



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ADMA NADJA FERREIRA DE MELO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUBSEQUENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS NA
TERMOTOLERÂNCIA E SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS DE *Salmonella* Enteritidis PT4 E *Salmonella*
Typhimurium PT4**

JOÃO PESSOA – PB

2016

ADMA NADJA FERREIRA DE MELO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUBSEQUENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS NA
TERMOTOLERÂNCIA E SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS DE *Salmonella* Enteritidis PT4 E *Salmonella*
Typhimurium PT4**

JOÃO PESSOA – PB

2016

ADMA NADJA FERREIRA DE MELO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUBSEQUENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS NA
TERMOTOLERÂNCIA E SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS DE *Salmonella* Enteritidis PT4 E *Salmonella*
Typhimurium PT4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA – PB

2016

ADMA NADJA FERREIRA DE MELO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUBSEQUENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS NA
TERMOTOLERÂNCIA E SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS DE *Salmonella* Enteritidis PT4 E *Salmonella*
Typhimurium PT4**

Dissertação APROVADA em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani – CT/UFPB

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – UAS/UFCG

Examinador interno

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant’Ana – FEA/UNICAMP

Examinador externo

JOÃO PESSOA – PB

2016

*Ao meu **Deus**, por todas as conquistas e vitórias alcançadas, e por tudo que tens feito em minha vida. Aos meus pais, **Marilena** (In memoriam) e **Glaúcio**, e ao meu noivo **Ramon**, em reconhecimento ao apoio e incentivo tão profundos a mim concedidos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de fraquezas, decisões, alegrias e vitórias, pelo seu misericordioso amor e pela força incomparável. A ti Senhor toda honra e toda a glória.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, e pelo apoio a educação e a ciência.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em particular ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pela oportunidade e estrutura fornecidos.

Ao corpo docente do PPGCTA, pelos ensinamentos essenciais e a seus funcionários pela disponibilidade e gentileza, em especial, a secretária Lindalva.

À minha orientadora, professora Dr^a. Marciane Magnani, pela brilhante orientação, por inserir-me ao meio científico, pelo seu apoio constante, pelos valiosos ensinamentos, seu exemplo de determinação e profissionalismo, pela amizade, disponibilidade, dedicação, e por confiar e acreditar em meu potencial. Obrigada por contribuir de forma especial para a realização desta pesquisa. Que o Senhor Deus derrame infinitas bênçãos sobre a sua vida.

Aos professores Dr. Evandro Leite de Souza e a Dr^a. Janneyre Ferreira Maciel pela disponibilização da estrutura laboratorial durante a realização de parte deste trabalho.

À professora Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira e ao professor Dr. Anderson de Souza Sant'Ana, membros da banca examinadora, pelas contribuições e disponibilidade.

Em especial a minha mãe, Marilena (*in memoriam*), a minha estrela, a minha mainha, por ter me ensinado a sempre acreditar e lutar pelos meus objetivos, por todos os anos vividos no qual compartilhamos muito carinho, amor e muitos momentos felizes, e que esteve sempre como uma estrela me iluminando em todo o tempo.

Ao meu pai, Gláucio, meu painho, por ser o meu grande exemplo de força, de homem batalhador, por muitas vezes abrir mão dos seus sonhos para realizar os meus, e que sempre auxiliou em tudo que eu precisava. A ti meus eternos agradecimentos.

À minha avó, Maria, por todo seu carinho, amor e incentivo, meu muito obrigada.

À todos os demais familiares, irmãos, tias e tios, primos e primas pelo apoio, carinho e incentivo. A vocês meus eternos agradecimentos.

Ao meu noivo, Ramon, pelo amor, paciência, amizade, companheirismo e compreensão, pelas palavras de incentivo, por sempre estar ao meu lado torcendo pela minha conquista, não me deixando desistir, por acreditar em mim mais que eu mesma, por ter me acompanhado

inúmeras vezes no laboratório, até mesmo nas madrugadas no decorrer das análises deste trabalho e por entender a minha ausência em inúmeros finais de semana e datas especiais.

Ao meu sogro, Sr. Raimundo, minha sogra D^a. Rosilda, minha cunhada Roxana, pelos incentivos, apoio e por estarem torcendo por minhas conquistas, meu muito obrigada.

À Geany Targino, amiga que tanto me ajudou na execução deste trabalho, obrigada por sua amizade, pela ajuda, pelos momentos vividos e compartilhados.

À Érika Teixeira, Nayre Martiniano, Caroline Carvalho, Julie Annie, Fátima Vasconcelos, amigas de todas as horas, “amigas-irmãs”, pela amizade, conselhos, cumplicidade, pelos inúmeros momentos vividos, por sempre me mostrarem que sou capaz de atingir os meus objetivos, e por entenderem a minha ausência em inúmeros momentos.

À Laênia Lopes, minha companheira de “guerra”, que aguentou todos meus estresses durante a execução final deste trabalho e me acompanhou em várias madrugadas. Obrigada pela amizade, ajuda e momentos compartilhados.

À Rayssa Carvalho, Narciza Arcanjo, Nelson Justino, Carine Marciel, Taliana Bezerra, Francieli Araújo, Dennyse Macedo, Vilma Barbosa, pela amizade, por sempre torcerem pela minha conquista, pelas palavras de encorajamento, força e por contribuírem de alguma forma para que esse sonho se tornasse realidade.

À família do “LAB” Laboratório de Processamento Microbiano em Alimentos – UFPB, Whyara Almeida, Sonalle Albuquerque, Tainá Amaral, Jessica Bezerra, Neyrijane Targino, Vanessa Gonçalves, Myrella Cariry, Rafael Lima, e aos demais que fazem parte desse grupo científico, pela ajuda, amizade e bons momentos de convívio.

Sendo impossível citar todos os nomes, agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indireta, cooperaram para realização deste trabalho e torceram pela realização dessa conquista.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças
a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

Salmonella enterica subespécie *enterica* é um patógeno frequentemente envolvido em surtos alimentares em todo o mundo. Os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* pertencentes ao fagotipo 4 (PT4) são prevalentes entre os agentes etiológicos de surtos de salmonelose envolvendo carne de frango. O objetivo do presente estudo foi avaliar mudanças na termotolerância e a capacidade de sobreviver em condições gastrointestinais simuladas de *Salmonella* *Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 inoculadas em peito de frango após a exposição subsequente a estresses abióticos (frio, ácido e osmótico) impostos durante o processamento de alimentos. Os efeitos da exposição ao óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano), uma substância proposta para uso como antimicrobiano em alimentos também foram avaliados. A exposição ao estresse frio (5 °C durante 5 h) não aumentou a viabilidade das células na exposição subsequente ao estresse ácido (ácido láctico - 5 µL/g e 2,5 µL/g) nas cepas testadas. Células de *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* previamente expostas ao estresse ácido mostraram maior tolerância ao estresse osmótico (NaCl - 75 mg/g e 37,5 mg/g) em comparação com células não expostas ao ácido. A exposição ao estresse osmótico sem prévia exposição ao estresse ácido causou um decréscimo concentração-dependente em ambas as cepas testadas. A exposição ao óleo essencial de orégano em concentrações subletais (1,25 µL/g e 0,625 µL/g) diminuiu a tolerância ao estresse ácido e osmótico em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A exposição subsequente aos estresses frio, ácido e osmótico em todas as concentrações testadas aumentou a termotolerância nas cepas testadas. Em condições gastrointestinais simuladas, as células sobreviventes dos tratamentos de subsequente exposição ao estresse (células persistentes) apresentaram maior tolerância às condições ácidas em comparação às células controles. Células persistentes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* apresentaram taxas de sobrevivência maiores (aproximadamente 1,2 log UFC/g) que as células controle no final da digestão *in vitro*. Estes resultados mostram que a exposição subsequente a condições de estresse aumenta a termotolerância e a sobrevivência em condições gastrointestinais em *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4, o que pode contribuir para a persistência deste patógeno na matriz alimentar e no hospedeiro.

Palavras-chave: Condições subletais, *Salmonella enterica*, digestão *in vitro*, processamento de alimentos, termotolerância.

ABSTRACT

Salmonella enterica subespecie *enterica* is a pathogen frequently involved in outbreaks worldwide. Serovars *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* belonging to paghe type 4 (PT4) are prevalent among the etiological agentes of salmonellosis outbreaks involving chicken meat. The aim of this study was to assess changes in thermotolerance and capability to survive to gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *S. Typhimurium* PT4 incorporated in chicken breast following exposure to abiotic stresses (cold, acid and osmotic) imposed during food processing. The effects of stressing conditions imposed by *Origanum vulgare* L. essential oil (oregano), a candidate substance for use as antimicrobial in foods, was also assessed. The exposure to cold stress (5°C for 5 h) did not result in increased tolerance to acid stress (lactic acid at 5 µL/g and 2.5 µL/g) in all tested strains. Cells of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* previously exposed to acid stress showed higher tolerance to osmotic stress (NaCl at 75 mg/g or 37.5 mg/g,) compared to non-acid-exposed cells. The exposure to osmotic stress without previous exposure to acid stress caused a salt-concentration dependent decrease in *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium*. Exposure to oregano essential oil at subinhibitory concentrations (1.25 µL/g and 0.625 µL/g) decreased the acid and omostic tolerance in both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. The subsequent exposure to cold, acid and osmotic stress conditions increased the thermotolerance in all test strains. Under simulated gastrointestinal conditions, the cells that survived the subsequent stress exposure (persisters) showed higher tolerance to acidic conditions (approximately 1.2 log CFU/g) compared with control cells. Persisters cells of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* showed higher survival rates at the end of the *in vitro* digestion. These results show that subsequent exposure to stress conditions increase the thermotolerance and enhanced the survival under gastrointestinal condition in *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4, which may contribute to the persistence of this pathogen within food matrix and host.

Key-words: sublethal conditions, *Salmonella enterica*, *in vitro* digestion, food processing, thermotolerance.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Fig. 1 - Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (●), *S. Typhimurium* PT4 (□) in Brain Heart Infusion broth at 37 °C in different time-intervals assessed for stress treatments.69

Fig. 2 - Fig. 2. Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (A), *S. Typhimurium* PT4 (B) in ground chicken breast meat after exposure to subsequent stress treatments. (●): Control; (■): T1: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (▲): T2: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (▼): T3: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (◆): T4: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (□): T5: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (Δ): T6: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); non exposure (18 h); (▽): T7: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (◇): T8: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); non exposure (18 h); Detection limit of the test: 2.0 log CFU/g.....70

Fig. 3 - Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (A), *S. Typhimurium* PT4 (B) in ground chicken breast meat after exposure to subsequent stress treatments. (●): Control; (■): T9: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (▲): T10: (cold stress (5 h); NaCl 75 mg/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (▼): T11: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); acid 5 µL/g (18 h); (◆): T12: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (○): T13: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); (□): T14: cold stress (5 h); NaCl 37.5 mg/g; OVEO 0.625µL/g (18 h); (Δ): T15 cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); acid 2.5 µL/g (18 h); (▽): T16: cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/ (18 h); (◇): T17: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (*): T18: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); Detection limit of the test: 2.0 log CFU/g.....71

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1 - Tratamentos de estresses subletais e respectivas condições utilizadas durante a exposição de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 em peito de frango.....28

Tabela 2 - Condições utilizadas durante cada etapa da digestão gastrointestinal simulada.....30

ARTIGO

Table 1 - Sub-lethal stress treatments and respective conditions used during exposure of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 in ground chicken breast.....65

Table 2 - Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 subsequently exposed to sub-lethal stress treatments, before and after exposure to 55 °C during 30 minutes in ground chicken breast.....66

Table 3 - The conditions used during each step of the simulated gastrointestinal and the obtained viable cell counts.....68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1. CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	17
3.2. TOLERÂNCIA BACTERIANA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE SUBLETAL....	19
3.3. <i>Salmonella enterica</i> sorovares S. Enteritidis e S. Typhimurium.....	22
4. ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	25
4.1 Cepas teste.....	25
4.2 Agentes antimicrobianos.....	25
4.3 Preparo do inóculo e condições de crescimento.....	25
4.4 Determinação das condições de estresse subletal.....	26
4.5 Preparo do modelo base-peito de frango.....	27
4.6 Tratamentos de exposição subsequente ao estresse em peito de frango.....	27
4.7 Viabilidade em condições gastrointestinais simuladas.....	39
4.8 Análises estatísticas e validação dos dados.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 ARTIGO - Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions in <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 and <i>Salmonella</i> Typhimurium PT4 after subsequent stress exposure in chicken breast meat.....	39

1 INTRODUÇÃO

Bactérias da espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* se destacam entre os principais patógenos responsáveis por surtos alimentares em diversos países. Os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são reconhecidos como agentes etiológicos de alguns dos maiores surtos alimentares já notificados em todo o mundo (MAJTANOVA, MAJTAN; MAJTAN, 2011; NIELSEN et al., 2013; YANG et al., 2014). Dentre os fagotipos já identificados em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, o fagotipo 4 (PT4) é considerado um dos mais virulentos e tem sido frequentemente detectado em surtos de salmonelose envolvendo produtos avícolas (NUNES et al., 2003; KOTTWITZ et al., 2011).

A ocorrência de salmoneloses em humanos tem sido relacionada ao consumo de diversos alimentos, tais como queijos (FERRARI et al., 2013), manteiga de amendoim (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012), frutas e vegetais minimamente processados (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER; 2014) e carne bovina (ROWLANDS et al., 2014). No entanto, ovos e produtos à base de carne de frango ainda são os alimentos mais frequentes envolvidos em surtos causados por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC, 2015; YADAV et al., 2016).

Durante o processamento de alimentos, as células de *Salmonella* encontram vários fatores abióticos de estresse utilizados como obstáculos (barreiras) que promovam condições ambientais desfavoráveis para a sobrevivência e crescimento microbiano (SHAH et al., 2013; MONTE et al., 2014). Os principais obstáculos impostos às células bacterianas no processamento de carne de frango incluem o estresse causado pela cadeia de frio, o estresse osmótico, porque o sal é comumente usado como conservante, o estresse ácido, porque os tratamentos com soluções ácidas são utilizados para a conservação da qualidade e prevenção da deterioração microbiana. Finalmente, o estresse térmico (calor) é aplicado no pré-cozimento ou cozimento doméstico dos produtos processados (SHAH et al., 2013; YADAV et al., 2016). Em adição, o uso de substâncias naturais com atividade antimicrobiana tem sido sugerido como agentes para controle de *Salmonella enterica* em alimentos. Particularmente o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEOV) é citado como um agente antibacteriano promissor, pois não induz tolerância direta ou cruzada aos tratamentos geralmente aplicados para controlar o crescimento de bactérias em alimentos (LUZ et al., 2012; MONTE et al., 2014).

