

RENATA APARECIDA MENDES

**ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL EM *Salmonella enterica*:
INDUÇÃO, PERFIL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES E
DETECÇÃO DE mRNA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

RENATA APARECIDA MENDES

**ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL EM *Salmonella enterica*:
INDUÇÃO, PERFIL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES E
DETECÇÃO DE mRNA**

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

APROVADA: 26 de Junho de 2009.

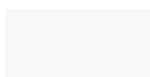
Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Co-orientadora)

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos

Prof^a. Maria Cristina Baracat-Pereira

Prof. Maurilio Lopes Martins

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos
(Orientadora)



AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

À professora e orientadora Míriam dos Santos, pela orientação, atenção, amizade, confiança e disponibilidade ao longo do curso.

Aos professores Elza Fernandes de Araújo e Hilário Cuquetto Mantovani, pela disponibilidade e contribuição constantes neste trabalho.

Aos professores Flávia Maria Lopes Passos, Maria Cristina Baracat-Pereira e Maurilio Lopes Martins, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

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

Ao Karlaine, pelo estímulo, paciência e amor durante todo este tempo.

Aos meus queridos pais e irmãos, pelo carinho e atenção.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disposição em ajudar-me.

Aos professores Maria Catarina Megumi Kasuya e Maurício Dutra Costa, do laboratório de Associações Micorrízicas, pela grande colaboração na utilização do microscópio de epifluorescência.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, por disponibilizar o laboratório de Microbiologia de Alimentos para execução de parte deste trabalho.

À Dra. Virgínia Maria Chaves Alves, do laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pela colaboração na extração de proteínas com o equipamento *French Press*.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, por disponibilizar o laboratório de Fisiologia de Microrganismos para a realização dos trabalhos com proteínas.

À Irene do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos pela disponibilidade e grande ajuda na realização dos trabalhos com RNA.

À Adriana Ponce, por todo o auxílio nos trabalhos com proteínas.

Aos estagiários e amigos Camila, Wemerson, Carla e Daniel pela amizade, dedicação e apoio na realização dos experimentos.

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Microbiologia de Anaeróbios, Fisiologia de Microrganismos, Microbiologia Industrial, Genética Molecular e de Microrganismos e Associações Micorrízicas pela disponibilidade em ajudar-me em tudo que precisei, pela amizade e pelo excelente convívio.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1. O patógeno <i>Salmonella</i>	3
1.2. Resposta a condições de estresse.....	6
1.3. Estado viável não cultivável (VNC).....	10
1.4. Fatores que induzem o estado viável não cultivável	11
1.5. Alterações fenotípicas de células no estado viável não cultivável	12
1.6. Ressuscitação do estado viável não cultivável	14
1.7. Detecção de células no estado viável não cultivável	16
1.8. Importância do estado viável não cultivável em alimentos	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2	
Indução do estado viável não cultivável (VNC) em <i>Salmonella enterica</i> e perfil de proteínas intracelulares de <i>S. Enteritidis</i> PT4 963 no estado viável não cultivável	36
2.1. INTRODUÇÃO	36
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.2.1. Microrganismos utilizados.....	39
2.2.2. Indução do estado viável não cultivável em diferentes meios e	

concentrações salinas.....	40
2.2.2.1. Obtenção de células de diferentes estirpes no estado viável não cultivável	40
2.2.2.2. Avaliação da culturabilidade e viabilidade celular.....	41
2.2.3. Indução do estado viável não cultivável em diferentes densidades populacionais iniciais	43
2.2.4. Avaliação do perfil de proteínas intracelulares de <i>S. Enteritidis</i> PT4 963 no estado viável não cultivável e em resposta a estresse.....	44
2.2.4.1. Coleta das amostras.....	44
2.2.4.2. Extração de proteínas intracelulares.....	45
2.2.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE).....	45
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.3.1. Indução do estado viável não cultivável utilizando diferentes estirpes, meios de suspensão de células e concentrações salinas.....	47
2.3.2. Indução do estado viável não cultivável em diferentes densidades populacionais iniciais	58
2.3.3. Perfil de proteínas intracelulares de <i>S. Enteritidis</i> PT4 963 no estado viável não cultivável e em resposta a estresse.....	63
2.4. CONCLUSÕES.....	68
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPÍTULO 3	
Detecção dos transcritos dos genes <i>invA</i> , <i>rpf</i> , <i>katF</i> e rDNA 16S em <i>S. Enteritidis</i> PT4 963 no estado viável não cultivável	76
3.1. INTRODUÇÃO.....	76
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.2.1. Microrganismo utilizado e condições de cultivo.....	79
3.2.2. Obtenção de células de <i>S. Enteritidis</i> PT4 963 em fase exponencial e no estado viável não cultivável	79
3.2.3. Detecção dos transcritos dos genes <i>invA</i> , <i>rpf</i> , <i>katF</i> e rDNA 16S	81
3.2.3.1. Preparo das células para extração de RNA.....	81
3.2.3.2. Extração e quantificação do RNA total.....	81

3.2.3.3. RT-PCR.....	83
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.4. CONCLUSÕES.....	92
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

RESUMO

MENDES, Renata Aparecida D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Estado viável não cultivável em *Salmonella enterica*: indução, perfil de proteínas intracelulares e detecção de mRNA.** Orientadora: Míriam Teresinha dos Santos. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Hilário Cuquetto Mantovani.

O patógeno de origem alimentar, *Salmonella* spp. entra no estado viável não cultivável (VNC) em resposta a condições ambientais adversas. A presença de células VNC é um problema de saúde pública porque células neste estado não são detectadas pelas metodologias tradicionais utilizadas de rotina em laboratórios, resultando em avaliação inadequada de alimentos contaminados com patógenos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da estirpe, do meio de suspensão de células, da concentração salina e da densidade populacional inicial na entrada de *Salmonella enterica* no estado VNC e estudar o perfil de proteínas intracelulares e a presença de transcritos dos genes *invA*, *rpf*, *katF* e *rDNA* 16S na população de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC. A população de *S. enterica* que permaneceu no estado VNC variou significativamente entre as estirpes e condições utilizadas. A perda da culturabilidade foi mais lenta ($p < 0,001$) em células mantidas a 4 °C em meio infusão de cérebro e coração (BHI) acrescido de NaCl do que as mantidas em solução fosfato de Butterfield (BPS). Células mantidas a 4 °C em BHI adicionado de NaCl apresentaram percentual de células viáveis menor ($p < 0,05$) no momento em que a culturabilidade não era mais detectada. A

maior perda de culturabilidade foi obtida em meios com 1,2 mol/L de NaCl ($p < 0,001$). As linhagens *S. Enteritidis* PT4 963 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 mantidas a 4 °C em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L apresentaram os maiores índices de entrada em estado VNC ($p < 0,001$). As menores taxas de perda de culturabilidade e também as maiores reduções nas contagens de microrganismos viáveis foram observadas em densidade populacional inicial de 10^7 UFC/mL ($p < 0,05$) se comparadas às amostras inoculadas com 10^5 e 10^3 UFC/mL. O perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC difere do encontrado em células nas fases exponencial e estacionária de crescimento e sob resposta a estresse osmótico, por baixa temperatura e falta de nutrientes. A não detecção de proteínas com massa molecular superior a 63 kDa e a presença de proteínas com massas moleculares menores nas células no estado VNC sugerem a ocorrência de proteólise para garantir o aporte de nutrientes e a manutenção de viabilidade. Nossos resultados indicam que o estado VNC constitui um estado fisiologicamente distinto no ciclo de vida de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4. No entanto, não conseguimos detectar uma proteína específica das células de *Salmonella* no estado VNC. A quantidade de RNA total diminuiu aproximadamente 600 vezes em células no estado VNC quando comparada à quantidade obtida de células em crescimento ativo. Não foram detectados os transcritos correspondentes aos genes *invA*, *rpf* e *katF* em *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC nas condições experimentais utilizadas. Entretanto, a expressão do 16S rRNA foi detectada em células VNC. Estes resultados sugerem que *S. Enteritidis* PT4 no estado VNC está ativa metabolicamente pela produção de transcritos para o rDNA16S e que este *housekeeping* gene pode ser considerado um bom marcador de viabilidade celular para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 no estado VNC.

ABSTRACT

MENDES, Renata Aparecida D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009. **Viable but nonculturable state in *Salmonella enterica*: induction, intracellular protein profile, and mRNA detection.** Adviser: Míriam Teresinha dos Santos. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo and Hilário Cuquetto Mantovani.

The foodborne pathogen *Salmonella* spp. enters into a viable but nonculturable state (VBNC) in response to adverse environmental conditions. The presence of VBNC cells is a public health concern since it may be overlooked under standard routine laboratory procedure, resulting in improper assessment of contaminating pathogens in food. This work was done to investigate the influence of strain, cell suspension media, saline concentration, and initial population density on the induction of VBNC state in *Salmonella enterica* and to evaluate the intracellular protein profile and the presence of *invA*, *rpf*, *katF*, and 16S rDNA gene transcripts in VBNC *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 963. The entry into VBNC state in *S. enterica* varied significantly between strains and was also influenced by the saline concentration, suspension media, and initial population density. The culturability loss was lower ($p < 0.001$) in cells maintained at 4 °C in Brain and Heart Infusion broth (BHI) than in cells in Butterfield's Phosphate Solution (BPS). The cells maintained at 4 °C in BHI added with NaCl showed lower ($p < 0.05$) viability when culturability could no longer be detected. The highest rate of culturability loss was obtained in media

with 1.2 mol/L NaCl ($p < 0.001$). The strains *S. Enteritidis* PT4 963 and *S. Typhimurium* ATCC 14028 maintained at 4 °C in BPS added with 1.2 mol/L NaCl showed the largest ($p < 0.001$) entry index into VBNC state. The smallest culturability loss rates and also the largest reductions in viable counts were observed for an initial population density of 10^7 CFU/mL ($p < 0.05$) compared to 10^5 and 10^3 CFU/mL. The intracellular protein profile of VBNC *S. Enteritidis* PT4 963 differed from that observed in the exponential and stationary growth phases, and under osmotic, low temperature, and starvation stresses. The absence of proteins with molecular mass superior to 63 kDa and the presence of proteins with smaller molecular masses in the VBNC state suggest the occurrence of proteolysis, probably to guarantee the maintenance of the nutrient supply and viability. Our results indicate that the VBNC state constitutes a physiologically distinct state within the life cycle of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4. However we could not detect any protein specific of the VBNC cells of *Salmonella*. The amount of total RNA decreased approximately 600-fold in VBNC cells. No *katF*, *invA*, and *rpf* mRNA was detected in the VBNC populations under the experimental conditions studied. However the 16S rRNA expression was detected in VBNC cells. These results suggest that, considering the 16S rRNA production, VBNC *S. Enteritidis* PT4 cells are metabolically active and that this housekeeping gene is a good viability marker for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in the VBNC state.

INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias do gênero *Salmonella* são importantes patógenos veiculados por alimentos. Dentre os diversos sorovares existentes, destacam-se *S. enterica* Typhimurium e *S. enterica* Enteritidis como os mais frequentemente implicados em surtos de salmonelose em humanos. Estes e outros microrganismos estão frequentemente expostos a estresses provocados por vários fatores, tais como mudanças na disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, salinidade, substâncias antimicrobianas, dentre outros. A persistência de bactérias em ambientes como alimentos e no trato gastrointestinal é determinada por sua capacidade de suportar e mesmo se adaptar a esses estresses.

Uma estratégia que pode ser utilizada por bactérias não formadoras de esporos para sobreviver em condições drásticas é a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado viável não cultivável (VNC), onde permanecem viáveis, metabolicamente ativas, porém incapazes de crescer em meios de cultura de rotina.

Muitos microrganismos são capazes de entrar no estado VNC como *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella enterica*. Diversos são os fatores que induzem a entrada neste estado fisiológico por bactérias. Os estresses osmótico e de temperatura baixa e a escassez de nutrientes são amplamente estudados como fatores de indução deste estado.

A importância do estado VNC para a segurança alimentar está no fato de que patógenos podem estar presentes em alimentos no estado VNC e não serem detectados por procedimentos laboratoriais de rotina, ocasionando a classificação errônea do alimento como adequado para consumo. Estas células, ao serem ingeridas e entrarem em contato com fatores presentes no hospedeiro, podem retomar a capacidade de se multiplicar e causar doenças.

Microrganismos no estado VNC apresentam alterações morfológicas e fisiológicas significativas como redução do tamanho, alteração da forma celular, redução das taxas metabólica e de transporte. Entretanto os mecanismos envolvidos na entrada, persistência e saída deste estado ainda não estão bem elucidados.

Para se compreender este estado de dormência, tem sido feita a avaliação do proteoma e da transcrição diferencial de células no estado VNC a fim de identificar proteínas expressas exclusivamente neste estado, as quais poderiam ser utilizadas como candidatas a alvos de métodos moleculares de detecção de patógenos no estado viável não cultivável em matrizes complexas como os alimentos, uma vez que os métodos disponíveis baseados no uso de corantes fluorescentes sofrem influência de interferentes dessas matrizes.

Devido à grande importância da detecção do patógeno *Salmonella* e da necessidade da compreensão dos mecanismos moleculares que caracterizam o estado fisiológico viável não cultivável, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da estirpe, do meio de suspensão das células, da concentração salina e da densidade populacional inicial sobre a entrada de *S. enterica* no estado viável não cultivável e estudar o perfil de proteínas intracelulares e a presença de transcritos dos genes *invA*, *rpf*, *katF* e rDNA 16S em *S. enterica* Enteritidis PT4 963 no estado viável não cultivável.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O patógeno *Salmonella*

Dentre os bacilos gram-negativos causadores de doenças de origem alimentar, os mais importantes são membros do gênero *Salmonella* (JAY *et al.*, 2005). As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos pequenos, mesófilos e anaeróbios facultativos, sendo a maioria móveis, por meio de flagelos peritríquios. São amplamente distribuídos na natureza, tendo humanos e animais como seu reservatório principal (JAY *et al.*, 2005).

O *habitat* principal de *Salmonella* é o trato intestinal de animais como aves, répteis, suínos, humanos e, ocasionalmente, insetos. Embora seu *habitat* primário seja o trato intestinal, o patógeno pode ser encontrado em outros sítios. Quando presentes no intestino, os microrganismos são excretados nas fezes e podem ser transportados por insetos e outros seres vivos para vários locais (JAY *et al.*, 2005).

As doenças causadas por *Salmonella* spp. dividem-se em dois grupos, segundo a divisão proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizada em seu sistema de estatísticas sanitárias: o primeiro composto pela febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, e pelas febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B e C); o segundo grupo de doenças é composto

pelas enterocolites ou salmoneloses, causadas pelos demais sorovares, que são os agentes mais frequentemente veiculados por alimentos (ICMSF, 2000).

Os sintomas da salmonelose incluem náusea, vômitos, dor abdominal, dor de cabeça, calafrios e diarreia. Estes sintomas são geralmente acompanhados por prostração, fraqueza muscular, febre moderada, agitação e sonolência. Os sintomas geralmente persistem por dois a três dias. A taxa de mortalidade média é de 4,1%, variando de 5,8% durante o primeiro ano de vida, para 2% entre um e 50 anos e de 15% para pessoas com mais de 50 anos (JAY *et al.*, 2005).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece como padrão exigido a ausência de *Salmonella* em 25g de produto. Portanto, a contaminação de alimentos com este patógeno, independentemente da carga microbiana presente, os torna impróprios para consumo.

Atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (REEVES *et al.*, 1989). A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *houtanae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *salamae*. O gênero abriga, atualmente, 2579 sorovares, sendo 1531 destes pertencentes à subespécie *enterica*, que representa pelo menos 99,5% das estirpes de *Salmonella* isoladas (WHO, 2007).

Dentre os diversos sorovares existentes *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium é o mais frequentemente implicado em surtos de salmonelose em humanos em países desenvolvidos (SCHLOSSER *et al.*, 2000). Entretanto, nos últimos anos, tem sido observado aumento expressivo da prevalência de *S. enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis como agente etiológico de surtos de doenças de origem alimentar em vários países (RABSCH *et al.*, 2001; VELGE *et al.*, 2005; BRADEN, 2006), inclusive no Brasil (CASTRO *et al.*, 2002).

S. Enteritidis é de origem aviária, sendo encontrada principalmente em ovos. Este microrganismo pode ser transmitido aos ovos a partir de ovários e ovidutos infectados antes da postura (THIAGARAJAN *et al.*, 1994) ou por penetração na casca, devido à contaminação por fezes (COX *et al.*, 2000).

Salmonella, sendo um microrganismo patogênico, apresenta vários fatores de virulência que possibilitam a superação das defesas do hospedeiro.

A virulência deste patógeno é conferida pela expressão de genes localizados tanto no cromossomo como em plasmídeos (GÁLÁN e CURTIS, 1989). No cromossomo, vários genes de virulência estão localizados em ilhas de patogenicidade, que consistem de grandes regiões de DNA genômico, variando de 10 a 200 kb, que estão presentes em bactérias patogênicas mas ausentes nos genomas de membros não patogênicos da mesma espécie ou de espécies relacionadas (WILSON *et al.*, 2002).

Foram descritas até o presente 17 ilhas de patogenicidade em *Salmonella*, que codificam fatores de virulência para a invasão da célula hospedeira e patogênese intracelular, dentre outras funções (MILLS *et al.*, 1995; GÁLÁN, 1996; OCHMAN *et al.*, 1996; SHEA *et al.*, 1996; HENSEL, 2004; CHIU *et al.*, 2005; VERNIKOS e PARKHILL, 2006; SAROJ *et al.*, 2008). As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* podem ter sido adquiridas por meio de transferência horizontal de genes provenientes de outros organismos (MARCUS *et al.*, 2000), o que permitiu a esta bactéria obter características de virulência de outras espécies (SAROJ *et al.*, 2008).

Um exemplo de gene localizado no cromossomo que confere virulência à *Salmonella* é o gene *invA*, que está localizado na ilha de patogenicidade 1 (SP-1) e organizado em uma unidade transcricional, o operon *inv*, sendo seu produto relacionado à invasão das células epiteliais do intestino delgado (GÁLÁN e CURTIS, 1989; JONES, 2005). A presença deste gene foi detectada em vários sorovares de *Salmonella* (GÁLÁN e CURTIS, 1991).

Estudos revelam que a expressão dos genes *inv* é regulada por modificações do superenovelamento no DNA como consequência de uma série de sinais ambientais como osmolaridade, temperatura e tensão de oxigênio (GÁLÁN e CURTIS, 1990; JONES, 2005). As condições encontradas no intestino são consideradas ótimas para a expressão destes genes (GÁLÁN e CURTIS, 1990).

Plasmídeos que conferem virulência têm sido encontrados em poucos sorovares de *Salmonella* pertencentes à subespécie *enterica*, particularmente naqueles que demonstram adaptação ao hospedeiro como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (ROTGER e CASADESÚS, 1999; RYCHLIK *et al.*, 2006). Por exemplo, os genes do operon *spvRABCD*, localizados em plasmídeos, estão relacionados ao aumento da severidade da doença e à ocorrência da infecção

extra-intestinal e persistência do patógeno em sítios extra-intestinais (BOYD e HARTL, 1997; AHMER *et al.*, 1998; ROTGER e CASADESÚS, 1999).

1.2. Resposta a condições de estresse

Os microrganismos geralmente enfrentam uma série de condições adversas tanto no ambiente como nos alimentos. Essas condições incluem alterações de temperatura, altas concentrações salinas, falta de nutrientes e baixo pH. Para aumentar as chances de sobrevivência, os microrganismos podem apresentar respostas programadas, quando genes induzidos por estes fatores de estresse são expressos, sendo sintetizadas proteínas que, presumivelmente, agem prevenindo ou reparando danos macromoleculares causados pelo estresse (BEARSON *et al.*, 1997).

Um sistema geral de resposta a estresse pode ser ativado por vários fatores e proteger contra múltiplos estresses. A ativação desta resposta geral usualmente resulta em redução da taxa de crescimento ou entrada em fase estacionária (HENGGE-ARONIS, 1999). Os sistemas gerais de resposta a estresse melhor caracterizados são controlados por fatores sigma alternativos, σ^S em *Escherichia coli* e outras bactérias gram-negativas, como *Salmonella* e por σ^B em *Bacillus subtilis* e outras bactérias gram-positivas (YOUSEF e JUNEJA, 2003).

O fator σ^S , codificado pelo gene *rpoS* e induzido principalmente na entrada da fase estacionária e em resposta à limitação de nutrientes, é reconhecido como fator-chave no aumento da resistência a estresse, controlando a expressão de aproximadamente 40 genes envolvidos nas modificações associadas com a entrada na fase estacionária (DODD e ALDSWORTH, 2002).

O gene *rpoS* também foi denominado de *nur*, *katF*, *appR*, *csi-2* e *abrD* em trabalhos anteriores, pelo estudo de diferentes fenótipos. Seu produto, uma proteína de 38 kDa, é um fator de transcrição sigma alternativo. Genes sob o controle de RpoS possuem diversas funções como proteção contra danos ao DNA, determinação de modificações morfológicas, virulência, osmoproteção,

proteção contra estresse oxidativo e termotolerância (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994; WEBER *et al.*, 2005).

