

FLÁVIA ARRUDA FLORESTA

**CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DO ESTADO VIÁVEL NÃO
CULTIVÁVEL (VNC) EM *Salmonella E Escherichia coli***

Tese 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
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F634c
2006

Floresta, Flávia Arruda, 1980-

Condições para indução do estado viável não
cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli* /
Flávia Arruda Floresta. – Viçosa : UFV, 2006.
xv, 55f. : il. algumas col. ; 29cm.

Orientador: Míriam Teresinha dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-55.

1. *Salmonella* - Crescimento. 2. *Escherichia coli* -
Crescimento. 3. Cloreto de sódio - Efeito fisiológico.
4. Bactérias patogênicas. 5. Alimentos - Microbiologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.3

FLÁVIA ARRUDA FLORESTA

**CONDIÇÕES PARA INDUÇÃO DO ESTADO VIÁVEL NÃO
CULTIVÁVEL (VNC) EM *Salmonella* E *Escherichia coli***

Tese 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: 10 de fevereiro de 2006.

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos
(Orientadora)

“E agora o importante

é terminar bem.”

(Teilhard de Chardin)

A Deus, meus pais Antônio e Carminha,

meus irmãos Fernanda e Antônio José

meu sobrinho Lucas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer experimentar que Ele não é teoria, nem teologia e sim pessoa concreta. Por se fazer presente em todos os momentos de minha vida, principalmente nos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de participar do Programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Míriam dos Santos, pela orientação, amizade, incentivo, confiança e carinho.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pela disponibilidade, aconselhamentos e sugestões neste trabalho.

À professora Célia, pelas valiosas sugestões neste trabalho e de uma maneira especial, pela amizade e confiança depositada em mim.

Aos professores Paulo Arruda e Flávia Maria Lopes Passos, pelas sugestões e críticas.

Aos professores do Departamento de Microbiologia que muito ajudaram em minha formação.

À professora Cristina, por disponibilizar o laboratório de Microbiologia de Alimentos para execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao professor Maurício, pela atenção, incentivo e orientação na utilização do microscópio de epifluorescência.

À Nilcéa, Laura, D. Aparecida e Sr. Custódio, por sempre me atenderem com atenção e competência.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial Sr. Cezário, Sr. Paulo, José Carlos e Pablo, pela colaboração e paciência.

A meus queridos pais, Antônio e Carminha, por tudo que fizeram por mim, por sempre estarem presentes, pela paciência, pelo amor e acima de tudo, por terem feito de mim quem sou hoje.

À Fernanda e Antônio José, companheiros de todas as horas, em toda minha vida. Pelos conselhos valiosos e por me fazer extremamente amada.

Ao Dudu e Roberta, que já fazem parte da minha família, pelo apoio constante, não só na vida acadêmica, mas em todos os momentos necessários.

Ao Lucas, meu sobrinho, por alegrar a minha casa e minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Anaeróbios, Microbiologia Industrial e Patógenos Alimentares, pela torcida e pelo convívio sempre positivo.

Aos amigos Uelinton, Renata, Marcelo, Andrezinho, Marcelão, Ulisses, Priscila, Ireninha, Janaína, Lilica e Simone, que fizeram a Fisiologia e Genética de Microrganismos mais fáceis de serem encaradas. Saudades dos dias e noites de estudos intermináveis.

À Simone, Lilica e Maurílio que além de colegas de curso se tornaram grandes amigos, para a vida inteira, pessoas que posso contar em qualquer situação.

À Bete, minha grande amiga, pela companhia em todos os momentos, inclusive os de descanso, pela amizade, confiança e pelos biscoitos e sucos na hora do lanche e também pelas farofas de ovo, palha italiana e caronas até a rodoviária.

Ao Andrezinho por sempre me animar e por sua disponibilidade constante.

À Sabrina, minha estagiária alto nível, pela ajuda, companheirismo e amizade.

À Carol, pela dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho e também me proporcionaram momentos inesquecíveis.

BIOGRAFIA

FLÁVIA ARRUDA FLORESTA, filha de Antônio Nogueira Floresta e Maria do Carmo Arruda Floresta, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, no dia 25 de fevereiro de 1980.

Em março de 2003, graduou-se em Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em agosto de 2003, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Respostas adaptativas	3
2.2. Fatores que induzem o estado VNC	5
2.3. Alterações Fenotípicas	7
2.4. Ressuscitação	7
2.5. Técnicas de detecção do estado VNC	8
2.6. Importância do estado VNC em alimentos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Microrganismos	12
3.2. Efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i>	12
3.3. Efeito do cloreto de sódio sobre células de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> em diferentes fases de crescimento, em temperatura de refrigeração	13
3.4. Detecção de células no estado VNC	14
3.5. Avaliação da morfologia celular	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17

	Página
4.1. Efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i>	17
4.2. Efeito do cloreto de sódio sobre células de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> em diferentes fases de crescimento, em temperatura de refrigeração	22
4.3. Culturabilidade e indução do estado VNC	29
4.4. Efeito do NaCl na morfologia de <i>E. coli</i>	36
5. CONCLUSÕES	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Velocidade específica máxima de crescimento de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) na presença de cloreto de sódio, a 35 °C ± 1.....	20
Tabela 2 - Variação da densidade óptica (Δ D.O.) de <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) na presença de cloreto de sódio, a 35 °C ± 1	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Crescimento de <i>Salmonella</i> CCS3 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a 35 °C ± 1	18
Figura 2 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a 35 °C ± 1.....	18
Figura 3 - Crescimento de <i>Escherichia coli</i> CCS4 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl. a 35 °C ± 1	19
Figura 4 - Crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 1175 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a 35 °C ± 1	19
Figura 5 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	23
Figura 6 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>Salmonella</i> CCS3 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	23
Figura 7 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>E. coli</i> ATCC 1175 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	24

	Página
Figura 8 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>E. coli</i> CCS4 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	24
Figura 9 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	27
Figura 10 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>Salmonella</i> CCS3 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	27
Figura 11 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>E. coli</i> ATCC 1175 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	28
Figura 12 - Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de <i>E. coli</i> CCS4 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a 5 °C ± 1	28
Figura 13 - Comparação entre as contagens de células de <i>Salmonella</i> viáveis cultiváveis (CVC) e células viáveis totais (CVT) após dez dias de estocagem a 5 °C ± 1 em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl	30
Figura 14 - Comparação entre as contagens de células de <i>E. coli</i> viáveis cultiváveis (CVC) e células viáveis totais (CVT) após dez dias de estocagem a 5 °C ± 1 em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl	30
Figura 15 - Comparação entre as contagens de células de <i>Samonella</i> viáveis totais (CVT), pelos métodos DVC-Kogure e pelo método LIVE/DEAD [®] , após dez dias de estocagem a 5 °C ± 1 em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl	33
Figura 16 - Comparação entre as contagens de células de <i>E. coli</i> viáveis totais (CVT), pelos métodos DVC-Kogure e pelo método LIVE/DEAD [®] , após dez dias de estocagem a 5 °C ± 1 em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl	33

	Página
Figura 17 - Células de <i>E. coli</i> CCS4, em tampão BPS 1,02 M NaCl, após dez dias de incubação sob refrigeração (5 °C ± 1), coradas pelo método Kit LIVE/DEAD®	35
Figura 18 - Células de <i>E. coli</i> CCS4, em caldo BHI 1,02 M NaCl, após dez dias de incubação sob refrigeração (5 °C ± 1), coradas com laranja de acridina	35
Figura 19 - Micrografias de <i>Escherichia coli</i> CCS4 em meio BHI adicionado de diferentes concentrações de NaCl, em microscópio eletrônico de varredura Leo 1430 VP	37
Figura 20 - Micrografias de <i>E. coli</i> CCS4 em tampão BPS adicionado de diferentes concentrações de NaCl, em microscópio eletrônico de varredura Leo 1430 VP	38

RESUMO

FLORESTA, Flávia Arruda M. S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli*. Orientadora: Míriam Teresinha dos Santos. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Hilário Cuquetto Mantovani.

O efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento e a sobrevivência de *Salmonella* e *Escherichia coli*, e também sua capacidade de induzir o estado fisiológico viável mas não cultivável foram investigados. Estirpes de *Salmonella* e *E. coli* isoladas de carcaças suínas e linhagens de referência foram utilizadas neste estudo. As velocidades máximas de crescimento, em meio Infusão Cérebro e Coração (BHI), foram menores em todas as concentrações de NaCl para as quatro estirpes estudadas. O comportamento das estirpes de *Salmonella* e *E. coli* foi afetado de forma diferente pelo NaCl em células provenientes de fase log e estacionária de crescimento. Tanto para *Salmonella* como para *E. coli*, as células provenientes de fase log de crescimento apresentaram redução do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) ao longo de dez dias de estocagem a 4 °C, em meio BHI. Para células provenientes de fase estacionária de crescimento, o número de UFC/mL permaneceu quase inalterado no mesmo período de estocagem nas concentrações superiores a 0,68 M e 1,02 M de NaCl para *Salmonella* e *E. coli*, respectivamente. Nas concentrações de 0 e 0,17 M de NaCl os microrganismos apresentaram crescimento nas duas fases estudadas. Quando avaliou-se o comportamento das estirpes em solução fosfato de Butterfield (BPS) nas mesmas concentrações de NaCl, observou-se que, nas concentrações 0 e 0,17 M de NaCl, as estirpes de *Salmonella* e *E. coli* não apresentaram crescimento e, nas concentrações de 0,68 M e 1,02 M para as estirpes de *Salmonella* e 1,02

M e 1,28 M de NaCl para as de *E. coli*, observou-se queda na culturabilidade no período de dez dias de estocagem quando células da fase log foram avaliadas, no entanto quando células da fase estacionária foram testadas o número de UFC/mL foi praticamente o mesmo para todas as concentrações de NaCl utilizadas. Na detecção de células no estado viável não cultivável, constatou-se que parte das células das quatro estirpes provenientes da fase log de crescimento nas maiores concentrações de NaCl testadas para cada uma delas, provavelmente, estavam no estado VNC. Sob condições de estresse osmótico devido ao NaCl, as células do isolado *E. coli* CCS4 apresentaram mudanças morfológicas por microscopia eletrônica de varredura. Em meio BHI e BHI adicionado de 0,17 M, 1,02 M as células mostraram-se na forma filamentosa, em BHI com 1,28 M de NaCl algumas células diminuíram de tamanho e outras se desintegraram. Em BPS, todas as condições testadas induziram a diminuição do tamanho das células e na concentração de 1,28 M de NaCl transição para a forma cocóide foi observada. Esses resultados sugerem que estresse osmótico e temperatura de refrigeração induzem o estado VNC nos isolados de *Salmonella* e *E. coli* obtidos a partir de carcaças suínas.

ABSTRACT

FLORESTA, Flávia Arruda M. S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006.
Conditions for induction of viable but non culturable (VNC) state in *Salmonella* and *Escherichia coli*. Adviser: Míriam Teresinha dos Santos. Committee Members: Célia Alencar de Moraes and Hilário Cuquetto Mantovani.

The effect of sodium chloride on the growth and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* and the role of salt concentration in the induction of the viable but non culturable (VNC) state was evaluated. *Salmonella* CCS3 and *E. coli* CCS4, isolated from swine carcasses, and a reference strain of *Salmonella* and *E. coli* were used in this study. All strains showed smaller maximum growth rates when cultured in Brain Heart Infusion (BHI) with different NaCl concentrations than in control treatments (BHI without NaCl). Sodium chloride affected log and stationary phase cultures of *Salmonella* and *E. coli* differently. *Salmonella* and *E. coli* from exponentially growing cultures showed reduction in the number of colony forming units (CFU/mL) after ten days of storage at 4 °C in BHI medium. Stationary phase cells of *Salmonella* and *E. coli* were not affected by NaCl concentrations up to 0,68 M and 1,02 M, respectively. In BHI without salt and BHI with 0,17 M of NaCl, growth was observed for both log and stationary phase cells of the four strains tested. In phosphate Butterfield solution (PBS) without salt or with 0,17 M of NaCl, log phase cells of *Salmonella* and *E. coli* did not grow, while concentrations of 0,68 M and 1,02 M NaCl for *Salmonella* and 1,02 M and 1,28 M NaCl for *E. coli* induced a significant loss of culturability at the same time and temperature of incubation. When stationary phase cells of the four strains were incubated in PBS, the number of CFU/mL was similar regardless of the NaCl concentration used. Some log phase cells of the four strains lost

culturability but maintained viability at higher NaCl concentrations in BHI and PBS, suggesting that *Salmonella* and *E. coli* entered the VNC state. Scanning electron microscopy indicated morphological changes in *E. coli* CCS4 cells under osmotic stress. In BHI medium without salt or with 0,17 M and 1,02 M of NaCl, filamentous growth was observed, while in BHI with 1,28 M NaCl, the cells became smaller or lysed. In PBS, all conditions tested resulted in cell size reduction and at 1,28 M NaCl was observed the transition of the cells to the coccoid form. These results suggest that osmotic stress and refrigeration temperature induce the VNC state in isolates of *Salmonella* and *E. coli* obtained from swine carcasses.

1- INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas e não patogênicas estão freqüentemente expostas a estresses provocados por mudanças na disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, salinidade e iluminação solar, dentre outras, quando crescem no ambiente, nos alimentos ou invadem um hospedeiro. Portanto, a persistência das bactérias no ambiente em que vivem é, na maioria das vezes, determinada por sua capacidade de suportar e mesmo se adaptar a esses estresses.

Dependendo da intensidade e do tipo de estresse sofrido, os microrganismos podem apresentar diferentes respostas adaptativas como a formação de esporos e podem entrar em um estado fisiológico denominado viável não cultivável (VNC) no qual as células mantêm atividade metabólica, mas não são cultiváveis pelos métodos tradicionais disponíveis. O estado VNC é uma estratégia de sobrevivência no ciclo de vida de algumas bactérias que ocorre, principalmente, após a fase estacionária do crescimento.

Aproximadamente sessenta espécies bacterianas tiveram sua capacidade de entrar no estado VNC comprovada. Entre estas espécies, podemos destacar alguns patógenos alimentares como, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* (incluindo *E. coli* enterohemorrágica, EHEC), *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, entre outras.

O estado VNC se torna importante para os microbiologistas uma vez que as células que estão dormentes podem retomar seu metabolismo vegetativo normal, por um processo denominado ressuscitação e ainda manter sua capacidade de causar doenças no hospedeiro.

A principal estratégia utilizada para determinar se as células não cultiváveis estão mortas ou no estado VNC é a contagem de células viáveis por meio de alguma metodologia que avalie a atividade metabólica ou a integridade de membrana.

A indução do estado VNC em patógenos como *Salmonella*, estirpes patogênicas de *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni* expostas a condições de estresse, incluindo o processamento e os vários tipos de embalagens dos alimentos modernos, tem causado grande preocupação aos órgãos de saúde pública.

Uma vez que adição de sal e refrigeração são muito utilizadas como barreiras para impedir o crescimento de microrganismos nos alimentos e já foi relatado que esses tratamentos são capazes de induzir o estado VNC em bactérias, este trabalho teve como objetivo verificar se essas condições são capazes de induzir esse estado fisiológico em estirpes de *Salmonella* e *E. coli*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Respostas adaptativas

As bactérias Gram-negativas *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* são membros da família das enterobacteriáceas que residem grande parte de seu ciclo de vida em animais. *S. enterica* é o agente etiológico de gastroenterites e febre tifóide em humanos e outros animais, enquanto *E. coli*, na maior parte das vezes, é encontrada como comensal do intestino de mamíferos, podendo, entretanto, existir variantes patogênicas, como *E. coli* O157:H7 (PUENTE e FINLAY, 2001; SCHERER e MILLER, 2001).

O habitat natural de *S. enterica* e *E. coli* possui temperatura amena e constante, aproximadamente 37 °C, e também altas concentrações de aminoácidos livres e açúcares, que propiciam condições ótimas para o crescimento (SAVAGEAU, 1983). Uma vez excretadas do hospedeiro, *Salmonella* e *E. coli* encontram ambientes desfavoráveis como disponibilidade de nutrientes limitada, estresse osmótico, ampla variação na temperatura e no pH, entre outros.

