

ANDRES FELIPE VANEGAS SALIVE

**INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA CULTURABILIDADE  
DE *Salmonella* NO ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL**

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  
2016**

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

T

V252i  
2016  
Vanegas Salive, Andres Felipe, 1991-  
Indução, caracterização e recuperação da  
culturabilidade de *salmonella* no estado viável não  
cultivável / Andres Felipe Vanegas Salive. - Viçosa, MG, 2016.  
x, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella*. 2. viável não cultivável.  
3. culturabilidade. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.344

ANDRES FELIPE VANEGAS SALIVE

**INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA CULTURABILIDADE  
DE *Salmonella* NO ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL**

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: 18 de março de 2016

---

Dr. François Baglinière  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Míriam Teresinha dos Santos

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Vieira Prudêncio

---

Prof. Natan de Jesus Pimentel Filho

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me abençoar com a oportunidade de realizar este sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia que me deram a honra de receber o conhecimento e experiências acadêmicas maravilhosas.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos.

À minha querida orientadora, Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, que é meu grande exemplo profissional e, com seus princípios éticos e morais, foi meu maior apoio, por seus conselhos, constante motivação e todo o conhecimento, muito obrigado professora Cristina, você fez tudo mais fácil.

Ao Brasil, país que levo no meu coração e será sempre a minha segunda casa.

Ao meu coorientador François Baglinière e a doutora Cláudia Vieira Prudêncio, obrigado pela amizade, paciência, pelos ensinamentos, motivação, apoio constantes e por serem um exemplo profissional.

Aos professores Míriam Teresinha dos Santos, Hilário Cuquetto Mantovani, Denise Mara Soares Bazzolli e Antônio Galvão do Nascimento, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos professores Sukarno Olavo Ferreira do Departamento de Física e Leandro Licursi de Oliveira do Departamento de Biologia Geral, pelo apoio e motivação no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Natan de Jesus Pimentel Filho, obrigado pela amizade os ensinamentos, o apoio e pelas sugestões neste trabalho.

A minha mãe por todos os esforços feitos para permitir que eu alcançasse meus sonhos.

A meus amigos do laboratório pela amizade, ajuda, convivência e companheirismo.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

ANDRES FELIPE VANEGAS SALIVE, filho de Maria Cristina Salive Rengifo e Alexander Vanegas Rincon, nasceu em 25 de janeiro de 1991, na cidade de Ibaguè, Colômbia. Iniciou a graduação em julho de 2008 na Universidade de Tolima (Colômbia), na qual se graduou em Biologia em 4 de abril de 2014.

Em março de 2014 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa da dissertação em 18 de março de 2016.

## SUMÁRIO

Lista de Ilustrações .....	v
Lista de Tabelas .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Revisão de Literatura .....	1
Gênero <i>Salmonella</i> .....	1
Estado viável não cultivável .....	3
Importância das células no estado VNC .....	5
Detecção de células no estado VNC .....	6
Recuperação de células no estado VNC .....	8
Referências Bibliográficas .....	10
Capítulo 1: Indução e caracterização de células de <i>Salmonella enterica</i> no estado viável não cultivável .....	20
Introdução .....	21
Materiais e Métodos .....	23
Resultados .....	28
Discussão .....	37
Conclusões e Perspectivas .....	42
Referências Bibliográficas .....	43
Capítulo 2: Recuperação da culturabilidade de <i>Salmonella enterica</i> no estado viável não cultivável .....	49
Introdução .....	50
Materiais e Métodos .....	52
Resultados .....	56
Discussão .....	62
Conclusões e Perspectivas .....	65
Referências Bibliográficas .....	66

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1

**Figura 1.** Sobrevivência de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium submetidas a estresse com soluções de ácido peracético (5,66 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (1,2 mg/mL).

**Figura 2.** Imagens representativas de células de *Salmonella* Enteritidis coradas com kit Live/Dead<sup>®</sup> obtidas por microscopia de fluorescência.

**Figura 3.** Imagens representativas de células de *Salmonella* Typhimurium coradas com kit Live/Dead<sup>®</sup> obtidas por microscopia de fluorescência.

**Figura 4.** Imagens de microscopia de força atômica (MFA) de *Salmonella* Enteritidis em estado VNC induzido por diferentes condições de estresses.

**Figura 5.** Imagens de microscopia de força atômica (MFA) de *Salmonella* Typhimurium em estado VNC induzido por diferentes condições de estresses.

### Capítulo 2

**Figura 1.** Valores médios de densidade ótica a 600 nm do crescimento celular de *Salmonella* em etapa de recuperação da culturabilidade em MMS.

**Figura 2.** Curva de recuperação da culturabilidade de *Salmonella* Enteritidis induzida por estresse osmótico e nutricional e submetida à recuperação com MMS e caldo BHI adicionados de extrato livre de células (ELC) de *Salmonella* Typhimurium.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Caracterização das soluções usadas para estressar células de *S. enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium.

**Tabela 2.** Tempo necessário para se observar a perda da culturabilidade em caldo BHI e da capacidade de formação de colônias em ágar BHI por células de *Salmonella* submetidas às diferentes condições de estresses.

**Tabela 3.** Percentual de células viáveis de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Typhimurium mantidas em tratamentos estressantes a  $4 \pm 1$  °C determinadas pela contagem ao microscópio de fluorescência utilizando o kit Live/Dead®.

**Tabela 4.** Percentual de células viáveis de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Typhimurium determinada pela contagem no microscópio de fluorescência utilizando o kit Live/Dead® de células após 83 dias de indução ao estado VNC.

**Tabela 5.** Porcentagens de células viáveis de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Typhimurium mantidas em tratamentos estressantes a  $4 \pm 1$  °C determinadas pela contagem em citômetro de fluxo.

**Tabela 6.** Percentagem de células viáveis de *Salmonella* determinada pela contagem no citômetro de fluxo de células após 83 dias de indução ao estado VNC.

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Frequência de recuperação da culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium induzidas ao estado VNC por diferentes tratamentos e após incubação em caldo MMS por 96 h a 37 °C.

**Tabela 2.** Frequência de recuperação da culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium induzidas ao estado VNC por diferentes tratamentos e após incubação em caldo BHI por 96 h a 37 °C.



## RESUMO

SALIVE, Andres Felipe Vanegas. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Indução, caracterização e recuperação da culturabilidade de *Salmonella* no estado viável não cultivável.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: François Baglinière e Uelinton Manoel Pinto.

*Salmonella* é um dos principais micro-organismos implicados nas doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados e, portanto, torna-se necessário assegurar a ausência deste patógeno nos alimentos para garantir a segurança do consumidor. A maioria dos métodos de detecção de *Salmonella* depende da culturabilidade do patógeno nas condições de laboratório. É sabido que *Salmonella* pode entrar no estado conhecido como viável não cultivável (VNC) em alimentos ou no ambiente e assim, resistir durante longos períodos de tempo em condições adversas. Durante o estado VNC, a atividade metabólica das células é muito baixa, impossibilitando sua detecção por técnicas de cultivo tradicionais. Isto pode resultar em subestimação ou a não detecção de células viáveis. Considerando a escassez de informações sobre o estado VNC neste patógeno, objetivou-se, neste trabalho, avaliar condições de indução e de recuperação da culturabilidade de *Salmonella* no estado VNC e caracterizar a morfologia celular neste estado de resistência. A indução das células de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium foi feita em solução tampão fosfato de Butterfield adicionado de 0,6 M de NaCl, solução salina (1,2 M de NaCl), ácido peracético (5,66 mg/mL) ou peróxido de hidrogênio (1,2 mg/mL) a 4 °C. A culturabilidade foi acompanhada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e a viabilidade celular foi verificada por microscopia de epifluorescência, com uso do kit Live/Dead<sup>®</sup> e citometria de fluxo. Análises morfológicas foram realizadas por microscopia de força atômica (MFA). Para a recuperação da culturabilidade foram utilizados o meio mínimo de sais (MMS) e o caldo BHI, suplementados com diferentes componentes. As condições de estresse utilizadas induziram a entrada de *Salmonella* no estado VNC, com variações no período de tempo para indução. Em condições de estresse nutricional e osmótico a entrada no estado VNC ocorreu em períodos

acima de 93 dias, mas estas condições favoreceram a manutenção de maior percentagem 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 horas, mas resultaram em percentagens de 8,51 % a 45,5 % de células viáveis. As células submetidas aos estresses nutricional e osmótico apresentaram alterações morfológicas, com redução do tamanho e alteração da forma bacilar para cocóide; alterações que não foram evidenciadas quando o estresse ácido ou oxidativo foram utilizados. O meio MMS foi mais eficiente para promover a recuperação da culturabilidade de *Salmonella*, particularmente quando 1 % de catalase foi incorporada ao meio. Aumento na frequência de recuperação da culturabilidade também foi constatado quando piruvato de sódio e extrato livre de células de *Salmonella* e *Enterobacter cloacae* foram adicionados aos meios de cultura. *Salmonella* Enteritidis demonstrou maior frequência de recuperação da culturabilidade do que *Salmonella* Typhimurium. Estes resultados confirmam que diferentes condições estressantes induzem *Salmonella* no estado VNC e que o uso de MMS acrescido de componentes, como a catalase, pode ser uma alternativa para aumentar a recuperação de células de *Salmonella* em estado VNC. Assim, estes resultados representam importante avanço no entendimento das condições de entrada e saída de *Salmonella* do estado VNC.

## ABSTRACT

SALIVE, Andres Felipe Vanegas. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march of 2016. **Induction, characterization and recovery the culturality of *Salmonella* in viable but not cultivable state** Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisors: François Baglinière and Uelinton Manoel Pinto.

*Salmonella* is one of the main microorganisms implicated in diseases caused by food and it is necessary to ensure the absence of this pathogen in food for consumer's safety. Most of the methods for *Salmonella* detection relies on the pathogen culturability in laboratory conditions. It is known that *Salmonella* can be induced in a state known as viable but non culturable (VBNC) in food or in the environment and withstand in this form for long periods. During the VBNC state, the metabolic activity of the cells is very low, making it impossible to detect by traditional cultivation techniques. This may result in underestimation or failure to detect viable cells of this pathogen. Considering the few information about VBNC state in *Salmonella*, this study aimed to evaluate the induction of VBNC state in this pathogen, the culturability recovery conditions and characterize the cellular morphology in this state of resistance. The induction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium to VBNC state was made in Butterfield phosphate buffer (0.6 M), saline solution (1.2 M NaCl), peracetic acid (5.66 mg/mL) or hydrogen peroxide hydrogen (1.2 mg/mL) at 4 ° C. The culturability was accompanied in brain heart infusion broth (BHI) and cell viability checked by epifluorescence microscopy with the Live / Dead® kit and flow cytometry. Morphological analyzes were performed by atomic force microscopy (AFM). For the recovery of culturability, minimal salts medium (MMS) and BHI broth supplemented with different components. All stress conditions used induced *Salmonella* into VBNC state and, the time for the VBNC state induction varying. In the starvation and osmotic treatment, VBNC state was detected after 93 days of treatment, but these conditions favored the maintenance of a higher percentage of viable cells, with values above 80.9%. More aggressive stress conditions as acid or oxidative stress induced the cells into VBNC state in periods shorter than 24 hours, but resulted in a percentage

of 8.51% to 45.5% viable cells. Cells undergoing starvation and osmotic stress showed morphological changes, reducing the size and changing the bacillary form to coccoid but these changes were not apparent when the acid or oxidative stress were used. The medium MMS was more efficient to promote recovery *Salmonella* culturability, particularly when 1% catalase was incorporated into the medium. Higher frequency of recovery was also observed when sodium pyruvate and cell free extract of *Salmonella* and *Enterobacter cloacae* were added to the media. Among the serotypes used, *Salmonella* Enteritidis showed higher frequency of recovery than *Salmonella* Typhimurium. These results confirm that different stress conditions can induce *Salmonella* to enter in the VBNC state, and the use of MMS plus various components, particularly catalase, can be an alternative to ensure the recovery of *Salmonella* cells and facilitate the detection of the pathogen in food. Thus, these results represent an important advance in the understanding of the conditions of entry and exit of *Salmonella* VBNC state.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Gênero *Salmonella*

A primeira descrição de bactérias do gênero *Salmonella* foi feita ao final do século XIX, por Daniel Elmer Salmon e Theobald Smith, que isolaram o micro-organismo em amostras de porcos doentes (BRANDS *et al.*, 2005). A classificação do micro-organismo foi proposta pelo bacteriologista Léon Marcel Lignières, em 1900, sugerindo a denominação de *Salmonella* em honra a Elmer Salmon (BRANDS *et al.*, 2005). *Salmonella* é reconhecida como importante patógeno causador de doenças em animais e em seres humanos. As doenças causadas por este patógeno são divididas em dois grupos, sendo que o primeiro compreende a febre tifóide, causada por *Salmonella enterica* sorovar Typhi e a febre entérica, causada por *S. enterica* sorovar Paratyphi (MCWHORTER *et al.*, 2015). O segundo grupo inclui as gastroenterites, causadas por outros sorovares veiculados de forma frequente nos alimentos (JACOBSEN *et al.*, 2011).

*Salmonella* é um gênero de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, classe Proteobacteria (GRIFFIN e MCSORLEY, 2011), que apresenta forma de bacilos curtos, gram-negativos, não produtores de esporos nem de cápsulas. Quase todos os membros do gênero apresentam motilidade pela presença de flagelos peritriquios e o habitat principal é o trato intestinal de vários animais (HOELZER *et al.*, 2011; WIEDEMANN *et al.*, 2014; MCWHORTER *et al.*, 2015).

O gênero compreende duas espécies, *Salmonella bongori* e *S. enterica*, sendo esta última classificada em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) e *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (TINDALL *et al.*, 2005). O gênero apresenta 2.579 sorovares e destes, 1.531 são pertencentes à espécie *S. enterica* (JACOBSEN *et al.*, 2011).

Os sorovares de *Salmonella* são classificados em grupos baseando-se na adaptação a diferentes espécies hospedeiras (KINGSLEY e BÄUMLER, 2000).

*Salmonella* pode multiplicar em ampla faixa de temperatura (5 °C a 45 °C), com ótima entre 35 °C e 37 °C, na qual o tempo de geração chega a alcançar 22 minutos (D'AOUST, 2007). Além da capacidade de crescimento em ampla faixa de temperatura, este patógeno pode crescer em pH entre 4,0 e 9,0, com melhor crescimento em valores próximos à neutralidade (BELL, 2002; BRANDS *et al.*, 2005). O valor ótimo de atividade de água ( $A_w$ ) para o crescimento é de 0,995, mas o patógeno pode crescer em valores de até 0,945, ou em limites de  $A_w$  de até 0,93 em alimentos (BELL, 2002).

