gene nos tempos posteriormente avaliados; 15, 30 e 45 dias (BOARETTI *et al.*, 2003). Em fase estacionária de crescimento em meio rico, mutantes de *E. coli* deficientes na síntese de (p)ppGpp são também deficientes na síntese de RpoS (GENTRY *et al.*, 1993).

Esse é o primeiro relato na literatura que correlaciona a expressão do gene *mreB* em células deficientes na síntese de (p)ppGpp, e que indica a indução desse gene por (p)ppGpp. Porém, sabe-se que a diminuição da expressão do gene *mreB*, responsável pela manutenção da morfologia bacilar das células, ao longo do período de estresse nutricional e choque frio analisado, provavelmente é devido a alteração morfológica que células em condições de estresse apresentam. Os resultados obtidos concordam com aqueles apresentados por Chiu e colaboradores (2008), que verificaram diminuição da expressão do gene *mreB* em células de *V. parahaemolyticus* durante a transição entre a fase exponencial e estacionária ou em condição de escassez nutricional. Em células de *H. pylori* (THOMPSON *et al.* 2003) e *B. subtilis* (LEVIN *et al.*, 1992) também foi verificada diminuição da expressão do gene *mreB* quando as células entraram em fase estacionária. Eymann e colaboradores (2002) observaram diminuição da expressão do gene *mreB* em células de *B. subtilis* em condições de limitação nutricional.

4.2. Indução das estirpes de *Salmonella* Enteritidis mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp ao estado viável não cultivável

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp apresentaram perda de culturabilidade ao longo do tempo em solução BPS e em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio (Figuras 5 e 6). Nos primeiros 40 dias de incubação em solução BPS foram verificadas reduções médias de 1,9 ciclos logarítmicos na população da estirpe de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem, de 2,7 ciclos logarítmicos na população da estirpe mutante simples (*RelA*⁺ *SpoT*⁻) e de 2,3 ciclos logarítmicos no número da estirpe mutante duplo (*RelA*⁻ *SpoT*⁻). Neste mesmo período de 40 dias de incubação o número de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 inoculadas em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio

reduziu, em média, 3,6; 4,6 e 4,1 ciclos logarítmicos nas estirpes selvagem, mutante simples e mutante duplo, respectivamente.

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes simples e duplo inoculadas somente em solução BPS e mantidas a 4 °C perderam a culturabilidade após 190, 180 e 180 dias, respectivamente. Quando essas estirpes foram inoculadas em solução BPS contendo 0,6 M de cloreto de sódio perderam a culturabilidade em um tempo menor e que foi de 150, 120 e 140 dias, respectivamente. Estes resultados indicam que o meio de suspensão utilizado influenciou na manutenção da culturabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes, ocorrendo maior redução de culturabilidade quando os micro-organismos são submetidos a uma condição de limitação severa de nutrientes, alta concentração salina e baixas temperaturas.

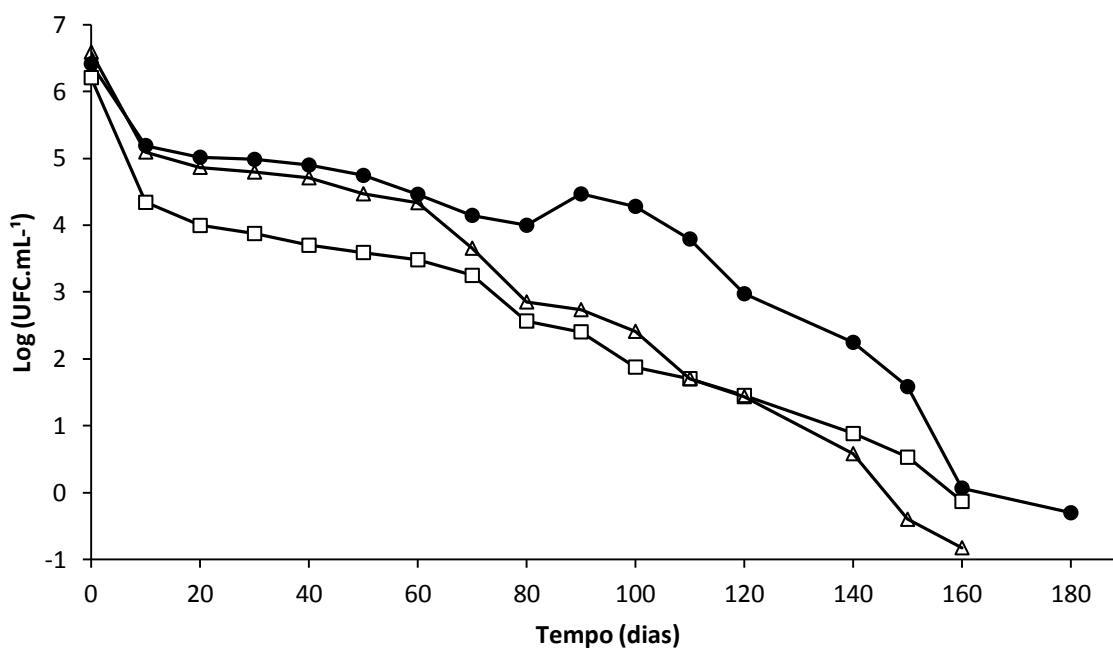


Figura 5. Culturabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS a 4 °C. (●) Selvagem; (□) Mutante simples (*relA::aacC1*); (Δ) Mutante duplo (*relA::aacC1*; *spoT::cat*). O número de células cultiváveis foi determinado por meio de plaqueamento em ágar TSA utilizando a técnica de microgotas com incubação a 37 °C por 24 horas.

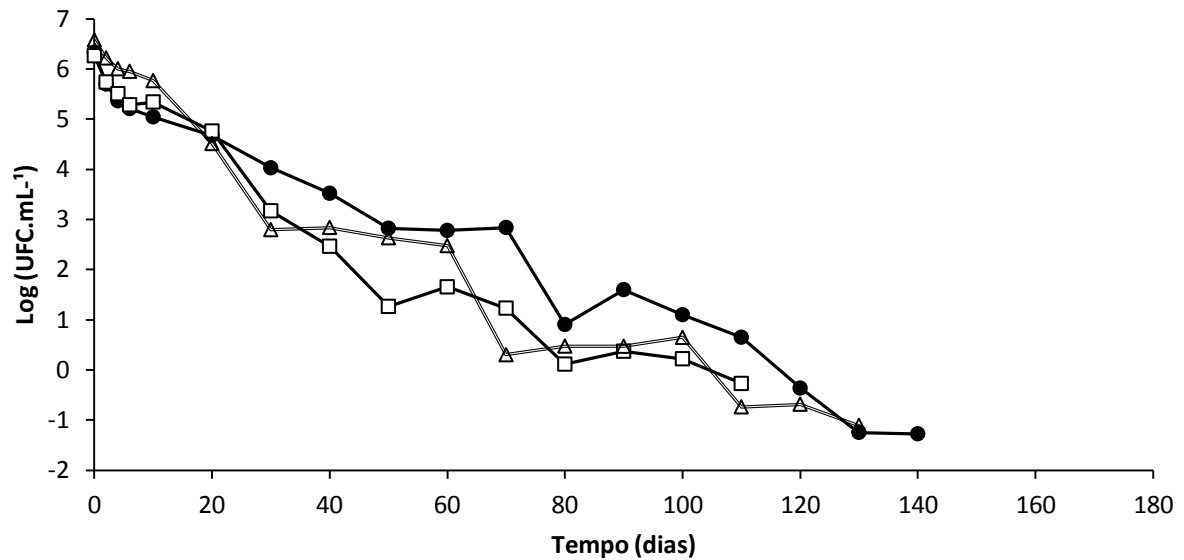


Figura 6. Culturabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C. (●) Selvagem; (□) Mutante simples (*relA::aacC1*); (Δ) Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*). O número de células cultiváveis foi determinado por meio de plaqueamento em ágar TSA utilizando a técnica de microgotas com incubação a 37 °C por 24 horas.

As estirpes selvagem e mutantes avaliadas perderam a capacidade de formação de colônias em ágar TSA, porém mantiveram a viabilidade celular, isto é, entraram no estado VNC quando mantidas em solução BPS acrescida ou não de cloreto de sódio a 4 °C (Figuras 7 e 8, Tabelas 2 e 3).

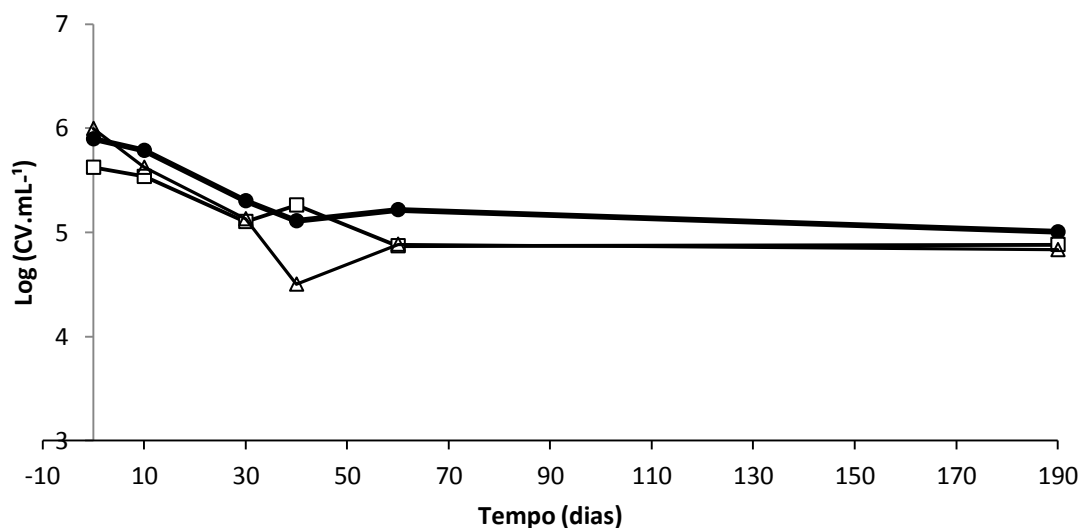


Figura 7. Viabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS a 4 °C. (●) Selvagem; (□) Mutante simples (*relA::aacC1*); (Δ) Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*). O número de células viáveis foi determinado utilizando o *kit* LIVE/DEAD® BacLight por microscopia de epifluorescência.