Na natureza, geralmente, os microrganismos encontram-se em condições adversas e tem-se observado que várias respostas adaptativas estão envolvidas na sobrevivência dos microrganismos, quando submetidos a condições de estresse (ABEE e WOUTERS, 1999). Essas respostas incluem alterações tanto na fisiologia quanto na morfologia celular, como por exemplo, a esporulação, aquisição de competência, produção de antibióticos dentre outras (DUBNAU e TURGAY, 2000).

Um dos mais conhecidos reguladores de resposta ao estresse é o fator sigma (σ^S) ou RpoS, que é uma subunidade da RNA polimerase. Mais de cinquenta genes controlados pelo σ^S , conferem tolerância ao estresse, bem como mediam rearranjos estruturais e morfológicos e ainda redirecionam o metabolismo celular (LANGE e HEGGE-ARONIS, 1991). Recentemente, um grande número de genes que conferem virulência aos patógenos, tem sido encontrado como parte do regulon σ^S (BEARSON *et al.*, 1996; COYNAUT *et al.*, 1996). Desta maneira, os microrganismos podem garantir sua sobrevivência por meio da síntese de proteínas como catalase (IVANOVA *et al.*, 1994), exonucleases (EISENSTARK *et al.*, 1999), dentre outras estratégias.

Outra resposta a estresse bastante comum em microrganismos é a síntese de solutos compatíveis como glicina e betaina, quando estes estão submetidos a estresse osmótico, com isso eles se tornam mais aptos a sobreviverem em ambientes com altas concentrações de solutos (BREMER e KRAMER, 2000).

Respostas adaptativas oriundas de estresse nutricional têm sido muito estudadas por alguns autores (ZAMBRANO, 1993; ZINSER e KOLTER, 1999). Uma das mais estudadas é o fenótipo de vantagem de crescimento em fase estacionária (GASP) que se caracteriza por mutação, geralmente simples, que seleciona microrganismos capazes de crescer ou sobreviverem nestas condições adversas. Esta resposta está ligada ao regulador de resposta RpoS, pois a mutação de apenas um alelo deste gene pode resultar em um mutante GASP.

Os microrganismos são submetidos a diferentes intensidades de estresse, desde um estresse leve, onde a velocidade de crescimento é reduzida, mas as células se adaptam completamente a nova condição, até o estresse letal em que as respostas podem levar à morte da célula, passando pelo estresse extremo, onde o crescimento pára e as células sacrificam suas fontes de reservas para sobreviver (YOUSEF e JUNEJA, 2003). Um estresse mais intenso pode levar à injúria que se caracteriza pelo decréscimo na resistência a agentes seletivos e pelo aumento no requerimento nutricional. Células injuriadas podem ser recuperadas facilmente utilizando-se meios de enriquecimento não seletivos como os empregados em análises microbiológicas para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* (MONTVILLE, 1997). As células submetidas a um estresse nutricional passam ao estado de inanição, o qual pode ser definido como o estado de resposta fisiológica diante da falta de nutriente. Nesse estado, as células também sofrem um decréscimo drástico no seu metabolismo, mas conseguem ser cultivadas em meio de

cultura com suprimentos nutricionais adequados, mesmo que em um período maior de tempo, isto é, apresentam aumento significativo da fase lag (OLIVER *et al.*, 1991).

Diante de condições de estresse, os microrganismos apresentam diferentes estratégias de sobrevivência. Dependendo da intensidade e do tipo de estresse sofrido, as bactérias podem entrar no estado viável não cultivável (VNC). ROSZAK e COLWELL (1987) definiram estado viável não cultivável como o estado fisiológico em que os microrganismos não são capazes de crescer em meios utilizados pelos métodos tradicionais disponíveis, mas que apresentam características de células vivas, como atividade respiratória, manutenção de potencial de membrana, atividade enzimática, entre outras.

2.2. Fatores que induzem o estado VNC

Há pouco mais que 20 anos, XU *et al.* (1982), estudando a sobrevivência de bactérias entéricas, em ambientes aquáticos, foram pioneiros na constatação da persistência de *Vibrio cholerae* e *E. coli* ainda metabolicamente ativos sob condições de salinidade e temperatura variadas, entretanto, esses mesmos microrganismos não apresentavam grande recuperação do crescimento quando cultivados pelos métodos tradicionais. Concluiu-se que sob certas condições ambientais, o fato de encontrar um baixo número ou mesmo não detectar a presença de microrganismos, não garante que esses estejam presentes em número pequeno ou estejam ausentes neste meio. Isto é de grande importância para a saúde pública, uma vez que o monitoramento da qualidade de água pode estar comprometido.

Inicialmente, acreditava-se que o estado fisiológico VNC era uma estratégia de sobrevivência utilizada apenas por bactérias Gram negativas como *Vibrio cholerae* (COLWELL *et al.*, 1985) *Vibrio vulnificus* (OLIVER *et al.*, 1991), *Campylobacter* (ROLLINS e COLWELL, 1986), *Escherichia coli* O157:H7 (MAKINO *et al.*, 2000) e *Salmonella* (ROSZAK *et al.*, 1983), dentre outras, mas atualmente bactérias Gram positivas entre elas *Enterococcus faecalis* (LLEÒ *et al.*, 1998) e *Listeria monocytogenes* (BESNARD *et al.*, 2000) já foram comprovadamente descritas como capazes de entrar no estado VNC em resposta a diferentes condições adversas.

Condições que induzem à perda da culturabilidade diferem de acordo com o microrganismo e incluem fatores diversos como inanição, temperaturas baixas e elevadas, salinidade, dentre outros (McDOUGALD *et al.*, 1998).

O estado VNC pode ocorrer em várias bactérias expostas à condição de falta de nutrientes, como *Vibrio cholerae* (KONDO *et al.*, 1994), *C. jejuni* (THOLOZAN *et al.*, 1999), *L. monocytogenes* (BESNARD *et al.*, 2000) e *V. parahaemolyticus* (WONG *et al.*, 2004). *Enterococcus faecalis*, apresentou perfil de proteínas de células no estado VNC diferente do perfil de células na fase log ou no estado de inanição, confirmando que são dois estados fisiológicos distintos (HEIM *et al.*, 2002).

A redução de temperatura induz o estado VNC em *Vibrio vulnificus* (WOLF e OLIVER, 1992; OLIVER, 1995), enquanto temperatura de 37 °C causou efeito semelhante em *Pseudomonas fluorescens*, um microrganismo psicotrófico (OLIVER, 2000).

Outros fatores induzem o estado VNC, como exposição a diferentes concentrações de cobre no solo em *E. coli* (GREY e STECK, 2001), *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium leguminosarum* (ALEXANDER *et al.*, 1999), *R. melioli* (MANAHAN *et al.*, 1997) e *Xanthomonas campestris* (GHEZZI e STECK, 1999) e também a exposição a condições ácidas em espécies de *Campylobacter* (CHAVEERACH *et al.*, 2003).

A exposição a estresse osmótico é capaz de induzir o estado VNC em várias bactérias e essa possibilidade é muito preocupante na indústria de alimentos, uma vez que a preservação dos alimentos por adição de cloreto de sódio e desidratação é amplamente utilizada pela sua eficiência na prevenção de crescimento bacteriano (GURAYA *et al.*, 1998; SAITO *et al.*, 2000).

A indução do estado VNC em *Salmonella* Typhimurium pode ser obtida em condições de desidratação e exposição a radiações ultravioleta (BALEUX *et al.*, 1998; LESNE *et al.*, 2000). O decréscimo da atividade de água (a_w) possibilita a entrada no estado VNC da estirpe multirresistente *Salmonella* Typhimurium DT 104 (GUPTE *et al.*, 2003). Em *E. coli*, a exposição a estresse osmótico e oxidativo é capaz de induzir a entrada no estado VNC (BRAUX *et al.*, 1997). Segundo ROTH *et al.* (1988), 90% da população de *E. coli* entraram no estado VNC quando exposta à concentração de 0,8 M de NaCl.

Estirpes de *Vibrio splendidus* apresentaram-se na forma VNC quando cultivadas em microcosmos acrescidos das seguintes concentrações de nutrientes, peptona - 0,8%, extrato de levedura - 0,4% e glicose - 0,4% e 3,3% de salinidade (ARMANDA *et al.*, 2003) e ainda, a estirpe de *Listeria monocytogenes* CNL 895807 encontrava-se no estado VNC após seis semanas de incubação a 20 °C na presença de 7% de NaCl (BESNARD *et al.*, 2000).

A taxa de entrada no estado VNC varia de acordo com a espécie, com as condições de estresse e também depende do estado fisiológico da população. Em algumas

circunstâncias, o microrganismo pode levar dias ou até anos para perder sua culturabilidade, embora sua viabilidade seja mantida (THOLOZAN *et al.*, 1999; OLIVER, 2000).

2.3. Alterações Fenotípicas

Células que entram no estado VNC apresentam inúmeras mudanças no seu metabolismo, incluindo redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2000a; OLIVER, 2000b). Entretanto, durante esse estado fisiológico, novas proteínas são sintetizadas (HEIM *et al.*, 2002) entre elas as proteínas do choque frio e as do estado de inanição (MORTON e OLIVER, 1994). O nível de ATP intracelular permanece alto nesse estado, o que não ocorre em células mortas ou “moribundas” (FEDERIGHI *et al.*, 1998). Constatou-se que a expressão gênica nas células no estado VNC não cessa (LLEO, 2000) podendo expressar, muitas vezes, um fenótipo diferente em células na fase log e ou estacionária de crescimento e por isso, acredita-se que mudanças fenotípicas podem ocorrer (WARNER e OLIVER, 1998).

Alterações morfológicas também ocorrem nas células no estado VNC sendo as mais freqüentes a redução do tamanho (OLIVER, 2000b), a transição para a forma cocóide (GUPTE *et al.*, 2003) e a filamentação (MATTICK *et al.*, 2000). Modificações na composição dos ácidos graxos da membrana citoplasmática têm sido constatadas o que resulta na alteração da estrutura (OLIVER, 2000b; DAY e OLIVER, 2004). Mudanças bioquímicas da parede celular, como alterações no peptidoglicano também têm sido demonstradas (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002). As mudanças morfológicas ocorridas no estado VNC foram constatadas por microscopia eletrônica para *Vibrio cholerae* (KONDO *et al.*, 1994), *Campylobacter jejuni* (FEDERIGHI *et al.* 1998) e *Salmonella Typhimurium* (GUPTE *et al.*, 2003).

2.4. Ressuscitação

Microrganismos no estado VNC podem retomar a culturabilidade sem que seja verificado aumento do número total de células. A este fenômeno dá-se o nome de ressuscitação. A recuperação integral da capacidade de ser cultivado pode levar vários dias.

Em alguns casos, a simples retirada do agente de estresse é capaz de tornar as células novamente cultiváveis, como em *V. vulnificus* (OLIVER, 1995), *V. parahaemolyticus* (WONG *et al.*, 2004), *E. coli* (OHTOMO e SAITO, 2001) e *E. coli* O157:H7 (NAKAGAWA *et al.*, 2000). Em outros casos, este evento parece ser extremamente complexo, por exemplo, *Legionella pneumophila* entra no estado VNC induzido pela deficiência de nutrientes, mas a adição de nutrientes não reverte o estado de dormência (KELL *et al.*, 1998). Algumas bactérias recuperam culturabilidade após passagem *in vivo* como no caso de *Vibrio vulnificus* em ratos (OLIVER e BOCHIAN, 1995), *V. cholerae* em intestino humano (COLWELL *et al.*, 1996), *C. jejuni* e *C. coli* em ovos embrionários (CAPPELIER *et al.*, 1999; CHAVEERACH *et al.*, 2003), *S. enterica* Oranienburg em ratos (ASAKURA *et al.*, 2002) e *Vibrio* spp em camundongos (BAFFONE *et al.*, 2003). Tem se atribuído à expressão do gene *rpf*, que codifica um fator de promoção da ressuscitação, a retomada do crescimento por *Micrococcus luteus* (KAPRELYANTS *et al.*, 1996; MUKAMOLOVA *et al.*, 1998), assim como, mais recentemente, para *Salmonella enterica* Oranienburg (PANUTDAPORN *et al.*, 2006). A ressuscitação está freqüentemente associada à manutenção da virulência por vários patógenos, constituindo-se um risco potencial a ingestão de alimentos aparentemente seguros, mas que apresentam estes patógenos no estado viável não cultivável (BAFFONE *et al.*, 2003).

2.5. Técnicas de detecção do estado VNC

A determinação das células no estado VNC é feita pela diferença entre as células viáveis totais e as células cultiváveis (ROSZAK e COLWELL, 1987b). A detecção das células viáveis totais pode ser realizada por diferentes metodologias.

A contagem direta de viáveis (DVC) descrita por KOGURE *et al.* (1979), se fundamenta na contagem microscópica de células alongadas. O alongamento ocorre somente nas células que mantêm alguma atividade metabólica (células viáveis) após incubação por poucas horas utilizando uma quantidade determinada de uma fonte de nutriente, geralmente extrato de levedura, na presença de ácido nalidíxico, um inibidor de divisão celular. Alguns autores relatam que esta metodologia pode ser utilizada com pequenas modificações, como por exemplo, a mudança do antibiótico, para bactérias que são resistentes ao ácido nalidíxico ou mesmo do nutriente ou concentração do nutriente utilizado. Para auxiliar a visualização das células utiliza-se o corante fluorescente laranja

de acridina, que se liga aos ácidos nucléicos (McDOUGALD *et al.*, 1998). Ao se ligar, como dímero à dupla fita de DNA, o fluorocromo fluoresce na cor verde, quando se liga à fita única de RNA, este fluorocromo fluoresce na cor laranja (COLWELL, 2000). Desta maneira, as células viáveis fluorescem laranja por possuírem um conteúdo maior de RNA do que de DNA, enquanto que as células não viáveis, por possuírem menor quantidade de RNA, fluorescem verde (SANTIWATANAKUL, 2005). Esta metodologia foi utilizada com sucesso por vários autores (OLIVER *et al.*, 1995; FEDERIGHI *et al.*, 1998; HÖLLER e MARTIN, 1998; BESNARD *et al.*, 2000b).

A viabilidade pode ser determinada também pela detecção da atividade respiratória. A metodologia utilizada é a dupla coloração CTC-DAPI descrita por RODRIGUEZ *et al.* (1992), que discrimina simultaneamente células totais e células viáveis. Todas as células são coradas em azul pelo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e somente as células com a cadeia de transporte de elétrons ativa são capazes de reduzir o corante fluorescente CTC (cloreto de 5-ciano-2,3 ditolil tetrazólio) apresentando um precipitado intracelular fluorescente vermelho. Esta técnica tem sido utilizada em vários trabalhos (FEDERIGHI *et al.*, 1998, BESNARD *et al.*, 2000b, LESNE *et al.*, 2000, GUPTE *et al.*, 2003).

Outra maneira de se verificar a viabilidade das células é por meio da avaliação da integridade da membrana celular. Na maioria das vezes é utilizado o Kit LIVE/DEAD BacLight®. A técnica se baseia no uso combinado de dois corantes fluorescentes de ácidos nucléicos, SYTO 9 e iodeto de propídio, que têm diferente capacidade de penetrar na membrana celular. O corante SYTO 9 cora todas as células de verde, entretanto, aquelas que apresentam danos na membrana celular permitem a entrada do iodeto de propídio e então se coram de vermelho, podendo assim diferenciar células viáveis de células mortas (VILLARINO, *et al.*, 2000). Esta técnica tem sido utilizada em trabalhos mais recentes (ASAKURA *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; ASAKURA *et al.*, 2005).

Outros métodos têm sido também descritos para verificar a viabilidade das células, como por exemplo, a detecção da atividade de esterase pelo uso de substrato fluorogênico (LUNDGREN, 1981; REYNOLDS e FRICKER, 1999), da capacidade de transporte de substratos marcados (SHAHAMAT *et al.*, 1993; RAHMAN, *et al.*, 1994 e YOSHIOKA *et al.*, 1996), da presença de ácidos nucléicos (RNA ou DNA) por técnicas moleculares de PCR e RT-PCR (ISLAM *et al.*, 1993; SHERIDAN, *et al.*, 1998; YARON e MATTHEWS, 2002; RIJPENS *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005) e também por meio de hibridização fluorescente *in situ* com sondas de oligonucleotídeos (método de FISH) (BAUDART *et al.*, 2002).