Em diferentes nichos ecológicos, nos alimentos e no trato gastrointestinal de hospedeiros, *Salmonella* é constantemente submetida a situações de estresses. No entanto, este patógeno tem a capacidade de detectar e responder a mudanças no ambiente e apresenta mecanismos que envolvem proteção contra os agentes estressantes e, ou reparo dos danos causados por eles. A resposta de tolerância ao estresse incluem modificações tanto estruturais como fisiológicas nas células e são reguladas por uma complexa maquinaria genética (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2015). A resposta a uma condição de estresse pode levar á adaptação cruzada, ou seja, a aquisição de resistência a outros estresses, favorecendo a sobrevivência das células estressadas (GREENACRE e BROCKLEHURST, 2006; GABRIEL e NAKANO, 2009).

A resposta adaptativa ao estresse permite a sobrevivência de *Salmonella* em diferentes tipos de alimentos crus e processados, incluindo, como exemplo, clara de ovo em pó, mantida a 54 °C e em baixa umidade (JUNG e BEUCHAT, 1999); produtos de leite fermentado com pH 4,23 (SHEN *et al.*, 2007); manteiga de amendoim, com baixa  $A_w$  e alto conteúdo de gordura, mantida a temperatura baixa (BURNETT *et al.*, 2000; AVILES *et al.*, 2013); superfície de ovos em temperatura ambiente (PASQUALI *et al.*, 2016); leite pasteurizado e diversos queijos (DE BUYSER *et al.*, 2001); frango cru refrigerado (BEAL *et al.*, 2004) e lulas estocadas em solução a 7% de NaCl a 4 °C (ASAKURA *et al.*, 2002).

É reconhecido que *Salmonella* pode estar presente em diversos alimentos, como carnes, ovos, produtos de milho, frutas, vegetais e água na

forma de resistência conhecida como viável não cultivável e, portanto, trazer riscos para a saúde do consumidor (ASAKURA *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2012).

### **Estado viável não cultivável**

Em 1982, Xu *et al.* observaram que *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* apresentavam a capacidade de entrar em um estado celular adaptativo, de maior sobrevivência a condições ambientais desfavoráveis, denominado viável não cultivável (VNC). Inicialmente, o conceito de células no VNC foi utilizado para indicar um estado de inatividade, mas já se sabe que neste estado, as células apresentam atividade metabólica e expressão de genes, sendo por isso, considerado atualmente como um estado de resistência (OLIVER *et al.*, 2005; RAMAMURTHY *et al.*, 2014). O estado VNC é caracterizado pela perda da capacidade de formação de colônias ou turvação em meios de cultivo de rotina, redução da atividade metabólica, 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). As células bacterianas no estado VNC também apresentam diferenças na parede celular e na composição da membrana, incluindo proteínas, ácidos graxos e peptidoglicano (PINTO *et al.*, 2013). Além disso, as células no estado VNC apresentam maior resistência física e química do que as células cultiváveis, possivelmente relacionadas à redução da taxa metabólica e às alterações na parede celular (SIGNORETTO *et al.*, 2000). O estado VNC se diferencia da esporulação, pois enquanto os esporos são metabolicamente inertes, células em estado VNC mantêm processos de respiração, transcrição e síntese de proteínas (PINTO *et al.*, 2013).

Outro estado que apresenta diferença do estado VNC são as células *persistir*, as quais são formadas em baixa frequência durante o crescimento celular e não apresentam mudanças morfológicas ao contrário das células no estado VNC, que são formadas em alta frequência e apresentam mudanças morfológicas (PINTO *et al.*, 2013). Outro estado fisiológico diferente, o estado de latência, muitas vezes é confundido com o estado VNC, mas difere deste pelas células não apresentarem atividade metabólica detectável (PINTO *et al.*, 2013).

Os fatores que levam uma bactéria à entrada no estado VNC estão associados às condições de estresse e à falta de nutrientes (OLIVER *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2013; RAMAMURTHY *et al.*, 2014), além de mudanças drásticas de temperatura (REISSBRODT *et al.*, 2002; OZKANCA *et al.*, 2009; MAGAJNA e SCHRAF, 2015). Agentes estressantes que incluem a radiação ultra-violeta (UV) (CARO *et al.*, 1999), mudanças em valores ótimos no pH e na salinidade (ASAKURA *et al.*, 2002; WONG *et al.*, 2004), baixas concentrações de oxigênio (KANA *et al.*, 2008) e estresse oxidativo (MOCK *et al.*, 2015) promovem a entrada das células em estado VNC. Substâncias como dióxido de enxofre (MILLET e LONVAUD, 2000), metais pesados (CAMPO *et al.*, 2009), conservantes de alimentos (QUIRÓS *et al.*, 2009) e tratamentos com plasma, alta pressão atmosférica (DOLEZALOVA e LUKES, 2015) e cloração para o tratamento de águas residuais (OLIVER *et al.*, 2005) também já foram relacionados à indução do estado VNC. Entretanto, ainda não se sabe quais as diferenças relacionadas ao tempo de indução e as modificações celulares causadas pelas diversas condições utilizadas para o processo de indução ao estado VNC. Apesar dos avanços nas pesquisas feitos até agora, estudos que comparem as diversas condições que levam à entrada das células bacterianas ao estado VNC são escassos, mas necessários para gerar informações importantes como o tempo de indução e a resistência particular adquirida pelas células em situações distintas.

*Salmonella* está entre as mais de 68 bactérias que tem a capacidade de entrar no estado VNC como resposta a diversas condições de estresse (ASAKURA *et al.*, 2002; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; ASAKURA *et al.*, 2005; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006; PANUTDAPORN *et al.*, 2006; PASSERAT *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2012) e assim, sobrevive por longos períodos de tempo (MUKAMOLOVA *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2013). Neste estado fisiológico, *Salmonella* diminui sua atividade metabólica, a expressão de genes e ocorrem mudanças morfológicas (GUPTE *et al.*, 2003; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2015). Todas essas mudanças são acompanhadas da perda da culturabilidade típica das células, o que impossibilita sua detecção por metodologias de cultivo convencionais (REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006). Células de *Salmonella* no estado VNC tem a capacidade de recuperar a



culturabilidade em condições favoráveis específicas mantendo seu potencial infeccioso, o que representa um risco para a saúde humana (MUKAMOLOVA *et al.*, 2003).

### **Importância de células no estado VNC**

As células no estado VNC têm grande significado na inocuidade do alimento e na saúde pública. Muitas espécies patogênicas potencialmente perigosas sobrevivem nos alimentos processados, água potável e no ambiente no estado VNC (SARDESSAI, 2005). Este fato sugere que a entrada no estado VNC é uma estratégia de adaptação em longo prazo de alguns micro-organismos em condições ambientais desfavoráveis. Essa hipótese é baseada nas características de resistência apresentadas pelas células no estado VNC. Além disso, muitas espécies tem a capacidade de recuperar a culturabilidade (ASAKURA *et al.*, 2002; BAFFONE *et al.*, 2006; PANUTDAPORN *et al.*, 2006) o que contesta a hipótese de que o estado VNC é uma etapa transitória na degeneração da população bacteriana que resulta em morte celular.

Patógenos no estado VNC representam riscos para a saúde, pois não são detectados em análises pelos métodos tradicionais, fazendo com que a segurança do alimento seja subestimada ou, pode levar a considerar uma amostra livre de patógenos quando células no estado VNC podem estar presentes. Esta consideração é mais preocupante pelo fato de que algumas espécies bacterianas ainda são virulentas no estado VNC e, as que perdem a virulência, podem retornar o potencial patogênico quando recuperam a culturabilidade (DU *et al.*, 2007).

No ano de 1998, no Japão, ocorreu um surto de infecção causado por ovas de salmão salgadas contaminadas com *E. coli* enterohemorrágica O157 e houve suspeita das células estarem em estado VNC (MAKINO *et al.*, 2000). Também no Japão, em 1999 lulas contaminadas com *S. enterica* sorovar Oranienburg que se encontrava em estado VNC foram associadas a surto de infecção alimentar (ASAKURA *et al.*, 2002). Estes surtos confirmam a importância de se disponibilizar métodos de detecção de células no estado VNC, uma vez que, por metodologias tradicionais que envolvem

culturabilidade, pode-se subestimar a população microbiana presente em um alimento, comprometendo a segurança de alimentos e trazendo riscos para a saúde humana.

Torna-se, portanto, muito importante desenvolver métodos de detecção para quantificar a população de células viáveis, incluindo as células no estado VNC, particularmente de patógenos. Outro aspecto que demanda mais atenção é a identificação das condições que podem induzir a entrada no estado VNC e as condições de recuperação da culturabilidade. A diversidade de microorganismos e a dificuldade de se detectar esse estado resultam em implicações importantes em diferentes áreas de estudo como ecologia, monitoramento ambiental, tecnologia dos alimentos e gestão das enfermidades infecciosas.

### **Detecção de células no estado VNC**

A principal característica das células no estado VNC é a ausência de culturabilidade, o que dificulta sua detecção (PINTO *et al.*, 2013). Entretanto, a presença destas células pode ser avaliada pela comparação entre número de células viáveis e o número de células cultiváveis de dada amostra (RAMAMURTHY *et al.*, 2014) Considera-se que, se o número de células cultiváveis diminuir a níveis indetectáveis, mas ainda se têm células viáveis, a população é considerada como em estado VNC (LI *et al.*, 2014). Em geral, a avaliação da culturabilidade é realizada em meios ricos como ágar tripcaseína e soja (TSA) ou caldo nutriente (NB) que minimizem a ocorrência de estresses e favoreçam o crescimento (CARO *et al.*, 1999; OZKANCA *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2013).

Técnicas microscópicas podem ser utilizadas para a detecção de células metabolicamente ativas em amostras onde não é observada a culturabilidade, ou seja, células no estado VNC. A observação do alongamento celular na presença de ácido nalidíxico em microscópio ótico permite diferenciar células viáveis de células metabolicamente inativas (FAKRUDDIN *et al.*, 2013). Corantes fluorescentes também podem ser utilizados, a exemplo do composto cloreto de tetrazólio 5-ciano-2,3-ditolil (CTC) que pode ser reduzido por bactérias metabolicamente ativas que fazem com que o composto seja

precipitado apresentando uma fluorescência vermelha. Para gerar contraste, se utiliza outro corante, como o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), um marcador fluorescente que atravessa de forma eficiente a membrana das células mortas, corando-as de azul (CAPPELIER *et al.*, 1997; BESNARD *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2012). O kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> é outra alternativa para distinguir células vivas de mortas por microscopia e no qual são usados dois corantes fluorescentes com características distintas de permeabilidade celular: o Syto<sup>®</sup> 9 que permeia todas as células, independente da presença de danos na membrana e cora as células de verde e o iodeto de propídio, que permeia somente as células com danos na membrana e, portanto, cora as células mortas de vermelho (LINDBÄCK *et al.*, 2010; DINU e BACH, 2011; HOEFMAN *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013; POSTNIKOVA *et al.*, 2015).

A contagem de colônias em placas ou de células ao microscópio constituem métodos tradicionais para determinação de bactérias. Atualmente, muitas outras técnicas estão disponíveis para a análise de uma única célula e a citometria de fluxo é uma dessas ferramentas que pode ser utilizada para a detecção de células viáveis, com a vantagem de ser mais precisa (MORISHIGE *et al.*, 2015). Outra vantagem destacada da técnica de citometria de fluxo é a capacidade de obter medidas específicas em grande número de células em tempo curto e com pouco esforço. Em um citômetro de fluxo, cerca de 200 a 2.000 células circulam por segundo através de um detector e o circuito eletrônico captura de cada partícula, a luz dispersada e a fluorescência emitida a diferentes comprimentos de onda de excitação (GASOL e DEL GIORGIO, 2000).

A ocorrência de células no estado VNC também tem sido avaliada pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), mas a técnica pode superestimar a quantidade das células viáveis, pois o DNA de células mortas pode ser simultaneamente extraído e amplificado (NOCKER *et al.*, 2006). Uma alternativa para que técnicas baseadas em PCR possam detectar exclusivamente células viáveis é o uso de agentes intercalantes do DNA, como etídeo monoazida (EMA) e propídio monoazida (PMA) que podem penetrar em células com membranas danificadas e impedir a amplificação do DNA de células mortas (CAWTHORN e WITTHUHN, 2008).

Características das células como, atividade metabólica e produção de RNA mensageiro (mRNA) também são utilizadas para a detecção de células no

estado VNC. Apesar das células no estado VNC terem atividade metabólica diminuída, esta ainda pode ser medida pelo o kit BacTiter-Glo Microbial (Promega, Madison, WI, EUA) que quantifica ATP. Pela curta vida que apresenta, o mRNA é um sinal de viabilidade em uma população e foi usado por Lindbäck *et al.* (2010) para detectar células de *Listeria monocytogenes* que não apresentavam crescimento, permitindo comprovar que as células se encontravam no estado VNC. Essa técnica já foi também utilizada na determinação de populações no estado VNC de *V. cholerae* (BEJ *et al.*, 1996); de *E. coli* (SHERIDAN *et al.*, 1998) e de *Vibrio parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005).

### **Recuperação de células no estado VNC**

Identificar as condições que permitam a recuperação da culturabilidade de células no estado VNC é importante para favorecer melhor adequação das técnicas de avaliação da contaminação de alimentos e, conseqüentemente, garantir a segurança alimentar (OLIVER, 2010; LI *et al.*, 2014). O termo ressuscitação foi utilizado inicialmente por Roszak *et al.* (1984) e se refere à capacidade das células no estado VNC de recuperar a culturabilidade, no qual ocorre uma reversão das modificações metabólicas e fisiológicas que impediam a culturabilidade (PINTO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014). Este fenômeno é diferente da recuperação da culturabilidade de uma célula injuriada que cresce após a retirada do estresse presente no meio que estava impedindo sua multiplicação. Para determinar a recuperação da culturabilidade de uma célula no estado VNC é fundamental que toda a população esteja no estado VNC para garantir que o crescimento não seja produto de células injuriadas, ou seja, de células cultiváveis (PINTO *et al.*, 2013).

Diferentes micro-organismos podem necessitar de condições distintas para recuperar a culturabilidade. Um dos primeiros estudos a observar este fenômeno de recuperação da culturabilidade foi realizado em 1984, por Roszak *et al.*, que observaram a recuperação de células de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC por meio da adição de nutrientes ao microcosmo em que as células se encontravam. Este estudo foi o ponto de partida para a pesquisa nessa área.

Diferentes metodologias já foram utilizadas para favorecer o processo de recuperação da culturabilidade e incluem mudanças de temperatura (BATES e OLIVER, 2004; LEMKE e LEFF, 2006), adição de substâncias como aminoácidos (PINTO *et al.*, 2011), enzimas como catalase (KONG *et al.*, 2004; ZENG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014), piruvato de sódio (MORISHIGE *et al.*, 2013); de sobrenadantes de culturas (ASAKURA *et al.*, 2002; AYRAPETYAN *et al.*, 2014) e pela passagem por ambientes complexos como modelos animais (BAFFONE *et al.*, 2006). Os trabalhos mostram que 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).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERON, L.; KHEMIRI, A.; KOUBAR, M.; LACOMBE, C.; COQUET, L.; COSETTE, P.; FRERE, J. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. **Water Research**, v. 47, p. 6606-6617, 2013.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M.; BERNARDO, A.; HILL, C.; LÓPEZ, M. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v.45, p. 482-492, 2012.