Em determinados ambientes ou mesmo em alimentos, as bactérias podem enfrentar uma condição de estresse osmótico, causado por altas concentrações de sal ou açúcar, ou ainda devido à desidratação do alimento. Sob esta condição, é essencial para a célula a manutenção da pressão de turgor e hidratação (YOUSEF e JUNEJA, 2003). Quando *E. coli* é mantida em meio com alta osmolaridade, há a síntese de um sistema para a captação de potássio, chamado transportador KdpABC, responsável pelo acúmulo de potássio dentro da célula para responder ao ambiente hiperosmótico externo (WHITE, 2000).

Outro mecanismo, muito bem caracterizado, por meio do qual as bactérias respondem ao estresse hiperosmótico, envolve o acúmulo de solutos compatíveis, moléculas polares e altamente solúveis que não afetam as funções normais da célula, mesmo em altas concentrações (YOUSEF e JUNEJA, 2003; O'BYRNE e BOOTH, 2002). Os solutos compatíveis mais comuns são glicina betaína, prolina, ectoína, carnitina, colina e trealose. O acúmulo destes compostos é regulado no nível transcricional ou por modificação da atividade enzimática (BREMER e KRÄMER, 2000). Em *E. coli*, a síntese de algumas proteínas requeridas para a produção e transporte dos osmoprotetores é controlada pelo fator σ^s . O operon *otsBA*, que codifica as enzimas trealose-6-fosfato sintase (*otsA*) e trealose-6-fosfato fosfatase (*otsB*), responsáveis pela produção de trealose em células de *E. coli* estressadas osmoticamente, são exemplos de genes dependentes de σ^s (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994).

A membrana celular também apresenta modificações em resposta ao estresse osmótico. Foi observado aumento na razão *trans/cis* de ácidos graxos insaturados em células expostas a altas concentrações de sal (CRONAN, 2002) e aumento na proporção de fosfolipídios aniônicos e/ou glicolipídios quando comparado às células não estressadas (RUSSEL *et al.*, 1995).

Quando mantidos em baixa temperatura, os microrganismos apresentam modificações fisiológicas que permitem sua sobrevivência a esta condição. Uma das mudanças ocorridas é o aumento do número de insaturações ou diminuição no tamanho da cadeia dos ácidos graxos de membrana, para

manter a fluidez da membrana em níveis normais uma vez que esta é reduzida em razão da baixa temperatura (RUSSEL *et al.*, 1995).

As proteínas sintetizadas em resposta ao choque frio podem ser classificadas como Csps (*cold shock proteins*) ou Caps (*cold-shock acclimation proteins*). As Csps são expressas rapidamente, mas por um curto período em resposta ao choque frio. As proteínas Caps são sintetizadas durante o crescimento contínuo em baixas temperaturas, estas são rapidamente induzidas, mas permanecem sendo superexpressas várias horas após a diminuição da temperatura (PHADTARE *et al.*, 1999). Estas proteínas compartilham um alto grau de similaridade (>45%) em uma variedade de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, incluindo *E. coli* (GOLDSTEIN *et al.*, 1990) e *S. Enteritidis* (JEFFREYS *et al.*, 1998).

O choque frio também causa a estabilização das pontes de hidrogênio das estruturas secundárias dos ácidos nucléicos, resultando em uma diminuição da eficiência da replicação, transcrição e tradução (YOUSEF e JUNEJA, 2003). Este efeito é reduzido pela expressão de proteínas que atuam como chaperonas de ácidos nucléicos. CspA, a principal proteína de choque frio em *E. coli* funciona como uma chaperona de RNA em baixas temperaturas (SCHINDELIN *et al.*, 1993; JIANG *et al.*, 1997; YAMANAKA *et al.*, 1998). CspA também atua com ativador transcricional de pelo menos dois outros genes que codificam proteínas induzidas pelo frio, GyrA (JONES *et al.*, 1992) e H-NS (LA TEANA *et al.*, 1991), ambas envolvidas no superrenovamento do DNA.

As proteínas sintetizadas em resposta ao choque frio podem ser classificadas como Csps (*cold shock proteins*) ou Caps (*cold-shock acclimation proteins*). As Csps são expressas rapidamente, mas por um curto período em resposta ao choque frio. As proteínas Caps são sintetizadas durante o crescimento contínuo em baixas temperaturas, estas são rapidamente induzidas, mas permanecem sendo superexpressas várias horas após a diminuição da temperatura (PHADTARE *et al.*, 1999). Estas proteínas compartilham um alto grau de similaridade (>45%) em uma variedade de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, incluindo *E. coli* (GOLDSTEIN *et al.*, 1990) e *S. Enteritidis* (JEFFREYS *et al.*, 1998).

Em *E. coli*, as Csps estão agrupadas em duas classes. As proteínas da classe I incluem chaperonas de DNA/RNA, como a CspA, proteínas associadas

a ribossomos, uma ribonuclease e uma proteína envolvida no término da transcrição. As proteínas da classe II estão envolvidas na estabilidade e estrutura do DNA e incluem a proteína de ligação ao DNA H-NS e uma subunidade da DNA girase (YOUSEF e JUNEJA, 2003).

A síntese e o transporte de solutos compatíveis como betaína, prolina, carnitina e trealose também conferem tolerância dos microrganismos ao frio. Em *E. coli* verificou-se que a síntese de trealose, pelo produto do gene *otsBA* é induzida também pelo frio (KANDROR *et al.*, 2002).

No ambiente natural, as bactérias frequentemente enfrentam condições onde há limitação de nutrientes e entram em períodos intermitentes de ausência de crescimento ou crescimento muito lento. Em alguns ambientes, o tempo de geração pode ser de dias ou meses uma vez que a concentração de nutrientes está baixa. Quando ocorre falta de um nutriente essencial, a célula microbiana pode induzir sistemas de captação específicos para retirar do ambiente o nutriente necessário ou induzir a síntese de enzimas que poderão utilizar uma fonte alternativa do nutriente (WHITE, 2000).

Por exemplo, sob condições de concentrações baixas de fosfato inorgânico, *E. coli* estimula a transcrição de, pelo menos, 38 genes que estão envolvidos na assimilação de fosfato, incluindo genes que codificam uma fosfatase alcalina que pode produzir fosfato a partir de ésteres de fosfato orgânico (*phoA*), genes que codificam proteínas para a formação de um canal de porina na membrana externa para ânions incluindo fosfato (*phoE*), um sistema de captação de fosfato chamado sistema Pst e uma proteína requerida para a repressão do fosfato (*pstSCAB – phoU*), uma histidina quinase e um regulador de resposta (*phoBR*), 14 genes para a captação e quebra de fosfato, genes para a captação de gliceraldeído-3-fosfato e genes que codificam uma fosfodiesterase (WANNER, 1996).

A falta de carbono e energia é um dos estresses mais comuns enfrentados por bactérias em ambientes naturais (FOSTER e SPECTOR, 1995; SPECTOR, 1998). *S. Typhimurium* e muitas outras bactérias não formadoras de endosporos respondem à falta de carbono com alterações na expressão gênica que resultam em modificações morfológicas e fisiológicas que as tornam diferentes das células em crescimento ativo e mais resistentes a estresses (SPECTOR, 1998). Diferentemente do ocorrido na fase estacionária, a resposta

à falta de nutrientes é obtida em consequência de um único parâmetro específico, a falta de carbono e energia e em densidades populacionais menores do que as encontradas em condições típicas de fase estacionária (KENYON *et al.*, 2002). Este processo é controlado, pelo menos parcialmente, pelo fator de transcrição alternativo σ^S (HENGGE-ARONIS, 1996).

As bactérias em meio com limitação de nutrientes também degradam proteínas a uma taxa aumentada (MANDELSTAM, 1963; REEVE *et al.*, 1984; GOTTESMAN e MAURIZI, 2001). O processo de degradação de proteínas a aminoácidos livres em *E. coli* e *S. Typhimurium* em meio com limitação de carbono é muito importante para a sobrevivência da célula (REEVE *et al.*, 1984; PETERSON *et al.*, 2005).

1.3. Estado viável não cultivável (VNC)

Bactérias não formadoras de esporos, quando expostas a condições ambientais adversas, podem adotar como estratégia de sobrevivência, a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado viável não cultivável (OLIVER, 2005). O estado viável não cultivável (VNC) foi primeiramente relatado por Xu *et al.* (1982), em um estudo sobre a sobrevivência de *Vibrio cholerae* e *E. coli* em ambientes aquáticos. Foi observado que os microrganismos permaneciam metabolicamente ativos sob condições de salinidade e temperatura variadas, porém não apresentavam crescimento quando eram empregados métodos tradicionais de cultivo.

Há relatos na literatura da indução desse estado em mais de 60 espécies bacterianas diferentes (OLIVER *et al.*, 2005b), dentre elas, bactérias gram-negativas como *Salmonella* (ROSZAK *et al.*, 1984; CARO *et al.*, 1999; ASAKURA *et al.*, 2002; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003), *V. cholerae* (COLWELL *et al.*, 1985; SEELIGMANN *et al.*, 2008), *Vibrio vulnificus* (OLIVER *et al.*, 1991; OLIVER, 1995; OLIVER e BOCKIAN, 1995; RICE *et al.*, 2000; SMITH e OLIVER, 2006), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG e WANG, 2004), *Campylobacter* (ROLLINS e COLWELL, 1986; FEDERIGHI *et al.*, 1998; THOLOZAN *et al.*, 1999) e *E. coli* O157:H7 (MAKINO *et al.*, 2000) e em bactérias gram-positivas não formadoras de esporos como *Enterococcus*

faecalis (LLEÒ *et al.*, 1998; HEIM *et al.*, 2002), *Listeria monocytogenes* (BESNARD *et al.*, 2000a; BESNARD *et al.*, 2000b; CAPPELIER *et al.*, 2007; DREUX *et al.*, 2007) e *Lactococcus lactis* (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2007).

1.4. Fatores que induzem o estado viável não cultivável

A entrada no estado VNC pode ocorrer devido a muitos fatores presentes no ambiente como falta de nutrientes, temperaturas baixas e elevadas, salinidade, níveis de oxigênio, dentre outros (McDOUGALD *et al.*, 1998; OLIVER, 2000; OLIVER, 2005b). As condições de indução ao estado VNC variam de acordo com o microrganismo.

O estresse osmótico e de temperatura e a escassez de nutrientes são amplamente estudados como fatores de indução do estado VNC. Foi relatada a entrada da linhagem *S. enterica* Typhimurium DT 104 no estado VNC após 273 dias em solução tampão fosfato a 0,0735 mM mantida a 5 °C (GUPTE *et al.*, 2003). No entanto, a entrada de estirpes de *S. enterica* Oranienburg no estado VNC foi constatada num período muito mais curto, após a incubação em uma solução contendo 7% de cloreto de sódio a 4 °C por 24 horas (ASAKURA *et al.*, 2002). Em outro ensaio foi detectada a presença de *S. enterica* Enteritidis no estado VNC em microcosmo de água de rio mantido por 48 horas em temperatura ambiente (ROSZAK *et al.*, 1984). No trabalho realizado por Floresta (2006) foi constatado que parte da população de *S. enterica* Enteritidis CCS3, isolada de carcaça suína, entrou no estado VNC após 10 dias de inoculação em solução de KH_2PO_4 adicionada de cloreto de sódio 1,02 mol/L e mantida a 5 °C. Nesses estudos, verifica-se que o tempo requerido para a transição para o estado VNC varia com as condições empregadas bem como com a estirpe bacteriana utilizada.

Outros microrganismos também entram no estado VNC devido a indução por: estresse osmótico, baixa temperatura e escassez de nutrientes. Dentre eles estão *Vibrio vulnificus* (OLIVER *et al.*, 1991; SMITH e OLIVER, 2006), *V. parahaemolyticus* (WONG *et al.*, 2004; WONG e OLIVER, 2004; WONG e WANG, 2004; COUTARD *et al.*, 2005), *Vibrio cholerae* (KONDO *et*

al., 1994), *Edwardsiella tarda* (DU *et al.*, 2007) e *Listeria monocytogenes* (BESNARD *et al.*, 2000b).

O aumento de temperatura também pode induzir a entrada no estado VNC, como para *Pseudomonas fluorescens*, um microrganismo psicrotófico, que entra no estado VNC quando mantido a 37 °C (OLIVER, 2000).

A exposição a diferentes concentrações de cobre induz a entrada no estado VNC por *Erwinia amylovora* (ORDAX *et al.*, 2006), *E. coli* (GREY e STECK, 2001), *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium leguminosarum* (ALEXANDER *et al.*, 1999), *Xanthomonas campestris* (GHEZZI e STECK, 1999), e *Rhizobium melioli* (MANAHAN e STECK, 1997). A exposição a condições ácidas em *S. Typhimurium* (JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006) e *Campylobacter* (CHAVEERACH *et al.*, 2003), bem como a exposição à luz solar em *E. coli* (POMMEPUY *et al.*, 1996) também levam à entrada das células neste estado de dormência.

1.5. Alterações fenotípicas de células em estado viável não cultivável

Bactérias no estado VNC apresentam alterações morfológicas e fisiológicas importantes. Dentre as alterações morfológicas pode-se ressaltar a redução do tamanho (OLIVER, 2000) e a transição para a forma cocóide (GUPTA *et al.*, 2003; ALBERTINI *et al.*, 2006). Modificações na composição dos ácidos graxos da membrana citoplasmática também têm sido constatadas (OLIVER, 2000; DAY e OLIVER, 2004). Algumas mudanças bioquímicas no peptidoglicano também têm sido observadas, como o aumento no grau de ligações cruzadas, aumento da porcentagem de muropeptídeos ligados a lipoproteínas, diminuição do tamanho da cadeia de açúcares e alterações nas proteínas de ligação à penicilina (*penicillin binding proteins*) (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002).

Células que entram no estado VNC apresentam alterações no seu metabolismo, como redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2005b). Ainda se conhece muito pouco sobre a fisiologia relacionada à entrada e à persistência dos microrganismos neste estado, porém há evidências de que os mecanismos

envolvidos diferem, pelo menos, em parte, daqueles presentes quando a célula está sob resposta a estresse. Em *Enterococcus faecalis* verificou-se que o perfil de proteínas expressas no estado VNC induzido por falta de nutrientes e baixa temperatura difere do encontrado nas células em crescimento exponencial e em resposta a estresse por falta de nutrientes (*starvation*) (HEIM *et al.*, 2002).

A análise do proteoma de *E. coli* O157:H7 no estado VNC inoculada em tampão fosfato salina adicionado de 0,05% de peróxido de hidrogênio revelou redução dos níveis de alguns fatores de resposta à oxidação e aumento da síntese da proteína de membrana externa OmpW, um receptor para a colicina S4 (ASAKURA *et al.*, 2007). A maioria das proteínas de membrana de *E. coli* induzidas por exposição à água do mar exibem massa molecular inferior a 29 kDa, fato atribuído à proteólise e/ou ao *turnover* de proteínas para a adaptação às condições ambientais adversas, não sendo detectada nenhuma proteína exclusiva do estado VNC (MUELA *et al.*, 2008).

Vários trabalhos constataram que a síntese de mRNA não cessa em células no estado VNC, o que confirma que as células permanecem ativas metabolicamente (LLEÒ *et al.*, 2000; FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; SUN *et al.*, 2008). Em estudos realizados com *Vibrio cholerae* (ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006), *V. vulnificus* (SMITH e OLIVER, 2006) e *V. parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005), foi detectada a presença do mRNA do gene *rpoS*, que codifica um fator sigma alternativo relacionado à resposta geral ao estresse, na população no estado VNC.

A influência de *rpoS* na sobrevivência de *E. coli* e *Salmonella* no estado VNC tem sido investigada, entretanto, os estudos realizados ainda não são conclusivos sobre o papel deste fator na manutenção de bactérias no estado VNC (MUNRO *et al.*, 1995; BOARETTI *et al.*, 2003). Foi verificado que RpoS influencia positivamente a culturabilidade de *E. coli* e *S. Typhimurium* em água do mar (MUNRO *et al.*, 1995). Entretanto, este efeito protetor depende do estado fisiológico das células e da condição em que foram cultivadas antes da inoculação no meio oligotrófico. Por exemplo, verificou-se que mutantes de *E. coli* RpoS⁻ mantidos a 4 °C em água do mar perdem a culturabilidade e a

viabilidade muito mais rapidamente que a estirpe selvagem (BOARETTI *et al.*, 2003).

Quanto à manutenção de virulência das células no estado VNC, os dados encontrados na literatura são controversos. Não se detectou a presença dos transcritos dos genes de virulência *thd1* e *thd2*, que codificam uma hemolisina termoestável em *Vibrio parahaemolyticus* (COUTARD *et al.* (2005). Entretanto, nos trabalhos realizados com *V. vulnificus* no estado VNC foi confirmada a presença do mRNA do gene *vvhA*(FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; SMITH e OLIVER, 2006). O produto deste gene, uma hemolisina, é um importante fator de virulência para este patógeno.

Estudos *in vivo* também demonstram a controvérsia existente sobre a patogenicidade das células no estado VNC. Alguns estudos sobre a manutenção de virulência em *S. Typhimurium*, constataram que a virulência do patógeno foi perdida com a entrada no estado VNC (BALEUX *et al.*, 1998), enquanto outros estudos realizados com este mesmo patógeno verificaram que a virulência foi mantida (JOLIVERT-GOUGEON *et al.*, 2006). Outros patógenos como *E. coli* (POMMEPUY *et al.*, 1996), *Shigella dysenteriae* (RAHMAN *et al.*, 1996) e *Vibrio* spp. (BAFFONE *et al.*, 2003) também permaneceram virulentos após entrada no estado VNC.

1.6. Ressuscitação do estado viável não cultivável

Microrganismos no estado VNC podem retomar a capacidade de crescer em meios de cultura, sem que seja verificado aumento do número total de células. A este fenômeno dá-se o nome de ressuscitação. Em alguns casos, a simples retirada do fator de indução do estado VNC é capaz de acionar o retorno da culturabilidade, como em *Vibrio vulnificus* (WHITESIDES e OLIVER, 1997) e *V. parahaemolyticus* (BATES e OLIVER, 2004), onde as bactérias retomaram a capacidade de multiplicação pela simples mudança da temperatura de manutenção de 5 °C para 22 °C e em *E. coli* (OHTOMO e SAITO, 2001), em que a ressuscitação ocorreu após a transferência da cultura de uma solução fosfato salina com 5% de NaCl para uma solução sem a adição deste sal. *Vibrio cincinnatiensis* voltou a apresentar culturabilidade após

o aumento da temperatura de manutenção e adição de catalase ou vitamina B ao meio de cultivo (ZHONG *et al.*, 2009).

Em alguns casos, a ressuscitação parece ser um evento mais complexo. Por exemplo, para uma estirpe de *E. coli* não se obteve ressuscitação após a transferência das células para meios com diversos fatores bióticos e abióticos (ARANA *et al.*, 2007). Em estudos com *Legionella pneumophila* constatou-se que a adição de nutrientes ao meio não reverteu o estado VNC das células, apesar de ter sido a falta de nutrientes o fator de indução dessa condição (KELL *et al.*, 1998). Também em estudos com *S. Typhimurium* e *E. coli*, o aumento da temperatura de incubação, a adição de catalase, superóxido dismutase ou piruvato de sódio não propiciaram o retorno da culturabilidade (OLIVER *et al.*, 2005).

Algumas bactérias podem ressuscitar do estado VNC após passagem *in vivo* como no caso de *V. vulnificus* em ratos (OLIVER e BOCKIAN, 1995), *S. Oranienburg* e *Vibrio* spp. em camundongos (ASAKURA *et al.*, 2002; BAFFONE *et al.*, 2003), *L. monocytogenes* (CAPPELIER *et al.*, 2007), *C. jejuni* e *C. coli* (CAPPELIER *et al.*, 1999a; CAPPELIER *et al.*, 1999b; CHAVEERACH *et al.*, 2003) em diferentes modelos animais.

Verificou-se em *S. Typhimurium* que alguns fatores de crescimento podem induzir o retorno da culturabilidade em células VNC. Dentre os fatores estudados, constatou-se que um auto-indutor de crescimento, uma substância termoestável secretada por enterobactérias em resposta à noradrenalina, foi o mais efetivo em promover a ressuscitação de células (REISSBRODT *et al.*, 2002).

Dentre os fatores estudados que levam à ressuscitação de células no estado VNC, atualmente tem se destacado a proteína Rpf, uma proteína pequena, originalmente identificada em *Micrococcus luteus*, que promove a recuperação de bactérias no estado VNC para um estado vegetativo (MUKAMOLOVA *et al.*, 1998). Em *M. luteus* verificou-se que a proteína Rpf é um fator essencial para o crescimento do microrganismo (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002a) e que apresenta atividade de hidrolase de peptidoglicano (TELKOV *et al.*, 2006).