As técnicas moleculares para células viáveis, especialmente RT-PCR têm sido desenvolvidas mais recentemente e ainda não estão consolidadas, mesmo porque tem sido difícil a escolha de genes candidatos específicos para os patógenos e do tipo “housekeeping gene”, cuja expressão é independente do estado fisiológico e condições de crescimento que possam ser utilizados em diferentes matrizes.

2.6. Importância do estado VNC em alimentos

Patógenos no estado viável não cultivável podem ser responsáveis por surtos de toxinfecções alimentares. No Japão, um alimento tradicional a base de salmão preparado em uma mistura que contém 79% de molho de soja, 14% de água, 6,5% de tempero químico e 0,3% de sake sintético, cujo conteúdo de sal corresponde a 13% de NaCl, foi implicado como possível responsável por mais de sessenta casos de infecção alimentar causada por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157 só no ano de 1998, envolvendo salmão processado por uma mesma empresa. Os níveis de contaminação do alimento com EHEC O157 apresentavam-se menores que a dose infecciosa, mas a infecção se estabelecia. Por meio de seus estudos, MAKINO *et al.* (2000) comprovaram que EHEC O157 exposta a altos níveis de NaCl entravam no estado VNC. A capacidade de *Salmonella* Oranienburg sobreviver a condições de estresse osmótico por NaCl também foi demonstrada por esses autores, mesmo não sendo cultivável em meios tradicionais (ASAKURA *et al.*, 2002).

A indução do estado VNC em patógenos como *Salmonella*, estirpes patogênicas de *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* expostos a condições de estresse, incluindo o processamento e os vários tipos de embalagens dos alimentos modernos, tem causado grande preocupação aos órgãos de saúde pública (ROWAN, 2004). Esses patógenos no estado VNC por serem capazes de se manter viáveis, mas não cultiváveis por um longo período de tempo, não serem detectados pelos métodos tradicionais de análises de alimentos, apresentarem o fenômeno de ressuscitação e manterem a virulência, aumentam o risco potencial de toxinfecções causadas por alimentos tidos como adequados para o consumo (OLIVER e BOCKIAN, 1995; HUQ e COLWELL, 1995; MURPHY *et al.*, 2003; BAFFONE *et al.*, 2003).

Neste trabalho foram estudadas condições de estresse que podem induzir o estado VNC em *Salmonella* e *E. coli* e as mudanças morfológicas causadas por essas condições.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patógenos Alimentares e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram as culturas de referência *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 1175 e os isolados de *Salmonella* CCS3 e *E. coli* CCS4 obtidos de carcaças suínas. As estirpes de referência foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, enquanto as estirpes de carcaças suínas foram isoladas por Lima (2002). As bactérias foram cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração – BHI (Merck) por 18 horas e conservadas em caldo BHI com 20% de glicerol a -18°C .

3.2. Efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de *Salmonella* e *E. coli*

O crescimento na presença de diferentes concentrações de cloreto de sódio (Merck) das estirpes de *E. coli* e *Salmonella* foi avaliado em caldo BHI. As culturas foram cultivadas neste caldo por 16 horas e transferidas para tubos contendo meio BHI com as

diferentes concentrações de sal até atingir uma densidade óptica (D.O.) a 630 nm, de aproximadamente 0,07. Como controle foram utilizados meio BHI sem adição de NaCl com ou sem inóculo. As concentrações de NaCl testadas foram 0,17; 0,34; 0,50; 0,68; 0,85; 0,94; 1,02; 1,11; 1,19; 1,28; 1,36; 1,45; 1,54; 1,62; 1,71 e 1,79 M.

Em seguida, um volume de 180 µL desta suspensão foi transferido, em triplicata, para microplacas (Nunc-ImmunoTM plates), previamente esterilizadas por exposição à radiação ultravioleta ($\lambda = 270$ nm) por 30 minutos e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ em estufa (B.O.D.Nova Ética 411D).

O crescimento foi monitorado pela leitura da D.O., em comprimento de onda, λ , de 630 nm, em aparelho leitor de placas de ELISA (Versa Max[®] Molecular Devices). As leituras foram feitas em intervalos de 30 minutos até completar 24 horas e após 48 horas foi feita uma leitura para se confirmar a fase estacionária.

A partir das curvas de crescimento construídas, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) das estirpes em cada condição testada foi determinada pelo cálculo de regressão linear dos valores obtidos pelo $\ln$ da D.O._{630nm} na fase exponencial de crescimento em função do tempo. Utilizando esse parâmetro cinético ($\mu_{\text{máx}}$) versus o tempo em horas, a curva do efeito da concentração de NaCl sobre a velocidade máxima de crescimento foi construída para verificar a faixa de concentração correspondente a estresse osmótico, para cada estirpe.

3.3. Efeito do cloreto de sódio sobre células de *Salmonella* e *E. coli* em diferentes fases de crescimento, em temperatura de refrigeração.

Foi avaliada a sobrevivência de *Salmonella* e *E. coli* em meio BHI e solução fosfato de Butterfield (BPS) - Solução de KH_2PO_4 (Vetec) 7,35 mM - preparada de acordo com GUPTE *et al.* (2003) acrescidos de NaCl nas concentrações 0; 0,17; 0,68 e 1,02 M para *Salmonella* e 0; 0,17; 1,02 e 1,28 M para *E. coli* sob temperatura de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$). As duas maiores concentrações foram consideradas condições de estresse osmótico para as bactérias de acordo com a curva do efeito da concentração de NaCl sobre a velocidade específica máxima de crescimento. Para este estudo foi definido como estresse a diminuição de pelo menos 33% da velocidade específica de crescimento quando comparada com o controle (BHI sem adição de sal).

Para avaliar o efeito da fase de crescimento na sobrevivência das células a condições de estresse, células das bactérias em fase logarítmica de crescimento foram obtidas após a seguinte sequência de eventos: 1) ativação por 18 horas em meio BHI; 2) centrifugação a 1955 *g* por 10 minutos em centrífuga Sorvall RT 6000D (Du Pont Company, USA) e lavagem do sedimento de células por duas vezes com 5 mL de solução salina 0,85%; 3) transferência de 300 μ L para meio BHI e incubação em estufa a 35 °C; e 4) determinação da D.O. (630 nm) em intervalos de 30 minutos até que seu valor duplicasse duas vezes consecutivas, garantindo que a cultura estivesse em fase log de crescimento. Para obtenção de células na fase estacionária de crescimento, a cultura foi ativada por 12 horas, centrifugadas a 1955 *g* por dez minutos e lavadas duas vezes com cinco mililitros de solução salina 0,85%. Este procedimento foi adotado uma vez que experimentos prévios foram realizados e constatou-se que nestas condições as células estariam nas fases de crescimento desejadas.

A densidade populacional das suspensões de células em fase logarítmica e em fase estacionária foi padronizada em, aproximadamente, 10^6 UFC/mL e inoculadas nos frascos contendo 100 mL de meio BHI ou BPS sem ou com NaCl nas diferentes concentrações. Os frascos foram agitados vigorosamente e estocados em geladeira à temperatura de aproximadamente 5 °C $\pm$ 1, por dez dias.

Periodicamente, alíquotas de cada cultura e condição testada foram retiradas dos frascos e analisadas quanto à sobrevivência das estirpes por plaqueamento em TSA – Agar Tripticaseína e Soja - (Merck), em triplicata, pela técnica de microgotas (MORTON, 2001). Esse experimento foi realizado em duas repetições.

3.4. Detecção de células no estado VNC

Após dez dias de incubação sob refrigeração, alíquotas de cada cultura e condição testada foram retiradas dos frascos e analisadas quanto à culturabilidade, conforme já descrito no item 3.3. e quanto à viabilidade conforme metodologia de Kogure *et al.* (1979). Para análise da viabilidade, alíquotas de 0,25; 0,50 e 1,00 mL foram retiradas dos frascos cujas condições resultaram na perda da culturabilidade e incubadas na presença de extrato de levedura (Merck) a 0,025% (p/v) e de ácido nalidíxico (Merck) a 0,002% (p/v) por sete horas, a 35 °C $\pm$ 1. Após esse período de incubação, as amostras foram filtradas em membranas de polycarbonato pretas com poro de 0,22 μ m de diâmetro (Osmonics inc.). As

membranas foram fixadas com solução de formalina 2% (Sigma) durante três minutos e em seguida coradas com uma solução do corante laranja de acridina 0,01% (Merck) por cinco minutos no escuro. O excesso do corante foi lavado com água destilada estéril e as lâminas foram montadas e observadas em microscópio de epifluorescência (Nikon E600 com acessórios para epifluorescência Y-FL). Para cada amostra, 15 campos de duas membranas foram contados.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos de sobrevivência e viabilidade, foi conduzido um ensaio experimental para confirmar a possível entrada no estado viável não cultivável das quatro estirpes utilizadas neste trabalho.

Para esta análise foram utilizadas as condições de estresse para cada microrganismo: 0,68 e 1,02 M para *Salmonella* e 1,02 e 1,28 M para *E. coli* ambos sob temperatura de refrigeração. A culturabilidade foi determinada no tempo zero, que corresponde ao momento de inoculação e no tempo dez dias de incubação conforme procedimento descrito no item 3.3. Juntamente com a avaliação da culturabilidade, foi conduzida a análise da viabilidade por duas metodologias, DVC-Kogure (KOGURE *et al.*, 1979) e utilizando o Kit LIVE/DEAD® conforme instruções fornecidas pelo fabricante, 300 µL da amostra lavada, centrifugada e ressuspensa em solução salina 0,85% foram corados utilizando-se 1 µL da mistura de igual volume dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio. As amostras foram incubadas, no escuro, em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 µL da amostra já corada foi transferida para uma lâmina e coberta com lamínula de espessura de 0,17 mm e observada em microscópio de epifluorescência. Para cada amostra, 15 campos de duas lâminas foram contados.

3.5. Avaliação da morfologia celular

A morfologia celular da cultura de *E. coli* CCS4 isolada de carcaças de suínos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura no tempo zero e após dez dias de incubação sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) nas oito condições testadas. Uma alíquota de 5 mL foi filtrada em membrana de policarbonato branca Millipore® 0,22 µm.

As membranas contendo os espécimes foram fixadas com solução de glutaraldeído (Merck) a 3% por uma hora à temperatura ambiente e lavados seis vezes em

tampão fosfato 0,05 M pH 7,2, por dez minutos em cada etapa de lavagem. A seguir, os espécimes sofreram desidratação efetuada com álcool etílico (Merck) com as seguintes concentrações e tempos de exposição: 30%/10 min; 50%/10 min; 70%/10 min; 80%/10 min; 95%/10 min; 100%/15 min, por duas vezes (TEIXEIRA, 2004). Logo após a desidratação, as membranas foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Critical Point Dryer – CPD), onde foram mantidos em CO₂ líquido por um período de tempo pré-determinado, para a retirada de qualquer vestígio de umidade remanescente. Posteriormente à etapa do ponto crítico, as membranas foram montadas nos suportes apropriados e devidamente identificadas para a observação. Nesses suportes, os espécimes foram cobertos com ouro (metalizados) e as preparações foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430 VP) e fotografadas com aumentos de até 8550 vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de *Salmonella* e *E. coli*

O efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de *Salmonella* CCS3, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* CCS4 e *E. coli* ATCC 1175 em meio BHI a 35 °C $\pm$ 1 está apresentado nas figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

As estirpes de *Salmonella* apresentaram perfil de crescimento semelhante. O crescimento foi evidente até a concentração de 1,28 M de NaCl para *Salmonella* CCS3 (Figura 1) e até 1,19 M para *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. A concentração de 1,36 M inibiu o crescimento das duas estirpes (Figuras 1 e 2).

As estirpes de *E. coli* apresentaram maior tolerância à presença de NaCl. Observou-se o crescimento de *E. coli* ATCC 1175 até a concentração de 1,45 M (Figura 4), enquanto *E. coli* CCS4 apresentou crescimento até a concentração de 1,36 M de NaCl (Figura 3). *E. coli* ATCC 1175 mostrou-se mais resistente ao NaCl do que o isolado CCS4 apresentando um crescimento discreto nas concentrações de 1,54 e 1,63 M.

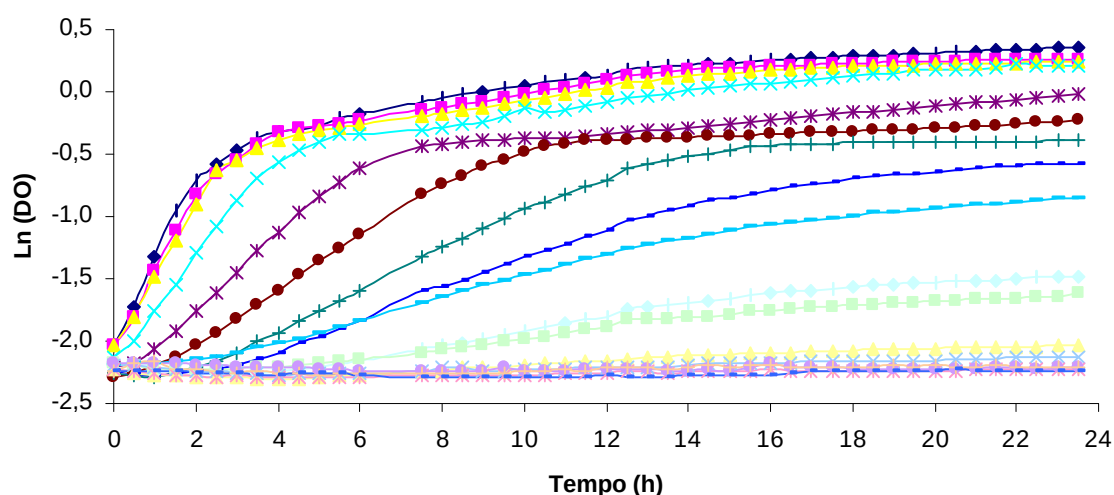


Figura 1. Crescimento de *Salmonella* CCS3 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a 35 °C $\pm$ 1.

0 M ($\blacklozenge$); 0,17 M ($\color{violet}\times$); 0,34 M ($\color{teal}-$); 0,51 M ($\color{cyan}\times$); 0,68 M ($\color{brown}\ast$); 0,85 M ($\bullet$);
 0,94 M ($\color{olive}+$); 1,02 M ($\color{blue}-$); 1,11 M ($\color{blue}-$); 1,19 M ($\color{lightblue}\diamond$); 1,28 M ($\color{lightblue}$); 1,36 M ($\color{lightblue}$);
 1,45 M ($\color{lightblue}\times$); 1,54 M ($\color{lightblue}\ast$); 1,62 M ($\color{lightblue}\diamond$); 1,71 M ($\color{lightblue}+$); 1,79 M ($\color{lightblue}-$).

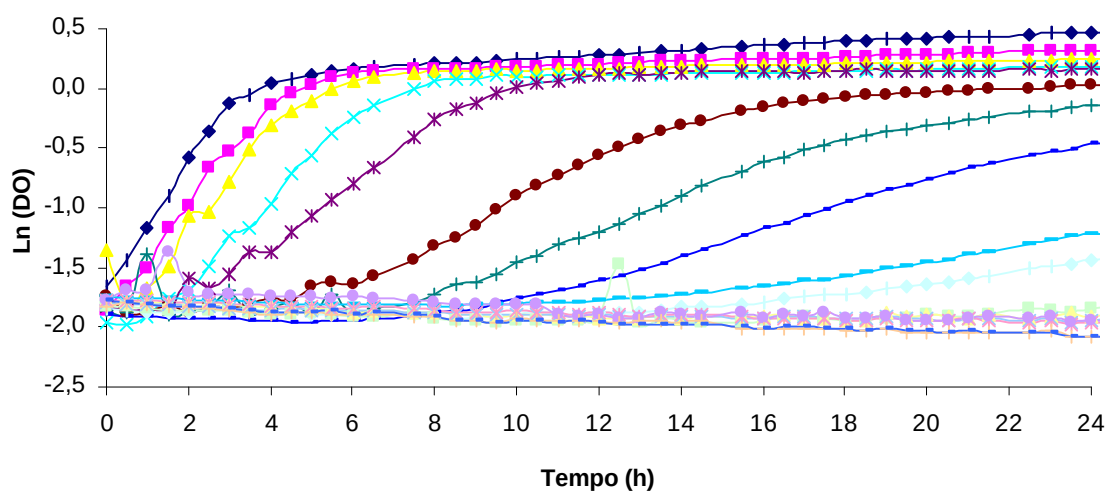


Figura 2. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a 35 °C $\pm$ 1.