ASAKURA, H.; MAKINO, S. I.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology** , v. 212, n. 1, p. 87-93, 2002.

ASAKURA, H.; IGIMI, S.; KAWAMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, B. 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, p. 243–249, 2005.

AVILES B.; KLOTZ, C.; SMITH, T.; WILLIAMS, R.; PONDER, M. Survival of *Salmonella enterica* serotype Tennessee during simulated gastric passage is improved by low water activity and high fat content. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 2, p., 333-337, 2013.

BAFFONE, W.; CASAROLI, A.; CITTERIO, B. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 83–91, 2006.

BATES, T. C.; OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state of kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 74–79, 2004.

BEJ, A. K.; NG, W. Y.; MORGAN, S.; JONES, D. D.; MAHBUBANI, M. H. Detection of viable *Vibrio cholerae* by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 1996.

BEAL, R. K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 151–164, 2004.

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

BURNETT, S. L.; GEHM, E. R.; WEISSINGER, W. R.; BEUCHAT, L. R Survival of *Salmonella* in peanut butter and peanut butter spread. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 472–477, 2000.

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

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

CAPPELIER, J. M.; LAZARO, B.; ROSSERO, A.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; FEDERIGHI, M. Double staining (CTC-DAPI) for detection and enumeration of

viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. **Veterinary Research BioMed Central**, v. 28, n. 6, p. 547-555, 1997.

CARO, A.; GOT, P.; LESNE, J.; BINARD, S.; BALEUX, B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3229–3232, 1999.

CAWTHORN, D. M.; WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1178–1185, 2008.

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

D'AOUST, J.; MAURER, J. *Salmonella* Species. In Doyle, M. Beuchat, L. (ed), **Food Microbiology**, v. 3, p. 187-236, 2007.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1–17, 2001.

DEL CAMPO, R.; RUSSI, P.; MARA, P.; MARA, H.; PEYROU, M.; LEÓN, I.; GAGGERO, C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. **FEMS Microbiology**, v. 298, 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.



DOLEZALOVA, E.; LUKES, P. Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. **Bioelectrochemistry**, v. 103, p. 7–14, 2015.

DU, M.; CHEN, J.; ZHANG, X.; LI, A.; LI, Y.; WANG, Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1349–1354, 2007.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K.; ANDREWS, S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. **International Scholarly Research Notices Microbiology**, v. 4, p. 245-252, 2013.

GABRIEL, A.; NAKANO, H. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. **Food Control**, v. 20, p. 443-446, 2009.

GASOL, J. M.; DEL GIORGIO, P. A. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. **SCIENTIA MARINA**, v. 64, P.197-224, 2000.

GREENACRE, E.; BROCKLEHURST, T. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 62–65, 2006.

GRIFFIN, A.; MCSORLEY, S. Development of protective immunity to *Salmonella*, a mucosal pathogen with a systemic agenda. **Mucosal Immunology**, v. 4, p. 371-382, 2011.

GUPTE, 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, p. 6669-6675, 2003.

HOELZER, K.; MORENO SWITT, A. I.; WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1-28, 2011.

HOEFMAN, S.; HOORDE, K.; BOON, N.; VANDAMME, P.; DE-VOS, P.; HEYLEN, K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. **Plos One**, v.7, n. 4, 2012.

JACOBSEN, A.; HENDRIKSEN, R. S.; AARESTURP, F. M.; USSERY, D. W.; & FRIIS, C. The *Salmonella enterica* pan-genome. **Microbial Ecology**, v.62, p. 487-504, 2011.

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

JUNG, Y. S.; BEUCHAT, L. R. Survival of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 1-8, 1999.

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

KINGSLEY, R. A.; BÄUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 1006-1014, 2000.

LEMKE M. J.; LEFF, L.; G. Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population levels. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 365–374, 2006.

KONG, I.; BATES, T.; HULSMANN, A.; HASSA, H.; SMITH, B.; OLIVER, J. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, p. 133–142, 2004.

LI, L.; MENDIS, N.; TRIGUI, H.; OLIVER, J. D.; FAUCHER, S. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-20, 2014.

LINDBÄCK, T.; ROTTENBERG, M. E.; ROCHE, S. M.; RØRVIK, L. M. 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. 8, p. 1-10, 2010.

MAGAJNA, B. A.; SCHRAFT, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. **Food Control**, v. 50, p. 45–50, 2015.

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

MCWHORTER, A. R.; DAVOS, D.; CHOUSALKAR, K. Pathogenicity of *Salmonella* strains isolated from egg shells and the layer farm environment in Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, 2015.

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

MOCK, N. M.; BAKER, C. J.; AVER'YANOV, A. A. Induction of a viable but not culturable (VBNC) state in some *Pseudomonas syringae* pathovars upon exposure to oxidation of an apoplastic phenolic, acetosyringone. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 89, p.16–24, 2015.

MORISHIGE, Y.; FUJIMORI, K.; AMANO, F. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 9, p, 1255-1264, 2015.

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

MUKAMOLOVA, G. V.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B., & YOUNG, M. Adoption of the transiently non-culturable state: a bacterial survival strategy? **Advances in Microbial Physiology**, v. 47, p. 65-129, 2003.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 310–320, 2006.

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 Water and Health**, v. 3, p. 249–257, 2005.

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

OZKANCA, R.; SARIBIYIKB, F.; ISIKA, K.; SAHINA, N.; KARIPTASC, E.; FLINT, P. Resuscitation and quantification of stressed *Escherichia coli* K12

NCTC8797 in water samples. **Microbiological Research**, v. 164, p. 212-220, 2009.

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

PASQUALI, F.; KLEIN, G.; REICH, F.; MANFREDA, G.; VALERO, A. Modelling survival behavior of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, Typhimurium and Tennessee on table eggs during storage at different temperatures. **Food Control**, v. 59, p. 314–319, 2016.

PASSERAT, J.; GOT, P.; DINKAN, S.; MONFORT, P. Respective roles of culturable and viable-but-nonculturable cells in the heterogeneity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5179-5185, 2009.

PINTO, D.; ALMEIDA, V.; SANTOS, M.; CHAMBEL, L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1601–1611, 2011.

PINTO, D.; SANTOS, M.; 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; SHAO, J.; MOCK, N. M; BAKER, C. J.; NEMCHINOV, L. V. Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-14, 2015.

QUIRÓS, C.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable sub populations to

malolactic fermentation processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2977–2981, 2009.

RAMAMURTHY, T.; GHOSH, A.; PAZHANI, G.; SHINODA, S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1-19, 2014.

REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; WILLIAMS, P. H. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4788–4794, 2002.

RODRIGUES, R. C.; MARTINS, E.; VANETTI, M. C. D.; PINTO, U. M.; SANTOS, M. T. Induction of the viable but nonculturable state of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis deficient in (p)ppGpp synthesis. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 2171-2178, 2015.

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

SARDESSAI, Y. Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. **Current Science-Bangalore**, v. 89, p.1650, 2005

SHEN, H.; YU, R.; CHOU, C. Acid adaptation affects the viability of *Salmonella* Typhimurium during the lactic fermentation of skim milk and product storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 380-385, 2007.

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

SIGNORETTO, C.; LLEÒ, M. M.; TAFI, M.; CANEPARI, P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1953-1959, 2000.

TINDALL, B.; GRIMONT, P.; GARRITY, G.; EUZEBY, J. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521-524, 2005.

WIEDEMANN, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I.; CHAUSSÉ, A. M.; SCHIKORA, A.; VELGE, P. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-18, 2014.

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

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

ZENG, B.; ZHAO, G.; CAO, X.; YANG, Z.; WANG, C. H.; HOU, L. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2012.

ZHAO, F.; BI, X.; HAO, Y.; LIAO, X. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure CO<sub>2</sub> and its characteristics. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2013.

# Capítulo 1

## Indução e caracterização de células de *Salmonella* no estado viável não cultivável

### RESUMO

*Salmonella* tem a capacidade de entrar no estado viável não cultivável (VNC) em condições de estresses. As células nesse estado fisiológico são caracterizadas pela perda da capacidade de crescimento em meios de cultivo de rotina dificultando a detecção por metodologias de cultivo convencionais, resultando na subestimação das células viáveis na amostra. Células de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium foram induzidas ao estado VNC em solução tampão fosfato de Butterfield (0,6 M de NaCl), solução salina (1,2 M de NaCl), ácido peracético (5,66 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (1,2 mg/mL), mantidas a 4 °C. A perda da culturabilidade foi acompanhada em caldo e ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e a viabilidade determinada pela microscopia de fluorescência, com uso do kit Live/Dead<sup>®</sup> e citometria de fluxo. Além disso, foi realizada a caracterização morfológica por microscopia de força atômica (MFA). Em condições de estresse nutricional e osmótico a entrada em estado VNC ocorreu em períodos acima de 93 dias, mas estas condições favoreceram a manutenção de maior percentagem de células viáveis, com valores acima de 80,9 %. Condições de estresses mais agressivas como ácido ou oxidativo induziram a entrada em estado VNC em períodos de, no máximo 24 horas, mas resultaram em percentagens de 8,51 % a 45,5 % de células viáveis. As células submetidas aos estresses nutricional e osmótico apresentaram alterações morfológicas, com redução do tamanho e alteração da forma bacilar para cocóide; alterações que não foram evidenciadas quando os estresses ácido ou oxidativo foram utilizados.



## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* é o patógeno mais frequentemente relacionado às infecções causadas pela ingestão de alimentos de origem animal (BRADEN, 2006; XIAO *et al.*, 2015). Esse patógeno apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes condições de estresse (D'AOUST, 2007) e a entrada em estado viável não cultivável (VNC) é um dos mecanismos de resposta ao estresse observado em *Salmonella* (ROSZAK *et al.*, 1984; ASAKURA *et al.*, 2002; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2013; RAMAMURTHY *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015). Neste estado, a célula perde a capacidade de crescimento em meios de cultivo de rotina, mas conserva a viabilidade e a patogenicidade (ASAKURA *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2014; RAMAMURTHY *et al.*, 2014).

Diversas condições de estresse podem induzir a entrada de *Salmonella* em estado VNC, tais como estresse nutricional (REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003; PANUTDAPORN *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015), baixas temperaturas (GUPTA *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2012), estresse ácido (JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006), estresse osmótico (ASAKURA *et al.*, 2002, PANUTDAPORN *et al.*, 2006), estresse oxidativo e sanitizantes (FERNANDES *et al.*, 2014; OLIVER *et al.*, 2005). Tratamentos com campo elétrico pulsado (SPILIMBERGO *et al.*, 2014), radiação ultra-violeta (UV) (CARO *et al.*, 1999) e sulfato de cobre (ZENG *et al.*, 2012) também foram relacionados à indução do estado VNC em *Salmonella*.

A indução de bactérias ao estado VNC é acompanhada por diversas mudanças celulares, tais como a diminuição da atividade metabólica e da expressão de genes, além de mudanças morfológicas (PINTO *et al.*, 2013; RAMAMURTHY *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015). Além disso, células em estado VNC podem manter sua capacidade de virulência e já foram relacionadas com a ocorrência de infecções alimentares (MAKINO *et al.*, 2000; ASAKURA *et al.*, 2002). Entretanto, ainda não se sabe quais as diferenças relacionadas ao tempo de indução e as modificações celulares causadas pelas diversas condições utilizadas para o processo de indução de *Salmonella* ao

estado VNC. Apesar dos avanços nas pesquisas feitos até agora, estudos que comparem as diversas condições que levam à entrada deste patógeno ao estado VNC são escassos, mas necessários para gerar informações importantes como o tempo de indução e a resistência particular adquirida pelas células em situações distintas. Li *et al.* (2014) ressaltaram a importância de estudos que forneçam informações sobre o efeito de diferentes condições que permitem a entrada no estado VNC.

Considerando que pouco é conhecido sobre o processo de indução ao estado VNC, particularmente sobre o comportamento das células induzidas por diferentes condições estressantes e a necessidade de ampliar o conhecimento de bactérias em estado VNC, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar o processo de indução do estado VNC em *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium, com o uso de diferentes condições de estresse presentes rotineiramente na indústria de alimentos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo

*S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 estirpe 578 foram utilizadas para indução do estado VNC. As culturas oriundas da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) foram armazenadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia), acrescido de glicerol (20 %) e mantidas a - 20 °C. A reativação das culturas foi realizada em caldo BHI a  $37 \pm 1$  °C, por 9 h.

### 2.2. Caracterização das soluções para a indução do estado VNC

A indução de *Salmonella* ao estado VNC foi feita em condições de estresse nutricional, osmótico, ácido ou oxidativo, todos com incubação a baixa temperatura ( $4 \pm 1$  °C). As soluções utilizadas para indução do estado VNC foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: atividade de água ( $A_w$ ), potencial hidrogênio-iônico (pH) e potencial redox (Eh). As medidas de  $A_w$  foram realizadas em analisador de atividade de água (AquaLab Cx-2, Pullman, Estados Unidos). O pH e o Eh foram avaliados em potenciômetro (pH 21, Hanna, Romênia) e os resultados obtidos foram apresentados como média de três repetições. As concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com o protocolo de Peróxidos Brasil<sup>®</sup> (2015).

### 2.3. Indução do estado viável não cultivável

Após a reativação das células em estoque, as culturas de *Salmonella* foram estriadas em ágar xilose lisina desoxicolato (XDL, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 h. Uma colônia foi transferida para 10 mL de caldo BHI e incubada a  $37 \pm 1$  °C por 8 horas. Após este período, as

células foram centrifugadas a 5000 g durante 20 min, a 4 °C, lavadas por seis vezes em solução salina 0,85 % e ressuspendidas em solução salina 0,85 %. O grande número de lavagens objetivou garantir a remoção de resíduos do meio de cultivo para indução do estado VNC.

As células de *Salmonella* foram submetidas às condições de estresse nutricional e osmótico pelo uso de solução fosfato de Butterfield (BPS) acrescido de cloreto de sódio (0,6 M) ou em solução salina (1,2 M). Alíquotas de 1 mL da suspensão de células foram adicionadas a 300 mL de cada solução e mantidas a  $4 \pm 1$  °C.

As condições de estresse ácido ou oxidativo foram realizadas em solução salina a 0,85 %, acrescida de 5,66 mg/mL de ácido peracético (Voxilon AN Thech Desinfecções, São Paulo, Brasil) ou 1,20 mg/mL de peróxido de hidrogênio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) respectivamente. Para indução do estado VNC, as células foram ressuspendidas em 40 mL de solução de ácido peracético ou peróxido de hidrogênio. Todas as suspensões de células foram submetidas a baixa temperatura, pelo armazenamento a  $4 \pm 1$  °C e estresse nutricional.

