

MAYARA MESSIAS OLIVEIRA

**INDUÇÃO E RECUPERAÇÃO DO ESTADO VIÁVEL NÃO
CULTIVÁVEL DE *Salmonella enterica* E *Shigella flexneri***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

O48i
2017
Oliveira, Mayara Messias, 1986-
Indução e recuperação do estado viável não cultivável de
Salmonella enterica e *Shigella flexneri* / Mayara Messias
Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.
xi, 52 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-51.

1. Salmonela. 2. Micro-organismos. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

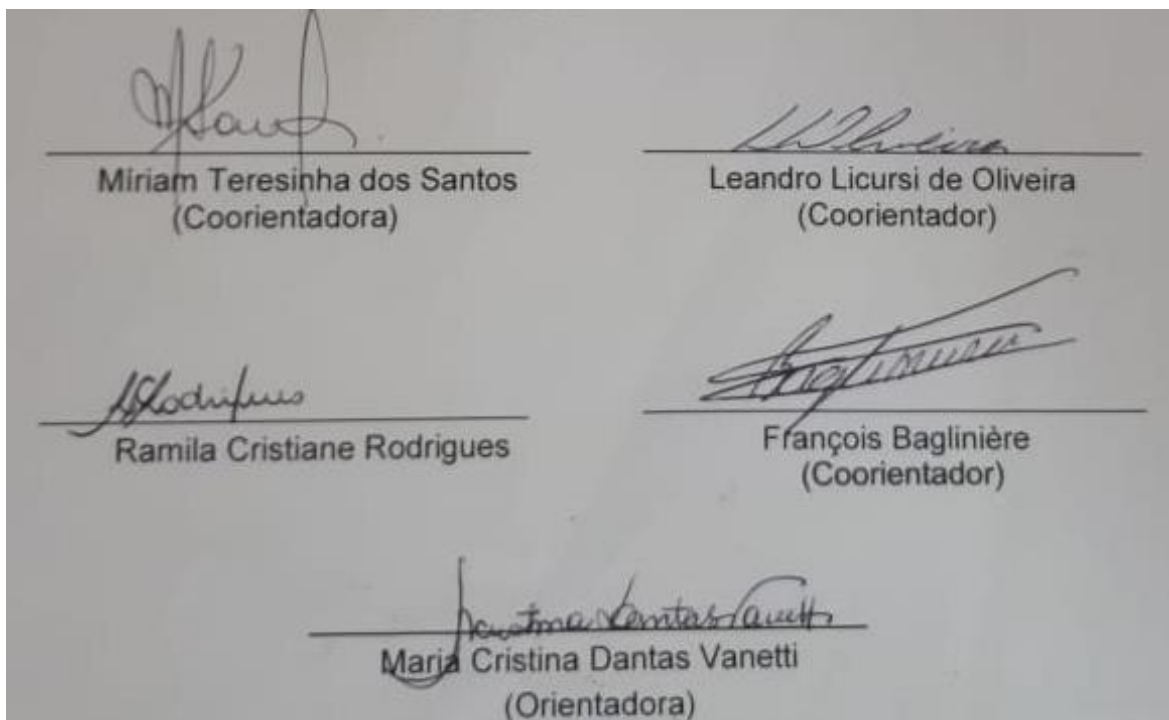
CDD 22. ed. 579.344

MAYARA MESSIAS OLIVEIRA

INDUÇÃO E RECUPERAÇÃO DO ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL DE *Salmonella enterica* E *Shigella flexneri*

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

APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.



A Deus e a “mainha”.

DEDICO.

“De fato, não fracassei ao tentar, cerca de 10.000 vezes, encontrar um método de recuperação de VNC. Simplesmente encontrei 10.000 maneiras que não funcionam.”

Adaptado de Thomas Edison.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus caminhos e me proporcionar a realização desse sonho.

A minha mãe Marli Messias Aragão, minha maior fonte de inspiração, por cada ensinamento, oportunidade, incentivo, bom exemplo e por todo amor dedicado a mim.

A minha tia Marilane Messias Aragão, por sempre me apoiar em cada decisão e vibrar comigo todas as minhas conquistas.

A toda minha família, pela torcida e pelas orações.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por ter me encantado todos os dias com sua magnífica estrutura e beleza e pela oportunidade de agregar conhecimentos que levarei sempre comigo.

Ao Departamento de Microbiologia (DMB), pelo compromisso com a formação dos discentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM), por ceder sua infraestrutura para realização das análises.

À Ana Paula Trovatti Uetanabaro, minha primeira orientadora, por acreditar no meu potencial, trabalho e por ter sido a grande incentivadora da busca por novas perspectivas.

À professora Cristina Vanetti, pela orientação desta dissertação, paciência, companheirismo, pelas risadas, momentos de descontração, suaves “puxões de orelha”, por fazer jus ao apelido carinhoso “mamis” e, principalmente, por ser o exemplo de professora e pesquisadora que pretendo levar ao longo da minha carreira.

Ao professor Leandro Licursi, pela coorientação, pelas preciosas contribuições para realização deste trabalho e pelo acompanhamento durante as análises realizadas por citometria de fluxo.

Ao François Baglinière, colaborador deste trabalho, pela participação, carinho, atenção e conselhos quando tudo parecia desmoronar.

Ao Felipe Alves de Almeida, popularizado como “Nerd”, pelas contribuições intelectuais, carinho, cuidado, amizade, prontidão em ajudar sempre, pelas risadas mais inusitadas, por me ensinar a beber café amargo, por ser um grande parceiro de trabalho e da vida.

À professora Míriam Teresinha, pela coorientação, participação na proposta deste estudo, pelo auxílio e amizade.

Ao professor Juraci Alves, por todo conhecimento compartilhado, pela prestatividade, amizade e pelas divertidas aulas de BIO 600.

À professora Márcia Silva, do Departamento de Economia Doméstica, por ter me acolhido durante os primeiros dias após a minha chegada em Viçosa e pela confiança.

Aos professores e colegas dos Laboratórios de Alimentos, Anaeróbios, Microbiologia Industrial e Fisiologia de Micro-organismos, que contribuíram para a realização dos experimentos.

À Nilcéa, Aline, Letícia, Sandra, Gabriel, Raquel, José Cesário e Célio, funcionários do DMB por sempre terem sido muito atenciosos e prestativos.

Às amigas do Laboratório de “Anaeróbios”, Déborah, Elsa, Isabela, Sofia, Juliana por me suportarem no laboratório, pela ajuda nos experimentos, pelas palavras clássicas de consolo e pelos momentos de descontração e muita risada durante os cafezinhos da tarde.

Aos meus amigos do Laboratório de Alimentos, Nerd (Felipe), Dory (Deisy), Fabinho (Fábio), Chuchuzinho (Gabriel), Carniça (Leonardo), Cleri (Cleriane), Ramila, Cláudia, François, Leandro, Barbie (Jéssika), Cléozinha (Cleonice), Érika, Solimar e Andrés, por toda amizade dentro e fora do laboratório, companheirismo, solidariedade nos momentos de sufoco, risadas, resenhas, por todo carinho que sempre tiveram comigo, pelos melhores momentos compartilhados.

À minha amiga Adeline, por tornar esses últimos dias em Viçosa os melhores possíveis.

À Let's (Letícia), minha amiga e “filha”, por todo companheirismo, carinho e atenção.

A todos meus amigos de Itabuna, por serem sempre companheiros, prestativos e torcerem por mim.

A todos, meu carinho e eterna gratidão!

BIOGRAFIA

MAYARA MESSIAS OLIVEIRA, filha de Marli Messias Aragão e Mário Oliveira dos Santos, nasceu em Itabuna - BA.

Em agosto de 2014, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus – BA.

Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.	2
2.2. Estado viável não cultivável	4
2.3. Recuperação da culturabilidade de células no estado VNC.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Estratégia experimental	14
3.2. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo	14
3.3. Indução do estado viável não cultivável (VNC)	15
3.3.1. Ativação dos estoques.....	15
3.3.2. Condições de estresses	15
3.4. Avaliação da culturabilidade	16
3.5. Determinação da viabilidade.....	16
3.6. Avaliação do estresse oxidativo intracelular.....	17
3.7. Recuperação da culturabilidade.....	18
3.7.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 VNC em estresse nutricional, osmótico e frio	18
3.7.2. <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578 e <i>Shigella flexneri</i> 2a VNC em estresse nutricional e oxidativo.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Entrada no estado VNC com estresse osmótico	22
4.2. Estresse oxidativo intracelular	31
4.3. Recuperação da culturabilidade	34
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
APÊNDICE	52

LISTA DE ABREVIATURAS

VNC: Viável não cultivável

ROS: Espécies reativas de oxigênio / *Reactive oxygen species*

VBNC: *Viable but nonculturable state*

RpoS: RNA polimerase S

PI: Iodeto de propídio

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

Sod: Superóxido dismutase

Kat: catalase

MMS: Meio mínimo de sais

Mn²⁺: Íon manganês

UFC: Unidade formadora de colônia

PCA: Ágar padrão para contagem

BPS: Tampão de Butterfield

DIC: Delineamento inteiramente casualizado

FSC: Tamanho celular

SSC: Complexidade celular

DCFH-DA: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

NAC: N-acetil L-cisteína

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

XLD: Ágar de desoxicolato-lisina-xilose

RESUMO

OLIVEIRA, Mayara Messias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Indução e recuperação do estado viável não cultivável de *Salmonella enterica* e *Shigella flexneri*.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Míriam Teresinha dos Santos, Leandro Licursi de Oliveira e François Baglinière.

O estado viável não cultivável (VNC) foi verificado em diversas espécies de micro-organismos, muitas das quais são patógenos de importância alimentar, tais como *Salmonella* e *Shigella*. Nesta condição, os micro-organismos perdem a capacidade de crescer nos meios de cultura convencionais, mas mantêm viabilidade quando analisados por técnicas de contagem direta, como microscopia. *Salmonella* e *Shigella* podem entrar nesta condição fisiológica como mecanismo de resposta as variações ambientais e recuperar culturabilidade quando as condições de sobrevivência forem novamente favoráveis. Neste trabalho, foi acompanhado o comportamento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 e *Shigella flexneri* durante a indução ao estado VNC, além de avaliar estratégias de reativação celular. Após a entrada no estado VNC por estresse nutricional, associado ao osmótico e baixa temperatura ou ao estresse oxidativo, as células foram submetidas a diversos tratamentos de recuperação, utilizando a combinação de alguns fatores, tais como meios de cultura, temperatura de incubação, agentes antioxidantes, condição atmosférica e métodos de esterilização dos meios. *S. flexneri* mostrou-se mais resistente às condições de estresses as quais foram expostas para indução ao estado VNC, pois células cultiváveis foram detectadas em meio de cultura após 277 dias sob os estresses nutricional, osmótico e frio, ao passo que *Salmonella* Enteritidis perdeu a culturabilidade em caldo BHI, após 133 dias de indução por estes mesmos agentes estressantes. Sob condições de estresse oxidativo, este sorovar não apresentou crescimento em TSA após 3 horas de indução, enquanto *S. flexneri* foi capaz de crescer após este mesmo período de tratamento. Análises por citometria de fluxo revelaram a presença de células viáveis de ambas espécies sob as condições de estresses utilizadas para indução ao estado VNC, entretanto, não foi possível recuperar a culturabilidade destas células utilizando as condições propostas, nas quais diversos fatores foram combinados totalizando assim 69 tratamentos de recuperação. Além disso, não foi observada diferença da presença de espécies

reativas de oxigênio (ROS) intracelular entre células em estado VNC e células viáveis em fase estacionária de crescimento em ambas espécies estudadas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mayara Messias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Induction and recovery of the viable non-cultivable state of *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri*.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Advisers: Míriam Teresinha dos Santos, Leandro Licursi de Oliveira and François Baglinière.

The viable but nonculturable state (VBNC) has been established in several species of microorganisms, many of which are foodborne pathogens, such as *Salmonella* and *Shigella*. In this condition, microorganisms lose the ability to grow in conventional culture media but maintain viability when analyzed by direct counting techniques, such as microscopy. *Salmonella* and *Shigella* may enter into this physiological condition as a mechanism of response to environmental variations and recovery culturability when survival conditions are again favorable. This work verified the behavior of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 578 and *S. flexneri* during induction to VBNC state and the use of resuscitations techniques. After entry into the VNC state by cold induction, osmotic and nutritional stresses or oxidative stress, cells were submitted to various recovery treatments using a combination of some factors such as culture media, incubation temperature, antioxidant agents, atmospheric condition and media sterilization methods. *S. flexneri* was more resistant to stress conditions once cultivable cells were detected in culture medium after 277 days under cold, osmotic and nutritional stresses, whereas *Salmonella* Enteritidis lost culturability in BHI broth, after 133 days of induction by these same stressful conditions. Under oxidative stress, this serovar did not growth in TSA after 3 hours of induction, while *S. flexneri* was able to grow after this same treatment period. Flow cytometric analysis revealed the presence of viable cells from both species under conditions of induction stresses to the VNC state, however, it was not possible to recover the culturability of these cells using the proposed conditions, in which the various factors were combined, thus totaling 69 recovery treatments. In addition, no difference was observed in the presence of intracellular reactive oxygen species (ROS) between VNC cells and viable cells in the stationary phase of growth in both species studied.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella e *Shigella* constituem um problema de saúde pública mundial sendo responsáveis por muitos casos de doenças de origem alimentar. Bactérias destes gêneros são expostas a diversas condições ambientais que podem levar à formação de células estressadas, injuriadas e à morte celular. Além disso, *Salmonella* e *Shigella* possuem mecanismos de resistência a condições estressantes que permitem estes patógenos entrarem em condição fisiológica conhecida como estado viável, mas não cultivável (VNC). Nesta condição, o micro-organismo mantém atividade metabólica em níveis baixos, mas detectáveis, diferente de estruturas diferenciadas que se encontram em dormência, como os esporos.

Células no estado VNC perdem a capacidade de se multiplicarem nos meios de cultura padrão utilizados pela maioria dos laboratórios para detecção e enumeração de células viáveis. É possível que esta incapacidade de divisão celular esteja relacionada, em parte, à presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos meios de cultivo em razão dos processos de autoclavagem ou por auto oxidação dos ingredientes.

Contudo, patógenos no estado VNC constituem verdadeira ameaça à saúde do consumidor, pois, apesar de não serem detectáveis pelos métodos de análises convencionais, ainda estão presentes viáveis nos alimentos, podendo ao longo da cadeia produtiva e após consumo, recuperar a culturabilidade, ou seja, reverterem-se do estado metabólico VNC para o estado metabólico normal, podendo se dividir e expressar normalmente os mecanismos de virulência.

São vários os esforços para esclarecer os mecanismos e agentes indutores que levam um micro-organismo em estado VNC a recuperar a culturabilidade. A busca deste conhecimento se deve, em primeiro lugar, à necessidade de se provar a existência do estado VNC e, em segundo lugar, à necessidade de revisão das técnicas de detecção a fim de garantir inocuidade dos alimentos ao consumidor.

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo principal obter células de *Salmonella* Enteritidis e de *Shigella flexneri* no estado VNC por diferentes condições de indução, seguido da utilização de diferentes condições para recuperação da culturabilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Os gêneros *Salmonella* e *Shigella* pertencem à família Enterobacteriaceae, morfologicamente são bacilos, gram-negativos, anaeróbios facultativos e não esporulantes. Entretanto, quanto à motilidade, estes dois gêneros diferem, pois *Salmonella* pode locomover-se por flagelos peritríquios ao contrário de *Shigella* (HALE e KEUSCH, 1996; JAY, LOESSNER e GOLDEN, 2005).

Salmonella forma um complexo grupo de bactérias constituído por duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a primeira está dividida em seis subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (TINDALL *et al.*, 2005). O gênero inclui mais de 2.500 sorovares (GRIMONT e WEILL, 2008; ANDINO *et al.*, 2015) sendo que mais de 1.500, são pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* (JACOBSEN *et al.*, 2011).

