

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Transições reversíveis de células de leveduras
entre estados viáveis, mas não cultiváveis (VBNC)
e estados viáveis e cultiváveis.

JUFNER CELESTINO VAZ TONI

Dissertação de Mestrado
2015



Instituto de Química

JUFNER CELESTINO VAZ TONI

TRANSIÇÕES REVERSÍVEIS DE CÉLULAS DE
LEVEDURAS ENTRE ESTADOS VIÁVEIS, MAS NÃO
CULTIVÁVEIS (VBNC) E ESTADOS VIÁVEIS E
CULTIVÁVEIS.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Cecilia Laluce**

Araraquara
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

T663t Toni, Jufner Celestino Vaz
Transições reversíveis de células de leveduras entre estados viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) e estados viáveis e cultiváveis / Jufner Celestino Vaz Toni – Araraquara - SP : [s.n], 2015
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cecília Laluce

1. Biocombustíveis. 2. Fermentação. 3. Leveduras. 4. Células germinativas. 5. *Saccharomyces cerevisiae*.
I. Título.

JUFNER CELESTINO VAZ TONI

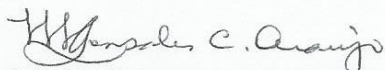
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de julho de 2015.

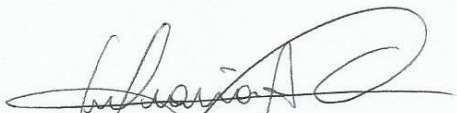
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. . CECÍLIA LALUCE (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP.



Profª. Drª. MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP.



Profª. Drª. JULIANA AUDI GIANNONI
Faculdade de Tecnologia e Alimentos / FATEC / Marília – SP.

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais:

Nome: Jufner Celestino Vaz Toni

Nome em citações bibliográficas: TONI, J. C. V.

Sexo: Masculino

Endereço Profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Instituto de Química (IQ)

Av. Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha – 14800-900

Araraquara-SP, Brasil.

Endereço eletrônico: jufner@hotmail.com

Formação acadêmica/ titulação:

- 2013 – atual** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química – IQ-UNESP, Brasil.
Título: Transições reversíveis das células de leveduras entre estados viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) e estados viáveis e cultiváveis.
Orientadora: Dra. Cecília Lalue.
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 2012 – 2013** Especialização em Gestão Ambiental
Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Brasil.
Título: Caracterização Física e Química dos Efluentes Líquidos Gerados na Indústria Alimentícia da Região de Marília-SP.
Orientador: Msc. Thiago Hernandez de Souza Lima
- 2012 – 2013** Especialização em Saúde Pública em Vigilância Sanitária
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.
Título: Gerenciamento de Resíduos Químicos em Laboratórios de Análises Químicas e Bromatológicas
Orientadora: Dra. Rosângela Aguilar da Silva
Bolsista da: Fundação do Desenvolvimento Administrativo.
- 2008 – 2011** Graduação em Tecnologia em Alimentos
Faculdade de Tecnologia em Alimentos- FATEC Marília/ SP, Brasil
Título: Reaproveitamento do Soro de leite bovino para produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* 229
Orientadora: Dra. Claudia Dorta.

Formação complementar

- 2014 – 2015** Extensão universitária em Inglês Instrumental
Interação Idiomas, Brasil.
- 2014 – 2014** Curso Responsabilidade Técnica
Conselho Regional de Química IV Região
- 2014 – 2014** Curso Análise de expressão gênica da plantas: qPCR.
Instituto de Biociências UNESP – Botucatu/SP, Brasil.
- 2011 – 2011** Extensão universitária em Óleos e Gorduras.
Faculdade de Tecnologia em Alimentos- FATEC Marília/SP, Brasil.

Atuação profissional

- 1. Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista - IQ-UNESP**
2013 – Atual
Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestrando em Biotecnologia.
- 2. Instituto Adolfo Lutz – IAL**
2012 – 2013
Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Especialização em Saúde Pública e Vigilância Sanitária.
- 3. Faculdade de Tecnologia em Alimentos - Fatec – Marília.**
2010 – 2011
Vínculo: Estagiário. Enquadramento funcional: Estagiário nos laboratórios de microbiologia e físico química.

Áreas de atuação

1. Ciências Biológicas / Microbiologia / Processos Fermentativos.
2. Ciências Biológicas / Microbiologia / Ciência e Tecnologia de Alimentos.
3. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia.
4. Ciências Biológicas / Microbiologia / Química

Idiomas

Português: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Espanhol: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Imamura, K.B.; **Toni, J.C.V.**; Giannoni, J.A. Ocorrência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L), beneficiado, no estado de São Paulo, no período de 2011 a 2012. *Analytica* (São Paulo), v. 75, p. 49-57, 2015.

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B.; Hernandez, T. Caracterização Física e Química dos Efluentes Líquidos Gerados na Indústria Alimentícia da Região de Marília-SP. *Analytica* (São Paulo), v. 69, p. 58-66, 2014.

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B.; Dorta, C. Reaproveitamento do soro de leite bovino para produção de Biomassa por *Kluyveromyces marxianus* 229.. *Revista Alimentus*, v. 2, p. 36-57, 2012.

Artigos aceitos para publicação

Imamura, K. B.; **Toni, J.C.V.**; Bocche, M.A.L.; Souza, D.A.; Giannoni, J.A. Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impresso), 2014.

Apresentação de trabalho

Toni, J.C.V., Lalluce, C. Reversible transitions of the yeast cells between viable but not culturable states (VBNC) and viable and culturable states, 2014. In: 2º BBEST, Campos do Jordão, SP.

Toni, J.C.V.; Silva, R.A.. Gerenciamento de Resíduos Químicos em Laboratório de Análises Químicas e Bromatológicas. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B.; Dorta, C.; Pereira, V.G.; Giannoni, J.A. Reaproveitamento do soro de leite bovino para produção de Biomassa por *Kluyveromyces Marxianus* 229. 2011. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Participação em eventos

1. Workshop de Sequenciamento de Nova Geração no IQ, UNESP, 2015.
2. Workshop em Empreendedorismo em Química e Biotecnologia, UNESP, 2014.
3. 29º REGEM - Reunião de Genética de Micro-organismos, 2014. (Encontro).
4. XV Workshop de Genética, UNESP. 2014.