#### **2.4. Avaliação da culturabilidade**

Para a determinação da culturabilidade, alíquotas de 1 mL das suspensões de células de *Salmonella* submetidas às diferentes condições de indução ao estado VNC foram inoculadas em caldo BHI e alíquotas de 100 µL plaqueadas em ágar BHI (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Os tubos e placas foram incubados a  $37 \pm 1$  °C durante 24 a 96 horas. Este procedimento foi realizado a cada 15 dias com as células mantidas no tampão BPS ou em solução salina, acrescida de 1,2 M de cloreto de sódio até não se observar crescimento microbiano, caracterizado pela turvação visual do meio ou pela formação de colônias em ágar. A viabilidade das células submetidas aos tratamentos com ácido peracético ou peróxido de hidrogênio foi também determinada pelo cultivo de 1 mL da suspensão de células estressadas em caldo BHI, com o monitoramento da entrada no estado VNC feito a cada hora, durante 12 horas.

Quando não se constatou a turvação do caldo BHI inoculado com

alíquotas de 1 mL, alíquotas de 10 mL de cada amostra foram coletadas, centrifugadas a 5000 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga 4K 15 Sigma, Harz, Alemanha). As células recuperadas foram ressuspensas em 0,1 mL de solução salina 0,85 %. A suspensão de cada amostra foi plaqueada pelo método de espalhamento em superfície em ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por, no mínimo, 96 horas para comprovar a perda da culturabilidade.

A viabilidade das células submetidas aos estresses por ácido peracético ou por peróxido de hidrogênio foi também verificada por plaqueamento de 200 µL da suspensão de células em ágar BHI a cada 15 min, por, no máximo 4 horas. Antes do plaqueamento, o ácido peracético e o peróxido de hidrogênio foram neutralizados segundo Vasquez-Sánchez *et al.* (2014) com as seguintes modificações: a lavagem com a solução neutralizante foi feita três vezes e a exposição na solução neutralizante foi feita durante 15 min no tratamento com ácido peracético e 10 min no tratamento com peróxido de hidrogênio.

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C, por 24 horas e, a contagem de colônias feita em contador de colônias (Phoenix Luferto CP 600, Araraquara, Brasil). O experimento foi feito em três repetições independentes e a média foi usada para traçar a curva de sobreviventes.

## **2. 5 Determinação da viabilidade de *Salmonella***

A viabilidade das células de *Salmonella* não cultiváveis foi determinada pela técnica de microscopia de fluorescência com o kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> (Invitrogen, Oregon, Estados Unidos) em diferentes tempos de permanência nas condições de estresses. Foram coletados 2 mL das células submetidas aos diferentes tratamentos de indução ao estado VNC e centrifugados a 5000 g durante 15 min, a  $4 \pm 1$  °C. Alíquota de 1 mL do sobrenadante foi descartado e, ao volume restante foi adicionado 3 µL de cada um dos corantes (Syto<sup>®</sup>9 e iodeto de propídio) e deixados no escuro durante 15 min. Após esse tempo, 10 µL da suspensão de células e corantes foram colocados em lâmina de vidro para visualização ao microscópio de fluorescência (Olympus BX50, Tokio, Japão) utilizando o filtro WG com comprimento de onda de excitação de 510 a 550 nm e emissão de 590 nm.

Além da visualização da morfologia e da viabilidade ao microscópio de fluorescência, foi feita a contagem de células. Estabeleceu-se como parâmetro, a contagem de 40 campos na lâmina, escolhidos aleatoriamente e se fez a contagem total das células por campo, diferenciando entre as células viáveis e mortas. Este procedimento foi feito em triplicata e o valor médio das contagens foi calculado e usado para determinar a percentagem de células vivas entre o total de células contadas.

A viabilidade celular também foi avaliada por citometria de fluxo. Para a preparação das amostras, foi coletado 1 mL da suspensão de células submetidas aos diferentes tratamentos de indução ao estado VNC. Diluições apropriadas foram preparadas e, a cada uma delas, adicionou-se 3  $\mu$ L de iodeto de propídio (20 mM, Invitrogen), deixando-o agir durante 10 min. Após esse tempo, as amostras foram colocadas no citômetro de fluxo (BD Biosciences, New Jersey, Estados Unidos) para realizar a medição. Este procedimento foi repetido por três vezes e os valores médios foram calculados e expressos como percentagem de células viáveis na amostra.

## **2.6. Avaliação da morfologia das células de *Salmonella* em estado VNC**

A morfologia das células em estado VNC, induzidas por diferentes tratamentos, foi avaliada em microscópio de força atômica (NT-MDT, N Ntegra Prima, Moscou, Rússia), em modo intermitente. Para o preparo das amostras, foi coletado 1 mL das células nos diferentes tratamentos de indução no estado VNC as quais foram centrifugadas a 7826 *g* durante 10 min (Hsiangtai Centrifuga D- 2000, Taipei, China). O sobrenadante foi descartado, 1 mL de solução salina 0,85 % foi colocado no tubo e as amostras foram novamente centrifugadas a 7826 *g* durante 10 min, a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por seis a sete vezes e, na última lavagem, a solução salina 0,85 % foi trocada por água destilada esterilizada. Este procedimento de lavagem das células permitiu a retirada de resíduos dos diferentes componentes presentes nos tratamentos de indução ao estado VNC. Após as sucessivas lavagens, alíquotas de 10  $\mu$ L das amostras foram colocadas em lâminas de vidro (1x1 cm) esterilizadas e foram deixadas em câmaras de fluxo laminar, próximas à chama do bico de Bunsen, até a completa secagem da

amostra. Depois disso, as lâminas foram deixadas em BOD a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  até sua visualização.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Indução de *Salmonella* ao estado VNC

As soluções usadas para estressar células de *Salmonella* e induzir a entrada em estado VNC apresentaram valores de Aw, pH ou Eh que podem causar estresses subletais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização das soluções usadas para estressar células de *S. enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium.

Soluções de tratamento	Atividade de água (Aw)	pH	Eh (Mili volts)
BPS + 0,6 M de NaCl (nutricional)	0,991	7,19	17
NaCl 1,2 M (nutricional, osmótico)	0,986	7,25	19
Ácido peracético (5,66 mg/mL) (nutricional, oxidativo, Ácido)	1,000	4,70	87
Peróxido de hidrogênio (1,2 mg/mL) (nutricional, oxidativo, Ácido)	1,003	5,02	78

A perda da culturabilidade foi monitorada nos diferentes tratamentos de indução do estado VNC. Os dados obtidos mostraram que um tempo maior é necessário para a perda da culturabilidade quando as células se encontram em estresse nutricional e osmótico, em tampão BPS adicionado de 0,6 M de NaCl ou em solução salina com 1,2 M de NaCl respectivamente, do que quando em estresse ácido ou oxidativo (Tabela 2).

Durante o monitoramento da entrada no estado VNC foi evidente a

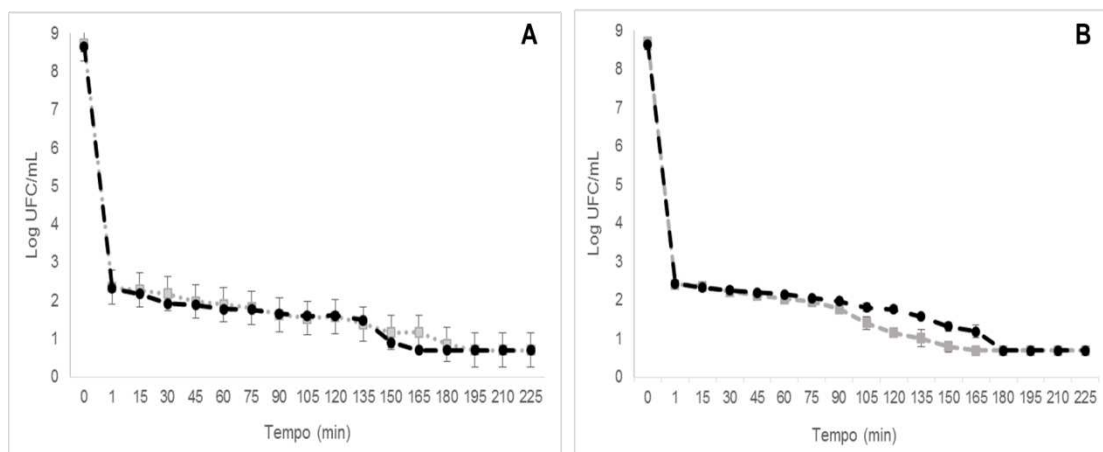


perda da capacidade de formação de colônias pelas células tratadas pelos diferentes estresses em tempo menor do que o observado no teste da culturabilidade feito em meio líquido (Tabela 2).

**Tabela 2.** Perda da culturabilidade em caldo BHI e da capacidade de formação de colônias em ágar BHI de células de *Salmonella* submetidas às diferentes condições de estresses a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Soluções de tratamento	Tempo de perda da culturabilidade			
	<i>Salmonella</i> Enteritidis		<i>Salmonella</i> Typhimurium	
	Caldo BHI (dias)	Ágar BHI (dias/horas*)	Caldo BHI (dias)	Ágar BH (dias/horas*)
BPS (0,6 M de NaCl)	221	192	143	93
Solução salina (1,2 M NaCl)	168	121	165	136
Ácido peracético (5,66 mg/mL)	1	3:30*	1	3*
Peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL)	1	3*	1	3*

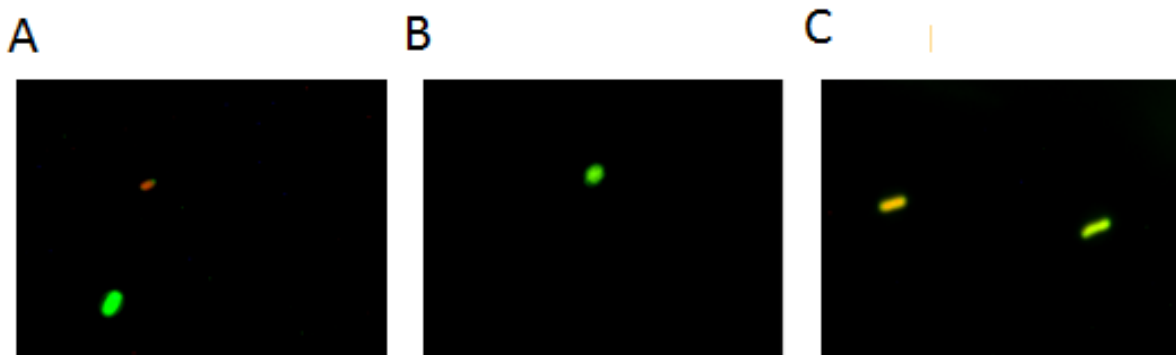
Não foram detectadas colônias em ágar BHI após 225 min de tratamento das células de *Salmonella* com ácido peracético ou peróxido de hidrogênio (Figura 1). A perda da capacidade de formação de colônias dos sorovares Enteritidis e Typhimurium de *Salmonella* quando expostos a estes agentes estressantes foi semelhante (Figura 1).



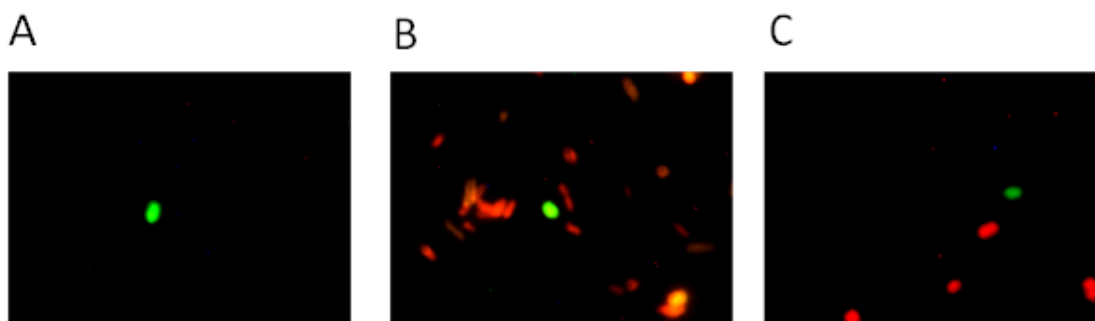
**Figura 1.** Sobrevivência de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium submetidas a estresse com soluções de A- ácido peracético (5,66 mg/mL) e B - peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL) a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Legenda: *Salmonella* Enteritidis (- ■-) e *Salmonella* Typhimurium (..●..).

### 3.2 Determinações da viabilidade de células de *Salmonella* em estado VNC

O teste viabilidade pelo kit Live/Dead<sup>®</sup> foi feito logo após a perda da culturabilidade das células submetidas aos diferentes tratamentos de indução ao estado VNC. A presença de células viáveis foi comprovada após a aplicação de todos os tratamentos pela constatação de células com coloração verde, dada pelo corante Syto<sup>®</sup> 9, o que indica a presença de células sem danos na membrana, ou seja, células viáveis (Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Imagens representativas de células de *Salmonella* Enteritidis coradas com kit Live/Dead<sup>®</sup>, onde células viáveis são verdes e células mortas vermelhas, obtidas por microscopia de fluorescência em microscópio Olympus BX50. Legenda: A - Células observadas 460 dias após a exposição ao estresse osmótico (1,2 M NaCl). B - Células observadas 1 dia após a exposição ao estresse com ácido peracético (5,66 mg/mL) e C - Células observadas 1 dia após a exposição ao estresse com peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL). Aumento 100.x



**Figura 3.** Imagens representativas de células de *Salmonella* Typhimurium coradas com kit Live/Dead<sup>®</sup> onde células viáveis são verdes e células mortas vermelhas, obtidas por microscopia de fluorescência em microscópio Olympus BX50. Legenda: A - Células observadas 460 dias após a exposição ao estresse osmótico (1,2 M NaCl), B - Células observadas 1 dia após a exposição ao estresse com ácido peracético (5,66 mg/mL) e C - Células observadas 1 dia após a exposição ao estresse com peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL). Aumento 100X

Com os dados das contagens de células totais e viáveis ao microscópio de fluorescência foi determinada a percentagem de células viáveis (Tabela 3). Verificou-se que células induzidas ao estado VNC pela manutenção em solução salina 1,2 M a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  permaneceram com maior proporção de viabilidade mesmo após o tempo de tratamento superior a 429 dias (Tabela 3). O tratamento com ácido peracético demonstrou ser o mais estressante para as células de *Salmonella*, por apresentar os menores percentuais de células viáveis: 8,51 e 21,30 %, de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, respectivamente (Tabela 3).