Além disso, este gênero possui um complexo sistema de classificação. A classificação de *Salmonella* em sorogrupos é realizada com base no antígeno oligossacarídeo O, enquanto a classificação em sorovares é baseada nos antígenos proteína flagelar H e polissacarídeo capsular de virulência Vi (BRONZE e GREENFIELD, 2005). A classificação em fagotipos é baseada na suscetibilidade deste gênero a diferentes bacteriófagos (DOYLE, 1990).

Salmonella é considerado um dos patógenos alimentares mais frequentemente isolados de alimentos. Este gênero é problema de saúde pública mundial, sendo responsável por 93,8 milhões casos de doenças de origem alimentar e 155 mil mortes por ano (ENG *et al.*, 2015). Os sorovares mais comuns associados às doenças humanas nos Estados Unidos e países europeus são *S. enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* sorovar Enteritidis (LEE *et al.*, 2015). No Brasil, *Salmonella* spp. destaca-se como o principal micro-organismo causador de surtos totalizando 1.564 (38,2 %) casos de doença no período de 2000 a 2014 (BRASIL, 2014, 2016).

O gênero *Shigella* possui quatro espécies ou sorogrupos (A, B, C, e D) dentro do qual há mais de 40 serotipos descritos (CDC, 2011). A espécie *Shigella dysenteriae* pertence ao sorogrupo A, *Shigella flexneri* pertence ao sorogrupo B, *Shigella boydii* pertence ao sorogrupo C e *Shigella sonnei* pertence ao sorogrupo D, sendo as três últimas espécies citadas, os principais agentes etiológicos de gastroenterites de origem alimentar (JAY, LOESSNER e GOLDEN, 2005; CDC, 2011).

A incidência de infecção por *Shigella* é impulsionada por surtos. Nos EUA, em 2015, foram relatados 4,3 casos por 100.000 habitantes e 52 laboratórios estatais e regionais de saúde pública relataram 13.784 casos confirmados pelo isolamento do patógeno (CDC, 2017). Tanto nos EUA quanto nos demais países desenvolvidos, *S. sonnei* tem sido responsável pelo maior percentual de infecções alimentares, seguido de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*, esta última está relacionada com a forma mais grave da doença (CDC, 2017; DA CUNHA *et al.*, 2017). Já a espécie mais comum em infecções alimentares em países em desenvolvimento é *S. flexneri*. No Brasil, estudos mostram a prevalência da *S. flexneri* sobre *S. sonnei* nos casos de infecção alimentar. As taxas mais altas foram observadas na região Sudeste (39%), seguida da região Nordeste (34%), havendo pouca ocorrência no Sul do país (3%) (DA CUNHA *et al.*, 2017).

Salmonella e *Shigella* apresentam relativa resistência a diversos fatores ambientais e, conseqüentemente, grande adaptabilidade fisiológica, podendo crescer em amplos valores de temperatura, pH e atividade de água. *Samonella* pode crescer em valores de temperatura de 5 °C a 45 °C, com ótima entre 35 °C e 37 °C (D'AOUST e MAURER, 2007), pH extremos de 3,8 a 9,5, com valores ótimos entre 7,0 e 7,5 (BELL, 2002; BRANDS *et al.*, 2005) e em valores de atividade de água acima de 0,94, com ótima para o crescimento de 0,995 (BELL, 2002). As espécies de interesse de *Shigella*, por serem típicas bactérias entéricas, também possuem requerimentos semelhantes para crescimento. Crescem em uma faixa de temperatura de 10 °C a 48 °C. Embora o melhor crescimento ocorra em uma faixa de pH de 6 a 8, já foram descritos crescimento em pH 5,0. Além disso, *Shigella* pode crescer em valores de atividade de água mais baixos que aqueles registrados para *Salmonella* e *Escherichia* (JAY, LOESSNER e GOLDEN, 2005).

As condições ambientais que estes patógenos enfrentam são as mais diversas possíveis. No intestino animal, as bactérias entéricas, tais como *Samonella* e *Shigella* competem com outros micro-organismos por nutrientes e podem ter o crescimento afetado pela atividade metabólica da microbiota competidora. Entretanto, quando os patógenos são excretados para o ambiente externo, as células bacterianas passam por condições menos estáveis do que dentro do hospedeiro, pois podem ser expostas a alterações de temperatura, diferentes intensidades de luz solar, variações na

disponibilidade de água e de oxigênio e entrar em contato com diferentes ecossistemas microbianos (HUMPHREY, 2004).

Bactérias, em geral, possuem um sistema regulador complexo, que medeia sua resposta ao ambiente externo e que pode ser ativado nas condições descritas acima. Um exemplo de tais reguladores são os fatores sigma, que são reguladores globais que alteram a especificidade da RNA polimerase. Alguns fatores sigma direcionam a transcrição para produzir proteínas de resposta aos estresses, que aumentam as chances de sobrevivência às mudanças do ambiente. Em *Salmonella*, o mais estudado destes fatores é RNA polimerase S (RpoS), que é produzido principalmente em resposta a privação de nutrientes, mas também está envolvido em respostas a alterações de pH e temperatura (LOEWEN *et al.*, 1998; HUMPHREY, 2004).

Por isso, os diversos mecanismos de resposta a um estresse ambiental específico levam esses micro-organismos a adquirirem resistência a outros diferentes tipos de estresses (BURGESS *et al.*, 2016). Ademais, estes e outros tipos de estresses podem levar uma parte ou a totalidade da população de *Salmonella* e *Shigella* a transformarem-se em um estado fisiologicamente descrito como viável, mas não cultivável (VNC). A entrada no estado VNC é principalmente, mas não exclusivamente, observada em bactérias gram-negativas e serve como estratégia para a sobrevivência em condições adversas (ROSZAK e COLWELL, 1987).

2.2. Estado viável não cultivável

A microbiologia faz uso de técnicas nas quais o cultivo é um dos principais métodos para enumeração de bactérias viáveis. O isolamento tradicional de *Salmonella* e *Shigella* utilizado pela maioria dos laboratórios de análise de alimentos envolve pré-enriquecimento em meio não seletivo com peso ou volume definido da amostra, seguido de etapa de enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios sólidos seletivos e confirmação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas (LAMPEL e ZHANG, 2013; LEE *et al.*, 2015). Os gêneros *Salmonella* e *Shigella* e outras 68 espécies de micro-organismos são relatados como capazes de entrar no estado VNC e, quando se encontram nesta condição, são incapazes de serem cultivados pelos métodos convencionais ou de crescerem em meios de cultura ricos (OLIVER, 2010; PINTO, SANTOS e CHAMBEL, 2013).

Diferente de células em estado VNC, células estressadas e injuriadas podem ser recuperadas em amostras pelo uso de meios de enriquecimento. Embora estas células não sejam cultiváveis em meios seletivos ou diferenciais devido à sensibilidade aos componentes tóxicos, estas não podem ser consideradas VNC, pois células estressadas ou injuriadas são metabolicamente ativas e sua incapacidade de crescer é uma consequência da lesão celular e não da redução da taxa metabólica para garantir a existência (PINTO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014).

O estado VNC das bactérias foi anteriormente referido como um estado de dormência (LI *et al.*, 2014). Contudo, a diferença entre VNC e estágios de dormência está baseada na atividade metabólica (PINTO; SANTOS e CHAMBEL, 2013). No estado VNC, as taxas metabólicas são mensuráveis, enquanto que, no estado de dormência, esta atividade permanece abaixo dos limites de detecção. Estudos moleculares ao longo dos anos resolveram a maioria dessas questões e agora, o estado VNC é reconhecido como um estado de sobrevivência distinto das bactérias (OLIVER, 2005, 2010; LI *et al.*, 2014). O estado VNC poderia ser uma resposta adaptativa que sustenta a sobrevivência a longo prazo em condições desfavoráveis ou um estado posterior à deterioração celular, que conserva características específicas das células viáveis, mas resulta em perda da culturabilidade pelas técnicas disponíveis (LI *et al.*, 2014).

Ainda existem muitas lacunas que necessitam ser preenchidas sobre os mecanismos genéticos que podem explicar a indução ao estado VNC. Alguns trabalhos apontam três proteínas que participam na indução do estado VNC: RpoS (BOARETTI *et al.*, 2003; KUSUMOTO, ASAKURA e KAWAMOTO, 2012), polifosfato quinase 1 (GANGAIAH *et al.*, 2009) e EnvZ (DARCAN *et al.*, 2009). Destas, apenas o efeito do RpoS na indução do estado VNC já foi estudado em *S. enterica* (KUSUMOTO, ASAKURA e KAWAMOTO, 2012). Kusumoto, Asakura e Kawamoto (2012) investigaram a função do fator sigma alternativo RpoS (σ^{38}) na indução de *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Oranienburg e *Salmonella* Typhimurium LT2 ao estado VNC sob estresse osmótico. Os resultados indicaram que RpoS atrasou a indução ao estado VNC e que a rápida indução de *Salmonella* Typhimurium LT2 e *Salmonella* Oranienburg pôde ser atribuída a concentrações ou quantidades mais baixas de RpoS. Além disso, foi observada concentração intracelular de RpoS reduzida durante a indução de VNC. Estes autores concluíram que durante a indução de *Salmonella* ao

estado VNC, as concentrações de RpoS podem ser reguladas, o que é importante para a manutenção da culturabilidade sob estresse.

Além da perda da culturabilidade, no estado VNC ocorre alteração na expressão gênica e no potencial de virulência, além de modificações na morfologia celular (MUELA *et al.*, 2008; ALLERON *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015). Foram observadas também nas células em VNC, diferenças na composição da parede e membrana celular, com alterações no perfil de proteínas e ácidos graxos (PINTO, SANTOS e CHAMBEL, 2013).

Uma vez que estas células não podem ser cultiváveis, os métodos de contagem direta são os mais comumente utilizados para verificação da viabilidade de células no estado VNC. Técnicas como a microscopia de fluorescência, combinada com o uso de vários corantes são as mais adotadas. Os corantes fluorescentes mais utilizados para determinar a viabilidade das células não cultiváveis são: o cloreto de tetrazólio 5-ciano-2,3-ditolil (CTC) e 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e o kit LIVE/ DEAD da *BacLight*, que verifica a viabilidade bacteriana usando dois corantes de ácidos nucleicos, o verde-fluorescente SYTO[®]9 e o iodeto de propídio (PI) vermelho-fluorescente (RAMAMURTHY *et al.*, 2014). O Syto[®] 9 permeia todas as células, independente da presença de danos na membrana e cora as células de verde enquanto o PI, permeia somente as células com danos na membrana e, portanto, cora as células mortas de vermelho (LINDBÄCK *et al.*, 2010; DINU e BACH, 2011; ZHAO *et al.*, 2013; POSTNIKOVA *et al.*, 2015).

Além da microscopia de fluorescência, outras técnicas tais como citometria de fluxo, que detecta e quantifica com precisão, células viáveis, também estão sendo usadas com frequência para avaliar a presença de células viáveis em amostras com células no estado VNC. Na citometria de fluxo, a distinção entre células viáveis e mortas também está associada ao uso de corantes vitais (KRAMER e MURANYI, 2013; PASQUAROLI *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014; TAMBURINI *et al.*, 2014). O uso desta técnica apresenta muitas vantagens frente a outras técnicas de análise celular, pois as análises são rápidas, permite a avaliação de grande número de células por leitura e a análise de amostras heterogêneas, obtendo resultados independentes para cada população, além de proporcionar uma visão muito mais próxima da condição real da população estudada porque as células são analisadas uma a uma (HEWITT e NEBE-VON-CARON, 2001).

A entrada no estado VNC é, além de resposta a condições ambientais adversas (GROISMAN e WINFIEL, 2003), também provocada pelo contato das bactérias a alguns compostos químicos (OLIVER, 2010). Li *et al.* (2014) citaram as principais condições que induzem diversas espécies de bactérias ao estado VNC: privação de nutrientes (COOK e BOLSTER, 2007), temperaturas extremas (BESNARD *et al.*, 2002), incubação fora do intervalo de pH ou salinidade que permite o crescimento celular (CUNNINGHAM, O'BYRNE e OLIVER, 2009), concentrações osmóticas elevadas ou reduzidas (ASAKURA *et al.*, 2008; WONG e LIU, 2008), concentrações flutuantes de oxigênio (MASCHER *et al.*, 2000; KANA *et al.*, 2008), estresse oxidativo (PINTO *et al.*, 2011; POSTNIKOVA *et al.*, 2015) exposição a metais pesados (GHEZZI e STECK, 1999; DEL CAMPO *et al.*, 2009), exposição a conservantes de alimentos (QUIRÓS *et al.*, 2009), exposição à luz branca visível e irradiação por luz UV (GOURMELON, CILLARD e POMMEPUY, 1994). Além disso, alguns tratamentos considerados bactericidas podem resultar na indução de apenas parte da população de células ao estado VNC, incluindo a pasteurização de leite (GUNASEKERA *et al.*, 2002) e a cloração de águas residuais (OLIVER, 2005).

Independente do estresse que leva à entrada ao estado VNC, bactérias, particularmente as patogênicas, tais como *Salmonella* e *Shigella*, apresentam risco para a saúde, porque estes patógenos podem recuperar a culturabilidade quando em condições ambientais favoráveis (OLIVER, DAGHER e LINDEN, 2005; RAMAMURTHY *et al.*, 2014). Este risco é ainda maior pelo fato de que as células em estado VNC podem se recuperar dentro do hospedeiro humano (OLIVER e BOCKIAN, 1995; COLWELL, 2000; RIVERS e STECK, 2001, BAFFONE *et al.*, 2006). Além disso, estudos mostraram que células de *S. dysenteriae*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi* em VNC, bem como outros patógenos, continuam a produzir fatores de virulência (RAHMAN *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2010; DINU e BACH, 2011; ALLERON *et al.*, 2013).

2.3. Recuperação da culturabilidade de células no estado VNC

As bactérias que entram no estado VNC podem tornar-se novamente cultiváveis, caracterizando este estado como reversível. Roszak, Grimes e Colwell utilizaram pela primeira vez, em 1984, o termo ressuscitação para descrever a recuperação de células não cultiváveis de *Salmonella Enteritidis* em caldo infusão

cérebro coração (BHI) (LI *et al.*, 2014). Desde então, pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de reativar *Salmonella* e outros patógenos no estado VNC.

De acordo com Li *et al.* (2014), um dos primeiros impasses que os pesquisadores encontraram quando realizaram estudos de ressuscitação em uma amostra foi a dificuldade de diferenciar a recuperação de células VNC, das células cultiváveis de crescimento normal. Ainda não existem métodos prontamente disponíveis para distinguir células não cultiváveis que ressuscitaram daquelas de crescimento normal, depois da exposição a um estímulo. Em estudos de ressuscitação, o ideal é que na amostra haja maior porção de células no estado VNC. Entretanto, a ausência completa de células cultiváveis não pode ser garantida por causa dos limites de detecção das técnicas. Geralmente, os experimentos de ressuscitação são conduzidos quando o número de células cultiváveis chega a nível indetectável, enquanto o número de células no estado VNC permanece alto (BIOSCA *et al.*, 1996; CAPPELIER *et al.*, 1999; CHAVEERACH *et al.*, 2003).

A recuperação da culturabilidade de várias espécies pode dar-se apenas com a retirada do estresse que levou à indução ao estado VNC (LI *et al.*, 2014). No entanto, existem muitos organismos que entram no estado VNC para os quais ainda não foi identificada uma condição de reativação (AYRAPETYAN e OLIVER, 2016). Vários estudos mostraram que moléculas de sinalização presentes no ambiente podem ajudar na recuperação de células VNC (NICHOLS *et al.*, 2008; BARI *et al.*, 2013; AYRAPETYAN, WILLIAMS e OLIVER, 2014). Investigações recentes revelaram que a sinalização por auto-indutores de *quorum-sensing* podem reativar espécies de vibrios em estado VNC (BARI *et al.*, 2013; AYRAPETYAN, WILLIAMS; OLIVER, 2014).