5. XV Encontro Nacional de Micotoxinas. 2014. (Encontro).
6. Dia do Químico- Palestra "Óleos Essenciais". UNESP, 2014.
7. Dia do Químico- Palestra "O químico na Indústria de Alimentos". UNESP, 2014.
8. IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz - I Simpósio de Vigilância e Resposta Rápida. 2012. (Encontro).
9. Seminário de Biotecnologia Industrial III, de curta duração FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2011. (Seminário).
10. 1º Concurso de fotografias Biotech. In: III Seminário de Biotecnologia em Alimentos. Fatec-Marília. 2011. (Seminário).
11. Seminário de Biotecnologia II, de média duração. FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2010. (Seminário).
12. Simpósio de Tecnologia em Alimentos, V Fatecal. FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP.. 2010. (Simpósio).
13. Seminário de Biotecnologia I, curso de média duração FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2009. (Seminário).
14. Simpósio de Tecnologia em Alimentos IV Fatecal. FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2009. (Simpósio).
15. Simpósio de Tecnologia em Alimentos III FATECAL FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2008. (Simpósio).

Organização de eventos e congressos.

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B.; Bueno, F.R.; Góes-Favoni, S.P. III Seminário de Biotecnologia FATEC- Fac. de Tecnologia em Alimentos de Marília-SP. 2011. (Congresso).

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B. Projeto de Sustentabilidade; Impacto Zero, SWU- Start With You. Vencedores da 2ª etapa do concurso de sustentabilidade. 2011. (Festival).

*Ao meu pai Cláudio, a memória da minha mãe Alice e ao
meu irmão Julender, por terem me ensinado tudo o que
eles sabiam e terem me incentivado e apoiado sempre .*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Cecilia Laluece, pelos ensinamentos, confiança, oportunidade e respeito durante esses anos de trabalho.

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão por todo apoio, carinho, amor, incentivo, e conselhos que eles me deram todos esses anos.

Em especial a minha noiva Kely, por seu amor, carinho, dedicação, companherismo, paciência, por ter ficado ao meu lado durante todos esses anos me apoiando e me ajudando em tudo sempre.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e conselhos para enriquecer este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química e a todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

Aos amigos que fiz em Araraquara.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o período que estive desenvolvendo a pesquisa.

Resumo

RESUMO

Diversos estados fisiológicos têm sido descritos para células de levedura durante o cultivo, como células lesionadas, células mortas e células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC). No entanto, pouca atenção ainda é dada à formação de células viáveis, mas não cultiváveis em leveduras e seus impactos sobre o processo de fermentação. O estado VBNC, também conhecido como estado de “dormência celular” pode ser definido como um estado fisiológico em que os micro-organismos não são capazes de crescer em meios bacteriológicos, mas apresentam características de células vivas. Fatores químicos e ambientais têm sido relatados para induzir um estado VBNC, incluindo a falta de nutrientes, temperaturas extremas, concentrações osmóticas e oxigênio. As células de levedura no estado VBNC podem exercer influências sobre o rendimento de biocombustível gerado no final do processo. As leveduras industriais utilizadas neste estudo foram coletadas em uma usina sucroalcooleira localizada na cidade de Américo Brasiliense-SP-Brasil. Para fornecer evidências da existência de um estado VBNC em leveduras investigou-se a capacidade das células ao entrarem no estado VBNC, aplicando estresse térmico (40°C) e osmótico (30% de sacarose). Populações viáveis foram monitoradas utilizando o corante azul de metileno, e as populações cultiváveis foram identificadas por semeadura em meio de cultura. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, para todas as amostras e os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Após 48 horas no período de tempo em estresse, a comparação entre as células viáveis e as células cultiváveis demonstrou a presença de células viáveis, mas não cultiváveis. Além disso, a remoção do estresse permitiu que as células fossem novamente capazes de crescer, fornecendo evidências da existência de um estado VBNC em leveduras.

Palavras-chave: Viabilidade. Estresses fermentativos. *Saccharomyces cerevisiae*. Culturabilidade. Dormência celular.

Abstract

ABSTRACT

Several physiological conditions have been described for yeast cells during cultivation, such as injured cells, dead cells and viable cells, but not culturable (VBNC). However, little attention is still given to the formation of viable cells, but not cultivable in yeast and its impact on the fermentation process. The VBNC state, also known as state of "numbness cell" can be defined as a physiological condition in which the microorganisms are not able to grow on bacteriological media, but that present characteristics of living cells. Chemical and environmental factors have been reported to induce VBNC state, including a lack of nutrients, temperature extremes, osmotic concentration and oxygen. The yeast cells in the VBNC state may influence the yield of biofuel generated at the end of the process. The yeasts used in this study were collected in a sugarcane mill located in Américo Brasiliense-SP-Brazil. To provide evidence of the existence of a state in yeast VBNC investigated the ability of cells to enter the VBNC state, applying heat stress (40°C) and osmotic (30% sucrose). Viable populations were monitored using the methylene blue dye, and cultivated populations were identified by inoculation in culture. All procedures were performed in triplicate for all samples and sample data were submitted to analysis of variance (ANOVA). After 48 hours the time of stress, the comparison between viable cells and culturable cells showed the presence of viable cells, but not culturable. Moreover, removal of stress the cells were allowed to grow again able, providing evidence for the existence of a VBNC state in yeast.

Keywords: Viability. Stresses fermentation. *Saccharomyces cerevisiae*. Culturability. Numbness cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Potenciais estresses fermentativos enfrentados pela levedura <i>S. cerevisiae</i> durante o processo de produção de etanol. (BAI et al., 2008).....	27
Figura 2 -	(A) Teste de identificação de leveduras industriais em amostras de CT, comparando-se com leveduras do gênero <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e CAT-1 em meio de cultura Nagai. (B) Gráfico representando o crescimento em porcentagem das células de leveduras industriais totais contidas na amostra de CT e das leveduras PE-2 e CAT-1.....	53
Figura 3 -	Mostra a viabilidade em porcentagem da levedura 63M antes do tratamento ácido e após o tratamento ácido.....	54
Figura 4 -	Crescimento das leveduras 63M e 63M-T em meio de cultura padronizado YPD, incubadas a 30°C por 48 horas.....	54
Figura 5 -	Análises de entrada e saída do estado VBNC do creme tratado de levedura (CT) antes, durante e após estresse térmico a 40°C por 48h. Células totais (—■—); Viabilidade (—●—) e Culturabilidade (—▲—).....	55
Figura 6 -	(A) Semeadura do creme de levedura tratado (CT) em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse térmico 40°C. (B) Contagem das células (log UFC/ml) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).....	57
Figura 7 -	Análises de entrada e saída do estado VBNC da levedura 63M antes e após estresse térmico a 40°C por 48h. Células totais (—■—), Viabilidade (—●—) e Culturabilidade (—▲—)	59
Figura 8 -	(A) Semeadura da levedura 63M em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse térmico 40°C. (B) Contagem das células (log UFC/ml) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).....	60
Figura 9 -	Análises de entrada e saída do estado VBNC do creme tratado de levedura (CT) antes e após estresse osmótico 30% por 48h. Células totais (—■—); Viabilidade (—●—) e Culturabilidade (—▲—).....	62