A percentagem de viabilidade obtida pela técnica de microscopia de fluorescência com o kit Live/Dead<sup>®</sup> das células submetidas aos tratamentos com ácido peracético e com peróxido de hidrogênio foi também determinada após 83 dias de armazenamento a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  e verificou-se que a proporção de células viáveis aumentou em relação ao que se havia encontrado no primeiro dia após a entrada no estado VNC (Tabela 4).

**Tabela 3.** Percentual de células viáveis de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Typhimurium mantidas em tratamentos estressantes a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  determinadas pela contagem ao microscópio de fluorescência utilizando o kit Live/Dead<sup>®</sup>.

Soluções de tratamento	Percentagem de células viáveis (%) <sup>*</sup>	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium
BPS + 0,6 M NaCl	Nd <sup>**</sup>	Nd
Solução salina 1,2 M NaCl	92,34	87,44
Ácido peracético (5,66 mg/L)	8,51	21,30
Peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL)	39,93	24,93

**Nota:** \*Médias de três repetições

\*\*Nd= não determinado

**Tabela 4.** Percentual de células viáveis determinadas pela contagem no microscópio de fluorescência utilizando o kit Live/Dead® após 83 dias de indução ao estado VNC.

Soluções de tratamento	Percentagem de células viáveis (%)*	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Ácido peracético (5,66 mg/mL)	54,45	46,70
Peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL)	37,80	30,10

**Nota:** \*Médias de três repetições

Os resultados de percentagem de células de *Salmonella* no estado VNC obtidos por citometria de fluxo (Tabelas 5 e 6) corroboraram os resultados obtidos por microscopia de fluorescência (Tabela 3 e 4). Confirmou-se que o tratamento em solução salina 1,2 M, apesar de demandar muito mais tempo para induzir a população à entrada no estado VNC, é o que mantém maior proporção de células viáveis (Tabelas 3 e 5).

**Tabela 5.** Porcentual de células viáveis de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Typhimurium mantidas em tratamentos estressantes a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  determinadas pela contagem em citômetro de fluxo.

Soluções de tratamento	Percentagem de células viáveis (%)*	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium
BPS + 0,6 M NaCl	Nd**	Nd
Solução salina 1,2 M NaCl	94,10	80,90
Ácido peracético (5,66 mg/L)	24,90	37,70
Peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL)	45,50	39,18

**Nota:** \*Médias de três repetições

\*\*ND = não determinado

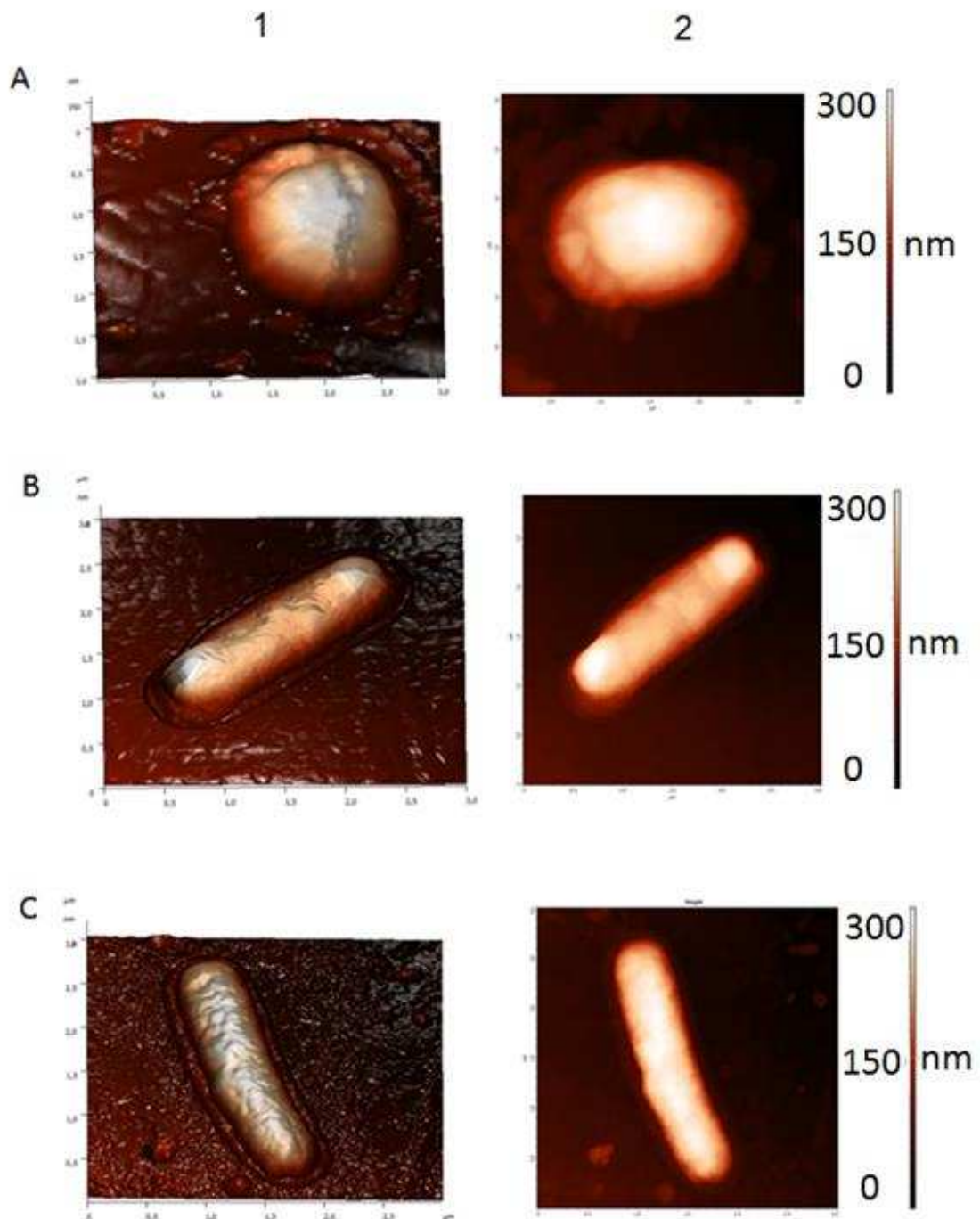
**Tabela 6.** Percentagem de células viáveis determinadas pela contagem no citômetro de fluxo após 83 dias de indução ao estado VNC.

Soluções de tratamento	Percentagem de células viáveis (%)*	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Ácido peracético (5,66 mg/mL)	53,4	44,2
Peróxido de hidrogênio (1,2 mg/mL)	93,2	47,0

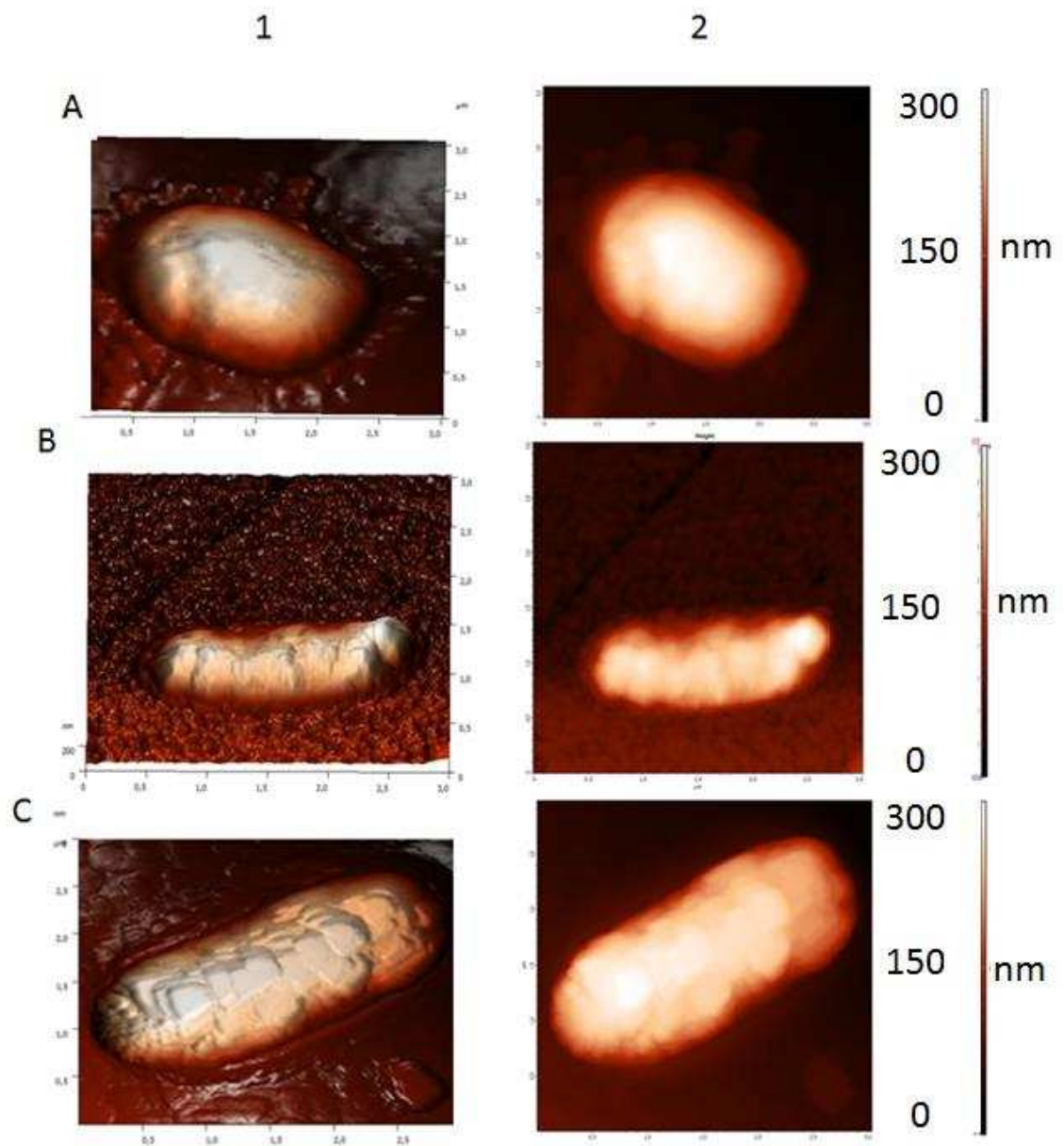
\*Médias de duas repetições

### 3.3 Caracterização morfológica de células em estado VNC

A caracterização morfológica das células de *Salmonella* em estado VNC foi feita pela microscopia de força atômica e esta técnica permitiu, além da visualização das células, a obtenção de dados como rugosidade da superfície, tamanho e forma da célula. Imagens representativas obtidas das células de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em VNC estão apresentadas nas figuras 4 e 5. É possível evidenciar que o tratamento com estresse osmótico 1,2 M de NaCl por 499 dias resultou em células de *Salmonella* Enteritidis com morfologia cocóide enquanto os estresses por ácido peracético e peróxido de hidrogênio, que resultaram em células em estado VNC em menos de 24 horas, permitiram a manutenção da forma bacilar (Figuras 4 e 5). A rugosidade da superfície celular parece bem mais acentuada nos tratamentos mais estressantes com ácido peracético ou peróxido de hidrogênio (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Imagens de microscopia de força atômica (MFA) de *Salmonella* Enteritidis em estado VNC induzido por diferentes condições de estresses. Legenda: Coluna 1 – Imagens em 3D. Coluna 2 – Imagens em 2 D. A - Células em estado VNC induzidas por 1,2 M de NaCl. B - Células em estado VNC induzidas por 5,66 mg/mL de ácido peracético. C – Células em estado VNC induzidas por 1,2 mg/mL de peróxido de hidrogênio.



**Figura 5.** Imagens de microscopia de força atômica (MFA) de *Salmonella* Typhimurium em estado VNC induzido por diferentes condições de estresses. Legenda: Coluna 1 – Imagens em 3D. Coluna 2 – Imagens em 2D. A- Células em estado VNC induzidas por 1,2 M de NaCl. B - Células em estado VNC induzidas por 5,66 mg/mL de ácido peracético. C – Células em estado VNC induzidas por 1,20 mg/mL de peróxido de hidrogênio.



#### 4. DISCUSSÃO

Os dois sorovares de *S. enterica* utilizados neste estudo estão entre os mais frequentemente associados a surtos de infecção alimentar e, portanto, a demonstração de que podem entrar em estado VNC quando submetidos a diferentes condições de estresses é relevante. No estado VNC, a presença de *Salmonella* em alimentos é subestimada e a sua não detecção representa riscos para a saúde do consumidor, pois a virulência pode ser mantida.

Embora *Salmonella* entre no estado VNC nas condições de estresses nutricional, osmótico, ácido ou oxidativo, associados à temperatura de 4 °C, o tempo de indução de células neste estado variou de acordo com as condições estressantes utilizadas. Quando o estresse nutricional foi associado ao salino e à baixa temperatura, células de *S. enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium entraram no estado VNC após, no mínimo, 93 dias em BPS + 0,6 M de NaCl ou 121 dias em solução salina 1,2 M de NaCl, tempo consideravelmente maior do que o registrado nas outras condições estressantes (Tabela 2). Ficou evidente que os estresses que apresentam maior desafio para a sobrevivência celular como, a exposição ao ácido peracético e ao peróxido de hidrogênio, fizeram com que a entrada no estado VNC ocorresse em menos de 24 horas, induzindo uma resposta oportuna rápida às condições de estresse.

Alguns trabalhos feitos em condições de estresse similares respaldam os resultados obtidos. Zeng *et al.* (2012) utilizam o estresse nutricional e a baixa temperatura (4 °C) para induzir *Salmonella* Typhi a entrar no estado VNC em 120 dias. Gupte *et al.* (2003) obtiveram *Salmonella* Typhimurium DT104 no estado VNC em solução tampão BPS 7,3500; 0,7350 ou 0,0735 mM a 5 °C em 273 dias. Esses autores consideraram que o tempo para que *Salmonella* Typhimurium DT104 entrasse no estado VNC foi maior do que valores registrados previamente com outras bactérias entéricas gram-negativas e atribuíram este resultado a maior resiliência deste sorovar. Conclusões de Anriany *et al.* (2001) também confirmaram que *Salmonella* Typhimurium DT104 apresenta uma resistência maior em diferentes condições de estresse. *Salmonella* Typhimurium em estado VNC foi obtida em águas residuais a 15 °C

e 28 °C após 200 dias (OLIVER *et al.*, 2005). *Salmonella* Enteritidis PT4 578 mantida em tampão BPS com 0,7 M NaCl a 4 °C entrou no estado VNC em 120 dias (MENDES, 2009), enquanto na presença de 0,6 M de NaCl, este tempo foi de 140 dias (RODRIGUES *et al.*, 2015).