A exposição a condições de estresse não letal pode causar injúrias na célula bacteriana, que em resposta, devido a seu metabolismo desordenado, passa a desenvolver a capacidade de crescimento em ambientes anteriormente não apropriados para seu crescimento, aumentando a

resistência frente a aplicação do mesmo ou a diferentes fatores de estresse (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012; YADAV et al., 2016). Assim, a exposição subsequente às condições subletais impostas durante o processamento de alimentos pode aumentar a capacidade de células bacterianas sobreviver em condições ambientais desfavoráveis.

Neste contexto, a tolerância dos micro-organismos a condições de estresse subletal passa a se constituir um risco potencial, quando considerado que pode resultar na indução de respostas adaptativas as injúrias causadas na célula microbiana (LUZ et al., 2012). Ainda, tem sido relatado que patógenos adaptados a condições de estresse são mais virulentos quando comparados aqueles não desafiados (SIRSAT et al., 2011). Isto é importante, principalmente no que diz respeito às cepas epidêmicas de *Salmonella*, porque, quando o hospedeiro ingere alimentos contaminados, as células bacterianas já expostas a vários estresses abióticos vão encontrar a acidez gástrica como a primeira linha do conjunto de defesa, e em seguida vários outros estresses abióticos e biótico (YANG et al., 2014). Consequentemente, células previamente expostas a condições de estresse subletal poderiam apresentar uma maior capacidade de sobreviver no ambiente do hospedeiro, aumentando os riscos de ocorrência de infecção.

Considerando estes aspectos, em soma à escassez de estudos com enfoque nas respostas de cepas epidêmicas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* a exposição a condições de estresse impostas pelos tratamentos empregados durante o processamento dos alimentos, o presente estudo avaliou os efeitos da exposição subsequente a condições de estresse na termotolerância e sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas de cepas epidêmicas de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 inoculadas em peito de frango.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição subsequente a estresses abióticos na termotolerância e sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas de cepas epidêmicas de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 inoculadas em peito de frango.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer diferentes condições de estresse subletal a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de ácido láctico (AL), cloreto de sódio (NaCl) e óleo essencial *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4;
- Determinar a temperatura subletal para uma exposição de 30 minutos em *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4;
- Avaliar a influência da exposição subsequente as condições de estresse frio, ácido, osmótico e de exposição ao óleo essencial de orégano na termotolerância das cepas teste inoculadas em peito de frango;
- Avaliar a sobrevivência em condições gastrintestinais simuladas de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 inoculadas em peito de frango após exposição subsequente a diferentes condições de estresse.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

O mercado consumir interno e externo têm exigido cada vez mais produtos alimentares frescos, saborosos, saudáveis e seguros. No entanto, a globalização da produção e comercialização de alimentos, apesar de aumentar a variedade de produtos disponíveis, também exerce um grande impacto sobre a segurança de alimentos (FORSYTHE, 2013). O processo de conservação de alimentos tem como base a obtenção de um produto final possuidor de uma alta qualidade nutricional atrelada a uma longa vida útil. A qualidade dos alimentos pode ser adversamente afetada por alterações ocasionadas pela ação de fatores físicos, químicos ou microbiológicos. Entretanto, o fator microbiológico é o mais importante pela sua capacidade de contaminação, variedade de efeitos que origina e intensidade de alterações que provoca (BENKEBLIA, 2004). A contaminação microbiana dos alimentos se destaca pela relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, devido ao risco de causar doenças transmitidas por alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos e ou suas toxinas (SOUZA et al., 2007).

Durante o processamento de alimentos, com a finalidade de preservar as características nutricionais e sensoriais dos produtos, e principalmente de minimizar o crescimento de micro-organismos patogênicos, é comum na indústria de alimentos a utilização de tratamentos físicos e químicos que promovem condições ambientais (estresses ambientais) desfavoráveis para o crescimento microbiano, a exemplo de tratamentos térmicos intensos, acidificação, refrigeração, congelamento, desidratação, adição de agentes químicos e de sal podem ser empregados. Além disso, algumas tecnologias de conservação de alimentos têm incluído a inativação não térmica, como radiação por ionização, alta pressão hidrostática e campos elétricos pulsados; aplicação de ácidos orgânicos ou dióxido de cloro e embalagem ativa e de atmosfera modificada (GOMEZ-LOPEZ et al., 2009; RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHIERE 2010; SPECTOR; KENYON, 2012; SHAH et al., 2013). Na última década, óleos essenciais de plantas têm sido propostos para uso na conservação de alimentos. Particularmente o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) é considerado um agente antibacteriano promissor pois não induz tolerância direta ou cruzada aos demais tratamentos comumente aplicados na preservação de matrizes alimentares tais como sais, ácidos e tratamentos térmicos (LUZ et al., 2012; MONTE et al., 2014).

O controle microbiano em alimentos pode ser alcançado através da combinação do uso de agentes em uma menor intensidade, como é defendido no conceito de tecnologia de obstáculos (LEISTNER, 2000). A aplicação de uma combinação inteligente de obstáculos/barreiras (fatores de preservação) pode garantir uma efetiva segurança microbiana, além de manter a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (KARATZAS et al., 2000).

O estudo das interações entre os fatores intrínsecos (características do alimento) e extrínsecos (ambiente em que o alimento se encontra) que interferem na capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos nos alimentos originou o conceito dos obstáculos de Leistner (FRANCO; LANDGRAF, 2005). O conceito dos obstáculos foi introduzido e amplamente aceito como uma ilustração das complexas interações de vários fatores de inibição na conservação de alimentos. As técnicas de conservação tem como alvo os fatores que influenciam o crescimento e a sobrevivência microbiana, e o uso de diferentes obstáculos é mais efetivo do que o emprego de apenas um método de conservação, aplicado em grande intensidade (LEISTNER; GOULD, 2002).

A qualidade global de produto pode ser afetada, de forma positiva ou negativa, dependendo da intensidade de aplicação de cada obstáculo. Para garantir a qualidade total é necessário um perfeito ajuste dos obstáculos para manter os alimentos na faixa ideal e assegurar a sua segurança. O emprego de diferentes e moderados obstáculos combinados, pode ser de grande valia na estabilidade microbiológica dos produtos, pois um efeito sinérgico é obtido se os obstáculos tem diferentes alvos dentro da célula microbiana, o que pode afetar a multiplicação, esporulação e liberação de toxina pelos microrganismos (LEISTNER, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os obstáculos (processos ou combinações dos mesmos) tradicionalmente utilizados para conservação de alimentos destroem grande parte da população microbiana. Entretanto, após sua aplicação a população microbiana no alimento pode incluir células sem viabilidade (irreversivelmente danificadas), células normais (sem danos) e células reversivelmente danificadas ou injuriadas (SPECTOR; KENYON, 2012). Os micro-organismos injuriados são definidos como aqueles que sobreviveram a um estresse, mas que perderam parte de suas características/habilidades distintivas, e, dessa forma, demandam mais tempo para se multiplicar no alimento. Contudo, em condições favoráveis aos micro-organismos, eles têm capacidade de reparar o dano e em seguida crescer no mesmo ritmo que as células normais. As injúrias microbianas variam de acordo com o tipo de estresse, espécie microbiana, composição e consistência dos alimentos e condições de armazenamento (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al.,

2012). Jay (2005) ressalta que nem todas as células em uma população resistem à mesma quantidade de danos e nem todas as formas de estresse produzem lesões identificáveis.

Neste contexto a aplicação de condições subletais, como por exemplo, uma pequena redução da acidez durante o processamento pode induzir uma adaptação em diversos micro-organismos, conferindo tolerância à acidez mais acentuada, ou mesmo proteção cruzada contra outros obstáculos impostos ao crescimento microbiano durante toda a cadeia de produção dos alimentos, como os tratamentos térmicos e adição de sais (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012; SPECTOR; KENYON, 2012).

3.2 TOLERÂNCIA BACTERIANA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE SUBLETAL

Células injuriadas (lesionadas subletalmente) pela exposição a condições de estresse tendem a desenvolver variados mecanismos de resposta, os quais podem ser reconhecidos fenotipicamente pela maior capacidade que as células previamente expostas a estresses subletais possuem de sobreviver em ambiente desfavoráveis (WU, 2008).

As células lesionadas podem sofrer reparo celular e proliferar a níveis reconhecidos como perigosos quando a água e os nutrientes são abundantes (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012). Durante o processo de reparo, essas células podem sofrer alterações em sua virulência e/ou adquirir novas habilidades de adaptação, tolerância e resistência aos agentes estressores, consistindo em uma ameaça potencial à segurança alimentar (SILVA-ANGULO et al., 2014). Por exemplo, os micro-organismos possuem condições ideais de temperatura na qual o crescimento ocorre na velocidade máxima. Quando expostos a temperaturas acima ou abaixo da considerada ótima para o seu crescimento, produzem um pequeno número de proteínas denominadas, respectivamente, “proteínas de choque térmico” ou “proteínas de resposta ao frio”. Assim, desde que o aumento ou a redução na temperatura não seja demasiadamente grande, essas proteínas protegem os micro-organismos contra o dano, ajudando-os a retornar à sua condição normal (SHAH et al., 2013).

Compreender como as bactérias respondem a aplicação de estresses é de fundamental importância para o estudo da viabilidade da aplicação de um agente antimicrobiano em matrizes alimentares. A tolerância/resistência aos antimicrobianos pode ser natural (intrínseca), adquirida, ou ainda ser transmitida dentro da mesma ou de espécies diferentes de bactérias (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). A adaptação a agentes ou processos com ação antimicrobiana é principalmente adquirida através de três mecanismos principais: (1) transferência de genes de resistência de micro-organismos resistentes a susceptíveis; (2)

adaptação genética, por exemplo, mudança no alvo da droga; e (3) adaptação fenotípica, primariamente pelo aumento de expressão de maquinaria celular existente (KOHANSKI et al., 2007; KOHANSKI et al., 2010; SHELDON, 2005).

Quando exposta a processos que causem injúria (estresse) subletal, a célula bacteriana induz a expressão de sistemas de reparação celular (KIESSLING et al., 2002; LADO; YOUSEF, 2002). A resposta ao estresse envolve a regulação da expressão gênica e o envolvimento de diversas proteínas de choque que levam a adaptação (BIKELS-GOSHEN et al., 2010). Outro mecanismo de resposta celular à injúria pode ocorrer na estrutura da membrana celular. Em resposta às perturbações físico-químicas, quando as células microbianas são expostas ao estresse subletal, a membrana celular pode ser capaz de mudar a composição de ácidos graxos com a finalidade de lidar com o novo ambiente. Essas mudanças na composição de ácidos graxos são refletidas em modificações nas propriedades físicas da superfície celular, tais como a temperatura da fase de transição e micro viscosidade (GUERZONI et al., 2001; YANG et al., 2014). A membrana citoplasmática bacteriana separa a célula do ambiente externo, sendo que esta barreira também desenvolve um papel na transdução de energia, na manutenção de transporte de solutos e atua na regulação do metabolismo e crescimento celular (DENICH et al., 2003; BEGLEY; HILL, 2015). Assim, o mecanismo mais comumente utilizado por micro-organismos para modular a fluidez e permeabilidade da membrana em condições de estresse subletal é a mudança da proporção de ácidos graxos saturados e insaturados (LUZ et al., 2014).

Além das alterações na membrana, uma das mais importantes estratégias das células bacterianas para sobreviver em condições desfavoráveis ao crescimento é o uso de fatores sigma (σ S) alternativos, capazes de regular a expressão de genes específicos em resposta ao estresse, garantindo a sobrevivência microbiana. Em condições de estresse, fatores sigma alternativos tais como σ S (codificado pelo gene *rpoS*) e σ H (codificado pelo gene *rpoH*) são reconhecidos pela enzima RNA-polimerase e, a partir deste reconhecimento os genes que serão expressos dependem de qual fator sigma está ligado à enzima (SOMOLINOS et al., 2010; YANG et al., 2014). Além da indução a tolerância a condições desfavoráveis, a exposição das células microbianas a estresses ambientais pode alterar a expressão de genes que codificam fatores de virulência (LENZ et al., 2010; SIRSAT et al., 2011). Neste contexto, patógenos adaptados a condições de estresse têm sido relatados como mais virulentos quando comparados aqueles não desafiados (SIRSAT et al., 2011).

Ainda, a exposição do microrganismo repetidas vezes a concentrações subletais de um agente antimicrobiano particular pode resultar no desenvolvimento de tolerância, o que repercute em aumento da sua capacidade de sobreviver mesmo quando exposto a altas concentrações (ou doses) desse agente. A exposição de bactérias ao estresse subletal pode resultar ainda em um aumento da tolerância a outros tipos de estresses não relacionados, fenômeno denominado tolerância cruzada ou proteção cruzada (SKANDAMIS et al., 2008). O desenvolvimento de tolerância direta ou cruzada pode ser observado mediante a exposição do microrganismo ao estresse subletal, seguida por sua exposição a doses letais do mesmo estresse ou estresses antimicrobianos diferentes (SKANDAMIS et al., 2008). As condições subletais que têm demonstrado induzir respostas ao estresse, resultando em um aumento da tolerância, incluem o choque térmico, a exposição a um pH extremo, o choque oxidativo, tal como a exposição ao peróxido de hidrogênio, o stress osmótico, entre outros (CEBRIÁN et al., 2010).

Uma das respostas de adaptação ao estresse mais estudada e relevante é a resposta de tolerância ao ácido, induzida para proteger as bactérias contra o estresse ácido severo (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2009). A tolerância ao ácido pode conferir também proteção cruzada a outros tipos de estresse. Por exemplo, a resposta de tolerância ao ácido induzida por ácido clorídrico (HCl) protege a bactéria contra a exposição a grandes quantidades de sais, temperaturas elevadas, peróxidos (LEYER; JOHNSON, 1993; HUMPHREY, 2004; XU; LEE; AHN, 2008) e ácidos orgânicos, podendo também induzir uma diferente resposta de tolerância ao ácido de acordo com a temperatura de incubação do microrganismo (KWON; RICKE, 1998; GREENACRE et al., 2003). Assim, é possível que células microbianas possam desenvolver resposta de tolerância ao ácido, que protegeria contra outros fatores de preservação de alimentos, tais como o sal (GREENACRE; BROCKLEHURST, 2006), sugerindo que a presença de um mecanismo de resposta comum ao estresse é responsável pelo desenvolvimento de proteção cruzada a outros agentes potencialmente encontrados no mesmo ambiente (GRUZDEV; PINTO; SELA, 2012).