Figura 10 -	(A) Semeadura do creme de levedura tratado (CT) em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse osmótico 30%. (B) Contagem das células (log UFC/ml) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).....	63
Figura 11 -	Análises de entrada e saída do estado VBNC da levedura 63M antes e após estresse osmótico 30% por 48h. Células totais (—■—), Viabilidade (—●—) e Culturabilidade (—▲—).....	65
Figura 12 -	(A) Semeadura da levedura 63M em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse osmótico 30%. (B) Contagem das células (log UFC/ml) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação entre as leveduras do CT e a 63M quanto ao efeito do estresse térmico e osmótico submetido durante a análise de entrada e saída do estado VBNC, após 48 de incubação em meio YPD.....	67
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
μL	microlitro
g	gramas
g.L ⁻¹	gramas por litro
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
L	litro
mL	mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
v/v	volume por volume
YPD	extrato de levedura, peptona e glicose
↓	queda nos parâmetros
↑	aumento nos parâmetros
CT	creme de levedura tratado com ácido sulfúrico
63M-T	levedura 63M tratada com ácido sulfúrico
PE-2	levedura <i>S. cerevisiae</i> da espécie Pedra-2 (Usina da Pedra)
Cat-1	levedura <i>S. cerevisiae</i> da espécie Catanduva-1 (Usina Catanduva)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Respostas adaptativas.....	25
1.2. Estresses Fermentativos.....	26
1.2.1. Estresse Osmótico.....	28
1.2.2. Estresse Térmico.....	28
1.2.3. Estresse Etanólico.....	29
1.2.4. Estresse Ácido.....	29
1.3. Estado VBNC.....	30
1.3.1. Histórico e definição.....	30
1.3.2. Fatores que induzem o estado VBNC.....	31
1.3.3. Reanimação celular.....	32
1.3.4. Alterações fenotípicas	33
1.3.5. Técnicas de detecção do estado VBNC.....	34
1.3.6. Estado VBNC em bactérias.....	36
1.3.7. Estado VBNC em leveduras.....	37
1.4. Importância do estado VBNC nas destilarias de produção de etanol...	38
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Linhagens de leveduras utilizadas.....	44
3.1.1. Levedura 63M da coleção de cultura do laboratório.....	44
3.1.2. Creme de levedura tratado (CT).....	44
3.2. Coleta e Armazenamento das amostras.....	44
3.2.1. Creme de levedura tratado (CT).....	44
3.2.2. Levedura 63M.....	45
3.3. Reativação das leveduras	45
3.4. Meios e soluções utilizados.....	46
3.4.1. Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose).....	46
3.4.2. Meio Nagai.....	46
3.4.3. Solução de ácido sulfúrico.....	46
3.4.4. Solução salina	46
3.5. Teste de identificação das leveduras PE-2 e CAT-1 presentes na	

amostra do creme trado (CT)	46
3.6. Tratamento com ácido sulfúrico da levedura 63M.....	47
3.7. Ensaios de viabilidade e culturabilidade.....	47
3.7.1. Viabilidade celular.....	48
3.7.2. Culturabilidade celular.....	49
3.8. Indução da entrada e saída do estado VBNC.....	49
3.8.1. Estresse térmico.....	49
3.8.2. Estresse Osmótico.....	50
3.9. Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Teste de identificação das leveduras PE-2 e CAT-1 presentes na amostra do creme trado (CT)	52
4.2. Efeito do tratamento ácido sobre a levedura 63M.....	53
4.3. Indução de entrada e saída do estado VBNC	55
4.3.1. Ensaios de Estresse Térmico.....	55
4.3.2. Ensaios de Estresse Osmótico.....	62
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Respostas adaptativas

Os micro-organismos, naturalmente respondem às mudanças das condições ambientais, devido às limitações, tais como mudanças na disponibilidade de nutrientes, temperatura, salinidade, iluminação solar e saturação de oxigênio. Desta forma, os micro-organismos persistem no ambiente mesmo quando as condições ambientais não são adequadas crescendo normal devido, em grande parte, a sua capacidade em adaptar-se a condições estressantes (HELMANN, 2002). As adaptações fisiológicas requerem um tempo de resposta variável em função da intensidade, do tipo de exposição aos fatores de indução ao estresse e ao tipo de micro-organismo (GIRAFFA, 2004).

Os micro-organismos, geralmente encontram-se em condições de estresse na natureza e tem-se observado que várias respostas adaptativas estão envolvidas na sobrevivência dos micro-organismos, quando submetidos a condições de estresse (ABEE e WOUTERS, 1999). Essas respostas incluem alterações tanto na fisiologia quanto na morfologia celular (DUBNAU e TURGAY, 2000).

Respostas adaptativas oriundas de estresse nutricional têm sido muito estudadas por alguns autores. Uma das mais estudadas é o fenótipo de vantagem de crescimento em fase estacionária (GASP - Growth Advantage in Stationary Phase) que se caracteriza por mutação, geralmente simples, que seleciona micro-organismos capazes de crescer ou sobreviver em condições adversas (ZINSER e KOLTER, 1999).

Os micro-organismos são submetidos a diferentes intensidades de estresse, desde um estresse leve, onde a velocidade de crescimento é reduzida, mas as células se adaptam completamente a nova condição, até o estresse letal em que as respostas podem levar à morte da célula, passando pelo estresse extremo, onde o crescimento para e as células sacrificam suas fontes de reservas para sobreviver (YOUSEF e JUNEJA, 2003).

Um estresse intenso pode levar à lesão celular que se caracteriza pelo decréscimo na resistência a agentes seletivos e pelo aumento da exigência nutricional. Células lesionadas podem ser recuperadas facilmente utilizando-se meios de enriquecimento não seletivos como os empregados em análises

microbiológicos para a detecção de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em alimentos (MONTVILLE, 1997). As células submetidas a um estresse nutricional passam ao estado de inanição. Este estado pode ser definido como o estado de resposta fisiológica diante da falta de nutrientes. Nestes casos, as células também sofrem um decréscimo drástico no seu metabolismo, mas conseguem ser cultivadas em meio de cultura com suprimentos nutricionais adequados, mesmo que em um período maior de tempo, isto é, apresentam aumento significativo da fase lag (OLIVER *et al.*, 1991).