Genes que codificam proteínas Rpf - *like* são amplamente distribuídos em bactérias patogênicas (TELKOV *et al.*, 2006). O gene que codifica a

proteína Rpf em *Salmonella* Typhimurium LT2 foi clonado e caracterizado (PANUTDAPORN *et al.*, 2006). Neste estudo, a proteína recombinante rRpf foi capaz de induzir a ressuscitação de células de *S. Oranienburg* do estado VNC além de estimular o aumento na velocidade de crescimento do patógeno em meio de caldo tripticaseína e soja a 37 °C.

O processo pelo qual a hidrólise do peptidoglicano promove a ressuscitação do estado VNC ainda não é conhecido. Dois modelos gerais para esse processo têm sido propostos e discutidos (COHEN-GONSAUD *et al.*, 2005; RAVAGNANI *et al.*, 2005; MUKAMOLOVA *et al.*, 2006;). No primeiro modelo especula-se que a proteína Rpf aja liberando uma pequena molécula que sinalizaria para a célula adjacente via difusão, possivelmente por meio de um receptor de superfície. Outra hipótese é que o papel da Rpf seria de promover alteração na parede celular de alguma forma que promova a liberação do bloqueio mecânico para a divisão celular. Esta proteína seria produzida durante a fase de crescimento exponencial para permitir a divisão celular, mas sua expressão é reduzida no estado de dormência de forma que sua atividade se tornaria muito baixa para permitir esse processo. Estudos realizados sobre a expressão desta proteína dão suporte a esta segunda hipótese (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002a, MUKAMOLOVA *et al.*, 2002b). Como alguns trabalhos demonstraram que a camada de peptidoglicano apresenta alterações no estado VNC (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002), o provável papel desta proteína seria a clivagem destes peptidoglicanos modificados.

1.7. Detecção de células no estado viável não cultivável

Uma vez que os microrganismos no estado VNC não são capazes de crescer em meios de cultura tradicionais, a sua determinação é geralmente realizada pela contagem de microrganismos viáveis ao microscópio. O número de células no estado VNC é obtido pela diferença entre as células viáveis totais e as células cultiváveis (ROSZAK e COLWELL, 1987).

A detecção das células viáveis totais pode ser realizada por diferentes metodologias como a técnica descrita por Kogure *et al.* (1979), que consiste em

incubar a amostra por poucas horas com uma determinada fonte de nutriente em baixa concentração, como extrato de levedura na presença de ácido nalidíxico, um inibidor de divisão celular. As bactérias posteriormente são coradas com o fluorocromo alaranjado de acridina e as células viáveis se apresentarão alongadas, pois irão preparar-se para a divisão celular que é impedida pela ação do ácido nalidíxico. Essa técnica é muito utilizada por vários autores, sendo que alguns inseriram modificações, seja no tempo de incubação das amostras, na concentração de nutriente ou no antimicrobiano utilizado (ROLLINS e COLWELL, 1986; ROSZAK e COLWELL, 1987; BYRD *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1994; OLIVER *et al.*, 1995; FEDERIGHI *et al.*, 1998; HÖLLER e MARTIN, 1998; BESNARD *et al.*, 2000b; OLIVER *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2008; ZHONG *et al.*, 2009).

A viabilidade celular também pode ser avaliada pela detecção da atividade respiratória com a utilização da dupla coloração CTC-DAPI descrita por Rodriguez *et al.* (1992). Todas as células são coradas em azul pelo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e somente as células com a cadeia de transporte de elétrons ativa são capazes de reduzir o corante fluorescente CTC (cloreto de 5-ciano-2,3 ditolil tetrazólio) apresentando um precipitado intracelular fluorescente vermelho. Em vários trabalhos essa metodologia foi utilizada (PYLE *et al.*, 1995; FEDERIGHI *et al.*, 1998; CARO *et al.*, 1999; BESNARD *et al.*, 2000a; LESNE *et al.*, 2000; GUPTE *et al.*, 2003).

A avaliação da integridade da membrana celular é outra forma muito utilizada para se verificar a viabilidade das células no estado VNC. A técnica se baseia no uso combinado de dois corantes fluorescentes de ácidos nucleicos, SYTO 9 e iodeto de propídio, presentes no *kit* LIVE/DEAD[®] BacLight (Molecular Probes), que têm diferentes capacidades de penetrar na membrana celular. O corante SYTO 9, que fluoresce verde, penetra em todas as células, viáveis e não viáveis. O iodeto de propídio penetra apenas nas células que apresentam danos na membrana celular, fazendo com que estas apresentem fluorescência vermelha ao microscópio de epifluorescência, diferenciando assim as células viáveis das células mortas (VILLARINO, *et al.*, 2000). Esta técnica tem sido utilizada em vários trabalhos para enumeração de células viáveis não cultiváveis (ASAKURA *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; ASAKURA *et al.*, 2005; SMITH e OLIVER, 2006; LIU *et al.*, 2008).

A utilização de ferramentas moleculares para a detecção de células viáveis, especialmente a detecção de mRNAs, tem sido muito útil para a confirmação de viabilidade das células no estado VNC. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar genes que poderiam ser utilizados como marcadores de viabilidade das células no estado VNC (LLEÒ *et al.*, 2000; FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; COUTARD *et al.*, 2007a; COUTARD *et al.*, 2007b; LIU *et al.*, 2008).

A presença do mRNA que corresponde ao gene *pbp5*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina, apresentou correlação com atividade metabólica e capacidade de ressuscitação, sendo considerada um bom marcador de viabilidade das células de *E. faecalis* no estado VNC (LLEÒ *et al.*, 2000).

A presença do transcrito referente ao rDNA 16S também foi considerada um bom marcador genético para a detecção e quantificação de células viáveis de *V. cholerae* no estado VNC (ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006). Foi relatado que os níveis do transcrito da fração ribossomal 16S se mantiveram estáveis desde a inoculação de *V. cholerae* no microcosmo de água do mar artificial até a entrada no estado VNC (ASAKURA *et al.*, 2006). No entanto, este mesmo transcrito apesar de ter sido detectado em células no estado VNC de *V. cholerae*, apresentou redução significativa no nível de transcrição, se comparado ao observado em células na fase exponencial de crescimento (GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006).

Outros trabalhos têm constatado que a presença do transcrito do gene de virulência que codifica uma hemolisina em *Vibrio vulnificus* no estado VNC é um bom indicador de viabilidade celular (FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; SMITH e OLIVER, 2006).

Outro gene candidato a marcador de viabilidade para células no estado VNC que tem sido investigado é o *rpoS*, um fator sigma alternativo, como em *V. vulnificus* (SMITH e OLIVER, 2006), em *V. parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005; COUTARD *et al.*, 2007b) e em *V. cholerae* (ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006).

1.8. Importância do estado viável não cultivável em alimentos

A investigação de ferramentas moleculares para detecção de microrganismos no estado VNC é especialmente importante para a pesquisa destes microrganismos em amostras de alimentos. Nestas amostras, a utilização de técnicas de microscopia de fluorescência torna-se difícil devido à presença de partículas que interferem na observação ao microscópio. Devido a essa dificuldade técnica não existem muitos trabalhos que atestem a presença de microrganismos no estado VNC em alimentos (OLIVER, 2005a). Entretanto existem evidências que este fenômeno ocorra, uma vez que em muitos alimentos as bactérias são submetidas a condições de estresse como alta concentração de sal, baixas temperaturas, baixo pH, baixos níveis de oxigênio e presença de compostos antimicrobianos que induzem a entrada no estado VNC.

Em 1998 no Japão, um alimento tradicional que continha 13% de cloreto de sódio, foi implicado como possível responsável por mais de sessenta casos de infecção alimentar causada por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157 (MAKINO *et al.*, 2000). Os níveis de contaminação do alimento com EHEC O157 mostraram-se inferiores à dose infecciosa, mas a infecção se estabelecia. Foi comprovado que as estirpes de EHEC O157 isoladas tanto do alimento como dos pacientes eram capazes de entrar em estado VNC quando expostas a altas concentrações de NaCl (MAKINO *et al.*, 2000).

As contagens de microrganismos viáveis em leite pasteurizado eram significativamente superiores às contagens de microrganismos em placas, sugerindo que nesta amostra havia uma parcela de bactérias no estado VNC (GUNASEKERA *et al.*, 2002).

Em estudos com populações de bactérias do ácido lático e ácido acético em vinhos durante a estocagem sugere-se que as bactérias do ácido acético entraram no estado VNC devido à limitação de oxigênio, enquanto que as bactérias do ácido lático devido à presença de sulfitos (MILLET e LONVAUD-FUNEL, 2000). Estes mesmos autores também constataram que as bactérias eram capazes de hidrolizar ésteres quando não cultiváveis e que as bactérias do ácido acético ressuscitavam rapidamente quando havia disponibilidade de oxigênio.

Bactérias no estado VNC também são encontradas em amostras de água para consumo (DESMONTS *et al.*, 1990; LERICHE e CARPENTIER, 1995; DEFIVES *et al.*, 1999; LECLERC e MOREAU, 2002; LIU *et al.*, 2008).

Mais recentemente, foi constatado que parte da população de *Pseudomonas fluorescens* dos biofilmes formados em superfícies de contato com alimentos (cupons de cerâmica imersos em exudato de carne bovina) entrava no estado VNC após a exposição a agentes sanitizantes (PENEAU *et al.*, 2007).

Portanto, os trabalhos mencionados anteriormente demonstram a importância do estudo do estado VNC para a segurança alimentar, uma vez que patógenos podem estar presentes no estado VNC em alimentos ou na água e não serem detectados por procedimentos laboratoriais de rotina, ocasionando a classificação errônea da amostra como adequada para consumo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMER, B. M. M.; VAN REEUWIJK, J.; TIMMERS, C. D.; VALENTINE, P. J.; HEFFRON, F. *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1185-1193, 1998.

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

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

ARANA, I.; ORRÑO, M.; PÉREZ-PASCUAL, D.; SECO, C. D.; MUELA, A.; BARCINA, I. Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, p. 1-11, 2007.

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

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

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

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

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

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

BATES, T. C.; OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **The Journal of Microbiology**, v.42, n.2, p.74-79, 2004.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.147, p.173-180, 1997.

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

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

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

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Recent horizontal transmission of plasmids between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p.1622-1627, 1997.

BRADEN, C. R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n.4, p.512-517, 2006.

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

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm#>. Acesso em 20 Out. 2009.

BREMER, E.; KRÄMER, R. Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *In: Bacterial Stress Responses*, STORZ, G. e HENGGE-ARONIS, R. (eds.) ASM Press, Washington, D.C., USA, p. 79-97, 2000.

BYRD, J. J.; XU, H.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.3, p. 875-878, 1991.

CAPPELIER, J. M.; MAGRAS, C.; JOUVE, J. L.; FEDERIGHI, M. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. **Food Microbiology**, v. 16, p. 375-383, 1999a.

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

CAPPELIER, J. M.; BESNARD, V.; ROCHE, S. M.; VELGE, P.; FEDERIGHI, M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. **Veterinary Research**, v. 38, p. 573-583, 2007.

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

CASTRO, F. A.; SANTOS, V. R.; MARTINS, C. H. G. M; FERNANDES, S. A.; ZAIA, J. E.; MARTINEZ, J. R.. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 244-251, 2002.

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

CHIU, C. H.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y.; WANG, H.; LEE, Y. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 1690 -1698, 2005.

COLWELL, R. R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D. J.; ROSZAK, D. R.; HUQ, S. A.; PALMER, L. M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related

pathogens in the environment implication for release of genetically engineered microorganisms. **BioTecnology**, v. 3, p. 817-820, 1985.

COHEN-GONSAUD, M.; BARTHE, P.; BAGNÉRIS, C.; HENDERSON, B.; WARD, J.; ROUMESTAND, C.; KEEP, N. H. The structure of a resuscitation-promoting factor from *M. tuberculosis* shows homology to lysozymes. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, p. 270-273, 2005.

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

COUTARD, F.; CRASSOUS, P.; DROGUET, M.; GOBIN, E.; COLWELL, R. R.; POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? **The ISME Journal**, v. 1, n. 2, p. 111-120, 2007a.

COUTARD, F.; LOZACH, S.; POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16 p. 5183-5189. 2007b.

COX, N.A.; BERRANG, M.E.; CASON, J.A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs: a review. **Poultry Science**, v.79, n.11, p. 1571-1574, 2000.

CRONAN, J. E. Phospholipids modification in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 202-205, 2002.

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

DEFIVES, C.; GUYARD, S.; OULARÉ, M. M.; MARY, P.; HORNEZ, J. P. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 1033-1038, 1999.

DESMONTS, C.; MINET, J.; COLWELL, R.; CORMIER, M. Fluorescent-antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in chlorinated wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1448-1452, 1990.

DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T. G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p.189-194, 2002.

DREUX, N.; ALBAGNAC, C.; FEDERIGHI, M.; CARLIN, F.; MORRIS, C. E.; NGUYEN-THE, C. Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 1272-1281, 2007.

DU, M.; CHEN, J.; ZHANG, X.; AIJUAN, L.; LI, Y.; WANG, Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1349-1354, 2007.

FEDERIGHI, M.; THOLOZAN, J. L.; CAPPELIER, J. M.; TISSIER, J. P.; JOUVE, J. L. Evidence of non coccoid viable but non culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining and scanning electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 15, n. 5, p.539-550, 1998.

FISCHER-LE SAUX, M.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R.; POMMEPUY, M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5641-5646, 2002.

FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 55p., 2006.

FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. How *Salmonella* survive against the odds. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p.145-174, 1995.

GÁLÁN, J. E.; CURTIS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 6383-6387, 1989.

GÁLÁN, J. E.; CURTIS III, R. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. **Infection and Immunity**, v. 58, p.1879-1885, 1990.

GÁLÁN, J. E.; CURTIS III, R. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 2901-2908, 1991.

GÁLÁN, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 263-272, 1996.

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

- GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N. S.; INOUE, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 283-287, 1990.
- GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; FEY, A.; HÖFLE, M. G.; ESPEJO, R. T.; GUZMÁN, C. A. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but nonculturable state and starvation in response to cold shock. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 658-666, 2006.
- GOTTESMAN, S.; MAURIZI, R. Cell biology: enhanced surviving starvation. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 614 – 615, 2001.
- GREY, B.; STECK, R. T. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5325-5327, 2001.
- GUNASEKERA, T. S.; SØRENSEN, A.; ATTFIELD, P. V.; SØRENSEN, S. J.; VEAL, D. A. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1988-1993, 2002.
- GUPTA, A. R.; RESENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6669-6675, 2003.
- HEIM, S.; LLEO, M. D. M.; BONATO, B.; GUSMAN, C. A.; CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6739-6745, 2002.
- HENGGE-ARONIS, R. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: NEIDHARDT, F. C. *et al.* **Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology**, 2 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. p. 1497–1512, 1996.
- HENGGE-ARONIS, R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 148-152, 1999.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 95–102, 2004.
- HÖLLER, C.; MARTIN, W. Evaluation of the direct viable count method for temperature-stressed *Campylobacter coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p. 157-162, 1998.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. ICMSF. **Microorganismos de los alimentos. 1: su significado y**

métodos de enumeración. 2 ed. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 439 p., 2000.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Food Science Text Series., Springer Science and Business Media, Inc. New York, USA, 790 p., 2005.

JEFFREYS, A. G.; HAK, K. M.; STEFFMAN, R. J.; FOSTER, J. W.; BEJ, A. K. Growth, survival and characterization of *cspA* in *Salmonella enteritidis* following cold shock. **Current Microbiology**, v. 36, p. 29-35, 1998.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 196-202, 1997.

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.

JONES, B.D. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p.110-117, 2005.

JONES, P. G.; KRAH, R.; TAFURI, S. R.; WOLF, A. P. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5798-5802, 1992.

KANDROR, O.; DE LEON, A.; GOLDBERG, A. L. Threose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 9727-9732, 2002.

KELL, D. B.; KAPRELYANTS, A. S.; WEICHART, D. H.; HARWOOD, C. L.; BARER, M. R. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 169-187, 1998.

KENYON, W. J.; SAYERS, D. G.; HUMPHREYS, S.; ROBERTS, M.; SPECTOR, M. P. The starvation-stress response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires σ^E , but not CpxR-regulated extracytoplasmic functions. **Microbiology**, v. 148, p. 113-122, 2002.

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

KONDO, K.; TAKADE, A.; AMAKO, K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p. 179-184, 1994.

LA TEANA, A.; BRANDI, A.; FALCONI, M.; SPURIO, R.; PON, C. L.; GUALERZI, C. O. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 10907-10911, 1991.

LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 207-222, 2002.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LESNE, J.; BERTHET, S.; BINARD, S.; ROUXEL, A.; HUMBERT, F. Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 195-203, 2000.

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

LLEÒ, M. M.; TAFI, M. C.; CANEPARI, P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. **Systematic Applied Microbiology**, v. 21, p. 333-339, 1998.

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

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

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

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

MANDELSTAM, J. Protein turnover and its function in the economy of the cell. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 621-636, 1963.

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

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

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

MILLS, D. M.; BAJAJ, V.; LEE, C. A. A 40 kilobase chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 49-759, 1995.

MUELA, A.; SECO, C.; CAMAFEITA, E.; ARANA, I.; ORRUÑO, M.; LÓPEZ, J. A.; 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.; YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; KELL, D. B. A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8916-8921, 1998.

MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O. A.; YOUNG, D. I.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B.; YOUNG, M. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 623-635, 2002a.

MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O. A.; KAZARIAN, K.; TELKOV, M.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B.; YOUNG, M. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 611-621, 2002b.

MUKAMOLOVA, G. V.; MURZIN, A. G.; SALINA, E. G.; DEMINA, G. R.; KELL, D. B.; KAPRELYANTS, A. S.; YOUNG, M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 84-98, 2006.

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

O'BYRNE, C. P.; BOOTH, I. R. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 203-216, 2002.

OCHMAN, H.; SONCINI, F. C.; SOLOMON, F.; GROISMAN, E. A. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 7800-7804, 1996.

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

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

OLIVER, J. D. Viable but nonculturable bacteria in food environments. *In: Food-borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. FRATAMICO, P. M.; BHUNIA, A. K. (eds.) Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, p. 99-112, 2005a.

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

OLIVER, J. D. Viable but nonculturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p. 203-208, 1995.

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

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

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

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

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

PENEAU, S.; CHASSAING, D.; CARPENTIER, B. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on

- surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2839-2846, 2007.
- PETERSON, C. N.; MANDEL, M. J.; SILHAVY, T. J. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7549-7553, 2005.
- PHADTARE, D.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold shock response and cold shock proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 175-180, 1999.
- POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, R.; COLWELL, R.; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.12, p. 4621-4626, 1996.
- PYLE, B.H.; BROADAWAY, S.C.; McFETTERS, G.A. A rapid, direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2614-2619, 1995.
- RAHMAN, I.; SHAHAMAT, M.; CHOWDHURY, M. A. ; COLWELL, R. R. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 115-120, 1996.
- RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Nontyphoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p. 237–247, 2001.
- RAVAGNANI, A.; FINAN, C. L.; YOUNG, M. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. **BMC Genomics**, v. 6, p. 39, 2005.
- REEVE, C. A.; BOCKMAN, A. T.; MATIN, A. Role of degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p. 758-763, 1984.
- REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; PLIKAYTIS, A. A.; HEIBA, B. D.; FARMER, J. J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 313-320, 1989.
- REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; TSCHÄPE, 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.
- RICE, S.A.; McDOUGALD, D.; KJELLEBER, S. *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.6, p.115-120, 2000.

- RODRIGUEZ, G. G.; PHIPPS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H.F. Use of fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1801-1808, 1992.
- ROLLINS, M. D.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n.3, p. 531-538, 1986.
- ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Metabolic activity of bacteria cells enumerated by direct viable count. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n.12, p. 2889-2893, 1987.
- 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.
- ROTGER, R.; CASADÉSUS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **International Microbiology**, v. 2, p.177-184, 1999.
- RUSSEL, N. J.; EVANS, R. I.; TER STEEG, P.F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.; ABEE, T. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 255-261, 1995.
- RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 1, p.1-10, 2006.
- SAROJ, S. D.; SHASHIDHAR, R.; KARANI, M.; BANDEKAR, J. R. Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 424-427, 2008.
- SCHINDELIN, H.; JIANG, W.; INOUE, M.; HEINEMANN, U. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 5119-5123, 1993.
- SCHLOSSER, W.; HOGUE, A.; EBEL, E.; ROSE, B.; UMHOLTZ, R.; FERRIS, K.; JAMES, W. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; hazard analysis and critical control point final rule in the US. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 107-111, 2000.
- SEELIGMANN, C. T.; MIRANDE, V.; TRACANNA, B. C.; SILVA, C. ; AULET, O.; CECILIA, M.; BINSZTEIN, N. Phytoplankton-linked viable non-culturable *Vibrio cholerae* O1 (VNC) from rivers in Tucumán, Argentina. **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 4, p. 367-377, 2008.
- SHEA, J. E.; HENSEL, M. ; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella*

typhimurium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 2593-2597, 1996.

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

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

SMITH, J. J.; HOWINGTON, P. J.; McFETERS, A. G. Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2977-2984, 1994.