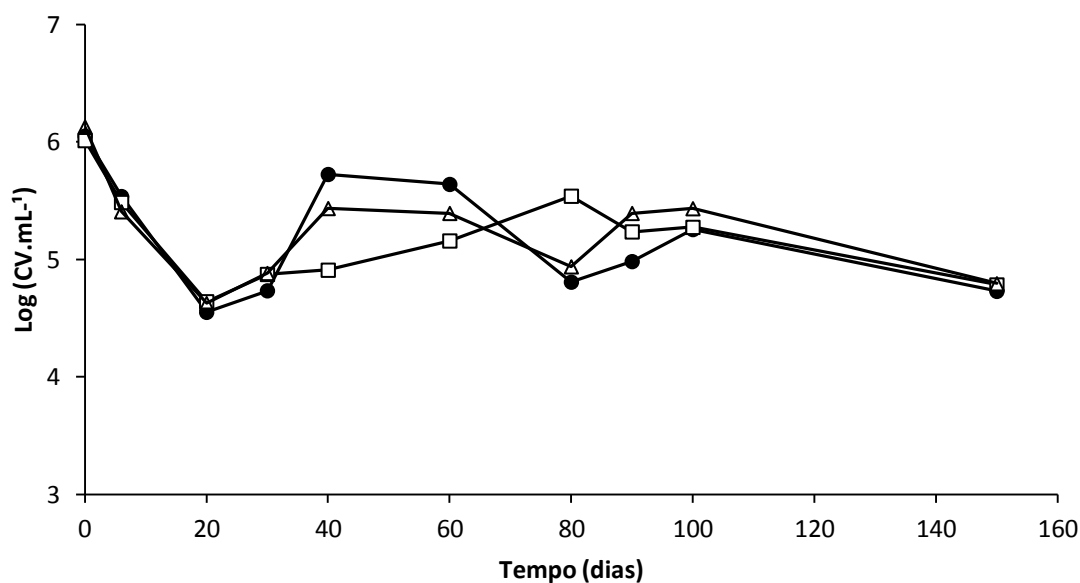


Figura 8. Viabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp mantidas em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C. (●) Selvagem; (□) Mutante simples (*relA::aacC1*); (Δ) Mutante duplo (*relA::aacC1*; *spoT::cat*). O número de células viáveis foi determinado utilizando o kit LIVE/DEAD® BacLight por microscopia de epifluorescência.

Tabela 2. Culturabilidade e viabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp, mantidas em solução BPS a 4 °C, no momento da inoculação e no estado VNC.

Estirpe/Tempo	Número de células	
	Células cultiváveis Log UFC.mL ⁻¹	Células viáveis Log CV.mL ⁻¹
Selvagem		
0 dias	6,4	5,9
190 dias	< 0,1	5,0 (78,1%)*
Mutante simples <i>relA::aacC1</i>		
0 dias	6,2	5,6
190 dias	< 0,1	4,9 (79,0%)
Mutante duplo <i>relA::aacC1</i> ; <i>spoT::cat</i>		
0 dias	6,6	6,0
190 dias	< 0,1	4,8 (72,7%)

* Porcentagem de células viáveis em relação à população inicial.

Tabela 3. Culturabilidade e viabilidade das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp, mantidas em solução BPS adicionada de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C, no momento da inoculação e no estado VNC.

Estirpe/Tempo	Número de células	
	Células cultiváveis Log UFC.mL ⁻¹	Células viáveis Log CV.mL ⁻¹
Selvagem		
0 dias	6,3	6,1
150 dias	< 0,1	4,7 (74,6%)*
Mutante simples <i>relA::aacC1</i>		
0 dias	6,3	6,0
150 dias	< 0,1	4,8 (76,2%)
Mutante duplo <i>relA::aacC1; spoT::cat</i>		
0 dias	6,6	6,1
150 dias	< 0,1	4,8 (72,7%)

* Porcentagem de viabilidade em relação à população inicial de células viáveis cultiváveis.

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp apresentaram variação no tempo de entrada no estado VNC, indicando que a indução desse estado de dormência pode variar de acordo a condição de estresse e o estado fisiológico da população. Parte da população de *S. enterica* Enteritidis CCS3 entrou no estado VNC após dez dias de inoculação em solução BPS adicionada de 1,02 mol. L⁻¹ de cloreto de sódio mantida a 5 °C (FLORESTA, 2006). Porém quando essa mesma estirpe foi mantida em solução BPS acrescida de 1,2 mol. L⁻¹ de cloreto de sódio a 4 °C, a culturabilidade é perdida após 100 dias de incubação (MENDES, 2009). Células de *S. enterica* sorovar Typhimurium mantida nessas mesmas condições foram capazes de perder totalmente a culturabilidade após 40 dias de incubação (MENDES, 2009). Sorovares Dublin e Oranienburg apresentaram diferentes períodos de entrada no estado VNC; 5 e 3 dias, respectivamente; após incubação em solução contendo 7% de cloreto de sódio a 37 °C (KUSUMOTO, ASAKURA e KAWAMOTO, 2012).

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes induzidas ao estado VNC por limitação de nutrientes, estresse osmótico e choque frio utilizadas neste

trabalho tiveram os genes *relA* e *spoT* interrompidos e, conseqüentemente, alteração na síntese do nucleotídeo de resposta ao estresse, o (p)ppGpp. Porém, nestes organismos parece que (p)ppGpp não influenciou a entrada ao estado VNC. Na literatura resultados contraditórios aos encontrados neste trabalho são relatados, evidenciando a importância da síntese de (p)ppGpp para manutenção da culturabilidade e viabilidade celular. Munro e colaboradores (1995) verificaram que *E. coli* cultivada em condições de alta osmolaridade retém alta culturabilidade até oito dias em água do mar, enquanto mutantes RelA⁻ SpoT⁺ e RelA⁻ SpoT⁻ perderam a culturabilidade rapidamente. Nesse mesmo estudo, após oito dias de incubação, a estirpe selvagem apresentou um percentual de células viáveis de 42%, enquanto os mutantes RelA⁻ SpoT⁺ e RelA⁻ SpoT⁻ apresentaram um percentual de células viáveis de 5% e 0,2%, respectivamente. Esses autores concluíram que em *E. coli*, a síntese do (p)ppGpp é importante para manutenção da culturabilidade e viabilidade em condições de estresse nutricional e osmótico. Vogt e colaboradores (2011) verificaram que mutante de *Pseudomonas aeruginosa* nos genes *relA* e *spoT* apresentou maior sensibilidade a exposição à concentração de 4 M de cloreto de sódio quando comparada a estirpe selvagem e mutante apenas no gene *relA*, indicando a importância do requerimento de (p)ppGpp para a manutenção da sobrevivência celular a condições de estresse osmótico.

Como as estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes RelA⁻ SpoT⁺ e RelA⁻ SpoT⁻ avaliadas neste estudo apresentaram culturabilidade por longos períodos, similar à estirpe selvagem, é provável que outros mecanismos de adaptação tenham ocorrido para permitir a sobrevivência a condições de escassez nutricional.

Mata (2012) verificou que a estirpe mutante simples de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (*relA::aacC1*) utilizada neste trabalho produz concentração basal de (p)ppGpp. Durante a indução ao estado VNC, a estirpe mutante simples perdeu a capacidade de formar colônias em ágar TSA mais rapidamente do que as estirpes selvagem e mutante duplo. Sabe-se que a concentração de (p)ppGpp é importante para expressão do fator sigma RpoS, responsável pela manutenção da culturabilidade em condições de estresse (LANGE *et al.*, 1995; MAGNUSSON *et al.*, 2005). Deste modo, é proposto que a estirpe mutante simples tenha utilizado as concentrações basais de (p)ppGpp para regulação do fator sigma RpoS e manutenção da culturabilidade celular, por curto período quando comparado as outras estirpes analisadas neste estudo. A importância do fator sigma RpoS na manutenção da culturabilidade em condições de estresse já foi

relatada em outros trabalhos. Mutantes RelA⁻ SpoT⁺ e RelA⁻ SpoT⁻ de *E. coli* perderam rapidamente a culturabilidade por não possuírem uma concentração suficientemente elevada de (p)ppGpp para aumentar a concentração do fator sigma RpoS a um nível necessário para regular genes de resposta ao estresse (MUNRO *et al.*, 1995). Células de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium deficientes na síntese de RpoS perderam rapidamente a culturabilidade em condições de escassez nutricional e estresse osmótico, indicando que o fator sigma RpoS, regulado por concentrações de (p)ppGpp, é importante para a manutenção da culturabilidade dessas células (MUNRO *et al.*, 1995). O estresse osmótico na presença de 7% de NaCl reduz a quantidade da proteína RpoS em *Salmonella* Dublin KDX1, *Salmonella* Oranienburg Sa99004 e *Salmonella* Oranienburg LT2, durante a indução do estado VNC (KUSUMOTO, ASAKURA e KEIKO KAWAMOTO, 2012). *Salmonella* Oranienburg LT2 que teve o gene *rpoS* interrompido perdeu a culturabilidade mais rapidamente que a estirpe selvagem, porém ambas mantiveram a viabilidade elevada, 84,8% e 85,4%, respectivamente, indicando que a interrupção do gene *rpoS* acelera a entrada no estado VNC em *Salmonella* em condições de estresse (KUSUMOTO, ASAKURA e KEIKO KAWAMOTO, 2012).