A hipótese de micro-organismos que podem estar em um estado viável, mas não cultivável (VBNC), foi originalmente proposto para justificar a longa persistência das bactérias patógenas humanas em ambientes naturais. A investigação da sobrevivência bacteriana em ambientes estressantes, com escassez de nutrientes, temperaturas extremas, diferentes concentrações osmóticas e de oxigênio indicaram que alguns organismos podem perder a culturabilidade sob certas condições ambientais e ainda apresentar sinais de atividade metabólica (ZHONG *et al.*, 2009; DHIAF *et al.*, 2008). Então, dependendo da intensidade e do tipo de estresse sofrido, os micro-organismos podem entrar no estado VBNC.

1.2. Estresses Fermentativos

Todos os organismos vivos crescem e se desenvolvem sob certas condições ambientais. O ambiente é um fator determinante da evolução de organismos e que induz a seleção de mecanismos que permitam a sua sobrevivência e adaptação às mudanças. Para atingir esse objetivo as células microbianas adotam estratégias que as levam a modificar o seu metabolismo, regulando a sua taxa de crescimento e, assim, sobrevivem às condições adversas. No entanto, em determinadas ocasiões essas mudanças são muito severas chegando a ser letais para a célula. As condições de temperatura, umidade, acidez, entre outras variam com as dimensões do ambiente e com a passagem do tempo deslocando, muitas vezes, das condições ótimas para o crescimento e reprodução das leveduras (FOLCH-MALLOL *et al.*, 2004).

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico, realizado principalmente por leveduras em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia para possibilitar a realização de suas atividades fisiológicas, além de seu crescimento e

reprodução. A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico é realizada através de reações sequenciais mediadas por enzimas, sendo denominada como via glicolítica. Essas enzimas glicolíticas podem sofrer intervenção de vários fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura, entre outros) que influenciam na sua atividade, afetando assim, o desempenho do processo fermentativo (CECCATO-ANTONINI, 2008; PRETORIUS, 2000; QUEROL et al., 2003). As leveduras industriais são submetidas a diversos estresses simultâneos impostos pelo próprio processo, tais como: concentrações altas de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH, altas temperaturas, presença de contaminantes principalmente bactérias e muitos outros (Figura 1) (BAI et al., 2008). Todos estes fatores de estresse ainda podem ser intensificados pela prática da reciclagem celular, levando a perdas de viabilidade das células e da capacidade de fermentação destas (BASSO et al., 2011). Deste modo, as células de leveduras adotam estratégias que as levam a modificar o seu metabolismo e fisiologia, regulando a sua taxa de crescimento para garantir a sua sobrevivência em condições adversas (FLEET, 2011).

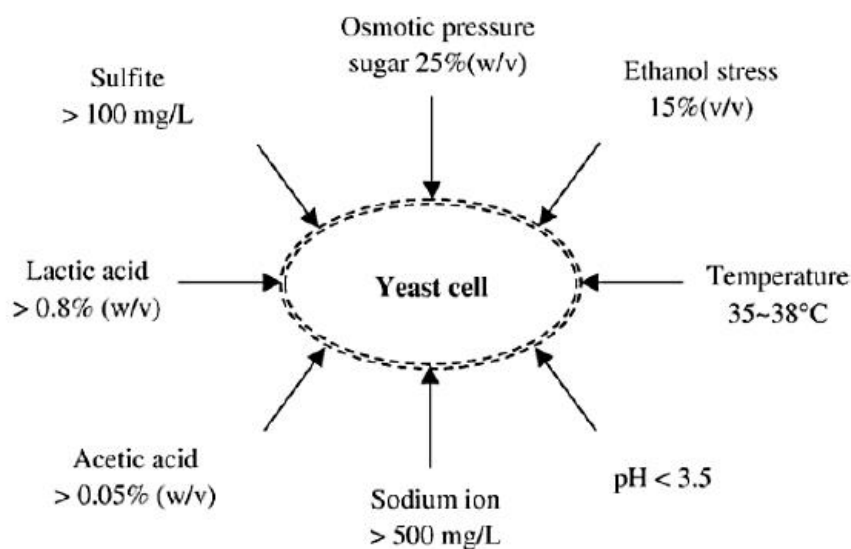


Figura 1 – Potenciais estresses fermentativos enfrentados pela levedura *S. cerevisiae* durante o processo de produção de etanol (Fonte: BAI et al., 2008).

Tanto os danos provocados pelo estresse quanto a resposta da levedura, dependem do tipo, do grau do estresse e da fase em que a levedura se encontra em seu ciclo de divisão celular no momento em que ocorre o estímulo. Para se defender destas situações desfavoráveis, a levedura responde rapidamente sintetizando moléculas que permitem aumentar o grau de reparo dos danos causados pelo estresse (BASSO et al., 2008; FOLCH-MALLOL et al., 2004).

1.2.1. Estresse Osmótico

O estresse osmótico é frequentemente citado nos processos industriais, isto porque, na fermentação etanólica, as leveduras são expostas a concentrações elevadas de açúcar. Por outro lado, o estresse osmótico também pode ser causado por sais, que estão presentes em grandes quantidades no melaço de cana de açúcar, como elevados níveis de cálcio, potássio e magnésio (BASSO, BASSO E ROCHA, 2011).

O estresse osmótico se define como uma diminuição do potencial hídrico do ambiente em que o organismo está se desenvolvendo, tendo como resposta imediata a saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo onde é necessário um tempo para que o equilíbrio osmótico entre as células e o meio seja atingido (FOLCH-MALLOL et al., 2004). A exposição ao estresse osmótico é capaz de induzir o estado VBNC em várias bactérias e leveduras, sendo essa possibilidade muito preocupante para as indústrias (GURAYA et al., 1998; SAITO et al., 2000).

1.2.2. Estresse Térmico

A temperatura é uma das variáveis ambientais mais importantes que exerce forte efeito sobre as atividades metabólicas dos micro-organismos, podendo ocorrer alterações no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e a viabilidade celular. A temperatura ótima de crescimento da maioria das leveduras está ao redor de 26-35°C, dependendo do “habitat” natural da espécie. Com o aumento da temperatura nos reatores, tem-se um aumento na velocidade da fermentação, favorecendo os contaminantes bacterianos e consequentemente deixando as leveduras mais sensíveis ao álcool levando desta maneira, a formação de metabólitos secundários como o glicerol (LIMA; BASSO; AMORIN, 2001).