Em *Salmonella* Typhimurium, a adição de Tween 20 (3 %) ou catalase (1 %), permitiu células no estado VNC virem a ser novamente cultiváveis dentro de 24 a 48 h (ZENG *et al.*, 2012). Morishige, Fujimori e Amano (2013) apontaram o piruvato de sódio como molécula-chave no processo de recuperação de *Salmonella* Enteritidis. Asakura *et al.* (2002) recuperaram células de *Salmonella* Oranienburg, que foram induzidas ao estado VNC em lula processada desidratada, inoculando-as em ratos tratados com morfina. As células ressuscitadas permaneceram virulentas como evidenciado pelos estudos com modelo animal. Jolivet-Gougeon *et al.* (2006), após tratarem células de *Salmonella* Typhimurium com ácido peracético, notaram que as

células perderam a culturabilidade, mas mantiveram a viabilidade e a virulência, o que foi demonstrado por ensaios de invasão de células HeLa.

Nicolò *et al.* (2011) contaminaram intencionalmente suco de toranja para determinar se bactérias patogênicas podiam entrar no estado de VNC. *Salmonella* Typhimurium e *S. flexneri* perderam a culturabilidade, mas mantiveram a viabilidade e foram capazes de reativar em água peptonada tamponada e em caldo tripton de soja tamponado fosfatado, após a entrada no estado VNC. Além disso, *S. flexneri* ainda foi capaz de formar colônias após 48 h de recuperação. Rahman *et al.* (1996) estudaram o potencial de virulência de *S. dysenteriae* tipo 1 em estado VNC e os resultados mostraram que este patógeno não apenas manteve o gene *stx* e a toxina shiga biologicamente ativos, mas também permaneceu capaz de se aderir às células Henle 407. Estes resultados mostram que as células VNC de *S. dysenteriae* tipo 1 retêm vários fatores de virulência e permanecem potencialmente virulentas se tornando um problema de saúde pública.

Portanto, a ressuscitação de células em estado VNC é uma preocupação de segurança alimentar porque o contaminante neste estado, não é detectado por análises microbiológicas convencionais e pode encontrar os estímulos para recuperação durante as etapas de produção de alimentos e após o consumo do produto (PINTO *et al.*, 2011).

O sucesso dos experimentos de recuperação é, também, dependente da idade da célula em estado VNC. Existe uma hipótese nomeada de “janela de ressuscitação”, que é definido como o período de tempo em que as células VNC podem ressuscitar em resposta ao estímulo dado para sua recuperação. O período de duração desta janela vai depender da espécie de micro-organismo bem como do tipo de estresse que levou a indução. Quanto maior o tempo de exposição do micro-organismo ao estresse que levou a indução, menores as chances de recuperação, isto pode justificar alguns relatos de baixa recuperação na literatura (PINTO, SANTOS e CHAMBEL, 2013).

Apesar de não haver relatos de sucessos na recuperação de células no estado VNC em condições anaeróbias, células estressadas já foram recuperadas com o uso desta condição. Xavier e Ingham (1993) conseguiram recuperar quantidade maior de células de *Salmonella* Enteritidis injuriadas pelo calor quando o meio utilizado para enumeração foi incubado sob condições de anaerobiose estrita. Ugborogho e Ingham

(1994) mostraram a mesma correlação em células de *Staphylococcus aureus* estressadas pelo calor. Estes autores justificaram que a exposição de certas bactérias ao tratamento térmico subletal inativa enzimas como a catalase (Kat) e superóxido dismutase (Sod), conseqüentemente estas bactérias podem não ser capazes de sobreviver no ambiente aeróbio, mas podem ser capazes de sobreviver em condições anaeróbias. Isto se deve ao fato de que a condição anaeróbia de cultivo remove todos os traços de oxigênio, que é o precursor de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, o metabolismo das células estressadas será mudado, o que pode levar a melhor recuperação (UGBOROGHO e INGHAM, 1994; STEPHENS, DRUGGAN e NEBE-VON CARON, 2000).

Dentre as ROS que são destacadas como elementos importantes na resposta bacteriana ao estresse oxidativo, estão o superóxido, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila. O radical hidroxila é mais nocivo às células, pois durante o estresse oxidativo, se a acumulação intracelular não for controlada, este radical pode levar a danos em moléculas como ácidos nucleicos, proteínas carboniladas e lipídeos peroxidados. Normalmente, enzimas como as superóxido dismutase (SodA, SodB, SodC), alquil-hidroperóxido redutase (AhpCF) e catalase (KatG, KatE) são utilizadas pelas bactérias para desintoxicar dos ROS e todas estas classes de enzimas já foram descritas em *Salmonella*. Além disso, outras proteínas tais como os reguladores SoxRS, os ativadores de transcrição OxyRS, e regulons SOS, atuam para proteger bactérias do estresse oxidativo. No entanto, as bactérias também podem usar ROS para se autodestruir, a depender da gravidade do estresse oxidativo (ZHAO e DRLICA, 2014).

Alguns trabalhos demonstraram que a esterilização de meios de cultura por calor úmido pode gerar ROS, quantidades significativas de H_2O_2 e ainda, compostos a partir dos nutrientes presentes que não são assimiláveis pelos micro-organismos, principalmente quando os meios de cultura são compostos de açúcares redutores na presença de fosfatos (LEWIS, 1930; BAUMGARTNER, 1938; FINKELSTEIN, LANKFORD e HILL, 1957; CARLSSON, NYBERG e WRETHEN, 1978; NAKASHIMA *et al.*, 2010). Stephens, Druggan e Nebe-Von Caron (2000) relataram que vários eventos podem levar à oxidação dos meios de cultura tais como a exposição à luz, ao oxigênio e a temperaturas elevadas, o que pode gerar dificuldade de recuperação de células no estado VNC.

Os impasses encontrados na literatura sobre se um meio rico ou mínimo é melhor para recuperar células podem ser explicados por diferentes fatores que influenciam o desempenho do meio. Finkelstein, Lankford e Hill (1957), ao estudarem o efeito da autoclavagem em um meio composto por NH_4^+ , glutamato e sacarose em presença de suplementos de glicose e fosfato apresentaram que um fator (ou fatores) tóxico para bactérias é formado e que este mesmo fator está presente durante a esterilização por calor em soluções neutras de glicose e fosfato.

Stephens, Druggan e Nebe-Von Caron (2000) encontraram uma correlação razoável entre o alto teor de açúcar e a má recuperação de células estressadas de *Salmonella* Typhimurium ao testarem diferentes fontes de peptona durante a etapa de pré-enriquecimento do método padrão utilizado para isolamento de *Salmonella*. O fraco desempenho de recuperação foi associado à geração de ROS por meio da auto oxidação dos açúcares redutores.

Carlsson, Nyberg e Wrethen (1978) utilizaram 14 diferentes tipos de caldos autoclavados sob condições anaeróbias para estudar o efeito da formação de ROS após a exposição dos meios de cultura ao oxigênio atmosférico. Neste estudo, apenas os meios que continham glicose e fosfato apresentaram uma tendência em acumular H_2O_2 . Além disso, uma solução de glicose e fosfato, com pH superior a 6,5, auto oxidou depois de ter sido aquecida a 120 °C durante, pelo menos, 5 min. A adição de Sod diminuiu a taxa de auto oxidação da maioria dos meios, o que indicou que os radicais superóxido foram gerados nestes meios. Nakashima *et al.* (2010) também verificaram que o ânion superóxido foi gerado a partir de alguns meios de laboratório convencionais, tais como, caldo nutriente, caldo de soja tríplico e caldo Mueller Hinton, bem como, em meio composto de extrato de carne, peptona e glicose, sendo este último o que apresentou a mais elevada geração de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, embora a presença de oxigênio singlete não tenha sido detectada.

Somado a isso, alguns trabalhos discutiram ainda a geração de ROS em meios sólidos. Tanaka *et al.* (2014) obtiveram maior contagem de *Gemmatimonas aurantiaca* T-27 quando esta espécie foi inoculada em um meio cuja fonte de fosfato e ágar foram autoclavados separadamente. A análise química do meio com ágar que tinha sido autoclavado junto com a fonte de fosfato revelou que a presença do H_2O_2 contribuiu para a inibição do crescimento.

Considerando esta indicação de que a formação de ROS afeta a reativação de células, agentes antioxidantes que possuem efeito sobre os radicais de oxigênio ou reduzem os riscos da sua produção vêm sendo adicionados aos meios de cultura para proteger as bactérias sensíveis e, então auxiliar na recuperação de células estressadas, injuriadas ou em estado VNC. Células neste estado, quando em condições favoráveis de recuperação, como em ambiente rico em nutrientes podem apresentar desequilíbrio entre anabolismo e catabolismo, levando à produção intracelular de radicais livres podendo ser recuperadas na presença de agentes degradadores de ROS (PINTO *et al.*, 2011). Entre estes agentes encontram-se a enzima catalase (GUPTE, DE REZENDE e JOSEPH 2003; ZENG *et al.*, 2012), enzima oxyrase (REISSBRODT *et al.*, 2002), piruvato de sódio (MORISHIGE, FUJIMORI e AMANO, 2013) e ferroxamina E (REISSBRODT *et al.*, 2000, 2002).

Resultados obtidos com *Vibrio vulnificus* levaram à hipótese de que a catalase pode ser crítica para a capacidade deste micro-organismo crescer em meio complexo e que a entrada no estado VNC pode refletir na perda da atividade desta enzima nas células submetidas a baixas temperaturas (SIDES, HITE e OLIVER, 1999; BOGOSIAN *et al.*, 2000). Masmoudi, Denis e Maalej (2010) compararam o comportamento de *S. aureus* em microcosmos de água do mar a 4 °C e 22 °C utilizando mutantes deficientes em KatA ou SodA para investigar o possível envolvimento do estresse oxidativo na perda da culturabilidade a baixa temperatura. As linhagens mutantes foram hipersensíveis ao estresse da água do mar a 4 °C e as células de tipo selvagem perderam a atividade da catalase, o que parece ter sido, em parte, responsável pela perda de culturabilidade e pela entrada no estado VNC. Em desacordo com o que ocorre com as principais bactérias gram-negativas, os autores sugerem que houve aumento de ROS endógeno, em ambas as estirpes de *S. aureus*, gerados durante o processo de sobrevivência no microcosmo. A falta de recuperação não estava ligada à potencial presença de concentrações baixas de ROS nos meios de cultura, pois quando se adicionou katA ou SodA aos meios, não foi detectado qualquer aumento na contagem do número de células viáveis.

Estudos como estes fornecem evidências de que tanto o envolvimento de ROS, exógeno ou endógeno, quanto a diminuição da atividade das enzimas responsáveis por sua neutralização, podem impedir a recuperação da culturabilidade de algumas bactérias em VNC. Além disso, o processo de recuperação da culturabilidade envolve

uma série de fatores tais como, a espécie do micro-organismo, o tempo de permanência em estado VNC, as condições de indução, além de fatores diversos no processo de recuperação (PINTO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014).

Diante da importância de enterobactérias VNC no contexto da segurança alimentar, este trabalho teve como objetivos a obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis e *S. flexneri* no estado VNC por estresse osmótico e oxidativo como principais condições para indução; a avaliação da influência de ROS intracelular na entrada das células no estado VNC; e a utilização de diferentes condições para recuperação da culturabilidade de *Salmonella* e *Shigella* em VNC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégia experimental

A estratégia experimental empregada neste estudo para induzir células de *Salmonella* e *Shigella* a entrarem no estado VNC e, posteriormente, realizar sua recuperação está ilustrada na Figura 1 e a descrição detalhada dos experimentos realizados encontra-se ao longo de todo tópico 3.

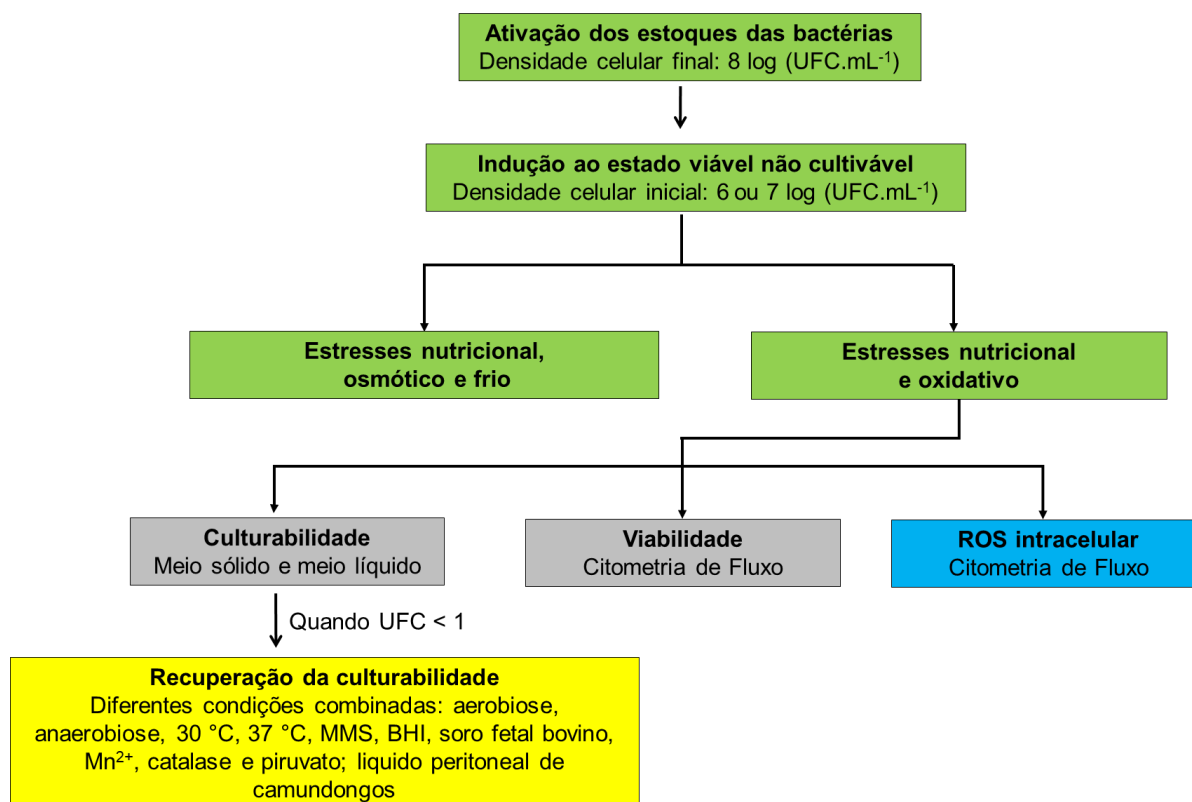


Figura 1 - Estratégia experimental utilizada para indução e recuperação de células VNC de *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a. As diferentes etapas estão codificadas pelas cores: verde – obtenção de células VNC, cinza - avaliação da entrada no estado VNC, azul - avaliação do estresse oxidativo intracelular causado pelo estresse de indução, amarelo – recuperação da culturabilidade de células VNC. Legenda: MMS – meio mínimo de sais; BHI – caldo infusão cérebro-corção, Mn²⁺ - íon manganês, UFC – unidade formadora de colônia.

3.2. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo

Duas espécies de enterobactérias foram utilizadas para indução ao estado VNC: *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a. As culturas pertenciam à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Universidade Federal de Viçosa - UFV, Brasil) e foram estocadas em caldo Luria Bertani (Himedia, Índia) acrescido de glicerol (20 %) e armazenadas a - 80 °C até o momento da

realização dos experimentos.

3.3. Indução do estado viável não cultivável (VNC)

3.3.1. Ativação dos estoques

As culturas em estoque foram inicialmente inoculadas em 5 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI, Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, foi realizada uma segunda reativação em ágar padrão para contagem (PCA, Sigma, Espanha) e posterior incubação a 37 °C por 24 h. Após esse período, uma colônia de cada espécie foi transferida para 10 mL de caldo BHI, seguido de incubação a 37 °C por 18 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 3000 *g* durante 20 min a 4 °C (Centrífuga 4k 15, Sigma, Alemanha), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de solução salina 0,85 %. Em seguida, foram retirados 100 µL da suspensão celular e reinoculados em 10 mL de caldo BHI. As culturas foram, então, incubadas a 37 °C por cerca de 3 h, o que correspondeu a população final de, aproximadamente, 8 log (UFC.mL⁻¹). Após atingirem a fase estacionária de cultivo, as células foram centrifugadas a 3000 *g* por 20 min a 4 °C e ressuspendidas em solução salina 0,85 %. Este procedimento foi repetido quatro vezes, para garantir que as alíquotas de células a serem induzidas ao estado VNC não estivessem com resíduos de nutrientes provenientes do meio de cultivo. Por fim, as células coletadas por centrifugação foram ressuspendidas em solução salina 0,85 %, o que correspondeu ao inóculo inicial utilizado nos experimentos subsequentes.