4.3. Morfologia celular de *Salmonella* Enteritidis selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp

4.3.1. Células em fase logarítmica de crescimento

Células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp cultivadas em caldo LB até a fase logarítmica de crescimento e observadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica apresentaram forma bacilar, superfície compacta e ligeiramente irregular (Figura 9 e 10). As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes simples e duplo apresentaram células com superfície irregular (Figura 9) e filamentosas (Figuras 9B, 10B e 10C).

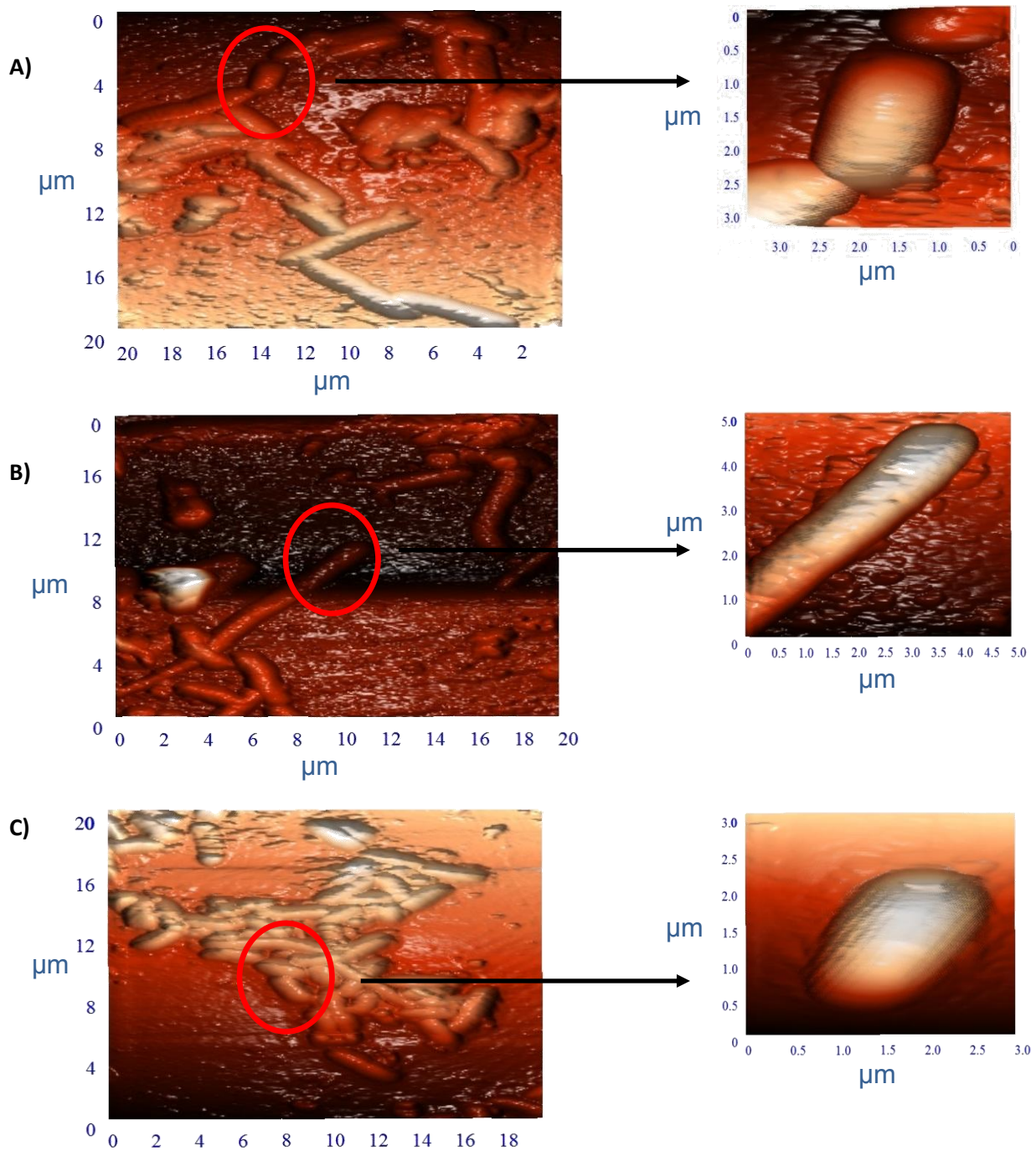


Figura 9. Imagens 3D de células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento obtidas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Varredura de 20, 5 e 3 μm. (A) Selvagem; Mutantes deficientes na síntese de ppGpp (B) simples (*relA::aacC1*) e (C) duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*).

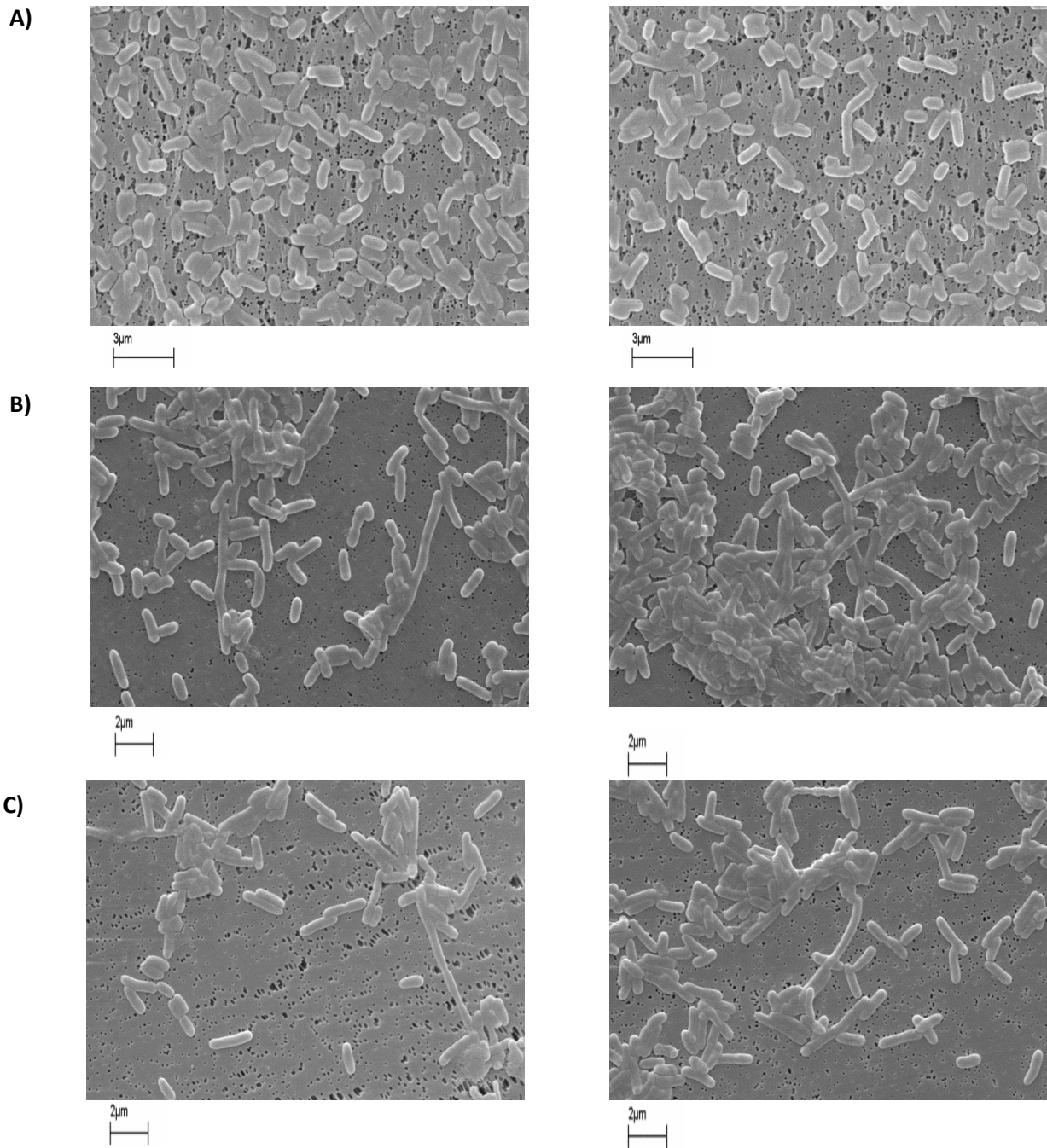


Figura 10. Micrografias de células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de policarbonato. Aumento de 10000 X. (A) Selvagem; Mutantes deficientes na síntese de ppGpp (B) simples (*relA::aacC1*) e (C) duplo (*relA::aacC1*; *spoT::cat*).

A filamentação celular também foi observada em mutantes de *E. coli* deficientes na síntese de (p)ppGpp por outros autores. Xiao e colaboradores (1991) observaram que células de *E. coli* W310, *E. coli* MG1655 e *E. coli* CF898 cultivadas em meio mínimo

contendo aminoácidos que tiveram o gene *spoT* ou os genes *relA* e *spoT* interrompidos apresentaram filimentação celular, porém as estirpes que tiveram apenas o gene *relA* interrompido não apresentaram alteração morfológica. Magnusson e colaboradores (2007) visualizaram filimentação celular em *E. coli* deficiente na síntese de (p)ppGpp pela interrupção dos genes *relA* e *spoT*.

Alguns trabalhos correlacionam a síntese de (p)ppGpp com aumento na concentração da proteína FtsZ em culturas de *E. coli*. A atividade da proteína FtsZ é essencial para a septação celular, guiando a invaginação do septo, pois células que não formam septo apresentam-se filamentosas. Em *E. coli*, o controle da expressão do gene *ftsZ* e a divisão celular são regulados por (p)ppGpp (POWEL e COURT, 1998). A septação direcionada por FtsZ é positivamente influenciada pelo estresse nutricional e o mecanismo desse efeito depende da síntese de (p)ppGpp por RelA (POWEL e COURT, 1998). Sitnikov e colaboradores (1996) verificaram que o controle da divisão celular em *E. coli* envolve o gene *rpoS*. Esses autores verificaram que os genes *ftsQA*, que codificam funções requeridas para a divisão celular, são regulados pelos promotores P₁ e P₂. O promotor P₁ é estimulado por *rpoS* e o promotor P₂ é regulado por SdiA, um auto-indutor do mecanismo de *quorum sensing*.