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

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

SUN, F.; CHEN, J.; ZHONG, L.; ZHANG, X.; WANG, R.; GUO, Q.; DONG, Y. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, p. 37-44, 2008.

TELKOV, M. V.; DEMINA, G. R.; VOLOSHIN, S. A.; SALINA, E. G.; DUDIK, T. V.; STEKHANOVA, T. N.; MUKAMOLOVA, G. V.; KAZARYAN, K. A.; GONCHARENKO, A. V.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A. S. Proteins of the Rpf (Resuscitation Promoting Factor) family are peptidoglycan hydrolases. **Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 414-422, 2006.

THIAGARANJAN, D.; SAEED, A.M.; ASEM, E.K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, v.73, n.1, p. 89-98, 1994.

THOLOZAN, J. L.; CAPPELIER, J. M.; TISSIER, J. P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1110-1116, 1999.

VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v. 36, p. 267-288, 2005.

VERNIKOS, G. S.; PARKHILL, J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2196-2203, 2006.

VILLARINO, A.; BOUVET, O. M. M.; REGNEULT, B.; MARTIN-DELAUTRE, S.; GRIMONT, P. A. D. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 755-768, 2000.

WANNER, B. L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: ***Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology**. NEIDHART, F.C. (Ed.) ASM Pres, Washington, D.C., p. 1357-1358, 1996.

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

WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**, 2 ed., Oxford. University Press, New York, NY, USA, 600 p., 2000.

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

WHO, World Health Organization. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars**. 2007 9th edition Disponível em: < http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/salmoms/WKLM_2007.pdf>. Acesso em 20 Jan. 2009.

WILSON, J. W.; SCHURR, M. J.; LEBLANC, C. L.; RAMAMURTHY, R.; BUCHANAN, K. L.; NICKERSON, C. A. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, p. 216–224. 2002.

WONG, P.; OLIVER, J. D. Biochemical and virulence characterization of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2430-2435, 2004.

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

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

XU, H. S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATWELL, 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.

YAMANAKA, K.; FANG, L.; INOUE, M. The CspA family in *Escherichia coli* : multiple gene duplication for stress adaptation. **Molecular Microbiology**, v.27, n.2, p. 247–255, 1998.

YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. (Eds). **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. CRC Press, Washington, USA, 369 p., 2003.

ZHONG, L.; CHEN, J.; ZHANG, X.; JIANG, Y. Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 247-252, 2009.

CAPÍTULO 2

Indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella enterica* e perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC

2.1. INTRODUÇÃO

O patógeno *Salmonella* é reconhecido pela capacidade de responder a inúmeras condições de estresse encontradas em alimentos como alta concentração de sal e baixas temperaturas (ASAKURA *et al.*, 2002; DODD e ALDSWORTH, 2002). Uma estratégia utilizada por este microrganismo para sobreviver em condições desfavoráveis é a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado viável não cultivável (VNC), em que permanece viável, metabolicamente ativo, porém incapaz de crescer em meios de cultura utilizados comumente nas análises microbiológicas de rotina (XU *et al.*, 1982).

A contaminação de alimentos com células em estado VNC pode não ser detectada em procedimentos laboratoriais de rotina, resultando em uma avaliação inapropriada da presença de patógenos nos produtos (PANUTDAPORN *et al.*, 2006).

Há relatos na literatura da indução desse estado em bactérias do gênero *Salmonella*, como *Salmonella enterica* Typhimurium (CARO *et al.*, 1999; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003), *S. enterica* Oranienburg (ASAKURA *et al.*, 2002; PANUTDAPORN *et al.*, 2006), e *S. enterica* Enteritidis (ROSZAK *et al.*, 1984; FLORESTA, 2006).

Condições como baixas temperaturas e adição de cloreto de sódio, que são práticas comumente utilizadas na conservação de alimentos, podem levar à indução do estado VNC em alguns microrganismos. Diversos são os fatores que induzem este estado fisiológico em bactérias. Os estresses osmótico e de temperatura e a escassez de nutrientes são amplamente estudados como fatores de indução ao estado VNC (ROSZAK *et al.*, 1984; ASAKURA *et al.*, 2002; GUPTE *et al.*, 2003; FLORESTA, 2006).

Células que entram no estado VNC apresentam alterações no seu metabolismo, como redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2000). Vários trabalhos constataram que a síntese de mRNA não cessa em células em estado VNC, o que confirma que as células permanecem ativas metabolicamente (LLEÒ *et al.*, 2000; FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; SUN *et al.*, 2008).

Ainda se conhece muito pouco sobre a fisiologia relacionada à entrada e persistência dos microrganismos neste estado, porém há evidências de que os mecanismos envolvidos diferem, pelo menos, em parte, daqueles presentes quando a célula está sob resposta a estresse. Em *Enterococcus faecalis* verificou-se que o perfil de proteínas no estado VNC, induzido por falta de nutrientes e baixa temperatura, difere do encontrado nas células em crescimento exponencial e em resposta a estresse por falta de nutrientes (HEIM *et al.*, 2002).

A análise do proteoma de *Escherichia coli* O157:H7 no estado VNC revelou redução dos níveis de alguns fatores de resposta a oxidação e aumento da síntese da proteína de membrana externa OmpW, um receptor para a colicina S4 (ASAKURA *et al.*, 2007). A maioria das proteínas de membrana de *E. coli* induzidas por exposição à água do mar exibiam massa molecular inferior a 29 kDa, fato atribuído à proteólise e/ou *turnover* de proteínas para a adaptação às condições ambientais adversas (MUELA *et al.*, 2008).

Dada a importância do estado VNC para a microbiologia de alimentos, os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da estirpe, do meio de suspensão das células, da concentração salina e da densidade populacional inicial sobre a entrada de *Salmonella enterica* no estado VNC e comparar o

perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC e em resposta a estresse.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia e no laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

2.2.1. Microrganismos utilizados

Foram utilizadas nesse trabalho as estirpes *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* PT4 963 e *S. Enteritidis* CCS3. As linhagens *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram obtidas da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, a estirpe *S. Enteritidis* PT4 963, isolada de peito de frango, foi obtida do acervo da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), enquanto a estirpe *S. Enteritidis* CCS3, obtida de carcaça suína, foi isolada por Lima (2002). As culturas foram mantidas congeladas a – 80 °C em tubos de microcentrifuga com 1 mL de caldo BHI – Infusão Cérebro e Coração (Merck) e contendo glicerol a 20%.

2.2.2. Indução do estado viável não cultivável em diferentes estirpes, meios de suspensão de células e concentrações salinas.

2.2.2.1. Obtenção de células de diferentes estirpes no estado viável não cultivável

Para avaliar a influência da estirpe, do meio de cultura e da concentração salina na entrada de *Salmonella* no estado VNC foram utilizadas as linhagens *S. Enteritidis* PT4 963, *S. Enteritidis* CCS3 e *S. Typhimurium* ATCC 14028.

As estirpes foram cultivadas por duas vezes consecutivas em 10 mL de meio BHI a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 2723 g por 20 minutos em centrífuga Sorvall RT 6000D (Du Pont Company, USA) e ressuspensas em 10 mL de solução salina 0,85%. Logo após, 100 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculados em 10 mL de caldo BHI e as culturas foram mantidas a 37 °C por aproximadamente três horas, até que atingissem a D.O. _{600nm} de 0,3, referente à fase exponencial de crescimento, correspondendo a uma população de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Estas culturas foram novamente centrifugadas a 2723 g por 20 minutos e ressuspensas em 10 mL de solução salina, procedimento que foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, 1 mL de cada suspensão bacteriana foi inoculado em frascos contendo 100 mL dos meios : (1) solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com a AOAC (1998), contendo 7,35 mmol/L de KH_2PO_4 e (2) caldo BHI. Tanto a solução BPS como o caldo BHI foram acrescidos de cloreto de sódio nas concentrações de 0,7; 1,0 ou 1,2 mol/L. A população inicial foi padronizada em aproximadamente 10^6 UFC/mL nos frascos, os quais foram mantidos a 4 °C em geladeira. Alíquotas foram retiradas periodicamente para análises de culturabilidade e viabilidade celular.

O experimento foi conduzido em duas repetições utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa *Sigma Stat for Windows version 3.5* (Systat Software, Inc.). Os dados foram analisados por meio de análise de variância considerando o

esquema fatorial 3 X 2 X 3 , correspondente a três estirpes (*S. Enteritidis* PT4 963, *S. Enteritidis* CCS3 e *S. Typhimurium* ATCC 14028), dois meios de suspensão das células (meio BHI e solução fosfato de Butterfield – BPS) e três concentrações salinas 0,7 1,0 ou 1,2 mol/L).

2.2.2.2. Avaliação da culturabilidade e viabilidade celular

A culturabilidade das amostras foi verificada por meio do plaqueamento em ágar triptcaseína e soja (TSA) pela técnica de microgotas (MORTON, 2001). Quando as contagens se encontravam abaixo de 10^3 UFC/mL, que é o limite de detecção da técnica, utilizavam-se outros métodos de plaqueamento, como o plaqueamento em superfície ou em mistura (MORTON, 2001). O limite mínimo de detecção destas técnicas foi reduzido a 0,1 UFC/mL obtido por plaqueamento de 1 mL da amostra concentrada 10 vezes, por centrifugação a 2723 *g* por 20 minutos. As placas de TSA eram mantidas a 37 °C por até 72 horas. Quando não se verificava a formação de colônias após 72 horas, 10 mL da amostra original foram inoculados em 10 mL de meio BHI com concentração dupla e mantidos a 37 °C por 48 horas com a finalidade de verificar crescimento por meio da turvação do meio.

A viabilidade celular foi avaliada pela contagem direta ao microscópio de microrganismos viáveis utilizando o *kit* LIVE/DEAD® *BacLight* (Molecular Probes), segundo as instruções do fabricante. Para utilização do *kit* LIVE/DEAD®, 300 µL da amostra lavada, centrifugada e ressuspensa em solução salina 0,85% foram corados utilizando-se 1 µL da mistura contendo partes iguais dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio. As amostras foram incubadas, no escuro, em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 µL da amostra já corada foi transferida para uma lâmina e coberta com lamínula de espessura de 0,17 mm e observada em microscópio de epifluorescência Olympus BX 50, utilizando o filtro WG. Foram montadas duas lâminas para cada amostra sendo contados 15 campos ao acaso em cada lâmina.

Quando as amostras apresentavam contagem de microrganismos viáveis ao microscópio inferior a 10^4 células/mL (limite de detecção da técnica),

alíquotas de 1 a 10 mL eram centrifugadas a 10000 g por 20 minutos, ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% e coradas com 3 µL da mistura os corantes SYTO 9 e iodeto de propídio. Após a incubação por 15 minutos no escuro, a amostra era filtrada em membrana de policarbonato preta (Millipore) com poro de 0,2 µm e diâmetro de 13 mm. As membranas eram colocadas sobre lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de epifluorescência.

A contagem direta de microrganismos viáveis por mililitro (CV/mL) foi calculada pela fórmula:

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

onde, *FM* é o fator do microscópio (2066 para amostra filtrada em membrana de policarbonato ou 12732,4 para amostra transferida diretamente para a lâmina) e *FD* é o fator de diluição que corresponde ao inverso da diluição utilizada.

Foram construídos gráficos com as contagens de microrganismos cultiváveis expressas em número logarítmico de unidades formadoras de colônia por mililitro (Log de UFC/mL) para cada amostra ao longo do tempo de análise (120 dias).

A taxa de perda de culturabilidade foi determinada pela inclinação da reta obtida por regressão linear do gráfico Log de UFC/mL x Tempo (dias).

A contagem de microrganismos viáveis por mililitro (CV/mL) foi determinada no momento da inoculação, no dia da perda total de culturabilidade e após 210 dias de inoculação nos frascos. A viabilidade foi expressa pelo percentual de microrganismos viáveis em determinado tempo em relação à população inicial.

O índice de entrada em estado viável não cultivável (IVNC) foi calculado pelo percentual de células viáveis na data da perda total de culturabilidade em relação à população inicial inoculada dividido pelo tempo requerido para a perda total de culturabilidade.

2.2.3. Indução do estado viável não cultivável em diferentes densidades populacionais iniciais

Com o objetivo de avaliar a influência da densidade populacional inicial sobre a indução do estado VNC em células de *Salmonella* foram utilizadas as estirpes de *S. Enteritidis* ATCC 13076, CCS3 e PT4 963 em solução BPS adicionada de 1,2 mol/L de NaCl.

Para obtenção das células, as estirpes foram cultivadas por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo BHI a 37 °C por 12 horas. As culturas foram posteriormente centrifugadas a 2723 *g* por 20 minutos, lavadas em solução salina 0,85% por duas vezes, padronizadas em 10⁹ UFC/mL e, posteriormente, ajustadas para que atingissem populações iniciais de 10³, 10⁵ e 10⁷ UFC/mL em frascos contendo 100 mL de solução BPS preparada de acordo com a AOAC (1998), acrescida de cloreto de sódio a 1,2 mol/L. Os frascos foram mantidos a 4 °C em geladeira. Alíquotas foram retiradas periodicamente para análises de culturabilidade e viabilidade celular conforme o item 2.2.2.

O experimento foi conduzido em três repetições, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa *Sigma Stat for Windows version 3.5*. Os dados foram analisados por meio de análise de variância considerando o esquema fatorial 3 X 3, correspondente a três estirpes (*S. Enteritidis* ATCC 13076, CCS3 e PT4 963) e três densidades populacionais (10³, 10⁵ e 10⁷ UFC/mL).

Foram construídos gráficos com o logaritmo da contagem de microrganismos cultiváveis por mililitro (UFC/mL) para cada amostra ao longo do tempo de análise (31 dias). A taxa de perda de culturabilidade foi determinada pela inclinação da reta obtida por regressão linear do gráfico Log de UFC/mL x Tempo (dias).

A contagem de microrganismos viáveis por mililitro (CV/mL) foi determinada no momento da inoculação e após 6 e 31 dias de inoculação nos frascos. A perda de viabilidade foi estimada considerando-se o cálculo da redução média em ciclos logarítmicos de microrganismos viáveis ao longo do tempo analisado (31 dias). A população de microrganismos viáveis não cultiváveis foi calculada pela subtração do número de UFC/mL do número de CV/mL.

2.2.4. Avaliação do perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado viável não cultivável e em resposta a estresse

2.2.4.1. Coleta das amostras

As células de *S. Enteritidis* PT4 963 foram coletadas em sete condições distintas: na fase exponencial de crescimento, na fase estacionária, sob estresse osmótico, estresse de baixa temperatura e estresse de falta de nutrientes, no momento da inoculação em solução BPS acrescida de cloreto de sódio 1,2 mol/L e após 70 dias de inoculação nesta solução, mantida a 4 °C, quando a população foi considerada viável não cultivável.

A estirpe de *S. Enteritidis* PT4 963 foi cultivada por duas vezes consecutivas em 10 mL de meio BHI a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 2723 g por 20 minutos e ressuspensa em 10 mL de solução salina 0,85%. Logo após, alíquotas de 100 µL desta suspensão bacteriana foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI e mantidas a 37 °C por aproximadamente três e sete horas, respectivamente, para obtenção de células nas fases exponencial e estacionária de crescimento.

Alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana também foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo BHI e contendo cloreto de sódio 0,7 mol/L com incubação a 37 °C por sete horas para induzir a resposta a estresse osmótico. A resposta a estresse frio foi obtida pela inoculação de 1 mL da suspensão bacteriana em 10 mL de caldo BHI e manutenção da cultura a 4 °C por 120 horas. A resposta à falta de nutrientes foi obtida inoculando-se 1 mL da suspensão bacteriana em 10 mL de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com AOAC (1998), sendo a cultura mantida a 37 °C por 72 horas. As culturas foram posteriormente centrifugadas a 2723 g por 20 minutos a 4 °C e ressuspensas em 4 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0 adicionados de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) para uma concentração final de 1 mmol/L.

Para a indução do estado VNC, culturas provenientes da fase exponencial de crescimento foram centrifugadas, lavadas cinco vezes em solução salina e inoculadas em frascos contendo 300 mL de solução BPS,

acrescida de cloreto de sódio a 1,2 mol/L. A população inicial inoculada foi de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Os frascos foram mantidos a 4 °C em geladeira por 70 dias quando se verificou que a cultura estava no estado VNC, uma vez que a contagem de microrganismos cultiváveis em ágar tripticaseína e soja (TSA) foi inferior a 0,1 UFC/mL, indicando a total perda de culturabilidade e a contagem de microrganismos viáveis ao microscópio estava em $3,8 \times 10^7$ células/mL.

Alíquotas de 240 mL das culturas recém inoculadas nos frascos de meio BPS acrescidos de NaCl 1,2 mol/L e após 70 dias de manutenção a 4 °C foram centrifugadas a 7444 g por 30 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 4 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 adicionado de PMSF 1 mM.

2.2.4.2. Extração de proteínas intracelulares

A extração de proteínas intracelulares foi realizada em *French Press* (SLM Instruments, Inc., EUA). As amostras foram submetidas por duas vezes consecutivas à pressão de 900 a 1000 psi com posterior centrifugação a 7444 g por 60 minutos a 4 °C para remoção dos restos celulares. Alíquotas de 2 mL das amostras foram precipitadas com três volumes de acetona por 16 horas a 4 °C e centrifugadas a 7444 g por 40 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos foram secos ao ar e ressuspendidos em 400 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As amostras foram estocadas a - 20 °C em tubos de microcentrífuga. A quantificação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.2.4.3. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)

O perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 foi avaliado por SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970), em Sistema Mini-Protean[®] II, com fonte Power Pac 300 (Bio - Rad Laboratories, EUA). Os extratos protéicos foram padronizados em 50 µg de proteína por 15 µL de amostra e submetidos à fervura por 10 minutos juntamente com 5 µL de tampão da amostra. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 16%. O

gel foi submetido à eletroforese a 100 V, por aproximadamente cinco horas e, em seguida, foi corado com o corante azul de Coomassie coloidal G-250.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Indução do estado viável não cultivável utilizando diferentes estirpes, meios de suspensão de células e concentrações salinas.

Verificou-se perda de culturabilidade ao longo do tempo para as três estirpes estudadas nos meios de suspensão e concentrações salinas testados (Figuras 1 a 6), A maior redução nas contagens foi observada nos primeiros 40 dias de manutenção a 4 °C, onde constatou-se redução média de 4,35 ciclos logarítmicos nas contagens de microrganismos em ágar TSA. Entre 40 e 80 dias houve redução média de 1,7 ciclos logarítmicos e entre 80 e 120 dias, redução de 0,73 ciclos logarítmicos.

A taxa de perda de culturabilidade variou entre as estirpes somente nas amostras inoculadas em caldo BHI e contendo NaCl 1,2 mol/L ($p < 0,05$), com o maior valor obtido para *S. Enteritidis* PT4 963 (Tabela 1). O meio utilizado influenciou a perda de culturabilidade, sendo a maior redução verificada nas amostras em solução BPS ($P < 0,001$). A concentração salina também teve influência sobre a perda de culturabilidade, sendo encontrada maior taxa para as amostras inoculadas com 1,2 mol/L de cloreto de sódio ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras com 0,7 e 1,0 mol/L de cloreto de sódio.

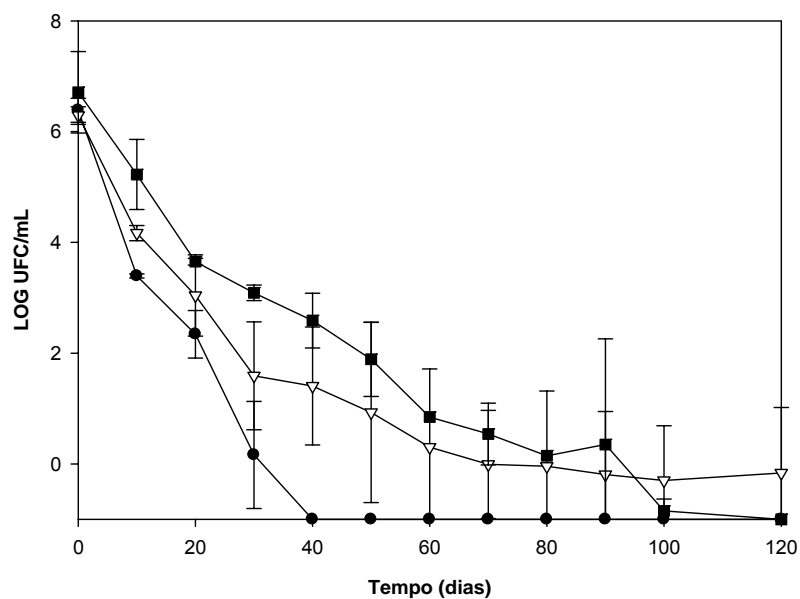


Figura 1. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 mantida em solução BPS acrescida de cloreto de sódio a 4 °C. (●) BPS + NaCl 1,2 M; (▽) BPS + NaCl 1,0 M; (■) BPS + NaCl 0,7 M.