3.3.2. Condições de estresses

Alíquotas de 1 mL da suspensão de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a em solução salina 0,85 %, foram utilizadas para inocular 100 mL de solução de tampão de Butterfield (BPS, 7,35 mM KH₂PO₄) acrescido de 1,2 M de NaCl, caracterizando assim as condições de estresses nutricional e osmótico para as células. Além disso, essas células foram submetidas ao estresse pelo frio a 4 ± 1 °C durante o período de indução.

Outras condições de estresses empregadas para indução ao estado VNC foram o estresse nutricional e oxidativo. Para isso, foram adicionados 10 mL da suspensão

bacteriana, preparada conforme descrito no item 3.3.1, em 100 mL de solução salina 0,85 %, acrescida com 10 mM de H₂O₂ P. A. (VETEC, Brasil). Durante a indução com H₂O₂, as células ficaram armazenadas a 25 °C.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições independentes e quatro tratamentos no total (Tabela 1).

Tabela 1 – Tratamentos de indução ao estado VNC em DIC

Sorovares	Estresses
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578	BPS + NaCl 1,2 M + 4 °C
	NaCl 0,85% + H ₂ O ₂ 10 mM + 25 °C
<i>S. flexneri</i> 2a	BPS + NaCl 1,2 M + 4 °C
	NaCl 0,85% + H ₂ O ₂ 10 mM + 25 °C

3.4. Avaliação da culturabilidade

Para a determinação da culturabilidade em meio líquido, alíquotas de 5 mL das suspensões de células de enterobactérias mantidas em BPS acrescido de 1,2 M de NaCl foram inoculadas em 5 mL de caldo BHI duas vezes concentrado. Foi avaliada também, a perda da culturabilidade por plaqueamento em profundidade em PCA. Os tubos e placas foram incubados a 37 ± 1 °C por um período mínimo de 96 h. Este procedimento foi realizado a cada 30 dias até não se observar visualmente o crescimento microbiano.

A culturabilidade das células submetidas ao tratamento com H₂O₂ foi também determinada pelo cultivo de 5 mL da suspensão de células estressadas em 5 mL de caldo BHI duas vezes concentrado e, por plaqueamento em profundidade utilizando triptona soja ágar (TSA, Himedia, Índia). O monitoramento da perda da culturabilidade foi realizado a cada 15 min durante as duas e três primeiras horas de indução, respectivamente para *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a e, com intervalos iguais ou maiores que 60 min, após este período inicial de indução. O experimento foi feito em três repetições independentes e a média foi usada para traçar a curva de sobreviventes.

3.5. Determinação da viabilidade

A determinação da viabilidade das células de enterobactérias foi realizada em

citometro de fluxo BD FACSVerser (BD Biosciences, Estados Unidos) equipado com dois lasers com comprimentos de onda de excitação de 488 nm (azul) e 633 nm (vermelho). A população de bactérias foi detectada com base nas propriedades intrínsecas das células de espalhamento de luz (FSC – tamanho e SSC – complexidade celular). Ao realizar a leitura das amostras, foram feitos ajustes de escala de área, padronizados em log e, a determinação da população de interesse analisada na amostra foi selecionada com auxílio da ferramenta *gate* do *software*. As representações gráficas de cada *gate* foram construídas. O fluxo utilizado para a leitura das amostras foi o médio, equivalente a 60 µL por minuto e o número de eventos total observado foi de 50.000 em toda alíquota amostral.

Os volumes das amostras de células, em tratamentos de indução ao estado VNC, coletados para leitura no citômetro variou de 300 a 500 µL. Diluições apropriadas foram preparadas para que a concentração final de células, no momento das análises no citômetro, fosse de 5 a 6 log (UFC.mL⁻¹). Por fim, a cada amostra, adicionou-se 10 µM de iodeto de propídio (PI, Invitrogen Corporation, Estados Unidos), deixando-o agir durante 5 min antes da leitura.

As análises de citometria foram realizadas em triplicata e os dados obtidos com relação ao tempo máximo de leitura, número total de eventos e porcentagem de células vivas e mortas nas *gates* desenhadas foram utilizados para calcular o número total de células nas amostras, o número total de células mortas (marcadas com PI) e o número total de células viáveis (não marcadas com PI).

A viabilidade das células mantidas em BPS acrescido de 1,2 M de NaCl foi monitorada a cada 30 dias e, das células mantidas em solução salina 0,85% acrescida de 10 mM de H₂O₂, após dois e 13 dias.

3.6. Avaliação do estresse oxidativo intracelular

A avaliação da presença de ROS intracelular foi feita em células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a em fase estacionária de crescimento e em células das mesmas espécies em estado VNC. As células que entraram em estado VNC em BPS, acrescido de 1,2 M de NaCl estavam a 259 dias sob os estresses e, aquelas que foram induzidas em VNC pelo estresse em solução salina 0,85% acrescida de 10 mM de H₂O₂, estavam a dois dias sob os estresses. O volume de 1 mL dessas células foi, inicialmente, centrifugado a 16.900 *g* durante 20 min a 4 °C (Centrífuga 5418 R,

Eppendorf, Alemanha). As células coletadas foram ressuspensas em solução salina 0,85 % e diluídas até a concentração final de 5 ou 6 log (UFC.mL⁻¹) e preparadas para a detecção da presença de espécies relacionadas com o estresse oxidativo.

Inicialmente, foi adicionado 300 nM de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Adrich, Israel), corante de detecção do estresse oxidativo, a um volume de 1,5 mL das amostras, previamente diluídas. As amostras foram, então, homogeneizadas e subdivididas em três alíquotas de 500 µL. Em uma alíquota, foi realizado o controle negativo, adicionando-se 5 mM de N-acetil L-cisteína (NAC, Sigma-Adrich, China), inibidor de ROS, seguido de incubação por, no mínimo, 30 min antes do ensaio de adição do indutor. Em outra alíquota, o controle positivo, adicionou-se 500 µM de piocianina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), indutor de ROS, seguido de incubação por, no mínimo, 30 min no escuro, com agitação periódica antes da análise. Por fim, a terceira alíquota foi destinada a detecção de ROS relacionadas com o estresse oxidativo intracelular proveniente das condições de estresses na quais as amostras se encontravam.

Posteriormente, foi adicionado às amostras que estavam sem o indutor e sem o inibidor, 10 µM de PI e, após 5 min, foi verificada a viabilidade das células utilizadas nesse ensaio. Após a realização das leituras em citômetro de fluxo, também, foi adicionado em algumas amostras 0,06 % de H₂O₂ para verificar se o DCFH-DA estava, de fato, oxidando dentro das células.

A detecção do estresse oxidativo intracelular e da viabilidade celular foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Verse. O fluxo utilizado para leitura das amostras foi o baixo, que corresponde 12 µL por minuto e o número de eventos total observados foi de 10.000 na população selecionada pela *gate*.

O experimento foi conduzido com três repetições independentes.

3.7. Recuperação da culturabilidade

3.7.1. Recuperação de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em estresse nutricional, osmótico e frio

As células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em BPS, acrescido de 1,2 M de NaCl, foram submetidas a diferentes tratamentos de recuperação da culturabilidade. Antes da inoculação das células VNC em meios de cultura que consistiram de diferentes tratamentos, o volume de 1 mL da suspensão de células em

VNC foi centrifugado a 7.900 *g* durante 20 min a 4 °C (Centrífuga 4k 15, Sigma-Aldrich, Alemanha) e as células ressuspensas em 300 µL de solução salina 0,85 %, sendo esta, a alíquota adicionada em cada tubo de ensaio com 3 mL de meio de cultivo. Os tubos foram incubados durante um período mínimo de 15 dias e, a cada dia, foi avaliado o crescimento celular caracterizado pela observação visual do meio.

Em todos os tratamentos de recuperação realizados, foram feitos controles positivos, os quais consistiam de células cultiváveis de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 inoculadas nos meios, com a finalidade de verificar se o tratamento aplicado não inibia o crescimento das células com metabolismo normal. Controles negativos também foram feitos, utilizando 300 µL de solução salina 0,85% ao invés da suspensão de células.

Um dos experimentos de recuperação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) sendo um fatorial 2⁵ no qual cinco fatores (expoentes) tiveram dois níveis (base), resultando assim em 32 combinações, que constituíram os tratamentos, com três repetições biológicas independentes e cinco unidades experimentais de cada repetição biológica. Os seguintes fatores e níveis (entre parênteses) foram combinados: 1. meio de cultivo líquido (BHI e MMS, Meio Mínimo de Sais 5X – HiMedia Laboratórios, Índia), 2. método de esterilização do meio (filtração e calor úmido 121 °C/15 min), 3. temperatura de incubação (30 °C e 37 °C), 4. condição atmosférica (aerobiose e anaerobiose) e 5. agentes de recuperação (10 mM de piruvato de sódio, Merck, Alemanha / 2,5 mM de Mn²⁺ do sulfato de manganês, Vetec, Brasil).

Ensaio em DIC, também, foram feitos utilizando catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como agente de recuperação, adicionado no meio de cultura esterilizado por filtração, em membrana com 0,22 µm (Millipore Express, China). O meio de cultivo e a temperatura de incubação variaram conforme demonstrado na Tabela 2. Este experimento foi conduzido em três repetições biológicas independentes com quatro unidades experimentais de cada repetição biológica.

Tabela 2 - Tratamentos de recuperação de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 VNC com catalase, em meio líquido esterilizado por filtração e em condição de aerobiose

Tratamentos	Meio de cultivo + 0,2% de catalase	Temperatura / tempo de incubação
1	BHI	30 °C
2	MMS	30 °C
3	BHI	37 °C
4	MMS	37 °C
5	BHI	45 °C / 2 h e 37 °C / 15 dias
6	MMS	45 °C / 2 h e 37 °C / 15 dias

Além destes tratamentos de recuperação, foram ainda realizados experimentos utilizando soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, Australia) na tentativa de recuperar a viabilidade das células de *Salmonella* VNC. Os tratamentos utilizados para recuperação com o soro fetal bovino estão listados na Tabela 3. O experimento foi conduzido em DIC com três repetições biológicas e com uma unidade experimental de cada repetição biológica.

Tentativa adicional de recuperação das células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi feita usando ensaios com líquido fresco da cavidade peritoneal de camundongos, gentilmente cedido pelo professor Dr. Leandro Licursi de Oliveira do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Para a coleta do líquido foram, inicialmente, injetados via intraperitoneal, cerca de 5 mL de solução salina 0,85 % e, após a lavagem da região do peritônio, o líquido foi centrifugado a 11.600 g durante 10 min a 25 °C (Centrífuga 4k 15, Sigma-Aldrich, Alemanha). O sobrenadante foi, então, descartado e o sedimento celular ressuspenso em 2 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Um volume de 100 µL da suspensão obtida foi colocado em contato, por cerca de 1 h a 37 °C, com uma suspensão de 3 mL de células VNC concentradas por centrifugação (7.900 g durante 20 min a 4 °C), ressuspenso em 500 µL de DMEM. Após o período de incubação, duas alíquotas de 200 µL da mistura foram plaqueadas em superfície em PCA e o restante do volume de

aproximadamente, 200 µL, foi inoculado em 3 mL de caldo BHI. A incubação foi por, no mínimo, 5 dias a 37 °C. O experimento foi conduzido com três repetições independentes e, em cada repetição, utilizou-se triplicata das células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Como controle positivo, foram usadas células cultiváveis de *Salmonella* Enteritidis. Durante a execução dos experimentos foram feitos também, controles negativos, os quais consistiram da inoculação, em PCA e em caldo BHI, de 200 µL da suspensão obtida a partir do líquido peritoneal centrifugado.

Tabela 3 – Tratamentos de recuperação de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 VNC com soro fetal bovino a 37 °C

Tratamentos	Meio de cultivo	Agente antioxidante	Condição atmosférica
1	soro fetal bovino	ausente	Anaerobiose
2	MMS* + 10 % de soro fetal bovino	ausente	Anaerobiose
3	MMS + 10 % de soro fetal bovino	piruvato de sódio 10 mM	Anaerobiose
4	soro fetal bovino	piruvato de sódio 10 mM	Anaerobiose
5	soro fetal bovino	ausente	Aerobiose
6	MMS + 10 % de soro fetal bovino	ausente	Aerobiose
7	MMS + 10 % de soro fetal bovino	piruvato de sódio 10 mM	Aerobiose
8	soro fetal bovino	piruvato de sódio 10 mM	Aerobiose

*MMS esterilizado por autoclavagem.

Alíquotas dos meios de cultura com indicação de crescimento bacteriano nos diferentes tratamentos de recuperação foram estriadas em meios seletivos para *Salmonella*, tais como ágar de desoxicolato-lisina-xilose (XLD, Oxoid, Inglaterra) e, ou em meio cromogênico para *Salmonella* (ágar Rambach®, Merck, Alemanha).

3.7.2. Recuperação de *Salmonella* Enteritidis e *S. flexneri* em estresse nutricional e oxidativo

Os ensaios de recuperação de células em estado VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a sob estresses nutricional e oxidativo foram conduzidos da mesma forma descrita no item 3.7.1. Os tratamentos utilizados para

recuperar estas enterobactérias estão detalhados na tabela 4. O experimento foi conduzido em DIC, com três repetições biológicas independentes e duas unidades experimentais em cada repetição biológica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Entrada no estado VNC com estresses osmótico e oxidativo

Salmonella Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a apresentaram comportamento típico de entrada no estado VNC, isto é, manutenção da viabilidade e decréscimo da culturabilidade (Figura 2 A e B).

Os parâmetros de culturabilidade e viabilidade de ambas as bactérias foram acompanhados por um período de, aproximadamente, 280 dias sob as condições de estresses nutricional, osmótico e frio. Constatou-se comportamento diferente das enterobactérias quanto à entrada no estado VNC (Figura 2 e Tabela 5). Neste estudo, somente *Salmonella* Enteritidis PT4 578 perdeu culturabilidade na alíquota analisada, sendo assim considerado o único patógeno a entrar completamente no estado VNC. O número de células cultiváveis decresceu na população de, aproximadamente, 6 log (UFC.mL⁻¹) para 0 log (UFC.mL⁻¹) em 62 dias em PCA (Figura 2) e, após 133 dias de indução, também não foi mais observado o crescimento em caldo BHI (Tabela 5). Por outro lado, células de *S. flexneri* 2a, ainda apresentaram culturabilidade em ambos os meios utilizados para detecção de crescimento após 277 dias de manutenção dos estresses nutricional, osmótico e frio (Tabela 5).

A perda da culturabilidade de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi detectada inicialmente em PCA. Isto pode ser justificado, como discutido em alguns trabalhos, pela possível presença de H₂O₂ em meios com ágar e atividade reduzida, em células no estado VNC, das enzimas responsáveis pela sua neutralização. Essa evidência foi mostrada no trabalho de Kong *et al.* (2004) que geraram um mutante *oxyR* de *V. vulnificus* que não tinha atividade de catalase e, conseqüentemente, não crescia em meio sólido, devido a presença de H₂O₂. Além disso, estes autores conseguiram demonstrar que na estirpe selvagem, a incubação a baixa temperatura resultou em perda da atividade da catalase, tornando as células sensíveis ao H₂O₂, concomitantemente com a perda de culturabilidade e entrada em estado VNC.