Segundo Rivera et al., (2006) a exposição a temperaturas elevadas provoca a quebra das ligações de hidrogênio, resultando na desnaturação das proteínas e dos ácidos nucleicos, aumenta a fluidez da membrana e reduz a permeabilidade desta pelos nutrientes essenciais, além de diminuir a atividade respiratória da célula e a divisão celular. As leveduras mostram uma resposta rápida de defesa quando expostas a temperaturas elevadas, como a síntese das proteínas do choque térmico ou “heat-shock proteins” (Hsps).

1.2.3. Estresse Etanólico

A concentração de álcool é um dos fatores estressantes que mais afeta a levedura durante o processo fermentativo, devido a elevados níveis de etanol produzidos no final de cada ciclo de fermentação nos processos industriais (8-12%, v/v), (BASSO et al., 2011). Segundo Alexandre e Charpentier (1998) o papel inibitório do etanol sobre a levedura *S. cerevisiae* não está totalmente esclarecido. No entanto, o principal alvo do etanol parece ser a membrana citoplasmática das células. Deste modo, a exposição a concentrações elevadas de etanol aumenta a fluidez das membranas levando a perdas em sua estrutura e função. O etanol, não somente inibe o crescimento e a reprodução celular, como também reprime o sistema de transporte da glicose, limitando a produção de etanol (WALKER, 1998).

1.2.4. Estresse Ácido

O estresse ácido é um fator muito importante nos processos industriais, devido a diversos ácidos que são formados e excretados no meio durante a fermentação, sobretudo pelas bactérias contaminantes, sendo as bactérias lácticas e acéticas as mais abundantes no processo (*Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* e *Acetobacter sp.*) (LUCENA et al., 2010; LOPES et al., 2004).

O pH ideal de crescimento e fermentação para a levedura *S. cerevisiae* é de 4,5 à 6,5 (WALKER, 1998), sendo que variações no pH do meio podem levar à diminuição ou perda total da atividade catalítica das enzimas envolvidas na produção de etanol. Quando o pH do meio externo é muito baixo (2,5 - 3,5) a forma não dissociada dos ácidos fracos difundem-se através da membrana plasmática da

levedura. Estes ácidos dissociam-se produzindo ânions e prótons diminuindo o pH interno da célula (DORTA et al., 2006).

A fim de restituir a homeostase celular, a célula bombeia os prótons para o exterior por meio da H⁺-ATPase. Isso pode resultar em uma queda do ATP celular diminuindo o *pool* de energia destinado ao crescimento e funções metabólicas essenciais da célula (DORTA et al., 2006). Mesmo que as leveduras possam tolerar pHs baixos, o tratamento do creme de levedura (pé-de-cuba) realizado nos processos industriais com ácido sulfúrico (pH 1,8-2,5) após cada ciclo de fermentação com a finalidade de reduzir a contaminação bacteriana, pode provocar alterações fisiológicas nas células, levando muitas vezes a perdas de viabilidade e, conseqüentemente, quedas no rendimento do processo.

1.3. Estado VBNC

1.3.1. Definição e Histórico

O estado viável, mas não cultivável (VBNC) pode ser definido como um estado fisiológico em que os micro-organismos não são capazes de crescer em meios de cultivos, mas que mantêm a sua viabilidade. Este estado é reversível, onde estas células devem ser capazes de sair deste estado de dormência e retornar a um estado metabolicamente ativo (ressuscitar) quando as condições se tornam favoráveis (HEIM, et al., 2002), caracterizando um estado real de VBNC.

Roszak e Colwell (1987) definiram estado viável, mas não cultivável como o estado fisiológico em que os micro-organismos não são capazes de crescer em meios utilizados pelos métodos tradicionais disponíveis, mas que apresentam características de células vivas, como atividade respiratória, manutenção de potencial de membrana, atividade enzimática, entre outras. As células do estado VBNC demonstram tipicamente níveis muito baixos de atividade metabólica, mas em ressuscitação se tornam novamente cultivável.

O estado VBNC difere significativamente do estado de "sobrevivência de ausência de nutrientes" onde as células também sofrem dramática diminuição no metabolismo, porém ainda são totalmente cultiváveis (OLIVER et al., 1991). Um estudo recente sobre o proteoma *Enterococcus faecalis*, por exemplo, mostram

claramente que os perfis de proteínas das células que entram no estado VBNC são muito diferentes das células em fase de crescimento exponencial ou em estado de jejum (HEIM et al., 2002).

As primeiras experiências com esta forma particular de adaptação ao meio hostil (estado VBNC) foram realizadas por Xu et al. (1982), estudando a sobrevivência de bactérias entéricas, em ambientes aquáticos. Estes estudos foram pioneiros na constatação da persistência de *Vibrio cholerae* e *E. coli* ssp. ainda metabolicamente ativos sob condições de salinidade e temperatura variada, entretanto, esses mesmos micro-organismos não apresentavam grande recuperação do crescimento quando cultivados pelos métodos tradicionais. Então, conclui-se que sob certas condições ambientais, o fato de encontrar um baixo número ou mesmo não detectar a presença de micro-organismos, não garante que esses estejam presentes em número pequeno ou estejam ausentes neste meio.

1.3.2. Fatores que induzem o estado VBNC

As células entram no estado VBNC como uma resposta a alguma forma de estresse natural. Vários fatores ambientais podem induzir a entrada no estado VBNC, como por exemplo, Temperaturas extremas (OLIVER, 2010), idade fisiológica da cultura, concentrações osmóticas elevadas (ROTH, LECKIE, DIETZLER, 1988); teor de oxigénio (GAUTHIER, 2000); iluminação e ventilação (ROLLINS e COLWELL, 2000), além de ausência de nutrientes (OLIVER, 2000). Estes são tipicamente ambientes de estresses que podem ser letais se as células não entrarem neste estado de dormência. Em todos os casos, os indutores do estado VBNC parecem ser fatores ambientais que são potencialmente prejudiciais para a uma determinada espécie, entretanto não prejudiciais para outras espécies de micro-organismos. Por exemplo, enquanto a entrada no estado VBNC por *V. vulnificus* (Temperatura ótima = 37°C) é induzida por baixa temperatura de incubação (<10°C), o inverso ocorre para a *Pseudomonas fluorescens* que prefere baixas temperaturas, e que se for submetida a uma temperatura de 37°C entra no estado VBNC (WOLF e OLIVER, 1992).