Schreiber e colaboradores (1995) constataram que concentrações elevadas de (p)ppGpp não bloqueiam a formação do septo em células de *E. coli*, indicando a importância de (p)ppGpp na divisão celular. É possível que a alteração na concentração de (p)ppGpp, por meio da interrupção dos genes *relA* e, ou *spoT*, nas estirpes mutantes de *Salmonella* utilizadas neste trabalho exerça efeitos na expressão de genes responsáveis pela septação celular, o que resultou na formação de células filamentosas.

Não há informações na literatura sobre a morfologia celular de mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp de *Salmonella*, mas os resultados sugerem, que possivelmente a síntese de (p)ppGpp é importante para a divisão celular de *Salmonella*, assim como ocorre em *E. coli*.

4.3.2. Células no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio

Células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes em fase logarítmica de crescimento após cultivo em caldo LB e observadas por microscopia

de força atômica e microscopia eletrônica de varredura apresentaram forma bacilar e superfície compacta (Figuras 11A1, 11B1, 11C1, 12A1, 12B1 e 12C1). Entretanto, quando estas estirpes foram induzidas ao estado VNC em solução BPS, apresentaram superfície ligeiramente rugosa, com mudança para a forma cocóide (Figuras 11B2 e 12A2). Constatou-se também redução nas dimensões celulares diâmetro, comprimento e volume, porém manutenção da altura celular quando comparada às estirpes em fase exponencial de crescimento (Tabela 4).

Curiosamente, nestas condições de indução ao estado VNC, as células do mutante duplo se apresentaram envolvidas em uma estrutura espessa, evidenciada por microscopia de fase de força atômica (Figura 11C2) de natureza química ainda não esclarecida.

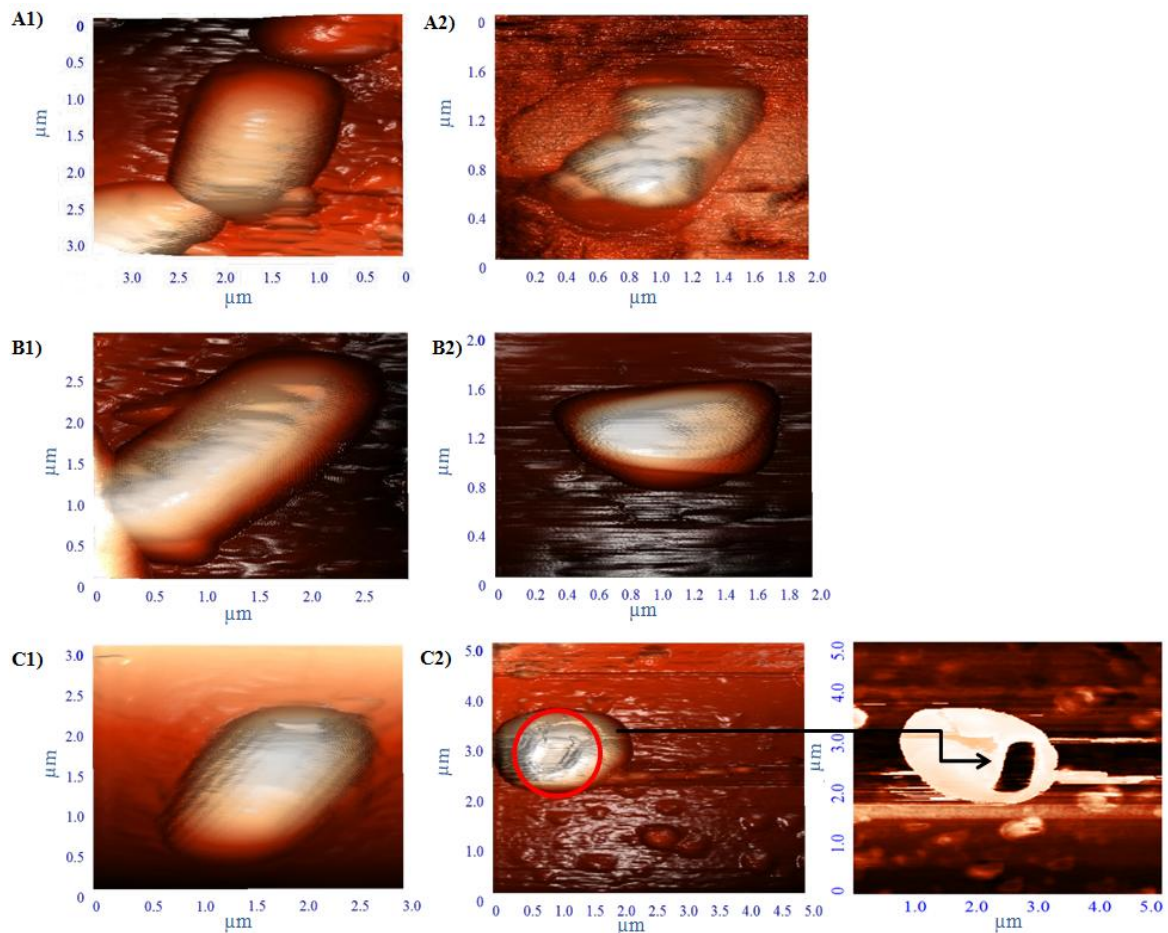


Figura 11. Imagens 3D de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS a 4 °C observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Selvagem (A1) em fase log e (A2) no estado VNC; Mutante simples (*relA::aacC1*) (B1) em fase log e (B2) no estado VNC; Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*) (C1) em fase log e (C2) no estado VNC. À direita em (C2), detalhe da célula em VNC por microscopia de fase.

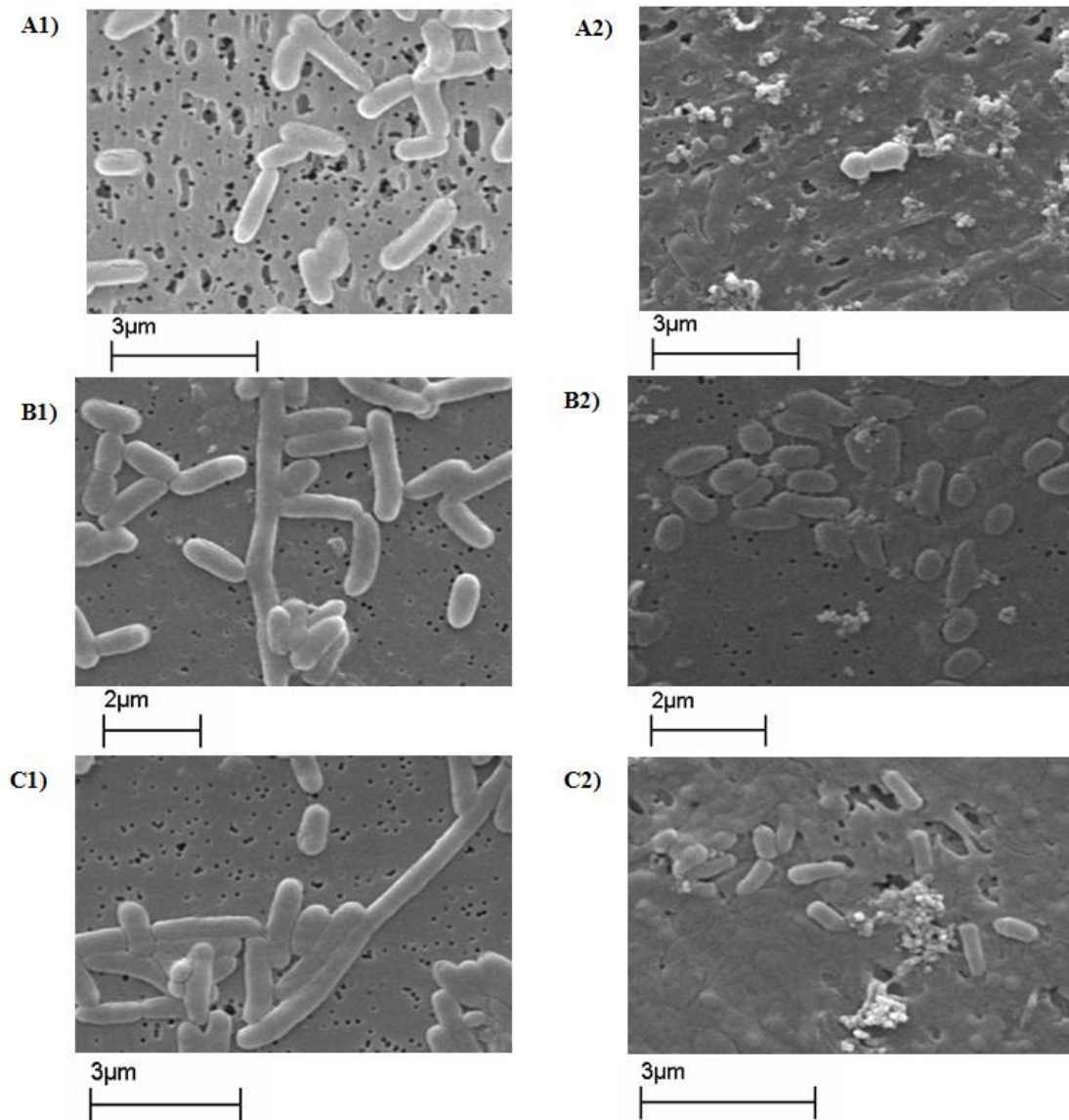


Figura 12. Micrografias de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS a 4 °C observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de polycarbonato. Aumento de 10000 X. Selvagem (A1) em fase log e (A2) no estado VNC; Mutante simples (*relA::aacC1*) (B1) em fase log e (B2) no estado VNC; Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*) (C1) em fase log e (C2) no estado VNC.