Tabela 4 – Tratamentos de recuperação de células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a sob estresses nutricional e oxidativo

Tratamentos	Meio de cultivo	Agente de recuperação	Condição atmosférica	Método de esterilização	Temperatura de incubação (°C)
1	BHI	ausente	aerobiose	filtração	30
2	BHI	catalase 1%	aerobiose	filtração	30
3	BHI	piruvato de sódio 10 mM	aerobiose	filtração	30
4	BHI	ausente	aerobiose	filtração	37
5	BHI	catalase 1%	aerobiose	filtração	37
6	BHI	piruvato de sódio 10 mM	aerobiose	filtração	37
7	BHI	ausente	anaerobiose	filtração	30
8	BHI	catalase 1%	anaerobiose	filtração	30
9	BHI	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	filtração	30
10	BHI	ausente	anaerobiose	filtração	37
11	BHI	catalase 1%	anaerobiose	filtração	37
12	BHI	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	filtração	37
13	BHI	ausente	anaerobiose	calor úmido	30
14	BHI	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	calor úmido	30
13	BHI	ausente	anaerobiose	calor úmido	37
14	BHI	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	calor úmido	37
15	MMS	ausente	aerobiose	filtração	30
16	MMS	catalase 1%	aerobiose	filtração	30
17	MMS	piruvato de sódio 10 mM	aerobiose	filtração	30
18	MMS	ausente	anaerobiose	filtração	37
19	MMS	catalase 1%	anaerobiose	filtração	37
20	MMS	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	filtração	37
21	MMS	ausente	anaerobiose	calor úmido	30
22	MMS	piruvato de sódio 10 mM	anaerobiose	calo úmido	30

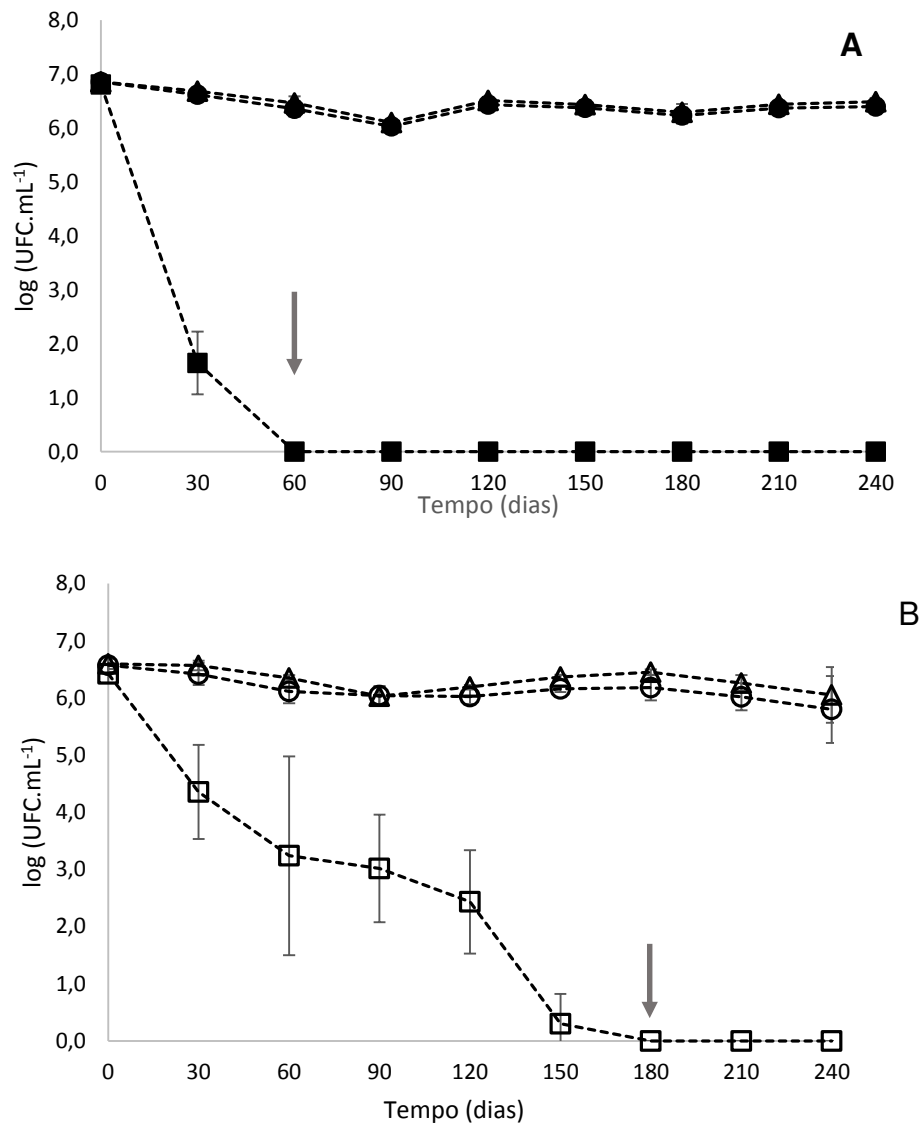


Figura 2 - *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (A) e *S. flexneri* 2a (B) sob estresses nutricional, osmótico e frio. Perda da culturabilidade (quadrado), população de células viáveis (círculo) e população total de células (triângulo). A perda da culturabilidade foi determinada em PCA por plaqueamento em profundidade e as populações de células viáveis e total foram determinadas por citometria de fluxo. As setas cinzas indicam o limite de detecção da técnica de plaqueamento em profundidade de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (quadrado preenchido) e *S. flexneri* 2a (quadrado não preenchido).

Tabela 5 - Perda da culturabilidade de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S.flexneri* 2a nos diferentes tratamentos de indução ao estado VNC.

Meios de cultura	Tratamentos: BPS + 1,2 M de NaCl + 4 °C	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578	<i>S. flexneri</i> 2a
PCA	62 dias	cultivável após 277 dias
Caldo BHI	133 dias	cultivável após 277 dias
Meios de cultura	Tratamentos: Solução salina 0,85% + 10 mM de H ₂ O ₂ + 25 °C	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578	<i>S. flexneri</i> 2a
TSA	entre 2 e 3 h	entre 3 e 4 h
Caldo BHI	< 5 min	4 h

A indução de *Salmonella* ao estado VNC em condições semelhantes e por tempo aproximado ao encontrado neste estudo foi também relatada em alguns trabalhos. Mendes (2009) obteve células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578, após 120 dias, ao realizar indução em tampão BPS com 0,7 M de NaCl a 4 °C, enquanto na presença de 0,6 M de NaCl, Rodrigues *et al.* (2015) relataram um período de 180 dias para obtenção de células VNC. Na presença de 1,2 M de NaCl, Salive (2016) detectou a perda da culturabilidade deste patógeno em caldo BHI após 168 dias de indução. Células de *Salmonella* Typhimurium foram induzidas ao estado VNC em águas residuais a 15 °C e 28 °C e perda a culturabilidade foi observada em um período de 150 a 200 dias (OLIVER, DAGHER e LINDEN, 2005). Gupte, De Rezende e Joseph (2003) obtiveram *Salmonella* Typhimurium DT104 no estado VNC sob estresse nutricional e frio em 273 dias. Nesse trabalho, os autores concluíram que o tempo necessário para que as células de *Salmonella* Typhimurium DT104, sob estresse nutricional, se tornassem não cultiváveis foi maior do que se tinha observado anteriormente com outras bactérias entéricas gram-negativas, tempo similar ao observado neste trabalho para *S. flexneri* 2a.

As análises realizadas por citometria de fluxo demonstraram que, mesmo após a ausência de crescimento nos meios de cultura convencionais, foi possível verificar que, parte da população ainda mantinha viabilidade, uma vez que a maioria das células não foi marcada com PI (Figura 3). Além disso, ainda com relação à viabilidade, o comportamento de ambas as enterobactérias também apresentou diferenças ao longo do período de análises.

Nas primeiras 48 h de exposição aos estresses de indução, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a não apresentaram diferenças entre o percentual de células viáveis dentro da população analisada, com aproximadamente, 100 % de viabilidade (Figura 3 A e B). Com 240 dias de indução, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 manteve maior percentual de células viáveis do que *S. flexneri* 2a (Figura 3 G e H).

Os estresses nutricionais e oxidativo resultaram na entrada de ambos os patógenos em estado VNC. Entretanto, como observado anteriormente quando aplicados os estresses nutricional, osmótico e frio, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 perdeu culturabilidade em tempo inferior quando comparado com o tempo registrado para *S. flexneri* 2a (Figura 4 e Tabela 5).

A entrada em estado VNC em razão do estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ também foi relatada em outras bactérias. Kong *et al.* (2004) induziram células de *V. vulnificus* ao estado VNC com 2 mM de H₂O₂ e verificaram perda da capacidade de formação de colônias após 1 h de tratamento em mutantes *oxyR*. Asakura *et al.* (2005) utilizaram H₂O₂ 0,05 % (10 mM) para induzir *E. coli* O157:H7 ao estado VNC e verificaram que, após 6 h de tratamento, houve perda da culturabilidade em TSA com manutenção da viabilidade.

A perda da culturabilidade de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 exposta ao estresse oxidativo foi observada em caldo BHI, imediatamente após o contato com H₂O₂, mas a formação de colônias em TSA, foi detectada até 3 h após a indução. Isto pode ser atribuído a dois fatores: a composição dos meios, ou atividade inibitória residual de H₂O₂ quando as células foram inoculadas no caldo BHI. Os meios de cultura BHI e TSA apresentam composição nutricional diferente. A fonte de carbono principal do BHI é proveniente da glicose, ao passo que a do TSA vem dos aminoácidos e peptídeos (Oxoid Microbiology Products, Inglaterra; Himedia®, Índia). Sendo assim, o comportamento metabólico de *Salmonella* pode ser diferente nestes meios e isto inferiu com a culturabilidade do patógeno após o estresse oxidativo. Atividade inibitória residual de H₂O₂ pode ter impedido o crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 no caldo BHI, pois alíquota de 5 mL foi retirada diretamente da solução salina 0,85 %, adicionada de 10 mM de H₂O₂ e inoculada no caldo sem prévia neutralização do agente oxidante.

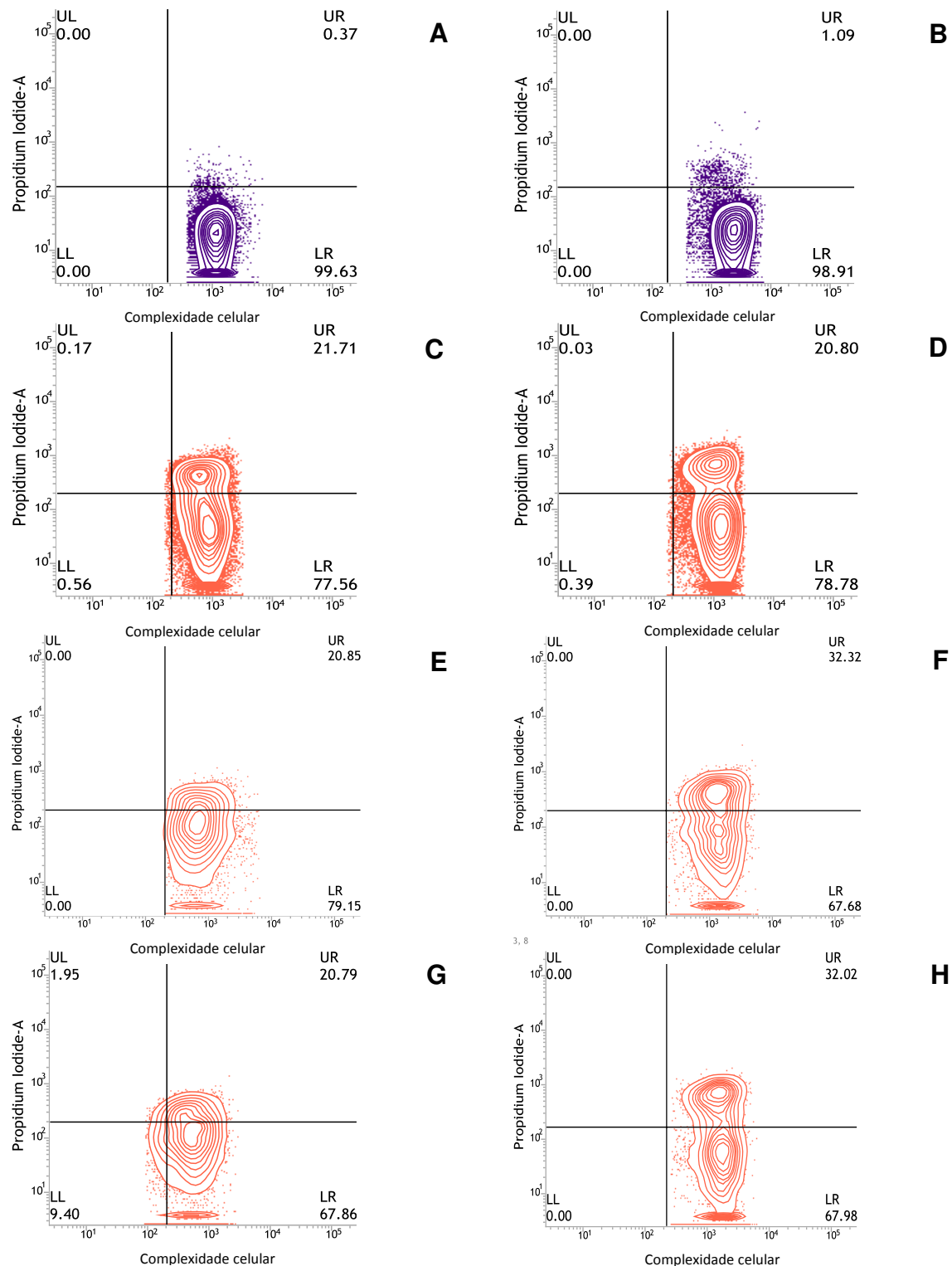


Figura 3 – Representação gráfica da população de células mortas e viáveis de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (A, C, E e G) e *S. flexneri* 2a (B, D, F, H) sob os estresses, nutricional, osmótico e frio. A e B após 2 dias de indução; C e D após 60 dias de indução; E e F após 120 dias de indução; G e H após 240 dias de indução. Análises realizadas por citometria de fluxo. Legenda: UL – porcentagem de células mortas lado superior esquerdo; UR - porcentagem de células mortas lado superior direito; LL – porcentagem de células viáveis lado inferior esquerdo; LR - porcentagem de células viáveis lado inferior direito.

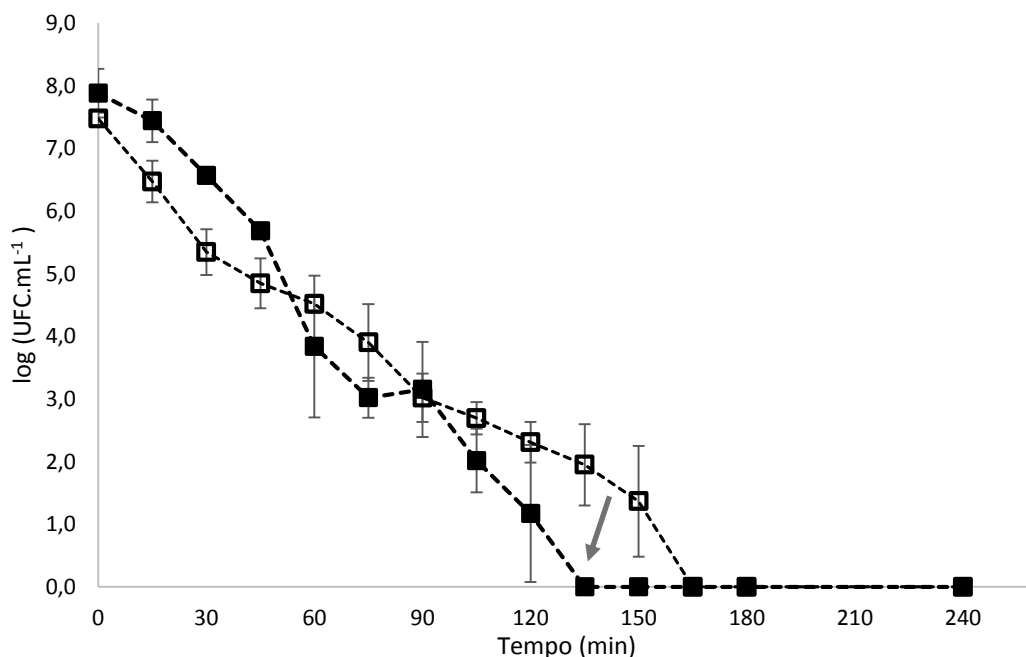


Figura 4 – Perda da culturabilidade, em TSA por plaqueamento em profundidade, de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (quadrado preenchido) e *S. flexneri* 2a (quadrado não preenchido) sob estresses nutricional e oxidativo. A seta cinza indica o limite de detecção da técnica.