Ainda, se tratando de microrganismos epidêmicos, deve-se considerar os fatores de estresse encontrados pelo micro-organismo na linha de defesa do hospedeiro, já que após a ingestão do alimento contaminado, os micro-organismos também são expostos a estresses abióticos e bióticos, como, o pH extremo do estômago, os sais biliares, elevada osmolaridade, baixa tensão de oxigênio no intestino, competição por nutrientes com as bactérias gastrointestinais e a produção por estes micro-organismo de bacteriocinas e metabólitos com atividade antimicrobiana, que representam um desafio significativo para a sobrevivência das células contaminantes (SHAH et al., 2013; YANG et al., 2014). Consequentemente, células

previamente expostas a condições de estresse subletal poderiam apresentar uma maior capacidade de sobreviver no ambiente do hospedeiro, aumentando os riscos de ocorrência de infecção.

3.3 *Salmonella enterica* sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, mesófilos, sendo a maioria móvel por meio de flagelos peritríquios e pertencentes a família Enterobacteriaceae (WAN NORHANA et al., 2010). O gênero *Salmonella* é classificado atualmente em três espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterrânea*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. salamae*, *S. houtenae* e *S. indica*; e a *S. bongori* em 20 subespécies. As espécies e subespécies são classificadas em sorotipos ou sorovares de *Salmonella*. Existem mais de 2.500 sorovares de *S. enterica* e a distribuição ubíqua desses sorovares possibilita a sua disseminação por inúmeras vias, incluindo os alimentos. Porém, a eliminação intermitente de *S. enterica* nas fezes de animais constitui a principal fonte de contaminação dos alimentos (SU; CHIU, 2007). Dentre os patógenos transmitidos por alimentos *Salmonella* é o patógeno que causa o maior número de internações hospitalares relacionadas a surtos (CDC, 2015).

A elevada prevalência de diversos sorovares de *S. enterica* em alimentos de origem animal é um dos principais fatores de risco associados a surtos alimentares em todo o mundo. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, mais de um milhão de casos de infecção são causados por esse micro-organismo, ocasionando morte de mais de 300 pessoas ao ano (CDC, 2015). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do total de surtos notificados entre os anos de 2000 a 2015, 14,4 % estavam associados principalmente à presença de *S. enterica* (BRASIL, 2015).

Infecções causadas por *Salmonella* resultam desde síndromes brandas até casos graves, como os causados por *S. enterica* Typhi e Paratyphi, exclusivamente em humanos constituindo uma doença denominada febre entérica, que tem uma alta taxa de mortalidade (EFSA-ECDC, 2013). Nas salmoneloses causadas pelos sorovares de *S. enterica*, a pessoa infectada pode apresentar quadros de diarreia, febre, vômitos e dores abdominais que ocorrem entre 12 a 72 horas após o consumo de alimentos contaminados com gravidade variável podendo levar a morte (JAY et al., 2005). Durante o processo infeccioso, *S. enterica* pode colonizar o trato intestinal e atingir o baço, o fígado, a medula óssea por meio da circulação linfática e sanguínea. A partir da ingestão, sobrevivem ao pH do estômago, penetram o epitélio intestinal resultando

em sintomas de diarreia com perda de eletrólitos, hemorragias, inflamação localizada e necrose. A passagem da bactéria no intestino é iniciada pela invasão em enterócitos e as células M (micro pregas) localizadas na porção final do intestino delgado onde se reproduzem. As membranas pregueadas envolvem e englobam a bactéria, ocorrendo uma replicação intracelular no fagossomo com subsequente morte da célula hospedeira e disseminação para as células epiteliais adjacentes e para o tecido linfoide. A resposta inflamatória confina a infecção do trato gastrointestinal, promovendo a liberação das prostaglandinas e a secreção ativa de líquidos (MURRAY et al., 2004; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012).

A disseminação de *Salmonella* na cadeia alimentar promoveu uma mobilização dos setores de segurança dos alimentos e o monitoramento desse patógeno tem sido intensificado em todo o mundo. A legislação brasileira estabelece como padrão a ausência desse micro-organismo em 25 gramas de produto, ou seja, a contaminação em alimentos por este patógeno, independente da carga microbiana presente, os torna impróprios para o consumo (BRASIL, 2001).

As infecções causadas por *S. enterica* tem sido associadas à ingestão de diversos alimentos contaminados, tais como queijos (FERRARI et al., 2013), manteiga de amendoim (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012), frutas e vegetais minimamente processados (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER; 2014) e carne bovina (ROWLANDS et al., 2014). No entanto, ovos e produtos à base de carne de frango ainda são os alimentos mais frequentes envolvidos em surtos causados por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC, 2015; YADAV et al., 2016). No Brasil, os principais alimentos envolvidos em surtos causados por *Salmonella enterica* incluem carne de frango e derivados, queijos e produtos à base de ovos (KOTTWITZ et al., 2012; FERRARI et al., 2013; BRASIL, 2015). Dentre os sorovares frequentemente associados às infecções alimentares e surtos de salmonelose destacam-se *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Durante décadas, o sorovar *Typhimurium* foi o mais prevalente em diversos países como agente de surtos de salmonelose e, apesar de seu envolvimento em surtos ainda ser significativo, a substituição natural dos nichos evidenciou também o sorovar *Enteritidis*. No Brasil, *S. Enteritidis* emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública em 1993. Estudos epidemiológicos sugerem que a entrada deste sorovar no país ocorreu provavelmente no final da década de 80, via importação de material genético avícola contaminado (SILVA; DUARTE, 2002). Até os dias atuais *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são relatados como os sorovares mais frequentes associados a surtos de salmonelose não tifoide em humanos (FERRARI et al., 2013; BRASIL, 2015; CDC, 2015; YADAV et al., 2016).

Dentre as técnicas de tipificação para caracterização de *Salmonella*, a fagotipificação se destaca por ser um valioso método no contexto epidemiológico pois é capaz de diferenciar cepas de *Salmonella* dentro de um sorovar em particular (YAN et al., 2003). Esta técnica determina a qual fago (bacteriófago) a bactéria é suscetível. Os fagos são vírus bacterianos altamente especializados, pois infectam somente membros de uma espécie em particular ou de determinadas linhagens dentro de uma espécie, causando lise celular após a infecção (TORTORA et al., 2012). A partir de culturas puras de *Salmonella* diferentes tipos de fagos são testados para a capacidade de infecção e lise das células (TORTORA et al., 2012). A fagotipificação tem sido utilizada para descrever clones com graves implicações em saúde pública (MAJTANOVA et al. 2011; BOXSTAEL et al. 2012). Dentre os fagotipos (PTs), o PT4 é considerado prevalente em infecções envolvendo produtos avícolas (NUNES et al., 2003; KOTTWITZ et al., 2011).

Considerando o que foi exposto, a tolerância de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* a condições de estresse subletal passa a se constituir um risco potencial, quando considerados os relatos da capacidade destes sorovares de tolerar e sobreviver em ambientes desfavoráveis. *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* parecem ser capazes de detectar e responder rapidamente e de forma adequada a uma vasta gama de estresses bióticos e abióticos encontrados nos mais diversos ambientes (SHAH et al., 2013; YANG et al., 2014; BEGLEY; HILL, 2015). Esses mecanismos de adaptação em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* conferem maior resistência aos tratamentos físicos e químicos empregados para controle microbiano nos alimentos. Com isso, uma pré-exposição a fatores de estresse pode induzir um aumento potencial na capacidade destes patógenos resistirem aos mecanismos de defesa do trato gastrointestinal do hospedeiro (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012; SHAH et al., 2013; YANG et al., 2014; YADAV et al., 2016).

Estudos anteriores relatam que células de *S. Typhimurium* previamente expostas a condições ácidas tornaram-se mais tolerantes ao cloreto de sódio (NaCl) (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004; TOSUN; GONUL, 2003). Ainda, o cultivo em condições moderadamente ácidas aumenta a tolerância de células de *S. Typhimurium* à temperaturas elevadas (LEYER; JOHNSON, 1993; BACON et al., 2003). Similarmente, a exposição ao NaCl pode aumentar a termotolerância em sorovares de *S. enterica* (PEÑA-MELÉNDEZ; PERRY; YOUSEF, 2014).

Entretanto, existe uma escassez de estudos com enfoque nos efeitos que a exposição subsequente a fatores de estresse causa em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, particularmente a exposição à condições comumente aplicadas como barreiras ao crescimento bacteriano durante o processamento de alimentos. Também são escassos ou inexistentes estudos que avaliem cepas

epidêmicas de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 em carne crua de frango, matriz comum de isolamento destes sorovares.

4 ABORDAGEM METODOLÓGICA

4.1 Cepas teste

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo incluíram *S. Enteritidis* PT4 107/01 resistente ao ácido nalidíxico (30 µg/mL) e *S. Typhimurium* PT4 46/99 resistente à tetraciclina (30 µg/mL). Estas cepas foram isoladas de carne de frango envolvida em surtos ocorridos no Sul do Brasil (KOTTWITZ et al., 2011). As culturas estoques foram mantidas em criotubos contendo caldo infusão de cérebro e coração – CBHI (Himedia, Índia) adicionado de 20% de glicerol, armazenados a - 80 °C

4.2 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos utilizados neste estudo foram cloreto de sódio (NaCl P.A.), ácido láctico (AL) a 85% e o óleo essencial de orégano (OEOV). O NaCl e o AL foram obtidos a partir de Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). O OEOV foi obtido a partir da Laszlo Aromaterapia Indústria e Comércio Ltda. (Minas Gerais, Brasil) sendo seu constituinte majoritário (identificado por Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas/CG-MS) o Carvacrol (68,0%) (SOUSA et al, 2016). Soluções de NaCl (600-50 mg/mL) e AL (160-1,25 µL/mL) foram preparados em CBHI. Soluções de OEOV (40-0,312 µL/mL) foram preparadas em CBHI utilizando Tween 80 (1%) (Sigma Aldrich, EUA) como emulsionante (Tween 80 a 1% não inibiu o crescimento das cepas bacterianas testadas).

4.3 Preparo do inóculo e condições de crescimento

O inóculo de cada cepa foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) a partir de culturas cultivadas *overnight* em ágar BHI a 37 °C. Cada cepa foi cultivada em CBHI a 37 °C durante 18 - 20 horas (h) (fase final do crescimento exponencial), coletadas por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e ressuspensas em solução salina estéril para a padronização da suspensão celular. As suspensões microbianas foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina

estéril e cada diluição foi padronizada em espectrofotômetro a 625 nm mediante o valor de Densidade Óptica (DO_{625}), utilizando-se solução salina como branco para o alcance de leitura de 0,09 que fornece uma contagem de células viáveis de, aproximadamente, 8 log de UFC/mL para ambas as cepas teste (MONTE et al., 2014).

Em placas de Petri contendo ágar BHI foram semeados 0,1 mL de cada diluição da suspensão bacteriana com auxílio de alça de Drigalsky e essas foram, posteriormente, incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo, para o comprimento de onda de 625 nm o valor da DO foi de 0,09 para ambas as cepas, correspondendo a, aproximadamente, 10^8 log de UFC/mL.

Durante os ensaios, foi utilizado um inóculo misto de *S. Enteritidis* PT4 107/01 e *S. Typhimurium* PT4 46/99 utilizando cada suspensão bacteriana a uma razão de 1:1 (OLIVEIRA et al., 2011). Para avaliação da viabilidade celular de cada cepa ensaiada nos diferentes tratamentos aplicados durante o estudo o ágar de cultivo (BHI) foi suplementado com ácido nalidíxico 30 µg/mL para crescimento de *S. Enteritidis* PT4 107/01 e com tetraciclina 30 µg/mL para o crescimento *S. Typhimurium* PT4 46/99.

4.4 Determinação das condições de estresse subletal

A concentração inibitória mínima (CIM) do AL, NaCl e OEOV frente às cepas teste foi determinada utilizando o método de micro-diluição de acordo com os procedimentos descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com pequenas modificações (CLSI, 2012). Cerca de 50 µL das soluções de NaCl (600 - 50 mg/mL), AL (160 - 1,25 µL/mL) ou OEOV (40 - 0,312 µL/mL), foram colocadas em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 50 µL de suspensão bacteriana (6 log de UFC/mL) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi devidamente envolvida com filme plástico para evitar a desidratação bacteriana ou volatilização dos antimicrobianos. As placas, incluindo controles de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo) foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração dos agentes de estresse capaz de inibir o crescimento das cepas. Concentrações subletais correspondentes a 1/2 e 1/4 de CIM de NaCl, AL e OEOV foram usadas como fatores de estresse durante os tratamentos.

A temperatura subletal para avaliação de mudanças na termotolerância em *S. Enteritidis* PT4 107/01 e *S. Typhimurium* PT4 46/99 foi definida com base em ensaios preliminares de

exposição das cepas em diferentes temperaturas durante 30 minutos e os dados foram comparados pelo Programa Online “Pathogen Modeling Program” (PMP) (United States Department of Agriculture Agricultural Research Service; <http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>). A exposição de 30 min, a 55 °C causou uma redução de cerca de 3 log de UFC/g em *S. Enteritidis* PT4 107/01 e 2 log de UFC/g em *S. Typhimurium* PT4 46/99, sendo definida como a temperatura subletal e foi utilizada ao longo dos experimentos para avaliar as mudanças na termotolerância. Efeitos letais contra as cepas teste foram verificados após 30 min de exposição a 58 °C (tempo para redução de 6.5 log de UFC/g).

4.5 Preparo do modelo base-peito de frango

Os efeitos da exposição a concentrações subletais de NaCl, AL, OEOV e a temperatura subletal sobre a viabilidade celular bacteriana, foram realizados em peito de frango, considerando que esta foi a matriz alimentar de isolamento das cepas ensaiadas, e foram simuladas as condições impostas as células bacterianas durante o processamento da carne de frango.

As amostras de peito de frango foram adquiridas em abatedouro situado na cidade de Guarabira (Paraíba, Brasil) e foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias de acordo com os métodos padrões (APHA, 2001), seguindo os padrões sanitários estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001). Os dados obtidos (não mostrados) revelaram uma satisfatória qualidade sanitária das amostras de peito de frango e ausência de *Salmonella* spp. A composição centesimal das amostras de peito de frango determinada de acordo com os procedimentos padrões (AOAC, 2012), foi em média: Umidade 73,5 g/100 g; Minerais 0,91 g/100 g; Lipídios 4,64 g/100 g; Proteínas 21 g/100 g. Amostras refrigeradas (9 g) de peito de frango foram moídas em liquidificador doméstico e foram mantidas em sacos *Stomacher* (17,5 x 12,5 cm) até a realização dos ensaios.