O valor de pH 4,7 da solução de ácido peracético (5,66 mg/mL) (Tabela 1) é baixo o suficiente para gerar estresse ácido em *Salmonella* (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2012; GABRIEL, 2013; YANG *et al.*, 2014) e, junto com o potencial de oxidação alto (Tabela 1), em razão da presença de peróxido de hidrogênio na composição deste sanitizante, levou a redução drástica no tempo de entrada no estado VNC. A rápida resposta da célula às condições de estresse ácido que induz a entrada no estado VNC em um tempo curto já foi evidenciada anteriormente. Jolivet-Gougeon *et al.* (2006) documentaram a perda da capacidade de formação de colônias e a manutenção da viabilidade de *Salmonella* Typhimurium LT2 após 1 hora de tratamento com 15 mg/L de ácido peracético em temperatura de 15 °C. Outras bactérias apresentaram comportamento semelhante, como estirpes de *Campylobacter jejuni* que, em presença de ácido fórmico, em pH 4,0, entraram no estado VNC em períodos de 1 a 2 horas (CHAVEERACH *et al.*, 2003). No trabalho feito por Cunningham *et al.* (2009), *Listeria monocytogenes* submetida ao estresse ácido com sorbato de potássio a pH 4,0 entrou no estado VNC 7 horas após a exposição ao estresse.

O potencial oxidativo do peróxido de hidrogênio (1,20 mg/mL) associado ao estresse ácido da solução (pH 5,02) (Tabela 1) foi suficiente para induzir as células de *S. enterica* Enteritidis e Typhimurium ao estado VNC em tempo menor do que 24 horas. A rápida entrada em VNC induzida pelo peróxido de hidrogênio também foi registrada com outras bactérias. Asakura *et al.* (2005) utilizaram peróxido de hidrogênio a 0,5 mg/mL, pH 4,0 e verificaram que células de *E. coli* O157:H7 perderam a culturabilidade com manutenção da viabilidade depois de 6 horas de tratamento. Nowakowska e Oliver (2013) induziram células de *Vibrio vulnificus* ao estado VNC por estresse oxidativo utilizando 0,2 mM de peróxido de hidrogênio e verificaram perda da capacidade de formação de colônias após 1 hora de tratamento.

A perda da culturabilidade e a manutenção da viabilidade são os parâmetros fundamentais para a detecção de células no estado VNC (GUPTE

*et al.*, 2003). A perda da culturabilidade foi primeiramente observada quando alíquotas das suspensões de células foram inoculadas em ágar BHI (Tabela 2). Entretanto, quando se tratava da solução salina com 1,2 M de NaCl, deve-se considerar que as alíquotas analisadas eram menores, isto é, 0,1 mL foi analisado em ágar BHI e 1 mL foi analisado em caldo BHI. Nas avaliações da culturabilidade das células tratadas com ácido peracético ou peróxido de hidrogênio, as alíquotas analisadas foram do mesmo volume e verificou-se que em meio sólido, a culturabilidade foi perdida em tempo menor (Tabela 2). Este resultado provavelmente se deve ao fato de que os meios líquidos permitem maior troca de nutrientes fazendo com que populações bacterianas possam crescer com maior facilidade. A comparação dos resultados nos testes de culturabilidade em caldo e ágar BHI permite sugerir a utilização de meios líquidos para garantir a detecção da perda da culturabilidade da população, gerando dados mais precisos. Na literatura são encontrados trabalhos de verificação da culturabilidade tanto em meios líquidos (JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2015) como em meios sólidos (COUTARD *et al.*, 2005; PASSERAT *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2012; MAGAJNA e SCHRAF, 2015; DOLEZALOVA e LUKES, 2015; MORISHIGE *et al.*, 2015).

Os diferentes tipos de estresse usados não só induziram a entrada de *Salmomella* no estado VNC em tempos diferentes, mas também influenciaram na taxa de sobrevivência da população (Tabelas 3 a 6). Não foi encontrada, na literatura consultada, a comparação da sobrevivência de *Salmonella* submetida às diferentes condições de estresses para induzir a entrada em estado VNC. Entretanto, esse tipo de comparação foi feita com outras bactérias. Asakura *et al.* (2005) constataram diferença na percentagem de células viáveis de *E. coli* O157:H7 submetidas ao estresse osmótico ou oxidativo. No tratamento com NaCl a 13 %, a perda da culturabilidade foi observada após 72 horas e a viabilidade registrada foi de 18,8 % enquanto no estresse com peróxido de hidrogênio, a perda da culturabilidade ocorreu em 6 horas e a viabilidade foi de 48,6 % (ASAKURA *et al.* 2005). Outro exemplo é *C. jejuni* que apresentou diferenças na sobrevivência das populações em diferentes estresses. No estresse com ácido fórmico em pH 4,0, as três estipes avaliadas perderam a culturabilidade após 2 horas e a viabilidade foi mantida entre 50,4 % e 60,8 %

(CHAVEERACH *et al.*, 2003). Esses resultados são indicativos de que existe relação entre o tempo de entrada no estado VNC e a porcentagem de células sobreviventes na população e que, estresses mais brandos, que demandam maior tempo para induzir a entrada no estado VNC, permitem maior adaptação da população, aumentando a porcentagem de sobrevivência. O aumento da proporção de células viáveis submetidas a estresse ácido ou oxidativo após 83 dias de tratamento (Tabelas 4 e 6) pode ser pelo fato das células que conseguiram entrar no estado VNC manterem a viabilidade por períodos prolongados de tempo, enquanto as células mortas perdem a integridade da membrana, fazendo com que o número total de células diminua ao longo do tempo e a relação entre células vivas e mortas aumente.

O kit Live/Dead é frequentemente usado para determinar a viabilidade bacteriana (LINDBÄCK *et al.*, 2010; DINU e BACH, 2011; HOEFMAN *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013; POSTNIKOVA *et al.*, 2015) mas apresenta limitações, pois, segundo Khan *et al.* (2010) o corante Syto<sup>®</sup>9, que é usado como indicador de membranas intactas presentes em células vivas, pode, algumas vezes, ser excluído por algumas bactérias viáveis. A citometria de fluxo, associada às técnicas de coloração para diferenciar células vivas e mortas é considerada mais rápida, sensível e precisa. Entretanto, os resultados da porcentagem de células sobreviventes pelas duas técnicas foram similares na maioria dos dados obtidos. Por ambas as técnicas, a maior porcentagem de células viáveis foi encontrada nas soluções de células em VNC induzidas pelo estresse nutricional e osmótico, após períodos superiores a 429 dias.

As mudanças morfológicas observadas nas células de *Salmonella* no estado VNC (Figuras 4 A e 5 A) fazem parte das adaptações necessárias para a sobrevivência em ambientes estressantes. Essas mudanças são evidenciadas em períodos de exposição de condições de estresse prolongados e são características típicas de células no estado VNC (PINTO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014). A forma cocóide de *Salmonella* em estado VNC foi também relatada por Zeng *et al.* (2012); Gupte *et al.* (2013) e Rodrigues *et al.* (2015). Lagha *et al.* (2015) verificaram que células de *Salmonella* Typhimurium mantidas em microcosmo de água do mar por 3 anos apresentaram geralmente a forma bacilar, medindo cerca de 2,5 µm de comprimento, mas formas cocóides e intermediárias, medindo de 0,6 a 1 µm também foram detectadas,

além de células alongadas, com cerca de 7,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. Segundo Jiang e Chai (1996), a redução do tamanho celular durante estresse é uma estratégia de sobrevivência que minimiza as exigências para manutenção da célula e aumenta a captação do substrato com a alta relação da superfície/volume. De fato, Rodrigues *et al.* (2015) constataram a redução do volume de células de *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 de 0,63  $\mu\text{m}^3$  na ausência de estresse para 0,18  $\mu\text{m}^3$  em células em VNC.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diferentes condições de estresse podem levar *Salmonella* a entrar no estado VNC. O tempo de entrada é influenciado pelo tipo de estresse, sendo que condições que representem um desafio maior para a sobrevivência das células reduzem o tempo de entrada no estado VNC, mas diminuem a percentagem de sobreviventes na amostra. Algumas características típicas das células como a mudança morfológica são mais facilmente detectadas em condições que demandem tempo maior para entrar no estado fisiológico o que mostra a complexidade de processos que ocorrem na célula no estado VNC.

É importante realizar a caracterização das possíveis mudanças na composição da membrana e análises dos genes expressos durante a entrada no estado VNC com o objetivo de melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos nesta fase de resistência celular.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M.; BERNARDO, A.; HILL, C.; LÓPEZ, M. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v.45, p. 482-492, 2012.

ANRIANY, Y. A.; WEINER, R. M., JOHNSON, J. A.; DE REZENDE, C. E.; JOSEPH, S. W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4048-4056, 2001.

ASAKURA, H.; MAKINO, S.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 1, p. 87-93, 2002.

ASAKURA, H.; IGIMI, S.I.; KAWAMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, B. 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, p. 243–249, 2005.

BRADEN, C. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 512-517, 2006.

CARO, A.; GOT, P.; LESNE, J.; BINARD, S.; BALEUX, B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3229–3232, 1999.

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

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

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

D'AOUST, J.; MAURER, J. *Salmonella* Species. In Doyle, M. Beuchat, L. (ed), **Food Microbiology**, v. 3, p. 187-236, 2007.

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.

DOLEZALOVA, E.; LUKES, P. Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. **Bioelectrochemistry**, v. 103, p. 7–14, 2015.

FERNANDES, E.; MARTINS, V. C.; NÓBREGA, C.; CARVALHO, C. M.; CARDOSO, F. A.; CARDOSO, S.; AZEREDO, J. Bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, n. 15, p. 239-246, 2014.

GABRIEL, A. Influences of simultaneous physicochemical stresses on injury and subsequent heat and acid resistances of *Salmonella* Enteritidis in apple juice. **Food Control**, v. 31, p. 28-34, 2013.



GUPTE, 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, p. 6669-6675, 2003.

HOEFMAN, S.; HOORDE, K.; BOON, N.; VANDAMME, P.; DE-VOS, P.; HEYLEN, K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. **Plos One**, v.7, n. 4, p. 1-9, 2012.

JIANG, X.; CHAI, T. J. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1300–1305, 1996.

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

KHAN, M. M. T.; PYLE, B. H.; CAMPER, A. K. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5088-5096, 2010.

LAGHA, R.; BELLON-FONTAINE, M. N.; RENAULT, M.; BRIANDET, R.; HERRY, J. M.; MRABET, B.; CHEHIMI, M. M. Impact of long-term starvation on adhesion to and biofilm formation on stainless steel 316 L and gold surfaces of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 399–409, 2015.

LI, L.; MENDIS, N.; TRIGUI, H.; OLIVER, J. D.; FAUCHER, S. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-20, 2014.

LINDBÄCK, T.; ROTTENBERG, M. E.; ROCHE, S. M.; RØRVIK, L. M. 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. 8, p. 1-10, 2010.

MAGAJNA, B. A.; SCHRAFT, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 C more quickly than their planktonic counterparts. **Food Control**, v. 50, p. 45–50, 2015.

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. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n. 9, p, 1255-1264, 2015.

NOWAKOWSKA, J.; OLIVER, J. D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, n.1, 213-222, 2013.

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 Water and Health**, v. 3, p. 249–257, 2005.

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

PASSERAT, J.; GOT, P.; DINKAN, S.; MONFORT, P. Respective roles of culturable and viable-but-nonculturable cells in the heterogeneity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5179-5185, 2009.

PINTO, D.; ALMEIDA, V.; SANTOS, M.; CHAMBEL, L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1601–1611, 2011.

PINTO, D.; SANTOS, M.; 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.; SHAO, J.; MOCK, N. M.; BAKER, C. J.; NEMCHINOV, L. G. Gene Expression Profiling in Viable but nonculturable (VBNC) Cells of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-14, 2015.

RAMAMURTHY, T.; GHOSH, A.; PAZHANI, G. P.; SHINODA, S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1-19, 2014.

REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; TSCHA, H.; WILLIAMS, P. H. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4788–4794, 2002.

RODRIGUES, R. C.; MARTINS, E.; VANETTI, M. C. D.; PINTO, U. M.; SANTOS, M. T. Induction of the viable but nonculturable state of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis deficient in (p)ppGpp synthesis. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 2171-2178, 2015.

SPILIMBERGO, S.; CAPPELLETTI<sup>A</sup>, M.; TAMBURINI, S.; FERRENTINO G.; FOLADORI<sup>B</sup>, P. Partial permeabilisation and depolarization of *Salmonella enterica* Typhimurium cells after treatment with pulsed electric fields and high pressure carbon dioxide. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2055-2062, 2014.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M.; IBUSQUIZA, P.; HERRERA, J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

XIAO, L.; ZHANG, Z.; SUN, X.; PAN, Y.; ZHAO, Y. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. **Food Control**, v. 57 p. 185-189, 2015.

YANG, Y.; KADIM, M. I.; KHOO, W. J.; ZHENG, Q.; SETYAWATI, M. I.; SHIN, Y. J., YUK, H. G. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 24-31, 2014.

ZENG, B.; ZHAO, G.; CAO, X.; YANG, Z.; WANG, C. H.; HOU, L. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2012.

ZHAO, F.; BI, X.; HAO, Y.; LIAO, X. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure CO<sub>2</sub> and its characteristics. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-9, 2013.

## Capítulo 2

### Recuperação da culturabilidade de *Salmonella enterica* no estado viável não cultivável

#### RESUMO

*Salmonella* é um dos patógenos mais frequentes associados com doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados e, em condições de estresse, entra em estado viável não cultivável (VNC). As condições que induzem *Salmonella* a sair do estado VNC ainda não são bem conhecidas e o objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de recuperação da culturabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium induzidas ao estado VNC por diferentes condições de estresse. A recuperação da culturabilidade foi avaliada em meio mínimo de sais (MMS) em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), suplementados com piruvato de sódio 10 mM, 1% de catalase, extrato livre de células de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Enterobacter cloacae* selvagem e transconjugante, incapaz de acumular acil homoserina lactonas. A recuperação da culturabilidade, monitorada por 96 horas em espectrofotômetro foi mais frequente em MMS, principalmente na presença de 1 % de catalase. O aumento na frequência de recuperação da culturabilidade também foi constatado quando os meios foram incorporados de piruvato de sódio e extrato livre de células de *Salmonella* e *Enterobacter cloacae*. *Salmonella* Enteritidis demonstrou maior frequência de recuperação da culturabilidade do que *Salmonella* Typhimurium.

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* é um dos patógenos mais frequentes associados com doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados. *Salmonella* tem a capacidade de entrar no estado viável não cultivável (VNC) quando submetido a determinadas condições de estresses (ASAKURA *et al.*, 2002; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; PANUTDAPORN *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 20015). Células de *Salmonella* no estado VNC já foram detectadas em carnes, ovos, produtos de milho, frutas, legumes e água potável e podem representar fonte de contaminação para seres humanos (ZENG *et al.*, 2012; MORISHIGE *et al.*, 2013). A ampla possibilidade da presença em alimentos faz com que *Salmonella* em estado VNC represente um risco para a saúde pública, dada a impossibilidade de sua detecção pelos métodos convencionais de análise, que dependem do cultivo para recuperação e detecção do micro-organismo.