Ambos os patógenos expostos ao estresse oxidativo apresentaram comportamento semelhante ao observado nos estresses nutricional, osmótico e frio. *Salmonella* Enteritidis PT4 578, embora tenha perdido culturabilidade primeiro, apresentou maior percentual de viabilidade (78,41 %) em relação a *S. flexneri* 2a (64,68 %) após a exposição ao estresse oxidativo promovido por 10 mM de H₂O₂ (Figura 5 C e D; Tabela 6).

Na tabela 6, pode-se verificar que, no período de dois até 13 dias após a entrada no estado VNC, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 apresentou maior redução na população de células viáveis quando comparado com *S. flexneri* 2a. Essas variações na população de células viáveis ou mortas em ambos patógenos no estado VNC, podem ser explicadas em parte, pela teoria do suicídio bacteriano. Muitas bactérias patogênicas possuem um sistema chamado PezAT, também conhecido como sistema épsilon / zeta, o qual é composto por uma toxina (PezT) e uma anti-toxina (PezA), responsáveis pelo suicídio celular, quando as condições são desfavoráveis à manutenção da viabilidade (MUTSCHLER *et al.*, 2011). Em condições estressantes, como estas utilizadas para indução ao estado VNC, é provável que a diminuição na população total seja para que os componentes celulares das bactérias mortas sirvam para manter níveis basais de atividade metabólica das células viáveis em VNC.

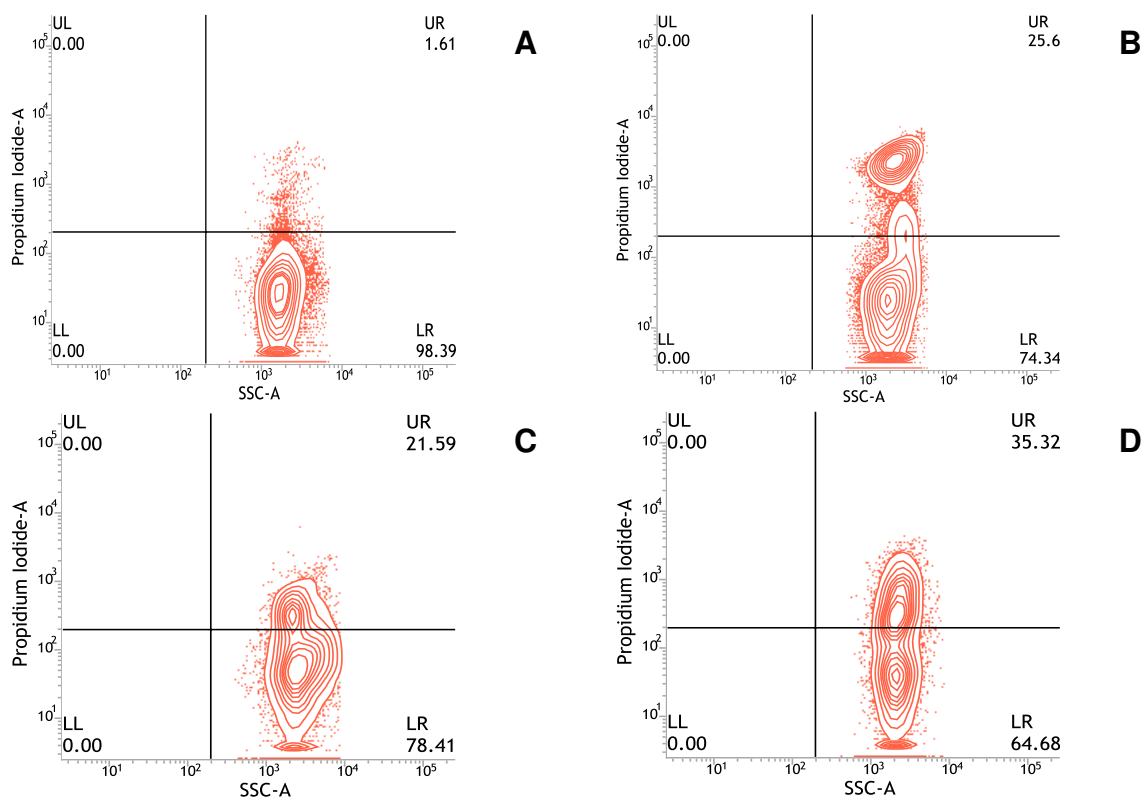


Figura 5 – Representação gráfica da população de células vivas e mortas de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (lado esquerdo) e *S. flexneri* 2a (lado direito) sob os estresses nutricional e oxidativo. A e B mostram a população de células após 2 dias de indução; C e D mostram a população de células após 13 dias de indução.

Tabela 6 – Perfil populacional de células VNC de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a, avaliado por citometria de fluxo após dois e 13 dias de indução sob os estresses nutricional e oxidativo.

Sorovares	Tempo após indução (dias)	Populações em log (UFC.mL ⁻¹)			Células viáveis (%)
		Total	Células viáveis	Células mortas	
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578	2	7,1 ± 0,3	7,1 ± 0,3	5,2 ± 0,5	98,39
	13	6,0 ± 0,1	5,9 ± 0,2	5,2 ± 0,1	78,41
<i>S. flexneri</i> 2a	2	7,3 ± 0,2	7,3 ± 0,2	6,3 ± 0,2	74,34
	13	6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,5	5,4 ± 0,6	64,68

S. flexneri 2a parece ser mais resistente aos estresses de indução ao estado VNC. Sob os estresses nutricional e oxidativo, este sorovar entrou em VNC em tempo maior de indução (4 h), além de manter maior número de células viáveis ao final de 13 dias (Tabelas 5 e 6).

Uma comparação geral do efeito dos dois tratamentos de estresses utilizados neste trabalho, mostra que, sob os estresses nutricional e oxidativo, as

enterobactérias apresentaram maior redução na população total de células e a perda da culturabilidade ocorreu de maneira mais rápida. Tal fato pode ser atribuído a maior sensibilidade destes patógenos ao estresse oxidativo, além do emprego de temperatura de 25 °C para indução (Tabelas 5 e 6).

Asakura *et al.* (2005) constataram diferença na porcentagem de células viáveis de *E. coli* O157:H7 submetidas aos estresses osmótico ou oxidativo. No tratamento com 13 % (2,2 M) de NaCl, a perda da culturabilidade foi observada após 72 h e a viabilidade registrada foi de 80 % enquanto no estresse com H₂O₂, a perda da culturabilidade ocorreu em 6 h e a viabilidade foi de 48,6 %. Salive (2016) ao submeter *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 sob condições de estresse nutricional e osmótico verificou que a entrada no estado VNC ocorreu em períodos acima de 93 dias, e que estas condições favoreceram a manutenção de maior porcentagem de células viáveis, com valores acima de 80,9 %. Condições de estresse mais agressivas como o estresse ácido ou oxidativo induziram a entrada em estado VNC em períodos de, no máximo 24 h, mas resultaram em porcentagens de 8,51 % a 45,5 % de células viáveis. Esses trabalhos permitem concluir que existe uma relação entre o tempo de entrada no estado VNC e a porcentagem de células sobreviventes na população. Estresses mais brandos, que demandam maior tempo para induzir a entrada no estado VNC, permitem maior adaptação da população, aumentando a porcentagem de sobrevivência (SALIVE, 2016).

A baixa temperatura de indução utilizada nos estresses nutricional e osmótico, pode ter sido outro fator que permitiu manter maior culturabilidade e manutenção da viabilidade de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a. Pinto *et al.* (2011) demonstraram que a baixa temperatura permitiu a culturabilidade por um período de tempo mais longo durante a indução de *E. coli* ao estado VNC, sob estresses osmótico e nutricional. Esses autores hipotetizaram que a baixa temperatura pode diminuir o metabolismo das células permitindo-lhes manter a culturabilidade por mais tempo.

A diferença quanto à indução ao estado VNC entre as enterobactérias utilizadas apontam duas questões: O que seria mais vantajoso para uma população de bactérias: entrar primeiro em estado VNC e manter-se com maior viabilidade ou ser cultivável por mais tempo, mesmo que após a entrada no estado VNC, a população de células viáveis seja menor? A resposta é incerta, mas ambas as circunstâncias são

estratégias para manter-se viável e garantir a sobrevivência da espécie em ambientes hostis. Maior viabilidade de células VNC pode garantir maior probabilidade de recuperação quando as condições de sobrevivência forem novamente favoráveis. Entretanto, manter-se cultivável pode aumentar a competitividade destes microorganismos frente a condições ambientais adversas, favorecendo a predominância da espécie, o que demonstra maior resistência.

4.2. Estresse oxidativo intracelular

A determinação do estresse oxidativo intracelular, realizada por citometria de fluxo para detecção de ROS, como H_2O_2 , peroxinitrito ($ONOO^-$), radicais hidroxilo (HO^-), óxido nítrico (NO) e radicais peroxil (ROO) foi feita com o corante fluorescente sensível à oxidação 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). DCFH-DA difunde passivamente através da membrana celular e é desacetilado por esterases para formar 2,7-diclorofluoresceína não fluorescente (DCFH). DCFH reage com ROS e forma o produto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF), que fica retido dentro da célula emitindo fluorescência verde, indicativo da produção celular de diferentes tipos ROS (FLETCHER, 1988; DWIVEDI *et al.*, 2014; ABDUCAM®, Inglaterra). Entretanto, os resultados obtidos indicaram não haver diferença nesta emissão de fluorescência e, conseqüentemente, na concentração destas espécies reativas no interior das células cultiváveis e em VNC das enterobactérias estudadas (Figura 6).

Além disso, a piocianina, que foi utilizada como controle positivo, cuja função é estimular o ciclo redox em bactérias recebendo elétrons, e assim provocar aumento do metabolismo oxidativo, não induziu a produção de ROS pela redução de NADPH, tanto nas células em VNC, quanto nas células cultiváveis em fase estacionária de crescimento. Da mesma forma, o NAC, antioxidante que aumenta as concentrações celulares de sequestradores de radicais livres, utilizado neste trabalho como controle negativo, não inibiu a presença destes radicais (Figura 6 A, C, E, G e I). No entanto, a confirmação da aplicação da técnica utilizada para determinar a presença de diversos tipos de ROS intracelular foi verificada pela adição de 0,06 % de H_2O_2 as amostras analisadas (Figura 6 K e L).

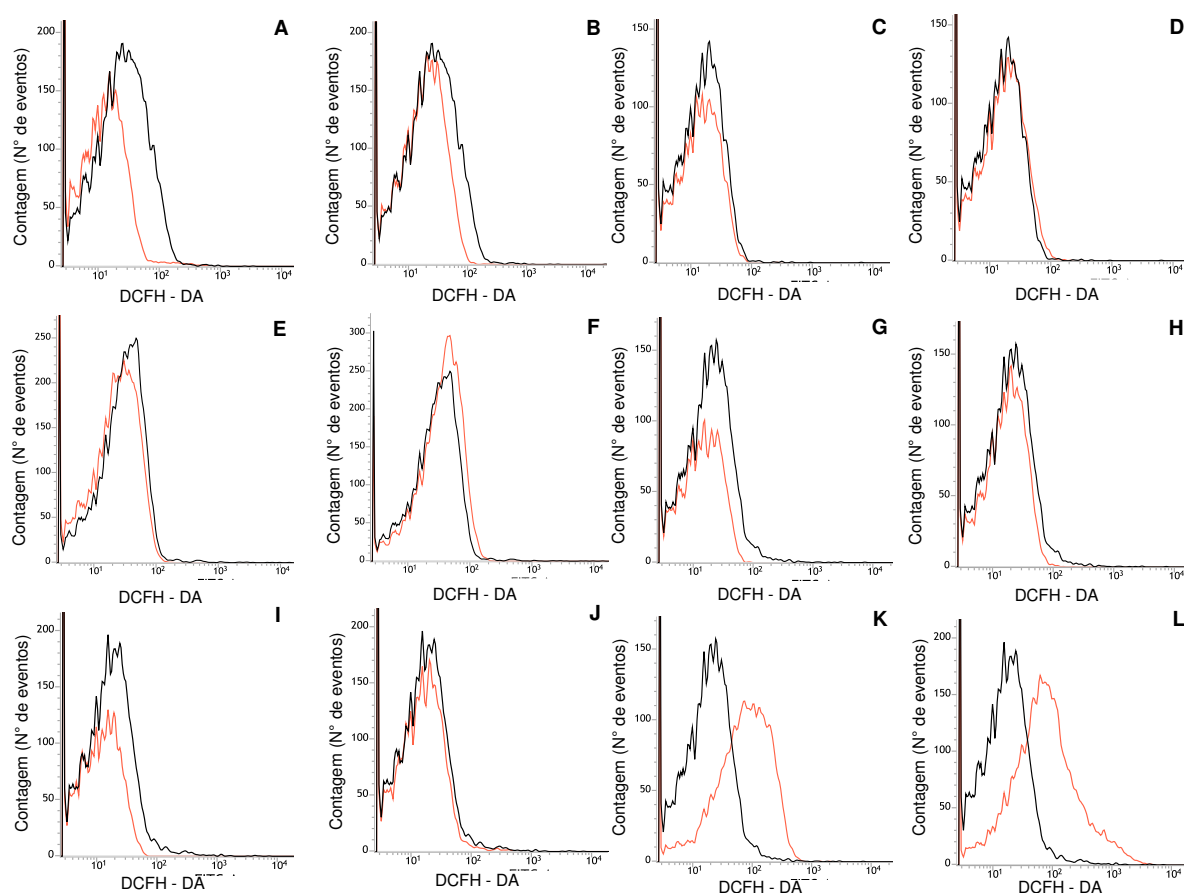


Figura 6 – Histogramas relacionando a quantidade de células com as intensidades de fluorescência emitidas pelo DCFH-DA, sinalizador de ROS intracelular, utilizado para detecção de ROS intracelular de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a nos diferentes tratamentos de indução ao estado VNC. Todos histogramas representados pela cor preta mostram a fluorescência emitida pelos controles negativos (NAC adicionado à suspensão celular) dos tratamentos. Os histogramas em **A, C, E, G e I** representados pela cor vermelha mostram a fluorescência emitida pelos controles positivos (piocianina adicionado à suspensão celular) dos tratamentos e os histogramas em **B, D, F, H e J** representam a fluorescência emitida pelas enterobactérias para ROS intracelular nos tratamentos. **A e B** representam *Salmonella* Enteritidis PT4 578 VNC induzida sob os estresses nutricional, osmótico e frio; **C e D** representam *S. flexneri* 2a sob os estresses nutricional, osmótico e frio; **E e F** representam *Salmonella* Enteritidis PT4 578 VNC induzida sob os estresses nutricional e oxidativo; **G e H** representam *S. flexneri* 2a VNC induzida sob os estresses nutricional e oxidativo; **I e J** representam *S. flexneri* 2a crescida em caldo BHI, em fase estacionária de crescimento; **K e L**, respectivamente, mostram nos histogramas em vermelho a fluorescência emitida por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 VNC e *S. flexneri* 2a VNC para ROS intracelular, após a adição de 0,06 % de H₂O₂ na suspensão celular. Determinação conduzida por citometria de fluxo.