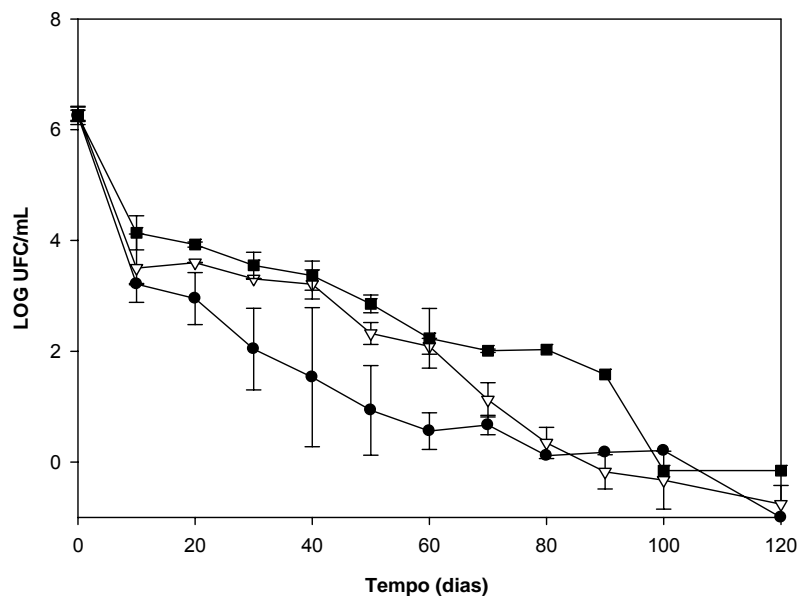


Figura 2. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 mantida em meio BHI acrescida de cloreto de sódio a 4° C. (●) BHI + NaCl 1,2 M; (▽) BHI + NaCl 1,0 M; (■) BHI + NaCl 0,7 M.

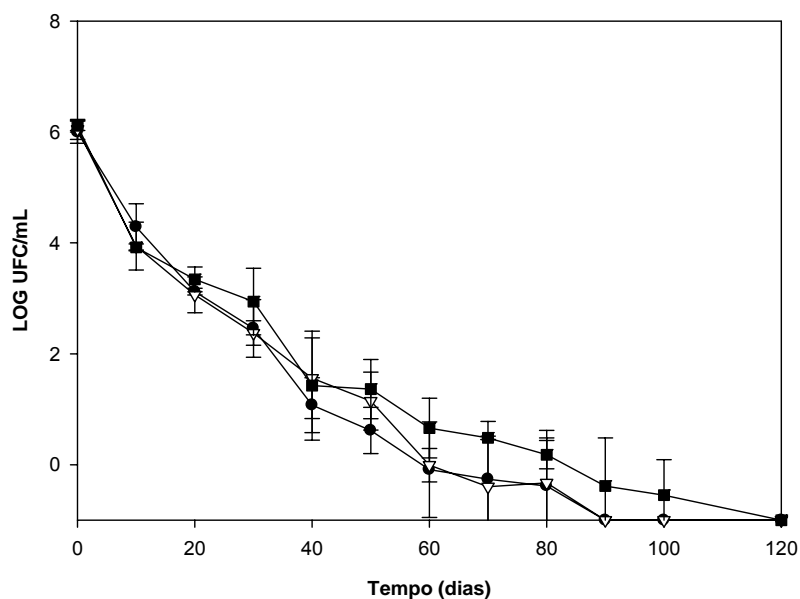


Figura 3. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCS3 mantida em solução BPS acrescida de cloreto de sódio a 4 °C. (●) NaCl 1,2 mol/L; (▽) NaCl 1,0 mol/L; (■) NaCl 0,7 mol/L.

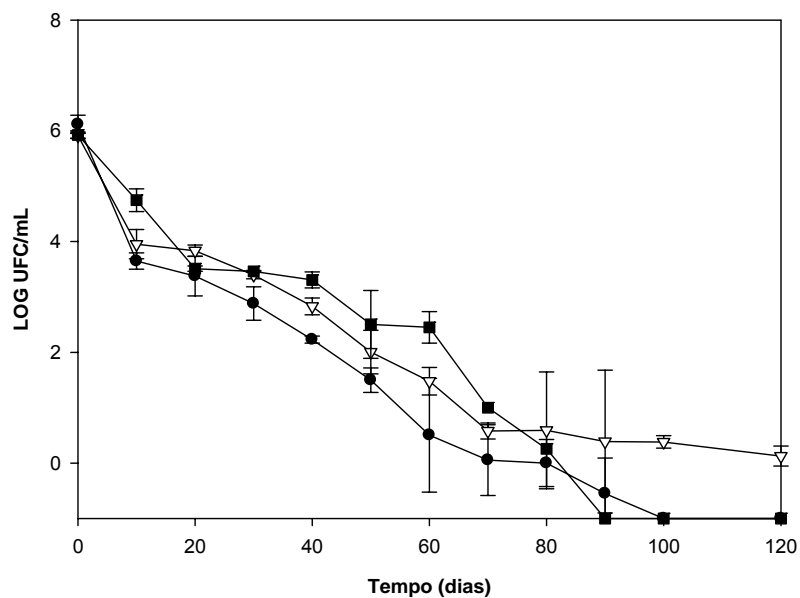


Figura 4. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCS3 mantida em meio BHI acrescida de cloreto de sódio a 4 °C. (●) NaCl 1,2 mol/L; (▽) NaCl 1,0 mol/L; (■) NaCl 0,7 mol/L.

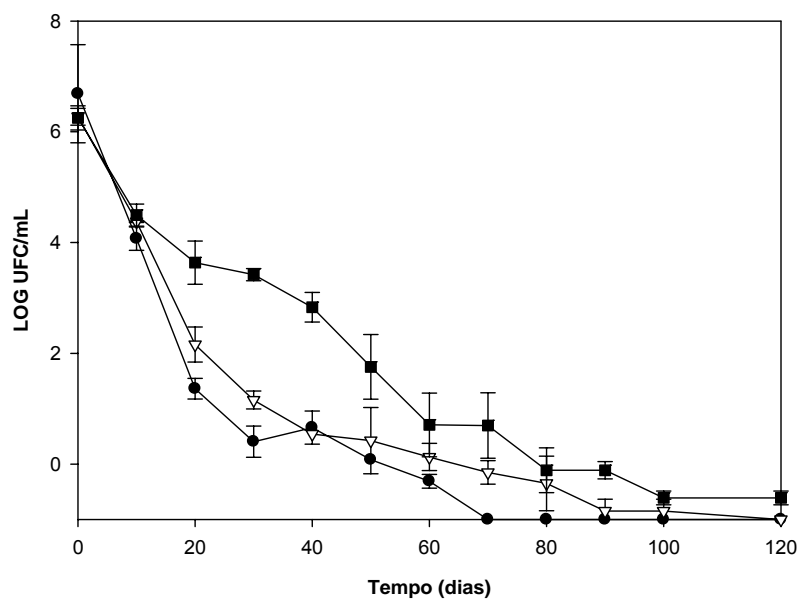


Figura 5. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 mantida em solução BPS acrescida de cloreto de sódio a 4 °C. (●) NaCl 1,2 mol/L; (▽) NaCl 1,0 mol/L; (■) NaCl 0,7 mol/L.

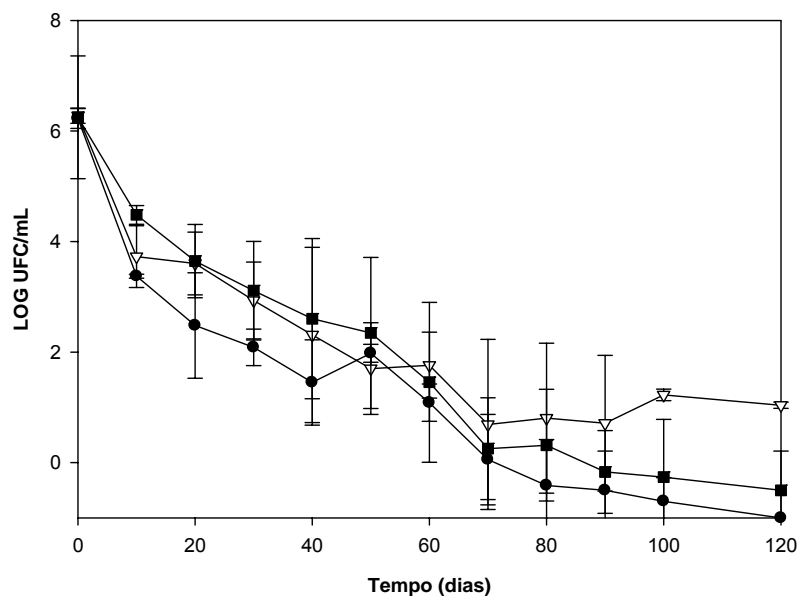


Figura 6. Culturabilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 mantida em meio BHI acrescida de cloreto de sódio a 4 °C. (●) NaCl 1,2 mol/L; (▽) NaCl 1,0 mol/L; (■) NaCl 0,7 mol/L.

Tabela 1. Taxa de perda de culturabilidade de células de *Salmonella enterica* mantidas em solução BPS e em meio BHI adicionados de cloreto de sódio a 4 °C.

Microrganismo	Tratamento	Taxa de perda de culturabilidade (h⁻¹)*
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium ATCC 14028	BPS + NaCl 0,7 mol/L	1,214 ± 0,247
	BPS + NaCl 1,0 mol/L	1,522 ± 0,304
	BPS + NaCl 1,2 mol/L	1,977 ± 0,395
	BHI + NaCl 0,7 mol/L	0,369 ± 0,139
	BHI + NaCl 1,0 mol/L	0,443 ± 0,100
	BHI + NaCl 1,2 mol/L	0,741 ± 0,194
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis CCS3	BPS + NaCl 0,7 mol/L	0,806 ± 0,287
	BPS + NaCl 1,0 mol/L	0,753 ± 0,122
	BPS + NaCl 1,2 mol/L	1,002 ± 0,386
	BHI + NaCl 0,7 mol/L	0,377 ± 0,129
	BHI + NaCl 1,0 mol/L	0,467 ± 0,086
	BHI + NaCl 1,2 mol/L	0,629 ± 0,066
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963	BPS + NaCl 0,7 mol/L	0,685 ± 0,163
	BPS + NaCl 1,0 mol/L	0,774 ± 0,204
	BPS + NaCl 1,2 mol/L	2,395 ± 0,028
	BHI + NaCl 0,7 mol/L	0,760 ± 0,433
	BHI + NaCl 1,0 mol/L	0,951 ± 0,077
	BHI + NaCl 1,2 mol/L	1,562 ± 0,824

* A taxa de perda de culturabilidade foi determinada pela inclinação da reta obtida por regressão linear do gráfico Log de UFC/mL x Tempo (dias).

A maior taxa de perda de culturabilidade foi verificada para *S. Enteritidis* PT4 963 em solução BPS acrescida de NaCl 1,2 mol/L enquanto que o menor valor foi observado para *S. Typhimurium* ATCC 14028 em meio BHI e contendo NaCl 0,7 mol/L (Tabela 1). Esses dados indicam que a culturabilidade declina mais rapidamente quando estes microrganismos são submetidos a uma condição de limitação de nutrientes e alta concentração salina. A falta de nutrientes é um dos principais fatores que induzem o estado VNC e, portanto, o

mais utilizado como ferramenta de estudo (FLORESTA, 2006). Este fato já foi constatado em estudos com bactérias do gênero *Salmonella* (ROSZAK *et al.*, 1984; GUPTA *et al.*, 2003; FLORESTA, 2006). Vários trabalhos também têm relatado que a perda da culturabilidade de alguns microrganismos é dependente da concentração de NaCl (MATTICK *et al.*, 2000; ASAKURA *et al.*, 2002; BESNARD *et al.*, 2002; ARMANDA *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2004; ASAKURA *et al.*, 2005).

A culturabilidade das amostras foi acompanhada por 120 dias. Durante este período, algumas amostras perderam totalmente a capacidade de formar colônias em meio de cultura, apesar de manterem viabilidade celular (Tabelas 2, 3 e 4). Esses dados confirmam a entrada em estado VNC das estirpes de *Salmonella* estudadas.

Tabela 2. Culturabilidade e viabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 mantidas em meio BHI e em solução BPS adicionados de cloreto de sódio a 4 °C.

Tratamento	Culturabilidade (UFC/mL)	Viabilidade (CV/mL*)
BHI + NaCl 1,2 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,8x10 ⁶	1,7x10 ⁶
Entrada no estado VNC (120 dias)	<0,1	5,0x10 ³ (0,29%)**
Após 210 dias	<0,1	1,4x10 ² (0,0082%)
BPS + NaCl 0,7 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	9,3x10 ⁶	5,1x10 ⁶
Entrada no estado VNC (120 dias)	<0,1	5,9x10 ⁵ (11,57%)
Após 210 dias	<0,1	4,1x10 ² (0,0080%)
BPS + NaCl 1,2 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	2,6x10 ⁶	3,6x10 ⁶
Entrada no estado VNC (40 dias)	<0,1	4,1x10 ⁵ (11,39%)
Após 210 dias	<0,1	1,4x10 ² (0,0039%)

* CV/mL = células viáveis/mL

** Número entre parênteses corresponde à porcentagem de células viáveis em relação à população inicial

Tabela 3. Culturabilidade e viabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCS3 mantidas em solução BPS adicionada de cloreto de sódio a 4 °C.

Tratamento	Culturabilidade (UFC/mL)	Viabilidade (CV/mL*)
BPS + NaCl 0,7 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,3x10 ⁶	8,3x10 ⁵
Entrada no estado VNC (120 dias)	<0,1	9,0x10 ³ (1,08%)**
Após 210 dias	<0,1	1,5x10 ² (0,018%)
BPS + NaCl 1,0 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,2x10 ⁶	8,6x10 ⁵
Entrada no estado VNC (90 dias)	<0,1	1,9x10 ⁴ (2,21%)
Após 210 dias	<0,1	4,8x10 ² (0,056%)
BPS + NaCl 1,2 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,0x10 ⁶	3,8x10 ⁶
Entrada no estado VNC (90 dias)	<0,1	4,5x10 ⁴ (1,18%)
Após 210 dias	<0,1	1,2x10 ² (0,032%)

* CV/mL = células viáveis/mL

** Número entre parênteses corresponde à porcentagem de células viáveis em relação à população inicial

A manutenção de viabilidade nas amostras após a perda total de culturabilidade variou de 0,25 a 73,33% (Tabelas 2, 3 e 4). Esses percentuais indicam que a população de *Salmonella* que permanece no estado VNC varia entre as estirpes e as condições utilizadas para indução do estado VNC. Para *S. Typhimurium* ATCC 14028, a viabilidade celular verificada na cultura inoculada em BHI e contendo NaCl 1,2 mol/L foi de 0,29%, enquanto que para as amostras em BPS adicionado de NaCl 0,7 e 1,2 mol/L foi de 11,57 e 11,39%, respectivamente (Tabela 2). Em *S. Enteritidis* CCS3, a população de células viáveis não cultiváveis correspondeu a 1,08%, 2,21% e 1,18% da população inicial para as amostras em BPS adicionado de NaCl nas concentrações de 0,7, 1,0 e 1,2 mol/L, respectivamente (Tabela 3). Para esta estirpe, nenhuma amostra em meio BHI perdeu totalmente a culturabilidade até 120 dias de manutenção a 4 °C. Em *S. Enteritidis* PT4 963 houve manutenção de viabilidade por 0,36%, 0,25% e 73,33% da população inoculada em BPS adicionada de NaCl 0,7 mol/L, BHI acrescido de NaCl 1,2 mol/L e BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Culturabilidade e viabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 mantidas em meio BHI e em solução BPS adicionados de cloreto de sódio a 4 °C.

Tratamento	Culturabilidade (UFC/mL)	Viabilidade (CV/mL*)
BPS + NaCl 0,7 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,9x10 ⁶	2,2x10 ⁶
Entrada no estado VNC (120 dias)	<0,1	7,9x10 ³ (0,36%)**
Após 210 dias	<0,1	2,1x10 ² (0,0095%)
BPS + NaCl 1,2 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,1x10 ⁷	1,5x10 ⁶
Entrada no estado VNC (70 dias)	<0,1	1,1x10 ⁶ (73,33%)
Após 210 dias	<0,1	1,2x10 ² (0,0080%)
BHI + NaCl 1,2 mol/L		
Após inoculação (tempo 0 dia)	1,7x10 ⁶	4,0x10 ⁶
Entrada no estado VNC (120 dias)	<0,1	9,9x10 ³ (0,25%)
Após 210 dias	<0,1	6,8x10 ¹ (0,0017%)

* CV/mL = células viáveis/mL

** Número entre parênteses corresponde à porcentagem de células viáveis em relação à população inicial

Na comparação das três estirpes em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L verifica-se que *S. Typhimurium* ATCC 14028 perdeu a culturabilidade mais rapidamente que as demais, entretanto, *S. Enteritidis* PT4 963 apresenta maior percentual de células em estado viável não cultivável, podendo ser considerada mais resistente às condições de estresse avaliadas. Vale ressaltar que esta estirpe, isolada de peito de frango, é pertencente ao fagotipo 4 (PT4) que é o fagotipo mais frequentemente descrito em surtos de salmonelose em humanos e aves (THEREFALL *et al.*, 1993; NUNES *et al.*, 2003; CASTILLA *et al.*, 2006).

A redução na culturabilidade mostrou-se variável entre as estirpes e as condições utilizadas para a indução do estado VNC (Tabela 1). Esta variação também é relatada na literatura, como por exemplo, *Salmonella enterica* sorovar Oranienburg entra no estado VNC em três dias quando inoculada em solução de cloreto de sódio a 7% (PANUTDAPORN *et al.*, 2006). *S. Enteritidis* também entra no estado VNC neste mesmo período quando inoculada em microcosmo de água de rio mantido a 25 °C (ROSZAK *et al.*, 1984). Entretanto,

em estudo realizado com *S. Typhimurium* DT104 verificou-se a que entrada no estado VNC ocorre somente após 273 dias de manutenção a 5 °C em solução BPS (GUPTE *et al.*, 2003).

Assim como a perda de culturabilidade, a manutenção de viabilidade pelas amostras variou significativamente ($p < 0,05$) entre as estirpes e condições de cultivo. *S. Orianienburg* manteve 60% de viabilidade após a entrada no estado VNC em solução a 7% de NaCl (PANUTDAPORN *et al.*, 2006). *S. Typhimurium* apresentou 1% de células viáveis em água do mar a -1,8 °C após 55 dias (SMITH *et al.*, 1994). Células de *Vibrio parahaemolyticus* em estado VNC após 31 dias de incubação a 4 °C em água do mar artificial praticamente não apresentaram perda de viabilidade (COUTARD *et al.*, 2005).

Foi realizada nova contagem de microrganismos viáveis após 210 dias de inoculação nos frascos sendo constatado que em todas as amostras havia uma parcela da população de *Salmonella* que permanecia viável, no estado viável não cultivável (Tabelas 2, 3 e 4). Essa população, semelhante para todas as amostras analisadas, foi de aproximadamente $2,0 \times 10^2$ células/mL. Esses dados indicam que as estirpes avaliadas podem persistir por um período relativamente longo no estado viável não cultivável. Também já foi verificado que células de *Enterococcus faecalis* mantinham viabilidade por pelo menos 90 dias após a entrada da cultura no estado VNC (LLEÒ *et al.*, 2000).

A maioria das populações de *Salmonella* que apresentou perda total de culturabilidade estava em solução BPS (Tabelas 2, 3 e 4). Apenas duas amostras inoculadas em meio BHI com 1,2 mol/L de NaCl perderam a capacidade de serem cultivadas no período analisado. Para as amostras que apresentaram perda total da culturabilidade foi calculado o índice de entrada em estado VNC, que corresponde ao percentual de células viáveis na data da total perda de culturabilidade em relação à população inicial inoculada dividido pelo tempo requerido para a total perda de culturabilidade (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de entrada em estado VNC de células de *Salmonella enterica* mantidas em solução BPS e em meio BHI adicionados de cloreto de sódio a 4 °C.

Microrganismo	Tratamento	Índice de entrada em estado VNC* (dia⁻¹)
<i>Salmonella enterica</i>	BPS + NaCl 0,7 mol/L	0,096
sorovar Typhimurium	BPS + NaCl 1,2 mol/L	0,287
ATCC 14028	BHI + NaCl 1,2 mol/L	0,002
<i>Salmonella enterica</i>	BPS + NaCl 0,7 mol/L	0,009
sorovar Enteritidis	BPS + NaCl 1,0 mol/L	0,025
CCS3	BPS + NaCl 1,2 mol/L	0,013
<i>Salmonella enterica</i>	BPS + NaCl 0,7 mol/L	0,003
sorovar Enteritidis PT4	BPS + NaCl 1,2 mol/L	1,034
963	BHI + NaCl 1,2 mol/L	0,002

* O índice de entrada em estado VNC (IVNC) foi calculado pelo percentual de células viáveis na data da perda total de culturabilidade em relação à população inicial inoculada dividido pelo tempo requerido para a perda total de culturabilidade e expresso em dia⁻¹.