4.6 Tratamentos de exposição subsequente ao estresse em peito de frango

Para os diferentes tratamentos de exposição subsequente a diferentes condições de estresse subletal, amostras de 9 g de peito de frango acondicionadas em sacos *Stomacher* foram adicionadas de 1 mL do inóculo misto ($\sim 10^8$ Log de UFC/mL), agitadas manualmente durante 1 min, e sempre incubadas sob refrigeração (12 °C), durante a exposição ao estresse, à exceção

da exposição ao estresse frio (5 °C durante 5 h). Todos os tratamentos foram expostos ao estresse frio (estresse 1) e, posteriormente, expostos ao estresse ácido, osmótico ou OEOV, totalizando 18 tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos de estresses subletais e respectivas condições utilizadas durante a exposição de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* PT4 em peito de frango.

Tratamentos	Estresse 2 Exposição (18h)	Estresse 3 Exposição (18h)
T1	Ácido láctico 2,5 µL/g	NaCl 37,5 mg/g
T2	Ácido láctico 5 µL/g	NaCl 75 mg/g
T3	Ácido láctico 5µL/g	NaCl 37,5 mg/g
T4	Ácido láctico 2,5 µL/g	NaCl 75 mg/g
T5	ne*	NaCl 75 mg/g
T6	Ácido láctico 5 µL/g	ne*
T7	ne*	NaCl 37,5 mg/g
T8	Ácido láctico 2,5 µL/g	ne*
T9	Ácido láctico 5 µL/g	OEOV 1,25 µL/g
T10	NaCl 75 mg/g	OEOV 1,25 µL/g
T11	OEOV 1,25 µL/g	Ácido láctico 5 µL/g
T12	OEOV 1,25 µL/g	NaCl 75 mg/g
T13	Ácido láctico 2,5	OEOV 0,625 µL/g
T14	NaCl 37,5 mg/g	OEOV 0,625 µL/g
T15	OEOV 0,625 µL/g	Ácido láctico 5 µL/g
T16	OEOV 0,625 µL/g	NaCl 37,5 mg/g
T17	ne*	OEOV 1,25 µL/g
T18	ne*	OEOV 0,625 µL/g

*ne: não exposto.

As alterações na termotolerância foram avaliadas pela exposição a 55 °C durante 30 min após a aplicação de cada sequência de estresse (tratamentos). Em cada etapa de exposição ao estresse, a viabilidade celular das cepas foi avaliada utilizando procedimento de contagem de células viáveis. Alíquotas de 40 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) foram adicionadas nos sistemas que foram em seguida agitados suavemente durante 1 min, para assegurar a homogeneização (contagens finais de células viáveis ~ 10⁶ log de UFC/g) e uma

alíquota de 100 µL de cada sistema foi submetida a diluição seriada (10^{-1} – 10^{-4}) em solução salina estéril e, em seguida, 20 µL de cada diluição foram inoculados pelo uso da técnica da micro-gota de acordo com Herigstad et al. (2001) em placas de Petri contendo ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 30 µg/mL de ácido nalidíxico, para a contagem de *S. Enteritidis* PT4 107/01; e ágar BHI suplementado com 30 µg/mL de tetraciclina para a contagem de *S. Typhimurium* PT4 46/99. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Os sistemas controles (células não expostas aos estresses subletais) foram incubados durante o mesmo intervalo de tempo em peito de frango a 12 °C, ou em BHI a 37 °C e foram ensaiados similarmente. Os resultados foram expressos como log de UFC/g.

4.7 Viabilidade em condições gastrointestinais simuladas

Células sobreviventes dos tratamentos de estresses subletais subsequentes (células persistentes) apresentando ou não aumento na termotolerância de *S. Enteritidis* PT4 (T1 e T2) e *S. Typhimurium* PT4 (T1 e T3) foram ensaiadas em condições gastrointestinais simuladas (Tabela 1).

As amostras foram preparadas em frascos esterilizados (50 mL) contendo o peito de frango e o inóculo (contagens de células viáveis ao término do ensaio de termotolerância) seguida da adição das soluções químicas e enzimáticas em cada etapa da simulação gastrointestinal. As condições gastrointestinais simuladas utilizadas neste estudo estão descritos na Tabela 2, incluindo os compostos utilizados, as suas concentrações, o tempo de exposição e a intensidade da agitação em todas as etapas (a agitação foi usada para simular os movimentos peristálticos). A simulação foi contínua, de modo que o volume global de trabalho aumentou (como acontece durante a digestão real) em relação ao inicial de 9 g de amostra de peito de frango (MADUREIRA et al., 2011).

A mastigação foi simulada de acordo com Silva et al. (2016), utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de 1- α -amilase diluída em solução de CaCl_2 a 1 mM, onde o pH foi ajustado para 6,9 utilizando solução de NaHCO_3 a 1 mM. Esta solução foi adicionada em 9 g das amostras a uma taxa de 0,6 mL/min, durante 2 minutos. Na etapa que simulou as condições do esôfago-estômago foi adicionada solução de pepsina a uma taxa de 0,05 mL/mL durante 90 minutos. A solução de pepsina foi preparada em HCl a 0,1 N numa proporção de 25 mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1 M (MAINVILLE et al., 2005). As condições do duodeno foram simuladas utilizando 1 g/L de pancreatina e 6 g/L de sais biliares, diluídos em solução de NaHCO_3 a 0,1 M. Esta solução foi adicionada no início

da etapa a uma taxa de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO, 2007). Finalmente, a etapa do íleo foi simulada por um aumento do pH para 6,5 utilizando solução de NaHCO_3 a 0,1 M.

Tabela 2. Condições utilizadas durante cada etapa da digestão gastrointestinal simulada.

Etapa	Compartimento	Condições	Agitação (rpm)	pH final	Tempo de exposição (min)
1	Antes da simulação	-	-	-	-
2	Boca	Amilase	200	6,9	2
3	Esôfago – Estômago	Pepsina	130	5,5	10
4				4,6	10
5				3,8	10
6				2,8	20
7				2,3	20
8				2,0	20
9	Duodeno	Pancreatina + sais de bile	45	5,0	30
10	Íleo		45	6,5	60

Todas as soluções enzimáticas foram preparadas no momento do experimento e antes de serem utilizadas foram filtradas utilizando filtro estéril de membrana de 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, EUA). Após, serem esterilizadas, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação, antes da sua adição gradual (quando apropriado). Uma câmara de incubação (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C foi utilizada para simular a temperatura do corpo humano e agitação mecânica foi usada para simular e os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes aos atingidos em cada compartimento digestivo.

O pH de cada amostra foi medido em todos os momentos com um pHmetro (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil) que foi periodicamente higienizado com etanol (90 mL/100 mL). Após a exposição em cada etapa da digestão simulada, foi recolhida assepticamente uma

alíquota de 100 µL do sistema gastrointestinal, e em seguida, foi submetida a diluição seriada ($10^{-1} - 10^{-4}$) em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). A contagem das células viáveis de cada cepa foi realizada conforme descrito anteriormente utilizando a técnica da micro-gota (HERIGSTAD et al., 2001). Os sistemas controles de cada cepa que continham o inóculo de células não expostas a sequência de estresses subletais (mantidas a 12 °C) foram analisadas de forma semelhante em peito de frango e em caldo BHI. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e os resultados foram expressos como log de UFC/g.

4.8 Análises estatísticas e comparação dos dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), os resultados foram expressos com os valores médios dos ensaios e desvio padrão. Nos ensaios de viabilidade celular, a comparação entre as médias e determinação das diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey e pelo teste T. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia). O crescimento observado para as células controle cultivadas a 37 °C em caldo BHI, ou em peito de frango a 12 °C foram comparados utilizando as ferramentas on-line da base de dados combinados para Microbiologia Preditiva (COMBASE, disponível em <http://www.combase.cc/es/>).

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; PRIETO, M.; BERNARDO, A.; HILL, C.; LÓPEZ, M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive instressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 482-492, 2012.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ, M. A comparative study of thermal and acid inactivation kinetics in fruit juices of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg grown at acidic conditions. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1147-1155, 2009.
- American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA. 676p. 2001.
- BACON, R. T.; RANSOM, J. R.; KENDALL, P. A.; BELK, K. E.; SMITH, G. C. Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial-resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4123-4128, 2003.
- BEGLEY, M.; C. HILL. Stress adaptation in foodborne pathogens. **Annual review of food science and technology**, v. 6, p. 191-210, 2015.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.
- BIKELS-GOSHEN, T.; LANDAU, E.; SAGUY, S.; SHAPIRA, R. Staphylococcal strains adapted to Epigallocatechin Gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 26-31, 2010.
- BOXSTAEL, S. V.; DIERICK, K.; VAN HUFFEL, X.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; HERMAN, L.; BERTRAND, S.; WILDEMAUWE, C.; CATRY, B.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork in Belgium between 2001 and 2006. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 913-918, 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em 24 de janeiro de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02/01/2001. p. 1- 54. Disponível em: <

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> acesso em 24 de janeiro de 2016.

CDC. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States (2015). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em 24 de janeiro de 2016.

CEBRIÁN, G.; SAGARZAZU, N.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; MAÑAS, P. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 26-33, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational vol. 32, document M100-S22. Wayne, PA: CLSI/NCCLS, 2012.

DENICH, T. J.; BEAUDETTE, L. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 2, p. 149- 182, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA v. 11, n. 4, p. 1-250, 2013.

FERRARI, R. G.; GALIANA, A.; CREMARES, R.; RODRIGUÉZ, J. C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ROYO, G. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 44, n. 2, p. 657-662, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

GOMEZ-LOPEZ, V. M.; RAJKOVIC, A.; RAGAERT, P.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 17-26, 2009.

GREENACRE, E.J.; BROCKLEHURST, T.F. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 62-65, 2006.

GRUZDEV, N.; PINTO, R.; SELA, S. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 415-422, 2012.

GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; COCCONCELLI, P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiol**, v. 147, n. 8, p. 225-2264, 2001.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z. SLAVCHEV, A.; GEISSLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their mainaromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, Illinois, v. 21, n. 5, p. 459-463, 2009.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 504-509, 2004.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology Microbiology**, New York: Springer, p. 229-233. 2005.

KARATZAS, A. K.; BENNIK, M. H.; SMID, E. J.; KETS, E.P. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 296-301, 2000.

KIESSLING, C.R.; CUTTING, J. H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W. M.; DATTA, A.R.; SOFOS, J. N. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999– 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 603–608, 2002.

KOHANSKI, M. A. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 130, n. 5, p. 797-810, 2007.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 37, n. 3, p. 311-320, 2010.

KOTTWITZ, L. B. M.; SCHEFFER, M. C.; COSTA, L. M. D.; FARAH, S. M. F. F.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1026-1031, 2011.

KOTTWITZ, L. B. M.; SCHEFFER, M. C.; COSTA, L. M. D.; LEITAO, J. A.; BACK, A., RODRIGUES, D. P.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. **Semina. Ciências Agrárias** (Impresso), v. 33, n. 2, p. 705-712, 2012.

KOUTSOMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* after habituation at different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 321-326, 2004.

KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Induction of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3458-3463, 1998.

LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p.433-440, 2002.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704–1712, 2007.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181–186, 2000.

LEISTNER, L., GOULD, G. W. Hurdle technologies: combination treatment for food stability, safety and quality. **Food Engineering Series**. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. 194p. 2002.

LENZ, C. A.; HEW-FERSTL, C. M.; VOGEL, R. F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p.317-326, 2010.

LEYER G. J.; JOHNSON E. A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1842-1847, 1993.

LUZ, I. S.; GOMES NETO, N. J.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Assessment of tolerance induction by *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in *Pseudomonas aeruginosa* cultivated in a meat-based broth and in a meat model. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 7, p. 1-10, 2014.

LUZ, S. I.; GOMES NETO, N. J.; TAVARES, A. G.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 667-672, 2012.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287–296, 2005.

MAJTANOVA, L.; MAJTAN, J.; MAJTAN, V. Trends in phage types of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated in Slovakia from 1995 to 2009. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 4, p. 454–456, 2011.

MONTE, D. F. M.; TAVARES, A. G.; ALBUQUERQUE, A. R.; SAMPAIO, F. C.; OLIEVIRA, T. C. R. M.; FRANCO, O. L.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

MURRAY, R. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 762p. 2004.

- NIELSEN, M. B.; KNUDSEN, G. M.; DANINO-APPLETON, V.; OLSEN, J. E.; THOMSEN, L. E. Comparison of heat stress responses of immobilized and planktonic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Food Microbiology**, n. 33, n. 2, p.221-227, 2013.
- NUNES, I. A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G. C.; SANTOS, M. A. A.; SOLARI, C. A.; SILVA, O. R.; FERREIRA, A. J. P. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 324-327, 2003.
- OLIVEIRA, M.; WIJNANDS, L.; ABADIAS, M.; AARTS, H.; FRANZ, E. Pathogenic potential of *Salmonella* Typhimurium DT104 following sequential passage through soil, packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 149-155, 2011.
- PENÃ-MELÉNDEZ, M.; PERRY, J. J.; YOUSEF, A. E. Changes in Thermal Resistance of Three *Salmonella* Serovars in Response to Osmotic Shock and Adaptation at Water Activities Reduced by Different Humectants. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, 914–918, 2014.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed., ArtMed, 2013.
- RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* with prior resistance to intense pulsed light and lactic acid. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 869-872, 2011.
- ROWLANDS, R. E.; RISTORI, C. A.; IKUNO, A. A.; BARBOSA, M. L.; JAKABI, M.; FRANCO, B. D. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 56, n. 6, p. 461-467, 2014.
- SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 1-8, 2014.
- SHAH, J.; DESAI, P.T.; CHEN, D.; STEVENS, J. R.; WEIMER, B. C. Preadaptation to cold stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p.7281-7289, 2013.
- SHELDON, A. T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, Washington, v. 18, n. 3, p. 170-180, 2005.
- SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.
- SILVA, N. ALVES, S.; GONÇALVES, A.; AMARAL, J. S.; POETA, P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 6, p. 503–510, 2013.

SILVA, S. Q.; SANTOS, M. T.; PAES, S. A.; VANETTI, M. C. D. Acid and low temperature treatments on *Salmonella* Enteritidis inoculated in pork and its subsequent survival in simulated gastric fluid. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p.530-535, 2016.

SILVA-ANGULO, A.B.; ZANINI, S. F.; RODRIGO, D.; ROSENTHAL, A.; MARTINEZ, A. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. **Food Control**, v. 37, p. 336-342, 2014.