O tempo necessário para que as células entrem no estado VBNC varia de acordo com o micro-organismo e as condições de indução. Diversos autores relataram que alguns micro-organismos demoram meses para serem induzidos ao

estado VBNC, enquanto outros relataram dias para os mesmos micro-organismos. Um fator que tem sido demonstrado que possui um efeito dramático sobre o tempo necessário para que as células cultivadas em laboratório tornam-se não cultivável, é a "Idade" das células.

Recentemente, uma série de teorias tem sido desenvolvida para explicar por que as células entram nesse estado de dormência, e por que elas não podem mais ser cultivadas em meios de rotina. Koch, (1996) observou que quando as bactérias entram em um modo "shut down", os núcleos das células se compactam devido ao elevado grau de enovelamento.

1.3.3. Reanimação Celular

O processo de "reanimação" celular é descrito como a recuperação da divisão celular, pelo menos em parte da população, com a restauração de condições ambientais adequadas (STEINERT et al., 1997 ; LLEO, et al., 2001).

O estado VBNC se torna importante para os microbiologistas uma vez que as células que estão dormentes podem retomar seu metabolismo vegetativo normal, sem que seja verificado aumento do número total de células. A recuperação integral da capacidade de ser cultivado pode levar vários dias ou não.

A fim de sustentar a hipótese de que o estado VBNC é um mecanismo fisiológico de sobrevivência, demonstra-se que a recuperação do estado cultivável de uma população de células VBNC após a remoção do fator estressante é possível (OLIVER, 2005; BOGOSIAN e BOURNEUF, 2001). Este processo de reanimação é frequentemente desencadeado simplesmente pela remoção do agente estressante que, inicialmente, induziu a resposta VBNC (OLIVER, 2005; du TOIT, PRETORIUS & LONVAUD-FUNEL, 2005).

Eventualmente, quando o estresse de indução é removido, estas células são capazes de sair do estado VBNC, e novamente se tornar cultivável em meios de cultura quimicamente definidos. O termo "Dormência" é utilizado nestes casos para caracterizar as células no estado VBNC, uma vez que estas células parecem ser metabolicamente inativas, ou quase, mas retém o potencial para se tornar metabolicamente ativas.

Em alguns casos, a simples retirada do agente estressor é capaz de tornar as células novamente cultiváveis, porém em outros casos este evento pode ser

extremamente complexo (KELL et al., 1998). Há relatos na literatura de que a simples retirada do agente estressor não é suficiente, sendo assim, alguns autores induzem a ressurreição por meio de outros mecanismos, como a adição de nutrientes (ROSZAK, GRIMES, COLWELL, 1984), ou indução de choque térmico. No entanto, a maioria destes processos de reanimação só são bem sucedidos com as culturas que entraram no estado VBNC por um curto período de tempo (SERPAGGI, et al. 2012), (BOGOSIAN e BOURNEUF, 2001), (MCDOUGALD, et al., 1998). Em estudos conduzidos com leveduras de vinho, vários autores têm demonstrado que após a entrada das leveduras no estado VBNC como uma resposta à exposição ao SO₂, a reanimação destas células acontece com uma diminuição substancial na concentração molecular de SO₂ (SERPAGGI, et al. 2012), (AGNOLUCCI, et al. 2010), (DIVOL e LONVAUD-FUNEL, 2005).

Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de saída do estado VBNC por leveduras em condições de fermentação. Tal como nas bactérias, uma alteração favorável nas condições ambientais tem sido mostrado para ressuscitar uma célula no estado VBNC e a mesma resposta pode ocorrer com leveduras (ZENG, et al., 2013).

Dessa forma, e de acordo com Oliver (1993), a evolução de um estado VBNC depende da intensidade do estresse, e o estado VBNC deve ser considerado como um meio para a sobrevivência da célula.

Vários aspectos da entrada e saída do estado VBNC tem sido debatido, entre eles está a teoria do “re-crescimento”. Nesta teoria, debate-se se as células cultiváveis, que aparecem após a remoção do estresse, são o resultado de uma verdadeira reanimação, ou são células novas, obtidas a partir do “re-crescimento” de alguns resíduos de células cultiváveis.

1.3.4. Alterações Fenotípicas

As células que entram no estado VBNC podem apresentar inúmeras mudanças no seu metabolismo, incluindo redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2000), mostrando que a mudança mais comum é a redução no metabolismo.

Durante esse estado fisiológico, novas proteínas são sintetizadas (HEIM et al., 2002) entre elas as proteínas do choque frio e as do estado de inanição

(MORTON e OLIVER, 1994). O nível de ATP intracelular permanece alto nesse estado, o que não ocorre em células mortas ou “moribundas” (FEDERIGHI et al., 1998). Constatou-se que a expressão gênica nas células no estado VBNC não cessa (LLEO et al., 2000) podendo expressar, muitas vezes, um fenótipo diferente em células na fase log e/ou estacionária de crescimento e por isso, acredita-se que mudanças fenotípicas podem ocorrer (WARNER e OLIVER, 1998) em células que entram no estado VBNC. Alterações morfológicas também ocorrem nas células no estado VBNC sendo as mais frequentes a redução do tamanho (OLIVER, 2000).

Serpaggi, et al., (2012), analisaram as características morfológicas de células VBNC, comparando as células controle (células que não estavam no estado VBNC), com células VBNC quanto à morfologia das colônias. O tamanho das células de *Brettanomyces* ssp. foi determinada pela granulometria das três culturas de células independentes (controle, VBNC e saída VBNC). Neste estudo, Serpaggi, et al., (2012), descobriram que as células no estado VBNC foram significativamente menores que as células controle, possivelmente por apresentarem diminuição no metabolismo. Por outro lado, cinco dias após a saída do estado VBNC, as células permaneceram significativamente menores do que as células do controle. As células do controle tinham um diâmetro de $3,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, ao passo que os diâmetros das células, no estado VBNC foram de $2,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ e nas células ressuscitadas o diâmetro de $2,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$. A entrada no estado VBNC resultou, assim, numa redução de 22% no tamanho das células.

Durante esta redução de tamanho, alterações significativas na estrutura da membrana, a composição de proteína, o conteúdo do ribossomo, e possivelmente até mesmo o arranjo de DNA podem ser diferentes (OLIVER, NILSSON e KJELLEBERG, 1991).

1.3.5. Técnicas de detecção do estado VBNC

A principal estratégia utilizada para determinar se as células não cultiváveis estão mortas ou no estado VBNC é a contagem de células viáveis por meio de alguma metodologia que avalie a atividade metabólica ou a integridade de membrana. A determinação das células no estado VBNC é feita pela comparação entre as células viáveis totais e as células cultiváveis (ROSZAK e COLWELL, 1987). A detecção das células viáveis totais pode ser realizada por diferentes metodologias.