As estirpes *S. Enteritidis* PT4 963 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 inoculadas em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L apresentaram os maiores índices de entrada em estado VNC, 1,034 e 0,287, respectivamente (Tabela 5). Verifica-se que estes valores são muito maiores que os encontrados para as demais condições testadas. Como para o cálculo do índice de entrada no estado VNC considerou-se o percentual de células viáveis não cultiváveis na população e o tempo requerido para a total perda de culturabilidade, os maiores índices calculados para estas amostras indicam que estas estirpes inoculadas em meio sem nutrientes com alta concentração salina entram mais rápido em estado VNC e mantêm uma população maior de microrganismos neste estado.

De forma geral, as culturas em meio BHI, rico em nutrientes, perderam a culturabilidade mais lentamente que as inoculadas em solução BPS, onde não havia disponibilidade de nutrientes, mas apresentaram percentual de células

viáveis menor no momento em que a culturabilidade não era mais detectada. Isto sugere que a falta de nutrientes poderia conferir resistência cruzada a outros estresses por estes microrganismos, como o estresse osmótico. A resposta à limitação de nutrientes mostrou conferir proteção cruzada ao estresse osmótico em *E. coli* (JENKINS *et al.*, 1990).

Neste trabalho verificou-se que estirpes de *Salmonella* mantidas em temperatura de refrigeração em meio com ou sem nutrientes adicionados de cloreto de sódio entram no estado VNC. Uma vez que adição de sal e refrigeração são condições muito utilizadas como barreiras para impedir o crescimento de microrganismos nos alimentos, especialmente produtos cárneos, é importante considerar que há risco de que este patógeno possa entrar no estado VNC em alimentos e não serem detectados pelas técnicas convencionais que dependem da culturabilidade.

A Figura 7 destaca a mudança de morfologia ocorrida em *S. Enteritidis* PT4 963 em estado VNC após 70 dias de inoculação em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L a 4 °C. As células apresentaram redução de tamanho em relação às coletadas na fase exponencial de crescimento e transição para a forma cocóide. Esta mudança morfológica no estado VNC foi descrita para *Campylobacter* sp. (REEZAL *et al.*, 1998), *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 (GUPTE *et al.*, 2003) e *Vibrio harveyi* (SUN *et al.*, 2008). Células que estão no estado de inanição também podem apresentar diminuição no seu tamanho, como observado em *Escherichia coli* mantida em solução BPS por 10 dias a 5 °C (FLORESTA, 2006) e em células de *Listeria monocytogenes* em concentrações limitantes de glicose e aminoácidos após sete dias de incubação (HERBERT e FOSTER (2001).

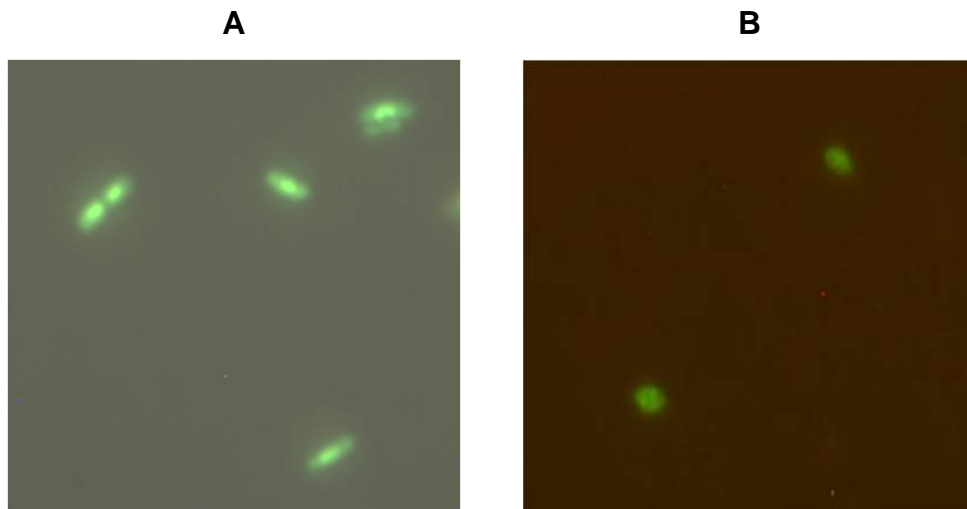


Figura 7. Células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 coradas com o *kit* LIVE/DEAD[®]. A - Células coletadas na fase exponencial de crescimento; B - Células no estado VNC após 70 dias de manutenção em solução BPS com NaCl 1,2 mol/L a 4 °C.

2.3.2. Indução do estado viável não cultivável em diferentes densidades populacionais iniciais

Houve perda gradativa de culturabilidade em todas as estirpes e densidades populacionais avaliadas (Figuras 8, 9 e 10), sendo o declínio mais acentuado nos primeiros seis dias de manutenção a 4 °C. A taxa de perda de culturabilidade variou entre as estirpes ($p < 0,001$), com *S. Enteritidis* PT4 963 apresentando o valor mais elevado, seguido por *S. Enteritidis* CCS3 e *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Tabela 6). As amostras inoculadas com 10^7 UFC/mL apresentaram as menores taxas de perda de culturabilidade ($p < 0,05$), entretanto não houve diferença significativa entre as amostras com densidades populacionais iniciais de 10^3 e 10^5 UFC/mL ($p > 0,05$).

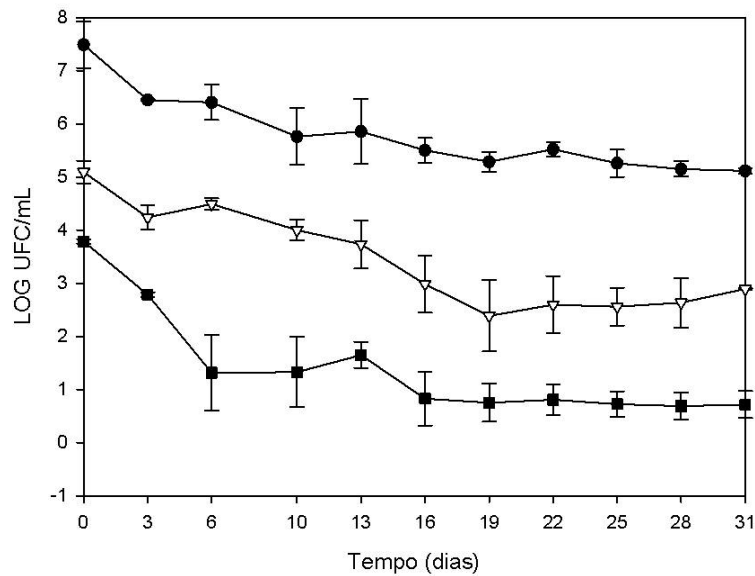


Figura 8. Culturabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076 mantidas em solução BPS contendo NaCl 1,2 mol/L a 4 °C por até 31 dias. Populações iniciais: (●) 10⁷ UFC/mL; (▽) 10⁵ UFC/mL e (■) 10³ UFC/mL.

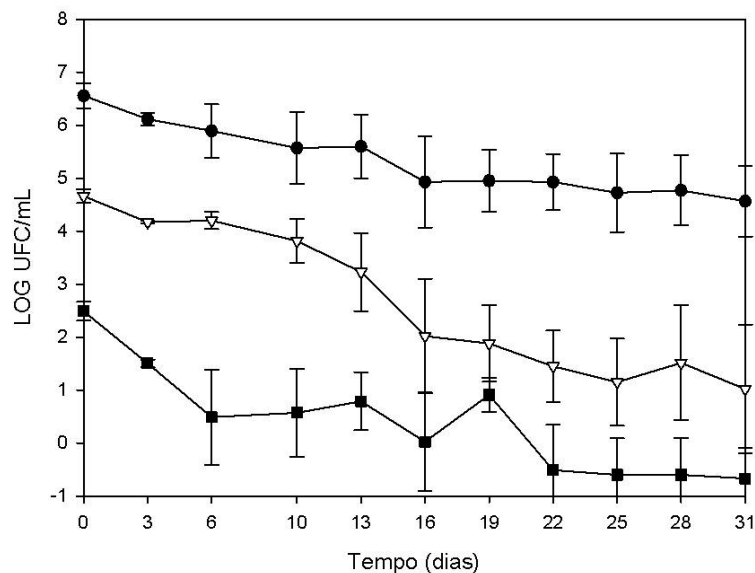


Figura 9. Culturabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis CCS3 mantidas em solução BPS contendo NaCl 1,2 mol/L a 4 °C por até 31 dias. Populações iniciais: (●) 10⁷ UFC/mL; (▽) 10⁵ UFC/mL e (■) 10³ UFC/mL.

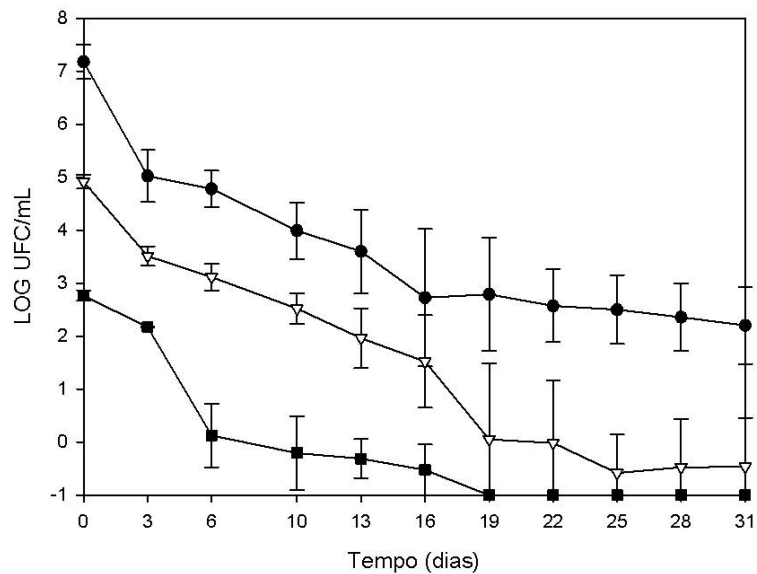


Figura 10. Culturabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 mantidas em solução BPS contendo NaCl 1,2 mol/L a 4 °C por até 31 dias. Populações iniciais: (●) 10⁷ UFC/mL; (▽) 10⁵ UFC/mL e (■) 10³ UFC/mL.

Tabela 6. Taxa de perda de culturabilidade de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis mantidas em solução BPS adicionada de cloreto de sódio 1,2 mol/L a 4 °C.

Microrganismo	População inicial (UFC/mL)	Taxa de perda de culturabilidade* (dia ⁻¹)
S. Enteritidis ATCC 13076	10 ⁷	0,200 ± 0,013
	10 ⁵	0,232 ± 0,008
	10 ³	0,239 ± 0,020
S. Enteritidis CCS3	10 ⁷	0,202 ± 0,051
	10 ⁵	0,418 ± 0,082
	10 ³	0,442 ± 0,194
S. Enteritidis PT4 963	10 ⁷	0,425 ± 0,073
	10 ⁵	0,613 ± 0,204
	10 ³	0,650 ± 0,079

* A taxa de perda de culturabilidade foi determinada pela inclinação da reta obtida por regressão linear do gráfico Log de UFC/mL x Tempo (dias).

A viabilidade também declinou ao longo do tempo e variou entre as estirpes ($p < 0,001$). *S. Enteritidis* CCS3 apresentou maior manutenção de viabilidade com redução média de apenas 0,57 ciclo logarítmico nas contagens de microrganismos viáveis até 31 dias, enquanto *S. Enteritidis* ATCC 13076 e PT4 963 apresentaram redução média de 0,96 e 0,98 ciclos logarítmicos (Figura 11). A densidade populacional inicial afetou a perda de viabilidade nas amostras avaliadas ($p < 0,05$), sendo que os frascos inoculados com aproximadamente 10^7 UFC/mL apresentaram as maiores reduções nas contagens de microrganismos viáveis (em média, 1,24 ciclos logarítmicos). As amostras inoculadas com 10^5 e 10^3 UFC/mL apresentaram reduções médias de 0,63 e 0,65 ciclo logarítmico, respectivamente.

Nas amostras inoculadas com 10^3 UFC/mL o aparecimento de células viáveis não cultiváveis na população foi mais rápido (Figura 11). Em *S. Enteritidis* CCS3 inoculada com 10^5 e 10^7 UFC/mL, a população de microrganismos no estado VNC praticamente permaneceu constante ao longo dos 31 dias de manutenção a 4 °C. Entretanto, para *S. Enteritidis* ATCC 13076 e PT4 963 inoculadas com estas densidades populacionais, a proporção de microrganismos neste estado aumentou com o tempo, embora menos acentuadamente se comparada à população de 10^3 UFC/mL.

Apesar de *S. Enteritidis* PT4 963 apresentar menores taxas de manutenção de viabilidade e maior declínio de culturabilidade, sugerindo sua menor resistência à condição de estresse avaliada, este patógeno foi o que apresentou maior percentual de células no estado VNC quando inoculado com a densidade de 10^3 UFC/mL em solução BPS acrescida de NaCl 1,2 mol/L a 4 °C. Nesta condição este foi capaz de entrar em estado VNC após 19 dias. Após 31 dias, quando haviam se passado 12 dias da perda total de culturabilidade, 50% da população ainda se mantinha viável, portanto no estado viável não cultivável.

Como já discutido anteriormente, a taxa de entrada de microrganismos no estado VNC pode variar muito de acordo com a espécie, com as condições utilizadas e também depende do estado fisiológico da população (BESNARD *et al.*, 2000). Neste estudo foi constatado que a população inicial inoculada pode influenciar a entrada de *Salmonella* no estado VNC.

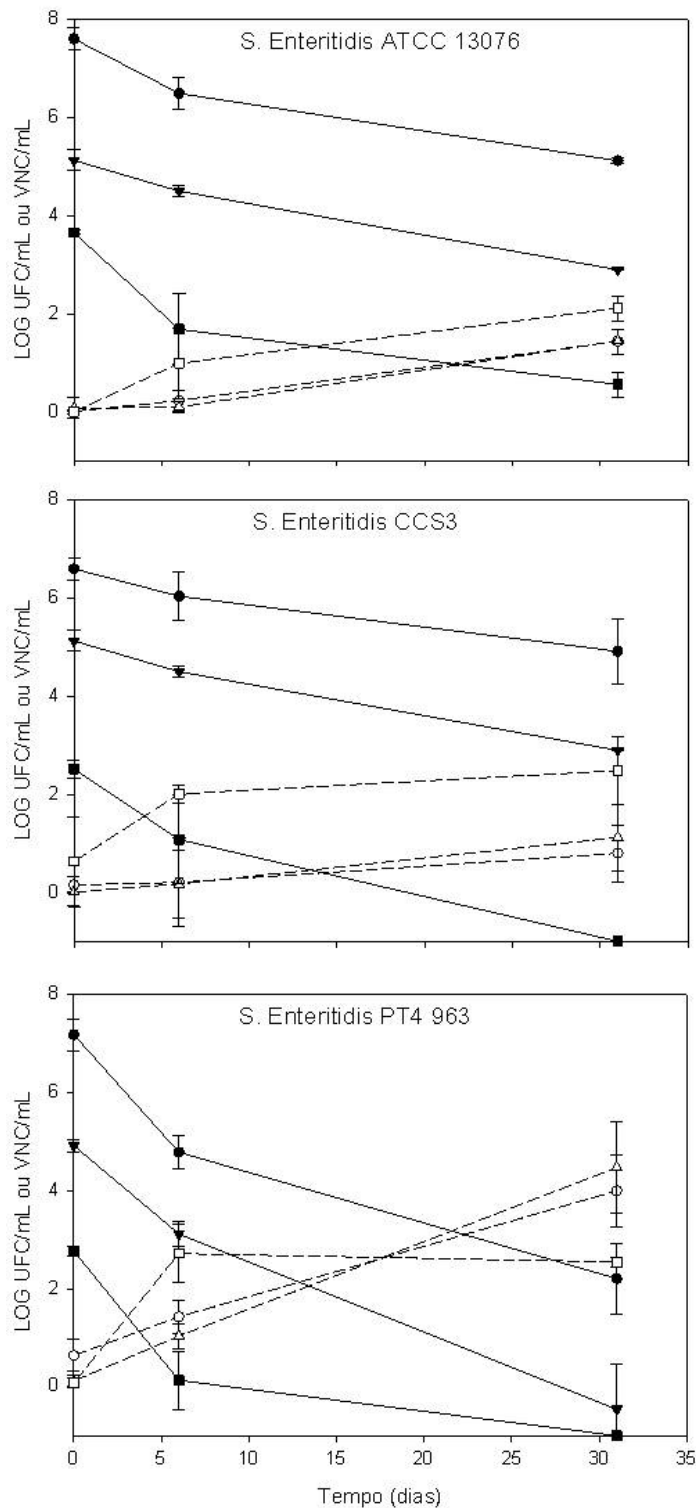


Figura 11. Contagem de células cultiváveis e de células viáveis não cultiváveis de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis mantidas em solução BPS acrescida de NaCl 1,2 mol/L a 4 °C por até 31 dias. (–) Células cultiváveis (linhas contínuas); (---) Células viáveis não cultiváveis (linhas tracejadas). Populações iniciais: (●) 10^7 UFC/mL; (▼) 10^5 UFC/mL e (■) 10^3 UFC/mL.

Embora os estudos sobre a entrada e persistência de microrganismos no estado VNC tenham progredido muito ao longo dos últimos anos, ainda se conhece muito pouco sobre os mecanismos regulatórios envolvidos neste processo. Não foi encontrado na literatura nenhum relato sobre a possível influência da densidade populacional na entrada de bactérias no estado VNC.

Neste trabalho foi demonstrado que a população inicial presente pode influenciar a entrada de *S. Enteritidis* no estado VNC. Este resultado também pode ser explicado pela presença de algum mecanismo regulatório dependente de população que sinalizaria para a entrada ou não de microrganismos neste estado.

2.3.3. Perfil de proteínas intracelulares de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado viável não cultivável e em resposta a estresse

Foi possível verificar diferenças no proteoma intracelular de *S. Enteritidis* PT4 963 nas diferentes situações avaliadas (Figura 12). Nas células em fase exponencial e estacionária de crescimento (canaletas 1 e 2, respectivamente) observou-se maior número de bandas em relação às demais. Nas células em resposta a estresse osmótico e baixa temperatura (canaletas 3 e 4, respectivamente) o padrão de bandas se assemelha ao encontrado na amostra recém inoculada em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L (canaleta 6).

Foram apontadas quatro bandas na amostra no estado VNC, todas com massa molecular inferior a 63 kDa (Canaleta 7). Nenhuma das proteínas detectadas aparece exclusivamente na amostra no estado VNC. Duas bandas, de 42 kDa e 34 kDa, aproximadamente (Figura 12, setas 3 e 4, respectivamente) apresentaram-se mais intensas do que as demais detectadas no estado VNC. Estas também estavam presentes nas amostras sob resposta a escassez de nutrientes, com intensidades comparáveis à amostra no estado VNC, e na recém inoculada em meio BPS (canaletas 5, 6 e 7). Como estas amostras foram mantidas em meio com falta de nutrientes (solução BPS), infere-se que sejam proteínas relacionadas à resposta à escassez de nutrientes.

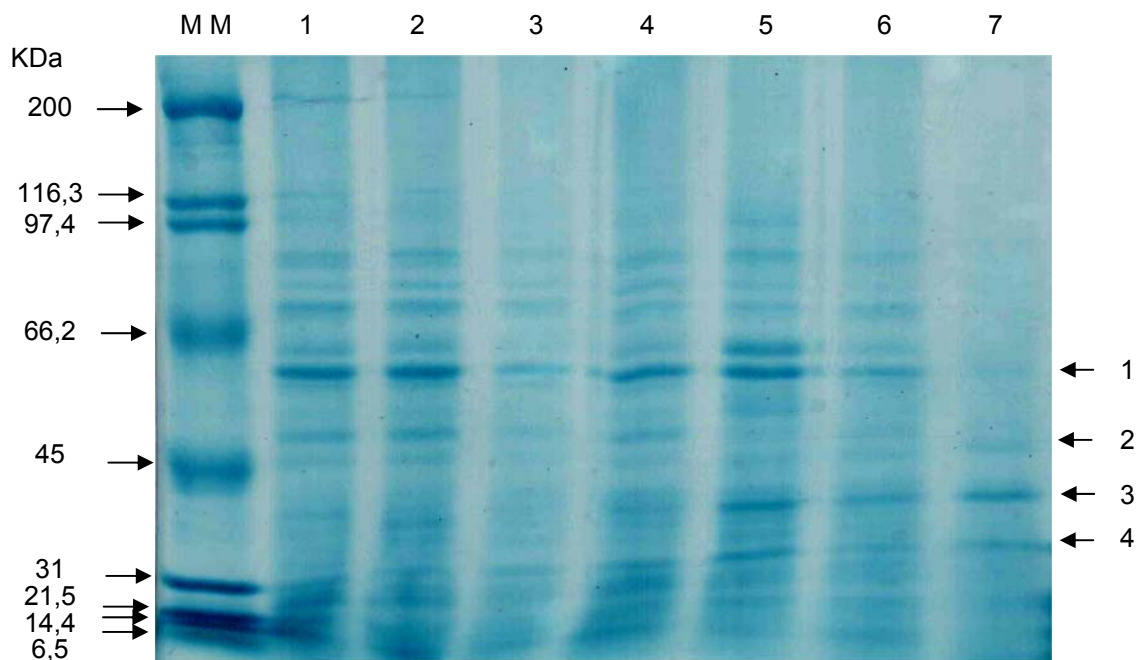


Figura 12. SDS-PAGE 16% das amostras de proteínas intracelulares (50 μ g) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 coletadas em diferentes estados fisiológicos. Canaleta 1, fase exponencial de crescimento; Canaleta 2, fase estacionária; Canaleta 3, resposta a estresse osmótico; Canaleta 4, resposta a estresse por baixa temperatura; Canaleta 5, estresse por falta de nutrientes; Canaleta 6, momento da inoculação em solução BPS acrescida de NaCl 1,2 mol/L; Canaleta 7, estado VNC. MM - Padrão de massa molecular de ampla faixa.