Células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp no estado VNC induzidas em solução BPS acrescido de 0,6 M de cloreto de sódio apresentaram redução do tamanho das células e transição da forma bacilar para a forma cocóide quando comparadas às células em fase logarítmica de crescimento (Figuras 13B2, 13C2, 14B2 e 14C2). As células mutantes apresentaram redução nas

dimensões celulares diâmetro, comprimento e volume celular quando comparadas com as células viáveis na fase exponencial de crescimento (Tabela 4). A estirpe *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem no estado VNC apresentou aumento de rugosidade (Figura 13A2), com redução da altura e volume celular, ocasionado pela perda de turgidez (Tabela 4). Uma possível explicação seria que a condição de estresse utilizada para indução ao estado VNC tenha promovido a perda do conteúdo celular e, conseqüentemente, redução da altura e do volume celular.

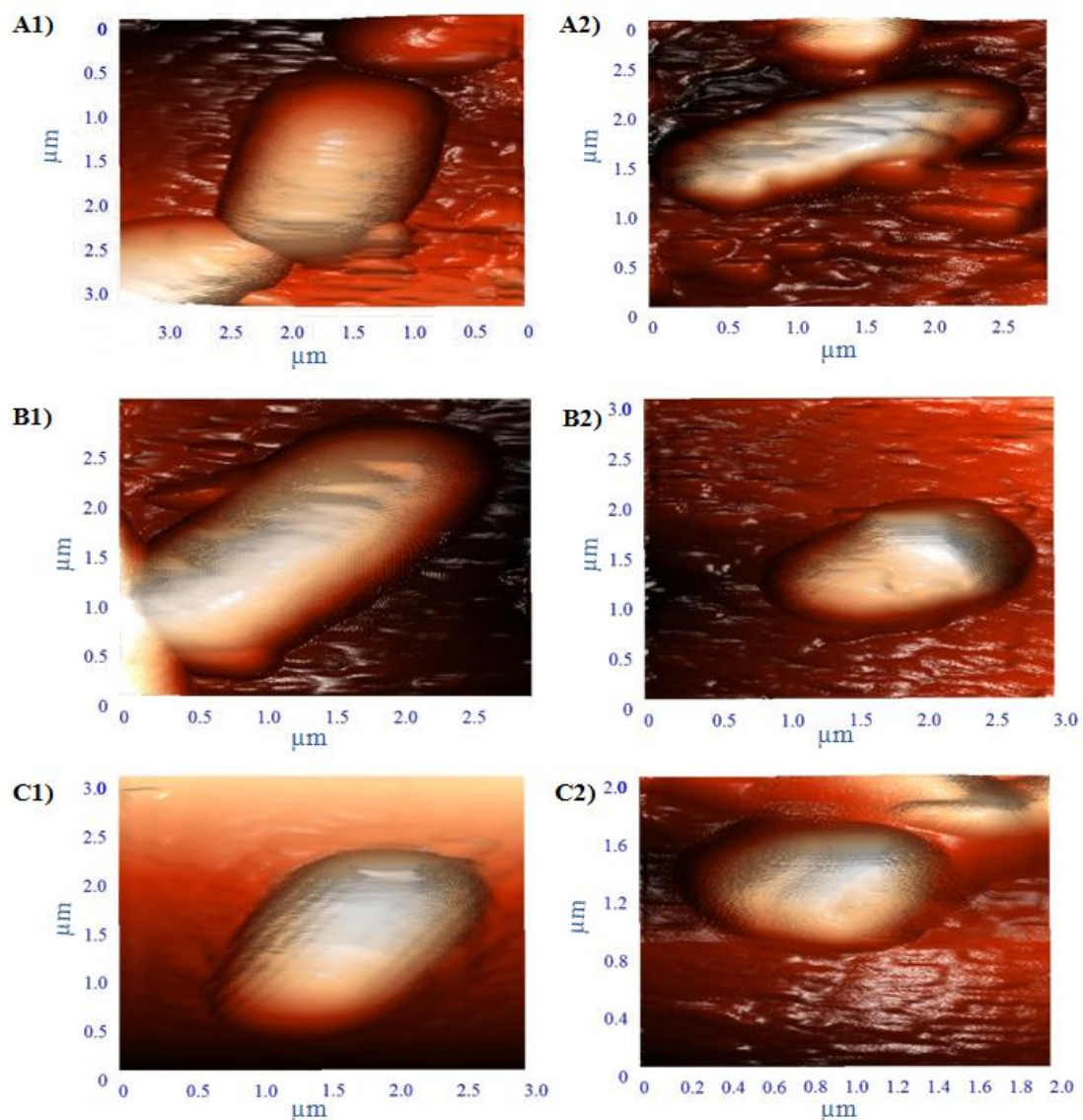


Figura 13. Imagens 3D de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagens e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Selvagem (A1) em fase log e (A2) no estado VNC; Mutante simples (*relA::aacC1*) (B1) em fase log e (B2) no estado VNC; Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*) (C1) em fase log e (C2) no estado VNC.

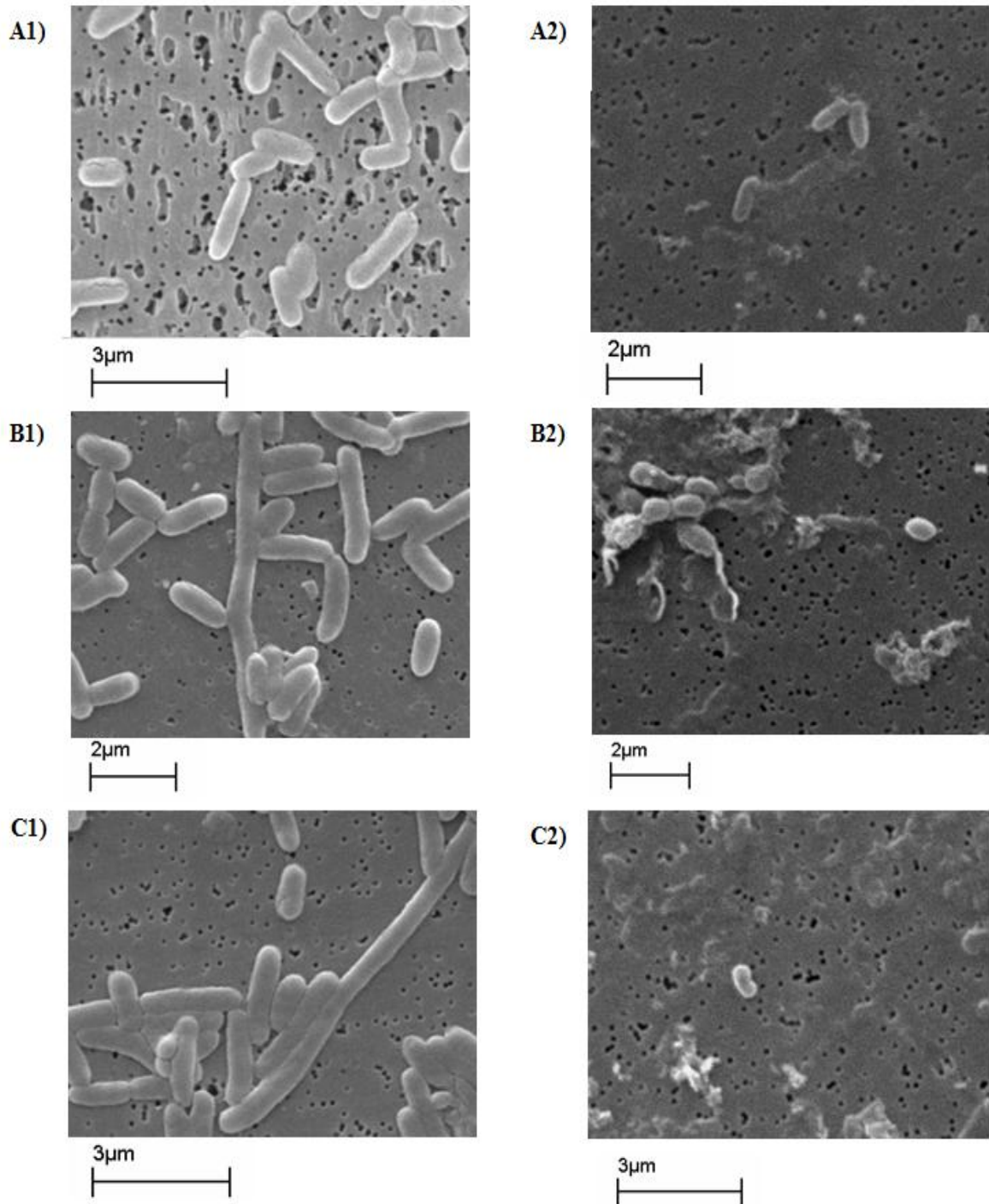


Figura 14. Micrografias de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescido de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C observadas por microscopia eletrônica de varredura em membrana de policarbonato. Aumento de 10000 X. Selvagem (A1) em fase log e (A2) no estado VNC; Mutante simples (*relA::aacC1*) (B1) em fase log e (B2) no estado VNC; Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*) (C1) em fase log e (C2) no estado VNC.

Tabela 4. Dimensões celulares das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica e no estado VNC após indução em solução BPS e em solução BPS acrescida de 0,6 M de cloreto de sódio, estimadas por meio de microscopia de força atômica.