A maioria dos trabalhos publicados envolvendo estudos de detecção de ROS intracelular não mostra a ação de indutores ou inibidores destas espécies, mas demonstra que a técnica que utiliza o DCFH-DA é válida e sensível para avaliar o

estresse oxidativo geral, seja por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou espectroscopia de fluorescência (NINGANAGOUDA *et al.*, 2014). Há relatos da avaliação do estresse oxidativo intracelular utilizando DCFH-DA em *B. subtilis* (ARAKHA *et al.*, 2015), *E. coli* (ARAKHA *et al.*, 2015; NINGANAGOUDA *et al.*, 2014), *Pseudomonas aeruginosa* (DWIVEDI *et al.*, 2014), *S. aureus* (KIM *et al.*, 2011) e *Salmonella Typhimurium* (JOSEPH *et al.*, 2016; SEM e RHEN, 2012), mas estes estudos não envolveram células no estado VNC.

A ausência de concentrações detectáveis de ROS intracelular pode justificar, em parte, a manutenção da viabilidade de ambas bactérias estudadas mesmo após 259 dias sob os estresses nutricional, osmótico e frio ou dois dias sob os estresses nutricional e oxidativo. *Salmonella* e *Shigella* possuem duas classes de enzimas para degradar H₂O₂. *Salmonella* possui catalases que degradam o H₂O₂ em água e oxigênio molecular, independente de um redutor adicional e peroxidases do tipo peroxiredoxina que reduz hidroperóxidos orgânicos em álcoois e H₂O₂ em água à custa de NADH ou NADPH (HORST *et al.*, 2010). Já *Shigella*, além da catalase possui também a SOD que é uma metaloenzima que converte os radicais superóxidos em H₂O₂ e O₂ (FRANZON, ARONDEL e SANSONETTI, 1990).

Hébrard *et al.* (2009) caracterizaram três membros da família catalase, KatG, KatE e KatN e dois membros da família peroxiredoxina, AhpC e TsaA, em *Salmonella*. Mutantes simples *katE*, *katG*, e *katN* de *Salmonella* não mostraram maior susceptibilidade a H₂O₂ exógeno (BUCHMEIER *et al.*, 1995; ROBBE-SAULE *et al.*, 2001). Em macrófagos, um mutante triplo *katG katE katN* não apresentou nenhuma alteração no crescimento, enquanto que mutante duplo *ahpCF* e *tsaA* apresentou taxa de crescimento reduzida nos macrófagos (HÉBRARD *et al.*, 2009). Horst *et al.* (2010) caracterizaram uma terceira peroxidase tipo Tpx e um mutante *tpx* simples de *Salmonella Typhimurium* que foi mais susceptível a H₂O₂ exógeno do que o tipo selvagem. Estas observações apontam as múltiplas vias que evoluíram em *Salmonella* para proteger este patógeno contra o estresse oxidativo (HORST *et al.*, 2010). Entretanto, não se conhece como estes diversos mecanismos de defesa contra ROS atuam em *Salmonella* no estado VNC.

Shigella flexneri sorotipo 5 deficientes na produção de superóxido dismutase contendo ferro (FeSOD/*sodB*) e catalase negativa (*katFG*) foram estudadas por Franzon, Arondel e Sansonetti (1990), quanto ao aumento da sensibilidade ao

estresse por oxigênio. O mutante *sodB* foi extremamente sensível à morte por fagócitos quando comparado ao progenitor selvagem. O mutante da catalase também mostrou maior sensibilidade, mas em menor grau. Após infecção de alças ileais de coelho e subsequente exame histopatológico, o mutante *sodB* causou pouco dano as vilosidades intestinais. O mutante *katFG*, por outro lado, mostrou um alto grau de destruição, semelhante ao da estirpe selvagem. Estes autores sugerem que a superóxido dismutase codificada por *sodB* pode desempenhar um papel importante na patogênese de *S. flexneri*. Em contraste, as catalases parecem ter contribuição limitada à virulência. Sendo assim, parece que mutações nos genes que codificam a catalase tanto em *Salmonella* quanto em *Shigella* parecem não trazer grandes prejuízos ao desenvolvimento destas espécies em ambientes hostis.

Os resultados obtidos, apesar de não detectarem presença de ROS endógenos na fração de VNC de *Salmonella* e *Shigella*, não excluem a formação e ação destes agentes durante as tentativas de recuperação das células em VNC. Sendo assim, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A adição de PI e DCFH-DA nas amostras analisadas por citometria de fluxo evidenciaram que a fração de células mortas da população total analisada de ambas enterobactérias no estado VNC, obtidas pelos dois diferentes meios de indução utilizados, pode ter maior concentração ROS intracelular indicando que este pode ser um dos motivos que levaram à morte destas células durante a exposição aos estresses de indução (dados não mostrados). Entretanto, é necessário também a realização de novas análises para confirmar esta hipótese por meio de melhor exploração dos dados estatísticos obtidos no *software* do citômetro de fluxo BD FACSVersé.

4.3. Recuperação da culturabilidade

Sob estresse nutricional, osmótico e frio *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi a única enterobactéria estudada que entrou em estado VNC. Sob estresse nutricional e oxidativo ambas bactérias estudadas, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *Shigella flexneri* 2a, entraram em estado VNC. Estas amostras de células em estado VNC foram posteriormente utilizadas nos experimentos de reativação.

Devido à ubiquidade de *Salmonella*, diferentes condições de recuperação foram escolhidas e envolveram variações nos parâmetros de crescimento, tais como

o uso de meio de cultura nutricionalmente rico, o caldo BHI, e outro com a quantidade mínima de nutrientes necessária ao crescimento, como o MMS; temperatura considerada ótima, 37 °C, e outra sub-ótima, 30 °C; além, da presença e ausência de oxigênio nos tratamentos. Estas diferentes condições adotadas para recuperar a culturabilidade de células VNC foram utilizadas para proporcionar condições de crescimento nas quais a taxa metabólica das células VNC pudesse ser estimulada a elevar-se gradativamente ou, dar condições de recuperação nas quais o metabolismo fosse ativado mais rapidamente. Além destas condições estabelecidas para recuperação, outros parâmetros também foram variados para reativar as células VNC de *Salmonella*, tais como, os métodos de esterilização dos meios e a adição de agentes de recuperação. Apesar de todas essas tentativas adotadas para recuperação da culturabilidade, não se obteve crescimento microbiano detectável. Os mesmos tratamentos foram aplicados para *Salmonella* e *Shigella* em VNC induzidos pelo estresse oxidativo pela presença de 10 mM de H₂O₂ a 25 °C e não se obteve reativação da culturabilidade das células.

Pinto *et al.* (2011) demonstraram que células de *E. coli* induzidas ao estado VNC em diferentes condições de estresse osmótico e nutricional a 4 °C puderam ser recuperadas em diferentes meios, ao passo que aquelas que foram induzidas da mesma forma a 25 °C não puderam ter sua culturabilidade recuperada em nenhum dos 41 meios testados. Salive (2016) recuperou células de *Salmonella* induzidas ao estado VNC sob os estresses nutricional, osmótico e os estresses nutricional e oxidativo e, além do emprego de baixa temperatura e, obteve melhores resultados recuperando a culturabilidade de células que estavam em BPS acrescido com 1,2 M de NaCl a 4 °C.

Uma observação a ser feita sobre os resultados encontrados neste trabalho é que em alguns meios utilizados para recuperação houve precipitação dos agentes antioxidantes adicionados ou dos próprios componentes dos meios, que poderia ser confundida com crescimento bacteriano e trazer uma interpretação errônea dos resultados (Figura 7). Entretanto, para evitar resultados falsos-positivos quando isto ocorria, foi realizada a confirmação por inoculação de alíquotas em meios não seletivos tais como o PCA e caldo BHI. Em nenhum destes tratamentos foi confirmada a presença de crescimento bacteriano.

A concentração de catalase de fígado bovino (2000 unidades / mg de proteína) adicionada nos tratamentos de recuperação variou de 0,2 % (2 mg.mL⁻¹) a 1% (10 mg.mL⁻¹), acima do recomendado pelo fabricante Sigma-Aldrich (1 mg.mL⁻¹), o que pode justificar sua precipitação horas depois da incubação dos meios. Após a filtração dos meios com 0,2 % de catalase, até o momento do inóculo com células no estado VNC, o meio de cultura não apresentou turvação. Após a incubação a 37 °C, observou-se a formação de precipitado e turvação dos meios, confundindo-se com o crescimento microbiano. Nos tratamentos com 1 % de catalase, a turvação dos meios de cultura, com posterior precipitação, era visível logo após a incubação a 30 °C e a 37 °C. Os tubos que estavam inoculados com os controles positivos apresentavam-se com uma turbidez mais intensa e uniforme por todo o meio do que os tubos que estavam inoculados com células no estado VNC (Figura 7 A e B, segunda fileira de tubos). A adição de 2,5 mM de Mn²⁺ ao meio MMS resultou na formação de precipitado provavelmente em razão da interação do íon Mn²⁺ com os demais sais que compõem o meio tais como o Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl e NH₄Cl (Figura 7 A e B, primeira fileira de tubos).

Durante os ensaios conduzidos com líquido intraperitoneal de camundongos, apenas o controle positivo que consistiu de células viáveis de *Salmonella* em contato com a suspensão do líquido apresentou formação de colônias em PCA e crescimento em caldo BHI. Não há relatos na literatura sobre ensaios de recuperação de células VNC de bactérias patogênicas expostas a macrófagos. Entretanto, neste trabalho foi avaliado se células em VNC de *Salmonella* podiam aderir, invadir e resistir ao estresse fagocítico e, então recuperar sua culturabilidade, uma vez que há relatos de recuperação de VNC em passagem pelo organismo hospedeiro.

Pinto, Santos e Chambel (2013) mostraram que os relatos de indução ao estado VNC em 68 espécies de 34 gêneros, é muito mais amplo do que os de recuperação, que são 10 espécies de oito gêneros. Tal registro mostra o quão desafiador pode ser recuperar células em estado VNC, principalmente porque ainda faltam muitas informações sobre o processo.

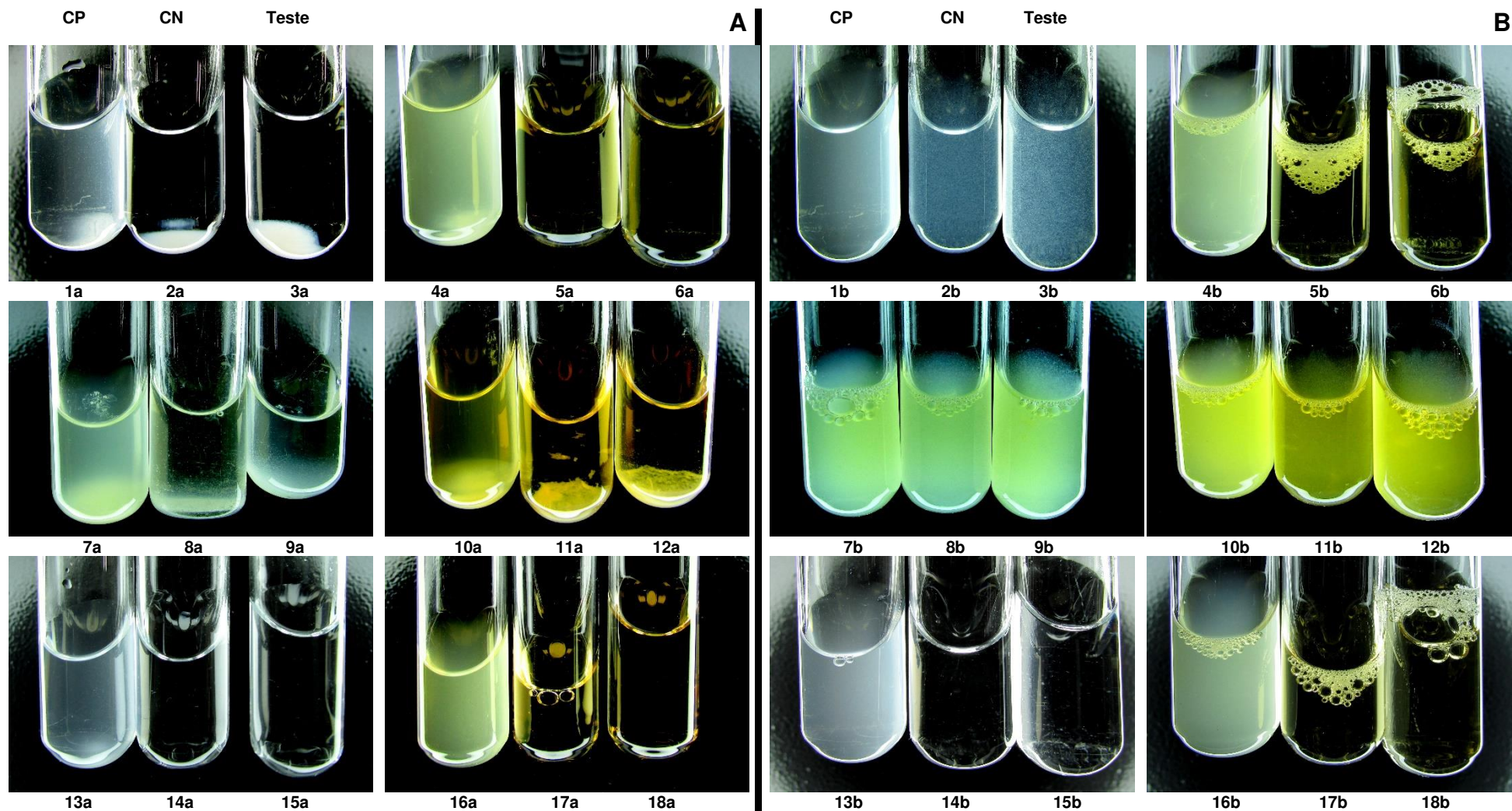


Figura 7 – Tubos contendo os meios de recuperação da culturabilidade, sem agitação prévia (A) e com agitação (B). À direita, de A e B estão os tratamentos com MMS e à esquerda, tratamentos com caldo BHI. A primeira fileira de tubos (1a – 6b) representa os tratamentos com adição de 2,5 mM de Mn^{2+} ; a segunda fileira de tubos (7a – 12b) representa os tratamentos com adição de 1% de catalase; a terceira fileira de tubos (13a – 18b) representa os tratamentos com adição de 10 mM de piruvato de sódio. Os tubos à esquerda de cada trio referem-se aos controles positivos (CP), os do meio ao controle negativo (CN) e os da direita aos inoculados com células de *Salmonella* no estado VNC (Teste).

A não recuperação das células VNC de *Salmonella* e *Shigella* nos meios de cultivo avaliados pode estar associada à teoria proposta por Bloomfield *et al.* (1998). Eles propuseram que a transferência de uma população estressada de bactérias que não possui atividade suficiente de enzimas que as protejam contra o estresse oxidativo, para um ambiente rico em nutrientes, tais como os meios de cultura, inicia um desequilíbrio no metabolismo. Este desequilíbrio resulta da produção de modo quase instantâneo de íons de superóxido endógeno e radicais livres, que são gerados quando as células transportam e metabolizam os compostos orgânicos (OLIVER, 2000). Na ausência de alguma pré-adaptação, tais células não seriam capazes de desintoxicar estes radicais tóxicos e morreriam (BLOOMFIELD *et al.*, 1998; OLIVER, 2000).

Existe outra hipótese proposta por Pinto, Santos e Chambel (2013) nomeada “janela de ressuscitação” para explicar a dificuldade de recuperação de células VNC. Na indução ao estado VNC, o número de células cultiváveis diminui ao passo que o de células VNC aumenta gradativamente ao longo do tempo. Isto implica que, em algum período de tempo, as células VNC que serão encontradas em suspensão não terão a mesma idade. Se todas células possuírem uma “janela de ressuscitação” com o mesmo comprimento, ou seja, se houver um período de tempo durante a permanência no estado VNC, no qual as células são capazes de recuperar a culturabilidade, isso implica que o número de células capazes de retomar o crescimento seja diminuído com o tempo de exposição ao estresse de indução.