Entretanto, em condições ainda não esclarecidas, *Salmonella* pode deixar o estado VNC e recuperar a culturabilidade, mantendo o potencial patogênico (GUPTE *et al.*, 2003; PANUTDAPORN *et al.*, 2006). No ano de 1999, no Japão, ocorreu um surto de infecção causado pela ingestão de lulas contaminadas com *Salmonella enterica* sorotipo Oranienburg que se encontrava no estado VNC (MAKINO *et al.*, 2000). Todavia, o patógeno não foi detectado no alimento suspeito de provocar o surto, pela impossibilidade das técnicas tradicionais de permitirem a recuperação das células VNC.

Considerando que uma característica importante das células no estado VNC é a possibilidade de recuperar a culturabilidade, confirma-se a necessidade de disponibilizar métodos que possam ser adaptados aos protocolos tradicionais para detecção de micro-organismos patogênicos em alimentos. Na atualidade, várias metodologias já foram caracterizadas para a recuperação da culturabilidade de diferentes patógenos. Entretanto, ainda não se sabe se tais protocolos são capazes de recuperar células no estado VNC induzidas por diferentes condições de estresse e com variações no número de células no estado VNC, e nas características específicas de cada tipo de micro-organismo. Tais variações podem fazer com que determinado protocolo de

recuperação não seja o indicado para todos os tipos de célula (PINTO *et al.*, 2011). Chaveerach *et al.* (2003) conseguiram recuperar a culturabilidade de *Campylobacter jejuni* incubando as células em VNC em ovos de galinha, mas não em meio rico. Pinto *et al.* (2011) conseguiram recuperar *Escherichia coli* induzida ao estado VNC por estresse nutricional e baixa temperatura (4 °C) com piruvato de sódio. Entretanto, esses mesmos autores verificaram que as células que foram induzidas pelo estresse nutricional a temperatura ambiente não conseguiram recuperar a culturabilidade com o mesmo tratamento e sugeriram que o estímulo requerido para a ressuscitação pode ser específico para cada condição de indução da entrada ao estado VNC.

Outro exemplo de tratamento para recuperar a culturabilidade de células bacterianas em estado VNC é a mudança de temperatura, como registrado em *Pseudomonas aeruginosa* (LEUNG *et al.*, 1995), e *Salmonella* Typhimurium (GUPTE *et al.*, 2003), mas não em *Helicobacter pylori* (ADAMS *et al.*, 2003). Substâncias como piruvato de sódio em meio mínimo de sais também podem induzir o processo de recuperação em *Salmonella* (MORISHIGE *et al.*, 2013). Algumas proteínas, como rRpf, podem atuar como um fator de recuperação, cuja adição ao meio de cultivo pode favorecer o processo de ressuscitação, como observado em *S. enterica* serovar Oranienburg (PANUTDAPORN *et al.*, 2006).

Além dos diferentes protocolos de indução do estado VNC e dos diferentes tratamentos utilizados para saída deste estado fisiológico, é importante levar em consideração um aspecto que é conhecido como “janela de ressuscitação” definido como o tempo no qual as células no estado VNC podem ressuscitar em resposta a determinado estímulo (SENOH *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2011). Segundo alguns autores, esse tempo pode variar de horas (GUPTE *et al.*, 2003), dias (MUKAMOLOVA, 1998) ou meses (SENOH *et al.*, 2010).

Embora sejam notáveis os avanços nas técnicas de recuperação de células de *Salmonella* no estado VNC, ainda são necessárias mais informações sobre a capacidade de recuperação de células estressadas por diferentes condições e aumentar a compreensão da natureza desse estado fisiológico.

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo

As bactérias utilizadas neste estudo estão relacionadas na tabela 1 onde também são apresentadas as origens e principais características de cada uma delas.

**Tabela 1:** Estirpes utilizadas no estudo.

Estirpes	Característica	Fonte
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028		Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 estirpe 578		Isolado de frango - Fiocruz RJ
<i>Enterobacter cloacae</i> 067	Produtora de AHL*	Isolada de leite - (Pinto <i>et al.</i> , 2007)
<i>Enterobacter cloacae</i> 067T	Transconjugante, AHL <sup>-</sup> expressa a enzima lactonase no plasmídeo pBHR1- <i>aiiA</i> -Km, relacionada à clivagem do anel lactona das moléculas de AHL.	(Martins, 2007)

**Nota:** \*AHL = Acil Homoserina Lactona, molécula sinal de comunicação celular entre bactérias gram-negativas.

As culturas foram estocadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia), acrescido de 20 % de glicerol e armazenadas a - 20 °C. A reativação foi realizada em caldo BHI a 37 ± 1 °C, por 9 horas.



## 2.2. Indução do estado viável não cultivável (VNC)

Após a reativação das células em estoque, as culturas de *Salmonella* foram estriadas em ágar xilose lisina desoxicolato (XDL, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas. Uma colônia foi transferida para 10 mL de caldo BHI e incubada a  $37 \pm 1$  °C por 8 h. Após este período, as células foram centrifugadas a 5000 g durante 20 min, a 4 °C, lavadas por seis vezes em solução salina 0,85 % e ressuspensas em solução salina 0,85 %. O grande número de lavagens objetivou garantir a remoção de resíduos do meio de cultivo para indução do estado VNC.

As células de *Salmonella* foram submetidas às condições de estresse nutricional e osmótico pelo uso de solução salina (1,2 M NaCl). Alíquotas de 1 mL da suspensão de células foram adicionadas a 300 mL mantidas a  $4 \pm 1$  °C.

As condições de estresse ácido e oxidativo foram realizadas em solução salina a 0,85 %, acrescida de 5,66 mg/mL de ácido peracético (Voxilon AN Thech Desinfecções, São Paulo, Brasil) ou 1,20 mg/mL de peróxido de hidrogênio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente. Para indução, as células foram ressuspensas em 40 mL de solução de ácido peracético ou peróxido de hidrogênio. Todas as suspensões de células foram submetidas ao estresse frio, pelo armazenamento a  $4 \pm 1$  °C.

## 2.3. Avaliação da culturabilidade

A determinação da culturabilidade foi feita em alíquotas de 1 mL das suspensões de células de *Salmonella* submetidas às diferentes condições de indução ao estado VNC, inoculadas em caldo BHI ou 100 µL plaqueadas em ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia). Os tubos e placas foram incubados a  $37 \pm 1$  °C durante 24 a 96 horas. Este procedimento foi realizado a cada 15 dias com as células mantidas no tampão BPS ou em solução salina, acrescida de 1,2 M de cloreto de sódio até não se observar crescimento microbiano, caracterizado pela turvação visual do caldo BHI ou pela formação de colônias em ágar BHI.

A viabilidade das células submetidas aos tratamentos com ácido peracético ou peróxido de hidrogênio foi também determinada pelo cultivo de 1

mL da suspensão de células estressadas em caldo BHI, com o monitoramento da entrada no estado VNC feito a cada hora, durante 12 horas.

Quando não se constatou a turvação do caldo BHI inoculado com alíquotas de 1 mL, alíquotas de 10 mL de cada amostra foram coletadas, centrifugadas a 5000 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sigma, 4K 15 Harz, Alemanha). As células recuperadas foram ressuspensas em 0,1 mL de solução salina 0,85%. A suspensão de cada amostra foi plaqueada pelo método de espalhamento em superfície em ágar BHI. As placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por, no mínimo, 96 horas para comprovar a perda da culturabilidade.

A viabilidade das células submetidas aos estresses por ácido peracético ou por peróxido de hidrogênio foi também verificada por plaqueamento de 200 µL da suspensão de células em ágar BHI feito a cada 15 min por, no máximo, 4 horas. Antes do plaqueamento, o ácido peracético e o peróxido de hidrogênio foram neutralizados segundo Vasquez-Sánchez *et al.* (2014) com as seguintes modificações: a lavagem com a solução neutralizante foi feita três vezes e a exposição na solução neutralizante foi feita durante 15 min no tratamento com ácido peracético e 10 min no tratamento com peróxido de hidrogênio.

Após o plaqueamento, seguiu-se a incubação das placas a  $37 \pm 1$  °C, por 24 horas e, a contagem de colônias, feita com auxílio de contador de colônias (Phoenix Luferto CP 600, Araraquara, Brasil). O experimento foi feito em três repetições independentes e a média foi usada para traçar a curva de sobreviventes.

#### **2.4. Tratamentos de recuperação da culturabilidade**

Para a recuperação da culturabilidade foram utilizados dois meios de cultivo, o meio mínimo de sais – MMS (Himedia, Mumbai, Índia) e o meio BHI. Esses meios foram suplementados com diferentes substâncias, cada uma das quais representou um tratamento de reativação. Foram adicionados aos meios de cultura para recuperação de células em VNC, 10 mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e 0,5 % de catalase (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). As soluções de piruvato de sódio e catalase foram esterilizadas por filtração, em membrana Millipore (Millipore, EUA) com 0,20 µm de diâmetro

de poro, e mantidas a 4 °C até o momento do uso. Também foram usados 100 µL de extratos livres de células (ELCs) das culturas de *S. enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium, *E. cloacae* 067 selvagem e transconjugante 067T cultivadas em caldo BHI a 30 ± 1 °C. Os ELCs foram preparados pela lise das culturas em fase estacionária de crescimento, por sonicação durante 3 minutos, com intervalos de 10 segundos de tratamento e 10 segundos de refrigeração (Vibra Cell VCX130, Newtown, Estados Unidos).

Os diferentes tratamentos de recuperação das células no estado VNC foram conduzidos em tubos de ensaio com volume de 5 mL de MMS ou BHI, excetuando-se o tratamento de 0,5 % de catalase, no qual o volume tanto de MMS como de BHI foi de 2 mL.

## **2.5 Avaliação da recuperação da culturabilidade**

As células de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium submetidas aos diferentes tratamentos de indução do estado VNC foram concentradas 10 vezes por centrifugação a 5000 g durante 15 min a 4 °C (Sigma, 4K 15 Harz, Alemanha) e, alíquotas de 100 µL do centrifugado foram inoculadas nos meios de cultura suplementados com os diferentes componentes. Seguiu-se incubação a 37 ± 1 °C durante 100 horas, ao longo dos quais foi monitorada a recuperação da culturabilidade por meio de leitura de densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro Spectronic (Mod 200, Thermo Scientific, EUA) em diferentes intervalos de tempo.

Cada experimento foi acompanhado de controles, que consistiram das células no estado VNC inoculadas nos meios MMS e BHI, sem suplementação; além dos mesmos meios sem inoculação. Cada experimento foi realizado em cinco repetições independentes.

Alíquotas dos meios de cultura com indicação de crescimento bacteriano nos diferentes tratamentos de recuperação foram estriadas em ágar seletivo XLD para se constatar a presença de *Salmonella*.

## 2. RESULTADOS

O aumento da densidade ótica de uma população bacteriana em um meio de cultivo líquido é sinal de crescimento celular e, baseando-se nesse princípio, foi possível determinar a frequência de recuperação da culturabilidade em meio mínimo de sais (MMS) e meio rico (BHI). Constatou-se que *Salmonella* Enteritidis recuperou a culturabilidade com maior frequência do que *Salmonella* Typhimurium independente das condições de estresse usadas para induzir o estado VNC (Tabelas 1 e 2). Embora a frequência de recuperação tenha sido diferente em cada tratamento foi possível evidenciar a recuperação da culturabilidade em, pelo menos uma das repetições dos tratamentos no MMS, sugerindo ser esta uma condição favorável à recuperação de células estressadas. O mesmo resultado não foi observado quando as células em VNC foram inoculadas em caldo BHI, onde se constatou menor frequência de recuperação da culturabilidade (Tabelas 1 e 2)

Embora as células de *Salmonella* estivessem no estado VNC induzidas por diferentes condições de estresse, a frequência de saída desse estado foi diferente. O estresse osmótico e nutricional permitiu uma frequência de recuperação da culturabilidade maior do que a dos outros estresses (Tabelas 1 e 2) sugerindo que cada condição de entrada no estado VNC requer condições específicas para recuperação da culturabilidade. *Salmonella* Typhimurium apresentou maior variação na frequência de recuperação, independente do estresse que induziu o estado VNC.

**Tabela 1.** Frequência de recuperação da culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium em 5 repetições induzidas ao estado VNC por diferentes tratamentos e após incubação em caldo MMS por 96 h a 37 °C.

Estratégias de Indução	Estratégias de Recuperação em <i>Salmonella</i> Enteritidis							Estratégias de Recuperação em <i>Salmonella</i> Typhimurium						
	MMS	Piruvato	Catalase	ELC	ELC	ELC	ELC	MMS	Piruvato	Catalase	ELC	ELC	ELC	ELC
				SE	ST	E	ET				SE	ST	E	ET
NaCl (1,2 M)	2	4	5	5	4	4	4	3	4	5	3	5	3	4
Ácido Peracético	2	4	5	4	4	4	4	3	2	3	2	2	2	1
Peróxido	2	5	5	3	4	2	3	1	3	5	2	1	1	3

**Nota:** \*LSE: ELC de *Salmonella* Enteritidis, LST: ELC de *Salmonella* Typhimurium; LE: ELC de *Enterobacter cloacae*; LET: ELC de *E. cloacae* transconjugante.

- Frequencia de recuperação alta ( 4/5 e 5/5)
- Frequencia de recuperação média (3/5)
- Frequencia de recuperação baixa ( 1/5 e 2/5)

**Tabela 2.** Frequência de recuperação da culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhimurium induzidas ao estado VNC por diferentes tratamentos e após incubação em caldo BHI por 96 h a 37 °C.