Condição/Estirpe	Dimensões*			
	Altura (μm)	Diâmetro (μm)	Comprimento (μm)	Volume (μm^3)
Células em crescimento exponencial				
Selvagem	$0,17 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,17$	$2,55 \pm 0,44$	$0,62 \pm 0,06$
Mutante simples <i>relA::aacC1</i>	$0,18 \pm 0,03$	$1,31 \pm 0,17$	$3,19 \pm 0,33$	$0,75 \pm 0,15$
Mutante duplo <i>relA::aacC1; spoT::cat</i>	$0,17 \pm 0,00$	$1,21 \pm 0,26$	$2,55 \pm 0,41$	$0,51 \pm 0,04$
Células VNC (indução em BPS)				
Selvagem	$0,10 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,05$	$1,16 \pm 0,10$	$0,09 \pm 0,01$
Mutante simples <i>relA::aacC1</i>	$0,16 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,09$	$1,41 \pm 0,24$	$0,19 \pm 0,07$
Mutante duplo <i>relA::aacC1; spoT::cat</i>	$0,07 \pm 0,00$	$0,49 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,15$	$0,03 \pm 0,01$
Células VNC (indução em BPS + 0,6 M de cloreto de sódio)				
Selvagem	$0,10 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,29$	$2,46 \pm 0,91$	$0,25 \pm 0,08$
Mutante simples <i>relA::aacC1</i>	$0,17 \pm 0,00$	$0,81 \pm 0,31$	$1,47 \pm 0,51$	$0,22 \pm 0,15$
Mutante duplo <i>relA::aacC1; spoT::cat</i>	$0,19 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,09$	$0,14 \pm 0,06$

* Média das dimensões de três células isoladas escolhidas ao acaso \pm o desvio padrão.

A alteração na morfologia e a redução do tamanho celular já foram descritas para diversas bactérias no estado VNC. Células de *S. enterica* sorovar Typhimurium DT104 mantidas em microcosmos por, aproximadamente, 235 dias a 5 °C apresentaram um arredondamento gradual, alterando a morfologia bacilar para cocóide observadas por microscopia eletrônica de varredura, transmissão ou epifluorescência (GUPTE *et al.*, 2003). Abdallah e colaboradores (2007) observaram redução do tamanho e mudança para a forma cocóide de células de *Salmonella bovis* *morbificans* no estado VNC por observação por microscopia de força atômica. Células de *V. alginolyticus* induzidas ao estado VNC por inoculação em água do mar artificial e incubação a 4 °C apresentaram de 80 a 100% da morfologia cocóide (ALBERTINI *et al.*, 2006). Outros autores já relataram a transição para a forma cocóide (GUPTE *et al.*, 2003; CHIU, CHEN e WONG, 2008; CARMO, 2012) e redução do tamanho celular de células no estado VNC (OLIVER, 2000b; FLORESTA, 2006, CARMO 2012).

É provável que a redução celular com transição para a forma cocóide seja devida à modificação na expressão do gene *mreB*, responsável pela manutenção da morfologia bacilar das células. Em células de *V. parahaemolyticus* sob condições normais, a proteína MreB forma filamentos helicoidais, porém em células no estado VNC as hélices de MreB se encontravam soltas, distribuídas por toda a porção celular e fragmentadas em filamentos curtos, não formando as hélices responsáveis pela morfologia celular. Células no estado VNC apresentaram despolimerização dos filamentos de MreB, sendo que a expressão do gene *mreB* se manteve constante durante os períodos iniciais, diminuindo posteriormente (CHIU *et al.*, 2008).

Neste trabalho não foi possível avaliar a expressão do gene *mreB* nas células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes no estado VNC, pois não se conseguiu obter RNA em quantidade suficiente pelo método de extração utilizado para realização da técnica de qRT-PCR. Outros experimentos serão necessários para aperfeiçoar a extração de RNA e verificação da expressão de genes em células no estado VNC.

Células que se encontram na fase estacionária ou em condições de escassez nutricional apresentam alteração na concentração de ATP que, conseqüentemente, influencia dinâmica dos filamentos MreB (CHIU *et al.*, 2008).

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* no estado VNC após indução em solução BPS acrescido de cloreto de sódio apresentaram redução do volume celular de 59,4%, 71,3% e 71,6%,

respectivamente. Esta redução, provavelmente, é devido à presença de alta concentração salina no meio utilizado para indução ao estado VNC, e que resultou em plasmólise. Em condições de estresse hiperosmótico, devido o fato da membrana celular ser impermeável a diversos metabólitos, há efluxo de água resultando em redução do volume celular. A água passa através da bicamada fosfolipídica ou em canais de proteínas específicas (SPECTOR e KENYON, 2011).

As estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* no estado VNC após indução em solução BPS apresentaram maior redução de volume celular; 86%, 75,3% e 93,5%, respectivamente; quando comparadas as estirpes selvagem e mutantes submetidas a condições de estresse nutricional, choque frio e estresse osmótico inoculadas em solução BPS acrescido de 0,6 M de cloreto de sódio. Entretanto, possivelmente as células induzidas ao estado VNC em solução BPS não tenham seguido o mesmo padrão de acúmulo de solutos compatíveis, ocasionando redução mais acentuada do seu volume celular.

Os perfis topográficos das células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de cloreto de sódio a 4 °C são apresentados na figuras 15.

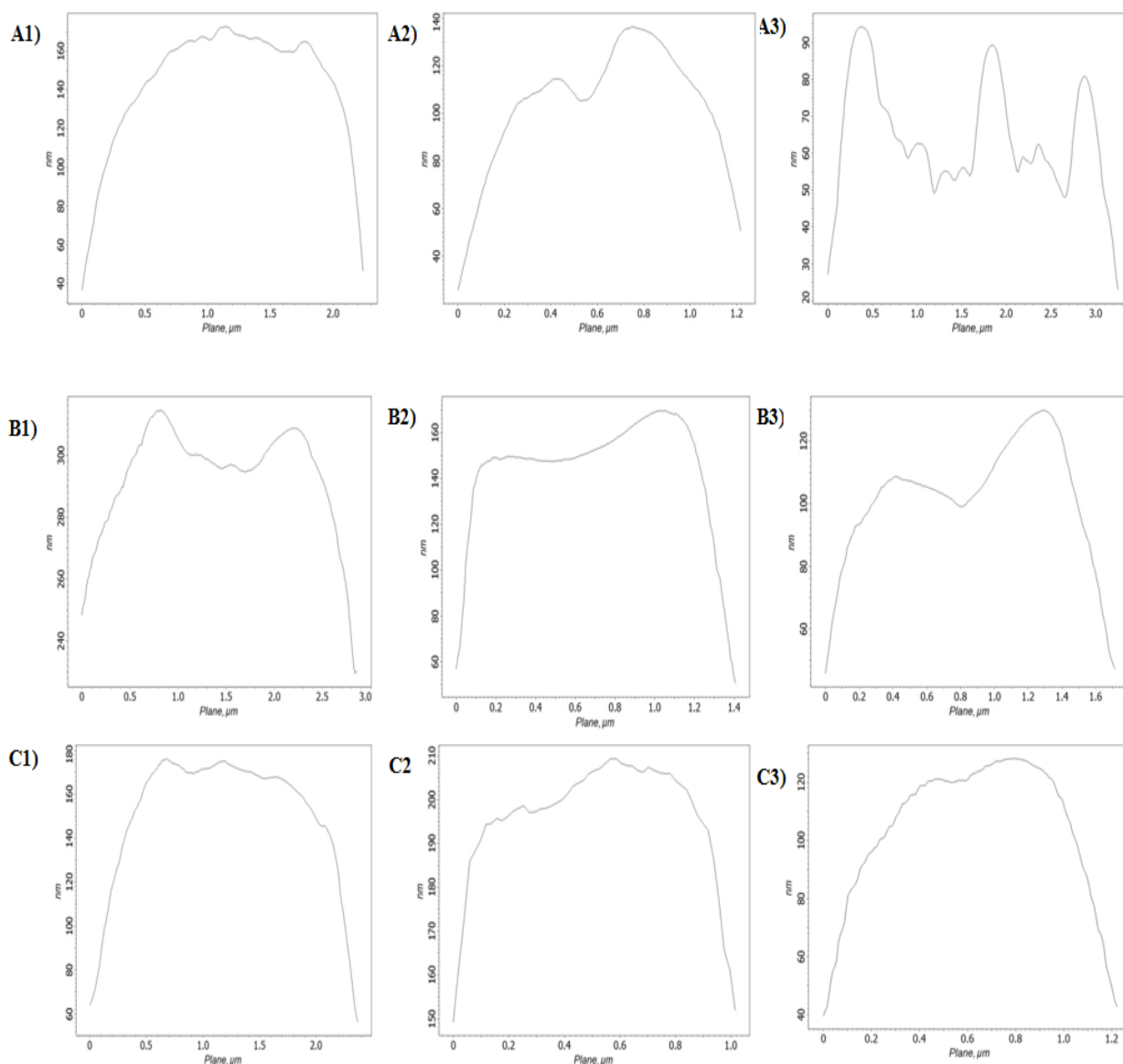


Figura 15. Perfil topográfico das células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes deficientes na síntese de (p)ppGpp em fase logarítmica de crescimento e no estado VNC após indução em solução BPS acrescida ou não de 0,6 M de cloreto de sódio a 4 °C. Selvagem (A1) em fase log, (A2) no estado VNC após indução em solução BPS e (A3) no estado VNC após indução em solução BPS acrescida de cloreto de sódio; Mutante simples (*relA::aacC1*) (B1) em fase log, (B2) no estado VNC após indução em solução BPS e (B3) no estado VNC após indução em solução BPS acrescida de cloreto de sódio; Mutante duplo (*relA::aacC1; spoT::cat*) (C1) em fase log e (C2) no estado VNC após indução em solução BPS e (C3) no estado VNC após indução em solução BPS acrescida de cloreto de sódio.

A avaliação do perfil topográfico de células das estirpes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 selvagem e mutantes *relA::aacC1* e *relA::aacC1; spoT::cat* nas estirpes estudadas confirma a redução do comprimento celular, porém a altura celular

foi mantida quando comparada às estirpes em fase exponencial de crescimento. As células apresentaram superfície com aspecto ligeiramente irregular. Após indução em solução BPS acrescida de cloreto de sódio a análise topográfica revelou o aumento da rugosidade e redução do diâmetro celular da estirpe selvagem e redução nas dimensões celulares, tais como diâmetro e comprimento, das estirpes mutantes quando comparadas com as células viáveis na fase exponencial de crescimento.

5. CONCLUSÕES

Mutantes *relA* e *spoT* de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em condições de estresse nutricional e choque frio apresentaram redução na expressão relativa do gene *mreB*.