0 M ($\blacklozenge$); 0,17 M ($\color{violet}\times$); 0,34 M ($\color{teal}-$); 0,51 M ($\color{cyan}\times$); 0,68 M ($\color{brown}\ast$); 0,85 M ($\bullet$);
 0,94 M ($\color{olive}+$); 1,02 M ($\color{blue}-$); 1,11 M ($\color{blue}-$); 1,19 M ($\color{lightblue}\diamond$); 1,28 M ($\color{lightblue}$); 1,36 M ($\color{lightblue}$);
 1,45 M ($\color{lightblue}\times$); 1,54 M ($\color{lightblue}\ast$); 1,62 M ($\color{lightblue}\diamond$); 1,71 M ($\color{lightblue}+$); 1,79 M ($\color{lightblue}-$).

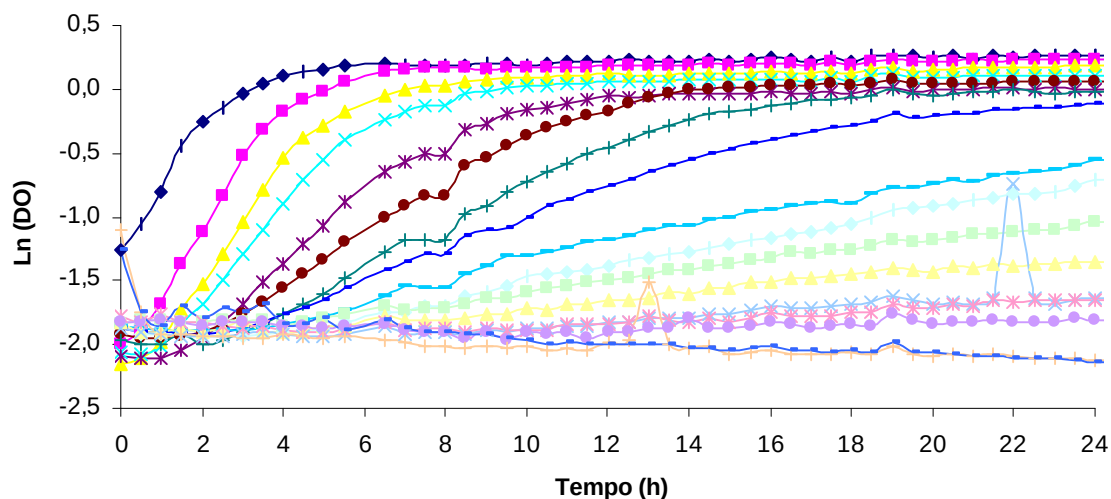


Figura 3. Crescimento de *Escherichia coli* CCS4 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$.

0 M (◆); 0,17 M (✧); 0,34 M (-); 0,51 M (x); 0,68 M (*); 0,85 M (•);
 0,94 M (+); 1,02 M (-); 1,11 M (-); 1,19 M (◊); 1,28 M (◊); 1,36 M (◊);
 1,45 M (x); 1,54 M (-); 1,62 M (◊); 1,71 M (+); 1,79 M (-).

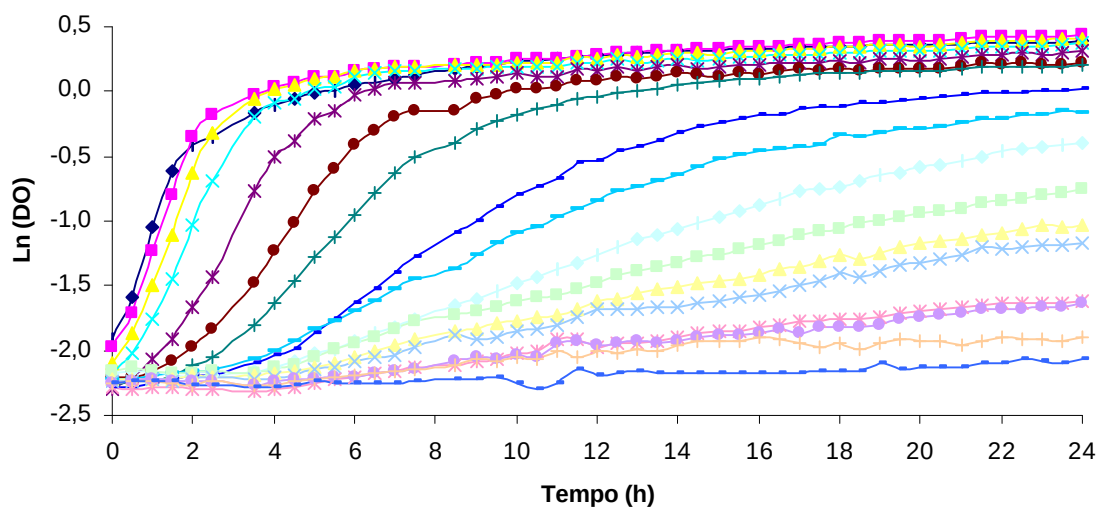


Figura 4. Crescimento de *Escherichia coli* ATCC 1175 em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) com diferentes concentrações de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$.

0 M (◆); 0,17 M (✧); 0,34 M (-); 0,51 M (x); 0,68 M (*); 0,85 M (•);
 0,94 M (+); 1,02 M (-); 1,11 M (-); 1,19 M (◊); 1,28 M (◊); 1,36 M (-);
 1,45 M (x); 1,54 M (-); 1,62 M (◊); 1,71 M (+); 1,79 M (-).

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\max}$) foram menores nas concentrações de NaCl para todas as estirpes (Tabela 1). A redução da $\mu_{\max}$ na concentração de 0,68 M de NaCl foi de 53,7% para *Salmonella* ATCC 14028 e 57,1% para *Salmonella* CCS3, e de 41,8% e 39,1% para *E. coli* ATCC 1175 e *E. coli* CCS4, respectivamente, mostrando que as estirpes de *E. coli* apresentaram-se mais resistentes ao efeito do NaCl que as de *Salmonella*.

A diferença entre as densidades ópticas final e inicial (Δ D.O.) foi semelhante nas concentrações de 0 e 0,17 M de NaCl para *Salmonella* ATCC 14028 e no intervalo de 0 a 0,51 M para *Salmonella* CCS3. Os resultados na variação de D.O. foram similares entre 0 e 0,68 M para *E. coli* ATCC 1175, e entre 0,17 e 0,68 M para *E. coli* CCS4. A partir dessas concentrações, houve um decréscimo no valor de Δ D.O., indicando um menor crescimento celular nestas concentrações de NaCl (Tabela 2)

Tabela 1 - Velocidade específica máxima de crescimento de *Salmonella* e *E. coli* cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) na presença de cloreto de sódio, a 35 °C $\pm$ 1.

Concentração de NaCl (Molar)	Velocidade específica máxima ($\mu_{\max}$ h ⁻¹)			
	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>	
	ATCC14028	CCS3	ATCC 1175	CCS4
0	0,54	0,70	0,98	0,69
0,17	0,45	0,66	0,91	0,59
0,34	0,48	0,59	0,80	0,56
0,51	0,40	0,44	0,68	0,49
0,68	0,25	0,30	0,57	0,42
0,85	0,20	0,22	0,42	0,27
0,94	0,14	0,16	0,32	0,23
1,02	0,11	0,12	0,21	0,16
1,11	0,04	0,09	0,14	0,15
1,19	0,04	0,06	0,10	0,11
1,28	0,04	0,04	0,07	0,09
1,36	0,02	-	0,06	0,05
1,45	0,03	-	0,05	-
1,54	-	-	-	-
1,62	-	-	-	-
1,71	-	-	-	-
1,79	-	-	-	-

Para *E. coli* CCS4, Δ D.O. foi 24,6% maior na concentração de 0,17 M de NaCl do que no controle. Isso pode ser explicado por um possível efeito protetor do NaCl sobre as células de *E. coli*. Esse efeito protetor de NaCl foi observado em *E. coli* O157:H7 que tem seu crescimento aumentado na presença de 4% (0,68 M) desse sal, especialmente sob condições de baixo pH (JORDAN e DAVIS, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por KRIST *et al.* (1998) que observaram uma menor variação da densidade óptica quando *E. coli* crescia em meio com valores baixos de atividade de água. A redução da Δ D.O pode ser devido ao fato da resposta osmorreguladora exigir um grande gasto de energia (CSONKA, 1989; GOULD, 1989 e KNOCHEL & GOULD, 1995). BUCHANAN & KLAWITTER (1992) também observaram redução na taxa de crescimento de *E. coli* O157:H7 em meio BHI adicionado de cloreto de sódio.

Tabela 2 - Variação da densidade óptica (Δ D.O.) de *Salmonella* e *E. coli* cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) na presença de cloreto de sódio, a 35 °C $\pm$ 1.

Concentração de NaCl (Molar)	Variação da Densidade Óptica (DD.O.)			
	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>	
	ATCC14028	CCS3	ATCC 1175	CCS4
0	1,44	1,29	1,34	1,01
0,17	1,48	1,17	1,41	1,34
0,34	1,19	1,14	1,39	1,35
0,51	1,31	1,12	1,34	1,32
0,68	1,08	0,87	1,27	1,17
0,85	0,86	0,69	1,15	1,04
0,94	0,77	0,57	0,93	0,93
1,02	0,81	0,46	0,91	0,85
1,11	0,24	0,31	0,75	0,53
1,19	0,42	0,12	0,56	0,47
1,28	0,29	0,08	0,35	0,47
1,36	0,09	0,03	0,25	0,24
1,45	0,03	0	0,21	0,05
1,54	0	0	0,09	0
1,62	0	0	0,09	0
1,71	0	0	0,04	0
1,79	0	0	0,02	0

O efeito do cloreto de sódio sobre o crescimento de *Salmonella*, neste trabalho, é semelhante aos resultados encontrados por MATTICK *et al.* (2000) que constatarem o efeito bactericida de 8% (1,36 M) de NaCl em caldo nutriente para *Salmonella enterica* Typhimurium DT104.

Entendendo que estresse é o desvio das condições ótimas de crescimento o qual resulta na diminuição da taxa de crescimento e da população máxima (YOUSEF e COURTNEY, 2003) e analisando os valores de $\mu_{\max}$ e a variação de D.O. das quatro estirpes utilizadas nesse trabalho, pode-se considerar que a partir das concentrações de 0,94 M de NaCl, as estirpes de *E. coli* estão sob condição de estresse, apresentando redução da $\mu_{\max}$ em aproximadamente 67%, enquanto *Salmonella* CCS3 e *Salmonella* ATCC 14028 estão sob estresse a partir de 0,85 M, apresentando redução da $\mu_{\max}$ em 63e 69%, respectivamente.

4.2. Efeito do cloreto de sódio sobre células de *Salmonella* e *E. coli* em diferentes fases de crescimento, em temperatura de refrigeração

A partir do estudo do efeito do NaCl sobre o crescimento, as concentrações de 0,68 M e 1,02 M foram selecionadas para as estirpes de *Salmonella* e 1,02 M e 1,28 M para as estirpes de *E. coli* para avaliação da sobrevivência quando estocados à temperatura de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) a partir de células em duas fases distintas de crescimento, logarítmica e estacionária. As concentrações de 0 e 0,17 M foram também utilizadas. As maiores concentrações de NaCl selecionadas são utilizadas em carnes salgadas, temperadas e resfriadas.

A sobrevivência das estirpes submetidas a estresse osmótico e de temperatura foi avaliada em duas condições, meio BHI, que consiste em meio complexo que contém nutrientes suficientes para o crescimento das estirpes utilizadas neste estudo, e em BPS, que é uma solução oligotrófica.

As figuras de 5 a 8 mostram o efeito do NaCl sobre as quatro estirpes estudadas, utilizando células coletadas em fase log de crescimento. As Figuras 5 e 6 mostram o comportamento de *Salmonella* ATCC 14028 e CCS3, respectivamente. As figuras 7 e 8 demonstram o comportamento de *E. coli* ATCC 1175 e CCS4.

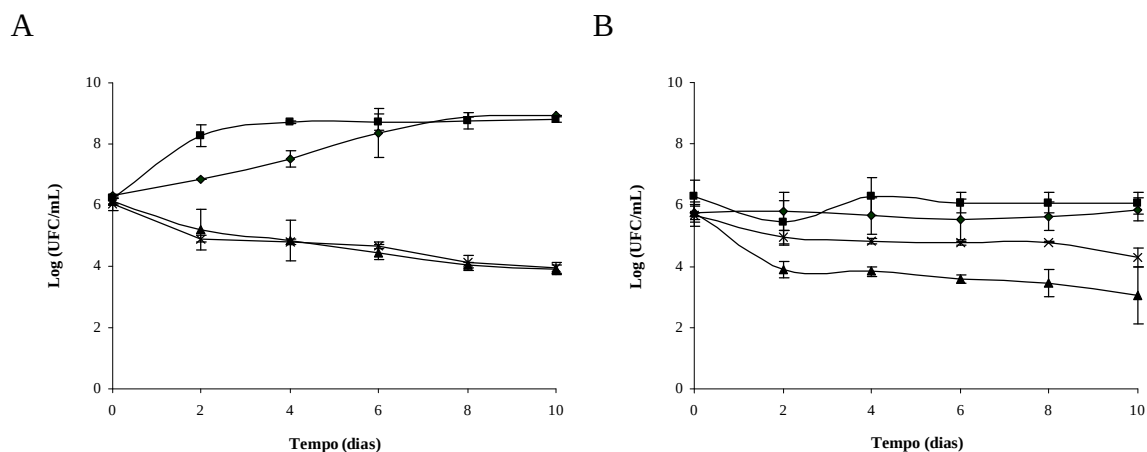


Figura 5. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ■ 0,17 M de NaCl; ● 0,68 M de NaCl; x 1,02 M de NaCl.

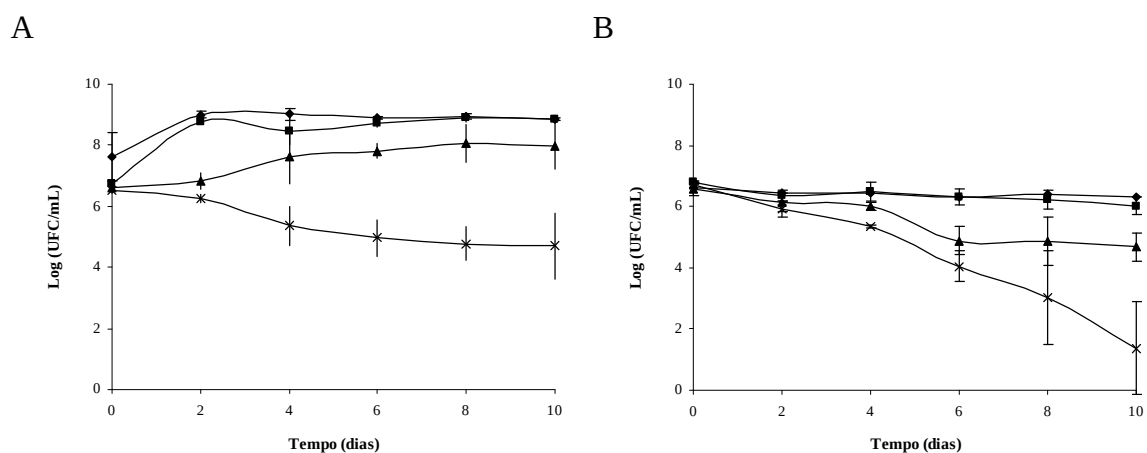


Figura 6. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *Salmonella CCS3* provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ■ 0,17 M de NaCl; ● 0,68 M de NaCl; x 1,02 M de NaCl.