Existem relatos de espécies em estado VNC que foram recuperadas por diferentes estímulos, como *Campylobacter jejuni* com mistura de gases (BOVILL e MACKEY, 1997), *L. pneumophila* em ameba (STEINERT *et al.*, 1997), *S. enterica* com choque térmico em meio de cultura rico (GUPTA, DE REZENDE e JOSEPH, 2003), *V. vulnificus* em modelo animal (OLIVER, 2005) e *E. coli* com aminoácidos (PINTO *et al.*, 2011). Entretanto, há poucos relatos sobre falhas na recuperação. Basaglia, Povolo e Casella (2007) induziram células de *Sinorhizobium meliloti* ao estado VNC no solo, mas não conseguiram recuperar a culturabilidade das mesmas. O mesmo ocorreu com células VNC de *Listeria monocytogenes* induzidas em folhas de salsa (DREUX *et al.*, 2007) e com *E. coli* VNC induzida a temperatura ambiente (ARANA, ORRANO e PASCUAL, 2007).

Além disso, algumas espécies requerem condições de reativação muito específicas, como por exemplo *C. jejuni* e *L. monocytogenes* que foram reativados, após inoculação em ovos de galinha embrionados (CAPPELIER *et al.*, 1999). Existem também outros micro-organismos que entram no estado VNC para o qual uma condição de reativação ainda não foi identificada (AYRAPETYAN e OLIVER, 2016; RAMAMURTHY *et al.*, 2014). Muitas vezes, a recuperação pode ser específica para determinada estirpe e até mesmo depender do tipo de estresse que levou à indução ao estado VNC. As células VNC de *Salmonella* e *Shigella* utilizadas neste trabalho, embora apresentassem sinais claros de viabilidade, foram incapazes de sair do estado de VNC.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos mostraram que *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *S. flexneri* 2a tiveram comportamento diferentes quando à entrada no estado VNC, sendo *S. flexneri* 2a mais resistente aos estresses de indução utilizados neste estudo. O estresse oxidativo em solução salina 0,85 % foi mais agressivo às células das enterobactérias, que entraram em estado VNC em menor tempo de exposição e apresentaram redução maior da viabilidade quando comparado ao estresse osmótico.

Não foi possível recuperar a culturabilidade das células no estado VNC obtidas neste trabalho, embora fosse detectada a presença de células viáveis. As condições de reversibilidade desse estado VNC podem ser muito específicas e depender de muitos fatores tais como os estresses de indução e a linhagem de estudo.

A hipótese de que ROS endógenos podem estar presentes na células em estado VNC e impedir a recuperação não foi confirmada pela técnica utilizada pois, não foi detectada presença de ROS intracelular em ambas espécies estudadas.

Estudos envolvendo de citometria e fluxo e estudo da morfologia pelo uso de técnicas microscópicas ao longo do tempo de indução são necessários para entender melhor as mudanças morfológicas que ocorrem durante a entrada no estado VNC. Além disso, antes de buscar alternativas de recuperação para células VNC, faz-se necessário estudos prévios para melhor compreensão desse estado fisiológico, de acordo com as peculiaridades envolvidas em cada condição de indução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCAM. **Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit**. Disponível em: <[http://www.abcam.com/ps/products/139/ab139476/documents/ab139476%20Cellular%20ROS-Superoxide%20Detection%20Assay%20Kit%20v8%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/139/ab139476/documents/ab139476%20Cellular%20ROS-Superoxide%20Detection%20Assay%20Kit%20v8%20(website).pdf)>.

Acesso em: 17 de fevereiro de 2017.

ALLERON, L. *et al.* VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. **Water Research**, v. 47, n. 17, p. 6606–6617, 2013.

ANDINO, A. *et al.* *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, n. 3, p. 1–16, 2015.

ARAKHA, M. *et al.* Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14813, 2015.

ARANA, I.; ORRUNO, M. PASCUAL D. P. Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 1, p. 1-11, 2007.

ASAKURA, H. *et al.* Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 9–10, p. 709–717, 2008.

ASAKURA, H. *et al.* 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 oxidative stresses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 2, p. 243–249, 2005.

ASAKURA, H. *et al.* Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1526–1529, 2002.

AYRAPETYAN, M.; OLIVER, J. D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 127–133, 2016.

AYRAPETYAN, M.; WILLIAMS, T. C.; OLIVER, J. D. Interspecific quorum sensing

mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2478–2483, 2014.

BAFFONE, W. *et al.* *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 83–91, 2006.

BARI, S. M. N. *et al.* Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 9926–9931, 2013.

BASAGLIA, M.; POVOLO, S.; CASELLA, S. Resuscitation of viable but not culturable *Sinorhizobium meliloti* 41 pRP4-luc: effects of oxygen and host plant. **Current Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 167-174, 2007.

BAUMGARTNER, J. G. Heat sterilised reducing sugars and their effects on the thermal resistance of bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 36, n. 4, p. 369, 1938.

BELL, C. ***Salmonella a practical approach to the organism and its control in food.*** London, United Kingdom, Blackwell Science, 2002. 328p.

BESNARD, V. *et al.* Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 359–370, 2002.

BIOSCA, E. G. *et al.* Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 450–455, 1996.

BOARETTI, M. *et al.* Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 986–996, 2003.

BOGOSIAN, G. *et al.* Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 18, p. 5070–5075, 2000.

BOVILL, R. A.; MACKEY, B. M. Resuscitation of “non-culturable” cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 143, n. 5, p. 1575–1581, 1997.

BRANDS, D. A.; ALCAMO, E. I.; HEYMANN, D. **Deadly diseases and epidemics *Salmonella*.** Oklahoma, United States: Chealsea House Publishers, 2005. 102p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 26 de maio de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 26 de maio de 2017.

BRONZE, M. S.; GREENFIELD, R. A. **Biodefence principles and pathogens**. United Kingdom: Horizon Bioscience, 2005. 838 p.

BUCHMEIER, N. A. *et al.* DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 1047–1053, 1995.

BURGESS, C. M. *et al.* The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 37-53, 2016.

CAPPELIER, J. M. *et al.* Recovery in embryonated 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, n. 11, p. 5154–5157, 1999.

CARLSSON, J.; NYBERG, G.; WRETHEN, J. Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 223-229, 1978.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **National *Shigella* Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: *Shigella* Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017.

- CHAVEERACH, P. *et al.* Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 711-714, 2003.
- COLWELL, R. R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 6, n. 2, p. 121-125, 2000.
- COOK, K. L.; BOLSTER, C. H. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 573–583, 2007.
- CUNNINGHAM, E.; O'BYRNE, C.; OLIVER, J. D. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1141–1144, 2009.
- DA CUNHA, F. D. P. L. *et al.* *Shigella* sp: Um problema de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, p. 52 – 57, 2017.
- D'AOUST, J-Y.; MAURER, J. **Salmonella species**. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition. American Society of Microbiology, 2007. p. 187-236.
- DARCAN, C. *et al.* Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in seawater. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 307–317, 2009.
- DEL CAMPO, R. *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, n. 2, p. 143–148, 2009.
- DINU, L. D.; BACH, S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8295-8302, 2011.
- DOYLE, M. P. **Salmonella**. In: CLIVER, D. O. Foodborne diseases. San Diego: Academic Press, 1990. p. 185-204.
- DREUX, N. *et al.* Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1272–1281, 2007.

DWIVEDI, S. *et al.* Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–9, 2014.

ENG, S-K. *et al.* *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

FINKELSTEIN, R. A; LANKFORD, C. E.; HILL, G. A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. **Applied Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 74-9, 1957.

FLETCHER, M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2027-2030, 1988.

FRANZON, V. L.; ARONDEL, J.; SANSONETTI, P. J. Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 2, p. 529-535, 1990.

GANGAIAH, D. *et al.* Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7838–7849, 2009.

GHEZZI, J. I.; STECK, T. R. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 3, p. 203–208, 1999.

GOURMELON, M.; CILLARD, J.; POMMEPUY, M. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 1, p. 105–112, 1994.

GRIMONT, P.; WEILL, F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella***, p. 1–167, 2008.

GROISMAN, E. A.; WINFIEL, M. D. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3687–3694, 2003.

- GUNASEKERA, T. S. *et al.* Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1988–1993, 2002.
- GUPTA, A. R.; DE REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6669-6675, 2003.
- D'AOUST, J.-Y.; MAURER, J. **Salmonella species**. *In*: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition. American Society of Microbiology, 2007. p. 187-236.
- HALE, T. L.; KEUSCH, G. T. **Shigella**. *In*: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- HÉBRARD, M. *et al.* Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4605–4614, 2009.
- HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v. 44, n. 3, p. 179-187, 2001.
- HIMEDIA. **Soyabean casein digest agar (tryptone soya agar)**. Disponível em: <<http://himedialabs.com/td/m290.pdf>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2017.
- HORST, S. A. *et al.* Thiol peroxidase protects *Salmonella enterica* from hydrogen peroxide stress *in vitro* and facilitates intracellular growth. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2929–2932, 2010.
- HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 1–6, 2004.
- JACOBSEN, A. *et al.* The *Salmonella enterica* pan-genome. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 3, p. 487, 2011.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Modern food microbiology. 7th edition. 2005.
- JOLIVET-GOUGEON, A. *et al.* Virulence of viable but nonculturable *S. Typhimurium* LT2 after peracetic acid treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v.

112, n. 2, p. 147–152, 2006.

JOSEPH, J. *et al.* Inhibition of ROS and upregulation of inflammatory cytokines by FoxO3a promotes survival against *Salmonella* Typhimurium. **Nature Communications**, v. 7, p. 12748, 2016.

KANA, B. D. *et al.* The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 672–684, 2008.

LAMPEL, K. A.; GUODONG, Z. *Shigella*. In : SALFINGER, Y. TORTORELLO, M. L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 15th edition. American Public Health Association-APHA, Washington, DC, 2013.

KIM, S. H. *et al.* Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2011.

KONG, I. S. *et al.* Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, n. 3, p. 133–142, 2004.

KRAMER, B.; MURANYI, P. Effect of pulsed light on structural and physiological properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 596–611, 2013.

KREBS, S. J.; TAYLOR, R. K. Nutrient-dependent, rapid transition of *Vibrio cholerae* to coccoid morphology and expression of the toxin co-regulated pilus in this form. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2942–2953, 2011.

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

LEE, K. M. *et al.* Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264–276, 2015.

LEWIS, I. M. The Inhibition of *Phytomonas malvaceara* in culture media containing sugars. **Journal of Bacteriology**, v. 19, n. 6, p. 423–33, 1930.

LI, L. *et al.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial

pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–1, 2014.

LIANG, X. *et al.* Flow cytometry is a promising and rapid method for differentiating between freely suspended *Escherichia coli* and *E. coli* attached to clay particles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 6, p. 1730–1739, 2014.

LINDBÄCK, T. *et al.* The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. **Veterinary Research**, v. 41, n. 1, 2010.

LIU, Y. *et al.* Production of shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. **Water Research**, v. 44, n. 3, p. 711–718, 2010.

LOEWEN, P. C. *et al.* Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 707–717, 1998.

MASCHER, F. *et al.* The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1662–1667, 2000.

MASMOUDI, S.; DENIS, M.; MAALEJ, S. Inactivation of the gene katA or sodA affects the transient entry into the viable but non-culturable response of *Staphylococcus aureus* in natural seawater at low temperature. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 2209–2214, 2010.

MENDES, R. A. **Estado viável não cultivável em *Salmonella enterica*: indução, perfil de proteínas intracelulares e detecção de mRNA**. 2009. [Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

MORISHIGE, Y.; FUJIMORI, K.; AMANO, F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogs on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*. **Microbes and Environments / JSME**, v. 28, n. 2, p. 180–6, 2013.

MUELA, A. *et al.* Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 1, p. 28–36, 2008.

MUTSCHLER, H. *et al.* A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. **PLoS Biology**, v. 9, n. 3, p. e1001036, 2011.

NAKASHIMA, T. *et al.* Generation of reactive oxygen species from conventional laboratory media. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 304–307, 2010.

NICHOLS, D. *et al.* Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4889-4897, 2008.

NINGANAGOUDA, S. *et al.* Growth kinetics and mechanistic action of reactive oxygen species released by silver nanoparticles from *Aspergillus niger* on *Escherichia coli*. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-9, 2014.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 415–425, 2010.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 93-100, 2005.

OLIVER, J. D. **The public health significance of viable but nonculturable bacteria.** *In: Nonculturable microorganisms in the environment.* Springer US, 2000. p. 277-300.

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, n. 7, p. 2620-2623, 1995.

OLIVER, J. D.; DAGHER, M.; LINDEN, K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. **Journal of Water and Health**, v. 3, n. 3, p. 249–257, 2005.

OXOID MICROBIOLOGY PRODUCTS. **Dehydrated culture media: brain heart infusion broth.** Disponível em: <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1135&org=3>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2017.

PASQUAROLI, S. *et al.* Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1812–1817, 2013.

PINTO, D. *et al.* Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1601–1611, 2011.

PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 61–76, 2013.

POSTNIKOVA, O. A. *et al.* Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

QUIRÓS, C. *et al.* Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2977–2981, 2009.

RAHMAN, I. *et al.* Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 115-120, 1996.

RAMAMURTHY, T. *et al.* Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 103, p. 1-9, 2014.

REISSBRODT, R. *et al.* Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from soil and water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 4128-4130, 2000.

REISSBRODT, R. *et al.* Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4788–4794, 2002.

RIVERS, B.; STECK, T. R. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. **Urological Research**, v. 29, n. 1, p. 60–66, 2001.

ROBBE-SAULE, V. *et al.* Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (σ s). **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1533–1545, 2001.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Induction of the viable but nonculturable state of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis deficient in (p)ppGpp synthesis. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2171–2178, 2015.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 365–379, 1987.

SALIVE, A. F. V. **Indução, caracterização e recuperação de *Salmonella* no estado viável não cultivável.** 2016. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola] Universidade Federal de Viçosa.

SEM, X.; RHEN, M. Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* relies on disseminated oxidative stress in the infected host. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–14, 2012.

SIDES, L.; HITE, M. F.; OLIVER, J. D. Effects of reactive oxygen species (ROS) inhibitor on resuscitation of viable but nonculturable (VBNC) cells of *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157: H7. **Annual Meeting American Society Microbiology**, v. 129, p. 558, 1999.

STEINERT, M. *et al.* Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 2047–2053, 1997.

STEPHENS, P. J.; DRUGGAN, P.; NEBE-VON CARON, G. Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 269–285, 2000.

TAMBURINI, S. *et al.* Accurate flow cytometric monitoring of *Escherichia coli* subpopulations on solid food treated with high-pressure carbon dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 440–450, 2014.

TANAKA, T. *et al.* A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7659–7666, 2014.

TINDALL, B. J. *et al.* Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 2005.

UGBOROGHO, T. O.; INGHAM, S. C. Increased D-values of *Staphylococcus aureus* resulting from anaerobic heating and enumeration of survivors. **Food Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 275–280, 1994.

WONG, H-C.; LIU, S-H. Characterization of the low-salinity stress in *Vibrio vulnificus*. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 2, p. 416-419, 2008.

XAVIER, I. J.; INGHAM, S. Increased D-values for *Salmonella enteritidis* resulting from the use of anaerobic enumeration methods. **Food Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 223–228, 1993.

ZENG, B. *et al.* Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella* Typhi. **BioMed Research International**, v. 2013, 2012.

ZHAO, F. *et al.* Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high-pressure CO₂ and its characteristics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

ZHAO, X. ; DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 1-6, 2014.

APÊNDICE

Tabela 1 – Intensidade de fluorescência (IF, DCFH-DA), determinada por citometria de fluxo, nas células viáveis e mortas de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e *Shigella flexneri* 2a induzidas ao estado VNC pelos estresses nutricional, osmótico e frio e estresses nutricional e oxidativo.

<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578		
Estresses	Células viáveis (*IF DCFH-DA)	Células mortas (IF DCFH-DA)
Nutricional, osmótico e frio	7,7 ± 1,5	29,0 ± 15,6
Nutricional e oxidativo	15,0 ± 9,6	49,0 ± 61,5
<i>Shigella flexneri</i> 2a		
Estresses	Células viáveis (IF DCFH-DA)	Células mortas (IF DCFH-DA)
Nutricional, osmótico e frio	29,3 ± 6,0	51,7 ± 17,0
Nutricional e oxidativo	22,6 ± 11,8	63,7 ± 48,8

*IF – Intensidade de Fluorescência