As estirpes mutantes *relA* e *spoT* de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 entraram no estado VNC em solução BPS acrescida ou não de cloreto de sódio a 4 °C.

Células mutantes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 observados em fase logarítmica de crescimento apresentaram alteração morfológica, com filamentação celular e superfície ligeiramente irregular. Células selvagem e mutantes de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 no estado VNC após indução em solução BPS mantido a 4 °C apresentaram transição da forma bacilar para cocóide e redução das dimensões celulares diâmetro, comprimento e volume. Entretanto, na presença de cloreto de sódio a estirpe selvagem manteve morfologia bacilar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, F. B.; LAGHA, R., BAKHROUF, A. Resuscitation and morphological alterations of *Salmonella bovis* cells under starvation in soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1507-1512, 2007.

ALBERTINI, M. C.; ACCORSI, A.; TEODORI, L.; PIERFELICI, L. ; UGUCCIONI, F. ; ROCCHI, M. B. L.; BURATTINI, S.; CITTERIO, B. Use of multiparameter analysis for *Vibrio alginolyticus* viable but nonculturable state determination. **Cytometry Part A**, v. 69, p. 260-265, 2006.

ALDEA, M.; GARRIDO, T.; PLA, J.; VICENTE, M. Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. **Journal EMBO**, v. 9, p. 3787–3794, 1990.

ALEXANDER, E.; PHAM, D.; STECK, T. R. The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3754-3756, 1999.

ALTIER, C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 85-92, 2005.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists International. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed., 1998.

ASAKURA, H.; MAKINO, S.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 87-93, 2002.

ASAKURA, H.; ISHIWA, A.; ARAKAWA, E.; MAKINO, S.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. **Environmental Microbiology**, v. 9, n.4, p. 869-879, 2006.

ASAKURA, H.; PANUTDAPORN, N.; KAWAMOTO, K.; IGIMI, S.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but nonculturable state. **Microbiology and Immunology**, v 51, n. 9, p. 875-881, 2007.

BALASUBRAMANIAN, G.; STUART, M. R.; WEIMER, B. C. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2498-2512, 2007.

BALZER, G. J.; McLEAN, G. J. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 675-680, 2002.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; CAPPELIER, J. M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 77-81, 2000.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; DECLERQ, E.; JUGIAU, F.; CAPPELIER, J. Environmental and physico-chemical factors induced VBNC state in *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Research**, v. 33, p. 359-370, 2002.

BIÈCHE, I.; OLIVI, M.; CHAMPÈME, M.H.; VIDAUD, D.; LIDEREAU, R.; VIDAUD, M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.78, p.661-666, 1998.

BOARETTI, M.; LLEÒ, M. D. M.; BONATO, B.; SIGNORETTO, C.; CANEPARI, P. Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 986-996, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.** 2001. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm#. Acesso em 26 de junho de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550>. Acesso em 03 Mar. 2012.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H. M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 967–973, 2003.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465–2467, 2000.

BREMER, E.; KRÄMER, R. Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In G. Storz, e R. Hengge-Aronis (Eds.), **Bacterial Stress Responses** (pp. 79–97). Washington, D.C.: ASM Press, 2000.

CAPPELIER, J. M.; LAZARO, B.; ROSSERO, A.; FERNANDES-ASTORGA, A.; FEDERIGHI, M. Double staining (CTC-DAPI) for detection and enumeration of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. **Veterinary Research**, v. 28, n.6, p. 547-555, 1997.

CARMO, C. P. **Morfologia celular, perfil de ácidos graxos e ativação de macrófagos por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no estado viável não cultivável.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

CARO, A.; GOT, P.; LESNE, J.; BINARD, S.; BALEUX, B. Viability and virulence of experimentally stressed non culturable *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3229-3232, 1999.

CASHEL, M.; GALLANT, J. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *E. coli*. **Nature**, v. 221, n. 5183, p. 838-841, 1969.

CDC. **CDC Estimates of Foodborne Illnes in the United States** (2011). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/>>. Acesso em 24 de janeiro de 2012.

CHATTERJI, D.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. The mediator for stringent control, ppGpp, bind to the β -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Genes to Cell**, v. 3, p- 279-287, 1998.

CHATTERJI, D.; OJHA, A. K. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 160–165, 2001.

CHAVEERACH, P.; HUURNE, M. H. A. A.; LIPMAN, A. J. L.; KNAPEN, F. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 711-714, 2003.

CHIU, S. W.; CHEN, S. Y.; WONG, H. C. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7016–7022, 2008.

COOK, K. L.; BOLSTER, C. H. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 573-583, 2007.

COSTA, K.; BACHER, G.; ALLMAIER, G. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 3710–3715, 1999.

COUTARD, F.; POMMEPUY, M.; LOAEC, S.; HERVIO-HEATH, D. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 951-961, 2005.

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* recovery of culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5183-5189, 2007.

CUNNINGHAM, E.; O'BYRNE, C.; OLIVER, J. D. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. **Food Control**, v. 20 p. 1141–1144, 2009.

DALEBROUX, Z. D.; SVENSSON, S. L.; GAYNOR, E. C.; SWANSON, M. S. ppGpp conjures bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 171-199, 2010.

DALEBROUX, Z. D.; SWANSON, M. S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. **Nature Reviews**, v. 10, p. 203-212, 2012.

DAY, A. P.; OLIVER, J. D. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 69-73, 2004.

DELAMARCHE, C.; THOMAS, D.; ROLLAND, J. P.; FROGER, A.; GOURANTON, J.; SVELTO, M. Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 4193–4197, 1999.

DENNIS, P.; NOMURA, M. Stringent control of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 10, p. 3819–3823, 1974.

DIVOL, B.; LONVAUD-FUNEL, A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p. 85-93, 2005.

DU, H.; WANG, M.; LUO, Z., NI, B.; WANG, F.; MENG, Y. Coregulation of gene expression by sigma factors *RpoE* and *RpoS* in *Salmonella enterica* serovar Typhi during hyperosmotic stress. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1483–1489, 2011.

EFSA-ECDC. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. **EFSA Journal**, v. 130, p. 2-352, 2007.

EYMANN, C.; HOMUTH, G.; SCHARF, C.; HECKER, M. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 2500–2520, 2002.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, p. 1-6, 2011. Article in press.

FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 72p., 2006.

GARRIDO, T.; SANCHEZ, M.; PALACIOS, P.; ALDEA, M.; VICENTE, M. Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. **Journal EMBO**, v. 12, p. 3957–3965, 1993.

GENTRY, D. R.; HERNADEZ, V. J.; NGUYEN, L. H.; JENSEN, D. B.; CASHEL, M. Synthesis of stationary-phase sigma factor sigma-S is positively regulated by ppGpp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7982–7989, 1993.

GHEZZI, I. J.; STECK, T. R. Induction of the viable non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 203-208, 1999.

GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; FEY, A.; HÖFLE, M. G.; ESPEJO, R. T.; GUZMÁN, C. A. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 658-666, 2006.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 613–624, 2008.

GOURMELON, M.; CILLARD, J.; POMMEPUY, M. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. **Journal Applied Bacteriology**, v. 77, p. 105-112, 1994.

GREY, B.; STECK, R. T. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5325-5327, 2001.

GUNASEKERA, T. S.; SØRENSEN, A.; ATTFIELD, P. V.; SØRENSEN, S. J.; VEAL, D. A. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1988–1993, 2002.

GUPTE, A. R.; RESENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104. **Applied and Environment Microbiology**, v. 69, p. 6669-6675, 2003.

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 549-559, 2001.

HASELTINE, W. A.; BOCK, R. Synthesis of guanosine tetra and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 70, n. 5, p. 1564-1568, 1973.

HEIM, S.; LLEO, M. D. M.; BONATO, B.; GUZMAN, C. A.; CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6739–6745, 2002.

HENARD, C. A.; BOURRET, T. J.; SONG, M. ; VÁZQUEZ-TORRES, A. Control of redox balance by the stringent response regulatory protein promotes antioxidant defenses of *Salmonella*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 36785–36793, 2010.

HENGGE, R. The two-component network and the general stress sigma factor *RpoS* (σ^S) in *Escherichia coli*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 631, p. 40–53, 2008.

HENGEE, R. Proteolysis of σ^S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 667-676, 2009.

HIRSCH, M.; ELLIOTT, T. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 18, p. 5077–5087, 2002.

HOON, M. J. L.; EICHENBERGERZ, P.; VITKUP, S. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. Review. **Current Biology**, vol. 20, nº 17, p. R735-R743, 2010.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. W. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, n.2, p. 819-830, 2012.

JAMES, T. S.; CHAIRMAN, D. R. B.; VICE, C.; DON, J. B.; PAUL, V.; GEORGE, M. G.; MICHAEL, G.; NOEL, R. K.; FRED, A. R.; KARL-HEINZ, S. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2ª Edição, volume 1, New York: Springer. 721p., 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLGEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Food Science Text Series., 790 p., 2005.

JOLIVET-GOUGEON, A.; SAUVAGER, F.; BONNAURE-MALLET, M.; COLWELL, R. R.; CORMIER, M. Virulence of viable but nonculturable *Salmonella* Typhimurium LT2 after peracetic acid treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 147-152, 2006.

KANA, B. D.; GORDHAN, B. G.; DOWNING, K. J.; SUNG, N.; VOSTROKTUNOVA, G.; MARCHWSKI, E. E.; TSENOVA, L.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A.; KAPLAN, G.; MIZRAHI, V. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 672-684, 2008.

KOGURE, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N.. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 415-420, 1979.

KÖNIGSHOFF, M.; WILHELM, J.; BOHLE, R.M.; PINGOUD, A.; HAHN, M. *HER-2/neu* gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.49, n.2, p.219-229, 2003.

KRUSE, T.; BORK-JENSEN, J.; GERDES, K. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 78–89, 2005.

KUSUMOTO, A.; ASAKURA, H.; KAWAMOTO, K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 4, p. 228-237, 2012.