Uma maneira de se verificar a viabilidade das células é por meio da avaliação da integridade da membrana celular com a utilização do corante azul de metileno ou azul de evans.(LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

Vários ensaios podem ser utilizados para demonstrar esta característica, mas em todos os casos, estes caracterizam alguns aspectos de atividade metabólica ou ainda a integridade celular que indica que as células estão vivas, mesmo se eles são incapazes de desenvolver em colônias em meios de cultura.

Um número de métodos tem sido utilizado para examinar a viabilidade de células não cultiváveis, a fim de satisfazer necessidades diferentes. A viabilidade das bactérias pode efetivamente, ser avaliada nas populações de ensaio (em massa) ou em células individuais (ensaio citológico) (MCDUGALD, et al., 1998). Este último parece ser preferido, uma vez que é baseado em técnicas de viabilidade independente de crescimento, tais como a avaliação da viabilidade das células por meio da manutenção da estrutura celular estável. Estes métodos incluem o uso de corantes de ácidos nucleicos, indicadores redox, potencial de membrana ou indicadores de sondas metabólicas, tais como diacetato de fluoresceína, que pode ser detectado através de microscopia de fluorescência (AGNOLUCCI, et al. 2010), (DIVOL e LONVAUD-FUNEL, 2005) ou de citometria de fluxo (SERPAGGI, et al. 2012).

A evidência para a presença de células que são viáveis mas não cultiváveis é fornecido por ensaios de viabilidade (KELL, et al., 1998), que envolvem a investigação direta de diversas funções celulares, tais como a respiração, o potencial de membrana ou a integridade e atividade enzimática (LLEO, et al., 2000)

As sondas fluorescentes também podem ser utilizadas para a contagem de células viáveis por microscopia ou por citometria de fluxo (FCM). Bactérias VBNC frequentemente diferem das células normais cultiváveis em termos do seu tamanho e da composição química da parede da célula. Além disso, as taxas de síntese e respiração macromoleculares diminuem à medida que as células entram em um estado VBNC (LAI, et al., 2009). Por outro lado, os níveis de ATP e potencial da membrana permanece geralmente elevada (LINDBACK, et al., 2010).

Outra técnica utilizada para detecção de viabilidade é através de coloração com diacetato de fluoresceína (FDA). A capacidade da FDA para corar as células viáveis é baseada na sua clivagem, em células vivas, por esterases de membrana durante o metabolismo ativo (SCHNURER E ROSSWALL, 1982).

Vários métodos têm sido recentemente desenvolvidos para verificar a presença de estado VBNC nos micro-organismos: Lowder, et al. (2000) e Gunasekera et al., (2000), mediram por citometria de fluxo a expressão de um novo gene repórter marcado com uma proteína fluorescente verde. Um dos métodos utilizados atualmente para avaliar a sobrevivência desses micro-organismos é o método de epifluorescência direta (técnica de filtro de epifluorescência direta, DEFT). Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Hobbie, et al. (1977), que já é utilizado em vinho na contagem dos micro-organismos antes do engarrafamento (FROUDIERE, et al. 1990).

1.3.6. Estado VBNC em bactérias

Inicialmente, acreditava-se que o estado fisiológico VBNC era uma estratégia de sobrevivência utilizada apenas por bactérias Gram negativas como *Vibrio cholerae* (COLWELL, 2000) *Vibrio vulnificus* (OLIVER, et al. 1991), *Campylobacter* (ROLLINS e COLWELL, 1986), *Escherichia coli* O157:H7 (MAKINO, et al., 2000) e *Salmonella* (ROSZAK, et al., 1984), dentre outras, mas estudos mostram que bactérias Gram positivas entre elas *Enterococcus faecalis* (LLEÒ et al., 2000) e *Listeria monocytogenes* (BESNARD, et al., 2002) já foram comprovadamente descritas como capazes de entrar no estado VBNC em resposta a diferentes condições adversas.

A maioria dos estudos sobre as células VBNC focaram bactérias patogênicas. Mais de 60 espécies de bactérias são descritas como sendo capaz de entrar em um estado VBNC (OLIVER, 2005). Em contraste, o estado VBNC tem recebido muito menos atenção em outros micro-organismos.

Oliver e Bockian, (1995) ao estudarem a entrada e a reanimação do estado VBNC para *Vibrio vulnificus*, mostraram que a entrada do estado VBNC ocorreu quando a temperatura da água diminuía e que a saída do estado VBNC foi possível, após um aumento da temperatura. McDougald, et al. (1998) observou que o estado VBNC induziu uma mudança na estrutura da membrana e da parede celular e uma diminuição do tamanho da célula.

Zeng, et. al. (2013), investigaram o estado VBNC em *Salmonella typhi*. Algumas amostras foram estimuladas a 4°C e -20°C, enquanto que outras foram induzidas por diferentes concentrações de CuSO₄. A contagem de células totais

utilizando acridina laranja, permaneceu constante ao longo de vários dias, no entanto, a contagem em placas diminuiu a níveis não detectáveis no espaço de 48 horas. Materiais de carbono e de azoto diminuíram lentamente, o que segundo os autores, indicou que uma grande parte da população de células estaria no estado VBNC quando foram expostas a concentrações de 0,01 ou 0,015 mmol/L de CuSO₄ para mais de 14 e 12 dias, respectivamente. A adição de 3 % de Tween 20 e de 1 % de catalase foram capazes de tornarem as células novamente cultiváveis, com tempos de ressuscitação de 48h e 24h, respectivamente.

1.3.7. Estado VBNC em leveduras

As leveduras são organismos eucariotos unicelulares e seu tamanho varia de 1 a 5 µm em largura e 5 a 30 µm ou mais em comprimento, não apresentando flagelos ou outros meios de locomoção. Apresentam parede celular rígida formada por manana, um polímero de manose. Elas apresentam-se sob formas variadas, de esférica a ovóide, de elipsóide a filamentosa (PELCZAR, et al., 1997). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são tradicionalmente utilizadas nas indústrias de panificação, produção de cervejas e vinhos, além de serem extensivamente estudadas para a produção de etanol combustível, processo em que as células estão sujeitas a uma variedade de condições adversas (ZHAO; BAI, 2009).

Existem variedades de leveduras utilizadas em processos industriais sendo que a levedura do gênero *Saccharomyces* é a mais utilizada na área da Biotecnologia por ser capaz de realizar a conversão dos açúcares em etanol. No entanto, leveduras que não fazem parte do inóculo inicial são normalmente encontradas nos processos de fermentação. Essas leveduras são denominadas de leveduras selvagens e leveduras não-*Saccharomyces*, pois estas proliferam ao longo do processo, já que a fermentação ocorre em condições não estéreis, facilitando a contaminação por diversos micro-organismos.