Estratégias de Indução	Estratégias de Recuperação em <i>Salmonella</i> Enteritidis							Estratégias de Recuperação em <i>Salmonella</i> Typhimurium						
	BHI	Piruvato	Catalase	ELC	ELC	ELC	ELC	BHI	Piruvato	Catalase	ELC	ELC	ELC	ELC
				SE	ST	E	ET				SE	ST	E	ET
NaCl (1,2 M)	0	0	3	3	5	5	3	0	0	2	1	1	2	1
Ácido Peracético	0	0	2	2	3	2	1	0	0	3	3	2	2	0
Peróxido	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	0

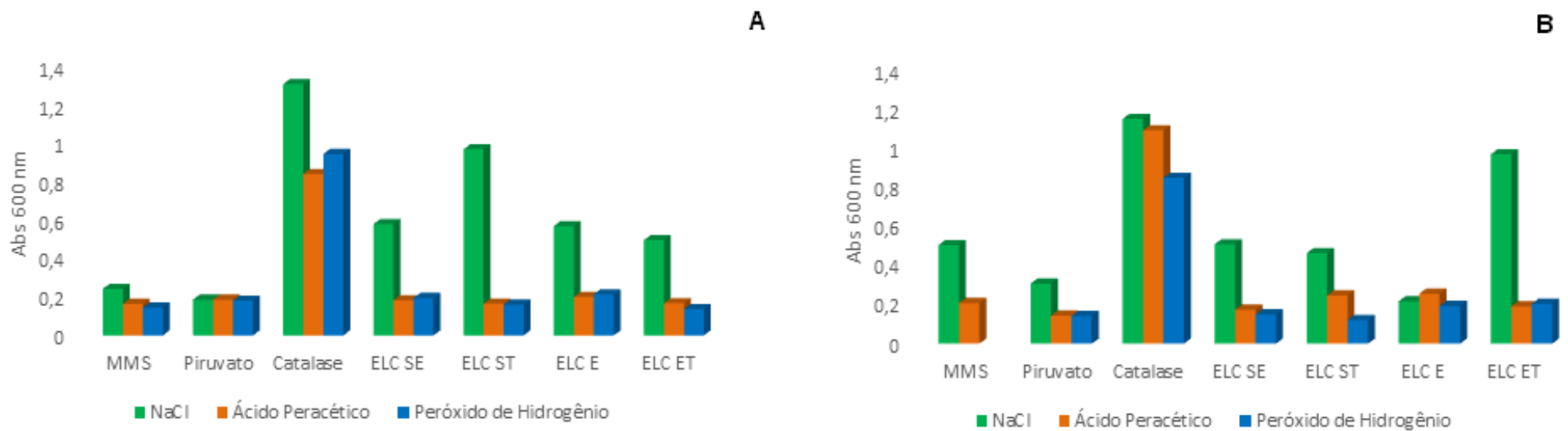
**Nota:** \*SE: ELC de *Salmonella* Enteritidis, ST: ELC de *Salmonella* Typhimurium; E: ELC de *Enterobacter cloacae*; ET: ELC de *E. cloacae* transconjugante.

- Frequência de recuperação alta ( 4/5 e 5/5)
- Frequência de recuperação média (3/5)
- Frequência de recuperação baixa ( 1/5 e 2/5)

A adição do piruvato de sódio aumentou a frequência de recuperação quando foi adicionado ao MMS, mas não no caldo BHI (Tabelas 1 e 2). De maneira semelhante, a adição de catalase também foi mais efetiva na recuperação da culturabilidade de *Salmonella* em MMS (Tabelas 1 e 2).

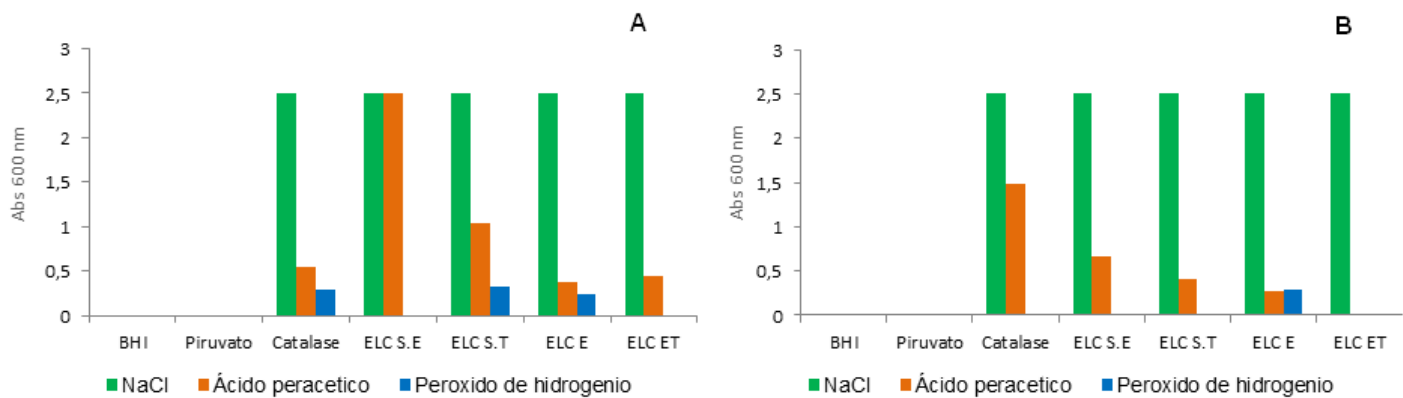
Em geral, a adição do ELC de *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium e de *E. cloacae*, selvagem e transconjugante aumentou a recuperação de *Salmonella* Enteritidis em MMS, mas os resultados de frequência de recuperação variaram quando se tratou de *Salmonella* Typhimurium, assim como em caldo BHI (Tabelas 1 e 2). Deve-se destacar que em caldo BHI, a recuperação de *Salmonella* foi maior quando o ELC de *E. cloacae* selvagem foi adicionado, do que quando se adicionou o ELC do transconjugante (Tabelas 1 e 2).

Em geral, o valor máximo de crescimento de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium nas diferentes condições de recuperação em MMS ocorreu quando as células haviam sido submetidas às condições de estresse osmótico e nutricional (Figura 1). Dos diferentes tratamentos utilizados para a recuperação da culturabilidade, o que envolveu a adição de 1% de catalase foi o que resultou em valores máximos de DO relativos ao crescimento dos dois sorovares.



**Figura 1.** Valores médios de densidade ótica a 600 nm do crescimento celular de *Salmonella* em etapa de recuperação da culturabilidade em MMS. Legenda: *Salmonella* Enteritidis (A) e *Salmonella* Typhimurium (B).





**Figura 2.** Valores médios de densidade ótica a 600 nm do crescimento celular de *Salmonella* em etapa de recuperação da culturabilidade em BHI. Legenda: *Salmonella* Enteritidis (A) e *Salmonella* Typhimurium (B).

## 2. DISCUSSÃO

*Salmonella* Enteritidis apresentou maior frequência de recuperação da culturabilidade e este resultado pode ser em razão da maior resistência deste sorovar a diferentes condições de estresse. Nos resultados de indução ao estado VNC apresentados no Capítulo 1, constataram-se maiores valores de percentagem de sobrevivência e maior tempo para entrada no estado VNC por este sorovar (Tabelas 3 e 5). Perez *et al.* (2010) compararam a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium ao estresse ácido e determinaram maior percentagem de sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis.

A maior recuperação da culturabilidade de *Salmonella* em MMS pode ser atribuída a melhor adaptação das células estressadas às características do substrato. Bloomfield *et al.* (1998) comentaram que a mudança de uma população de bactérias de um ambiente para outro substancialmente diferente representa um desafio a capacidade adaptativa. Esses autores propuseram que a transferência de células nutricionalmente estressadas para ágar nutriente a temperatura ótima desencadeia um desbalanço no metabolismo, provavelmente pela produção rápida de superóxidos e radicais livres, não permitindo uma adaptação da célula. É provável que a não recuperação de *Salmonella* em BHI se deveu a uma recuperação da atividade metabólica das células em VNC que gerou espécies reativas de oxigênio, não havendo tempo para que a célula se adaptasse para a detoxificação dessas espécies oxidativas formadas. Por esta razão, a suplementação de meios de cultivo com substâncias como piruvato de sódio, ácido  $\alpha$ -ceto glutárico e catalase, que auxiliam no combate às espécies reativas de oxigênio formadas, é frequentemente investigada para aumentar a culturabilidade de células no estado VNC (MIZUNOE *et al.*, 1999; MORISHIGE *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2013). De fato, a adição de piruvato de sódio aumentou a frequência de recuperação de *Salmonella* no meio MMS. Mizunoe *et al.* (1999) e Morishige *et al.* (2013) consideraram que piruvato apresenta a capacidade de combater o estresse oxidativo além de participar da divisão celular e da síntese de proteínas. Entretanto, a não constatação deste efeito protetor e recuperador do

piruvato de sódio em caldo BHI também foi observado por Lindbäck *et al.* (2010), que verificaram que o piruvato de sódio é incapaz de aumentar a recuperação células no estado VNC em condições de meio rico.

A constatação da maior frequência de recuperação quando 1% de catalase foi adicionada ao MMS e ao BHI pode ser também atribuída ao efeito de remover os radicais livres formados. Kong *et al.* (2004) evidenciaram a capacidade da catalase em combater o fator oxidante gerado pelas células no estado VNC em meio de cultivo rico, permitindo a recuperação da culturabilidade. Outros pesquisadores evidenciaram a capacidade da catalase para permitir a recuperação da culturabilidade de células no estado VNC (MIZUNOE *et al.*, 2000; ZENG *et al.*, 2013 ).

O aumento da frequência da recuperação da culturabilidade de *Salmonella* pela adição dos diferentes ELC pode ser atribuído à presença de grande variedade de moléculas presentes nestes extratos. É possível destacar os autoindutores 1 (AI-1) de *quorum sensing* como moléculas potencializadoras da culturabilidade de *Salmonella* em BHI considerando o aumento da frequência de recuperação da culturabilidade na presença de ELC de *E. cloacae* quando comparado com o ELC do transconjugante, não acumulador de AI-1 (Tabela 2). O AI-1 foi utilizado para a recuperação da culturabilidade de *Vibrio cholerae* (BARI *et al.*, 2013) enquanto Ayrapetyan *et al.* (2014) determinaram que a presença do autoindutor 2 (AI-2) permite a recuperação da culturabilidade de células de *Vibrio vulnificus*. Entretanto, Araújo (2012) não encontrou efeito de AI-1 na recuperação de *E. coli* em estado VNC.

A frequência de recuperação da culturabilidade dos dois sorovares de *Salmonella* não está relacionada apenas ao meio de recuperação utilizado, mas também às condições de indução do estado VNC. Pinto *et al.* (2011) consideraram que o tipo e a intensidade do estresse afeta a recuperação da culturabilidade. A maior percentagem de células viáveis no tratamento de estresse nutricional e osmótico verificada nos dados apresentados no capítulo 1 (Tabelas 3 e 5) poderia ter relação com a maior frequência de recuperação das células nesta condição de estresse.

Os maiores valores de DO constatados nas culturas de células recuperadas dos tratamentos de estresse nutricional e osmótico (Figura 1) suportam a hipótese de que condições de indução que representem um desafio

menor na sobrevivência das células permitirão uma melhor recuperação, tanto em frequência como em intensidade de crescimento.

Um dos maiores desafios para determinar a recuperação da culturabilidade das células em estado VNC é garantir que o aumento do número de células cultiváveis seja atribuído à recuperação da culturabilidade e não do crescimento de uma pequena população de células cultiváveis que possa ter permanecido na solução. O aumento abrupto do número de células de *Salmonella* Enteritidis evidenciado na Figura 2 não pode ser atribuído ao crescimento típico de células de *Salmonella* em fase logarítmica, mas é indicativo da recuperação da culturabilidade de um alto número de bactérias. Alguns estudos apresentaram de forma conclusiva, a recuperação de células no estado VNC. Whitesides e Oliver (1997) observaram aumento de células de *V. vulnificus* equivalente a 10 gerações em um tempo de 1 h, o que não seria possível, a não ser que houvesse a recuperação da culturabilidade de células em estado VNC.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A frequência de recuperação da culturabilidade de *Salmonella* depende do tipo e da intensidade do estresse utilizado para induzir o estado VNC e a suplementação dos meios de recuperação com catalase aumenta a frequência de saída do estado VNC. Considerando a complexidade das mudanças fisiológicas que ocorrem na célula microbiana para recuperar a culturabilidade, mais estudos são necessários objetivando aumentar a capacidade de recuperação dessas células. O uso de meios pobres ou meios ricos diluídos deve ser mais explorado bem como verificar o possível efeito da concentração das espécies reativas de oxigênio presentes no meio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. L.; BATES, T. C.; & OLIVER, J. D. Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Fresh water Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p 7462-7466, 2003.

ARAUJO, G. **Sudden increased and regrowth of fecal coliforms and Escherichia coli in wastewater biosolids after high solids centrifugation.** 2012, 136p. Master Thesis, Bucknell University.

ASAKURA, H.; MAKINO, S. I.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212 n. 1, p. 87-93, 2002.

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, p. 2478-2483, 2014.

BARI, S. N.; ROKY, M. K.; MOHIUDDIN, M.; KAMRUZZAMAN, M.; MEKALANOS, J. J.; FARUQUE, S. M. Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 9926-9931, 2013.

BLOOMFIELD, S. F.; STEWART, G. S.; DODD, C. E.; BOOTH, I. R.; POWER, E. G. M. The viable but non-culturable phenomenon explained? **Microbiology**. v. 144 n.1, p. 1-3. 1998.

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

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, p. 6669-6675, 2003.

KONG, I.; BATES, T.; HULSMANN, A.; HASSA, H.; SMITH, B.; OLIVER, J. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, p. 133–142, 2004.

LEUNG, K.; CASSIDY, M. B.; HOLMES, S. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Survival of  $\kappa$ -carrageenan-encapsulated and unencapsulated *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells in forest soil monitored by polymerase chain reaction and spread plating. **FEMS Microbiology**, v. 16, p. 71–82, 1995.

LINDBÄCK, T.; ROTTENBERG, M.; E., ROCHE, S. ; RØRVIK, M. 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. 8, p. 1-10, 2010.

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

MARTINS, L. Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrótroficas isoladas de leite. 2007 p tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa.

MIZUNOE, Y.; WAI, S. N.; ISHIKAWA, T.; TAKADE, A., YOSHIDA, S. I. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, p. 115-120, 2000

MORISHIGE, Y.; FUJIMORI, K.; AMANO, F. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.38, n. 9, p, 1255-1264, 2015.

MUKAMOLOVA, G. V.; YANOPOLSKAYA, N. D.; KELL, D. B.; KAPRELYANTS, A. S. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 237–243, 1998.

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

PEREZ, K.; CECCON, R.; MALHEIROS, P.; JONG, E.; TONDO, E. Influence of acid adaptation on the survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella* Typhimurium in simulated gastric fluid and in *rattus norvegicus* intestine infection. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 398–414, 2010.

PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v. 18, p. 1322-1327, 2007.

PINTO, D.; ALMEIDA, V.; SANTOS, M.; CHAMBEL, L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1601–1611, 2011.



REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; WILLIAMS, P. H. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4788–4794, 2002.

SENOH, M.; GHOSH-BANERJEE, J.; RAMAMURTHY, T.; HAMABATA, T.; KURAKAWA, T.; TAKEDA, M.; COLWELL, R.; NAIR, G.; TAKEDA, Y. Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 502–507, 2010.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

WHITESIDES, M. D.; OLIVER, J. D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 n3, 1002-1005, 1997.

XIAO, L.; ZHANG, Z.; SUN, X.; PAN, Y.; ZHAO, Y. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. **Food Control**, v. 57, p. 185-189, 2015.

ZENG, B.; ZHAO, G.; CAO, X.; YANG, Z.; WANG, CH.; HOU, L. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2012.