LAI, C. J.; CHEN, S. Y.; LIN, I. H.; CHANG, C. H.; WONG, H. C. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 118–124, 2009.

LANGE, R.; FISCHER, D., HENGGE-ARONIS, R. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ^S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4676-4680, 1995.

LAZZARINI, R.; DAHLBERG, A. The control of ribonucleic acid synthesis during amino acid deprivation in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 420–429, 1971.

LEVIN, P. A.; MARGOLIS, P. S.; SETLOW P.; LOSICK R.; SUN, D. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 6717–6728, 1992.

LLEÒ, M. M.; PIEROBON, S.; TAFI, M.C.; SIGNORETO, C.; CANEPARI, P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4564-4567, 2000.

LIU, Y.; GILCHRIST, A.; ZHANG, J.; LI, X. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.5, p. 1502-1507, 2008.

LIU, Y.; WANG, C.; FUNG, C.; LI, X. F. Quantification of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by targeting the *rpoS* mRNA. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 2612-2615, 2010a.

LIU, Y.; WANG, C.; TYRRELL, G.; LI, X. F. Production of shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. **Water Research**, v. 44, p. 711-718, 2010b.

LOEWEN, P. C.; HENGGE-ARONIS, R. The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 48, p. 53-80, 1994.

LUTKENHAUS, J.; MUKHERJEE, A. Cell division, *In* F. C. NEIDHARDT, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), ***Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology***. ASM Press, Washington, D.C. p. 1615–1626, 1996.

MAALEJ, S.; DENIS, M.; DUKAN, S. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. **Microbiology**, v. 150, p. 181-187, 2004.

MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 236-242, 2005.

MAGNUSSON, L. U.; GUMMESSON B.; JOKSIMOVIC, P.; FAREWELL, A.; NYSTROM, T. Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 5193-5202, 2007.

MAKINO, S-I.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5536-5539, 2000.

MANAHAN, S.; STECK, T. R. The viable nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium melilot*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 29-38, 1997.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MATA, G. M. S. C. **Guanosina tetrafosfato regula o sistema de detecção de quorum e a formação de biofilme em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 115p, 2012.

MATIN, A. Role of alternate sigma factors in starvation protein synthesis - novel mechanisms of catabolite repression. **14th Forum In Microbiology**, p. 494-505, 1996.

MATTICK, K. L.; JØRGENSEN F.; LEGAN, J. D.; COLE, M. B.; PORTER, J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T. J. Survival and filamentation of *Salmonella enteric* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1274-1279, 2000.

MENDES, R. A. **Indução, perfil de proteínas intracelulares e detecção de mRNA de *Salmonella enterica* no estado viável não cultivável.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 107p., 2009.

MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. **Letters of Applied Microbiology**, v. 30, p.136-141, 2000.

MISHRA, A.; TANEJA, N.; SHARMA, M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 945-953, 2012.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4th ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.

MUELA, A.; SECO, C.; CAMAFEITA, E.; ARANA, I.; ORRUÑO, M.; LÓPEZ, J. A.; BARCINA, I. Changes in *Escherichia coli* outermembrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, p. 28–36, 2008.

MUNRO, P. M.; FLATAU, G. N.; CLEMENT, R. L.; GAUTHIER, M. J. Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1853–1858, 1995.

NILSSON, H-O.; BLOM, J.; AL-SOUD, W. A.; LJUNGH, A.; ANDERSEN, L. P.; WADSTROM, T. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 11–19, 2002.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVER, J.D. Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response, p. 1-15. *In*: J.K. JANSSON, J.D. van Elsas, and M.J. Bailey (eds.), **Tracking Genetically-Engineered Microorganisms**. Landes Biosciences, Georgetown, TX, 2000a.

OLIVER, J. D. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. *In*: R.R. COLWELL and D.J. Grimes (eds.), **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C, p. 277-299, 2000b.

OLIVER, J. D. Viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 415–425, 2010.

ORDAX, M.; MARCO-NOALES, E.; LÓPES, M. M.; BIOSCA, E. G. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3482-3488, 2006.

PANUTDAPORN, N.; KAWAMOTO, K.; ASAKURA, H.; MAKINO, S.-I. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 241–247, 2006.

PENEAU, S.; CHASSAING, D.; CARPENTIER, B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2839-2846, 2007.

PIZARRO-CERDÁ, J.; TEDIN, K. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1827-1844, 2004.

POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, R.; COLWELL, R. ; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n. 12, p. 4621-4626, 1996.

POOLMAN, B.; BLOUNT, P.; FOLGERING, J. H. A.; FRIESEN, R. H. E.; MOE, P. C.; VAN DER HEIDE, T. How do membrane proteins sense water stress? **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 889–902, 2002.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L.. Supplement (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 907–909, 2001.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, p.173–174, 2003.

PORTER, J.; EDWARDS, C.; PICKUP, R.W. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 399–408, 1995.

POTRYKUS, K.; CASHEL, M. (p)ppGpp: Still magical. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 62, p. 35-51, 2008.

POWELL, B. S.; COURT, D. L. Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in luria bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, 1998.

RAHMAN, I.; SHAHAMAT, M.; KIRCHMAN, P. A.; RUSSEK-COHEN, E.; COLWELL, R. R. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3573–3578, 1994.

REDDY, P. S.; RAGHAVAN, A.; CHATTERJI, D. Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 255-265, 1995.

REISSBRODT, R. RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; TSCHA, 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4788–4794, 2002.

REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; PLIKAYTIS, A. A.; HEIBA, B. D.; FARMER, J. J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 313-320, 1989.

RICHILIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 1-10, 2006.

ROEßLER, M.; MÜLLER, V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 743–754, 2001.

ROSZAK, D. B.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 334-338, 1984.

ROTH, W. G.; LECKIE, M. P.; DIETZLER, D. N. Restoration of colony forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 3142-3146, 1988.

RUDI, K.; NATERSTAD, K.; DROMTORP, S.M.; HOLO, H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 301-306, 2005.

SAUX, M. F-L.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R. R.; POMMEPUY, M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5641–5646, 2002.

SCHOSTAK, M.; KRAUSE, H.; MILLER, K.; SCHRADER, M.; WEIKERT, S.; CHRISTOPH, F.; KEMPKENSTEFFEN, C.; KOLLERMANN, J. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. **BMC Urology**, v.15; p. 6-7, 2006.

SCHREIBER, G.; RON, E. Z.; GLASER, G. ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 27-32, 1995.

SERPAGGI, V. ; REMIZE, F. ; RECORBET, G. ; GAUDOT-DUMAS, E. ; GRAND, A. S. ; ALEXANDRE, H. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 438-447, 2012.

SHEN, S.; FANG, F. C. Integrated stress responses in *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 75-81, 2012.

SIGNORETTO, C.; LLEÓ, M. M.; CANEPARI, P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in viable but nonculturable state. **Current Microbiology**, v. 44, p. 125–131, 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SITNIKOV, D. M.; SCHINELLER, J. B.; BALDWIN, T. O. Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription offtsQA involves both *rpoS* and SdiA-mediated autoinduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 336-341, 1996.

SMITH, B.; OLIVER, J. D. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1445-1451, 2006.

SONG, M.; KIM, H. J.; KIM, E. Y.; SHIN, M.; LEE, H. C.; HONG, Y.; RHEE, J. H.; YOON, H.; RYU, S.; LIM, S.; CHOY, H. E. ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* Pathogenicity Island 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34183-34190, 2004.

SPECTOR, M. P. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 40, p. 233–279, 1998.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. Review. **Food Research International**, p. 1-27, 2011. Article in Press.

TESTERMAN, T. L.; VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y.; JONES-CARSON, J.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defenses required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 771–782, 2002.

THOMPSON, L. J.; MERRELL, D. S.; NEILAN, B. A.; MITCHELL, H.; LEE, A.; FALKOW, S. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2643–2655, 2003.

TREVORS, J. T. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 266–273, 2011.

TOULOKHONOV I. I.; SULGINA, I.; HERNANDEZ, V. J. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular and occurs near the N-terminus of the beta-subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1220-1225, 2001.

VOGT, S. L.; GREEN, C.; STEVENS, K. M.; DAY, B.; ERICKSON, D. L.; WOODS, D. E.; STOREY, D. G. The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4094-4104, 2011.

VORA, G. J.; MEADOR, C. E.; BIRD, M. M.; BOPP, C. A.; ANDREADIS, J. D.; STENGER, D. A. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 102, p. 19109–19114, 2005.

WAN NORHANA, M. N.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v. 21, p. 343-361, 2010.

WEBER, H.; POLENT, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V. F. ; HENGGE, R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1591-1603, 2005.

WENDRICH, T. M.; BLAHA, G.; WILSON, D. N.; MARAHIEL, M. A.; NIERHAUS, K. H. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. **Molecular Cell**, v. 10, p. 779–788, 2002.

WHO, World Health Organization. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars**. 2007 9th edition. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/clre/cadrecnr/salmons/WKLM-2007.pdf>>. Acesso em 03 de março de 2012.

WOLF, P. W.; OLIVER, J. D. Temperature effects on the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 33-39, 1992.

WONG, H.; WANG, P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 359-366, 2004.

WONG, H.; WANG, P.; CHEN, S.; CHIU, S. Resuscitation of viable but-nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in minimum salt medium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 269-275, 2004.

WONG, H. C.; SHEN, C. T.; CHANG, C. N.; LEE, Y. S.; OLIVER, J. D. Biochemical and virulence characterization of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2430–2435, 2004.

WU, J.; XIE, J. Magic spot: (p)ppGpp. **Journal of Cellular Physiology**, v. 220, n. 2, p. 297-302, 2009.

XIAO, H.; KALMAN, M.; KEHARAZ, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *reZA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 9, p. 5980-5990, 1991.

XU, H. S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L. ; ATWELL, R. W.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**, v. 8, p. 313-323, 1982.

YARON, S.; MATTHEWS, K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 633- 640. 2002.

ZHOU, Y. N.; JIN, D. J. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 2908–2913, 1998.