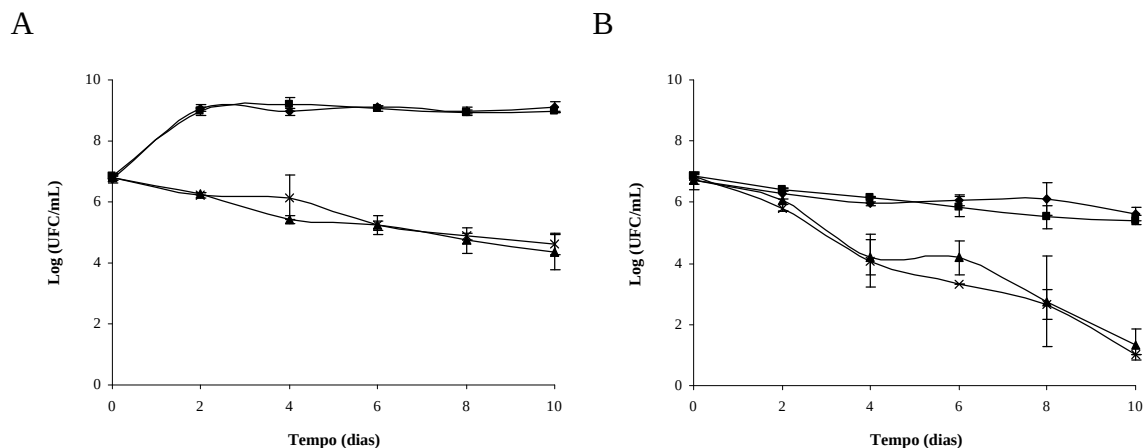


Figura 7. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *E. coli* ATCC 1175 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). $\blacklozenge$ 0 M de NaCl; $\blacktriangle$ 0,17 M de NaCl; $\blacksquare$ 1,02 M de NaCl; $\times$ 1,28 M de NaCl.

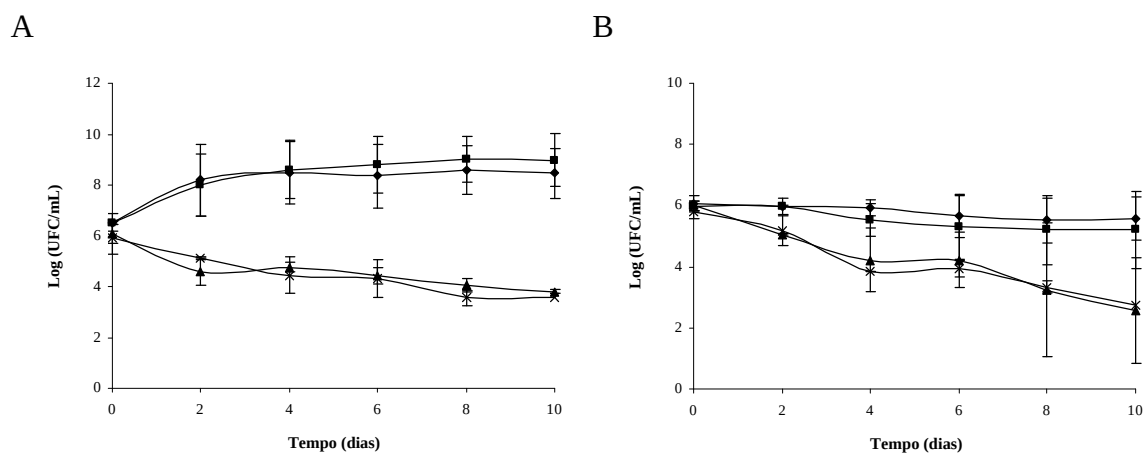


Figura 8. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *E. coli* CCS4 provenientes de cultura na fase log de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). $\blacklozenge$ 0 M de NaCl; $\blacktriangle$ 0,17 M de NaCl; $\blacksquare$ 1,02 M de NaCl; $\times$ 1,28 M de NaCl.

Quando comparamos as duas estirpes de *Salmonella*, observamos que em meio BHI, o isolado CCS3 mostra-se mais tolerante à presença de NaCl do que a linhagem ATCC 14028, pois na concentração 0,68 M de NaCl apresentou crescimento de 1,39 ciclos log após dez dias de estocagem, enquanto o isolado ATCC 14028 apresentou redução de 2,2 ciclos log nesse mesmo período de estocagem. O contrário acontece quando observamos os resultados em BPS, o isolado CCS3 apresentou redução de 5,36 ciclos log em 1,02 M de NaCl, enquanto para a linhagem ATCC 14028 foi evidenciada uma diminuição de apenas 1,37 ciclos log na mesma concentração após dez dias de estocagem.

O crescimento de *Salmonella* em alimentos refrigerados, como carnes frescas, e também em meios complexos estocados a 4 °C, tem sido mostrado (D'AOUST, 1991).

Redução do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de um isolado clínico de *Salmonella* com o aumento da concentração de NaCl e a não formação de colônias depois de 24 horas de exposição a 7% (1,19 M) de NaCl foram demonstradas (ASAKURA *et al.*, 2002).

Para *Listeria monocytogenes*, temperatura e concentração de NaCl são fatores importantes na perda da capacidade de formar colônias (BESNARD *et al.*, 2002). Organismos que estão sob condição de hiperosmolaridade têm a a_w de seu citoplasma diminuída e, portanto há um decréscimo de proteínas e outras macromoléculas que estão envolvidas em funções essenciais da célula, como transporte de nutrientes, replicação de DNA, entre outras. Interessantemente, microrganismos sob estresse osmótico apresentam níveis de ATP elevado, isto devido à inibição da síntese de macromoléculas (CONSKA, 1989).

E. coli ATCC 1175 e CCS4 apresentaram resultados semelhantes em meio BHI em fase log de crescimento (figuras 7A e 8A). Nas concentrações de 0 e 0,17 M de NaCl, essas bactérias apresentaram um crescimento médio de 2,0 ciclos log, o que já era esperado, uma vez que nestas concentrações de NaCl os microrganismos não estavam sob estresse osmótico. Já em meio BHI acrescido de 1,02 M e 1,28 M de NaCl as contagens tiveram uma redução média de 2,0 ciclos log para ambas as estirpes. Esse resultado está de acordo com o experimento anterior que mostrou o efeito inibitório do NaCl sobre o crescimento de *E. coli* (Figuras 3 e 4).

Em BPS, observaram-se diferenças na sobrevivência entre as estirpes de *E. coli*. A linhagem ATCC 1175 mostrou-se mais sensível tanto à ação do sal, quanto a falta de nutriente quando comparada com *E. coli* CCS4 (Figuras 7B e 8B). Isso pode ser notado pela diferença de 0,6 ciclo log na sobrevivência entre as duas estirpes em BPS sem adição

de sal e de 0,79, 1,95 e 2,8 ciclos log para BPS adicionado de 0,17 M, 1,02 M e 1,28 M de NaCl, respectivamente.

Os resultados estão de acordo com os encontrados na literatura. ASAKURA *et al.* (2005) verificaram uma perda acentuada de culturabilidade de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 a partir de 24 horas de incubação a 37 °C, sob estresse osmótico (solução salina contendo 13% NaCl), ocorrendo perda total após 72 horas. A perda da capacidade de formar colônias de *E. coli* O157:H7, não produtora de toxina foi mostrada em solução salina com teor final de 5% de NaCl (OTHOMO e SAITO, 2001) A redução do número de células viáveis em água de mar artificial (*artificial sea-waters* - AWS) devido à hiperosmolaridade também foi demonstrada (BRAUX *et al.*, 1997).

As Figuras 9A e 9B ilustram o comportamento de células de *Salmonella* ATCC 14028 coletadas da fase estacionária de crescimento nos meio BHI e tampão BPS, respectivamente. Da mesma maneira, podemos observar o comportamento do isolado CCS3 (Figuras 10A e 10B) e das estirpes de *E. coli* ATCC 1175 (Figuras 11A e 11B) e CCS4 (Figuras 12A e 12B).

Para *Salmonella*, em tampão BPS 0,17 M, 0,68 M e controle, a sobrevivência apresentou-se quase inalterada, entretanto, em 1,02 M de NaCl, o decréscimo da culturabilidade foi mais evidente, cerca de 1 ciclo log para ATCC 14028 e 2,0 ciclos log para CCS3 (Figuras 9A e 10A).

Os resultados encontrados mostram que para o isolado de *Salmonella* CCS3, em meio BHI e BHI acrescido de diferentes concentrações de sal, a fase de crescimento das células não interferiu na sobrevivência durante dez dias de incubação sob refrigeração. Entretanto, no tampão BPS, as células provenientes de fase estacionária das estirpes estudadas apresentaram menor perda da culturabilidade do que as células provenientes de fase log.

A sobrevivência também se manteve quase inalterada no período de dez dias para o isolado *E. coli* CCS4 nas três concentrações de NaCl e no controle de solução tampão BPS (Figura 12A). Já para a linhagem *E. coli* ATCC 1175 isto aconteceu somente para o controle e a concentração de 0,17 M de NaCl (Figura 11A). Em meio BHI, a estirpe de *E. coli* ATCC 1175 apresentou crescimento nas concentrações de 0,17 M e no controle e decréscimo de no máximo 1,9 ciclos log nas concentrações de 1,02 M e 1,28 M. O isolado CCS4 mostrou pequeno decréscimo nas maiores concentrações de NaCl e expressivo crescimento na ausência e na presença de 0,17 M de NaCl (> 2,0 ciclos log).

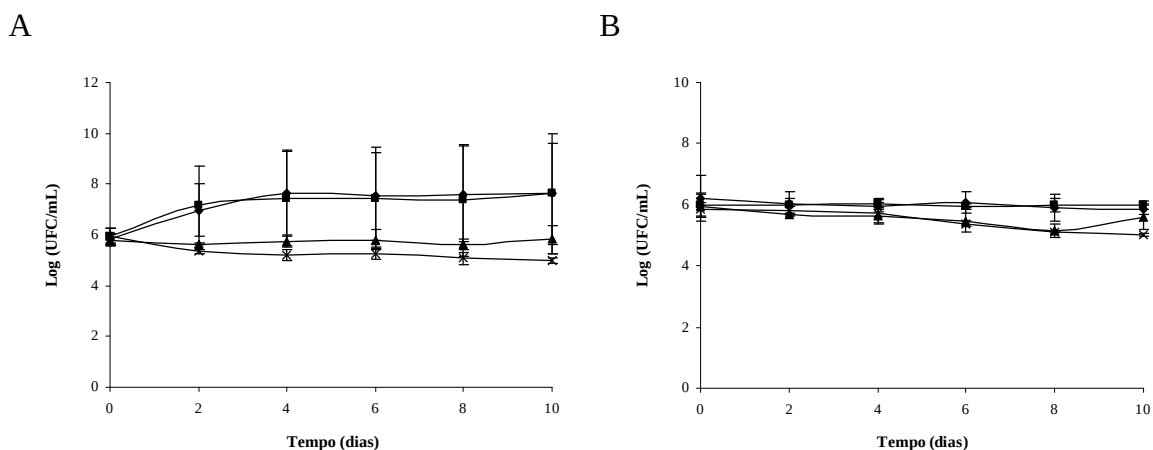


Figura 9. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ■ 0,17 M de NaCl; ● 0,68 M de NaCl; x 1,02 M de NaCl.

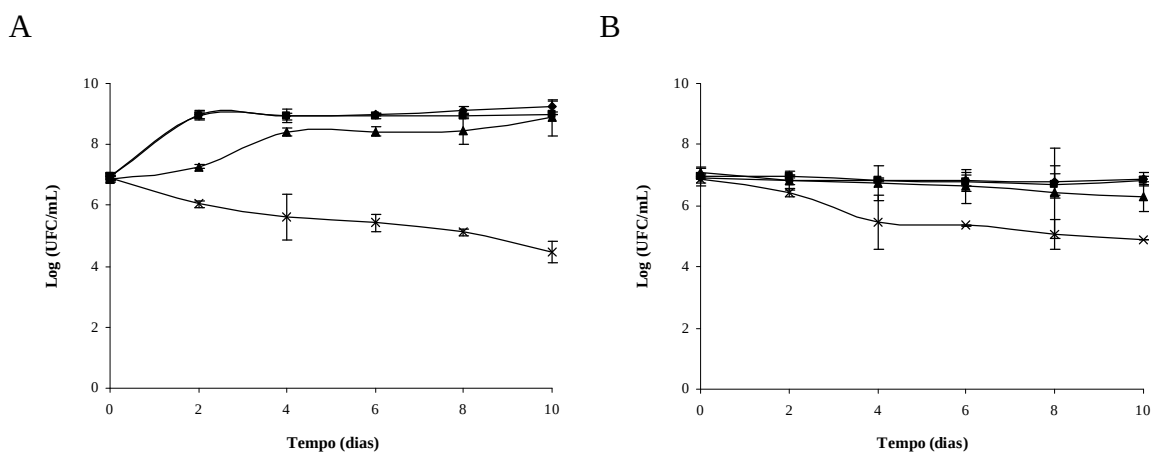


Figura 10. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *Salmonella* CCS3 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ■ 0,17 M de NaCl; ● 0,68 M de NaCl; x 1,02 M de NaCl.

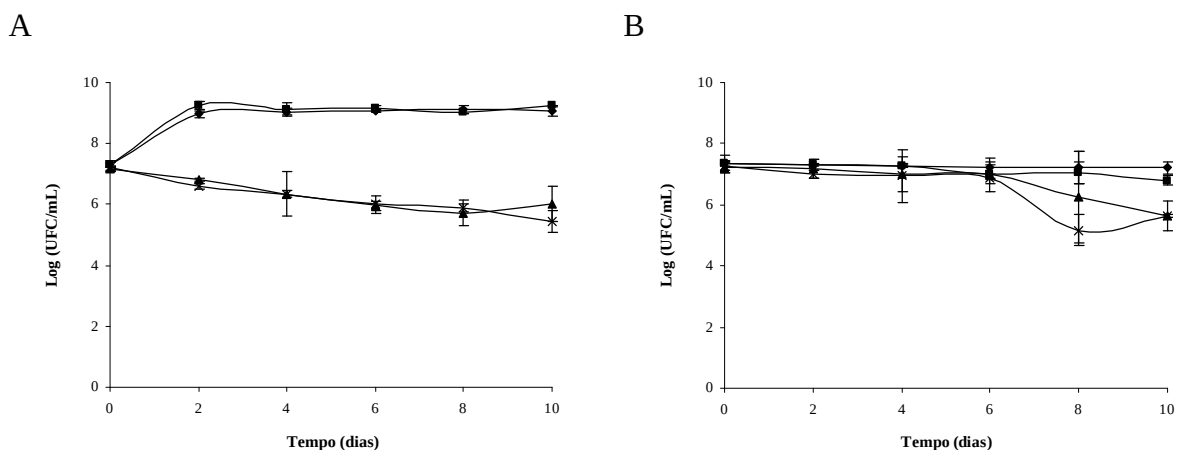


Figura 11. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *E. coli* ATCC 1175 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ◐ 0,17 M de NaCl; ◑ 1,02 M de NaCl; x 1,28 M de NaCl.

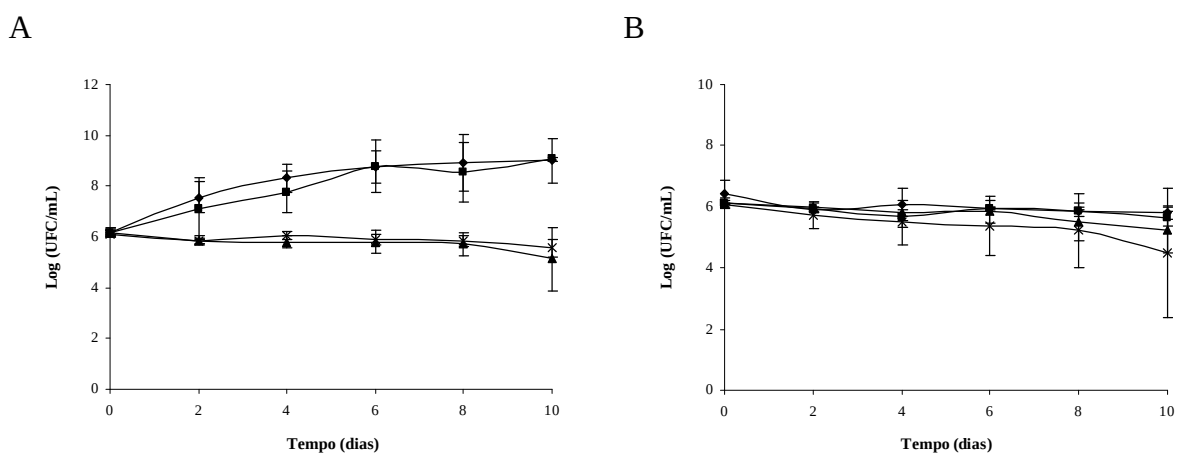


Figura 12. Efeito da adição de NaCl a caldo BHI e a BPS sobre células de *E. coli* CCS4 provenientes de cultura na fase estacionária de crescimento incubadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. (A) caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI); (B) solução fosfato de Butterfield (BPS). ♦ 0 M de NaCl; ◐ 0,17 M de NaCl; ◑ 1,02 M de NaCl; x 1,28 M de NaCl.