SIRSAT, S. A.; BURKHOLDER, K. M.; MUTHAIYAN, A.; DOWD, S. E.; BHUNIA, A. K.; RICKE, S. C. Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 813–822, 2011.

SKANDAMIS, P.N.; YOON, Y.; STOPFORTH, J. D.; KENDALL, P. A.; SOFOS, J. N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 294–303, 2008.

SOMOLINOS, M.; ESPINA, L.; PAGÁN, R.; GARCIA, D. *sigB* absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 32-38, 2010.

SOUZA, E. L., BARROS, J. C., GOMES NETO, N. J., CONCEIÇÃO, M. L. & COSTA, A. C. V. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 386–392, 2009.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, G. T.; CARVALHO, R. J.; SOUSA, J. P.; TAVARES, J. F.; SCHAFFNER, D.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semi-hard cheese broth and slurry. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 2, p. 246-252, 2016.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 455–481, 2012.

SU, L. H.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOSUN, H.; GÖNÜL, S. A. Acid adaptation protects *Salmonella typhimurium* from environmental stresses. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 31-36, 2003.

WAN NORHANA, M. N.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v.21, n. 4, p.343-361, 2010.

WU, V.C.H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 735-744, 2008.

XU, H.; LEE, H. Y.; AHN, J. Cross protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 290-297, 2008.

YADAV, A. S.; SAXENA G. K.; SAXENA V. K.; KATARIA, J. M. Study on Heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 2, p. 114-121, 2016.

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 189-204, 2003.

YANG, Y.; KHOO, W. J.; ZHENG, Q.; CHUNG, H.J.; YUK, H. G. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p.102–109, 2014.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO - Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions in *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 after subsequent stress exposure in chicken breast meat

Artigo submetido a Food Control (Fator de impacto 2.806)

Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions in *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 after subsequent stress exposure in chicken breast meat

Running title: Tolerance response in endemic *Salmonella*

Adma Nadja Ferreira de Melo^a, Geany Targino de Souza^a, Donald Schaffner^b, Tereza C. Moreira de Oliveira^c, Janeeyre Ferreira Maciel^a, Evandro Leite de Souza^d, Marciane Magnani^{a*}

^a*Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 58051900, Brazil;*

^b*Department of Food Science, Rutgers, The State University of New Jersey, 65 Dudley Road, New Brunswick, NJ 08901, USA*

^c*Department of Food Science and Technology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, 86057970,*

^d*Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 58051900, Brazil;*

Author for correspondence: Marciane Magnani

Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil e-mail: magnani2@gmail.com.br; Phone number: + 55 83 3216 7576; Fax number: + 55 83 3216 735

Abstract

This study assessed changes in thermo-tolerance and capability to survive to simulated gastrointestinal conditions in *Salmonella* Enteritidis (S. Enteritidis PT4) and *Salmonella* Typhimurium (S. Typhimurium PT4) inoculated in ground chicken breast following exposure to abiotic stresses (cold, acid and osmotic) commonly imposed during food processing. The effects of the stress imposed by exposure to the natural antimicrobial oregano (*Origanum vulgare* L.) essential were also assessed. The exposure to cold stress (5 °C for 5 h) did not result in increased tolerance to acid stress (lactic acid at 5 µL/g and 2.5 µL/g) in either strain. Cells of S. Typhimurium and S. Enteritidis previously exposed to acid stress showed higher tolerance to osmotic stress (NaCl at 75 mg/g or 37.5 mg/g) compared to non-acid-exposed cells. Exposure to osmotic stress without previous exposure to acid stress caused a salt-concentration dependent decrease in counts of either strain. Exposure to oregano essential oil at subinhibitory concentrations (1.25 µL/g and 0.62 µL/g) decreased the acid and osmotic tolerance of both S. Enteritidis PT4 and S. Typhimurium PT4. Subsequent exposure to cold, acid and osmotic stress conditions increased the thermo-tolerance in both strains. The cells that survived the subsequent stress exposure (persisters) showed higher tolerance to acidic conditions under simulated gastrointestinal conditions. Persisters cells of S. Enteritidis and S. Typhimurium showed higher survival rates (approximately 1.2 log CFU/g) than control cells at the end of the *in vitro* digestion. The results show that subsequent exposure to sub-lethal stress may increase the thermo-tolerance and enhance the survival under gastrointestinal conditions in S. Enteritidis and S. Typhimurium.

Key-words: sub-lethal stress, *Salmonella*, food processing, essential oil, survival.

1. Introduction

Salmonella is a foodborne pathogen that causes the most outbreak-related hospitalizations in the US (CDC, 2015). *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis serovars are recognized as the major etiological agents of salmonellosis in foodborne disease outbreaks reported worldwide (Majtanova, Majtan & Majtan, 2011; Nielsen et al., 2013; Yang et al., 2014). Among the phage types (PT), PT4 is considered the most virulent and prevalent in the epidemiological chain involving poultry products (Kottwitz et al., 2011). Salmonellosis has been linked to the consumption of a variety of food products such as cheeses (Ferrari et al., 2013), peanut butter (Álvarez-Ordóñez et al., 2012), minimally processed fruit and vegetables (Oliveira et al., 2011) and beef (Rowlands et al., 2014). Egg-based products and chicken meat are however still the foods most frequently involved in outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium (CDC, 2015; Yadav et al., 2016).

Salmonella cells may encounter abiotic stresses or hurdles during food processing or storage (Álvarez-Ordóñez et al., 2012; Monte et al., 2014). The main hurdles imposed on bacterial cells in chicken meat processing plants include cold stress (because the raw meat is stored at cold temperatures), osmotic stress (because salt is commonly used as a preservative and flavor enhancer) and acid stress (as a flavor enhancer and shelf life extender). Heat stress can also be applied in pre-cooking or domestic cooking of processed products (Shah et al., 2013; Yadav et al., 2016). Natural substances with antimicrobial activity have also been widely studied as alternative means of controlling *S. enterica* in foods (Espina et al., 2013; Monte et al., 2014). The essential oil from *Origanum vulgare* L. (oregano; OVEO) is cited as promising antibacterial agent because it has strong and wide-spectrum antimicrobial effects and does not induce direct or cross tolerance to common hurdles applied to control bacterial growth in foods (Luz et al., 2012).

The “hurdle concept” using the application of several stresses to disturb the homeostasis of bacterial cells (Leistner & Gorris, 1995) is widely used in traditional food preservation systems (Espina et al., 2013). It has been reported however that previous exposure of pathogenic bacteria to non-lethal stressful conditions could result in increasing subsequent resistance to the same or different environmental stresses (Yadav et al., 2016). Such stressed bacterial cells might then subsequently survive under what would have previously been lethal environmental conditions during food processing. This is especially important for pathogens like *Salmonella* because bacterial cells already exposed to several abiotic stresses will encounter stomach acid as the host’s first line of defense followed by several new abiotic/biotic stress factors (Shah et al., 2013). Survivors entering the intestines must deal with reduced oxygen, bile salts, antimicrobial peptides, weak acids (metabolic products of resident microbial flora), increased osmolarity, and competition with resident microorganisms for nutrients and space (Spector & Kenyon, 2012; Yang et al., 2014). However, studies focusing on the survival of *Salmonella* cells under gastrointestinal conditions after subsequent exposure to different hurdles commonly applied during food processing or storage are still scarce.

This study was performed to assess the effects of subsequent exposure to sub-lethal stress on thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of epidemic strains of *Salmonella* belonging to serovars Enteritidis and Typhimurium and Phage-Type PT4 in ground chicken breast.

2. Material and methods

2.1 Test strains, inoculum and growth conditions

The test microorganisms used in this study were *S. Enteritidis* 107/01 PT4 resistant to nalidixic acid (30 µg/mL), and *S. Typhimurium* 46/99 PT4 resistant to tetracycline (30 µg/mL). These strains were first isolated from chicken meat involved in outbreaks occurred in the South

of Brazil (Kottwitz et al., 2011). Stock cultures were maintained in cryovials at -80 °C in brain heart infusion broth (BHIB; Himedia, India) containing glycerol (20 mL/100mL).

The inoculum of each strain was obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (0.85% NaCl w/v) from overnight cultures grown in BHI agar (BHIA, Himeida, India) at 37 °C. The strains were grown in BHIB at 37 °C for 18 – 20 h (late exponential growth phase) and harvested through centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C). Harvested cells were washed twice in sterile saline solution (NaCl, 0.85%) and re-suspended in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions. Optical density of 0.09 at 625 nm (OD_{625}) provided viable cell counts of approximately 8 log CFU/mL for both strains (Monte et al., 2014). The cell suspensions were mixed in a ratio of 1:1 (*S. Enteritidis* 107/01 PT4 and *S. Typhimurium* 46/99 PT4) to create the final inoculum (Oliveira et al., 2011). BHIA supplemented with nalidixic acid (30 µg/mL) was used to count *S. Enteritidis* PT4 and BHIA supplemented with tetracycline (30 µg/mL) was used to count *S. Typhimurium* PT4.

2.2 Stress agents

The antimicrobial agents used in this study were OVEO (Laszlo Aromaterapia Ind. Com. Ltda., Minas Gerais, Brazil), sodium chloride (NaCl P.A.) and lactic acid 85% (LA). The NaCl and LA were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The major constituents of OVEO were identified by GC-MS as carvacrol (69.0%) (Sousa et al., 2016). Solutions of NaCl (600 – 50 mg/ mL) and LA (160 – 1.25 µL/ mL) were prepared in sterile BHIB. Emulsions of OVEO (40 – 0.312 µL/ mL) were prepared in sterile BHIB containing Tween 80 (1%, v/v/) (Sigma Aldrich, USA) as an emulsifier. Tween 80 at 1% (v/v/) did not inhibit the growth of the assayed bacterial strains.

2.3 Determination of sub-lethal stress conditions

A microtiter plate assay was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of OVEO, NaCl and LA according to a standard method (CLSI, 2012). Approximately 50 μ L of NaCl (600 to 50 mg/ mL), LA (160 to 1.25 μ L/ mL) or OVEO solution (40 – 0.312 μ L/ mL) were dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently 50 μ L of bacterial suspension (6 log CFU/mL) were added to each well. The microplate was loosely wrapped with cling wrap (Brand, City) to prevent bacterial dehydration and volatilization of the antimicrobials. Each plate also included controls without antimicrobials. The mixture was incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was confirmed as the lowest concentration capable of inhibiting visible bacterial growth after the incubation period. Sub-MICs of NaCl, LA and OVEO were used in assays of subsequent exposure to sub-lethal stressing conditions.

The sub-lethal temperature used to evaluate changes in thermo-tolerance was defined considering the results of preliminary assays. In those assays the strains were exposed to different temperatures in BHIB for 30 min based on preliminary prediction using the online Pathogen Modeling Program (United States Department of Agriculture Agricultural Research Service; <http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline>). A 30 min-exposure at 55 °C reduced counts of *S. Enteritidis* PT4, by approximately 3 log CFU/mL and *S. Typhimurium* PT4, by approximately 2 log CFU/g. Thus, 30 min at 55 °C was defined as the sub-lethal temperature for use in all experiments to assess changes in thermo-tolerance. Control experiments showed that 30 min at 58 °C reduce the counts of both strains by at least 6.5 log CFU/mL.

2.4 Preparation of ground chicken breast meat system

The effects of exposure to sub-lethal amounts of NaCl, LA or OVEO, as well as to sub-lethal heating temperatures, on bacterial tolerance were examined using ground chicken breast as cultivation substrate because test strains were originally isolated from chicken meat, and to simulate the conditions imposed to bacterial strains during chicken meat processing. The

chicken breast samples were obtained from a slaughterhouse located in city of Guarabira (Paraíba, Brazil) and were assessed for hygienic-sanitary conditions according to standard methods (APHA, 2001). The data obtained demonstrated a satisfactory sanitary quality and the absence of *Salmonella* spp. The average gross composition of the chicken breasts, determined according standard procedures (AOAC, 2012), was: moisture 73.5 g/ 100 g; ash 0.91 g/ 100 g; fat 4.64 g/ 100 g; and protein 21g/ 100 g. Refrigerated chicken breast samples (9 g) were ground using a domestic blender and maintained at refrigeration temperature in Stomacher bags (Vendor, city) (17.5 × 12.5 cm) for no longer than 2 days or until use in assays.

2.5 Subsequent stress exposure treatments in chicken breast

For the different stress exposure treatments, nine g samples of refrigerated (12 °C) ground chicken breast meat were added of 1 mL of the mixed inoculum (approximately 8 log CFU/mL) and hand-shaken for 1 min. Each inoculated chicken breast sample was exposed to cold stress (5 °C) during 5 h and subsequently exposed to acid, osmotic or OVEO stress, based on the experimental design shown in **Table 1**. Changes in thermo-tolerance were assessed by exposure to 55 °C for 30 min after the application of each sequential-stress treatment. The change in thermo-tolerance in each step was assessed by enumerating viable cells. The enumeration procedure used 40 mL-aliquots of sterile saline solution (NaCl, 0.85%) added to the stomach bag containing the ground chicken breast subjected to the treatment. The samples were gently hand-shaken for 1 min and diluted (10^{-1} – 10^{-4}) in sterile saline solution. Twenty µL-aliquots of each dilution were dispensed in Petri dishes containing BHIA supplemented with nalidixic acid (30 µg/mL), for counting *Salmonella* Enteritidis PT4 and in BHIA supplemented with tetracycline (30 µg/mL), for counting *Salmonella* Typhimurium PT4, using the micro-drop inoculation technique (Herigstad, Hamilton & Heersink, 2011). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Control samples (containing cells not exposed to sub-lethal stress and

incubated over the same time-interval at 12 °C in chicken breast or at 37 °C in BHIB) were assayed similarly. The results were expressed as log CFU/g.