A quantidade de proteínas extraídas na amostra proveniente de células no estado VNC foi aproximadamente 15 vezes menor que a obtida para a amostra a partir de células recém inoculadas em solução BPS acrescida de NaCl 1,2 mol/L. Esta drástica diminuição da quantidade de proteína a partir de células no estado VNC está de acordo com os dados da literatura que indicam

redução significativa na síntese de macromoléculas como uma das principais alterações no metabolismo das células no estado VNC (OLIVER, 2005). Redução nas concentrações de proteínas hidrofóbicas foi verificada em células de *E. coli* O157:H7 no estado VNC (ASAKURA *et al.*, 2007).

A concentração baixa de proteínas extraídas a partir da amostra no estado VNC, a não detecção de proteínas com massas moleculares superiores a 63 kDa e a presença de proteínas com massas moleculares menores em comparação às proteínas das demais condições avaliadas podem indicar que há degradação de proteínas para manter o aporte de nutrientes para as células no estado VNC.

O processo de proteólise de proteínas é conhecido há muito tempo e ocorre quando os microrganismos estão em inanição, quando há degradação de proteínas a uma taxa aumentada (MANDELSTAM, 1963; REEVE *et al.*, 1984; GOTTESMAN e MAURIZI, 2001). A degradação de proteínas dependente de energia é importante para as células eucarióticas e procarióticas e é realizada por complexos de proteínas multiméricos como os proteossomos de células eucarióticas (KESSEL *et al.*, 1995) e pelas proteases dependentes de ATP de células bacterianas (GOTTESMAN, 1999; PETERSON *et al.*, 2005). Em plantas, a proteólise é importante em várias situações como no estresse oxidativo induzido por senescência e metais pesados e na morte programada da célula (PALMA *et al.*, 2002).

Mais recentemente, a proteólise tem sido sugerida em células no estado VNC. Por exemplo, MUELA *et al.*(2008) constataram que a maioria das proteínas de membrana de *E. coli* no estado VNC induzidas por exposição à água do mar exibiam massa molecular inferior a 29 kDa. Estes autores atribuíram estes resultados à proteólise de proteínas para a adaptação às condições ambientais adversas.

A relevância da proteólise controlada para a regulação gênica e sobrevivência a estresse em bactérias tem sido investigada (GOTTESMAN, 1999; WICKNER *et al.*, 1999; PETERSON *et al.*, 2005). Várias proteínas regulatórias globais, dentre outras, estão sob controle proteolítico. Em *E. coli* e *S. Typhimurium* verificou-se que as peptídeos são essenciais para a viabilidade de culturas sob escassez de carbono (REEVE *et al.*, 1984) e a degradação de várias proteínas relacionadas à inanição são dependentes do

complexo de proteases ClpAP (WEICHART *et al.*, 2003). As proteases Clp constituem os sistemas de proteases melhor caracterizados em procaríotos e servem como modelos para estudos da estrutura e função de proteases (MAURIZI *et al.*, 1990; KESSEL *et al.*, 1995; CORYDON *et al.*, 1998; THOMSEN, *et al.*, 2002). Em conjunto com a Lon protease, as proteases Clp são responsáveis por pelo menos 70% da degradação de proteínas em *E. coli* (MAURIZI, 1992). Em *E. coli*, o complexo ClpAP é crucial para a degradação de proteínas relacionadas à inanição e mutações em *clpP* conferem desvantagem competitiva durante repetidos ciclos de inanição e crescimento (DAMERAU e JOHN, 1993).

Sugere-se que a regulação por proteólise é particularmente importante em células que não estão em processo de crescimento, pois poderia ser a única forma de reduzir significativamente os níveis de determinada proteína uma vez que não haverá divisão celular para ocorrer a diluição dos componentes celulares (WEICHART *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos também relatam que o perfil de proteínas das células no estado VNC difere do encontrado em outros estados fisiológicos (HEIM *et al.*, 2002; ASAKURA *et al.*, 2007). Em *E. coli* O157:H7 no estado VNC inoculado em tampão PBS adicionado de 0,05% de peróxido de hidrogênio houve redução dos níveis de alguns fatores de resposta a oxidação e aumento da síntese da proteína de membrana externa OmpW, um receptor para a colicina S4 em *E. coli* (ASAKURA *et al.*, 2007). Em *Enterococcus faecalis* verificou-se que o perfil de proteínas expressas no estado VNC induzido por falta de nutrientes e baixa temperatura difere do encontrado nas células em crescimento exponencial e em resposta a estresse por falta de nutrientes, sugerindo que os mecanismos que levam à resposta à inanição e ao estado VNC não se sobrepõem, mas compartilham alguns pontos em comum (HEIM *et al.*, 2002). Esses autores detectaram uma proteína com massa molecular aproximada de 30 kDa que estava presente apenas nas células em estado VNC e concluíram que o estado VNC é um estado fisiológico distinto no ciclo de vida de *E. faecalis*, que é ativado por múltiplos estresses ambientais.

A grande redução dos níveis de proteínas intracelulares, a não detecção de proteínas com massas moleculares superiores a 63 kDa e a presença de bandas com massas moleculares menores na amostra no estado VNC

sugerem a ocorrência de proteólise para garantir o aporte de nutrientes e manutenção de viabilidade. No entanto, outros estudos devem ser conduzidos para se confirmar esta hipótese.

Apesar de existirem trabalhos sobre a expressão de proteínas nestes patógenos anteriormente mencionados no estado VNC, ainda são necessários mais estudos sobre a expressão diferencial de proteínas neste estado, especialmente investigando as proteínas de menor massa molecular, uma vez que estas são predominantes em alguns estudos já realizados.

2.4. CONCLUSÕES

A velocidade de entrada no estado VNC, isto é, a taxa de perda de culturabilidade e a manutenção de viabilidade pelas células, varia significativamente entre as estirpes de *Salmonella enterica* e entre os meios de suspensão de células e as concentrações salinas utilizados.

A perda de culturabilidade de suspensões de células mantidas a 4 °C em caldo BHI é menor que as mantidas em solução BPS e apresentam percentual de células viáveis menor no momento em que a culturabilidade não é mais detectada.

Maiores concentrações salinas resultam em maior perda de culturabilidade, sendo encontrada maior perda para as células mantidas a 4 °C em BHI e BPS na presença de 1,2 mol/L de cloreto de sódio.

A estirpe *S. Enteritidis* PT4 963 apresenta o maior índice de entrada em estado VNC quando mantida a 4 °C em solução BPS adicionada de NaCl 1,2 mol/L.

A densidade populacional inicial afeta a entrada no estado VNC. Densidades populacionais iniciais maiores (10^7 UFC/mL) de *S. Enteritidis* resultam em perda de culturabilidade menor e em menor manutenção de viabilidade. Em densidades populacionais menores (10^3 e 10^5 UFC/mL), há maior entrada no estado VNC, proporcionalmente.

O perfil de proteínas intracelulares de *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* PT4 963 no estado VNC difere do encontrado em células nas fases exponencial e estacionária de crescimento e sob resposta a estresse osmótico,

por baixa temperatura e falta de nutrientes, pois, no estado VNC, somente foram detectadas proteínas com massa molecular inferior a aproximadamente 63 kDa.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ASAKURA, H.; IGIMI, S.; KAWAMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Role of *in vivo* passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 2, p. 4564-4567, 2000.

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

ASAKURA, H.; MAKINO, S.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIABATA, 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 nonculturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 87-93, 2002.

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

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, p. 173-180, 1997.

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

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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.

CASTILLA, K. S. ; FERREIRA, C. S. A.; MORENO, A. M.; NUNES, I. A.; FERREIRA, A. J. P. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 135-139, 2006.

CORYDON, T. J.; BROSS, P.; HOLST, H. U; NEVE, S.; KRISTIANSEN, K.; GREGERSEN, N.; BOLUND, L. A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. **Biochemical Journal**, v. 331, p. 309-316, 1998.

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

DAMERAU, K.; JOHN, A. C. Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 53-63, 1993.

DODD, C. E. R., ALDSWORTH, T. G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 189-194, 2002.

FISCHER-LE SAUX, M.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R.; POMMEPUY, M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5641-5646, 2002.

FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 55p., 2006.

GOTTESMAN, S. Regulation by proteolysis: developmental switches. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 142-147, 1999.

GOTTESMAN, S.; MAURIZI, R. Cell biology: enhanced surviving starvation. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 614 – 615, 2001.

GUPTA, A. R.; REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.11, p. 6669-6675, 2003.

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

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

JENKINS, D. E.; CHAISSON, S. A.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 2779-2781, 1990.

KESSEL, M.; MAURIZI, M. R.; KIM, B.; KOCSIS, E.; TRUS, B. L.; SINGH, S. K.; STEVEN, A. C. Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26S proteasome. **Journal of Molecular Biology**, v. 250, p. 587-594, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LIMA, E. S. C. L. **Avaliação microbiológica em carcaças suínas e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em um frigorífico em Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 51p., 2002.

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

MANDELSTAM, J. Protein turnover and its function in the economy of the cell. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 621-636, 1963.

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

- MAURIZI, M. R. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. **Experientia**, v. 48, p.178-201, 1992.
- MAURIZI, M. R.; CLARK, W. P.; KIM, S. H.; GOTTESMAN, S. ClpP represents a unique family of serine proteases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p.12546-12552, 1990.
- MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.
- MUELA, A.; SECO, C.; CAMAFEITA, E.; ARANA, I.; ORRUÑO, M.; LÓPES, J. A.; 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.
- NUNES, I. A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G. C.; SANTOS, M. A.; SOLARI, C. A.; SILVA, O. R.; FERREIRA, A. J. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 324–327, 2003.
- OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *In*: **Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**, p. 723-730, 2000.
- OLIVER, J. D. Viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.
p. 243-249, 2005.
- PALMA, J. M. L.; SANDALIO, M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RÍO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.
- 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.
- PETERSON, C. N.; MANDEL, M. J.; SILHAVY, T. J. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7549-7553, 2005.
- REEVE, C. A.; BOCKMAN, A. T.; MATIN, A. Role of degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 157, p. 758-763, 1984.

- REEZAL, A.; McNEIL, B.; ANDERSON, J. G. Effect of low osmolality nutrient media on growth and culturability of *Campylobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4643-4649, 1998.
- REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; TSCHÄPE, 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.
- 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.
- SMITH, B.; OLIVER, J. D. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1445-1451, 2006.
- SMITH, J. J.; HOWINGTON, P. J.; McFETERS, A. G. Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2977-2984, 1994.
- SUN, F.; CHEN, J.; ZHONG, L.; ZHANG, X; WANG, R.; GUO, Q.; DONG, Y. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, p. 37-44, 2008.
- THEREFALL, E. J.; CHART, H.; WARD, L. R.; DE SA, J. D.; ROWE, B. Interrelationships between strains of *Salmonella* Enteritidis belonging to phage types 4, 7, 7a, 8, 13, 13a, 23, 24 and 30. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 43-48, 1993.
- THOMSEN, L. E.; OLSEN, J. E.; FOSTER, J. W. INGMER, H. ClpP is involved in the stress response and degradation of misfolded proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbiology**, v. 148, p. 2727-2733, 2002.
- WEICHART, D.; QUERFURTH, N.; DREGER, M.; HENGGE-ARONIS, R. Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 1, p. 115-125, 2003.
- WICKNER, S.; MAURIZI, M. S., GOTTESMAN, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. **Science**; v. 286, p.1888–93, 1999.
- 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.S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATWELL, 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.

CAPÍTULO 3

Detecção dos transcritos dos genes *invA*, *rpf*, *katF* e rDNA 16S em *S. Enteritidis* PT4 963 no estado viável não cultivável

3.1. INTRODUÇÃO

Bactérias no estado viável não cultivável (VNC) perdem a capacidade de se multiplicarem em meios de cultura utilizados em análises bacteriológicas de rotina (XU *et al.*, 1982), entretanto, mantêm atividade metabólica e integridade de membrana. O metabolismo das células no estado VNC apresenta algumas alterações como redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2005).

Vários trabalhos constataram que a síntese de mRNA não cessa em células no estado VNC, o que confirma que as bactérias permanecem ativas metabolicamente (LLEÒ *et al.*, 2000; FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; SUN *et al.*, 2008). A detecção de mRNAs como marcadores de viabilidade das células nesta condição têm sido proposta por muitos pesquisadores (LLEÒ *et al.*, 2000; FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; ASAKURA *et al.*, 2006; SMITH e OLIVER, 2006; LIU *et al.*, 2008), uma vez que são moléculas muito instáveis, de meia vida muito curta (SHERIDAN *et al.*, 1998; RIJPENS *et al.*, 2002).

A presença do transcrito referente ao rDNA 16S, que codifica o rRNA 16S, foi considerada um bom marcador genético para a detecção e quantificação de células viáveis de *Vibrio cholerae* no estado VNC. Os níveis deste transcrito se mantiveram estáveis desde a inoculação do microrganismo no microcosmo de água do mar artificial até a entrada no estado VNC (ASAKURA *et al.*, 2006).

Atualmente, a detecção de transcritos de genes de virulência em patógenos no estado VNC tem sido alvo de estudos (FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; COUTARD *et al.*, 2005; SMITH e OLIVER, 2006; COUTARD *et al.*, 2007). Não foi detectada a presença dos transcritos dos genes de virulência *thd1* e *thd2*, que codificam uma hemolisina termoestável em *Vibrio parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005). Trabalhos realizados com *Vibrio vulnificus* no estado VNC detectam a presença do mRNA do gene de virulência *vvhA* (FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; SMITH e OLIVER, 2006).

O gene *rpoS* (*katF*), que codifica um fator sigma alternativo relacionado à resposta geral ao estresse (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994; DODD e ALDSWORTH, 2002), pode estar relacionado à sobrevivência das células no estado VNC. Em estudos realizados com *V. cholerae* (ASAKURA *et al.*, 2006), *V. vulnificus* (SMITH e OLIVER, 2006) e *V. parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005; COUTARD *et al.*, 2007), foi detectada a presença do transcrito desse gene na população no estado VNC. A influência de *rpoS* na sobrevivência de *Escherichia coli* no estado VNC também tem sido investigada (MUNRO *et al.*, 1995; BOARETTI *et al.* (2003). Foi constatado que RpoS influencia positivamente a culturabilidade de *E. coli* e *S. Typhimurium* em água do mar (MUNRO *et al.*, 1995). Entretanto, este efeito protetor depende do estado fisiológico das células e da condição em que foram cultivadas antes da inoculação no meio oligotrófico. Por exemplo, mutantes RpoS⁻ de *E. coli* mantidos a 4°C em água do mar perdiam a culturabilidade e a viabilidade muito mais rapidamente que a estirpe selvagem (BOARETTI *et al.*, 2003).

A saída dos microrganismos do estado VNC é denominada de ressuscitação. Dentre os fatores que podem levar à ressuscitação destaca-se a proteína Rpf, uma hidrolase de peptidoglicano (TELKOV *et al.*, 2006). Foi constatada a saída de *S. Oranienburg* do estado VNC após a adição da

proteína Rpf obtida e purificada de *S. Typhimurium* LT2 (PANUTDAPORN *et al.*, 2006).

Apesar de existirem dados na literatura a respeito da entrada de alguns sorovares de *Salmonella* no estado VNC, não há informações sobre a detecção de mRNA neste estado de dormência. Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença dos transcritos dos genes rDNA 16S, *invA*, *katF* e *rpf* em *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Patógenos Alimentares do Departamento de Microbiologia e no laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

3.2.1. Microrganismo utilizado e condições de cultivo

A linhagem *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963, um isolado de peito de frango obtida do acervo da Fundação Oswaldo Cruz, foi utilizada para a detecção dos transcritos dos genes rDNA 16S, *invA*, *katF* e *rpf*. A cultura foi mantida congelada a - 80 °C em tubos de microcentrífuga com 1 mL de caldo BHI - Infusão Cérebro e Coração (Merck) e contendo glicerol a 20%.

3.2.2. Obtenção de células de *S. Enteritidis* PT4 963 em fase exponencial e no estado VNC

Para obtenção das células, a estirpe de *S. Enteritidis* PT4 963 foi ativada, sendo cultivada por duas vezes consecutivas em 10 mL de meio BHI a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 2723 *g* por 20 minutos e ressuspendida em 10 mL de solução salina 0,85%. Logo após, uma

alíquota de 100 μ L desta suspensão bacteriana foi inoculada em 10 mL de caldo BHI e mantida a 37 °C por aproximadamente três horas, até que se atingisse a D.O._{600nm} de 0,3, na fase exponencial de crescimento, correspondendo a uma população de aproximadamente 3×10^8 UFC/mL. Nesta etapa, esta suspensão de células (10 mL) foi utilizada para a extração do RNA total de células na fase exponencial.

Para obtenção da cultura no estado VNC, as células foram preparadas seguindo as etapas descritas a seguir. Foram centrifugados a 2723 g por 20 minutos 200 mL da cultura em caldo BHI e o sedimento foi ressuspendido em 20 mL de solução salina. Em seguida, 3 mL desta suspensão bacteriana foram inoculados em frascos contendo 300 mL de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com a AOAC (1998), acrescida de cloreto de sódio a 1,2 mol/L. A população inicial inoculada foi de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Os frascos foram mantidos a 4 °C em geladeira. Alíquotas foram retiradas periodicamente para análise de culturabilidade por meio do plaqueamento em ágar triptcaseína e soja (TSA) pela técnica de microgotas (MORTON, 2001).

Quando as contagens se encontravam abaixo de 10^3 UFC/mL, que é o limite de detecção da técnica, utilizavam-se outros métodos de plaqueamento, como o plaqueamento em superfície ou em mistura (MORTON, 2001). O limite mínimo de detecção foi de 0,1 UFC/mL obtido por plaqueamento de 1 mL da cultura concentrada 10 vezes por centrifugação a 2723 g por 20 minutos. As placas de TSA foram mantidas a 37 °C por até 72 horas. Quando não se verificava a formação de colônias após 72 horas, 10 mL da amostra foram inoculados em 10 mL de meio BHI com concentração dupla e mantidos a 37 °C por 48 horas e verificava-se o crescimento pela turvação da amostra. Para alíquotas que apresentaram ausência de turvação no meio de cultura após esse período, foi plaqueado 1 mL dessa suspensão (BHI adicionada da amostra) em meio TSA pela técnica de plaqueamento em mistura sendo as placas incubadas a 37 °C por até 72 horas. Não havendo formação de colônias após esse procedimento, considerava-se que a suspensão estava totalmente não cultivável, ou seja, apresentava perda de 100% de culturabilidade.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada no momento da inoculação em solução BPS e após perda completa da culturabilidade pela contagem de microrganismos viáveis utilizando o *kit* LIVE/DEAD[®] (Molecular Probes), segundo as instruções do fabricante. 300 μ L da amostra lavada, centrifugada e ressuspensa em solução salina 0,85% foram corados utilizando-se 1 μ L da mistura de igual volume dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio. As amostras foram incubadas, no escuro, em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 μ L da amostra corada foi transferida para uma lâmina e coberta com lamínula de espessura de 0,17 mm. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 50 utilizando o filtro WG. Para cada amostra, 15 campos de duas lâminas foram contados.

3.2.3. Detecção dos transcritos dos genes *invA*, *rpf*, *katF* e rDNA 16S

3.2.3.1. Preparo das células para extração de RNA

Foi realizada a extração de RNA total da suspensão de células de *S. Enteritidis* PT4 963 considerada totalmente viável não cultivável. Para obtenção do RNA total foram recolhidos 850 mL da suspensão bacteriana que foram centrifugados a 7444 *g* por 30 minutos e o sedimento ressuspensa em 10 mL de solução salina 0,85%. Logo após, essa suspensão foi lavada duas vezes em solução salina por meio da centrifugação a 7444 *g* por 30 minutos. Uma alíquota de 10 mL da suspensão de células de *S. Enteritidis* PT4 963 em fase exponencial de crescimento foi centrifugada a 2723 *g* por 20 minutos. As suspensões de células no estado VNC e em fase log foram, finalmente, concentradas em 1 mL de solução salina em tubo de microcentrifuga.