Vários trabalhos mostram que a perda da culturabilidade de alguns microrganismos é dependente da concentração de NaCl (CHEVILLE *et al.*, 1996; MATTICK *et al.*, 2000; ASAKURA *et al.*, 2002; BESNARD *et al.*, 2002; ARMANDA *et al.*, 2003; WONG e WANG, 2004; ASAKURA *et al.*, 2005).

Alguns autores ressaltam a influência da fase de crescimento do microrganismo na evolução da perda de capacidade de formar colônias. Células na fase log de crescimento foram mais sensíveis ao efeito de NaCl que as células na fase estacionária e ainda, comprovou-se que as células na fase estacionária são mais resistentes devido a presença de proteínas sintetizadas a partir do gene *rpoS*. Resultados experimentais indicam que células mutadas neste gene, em fase estacionária, apresentaram a mesma sensibilidade ao NaCl que células na fase log. (MATTICK *et al.*, 2000).

A fase estacionária e a condição de inanição induzem a síntese de proteínas que conferem resistência a mudanças químicas e físicas que sofrem os microrganismos (ARNOLD e KASPAR, 1995). Entretanto, neste mesmo trabalho observou-se que células em meio livre de nutrientes (tampão BPS) não apresentaram maior resistência às condições de estresse impostas, quando comparadas com meio BHI nas mesmas condições. Este resultado é similar ao encontrado por CHEVILLE *et al.* (1996) que mostraram que células, provenientes da fase log de crescimento, em inanição apresentavam menor tolerância a ácido e sal do que células na fase estacionária. Isto indica que células em inanição podem induzir proteínas protetoras lentamente ou em níveis menores que células em fase estacionária.

4.3. Culturabilidade e indução do estado VNC

Pelos resultados obtidos no experimento de sobrevivência na presença de cloreto de sódio sob temperatura de refrigeração, observou-se que *Salmonella* e *E. coli* perdem a culturabilidade de forma mais acentuada quando células provenientes da fase logarítmica de crescimento eram submetidas a condições de estresse durante dez dias de incubação a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$. Portanto, foi avaliada a culturabilidade e a viabilidade nas concentrações de 0,68 M e 1,02 M de NaCl para células em fase log de crescimento das estirpes de *Salmonella* e de 1,02 M e 1,28 M de NaCl para as células das estirpes de *E. coli*, após dez dias de incubação a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Figuras 13 e 14).

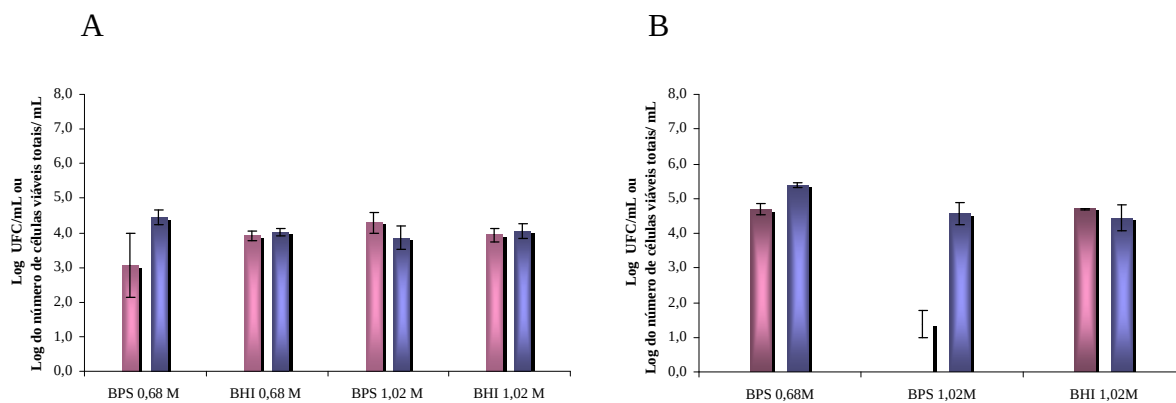


Figura 13. Comparação entre as contagens de células de *Salmonella* viáveis cultiváveis (CVC) e células viáveis totais (CVT) após dez dias de estocagem a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl. (A) *Salmonella* ATCC 14028 e (B) *Salmonella* CCS3.

CVC () log de UFC/mL em ágar Tripticaseína e Soja (TSA); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pela técnica DVC-Kogure (KOGURE *et al.*, 1979).

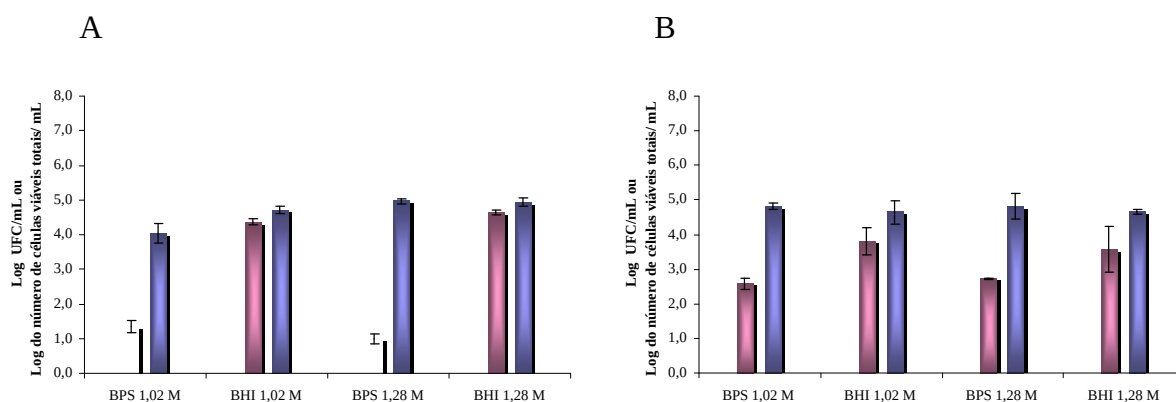


Figura 14. Comparação entre as contagens de células de *E. coli* viáveis cultiváveis (CVC) e células viáveis totais (CVT) após dez dias de estocagem a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl. (A) *E. coli* ATCC 1175 e (B) *E. coli* CCS4.

CVC () log de UFC/mL em ágar Tripticaseína e Soja (TSA); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pela técnica DVC-Kogure (KOGURE *et al.*, 1979).

A figura 13 mostra a comparação entre as contagens de células cultiváveis em unidades formadoras de colônia por mililitro e células viáveis totais por mililitro observadas ao microscópio, utilizando o método descrito por KOGURE *et al.* (1979), de cada estirpe de *Salmonella* obtida após dez dias de incubação a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Salmonella ATCC 14028 apresenta uma diferença de 31,2%, entre células viáveis totais e células viáveis cultiváveis em BPS acrescido de 0,68 M de NaCl. *Salmonella* CCS3 apresenta um comportamento diferente em BPS 0,68 M de NaCl, onde verifica-se que o número de células viáveis totais é praticamente o mesmo que o de células cultiváveis. Observa-se que a linhagem *Salmonella* ATCC 14028 em BPS 1,02 M de NaCl, não apresenta, aparentemente, células viáveis em estado latente, diferentemente de *Salmonella* CCS3 que mostra células viáveis não cultiváveis ou latentes (Figuras 13A e 13B). Não foi determinado se havia possibilidade de reativação em caldo. Confirmação do estado VNC pode ser feita por eletroforese de proteínas em duas dimensões (HEIM *et al.*, 2000). Entretanto, as metodologias DVC-Kogure e LIVE/DEAD[®] têm sido usadas como evidência do estado VNC (KOGURE *et al.*, 1979; VILLARINO *et al.*, 2000). O mesmo ocorre em meio BHI 1,02 M NaCl, o número de células viáveis totais de *Salmonella* CCS3 foi 21,2% maior que o número de células cultiváveis.

Para as estirpes de *E. coli*, a condição de falta de nutriente parece influenciar negativamente a culturabilidade, mas com manutenção da viabilidade para as duas estirpes, mesmo tendo apresentado percentuais de perda de culturabilidade diferentes. (Figura 14). A linhagem ATCC 1175 apresentou perda de culturabilidade maior em BPS (redução de aproximadamente cinco ciclos log) que o isolado CCS4.

A estirpe de *E. coli* ATCC 1175 apresenta diferenças de apenas 7,2% e 5,6% entre as contagens de células viáveis cultiváveis e células viáveis totais em meio BHI adicionado de 1,02 M e 1,28 M de NaCl, respectivamente; se comparadas às diferenças de 66,6% e 79,9% observadas em BPS adicionado das mesmas concentrações de sal.

O isolado *E. coli* CCS4 parece ser mais resistente à condição de falta de nutriente e alta concentração de sal, pois o número de células viáveis totais foi aparentemente o mesmo da linhagem *E. coli* ATCC 1175 nas quatro condições testadas, enquanto que o número de células cultiváveis foi maior 1,23 ciclos log em BPS 1,02 M de NaCl e 1,73 ciclos log em BPS 1,28 M NaCl do que a cultura de referência ATCC 1175 (Figura 14). Em meio BHI adicionado de sal, o contrário foi observado, a linhagem ATCC 1175 foi mais resistente que o isolado CCS4, havendo perda de culturabilidade de apenas 7,2% na concentração de 1,02 M de NaCl e de 5,6% na concentração de 1,28 M de NaCl, se

comparada com 18,3% e 23,1% do isolado *E. coli* CCS4 nas mesmas concentrações de sal (Figura 14). As células originadas de BPS, após dez dias de estocagem a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, mostravam-se mais lentas em sua formação de colônias em TSA. Isso pode ser devido à ocorrência de injúria que era recomposta com o tempo em TSA.

Baseado nas diferenças observadas entre as contagens de viáveis cultiváveis e viáveis totais apresentadas nas figuras 13A e 13B e nas figuras 14A e 14B podemos sugerir a entrada no estado viável não cultivável das estirpes de *Salmonella* e de *E. coli* nessas condições de estresse.

Para confirmar a entrada no estado VNC foi realizado um novo experimento quando se avaliou a culturabilidade e a viabilidade empregando-se duas metodologias DVC – Kogure e pelo método LIVE/ DEAD[®]. As figuras 15 e 16 mostram os resultados encontrados para as estirpes de *Salmonella* e *E. coli*, respectivamente.

Diante dos resultados encontrados, podemos dizer que parte da população dos microrganismos estudados encontra-se, possivelmente, no estado VNC após dez dias de estocagem sob refrigeração nas condições de estresse testadas, embora as metodologias utilizadas mostrem diferentes sensibilidades.

A avaliação da viabilidade pelo método LIVE/DEAD[®] apresentou maior sensibilidade que pelo método DVC – Kogure uma vez que, quase em sua totalidade, apresentou um número maior de células vivas quando amostras do mesmo tratamento foram analisadas.

Em trabalho realizado por VILLARINO *et al.* (2000) foi constatado que os marcadores fluorescentes não foram capazes de distinguir células vivas de células mortas tratadas com luz UV, uma vez que as células mortas apresentaram capacidade residual de transporte e permeabilidade na membrana. Essa pode ser a explicação da diferença encontrada entre as duas metodologias.

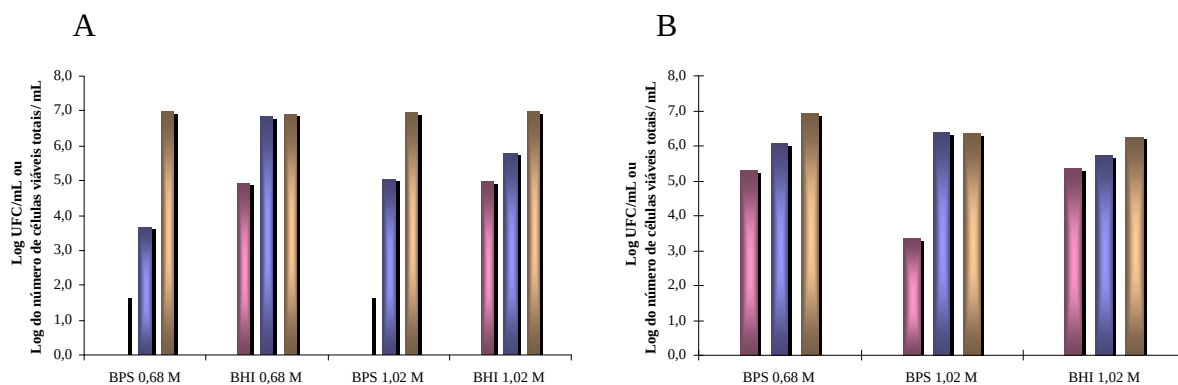


Figura 15. Comparação entre as contagens de células de *Samonella* viáveis totais (CVT), pelos métodos DVC-Kogure e pelo método LIVE/DEAD[®], após dez dias de estocagem a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl. (A) *Salmonella* ATCC 14028 e (B) *Salmonella* CCS3.

CVC () log de UFC/mL em ágar Tripticaseína e Soja (TSA); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pela técnica DVC-Kogure (KOGURE *et al.*, 1979); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pelo método LIVE/DEAD[®].

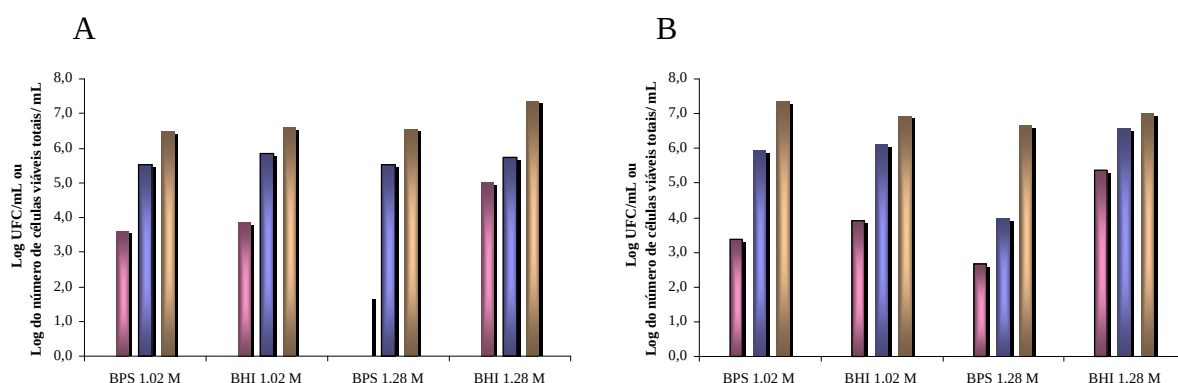


Figura 16. Comparação entre as contagens de células de *E. coli* viáveis totais (CVT), pelos métodos DVC-Kogure e pelo método LIVE/DEAD[®], após dez dias de estocagem a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ em BPS ou caldo BHI, em diferentes concentrações de NaCl. (A) *E. coli* ATCC 1175 e (B) *E. coli* CCS4.

CVC () log de UFC/mL em ágar Tripticaseína e Soja (TSA); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pela técnica DVC-Kogure (KOGURE *et al.*, 1979); CVT () log de células viáveis contadas ao microscópio pelo método LIVE/DEAD[®].

Nas figuras 17 e 18 estão mostradas lâminas observadas em microscópio de epifluorescência de células coradas pelo método LIVE/DEAD[®] e células tratadas com ácido nalidíxico e extrato de levedura e coradas com laranja de acridina, respectivamente.

Muitos microrganismos já foram descritos como capazes de entrar no estado viável não cultivável. Diversos são os fatores que induzem este estado fisiológico em bactérias. Os estresses osmótico e de temperatura são amplamente estudados como fatores de indução ao estado VNC. *Vibrio splendidus* tem sua capacidade de persistir no estado cultivável influenciado pela disponibilidade de nutrientes e salinidade. ARMANDA *et al.* (2003) mostraram que em meio quimicamente definido com 3,3% de salinidade e contendo 17 g/L de nutrientes disponíveis, *V. splendidus* entram no estado VNC em 61 dias de cultivo.