2.6 Viability of survivors (*persister cells*) during simulated gastrointestinal conditions

Survivors from subsequent sub-lethal stress treatments (*persister cells*) presenting or not increased thermo-tolerance of *S. Enteritidis* (T1 and T2) and *S. Typhimurium* PT4 (T1 and T3) (**Table 1**). Samples were prepared in sterile flasks (50 mL) containing chicken breast and the inoculum suspension (viable counts obtained at the end of the thermo-tolerance assays). The simulated gastrointestinal conditions are shown in **Table 3** including the compounds utilized, their concentrations, the exposure period and the intensity of stirring (used to simulate peristaltic movements). The overall working volume increased during simulated digestion (as happens during actual digestion) from the initial 9 g chicken breast sample (Madureira et al., 2011). All of the enzyme solutions were freshly prepared and filter-sterilized using a 0.22 µm membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to use; after sterilization, all of the solutions were maintained in an ice bath during the entire period of simulation prior to their gradual addition (when appropriate). An incubation chamber (at 37 °C) was used to simulate the temperature of the human body, and mechanical agitation was used to mimic peristaltic movements, with intensities resembling those attained in each digestive compartment. The pH of each sample was measured continuously with a pH meter (Model 021/15; Quimis, São Paulo, Brazil) that was periodically sanitized with ethanol (90 mL/100 mL). A 100 µL-aliquot of the mixture in each gastrointestinal compartment was aseptically collected and serially diluted (10^{-1} – 10^{-4}) using sterile saline solution (NaCl, 0.85%) after each artificial digestion step. Viable cells counts of each strain were performed using the microdrop inoculation technique as described above. Control mixtures containing the inoculum of cells not exposed to stress conditions (cultivated in ground chicken breast at 12 °C) were assayed similarly in ground

chicken breast and BHIB. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The results were expressed as log CFU/g.

2.7 Reproducibility and validation of data

All assays were performed in triplicate in three independent experiments (repetitions), and the results are expressed as average and standard deviation. Statistical analysis to determine significant differences in viable cell counts (log CFU/mL or log CFU/g) ($p < 0.05$) was performed using ANOVA followed by Tukey's test and T test. For this, the Sigma Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, USA) was used.

3. Results

3.1. Changes in tolerance during exposure to stress conditions

Viable cell counts over time of *S. Enteritidis* PT4 (*S. Enteritidis*) and *S. Typhimurium* PT4 (*S. Typhimurium*) when cultivated at optimal conditions in BHIB during exposure to different stress (41 h) at 37 °C are shown in **Fig. 1**. As predicted in *Salmonella* spp. models, an increase ($p < 0.05$) of approximately 2.5 log CFU/mL was observed for both, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, after 23 h of cultivation in BHIB, with no increases in the further time intervals assessed (41h).

The viable cell counts (viable counts) of *S. Enteritidis* (A), *S. Typhimurium* (B) in ground chicken breast after exposure to subsequent stress treatments are shown in **Fig. 2**. The 5 h-exposure to cold stress (5 °C) caused a decrease ($p < 0.05$) in initial viable counts of *S. Typhimurium*, (**Fig. 2B**) while no reduction ($p > 0.05$) was observed in *S. Enteritidis*. Cells incubated at 12 °C (control) for the same period increased ($p < 0.05$) initial viable counts over time (**Fig. 2A**). In subsequent exposure to acid stress for 18 h (lactic acid at 5 μ L/g and 2.5 μ L/g) both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* showed increases ($p < 0.05$) in viable counts of

approximately 1.0 log CFU/g (T1 and T2), which were similar ($p > 0.05$) to those observed in control systems (**Fig. 2A-B**).

When *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* were exposed to subsequent cold, acid and osmotic stress (T1 to T4), no decreases ($p > 0.05$) in viable counts was observed (**Fig 2A-B**). However, the exposure to osmotic stress without previous exposure to acid stress (T5 and T7) caused a salt-concentration dependent decrease ($p < 0.05$) of up to 1.6 log CFU/g and 1.4 log CFU/g for *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, respectively (**Fig 2A-B**). No changes ($p > 0.05$) in viable counts were observed in control systems incubated under refrigeration temperature for the same time interval (**Fig 2A-B**).

The exposure to cold stress followed by subsequent exposure to only OVEO (T17 and T18), as well as to subsequent cold, OVEO and acid stress (T11 and T15) or OVEO and osmotic stress (T12 and T16) caused reductions ($p < 0.05$) in viable counts of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (**Fig. 3A-B**). Interestingly, when cells were subsequently exposed to cold, acid and OVEO stress (T9 and T13) or only to osmotic stress (T10 and T14), the greatest ($p < 0.05$) decreases in viable counts were observed for both strains tested, which reached reduction of 2 log CFU/g (T10) (**Fig. 3A-B**).

S. Enteritidis cells subsequently exposed to cold, acid and/or osmotic stress showed increased ($p \leq 0.05$) thermo-tolerance (T1 to T8) (**Table 2**). When control cells (non-previously exposed cells) were exposed to 55 °C for 30 min, a decrease of viable counts ≥ 3.5 log CFU/g was observed, while a decrease ≤ 1 log CFU/g was observed in cells previously exposed to stress factors (**Table 2**).

Similarly, *S. Typhimurium* cells subsequently exposed to cold, acid and/or osmotic stress increased ($p < 0.05$) the thermo-tolerance to 55 °C (**Table 2**). The decreases in control (non-exposed) cells was approximately 2.5 log CFU/g and only a reduction of 0.5 log CFU/g was observed for cells previously exposed to the stress factors when further exposed to 55 °C

(**Table 2**). *S. Typhimurium* showed higher ($p < 0.05$) thermo-tolerance than *S. Enteritidis* considering the decreases in viable counts observed in exposed and non-exposed cells (**Table 2**).

S. Enteritidis and *S. Typhimurium* cells subsequently exposed to cold, acid or salt and OVEO stress showed lower decreases in viable counts ($p < 0.05$) when exposed to sub-lethal temperature compared to non-exposed cells (**Table 2**). There was no change in thermo-tolerance as a resulting of sub-lethal temperature exposure in cells subsequently exposed to OVEO and acid or OVEO and salt stress (T9 to T16) (**Table 2**).

3.2. Survival of cells exposed to simulated gastrointestinal conditions

Considering the results (increase or no-increase) in thermo-tolerance assays after subsequent exposure to sub-lethal stress conditions, the survival of persister cells from selected treatments were monitored during exposure to simulated gastrointestinal conditions were assessed. At the beginning of the *in vitro* digestive process (time zero, before exposure to the experimental mouth conditions), the viable counts of cells inoculated into BHIB and chicken breast were approximately 6.0 log CFU/mL and 5.7 log CFU/g, respectively, for *S. Enteritidis*, and approximately 6.1 log CFU/mL and 5.7 log CFU/g, respectively, for *S. Typhimurium*. Both, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* strains maintained higher ($p < 0.05$) viable counts when inoculated into breast chicken than in BHIB after the 32-min of exposure to simulated esophagus–stomach conditions (4th digestive step), as well as in the successive steps comprising the simulated digestive process (**Table 3**). Viable counts < 2 log CFU/mL were observed after the exposure to simulated esophagus–stomach conditions (7th digestive step; pH 2.0) for cells cultivated in BHIB, while viable counts > 2.0 log CFU/g were detected in ground breast chicken until the end of the *in vitro* digestion (after the 9th step) for both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (**Table 3**).

The induced-thermo-tolerance did not influence ($p > 0.05$) the capability of persister cells to survive under simulated gastrointestinal conditions in both strains tested. Viable counts in T1 did not differ ($p > 0.05$) from T2 for *S. Enteritidis* or from T3 for *S. Typhimurium* (**Table 3**).

The exposure to experimental mouth conditions (1st digestive step, pH 6.9) did not decrease ($p > 0.05$) the viable counts of *S. Enteritidis* persister or control cells inoculated in ground chicken breast (**Table 3**). Exposure to 10-minutes of pepsin in the first step of the simulated esophagus–stomach conditions (2nd digestive step, pH 5.5) did not affect the persister cells, however it did cause a decrease ($p < 0.05$) of viable counts up to 1.3 log CFU/g in control cells (**Table 3**). After 52 min of exposure to simulated esophagus–stomach conditions (after 5th digestive step; pH 2.8) control cells showed higher ($p < 0.05$) decreases in viable counts compared to persister cells (**Table 3**). After exposure to pH 2.3 during the 6th digestive step (esophagus–stomach condition) the control cells showed reductions of viable counts of approximately 2 log CFU/g, while no decreases ($p > 0.05$) were observed for persister cells (**Table 3**). In the last step of exposure to simulated esophagus–stomach conditions (7th digestive step, pH 2.0) no differences ($p > 0.05$) were observed in decreases of viable counts for persister or control cells (**Table 3**). The exposure to pancreatin + bile salts (simulated duodenum conditions; 8th digestive step) decreased ($p < 0.05$) the viable counts of control cells (approximately 1 log CFU/g) (**Table 3**). At the end of exposure to the gastrointestinal conditions (after simulated ileum condition; 9th digestive step) persister cells showed viable counts of up to 1.3 log CFU/g higher ($p < 0.05$) than those observed for the control cells (**Table 3**).

Similarly to what was observed for *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* persister cells from stress treatment T1 and T3 or control showed no decrease ($p > 0.05$) of viable counts after exposure to the simulated mouth conditions (1st digestive step, pH 6.9) (**Table 3**). The control

sample showed decrease in viable counts after the 5th digestive step (esophagus–stomach conditions, pH 2.8), while *S. Typhimurium* persister cells showed decrease ($p < 0.05$) in viable counts after 72-min of exposure to the simulated esophagus–stomach conditions (7th step digestive; pH 2.3) (**Table 3**). The exposure to pancreatin + bile salts (simulated duodenun conditions; 8th digestive step) caused a greater ($p < 0.05$) decrease in counts of control cells compared to persister cells. After the last step of the *in vitro* digestion, the viable counts of persister cells was approximately 1.2 log CFU/g higher ($p < 0.05$) than that observed for the control cells.

4. Discussion

S. Enteritidis and *S. Typhimurium* are among the serovars more tolerant to stress conditions, such as thermal, acid and osmotic stress (Spector & Kenyon, 2012). Strains of these serovars involved in diseases etiology present a dynamic interaction within host and with the environment (Yang et al., 2014; Monte et al., 2014) explaining their high prevalence as causing agents in human outbreaks. The exposure to cold stress decreased the viable counts of *S. Typhimurium* and did not affect the viable counts of *S. Enteritidis* in the present study. A previous study reported maintenance of cell viability for a 78-weeks period in freezing-temperature for *S. enterica* in raw pork (Escartín, Lozano & García, 2000). The ability of *S. enterica* to survive in low temperatures have been related to cold shock proteins (CSPs), synthesized during the acclimation phase with subsequently recovery of the growth (Shah et al., 2013). However, the time required for this response to cold stress vary among *Salmonella* serovars (Álvarez-Ordóñez et al., 2009; Shah et al., 2013). *Salmonella* cells cultivated under refrigeration temperature (12 °C) showed lower viable counts compared to those under optimal condition (BHIB) over time. This growth delay was probably related with extended lag phases

of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* exposed to refrigeration temperature as previously reported (Horton et al., 2000).

Viable counts of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* increased after exposure to cold and acid stresses. The exposure of *S. enterica* to cold stress could induce the activation of systems associated with the maintenance of pH homeostasis in acidic conditions (Lee et al., 1995; Xu, Lee & Ahn, 2008; Shah et al., 2013). The exposure to cold and acid stresses in the current study increased the tolerance of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* to osmotic stress, suggesting an inducing-tolerance effect. The tolerance of bacterial pathogens to osmotic stress results from their capability to accumulate compatible solutes to equilibrate osmotic changes (Bremer & Kramer, 2000; Sleator & Hill, 2002; Begley & Hill, 2015). Previous studies reported that *S. Typhimurium* cells exposed to acid conditions became more tolerant to NaCl-salt (Koutsomanis & Sofos, 2004; Tosun & Gonul, 2003). Overall, changes on cell membrane fluidity as a results of alterations in the unsaturated fatty acids and saturated fatty acids ratio were cited as a strategy used by *Salmonella* cells exposed to sub-lethal stressing conditions, including cold (Yang et al., 2014) and high-salt or acidic environments (Álvarez-Ordóñez et al. 2008; Alonso-Hernando, Alonso-Calleja & Capita, 2010).

The absence of induction of acid or osmotic tolerance exposure to OVEO in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* following the exposure to acid/osmotic stress are in accordance with findings of a previous study (Monte et al., 2014). OVEO, even at sub-MIC amounts, can affect the cell wall structure and increase membrane permeability in *S. Typhimurium* (Oliveira et al., 2015). These alterations could have affected the osmoregulation capability of membrane or its capacity to extrude toxic materials and therefore increased the sensitivity of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* cells to acid or osmotic stress, as observed in the present study. Similar results were observed when cells either strain tested were subsequently exposed to acid or osmotic stress and then to OVEO. Thus, it could be possible that a previous stress exposure

may have facilitated the action of OVEO on intracellular targets cell, such as enzymes involved in protein synthesis (Luz et al., 2012; Espina et al., 2013).

Exposure to cold, acid and/or osmotic and/or OVEO stresses increased the thermo-tolerance in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. The mechanisms involved in thermo-tolerance stress responses in *Salmonella* are not well understood, and specific genes/proteins activated may be different between the different serovars (Spector & Kenyon, 2012). There is evidence that heat shock proteins (HSP) and sigma factors (σ^S) are molecular mediators of the *Salmonella* response to heat (Xu, Lee & Ahn, 2008; Milillo, Martin, Muthaiyan, & Ricke, 2011; Sirsat et al., 2011). According prior research, adaptation to moderate acid condition increases the tolerance of *S. Typhimurium* cells to high temperatures (Leyer & Johnson, 1993; Bacon et al., 2003). Similarly, exposure to NaCl increases the thermo-tolerance in *S. enterica* serovars (Peña-Meléndez, Perry & Yousef, 2014). The higher thermo-tolerance of *S. Typhimurium* relative to *S. Enteritidis* as observed in the present study was recently associated with the expression of *rpoE*, *rpoH* and *htrA* genes present in the former (Yadav et al., 2016).

The higher viability of persister cells of both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* during the *in vitro* digestion in ground breast chicken compared to BHIB was probably a result of protective effects of this food matrix (e.g. from protein and fat). The availability of nutrients might facilitate the faster recover of damaged bacterial cells (Álvarez-Ordóñez et al, 2011). The solid nature of ground chicken breast might also help to protect bacterial cells during exposure to the stomach and intestinal conditions (Meira et al., 2015). It has been suggested that solid foods rich in fat and protein can protect *Salmonella* against stomach acidity (Waterman & Small, 1998). Persister cells showed a higher tolerance to simulated gastrointestinal conditions than control cells, particularly during exposure to the digestive steps with highest levels of acidity for *S. Enteritidis* (pH 2.8–2.0) and for *S. Typhimurium* (pH 2.3–2.0). This higher tolerance is likely related to the previous exposure to acid stress, since according Yuk &

Schneider (2006) exposure to moderate acidic conditions can trigger resistance to acidic gastric fluids in *S. enterica* and consequently increase the risk and severity of illness.