3.2.3.2. Extração e quantificação do RNA total

A extração de RNA total foi realizada pelo método TRIzol[®] (Invitrogen). As culturas centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos foram ressuspensas em

1 mL de TRIzol[®] e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e as amostras foram agitadas manualmente por 15 segundos, incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga e o RNA total precipitado com 0,5 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e novamente centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol. A amostra foi agitada em vortex e centrifugada a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi seco ao ar, ressuscitado em 30 µL de água Milli-Q-DEPC (Dietilpirocarbonato), e a amostra obtida foi incubada por 10 minutos a 60 °C e estocada a – 80 °C.

As quantidades de RNA total das amostras foram estimadas pela leitura da absorvância em espectrofotômetro a 260 nm. Uma alíquota de 5 µL de RNA total foi examinada por eletroforese em gel de agarose 1,2%. As imagens dos géis foram digitalizadas em sistema de vídeo Eagle Eye II (Stratagene).

Para a eliminação do DNA da amostra, foram adicionados 7,1 µg de RNA a um tubo de microcentrifuga contendo 8 unidades de RQ1DNase livre de RNase (Promega) e 2 µL de tampão 10X e o volume completado para 20 µL com água Milli-Q-DEPC. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 2 µL de *DNase Stop Solution* (Promega) para interromper a reação, seguindo-se uma incubação a 65 °C por 10 minutos.

Foi realizado um controle para verificação da presença de DNA nas amostras de RNA após o tratamento com DNase . Esse controle consistiu em uma reação de PCR utilizando-se as preparações de RNA total previamente tratadas com DNase livre de RNase. A reação continha 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador para rDNA 16S (Tabela 1), 1 µL de DNTPs 10 µM, 2,5 µL de tampão da *Taq* DNA polimerase 10X (Phoneutra), 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutra), 700 ng de RNA total e água Milli Q, para um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC -100 (MJ Research), utilizando uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento por 45 segundos a 54 °C e extensão por 1,5 minuto a 72

°C. O último ciclo foi seguido pela extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os possíveis produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. As imagens dos géis foram digitalizadas em sistema de vídeo Eagle Eye II (Stratagene). Uma vez comprovada a ausência de DNA nas amostras estas foram utilizadas na reação da transcriptase reversa associada à reação de polimerização em cadeia (RT-PCR).

3.2.3.3. RT-PCR

A técnica de reação da transcriptase reversa associada à reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) foi realizada para detecção dos transcritos dos genes *invA*, *rpf* *katF* e rDNA 16 S utilizando o *kit* AcessQuick™ RT – PCR System (Promega). As reações foram realizadas com 12,5 µL do Master Mix AcessQuick™ RT – PCR System, 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 µM (Tabela 1), aproximadamente 700 ng de RNA total, 2,5 unidades da Transcriptase Reversa AMV e o volume final foi completado para 25 µL com água Milli-Q-DEPC.

Tabela1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo

Genes	Sequência (5'- 3')	Tamanho esperado (pb)	Referência
rDNA16S	TACCTTGTTACGACTT AGAGTTTGATCMTGG	1484	BUCHHOLZ-CLEVEN <i>et al.</i> (1997)
<i>invA</i>	GTGAAATTATGCCACGTTCCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	GÁLAN e CURTIS (1989)
<i>rpf</i>	CCCATATGCGAATTCTGGCTATCGATACC CCGGATCCTCATTCTTTGCCGGGAAGTTTCTT	696	PANUTDAPORN <i>et al.</i> (2006)
<i>katF</i>	GCGCGTCGCGCACTGCGTGG CTGGCCAGCACTTCACGCTG	600	FANG <i>et al.</i> (1992)

A transcrição reversa foi realizada por 1 hora e 30 minutos a 45 °C em termociclador PTC - 100 (MJ Research) seguida por uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C e por 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento por 45 segundos a 54 °C e extensão por 1,5

minuto a 72 °C. O último ciclo foi seguido pela extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os possíveis produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. As imagens dos géis foram digitalizadas em sistema de vídeo Eagle Eye II (Stratagene).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada extração de RNA total das células de *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 963 em estado VNC após 67 dias de inoculação em solução BPS acrescida de cloreto de sódio 1,2 mol/L, quando houve perda de 100% da culturabilidade e manutenção de viabilidade.

Foram obtidos aproximadamente 3,6 µg de RNA total a partir de 850 mL da suspensão de células em estado VNC, o que corresponde a aproximadamente $3,2 \times 10^{10}$ células viáveis. A quantidade de RNA total extraída foi aproximadamente 600 vezes menor quando comparada à quantidade obtida de células provenientes da fase exponencial de crescimento (60 µg de RNA total a partir de aproximadamente 10^9 células microbianas), evidenciando a grande redução na síntese de RNA pelos microrganismos neste estado fisiológico. Também foi observada uma rápida e dramática diminuição nos níveis de síntese de RNA em microrganismos no estado VNC (GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006).

Os transcritos dos genes rDNA 16S, *invA*, *rpf* e *katF* foram detectados na amostra correspondente às células em fase exponencial de crescimento (Figuras 1 e 2). A partir de células no estado VNC foi possível a detecção do transcrito referente ao rDNA 16S (Figura 1), entretanto, não se constatou a presença de transcritos para os genes *invA*, *rpf* e *katF* nas condições experimentais utilizadas.

Apesar da não detecção dos demais transcritos, a presença de rRNA 16S indica que há síntese de RNA, o que confirma que as células VNC estão metabolicamente ativas nessa condição fisiológica. Devido ao fato do mRNA ser uma molécula de meia vida curta devido à presença de nucleases que o degradam rapidamente, a sua detecção pode ser considerada um critério válido para a avaliação da viabilidade celular (SHERIDAN, 1998). Asakura *et al.* (2006), analisando o transcriptoma de *Vibrio cholerae* no estado VNC induzido pela inoculação em água do mar artificial a 4 °C, também detectaram a presença do transcrito de rDNA 16S. Nesse estudo, os níveis do rRNA 16S se mantiveram estáveis desde a inoculação do microrganismo no microcosmo de água do mar artificial até o momento em que a população perdeu totalmente sua culturabilidade, sugerindo que este seria essencial para a viabilidade celular e que poderia se tornar um bom marcador genético para a detecção e quantificação de células viáveis de *V. cholerae*.

Em trabalho com *V. cholerae* no estado VNC, foi verificada a presença de rRNA 16S por PCR em tempo real, entretanto, o número de cópias desta molécula foi 154 vezes menor comparado ao número encontrado em células em crescimento exponencial (GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006).

Neste trabalho não foi detectada a presença do transcrito do gene de virulência *invA* em *S. Enteritidis* PT4 963 em estado VNC (Figura 2). Este gene, localizado no DNA cromossomal, está relacionado à invasão das células epiteliais do intestino delgado (GÁLAN e CURTIS, 1989). A transcrição deste fator de virulência pode ter sido totalmente reprimida ou reduzida não sendo possível sua detecção por meio da técnica de RT-PCR.

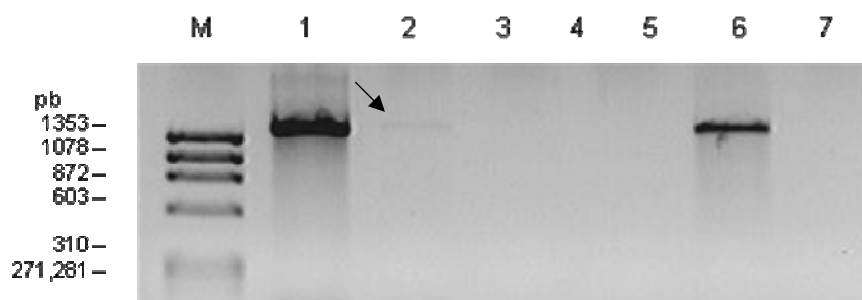


Figura 1. Detecção por RT-PCR do transcrito rRNA 16S em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963. Marcador DNA do fago ϕ x 174 clivado com *Hae* III (M). Células em fase exponencial de crescimento (1). Células no estado VNC (2). Controles negativos - reação de PCR com RNA total sem adição da enzima transcriptase reversa (3 e 4). DNA de *S. Enteritidis* PT4 963 (6). Branco da reação (7).

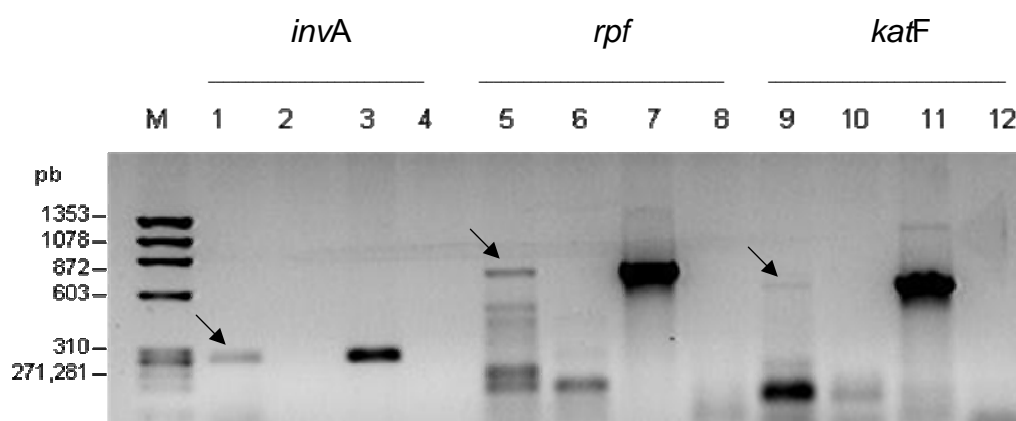


Figura 2. Detecção por RT-PCR dos transcritos dos genes *invA*, *rpf* e *katF* em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963. Marcador DNA do fago ϕ x 174 clivado com *Hae* III (M). Células em fase exponencial de crescimento (1). Células no estado VNC (2). DNA de *S. Enteritidis* PT4 963 (3). Branco da reação (4). Células em fase exponencial de crescimento (5). Células no estado VNC (6). DNA de *S. Enteritidis* PT4 963 (7). Branco da reação (8). Células em fase exponencial de crescimento (9). Células no estado VNC (10). DNA de *S. Enteritidis* PT4 963 (11). Branco da reação (12).

Há controvérsia na literatura sobre a detecção de transcritos de genes de virulência em células no estado VNC. Enquanto que em alguns trabalhos não houve detecção dos transcritos dos genes de virulência *thd1* e *thd2*, que codificam uma hemolisina termoestável em *Vibrio parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005; COUTARD *et al.*, 2007) outros trabalhos confirmaram a presença do mRNA do gene *vvhA* em *Vibrio vulnificus* no estado VNC (FISCHER-LE SAUX *et al.*, 2002; SMITH e OLIVER, 2006). O produto deste gene, uma hemolisina, é um importante fator de virulência para este patógeno.

Vale ressaltar que a não detecção do transcrito do gene *invA* não indica necessariamente que *S. Enteritidis* PT4 963 não produza fatores de virulência no estado VNC. A síntese deste transcrito pode estar tão baixa a ponto de não ser detectada pela técnica de RT-PCR ou este patógeno pode estar produzindo outros fatores de virulência no estado VNC.

O transcrito referente ao fator de promoção da ressuscitação Rpf foi detectado nas células que estavam em fase exponencial de crescimento, mas estava ausente nas células em estado VNC (Figura 2). A proteína Rpf, uma hidrolase de peptideoglicano (TELKOV *et al.*, 2006), é uma pequena proteína, originalmente identificada em *Micrococcus luteus*, que promove a recuperação de bactérias em estado VNC para um estado vegetativo (MUKAMOLOVA *et al.*, 1998). Em *Micrococcus luteus* verificou-se que esta proteína é um fator essencial para o crescimento do microrganismo (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002b). Como verificado no presente estudo, *S. Enteritidis* PT4 963 também produz o transcrito para esta proteína em crescimento ativo.

Genes que codificam proteínas Rpf - *like* são amplamente distribuídos em bactérias patogênicas (TELKOV *et al.*, 2006). O gene que codifica a proteína Rpf em *Salmonella* Typhimurium LT2 foi clonado e caracterizado por Panutdaporn *et al.* (2006). No trabalho destes autores, a proteína recombinante rRpf foi capaz de induzir a ressuscitação de células de *Salmonella* Oranienburg do estado VNC além de estimular o aumento na velocidade de crescimento do patógeno em meio de cultura TSB a 37 °C.

O mecanismo pelo qual a hidrólise do peptideoglicano promove a ressuscitação do estado VNC ainda não é conhecido. Dois modelos gerais para esse processo têm sido propostos e discutidos (MUKAMOLOVA *et al.*, 2006; COHEN-GONSAUD *et al.*, 2005; RAVAGNANI *et al.*, 2005). No primeiro

modelo especula-se que a proteína Rpf aja liberando uma pequena molécula que sinalizaria para a célula adjacente via difusão, possivelmente por meio de um receptor de superfície. Desta forma, mesmo não havendo produção desta proteína em estado VNC, o contato deste microrganismo com este fator de promoção da ressuscitação, produzido e secretado por outros microrganismos presentes no mesmo ambiente, poderia levar ao retorno da culturabilidade deste patógeno.

Outra hipótese é que o papel da proteína Rpf seria de promover alteração na parede celular de alguma forma que promova a liberação do bloqueio mecânico para a divisão celular. Esta proteína seria produzida durante a fase de crescimento exponencial para permitir a divisão celular, como verificado neste trabalho, mas sua expressão é reduzida no estado de dormência de forma que sua atividade se tornaria muito baixa para permitir esse processo. Estudos realizados sobre a expressão desta proteína dão suporte a esta hipótese (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002a, MUKAMOLOVA *et al.*, 2002b). Uma vez que trabalhos demonstraram que a camada de peptidoglicano sofre alterações no estado VNC (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002), o provável papel desta proteína seria a clivagem destes peptidoglicanos modificados.

A ressuscitação está frequentemente associada à manutenção da virulência por vários patógenos, constituindo-se um risco potencial a ingestão de alimentos aparentemente seguros, mas que apresentem estes patógenos no estado viável não cultivável (BAFFONE *et al.*, 2003).

Ainda são necessários estudos que investiguem o processo de ressuscitação de *S. Enteritidis* PT4 963 do estado VNC. Ao contrário de microrganismos como *V. vulnificus*, em que o simples aumento de temperatura promove a saída deste estado de dormência (WHITESIDES e OLIVER, 1997), neste trabalho para esta estirpe este fenômeno parece ser mais complexo, uma vez que somente a retirada dos fatores de estresse não propiciou a ressuscitação das células (dados não mostrados).

Apesar da técnica de RT-PCR ser um método qualitativo e não quantitativo para a detecção de transcritos em amostras de RNA, verificou-se que a banda referente à *katF* (*rpoS*) na amostra das células em fase exponencial de crescimento apresentou-se mais fraca em comparação às

demais (Figura 2, canaleta 9). Isto se deve ao fato de que a maior produção deste fator sigma alternativo ocorra na transição para a fase estacionária (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994).

Neste trabalho não foi detectada a presença do transcrito referente a *katF* no estado VNC (Figura 2), entretanto, este pode estar presente em níveis muito baixos, o que justificaria este resultado, uma vez que este gene possui apenas uma única cópia no genoma de *Salmonella* (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994).

O produto do gene *katF* controla um regulon com mais de 40 genes expressos em resposta a escassez de nutrientes e durante a transição para a fase estacionária. As proteínas deste regulon promovem o aumento na sobrevivência dos microrganismos em meios com deficiência de nutrientes e possuem um grupo diversificado de funções como proteção contra danos ao DNA, a determinação de modificações morfológicas, virulência, osmoproteção e termotolerância (FANG *et al.*, 1992; LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994; DODD e ALDSWORTH, 2002).

A influência de *katF* na sobrevivência de *E. coli* e *Salmonella* no estado VNC tem sido investigada, entretanto, os estudos realizados ainda não são conclusivos sobre o papel deste fator na manutenção de bactérias no estado VNC. (MUNRO *et al.*, 1995; BOARETTI *et al.*, 2003). A culturabilidade de *E. coli* e *S. Typhimurium* em água do mar é afetada positivamente por RpoS (MUNRO *et al.*, 1995). Entretanto, este efeito protetor depende do estado fisiológico das células e da condição em que foram cultivadas antes da inoculação no meio oligotrófico. Esta proteína propiciava efeito protetor apenas para as células que foram coletadas na fase estacionária antes de serem inoculadas no microcosmo. Porém, foi verificado que mutantes RpoS⁻ de *E. coli* mantidos a 4 °C em água do mar perdiam a culturabilidade e a viabilidade muito mais rapidamente que a estirpe selvagem (BOARETTI *et al.*, 2003).

Em alguns trabalhos com *V. cholerae* (ASAKURA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.*, 2006), *V. vulnificus* (SMITH e OLIVER, 2006) e *V. parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005; COUTARD *et al.*, 2007), foi detectada a presença do transcrito do gene *rpoS* na população em estado VNC. Foi verificado que células de *V. cholerae* no estado VNC apresentaram

redução de 24 vezes no número de cópias para este mRNA em comparação às células em crescimento exponencial (GONZÁLEZ-ESCALONA *et al.* (2006).

3.4. CONCLUSÕES

Verificou-se que células de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC estão ativas metabolicamente devido à produção de transcritos para o gene rDNA16S, que pode ser considerado um marcador de viabilidade. Entretanto, a quantidade de RNA total produzida por células neste estado é muito menor quando comparada às células em crescimento ativo.

Não houve detecção dos transcritos relacionados aos genes *invA*, *rpf* e *katF* em *S. Enteritidis* no estado VNC neste trabalho, no entanto, outros genes podem estar sendo transcritos neste estado.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BUCHHOLZ-CLEVEN, B. E. E.; RATTUNDE, B.; STRAUB, K. L. Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 301-309, 1997.

COHEN-GONSAUD, M.; BARTHE, P.; BAGNÉRIS, C.; HENDERSON, B.; WARD, J.; ROUMESTAND, C.; KEEP, N. H. The structure of a resuscitation-promoting factor from *M. tuberculosis* shows homology to lysozymes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 270-273, 2005.

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

- COUTARD, F.; LOZACH, S.; POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5183-5189, 2007.
- DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T. G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 189-194, 2002.
- FANG, F. C.; LIBBY, S. J.; BUCHMEIER, N. A.; LOEWEN, P. C.; HARWOOD, J.; GUINEY, D. G. The alternative σ factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 11978-11982, 1992.
- FISCHER-LE SAUX, M.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R.; POMMEPUY, M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5641-5646, 2002.
- GÁLAN, J. E.; CURTIS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 6383-6387, 1989.
- GÁLAN, J. E.; CURTIS III, R. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 2901-2908, 1991.
- GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; FEY, A.; HÖFLE, M. G.; ESPEJO, R. T.; GUZMÁN, C. A. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but nonculturable state and starvation in response to cold shock. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 658-666, 2006.
- LIU, Y.; GILCHRIST, A.; ZHANG, J.; LI, X. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1502-1507, 2008.
- LLEÒ, M. M.; PIEROBON, S.; TAFI, M. C.; SIGNORETO, C.; CANEPARI, P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in a *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in laboratory microcosm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4564-4567, 2000.

- LOEWEN, P. C.; HENGGE-ARONIS, R. The role of the sigma factor σ^S (KatF) in bacterial global regulation. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 48, p. 53-80, 1994.
- MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.
- MUKAMOLOVA, G. V.; KAPRELYANTS, A. S.; YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; KELL, D. B. A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8916-8921, 1998.
- MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O. A.; YOUNG, D. I.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B.; YOUNG, M. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 623-635, 2002a.
- MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O. A.; KAZARIAN, K.; TELKOV, M.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B.; YOUNG, M. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 611-621, 2002b.
- MUKAMOLOVA, G. V.; MURZIN, A. G.; SALINA, E. G.; DEMINA, G. R.; KELL, D. B.; KAPRELYANTS, A. S.; YOUNG, M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 84-98, 2006.
- MUNRO, P. M.; FLATAU, G. N.; CLÉMENT, R. L.; GAUTHIER, M. J. Influence of RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1853-1858, 1995.
- OLIVER, J. D. Viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 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.
- RAVAGNANI, A.; FINAN, C. L.; YOUNG, M. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. **BMC Genomics**, v. 6, p. 39, 2005.
- RIJPENS, N.; JANNES, G.; HERMAN, L. Messenger RNA- based RT-PCR detection of viable *Salmonella*. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 233-238, 2002.

SHERIDAN, G. E. C.; MASTERS, C. I.; SHALLCROSS, J. A.; MACKEY, B. M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1313-1318, 1998.

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

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

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

SUN, F.; CHEN, J.; ZHONG, L.; ZHANG, X.; WANG, R.; GUO, Q.; DONG, Y. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, p. 37-44, 2008.

TELKOV, M. V.; DEMINA, G. R.; VOLOSHIN, S. A.; SALINA, E. G.; DUDIK, T. V.; STEKHANOVA, T. N.; MUKAMOLOVA, G. V.; KAZARYAN, K. A.; GONCHARENKO, A. V.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A. S. Proteins of the Rpf (Resuscitation Promoting Factor) family are peptidoglycan hydrolases. **Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 414-422, 2006.

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

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