O tempo requerido para a transição para o estado VNC varia com as condições empregadas e também com a espécie e estirpe bacteriana utilizada (BESNARD *et al.*, 2000), o que justifica a variação encontrada neste trabalho.

A influência de NaCl na resposta fisiológica de *Listeria monocytogenes* foi estudada (BESNARD *et al.*, 2002). Foi constatado que NaCl e temperatura apresentam efeitos diferentes em isolados distintos de *L. monocytogenes*. Altas temperaturas e baixas concentrações de sal foram necessárias para diminuir o tempo de entrada no estado VNC da linhagem ATCC 19115, enquanto a estirpe Scott A necessitou de temperatura de 4 °C para que o tempo de entrada no estado VNC fosse diminuído. Estudando o efeito da luz natural na entrada do estado viável não cultivável, verificou-se que NaCl foi essencial para perda da culturabilidade em todas as estirpes testadas, exceto para a linhagem ATCC 19115.

A preservação de alimentos pela diminuição da atividade de água e por baixas temperaturas é amplamente utilizada como ferramenta efetiva na prevenção de doenças causadas por microrganismos, como por exemplo, salmonelose. Desta maneira existe uma grande preocupação de como os microrganismos respondem a determinadas condições de estresse sub-letal. O estado VNC tem sido bastante estudado, uma vez que o número de microrganismos potencialmente patogênicos pode estar subestimado, pois, não conseguem crescer em meios de cultura utilizados em laboratórios, mas podem estar viáveis e com capacidade de causar doença nos hospedeiros.

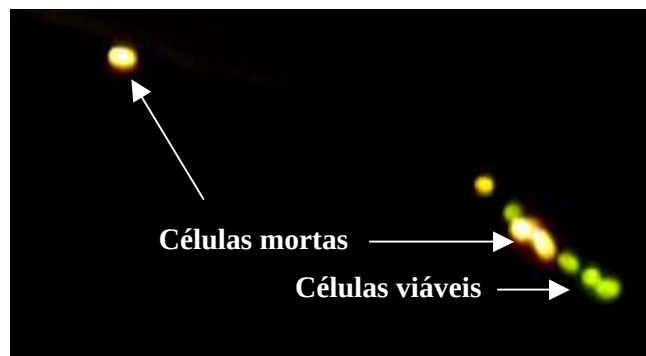


Figura 17. Células de *E. coli* CCS4, em tampão BPS 1,02 M NaCl, após dez dias de incubação sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), coradas pelo método Kit LIVE/DEAD[®].

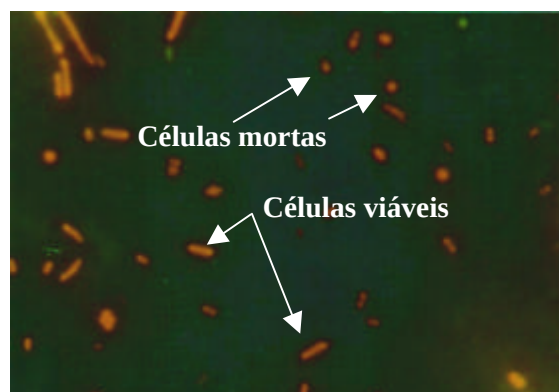


Figura 18. Células de *E. coli* CCS4, em caldo BHI 1,02 M NaCl, após dez dias de incubação sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), coradas com laranja de acridina. As células foram tratadas com 0,002% de ácido nalidíxico, 0,025% de extrato de levedura e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 7 horas antes da coloração.

Salmonella enterica Oranienburg no estado VNC em alimento salgado foi capaz de causar infecção sistêmica em camundongos imunodeprimidos (ASAKURA, *et al.*, 2002).

E. coli O157:H7, possivelmente no estado VNC provocado por altas concentrações de sal, causou surto ocorrido no Japão em 1998. Acredita-se que a conversão ao estado VNC desse microrganismo ocorreu no alimento e não foi detectado em meio de cultura rotineiramente utilizado em laboratório, este manteve sua patogenicidade e ressuscitou após passagem *in vivo* (MAKINO *et al.*, 2000).

A falta de nutrientes é um dos principais fatores que induzem o estado VNC e, portanto, o mais utilizado como ferramenta de estudo. Neste trabalho, verificou-se que tampão BPS foi mais efetivo na indução do estado VNC em isolados de *E. coli*, do que meio BHI. Isso pode ser explicado pelo fato das bactérias entrarem neste estado fisiológico em ambientes extremamente hostis, pois se não entrarem nesse estado de dormência, a condição será letal a célula. Muitos estudos têm mostrado que processos que normalmente eram considerados bactericidas podem levar à indução do estado VNC (GUSASEKERA *et al.*, 2002; OLIVER *et al.*, 2005). Entretanto, para cada microrganismo, as condições de estresse podem ser diferentes. Isto é observado para as estirpes de *Salmonella*. Para a linhagem ATCC 14028 em meio BHI adicionado de 0,68 M e 1,02 M de NaCl existe a possibilidade das células não entrarem no estado VNC, no tempo avaliado, bem como em BPS 1,02 M, mas em BPS 0,68 M de NaCl há 30,4% mais células viáveis totais do que células viáveis cultiváveis, evidenciando que o sal não é um fator determinante para a entrada neste estado de dormência. O contrário acontece para o isolado CCS3 que parece ser dependente de NaCl para entrada em VNC, pois somente nos meios com altos teores de NaCl, verifica-se diferença entre células viáveis totais e células viáveis cultiváveis (Figura 13).

4.4 Efeito de NaCl na morfologia de *E. coli*

As figuras 19 e 20 destacam as mudanças morfológicas do isolado *E. coli* CCS4 ocorridas durante dez dias de incubação a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ em meio BHI e em tampão BPS nas diferentes concentrações de NaCl estudadas, respectivamente.

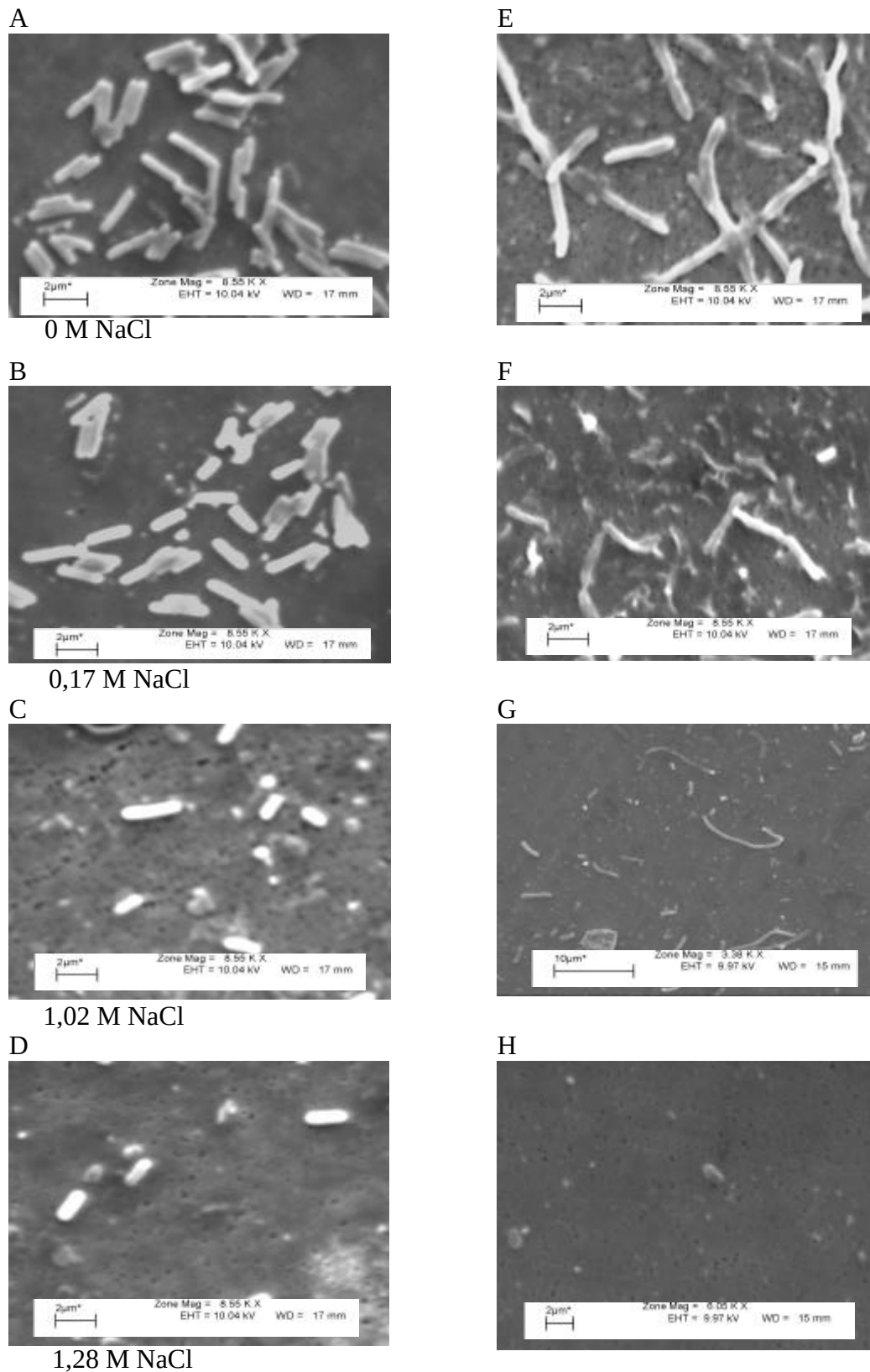


Figura 19. Micrografias de *Escherichia coli* CCS4 em meio BHI adicionado de diferentes concentrações de NaCl, em microscópio eletrônico de varredura Leo 1430 VP. A; B; C e D – Células coletadas, na fase log de crescimento; E; F; G e H – Células coletadas, na fase log de crescimento, após estocagem por dez dias sob refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 1$).

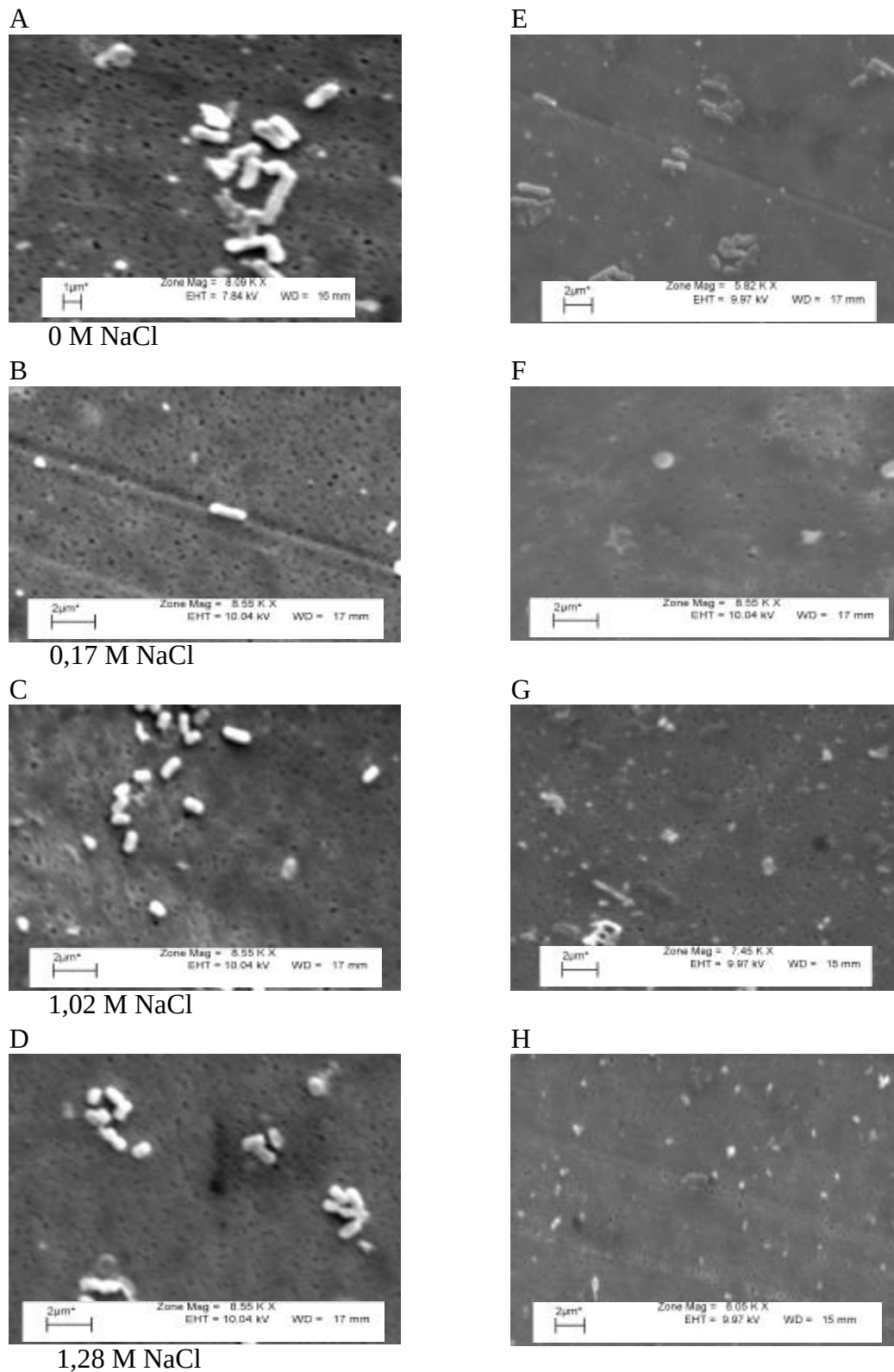


Figura 20. Micrografias de *E. coli* CCS4 em tampão BPS adicionado de diferentes concentrações de NaCl, em microscópio eletrônico de varredura Leo 1430 VP. A; B; C e D – Células coletadas, na fase log de crescimento; E; F; G e H – Células coletadas, na fase log de crescimento, após estocagem por dez dias sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

Em meio BHI, na presença ou ausência de NaCl, observou-se que nas concentrações de 0 M, 0,17 M, 1,02 M de NaCl ocorreu o fenômeno de filamentação (Figura 19E, 19F e 19G). Resultado semelhante foi encontrado para células de *Salmonella* sp. em TSB adicionado de NaCl, que se apresentaram na forma filamentosa após 24 horas de incubação a 21 ou 37 °C (MATTICK *et al.*, 2000).

A filamentação não ocorre somente devido a adição de sal, mas também, possivelmente, devido a temperatura, pois como observado na figura 19E, em meio BHI 0 M de NaCl ocorreu a filamentação.

Em BHI adicionado de 1,28 M de NaCl observa-se que algumas células de *E. coli* CCS4 diminuem de tamanho, outras se desintegram ou perdem a capacidade de aderir na membrana de polycarbonato (Figura 19H).

As mudanças morfológicas podem ocorrer devido a condições adversas em que os microrganismos se encontram. As células que entram no estado fisiológico viável não cultivável também podem apresentar mudanças na sua morfologia (KONDO *et al.*, 1994; GUPTE *et al.*, 2003), isto foi observado aqui para *E. coli* CCS4 em BHI adicionado de 1,02 M e 1,28 M de NaCl incubado sob temperatura de refrigeração.

Em solução tampão BPS, as células não apresentam este fenômeno de filamentação e sim de diminuição de tamanho e transição para a forma cocóide (Figuras 20D e 20H). Esta mudança para a forma cocóide já foi descrita para *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 (GUPTE *et al.* 2003), para *Campylobacter* sp. (REEZAL *et al.*, 1998; SANTIWATANAKUL e KRIEG, 2005) que estavam no estado VNC. Células que estão no estado de inanição também apresentam diminuição no seu tamanho (Figura 20D). Este fenômeno já foi descrito para células de *Listeria monocytogenes* em deficiência de glicose e aminoácidos após sete dias de incubação (HERBERT e FOSTER, 2001).