Persister cells of both strains showed higher tolerance to bile salts than control cells during the exposure to simulated duodenum conditions. *Salmonella* is reported to be tolerant to bile salts and able to survive exposure to gastrointestinal fluids (Van Velkinburgh & Gunn, 1999); however, a prior challenge to stress conditions might also enhance the survival in host gastrointestinal environment (Álvarez-Ordóñez et al., 2011). Overall, persister cells showed higher viable counts than control cells, which mean higher probability of infection (Fehlhaber & Janetschke, 1995).

5. Conclusion

The results of this study showed that exposure to cold and acid stress increase the tolerance of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 inoculated in chicken breast to osmotic stress. Subsequent exposure to cold, acid and osmotic stresses increases the thermo-tolerance in these same strains. Still, exposure to sub-lethal stress conditions enhances the survival of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 on chicken breast under gastrointestinal conditions. Therefore, these results suggest that subsequent exposure to some stress conditions used during chicken meat processing may help the survival of *Salmonella* within the host or in the environment.

Acknowledgments

The authors thank the CNPq-Brazil by financial support and CAPES-Brazil for the scholarship awarded for the first author A.N.F.Melo.

References

- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal Food Microbiology*, 137, 130–136.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., & López, M. (2009). Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Science*, 81, 65–70.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R., & Bernardo, A. (2008). Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *International Journal Food Microbiology*, 123, 212–219.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M. (2011). The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45, 482-492.
- American Public Health Association - APHA. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA. 676p.
- AOAC. (2012). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (18th eds.). Washington. DC USA.

- Bacon, R. T., Ransom, J. R., Kendall, P. A., Belk, K. E., & Smith, G. C. (2003). Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial-resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4123-4128.
- Begley, M., & C. Hill. (2015). Stress adaptation in foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 191-210.
- Beney, L., & Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 34-42.
- Bremer, E., & Kramer, R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *In Bacterial Stress Responses*, pp. 79-97. Edited by G. Storz & R. Hengge-Aronis. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- CDC. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States (2015). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em 24 de janeiro de 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational vol. 32, document M100-S22. Wayne, PA: CLSI/NCCLS.

- Escartín, E. F., Lozano, J. S., & García, O. R. (2000). Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 19-25.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B.M., & Pagán, (2013). R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 23-30.
- Ferrari, R. G., Galiana, A., Cremares, R., Rodríguez, J. C., Magnani, M., Tognim, M. C. B., Oliveira, T. C. R. M., & Royo, G. (2013). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella enterica* strains from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso), 44, 657-662.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J., (2011). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 121–129.
- Horton, A. J., Hak, K. M., Steffan, R. J., Foster, J. W., & Bej, A. K. (2000). Adaptive response to cold temperatures and characterization of *cspA* in *Salmonella typhimurium* LT2. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77, 13-20.
- Kottwitz, L. B. M., Scheffer, M. C., Costa, L. M. D., Farah, S. M. F. F., Magnani, M., Oliveira, T. C. R. M. (2011). Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1026-1031.

- Koutsomanis, K. P., & Sofos, J. N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 321-326.
- Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson, B., & Foster J. W. (1995). The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 17, 155–167.
- Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 41- 46.
- Leyer G. J., & Johnson E. A. (1993). Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1842–1847.
- Luz, I. S., Gomes-Neto, N. J., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., & Souza, E. L. (2012). Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5021-5024.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465-470.

- Majtanova, L., Majtan, J., & Majtan, V. (2011) Trends in phage types of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated in Slovakia from 1995 to 2009. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69, 454–456.
- Meira, Q. G. S., Magnani, M., Júnior Medeiros, F. C., Queiroga, R. C. R. E., Madruga, M. S. Gullón, B., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. E., & Souza, E. L. (2015). Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 76, 828-838.
- Milillo, S. R., Martin, E., Muthaiyan, A., & Ricke, S. C. (2011). Immediate reduction of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium following exposure to multiple-hurdle treatments with heated, acidified organic acid salt solutions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3765–3772.
- Monte, D. F. M., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C. R. M., Franco, O. L., Souza, E. L., & Magnani, M. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1- 6.
- Nielsen, M. B., Knudsen, G. M., Danino-Appleton, V., Olsen, J. E., & Thomsen, L. E. (2013). Comparison of heat stress responses of immobilized and planktonic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology*, 33, 221-227.

- Oliveira, K. A. R., Sousa, J. P., Medeiros, J. A. C. Figueiredo, R. C. B. Q., Magnani, M., Siqueira Junior, J. P., & Souza, E. L. (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food control*, 47, 334-339.
- Oliveira, M., Wijnands, L., Abadias, M., Aarts, H., & Franz, E. (2011). Pathogenic potential of *Salmonella* Typhimurium DT104 following sequential passage through soil, packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 149-155.
- Penã-Meléndez, M., Perry, J. J., & Yousef, A. E. (2014). Changes in Thermal Resistance of Three *Salmonella* serovars in response to osmotic shock and adaptation at water activities reduced by different humectants. *Journal of Food Protection*, 77, 914–918.
- Rowlands, R. E., Ristori, C.A., Ikuno, A. A., Barbosa, M.L., Jakabi, M., & Franco, B. D. (2014). Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine*, 56, 461-467.
- Shah, J., Desai, P.T., Chen, D., Stevens, J. R., & Weimer, B. C. (2013). Preadaptation to cold stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 7281-7289.

- Sirsat, S. A., Burkholder, K. M., Muthaiyan,, A., Dowd, S. E. Bhunia, A. K., & Ricke, S. C. (2011). Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 813–822.
- Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 49–71.
- Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45, 455–481
- Tosun, H., & Gönül, S. A. (2003). “Acid adaptation protects *Salmonella* Typhimurium from environmental stresses”. *Turkish Journal of Biology*, 27, 31-36.
- Van Velkinburgh, J. C., & Gunn, J. S. (1999). PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 67, 1614–1622.
- Waterman, S. R., & Small, P. L. C. (1998). Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3882–3886.
- Xu, H., Lee, H. Y., & Ahn, J. (2008). Cross protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 290-297.

- Yadav, A. S., Saxena G. K., Saxena V. K., & Kataria, J. M. (2016). Study on heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 114-121.
- Yang, Y., Khoo, W. J., Zheng, Q., Chung, H. J., & Yuk, H. G. (2014). Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 102–109.
- Yuk, H.G., & Schneider, K.R. (2006). Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology*, 23, 694-700.

Figure Captions

Fig. 1. Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (●), *S. Typhimurium* PT4 (□) in Brain Heart Infusion broth at 37 °C in different time-intervals assessed for stress treatments.

Fig. 2. Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (A), *S. Typhimurium* PT4 (B) in ground chicken breast meat after exposure to subsequent stress treatments. (●): Control; (■): T1: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (▲): T2: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (▼): T3: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (◆): T4: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (□): T5: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (Δ): T6: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); non exposure (18 h); (▽): T7: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); (◇): T8: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); non exposure (18 h); Quantification limit of the test: 2.0 log CFU/g.

Fig. 3. Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 (A), *S. Typhimurium* PT4 (B) in ground chicken breast meat after exposure to subsequent stress treatments. (●): Control; (■): T9: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (▲): T10: (cold stress (5 h); NaCl 75 mg/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (▼): T11: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); acid 5 µL/g (18 h); (◆): T12: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); (○): T13: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); (□): T14: cold stress (5 h); NaCl 37.5 mg/g; OVEO 0.625µL/g (18 h); (Δ): T15 cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); acid 2.5 µL/g (18 h); (▽): T16: cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/ (18 h); (◇): T17: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); (*): T18: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); Quantification limit of the test: 2.0 log CFU/g.

Table 1. Sub-lethal stress treatments and respective conditions used during exposure of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 in ground chicken breast.

Treatment	Stress 1 18h-exposure	Stress 2 18h-exposure
T1	Latic acid 2.50 µL/g	NaCl 37.50 mg/g
T2	Latic acid 5.00 µL/g	NaCl 75.00 mg/g
T3	Latic acid 5.00 µL/g	NaCl 37.50 mg/g
T4	Latic acid 2.50 µL/g	NaCl 75.00 mg/g
T5	ne*	NaCl 75.00 mg/g
T6	Latic acid 5.00 µL/g	ne*
T7	ne*	NaCl 37.50 mg/g
T8	Latic acid 2.50 µL/g	ne*
T9	Latic acid 5.00 µL/g	OVEO 1.25 µL/g
T10	NaCl 75.00 mg/g	OVEO 1.25 µL/g
T11	OVEO 1.25 µL/g	Latic acid 5.00 µL/g
T12	OVEO 1.25 µL/g	NaCl 75.00 mg/g
T13	Latic acid 2.50 µL/g	OVEO 0.62 µL/g
T14	NaCl 37.5 mg/g	OVEO 0.62 µL/g
T15	OVEO 0.62 µL/g	Latic acid 5.00 µL/g
T16	OVEO 0.62 µL/g	NaCl 37.50 mg/g
T17	ne*	OVEO 1.25 µL/g
T18	ne*	OVEO 0.62 µL/g

ne*: non exposed.

Table 2. Viable cell counts of *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* PT4 subsequently exposed to sub-lethal stress treatments, before and after exposure to 55 °C during 30 minutes in ground chicken breast.

Treatments	<i>S. Enteritidis</i> PT4		<i>S. Typhimurium</i> PT4	
	Before exposure	After exposure	Before exposure	After exposure
	(log CFU/g)	(log CFU/g)	(log CFU/g)	(log CFU/g)
Control	7.55 ± 0.11 ^a	4.01 ± 0.08 ^b	7.35 ± 0.10 ^a	4.85 ± 0.07 ^b
T1	6.19 ± 0.08 ^a	5.17 ± 0.05 ^b	6.02 ± 0.04 ^a	6.00 ± 0.03 ^a
T2	6.08 ± 0.06 ^a	6.07 ± 0.10 ^a	6.08 ± 0.02 ^a	6.07 ± 0.04 ^a
T3	6.05 ± 0.07 ^a	5.96 ± 0.05 ^a	6.31 ± 0.03 ^a	5.80 ± 0.02 ^a
T4	6.18 ± 0.09 ^a	6.09 ± 0.07 ^a	6.18 ± 0.05 ^a	6.09 ± 0.04 ^a
T5	4.28 ± 0.10 ^a	4.10 ± 0.08 ^a	4.28 ± 0.05 ^a	4.10 ± 0.04 ^a
T6	6.22 ± 0.03 ^a	6.05 ± 0.07 ^a	6.22 ± 0.01 ^a	6.05 ± 0.03 ^a
T7	4.67 ± 0.07 ^a	4.29 ± 0.04 ^a	4.67 ± 0.03 ^a	4.29 ± 0.04 ^a
T8	6.18 ± 0.07 ^a	6.09 ± 0.05 ^a	6.18 ± 0.07 ^a	6.09 ± 0.06 ^a
T9	5.13 ± 0.05 ^a	5.01 ± 0.04 ^a	5.53 ± 0.04 ^a	5.47 ± 0.03 ^a
T10	4.10 ± 0.09 ^a	3.75 ± 0.03 ^a	3.57 ± 0.02 ^a	3.22 ± 0.03 ^a
T11	4.57 ± 0.08 ^a	4.17 ± 0.04 ^a	4.39 ± 0.03 ^a	3.98 ± 0.04 ^a
T12	4.48 ± 0.10 ^a	4.12 ± 0.09 ^a	4.40 ± 0.06 ^a	4.21 ± 0.05 ^a
T13	5.55 ± 0.06 ^a	5.46 ± 0.07 ^a	5.91 ± 0.02 ^a	5.54 ± 0.04 ^a
T14	4.38 ± 0.07 ^a	4.36 ± 0.02 ^a	4.08 ± 0.04 ^a	3.95 ± 0.06 ^a
T15	5.03 ± 0.04 ^a	4.75 ± 0.05 ^a	4.69 ± 0.08 ^a	4.56 ± 0.06 ^a
T16	4.90 ± 0.03 ^a	4.57 ± 0.04 ^a	4.65 ± 0.01 ^a	4.24 ± 0.03 ^a
T17	5.45 ± 0.02 ^a	4.65 ± 0.03 ^b	5.06 ± 0.02 ^a	4.49 ± 0.02 ^b
T18	5.55 ± 0.09 ^a	4.58 ± 0.09 ^b	5.03 ± 0.03 ^a	4.79 ± 0.02 ^a

Before of exposure: viable cell counts obtained after subsequent sub-lethal stress exposure to to different treatments: Control: non exposure; T1: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T2: cold stress (5 h); acid 5µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T3: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T4: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T5: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T6: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); non exposure (18 h); 55 °C (30 min); T7: cold stress (5 h); non exposure (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); T8: cold stress (5 h); acid 2.5µL/g (18 h); non exposure (18 h); 55 °C (30 min); T9: cold stress (5 h); acid 5 µL/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); T10: (cold stress (5 h); NaCl 75 mg/g (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); T11: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); acid 5 µL/g (18 h); T12: cold stress (5 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); NaCl 75 mg/g (18 h); T13: cold stress (5 h); acid 2.5 µL/g (18 h); OVEO 0.625 µL/g

(18 h); T14: cold stress (5 h); NaCl 37.5 mg/g; OVEO 0.625 µL/g (18 h); T15 cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); acid 2.5 µL/g (18 h); T16: cold stress (5 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/ (18 h); T17: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 1.25 µL/g (18 h); T18: cold stress (5 h); non exposure (18 h); OVEO 0.625 µL/g (18 h). After exposure: viable cell counts after exposure of 30 minutes to 55°C in ground chicken breast meat; Quantification limit of the test: 2.0 log CFU/g.

a – b: different superscript letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between the viable cell counts in different times obtained for both strains bacterial when assayed in chicken breast and exposed to 55 °C, according to the T test.