5- CONCLUSÕES

A adição de cloreto de sódio reduziu a velocidade de crescimento das estirpes de *Salmonella* e *E. coli* estudadas em meio BHI a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Nas concentrações de NaCl testadas, a $\mu_{\text{máx}}$ foi menor que no controle (meio BHI). Para as estirpes de *Salmonella*, as concentrações superiores a 0,85 M de NaCl foram consideradas condição de estresse, enquanto para as de *E. coli*, o estresse osmótico ocorreu a partir de 0,94 M, indicando que, entre as estirpes testadas, as de *Salmonella* foram mais sensíveis ao efeito do NaCl do que as de *E. coli*.

O NaCl influenciou de forma diferente o comportamento das estirpes de *Salmonella* e *E. coli* em diferentes fases de crescimento (fase log e estacionária) sob temperatura de refrigeração.

As estirpes de *Salmonella* em meio BHI sem acréscimo de NaCl ou com 0,17 M cresceram tanto a partir de células na fase log como a partir de células na fase estacionária de crescimento. Já nas concentrações 0,68 M e 1,02 M o comportamento foi distinto para as duas fases de crescimento. A partir de células na fase log houve redução do número de UFC/mL ao longo de dez dias de estocagem sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) enquanto que para células provenientes da fase estacionária, o número de UFC/mL permaneceu praticamente constante durante o mesmo período.

O mesmo foi observado para *E. coli* ATCC 1175 e *E. coli* CCS4. As estirpes cresceram em meio BHI na ausência de NaCl ou 0,17 M independente da fase de crescimento, enquanto que para as concentrações de 1,02 M e 1,28 M de NaCl, células

provenientes da fase estacionária aumentaram em número após dez dias de estocagem a 5 °C $\pm$ 1 quando comparadas com células a partir da fase log.

Em BPS sem acréscimo de NaCl ou com 0,17 M, tanto para as células a partir da fase log como para as células a partir da fase estacionária de crescimento, o número de UFC/mL manteve-se o mesmo para *Salmonella* ATCC 14028, *Salmonella* CCS3, *E. coli* ATCC 1175 e *E. coli* CCS4 durante os dez dias de estocagem a 5 °C $\pm$ 1.

Para as estirpes de *Salmonella* nas concentrações de 0,68 M e 1,02 M de NaCl houve redução no número de UFC/mL durante esse período, sendo o isolado *Salmonella* CCS3 aparentemente mais sensível que *Salmonella* ATCC 14028.

Nas concentrações de 1,02 M e 1,28 M de NaCl, os isolados de *E. coli* também apresentaram redução no número de UFC/mL. A linhagem *E. coli* ATCC 1175 mostrou-se mais sensível que o isolado *E. coli* CCS4.

Parte das células de *Salmonella* CCS3, *Salmonella* ATCC 14028, *E. coli* CCS4 e *E. coli* ATCC 1175 entraram, possivelmente, no estado fisiológico VNC em BHI e BPS acrescido de 0,68 M e 1,02 M e 1,02 M e 1,28 M, respectivamente, evidenciada pela perda de culturabilidade acompanhada da manutenção da viabilidade, conforme métodos estabelecidos.

Dependendo da concentração de NaCl e da composição do meio *E. coli* CCS4 muda sua morfologia. Em meio BHI sem ou com adição de NaCl nas concentrações de 0,17 M, 1,02 M a 5 °C $\pm$ 1, observa-se o fenômeno de filamentação; em BHI 1,28 M e em BPS sem ou com adição de sal nas concentrações de 0,17 M, 1,02 M e 1,28 M as células diminuem o tamanho ou apresentam transição para a forma cocóide.

É necessário o estudo mais aprofundado do estado VNC destes microrganismos nas condições de estresse testadas neste trabalho. Possibilidades como estudo do perfil de proteínas e o fenômeno de ressuscitação são bastante relevantes para comprovar a existência do estado VNC nestas bactérias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 65-91, 1999.

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.

ARMANDA, S.P. ; FARTO, R.; PEREZ, M.J.; NIETO, T.P. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. **Microbiology**, v. 149, p. 369-375, 2003.

ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2037-2039, 1995.

ASAKURA, H.; IGIMI, S.; KAWAMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Role of *in vivo* passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidaditive stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 2, p. 243-249, 2005.

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, 2002a.

ASAKURA, H.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T.; MAKINO, S. Viable but non culturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1526-1529, 2002b.

BAFFONE, W.; CITTERO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZAWO, L.; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 31-39, 2003.

BALEUX, B.; CARO, A.; LESNE, J.; GOT, P. ; BINARD, S.; DELPEUCH, B. Survie et maintien de la virulence de *Salmonella typhimurium* VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux. **Oceanologica Acta**, v. 21, p. 939-950, 1998.

BAUDART, J.; COALLIER, J.; LAURENT, P. ; PREVOST, M. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family *Enterobacteriaceae* in freshwater and drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5057-5063, 2002.

BEARSON, S.M.D.; BENJAMIN, J.W.H.; SWORDS, W.E.; FOSTER, J.W. Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 2572-2579, 1996.

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.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.E.; 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, 2000a.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.E.; CAPPELIER, J.M. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. **Food Microbiology**, v. 17, p. 697-704, 2000b.

BRAUX, A.; MINET, J.; TAMANAI-SHACOORI, Z.; RIOU, G.; CORMIER, M. Direct enumeration of injured *Escherichia coli* cell harvested onto membrane filters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 31, p. 1-8, 1997.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *In: Bacterial Stress Responses*, p. 79-97, 2000.

BUCHANAN, R.L.; KLAUITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 9, p. 185-196, 1992.

CAPPELIER, J.M.; MINET, J.; MAGRAS, C.; COLWELL, R.R.; FEDERIGHI, M. Recovery in embrionated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5154-5157, 1999.

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

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.

CHEVILLE, A.M.; ARNOLD, K.W.; BUCHRIESER, C.; CHENG, C.-M.; KASPAR, C.W. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1822-1824, 1996.

CHO, J.C.; KIM, S.J. Viable but non-culturable state of a green fluorescence protein-tagged environmental isolate of *Salmonella typhi* in groundwater and pond water. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 257-264, 1999.

COLWELL, R.R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 6, p. 121-125, 2000.

COLWELL, R.R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D.J.; ROSZAK, D.R.; HUQ, S.A.; PALMER, L.M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment implication for release of genetically engineered microorganisms. **BioTecnology**, v. 3, p. 817-820, 1985.

COLWELL, R.R.; BRAYTON, P.; ERRINGTON, D.; TALL, B.; HUQ, A.; LEVINE, M.M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a culturable state in the human intestine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 28-31, 1996.

CONSKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 121-147, 1989.

COUTARO, 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, p. 951, 2005.

COYNAULT, C.; ROBBE-SAULE, V.; NOREI, F. Virulence and vaccine potential of *Salmonella* Typhimurium mutants deficient in expression of the RpoS (σ^S) regulon. **Molecular Microbiology**, v. 22, p. 149-160, 1996.

D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 207-215, 1991.

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

DUBNAU, D.; TURGAY, K. Regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress. In **Bacterial Stress Responses**. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds) ASM Press, Washington, DC, 485p., 2000.

EISENTARK, A.; CAUCUTT, M.J.; BECKER-HAPAK, M.; IVANOVA, A. Role of *Escherichia coli* rpoS and associated genes in defense against oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, p. 975-993, 1999.

FEDERIGHI, M.; THOLOZAN, L. J.; CAPPELIER, M. J.; TISSIER, P. J.; JOUVE, L. M. Evidence of non-cocoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining and scanning electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 15, p. 539-550, 1998.

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

GOULD, G.W. Drying, raised osmotic pressure and low water activity. In **Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures**. Gould, G.W. (ed). Elsevier Science Publishers Ltd., p. 97-117, 1989.

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, 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 DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6669-6675, 2003.

GURAYA, R.; FRANK, J.F.; HASSAN, A.N. Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in dairy foods stored at refrigeration temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1098-1102, 1998.

HEIM, S.; LLEO, M.D.M.; BONATO, B.; GUSMAN, 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, p. 6739-6745, 2002.

HERBERT, K.C.; FOSTER, S.J. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and role of known and novel components. **Microbiology**, v. 147, p. 2275-2284, 2001.

HÖLLER, C.; MARTIN, W. Evaluation of the direct viable count method for temperature-stresses *Campylobacter coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p. 157-162, 1998.

HUQ, A.; COLWELL, R.R. A microbiological paradox: viable but nonculturable bacterial with special reference to *Vibrio cholerae*. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 96-101, 1995.

ISLAN, M.S.; HASAN, M.K.; MIAH, M.A.; SUR, G.C.; FELSENSTEIN, A.; VENKATESAN, M.; SACK, R.B.; ALBERT, M.J. Use of the polymerase chain reaction and fluorescent antibody methods for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I in laboratory microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 536-540, 1993.

IVANOVA, A.; RENSHAW, M.; GUNTAKA, R.V.; EISENSTARK, A. DNA base sequence variability in Kat F (putative sigma factor) gene of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 5479-5480, 1992.

JORDAN, K.N.; DAVIES, K.W. Sodium chloride enhances recovery and growth of acid-stressed *E. coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 312-315, 2001.

KAMAT, A.S.; NAIR, P.M. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. **Lebensm. – wiss. u – Technol.**, v. 29, p. 714-720, 1996.

KAPRELYANTS, A.S.; MUKAMOLOVA, G.V. ; DAVEY, H.M.; KELL, D.B. Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1311-1316, 1996.

- KELL, D.B.; KAPRELYANTS, A.S.; WEICHART, D.H.; HARWOOD, C.L.; BARER, M.R. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 169-187, 1998.
- KNOCHEL, S.; GOULD, G. Preservation microbiology and safety: Quo vadis? **Trends Food Science & Technology**, v. 6, p. 127-131, 1995.
- KOGURE, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 415-420, 1979.
- KONDO, K.; TAKADE, A.; AMAKO, K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p. 179-184, 1994.
- KRIST, K.A.; ROSS, T.; McMEEKIN, T.A. Final optical density and growth rate, effects of temperature and NaCl differ from acidity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 195-203, 1998.
- LANGE, R.; HENGEE-ARONIS. Growth phase regulated expression of *bol A* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σ^S (*rpoS*). **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4474-4481, 1991.
- LESNE, J.; BERTHET, S.; BINARD, S.; ROUXEL, A.; HUMBERT, F. Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 195-203, 2000.
- LIMA, E.S.C.L. **Avaliação microbiológica em carcaças suínas e análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) em um frigorífico em Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, M.G., 51p., 2002
- LLEO, M.D.M.; TAFI, M.C.; CANEPARI, P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. **Systematic Applied Microbiology**, v. 21, p. 333-339, 1998.

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

LUNDGREN, B. Fluorescein diacetate as a stain for metabolically active bacteria, **Oikos**, v. 36, p. 17-22, 1981.

MAKINO, S.; 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, p. 5536-5539, 2000.

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

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

McDOUGALD, D.; RICE, S.A.; WEICHART, D.; KJELLEBERG, S. Nonculturability: adaptation or debilitation? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 1-9, 1998.

MONTVILLE, T.J. Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods. In: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. (eds), ASM Press, Washington D.C. p. 13-29, 1997.

MORTON, D.; OLIVER, J.D. Induction of carbon starvation proteins in *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3653-3659, 1994.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: **Compendium of Methods for the Microbilological Examination of Foods**. APHA-American Public Health Association, 4th Edithion, Washington DC, p. 63-67, 2001.

MUKAMOLOVA, G.V.; KAPRELYANTS, A.S.; YOUNG, D.I.; YOUNG, M.; KELL, D. B. A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8916-8921, 1998.

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K.N. Induction of adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 89-93, 2003.

NAKAGAWA, H.; HARA-KODO, Y.; KOJIMA, T.; IKEDO, M.; KODAKA, H.; KONUMA, H.; KUMAGAI, S. Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 107-110, 2000.

OHTOMO, R.; SAITO, M. Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: Possible implication for resuscitation from the VBNC state. **Microbial Ecology**, v. 42, p. 208-214, 2001

OLIVER, J.D. Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response. *In: Tracking Genetically Engineered Microorganisms*. Jansson, J.K.; Van Elsas, J.D. and Bailey, M.J. (eds), Landes Biosciences, Georgetown, Texas, 2000a.

OLIVER, J.D. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *In: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, p. 723-730, 2000b.

OLIVER, J.D. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 42, p. 203-208, 1995.

OLIVER, J.D.; BOCKIAN, R. *In vivo* resuscitation and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2620-2623, 1995.

OLIVER, J.D.; HITE, F.; McDOUGALD, D.; ANDON, L.N.; SIMPSON, M.L. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2624-2630, 1995.

OLIVER, J.D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2640-2644, 1991.

OLIVER, J.D.; WANUCHA, D. Survival of *Vibrio vulnificus* at reduced temperatures and elevated nutrient. **Journal of Food Safety**, v. 10, p. 79-86, 1989.

PANUTDAPORN, N.; KAWAMOTO, K.; ASAKURA, H.; MAKINO, S. 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.

PUENT, J.L.; FINLAY, B.B. Pathogenic *Escherichia coli*, In: **Principles of Bacterial Pathogenesis**, E. A. Groisman (ed) p. 387- 456. Academic Press, San Diego, California, 2001.

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

REEZAL, A.; McNEIL, B.; ANDERSON, J.G. Effect of low osmolality nutrient media on growth and culturability of *Campylobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4643-4649, 1998.

REYNOLDS, D.T.; FRICKER, C.R. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 785-795, 1999.

RIJPENS, N.P.; HERMAN, L.M. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 984-995, 2002.

RODRIGUEZ, G.G.; PHIPPIS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H.F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 181-1808, 1992.

- ROLLINS, M.D.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 531-538, 1986.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Metabolic activity of bacteria cells enumerated by direct viable count. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2889-2983, 1987b.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 365-379, 1987a.
- 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.
- ROWAN, N.J. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: *Quo Vadis?* **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 462-467, 2004.
- SAITO, A.; OTSUKA, K.; HAMADA, Y.; ONO, K.; MASAKI, H. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentration from dried squid and behaviors of those strains in the dried squid *Japan*. **Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 11-17, 2000.
- SANTIWATANAKUL, S.; KRIEG, R.N. Acridine orange and viability of the coccoid form of *Campylobacter upsaliensis*. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 88, suppl.1, p. 5-11, 2005.
- SAVAGEAU, M.A. *Escherichia coli* habitats, cells types, and molecular mechanisms of gene control. **The American Naturalist**. v. 122, p. 732-744, 1983.
- SCHERER, C.A.; MILLER, S.L. Molecular pathogenesis of salmonellae, *In: Principles of Bacterial Pathogenesis*, E. A. Groisman (ed), p. 263 - 333. Academic Press, San Diego, California, 2001.

SHAHAMAT, M.; MAI, U.; PASZKO-KOLVA, C.; KESSEL, M.; COLWELL, R.R. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1231-1235, 1993.

SHERIDAN, G.E.C.; MASTERS, C.I.; SHALLCROSS, J.A.; MACKEY, B.M. Detection of mRNA by reverse transcription PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1313-1318, 1998.

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

SIGNORETTO, C.; LLEO, M.M.; TAFI, M.C.; CANEPARI, P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1953-1959, 2000.

SMITH, J.J.; HOWINGTON, P. J.; McFETERS, A.G. Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2977-2984, 1994.

TEIXEIRA, L.M. **Caracterização fisiológica e genética do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 desprovido da capacidade de imunoestimulação.** . Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, M.G., 38p., 2004.

THOLOZAN, L.J.; CAPPELIER, M.J.; TISSIER, P. J.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1110-1116 1999.

WARNER, J.M.; OLIVER, J.D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3025-3028, 1998.

WHIESIDES, M.D.; OLIVER, J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1002-1005, 1997.

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

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

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

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

YAMAMOTO, H. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 6, p. 112-114, 2000.

YARON, S.; MATTHEWS, K.R. 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.

YOSHIOKA, K.; TAKAHASHI, H.; HOMMA, T.; SAITO, M.; OH, K.B.; NEMOTO, Y.; MATSUOKA, H. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1289, p. 5-9, 1996.

YOUSEF, A.E.; COURTNEY, P. D. Basics of stress adaptation and implications in new generation foods. In: **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. Yousef, A.E. and Juneja, V. K. (eds), CRC Press, Washington, USA, 369p. 2003.

ZAMBRANO, M.M. *Escherichia coli* mutants with a growth advantage in stationary phase. Dissertação (Pós Doutorado), Universidade de Harvard, Massachusettes, 1993.

ZINSER, E.R.; KOLTER, R. Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 5800-5807, 1999.