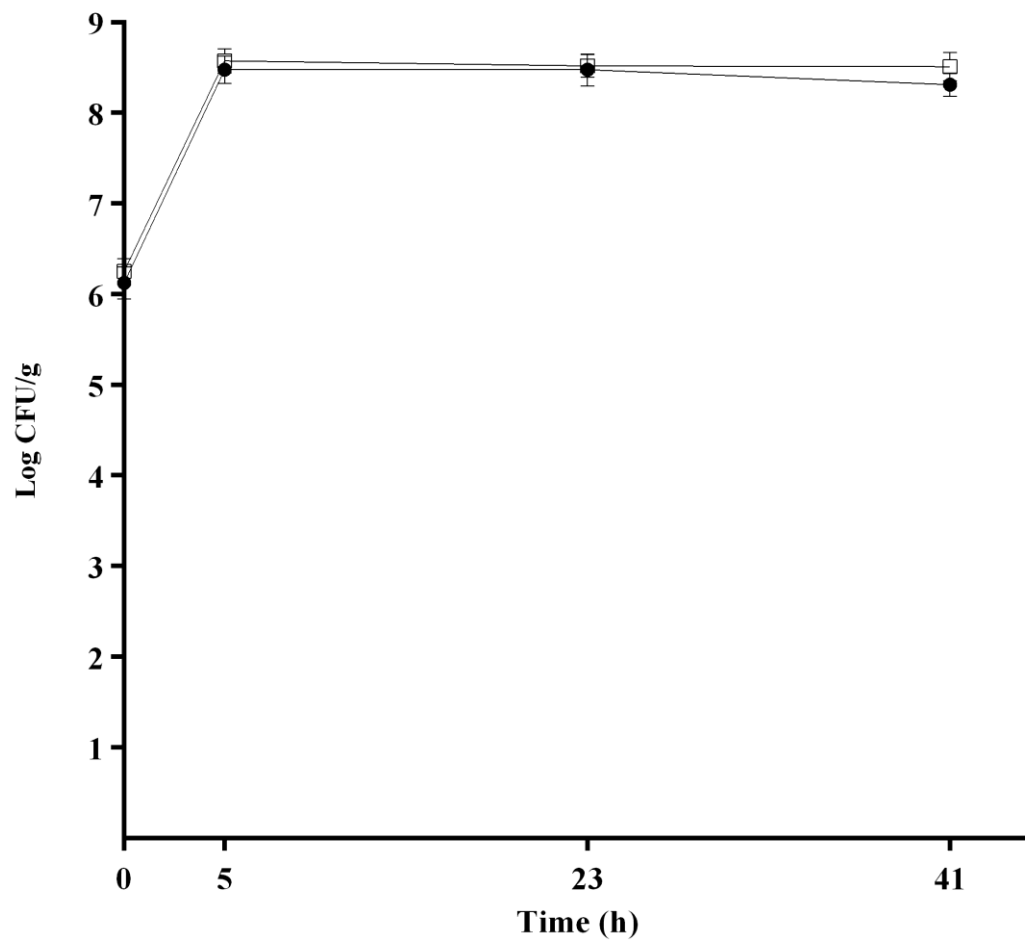
Table 3. The conditions used during each step of the simulated gastrointestinal and the obtained viable cell counts.

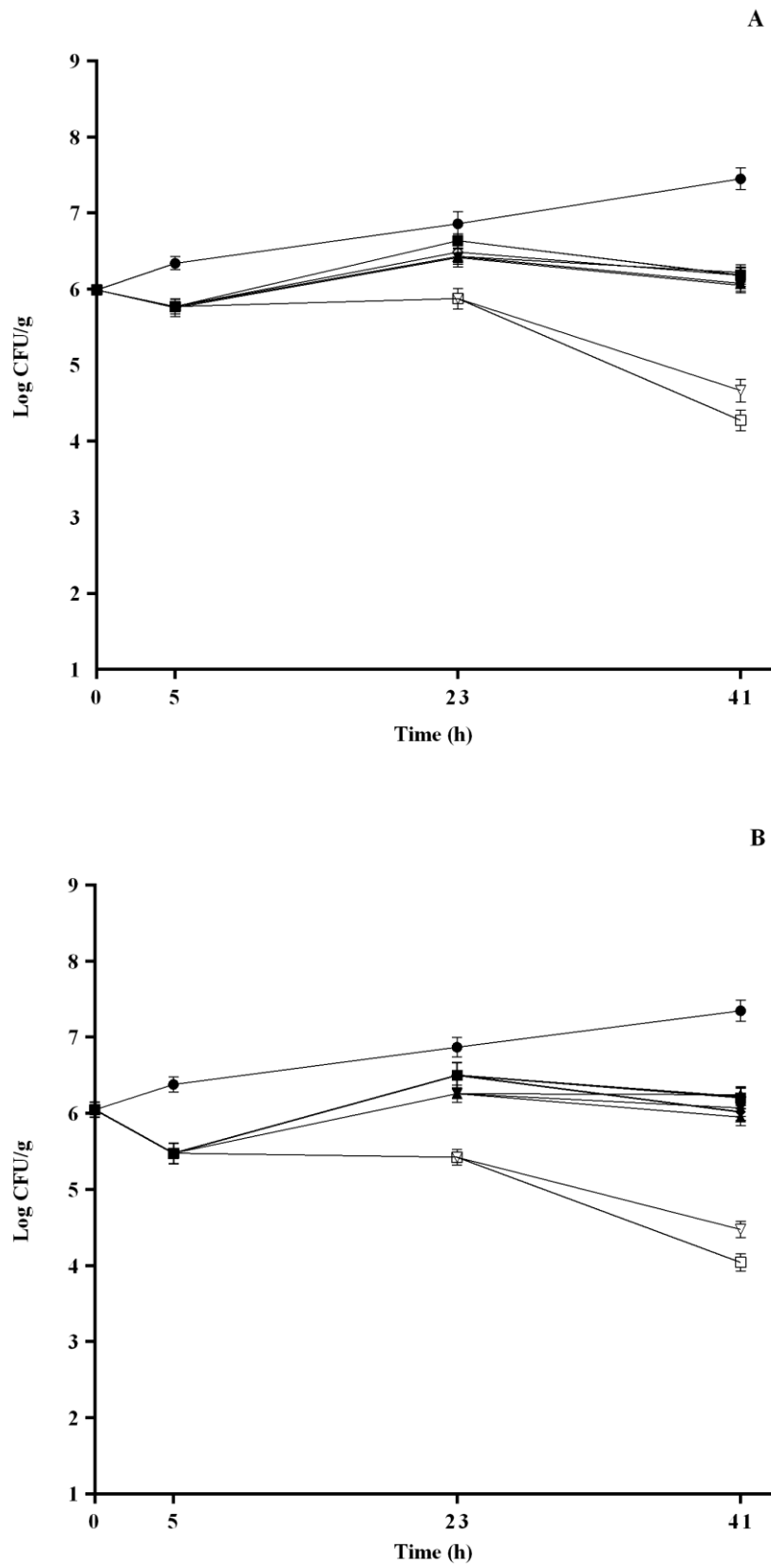
Steps	Compartments	Conditions	Stirring (rpm)	Final pH	Time of exposure (min)	Viable cell counts (in log cfu/g)							
						S. Enteritidis				S. Typhimurium			
						Growth media	Chicken Breast	T1	T2	Growth media	Chicken Breast	T1	T3
1	Before simulation	-	-	-	-	6.0 (±0.2) ^a	5.7 (±0.1) ^{ab}	5.3 (±0.2) ^b	6.0 (±0.2) ^a	6.1 (±0.1) ^a	5.7 (±0.1) ^a	6.0 (±0.2) ^a	5.8 (±0.2) ^a
2	Mouth	Saliva	200	6.9	2	6.0 (±0.2) ^a	5.6 (±0.3) ^{ab}	5.3 (±0.3) ^b	5.8 (±0.1) ^a	5.9 (±0.2) ^a	5.6 (±0.2) ^a	5.7 (±0.2) ^a	5.9 (±0.1) ^a
3	Esophagus– stomach	Pepsin	130	5.5	10	4.7 (±0.2) ^b	5.7 (±0.1) ^a	5.7 (±0.2) ^a	5.7 (±0.2) ^a	5.8 (±0.1) ^a	5.5 (±0.2) ^a	5.6 (±0.2) ^a	5.7 (±0.2) ^a
4				4.6	10	4.5 (±0.3) ^b	5.7 (±0.2) ^a	5.9 (±0.2) ^a	5.4 (±0.1) ^a	5.4 (±0.3) ^a	5.6 (±0.2) ^a	5.8 (±0.2) ^a	5.6 (±0.3) ^a
5				3.8	10	4.3 (±0.2) ^b	5.4 (±0.2) ^a	5.7 (±0.1) ^a	5.0 (±0.3) ^a	4.7 (±0.2) ^b	5.4 (±0.3) ^a	5.6 (±0.2) ^a	5.7 (±0.2) ^a
6				2.8	20	2.6 (±0.2) ^c	4.3 (±0.3) ^b	5.4 (±0.1) ^a	5.3 (±0.2) ^a	2.9 (±0.1) ^c	5.3 (±0.2) ^a	5.2 (±0.3) ^a	5.6 (±0.2) ^a
7				2.3	20	2.1 (±0.2) ^e	3.0 (±0.1) ^d	4.4 (±0.2) ^a	4.3 (±0.2) ^a	2.0 (±0.1) ^e	3.3 (±0.4) ^{cd}	3.9 (±0.2) ^{ab}	3.5 (±0.2) ^{bc}
8				2.0	20	< 2 (±0.0)	2.3 (±0.3) ^c	3.2 (±0.2) ^b	3.7 (±0.1) ^a	< 2 (±0.0)	2.4 (±0.2) ^c	3.4 (±0.1) ^{ab}	3.1 (±0.1) ^a
9	Duodenum	Pancreatin + bile salts	45	5.0	30	< 2 (±0.0)	2.1 (±0.2) ^c	3.0 (±0.1) ^b	3.9 (±0.1) ^a	< 2 (±0.0)	2.1 (±0.2) ^c	3.1 (±0.1) ^b	3.1 (±0.2) ^b
10	Ileum		45	6.5	60	< 2 (±0.0)	2.2 (±0.1) ^b	3.4 (±0.2) ^a	3.5 (±0.1) ^a	< 2 (±0.0)	2.3 (±0.2) ^b	3.6 (±0.2) ^a	3.5 (±0.2) ^a

Growth media: cells assayed in brain heart infusion (BHI) and non exposed to stress condition. Chicken breast: cells assayed in chicken breast an exposed to stress conditions.

T1: persisters cells from T1: cold stress (5 h); acid 2.5µL/g (18 h); NaCl 37.5 mg/g (18 h); 55 °C (30 min); persisters cell from T2: cold stress (5 h); acid 5µL/g (18 h); NaCl 75mg/g (18 h); 55 °C (30 min). T3: persisters cells from T3: cold stress (5 h); acid 5µL/g (18 h); NaCl 37.5mg/g (18 h); 55 °C (30 min).

a – d: different superscript letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between the viable cell counts obtained for both strains bacterial when assayed in BHI broth or into chicken breast and exposed to the same step of the experimental digestion, according to the Tukey's test.

**Fig 1**

**Fig 2.**

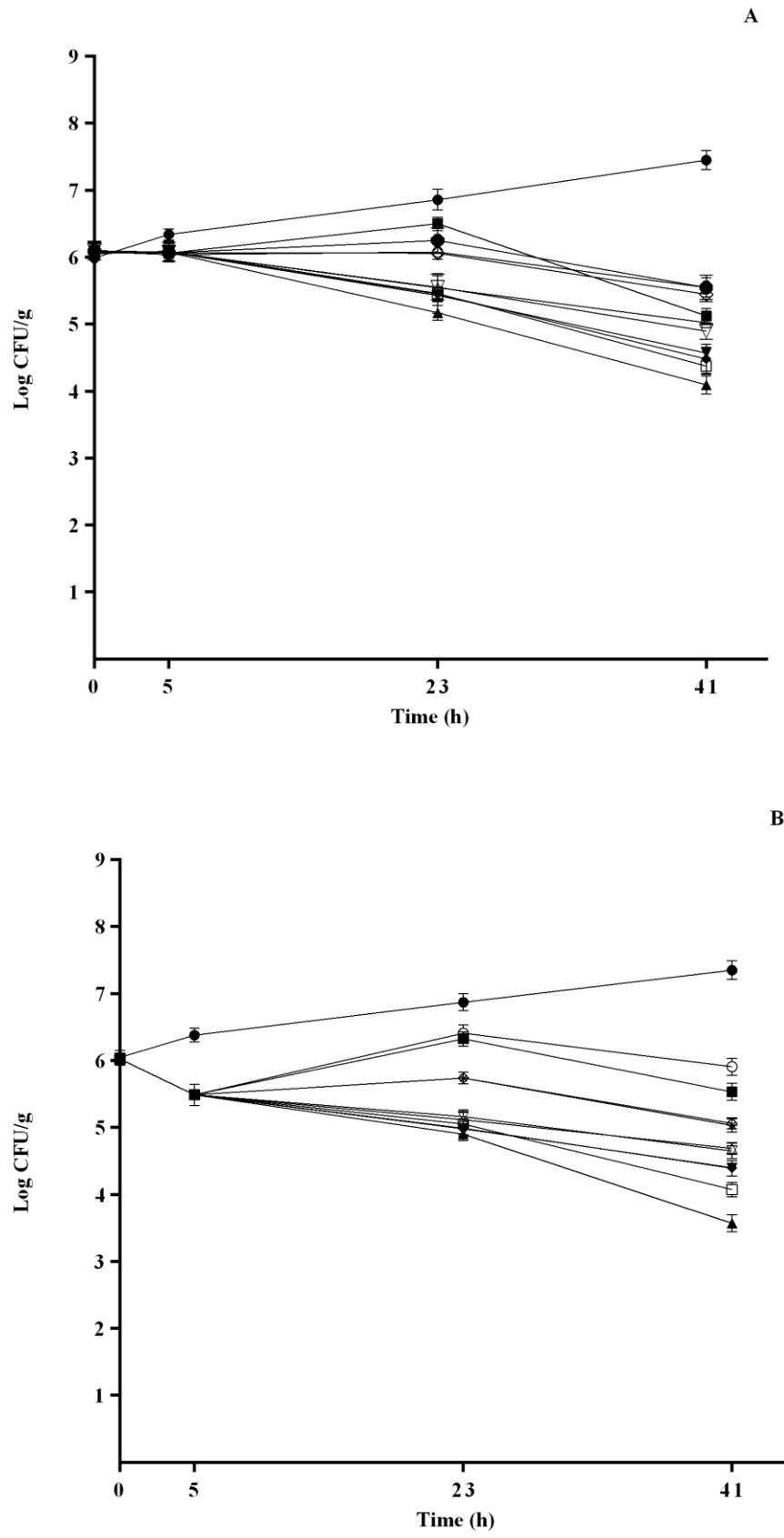


Fig. 3



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Changes in thermotolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions in *Salmonella* Enteritidis PT4 and S. Typhimurium PT4 after subsequent stress exposure in chicken breast

Authors:

Adma Nadja Ferreira de Melo a, Geany Targino de Sousa a, Donald Schaffnerb, Evandro Leite de Souza c, Marciane Magnania

Date Issued:

March 9, 2016

Certificate Verification Key:

5B2A-DE52-BBC5-D515-CC2F



This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.