Esse gênero *Saccharomyces* é sem dúvida um dos grupos de micro-organismos mais estudados pela comunidade científica, já que é considerado organismo eucarioto modelo e organismo GRAS (*Generally Recognize as Safe*) (JOHNSON; ECHAVARRI-ERASUN; 2011).

O estado VBNC tem sido extensivamente estudado em bactérias, entretanto, tem recebido muito menos atenção em células eucarióticas. Assim, sugere-se que várias espécies de leveduras também podem entrar em estado VBNC quando submetidas a estresses.

A existência de um estado VBNC comparável àquela descrita em bactérias tem sido sugerido para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Guillou, et. al. (2003), ao realizarem um choque eletrolítico de baixa amperagem em leveduras, estado fisiológico este sugerido para células bacterianas, notaram uma perda de culturabilidade, mas não de viabilidade durante os seus estudos.

Da mesma forma, Bleve, et al., (2003) detectou a presença de *S. cerevisiae* no estado VBNC em gêneros alimentícios pasteurizados. Além disso, um estudo realizado durante a fermentação alcoólica de vinhos doces, sugeriu a presença de células em um estado VBNC em *Candida stellata* (MILLS, et al. 2002). As mesmas observações foram feitas por Divol e Lonvaud-Funel, (2005) para as leveduras *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*.

Estudos recentes têm indicado que o dióxido de enxofre (SO₂), um agente antimicrobiano usado na preservação de alimentos, induz um estado VBNC na deterioração do vinho em levedura *Brettanomyces* (DU TOIT et al, 2005; AGNOLUCCI et al, 2010; SERPAGGI, et al. 2012). Estes últimos autores relataram uma capacidade de várias cepas de *Brettanomyces* para entrar em um estado VBNC após um tratamento de sulfito com variações de 0,2 a 1,0 mg l⁻¹, e ainda mencionaram um alto potencial de recuperação da culturabilidade após a remoção do estressor.

1.4. Importância do estado VBNC nas destilarias de produção de etanol

Na natureza, a sobrevivência durante longos períodos de privação de nutrientes e exposição a outros estresses ambientais é necessária. Portanto, é necessário que as células desenvolvam estratégias de sobrevivência sob diferentes condições de estresse. A entrada no estado de metabolismo reduzido descrito como o estado VBNC pode ser uma alternativa de sobrevivência também entre os organismos eucariotos inferiores (TURPIN, 1993).

A entrada no estado VBNC de leveduras utilizadas durante o processo fermentativo pode atuar negativamente na produção de etanol, uma vez que as

células dormentes não estão totalmente ativas e sendo assim podem não ser capazes de converter açúcar em etanol (KELL, et al. 1998).

Quando a pressão ambiental externa aumenta para um nível que um micro-organismo não pode tolerar, algumas bactérias e leveduras mudam o seu metabolismo e a reprodução celular entrando no estado VBNC. No entanto, neste estado, o micro-organismo é incapaz de crescer em meio de crescimento sólido de rotina, mesmo que ainda retenha a sua função metabólica em baixo nível. Este mecanismo de sobrevivência é reversível e permite que o micro-organismo ressuscite quando as condições ambientais tornam-se favoráveis, mais uma vez. Este estado é muito importante para a produção de vinho utilizando micro-organismos deteriorantes, como *A. aceti* e *B. bruxellensis*, que são capazes de entrar neste estado (DUCKITT, 2012).

A fermentação de mostos de uvas e vinho apresentam ambientes desafiadores e estressantes para qualquer micro-organismo que tenta crescer neles. Para sobreviver e eventualmente dominar nestes ambientes, um micro-organismo deve ser capaz de competir com os outros micro-organismos “rivals”, reproduzindo mais rápido ou permanecendo em um estado dormente e viável para que possa ressuscitar quando as condições ambientais adequadas, apresentarem-se novamente (du TOIT et al, 2005).

O ambiente que bactérias e leveduras encontram-se em fermentações apresenta inúmeras formas de estresse metabólico, tais como alto potencial osmótico, o aumento dramático em etanol e perda de nutrientes. Isto obriga os micro-organismos à adaptarem-se ao estresse para não serem superados por micro-organismos mais adaptados (du TOIT et al, 2005).

O etanol é um dos produtos de maior importância socioeconômica no Brasil e no mundo, já que este produto é muito utilizado em indústrias de alimentos e, como fonte de combustível ecologicamente correta. Como uma fonte de energia renovável, o bioetanol pode ajudar a atenuar as mudanças climáticas, assim como também reduzir a dependência dos combustíveis fósseis nos setores de transporte e industrial (BALAT, 2009). A produção de etanol em nosso país teve início com o uso de levedura *S. cerevisiae* na panificação. Assim, faz-se necessário conhecer as respostas das leveduras às diversas formas de estresses em que as células são submetidas e definir o melhor processo e condições a serem utilizadas incluindo vantagens e desvantagens (AMORIN et al., 2011; ANDRIETTA et al., 2006).

Dentro do processo industrial de produção de bioetanol, várias etapas do processo fermentativo podem induzir situações de estresse ocasionando a entrada das células leveduriformes no estado VBNC. O excesso de sacarose no meio fermentativo pode ocasionar estresse osmótico, assim como o excesso de produto formado por consequência da quantidade elevada de material fermentescível pode causar estresse ácido nas células. Durante o processo de fermentação há aumento da temperatura ótima de atuação da *Saccharomyces cerevisiae* ($32^{\circ}\text{C}\pm 2$) (MUKHTAR, et al., 2010), que pode atingir 39°C , e esse estresse térmico também pode induzir ao estado VBNC, além da escassez de nutrientes durante a fermentação.

Os estudos das respostas dos micro-organismos às situações de estresse são de grande importância para entender como as células podem responder e se adaptar às várias mudanças nos ambientes em que vivem (ATTFIELD, et al., 2001). Segundo Brejning e Jespersen (2002), a exposição das células de levedura em um novo meio enriquecido levaria a uma resposta imediata através de mudanças nas vias bioquímicas. Como essas mudanças estão relacionadas ao estado fisiológico celular, elas poderiam refletir o desempenho das células durante o processo. Sendo assim, a entrada e saída do estado VBNC é um processo extremamente importante para ser estudado em produção de etanol por leveduras.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho consistiu em verificar a ocorrência do estado VBNC em amostras de leveduras coletadas no processo industrial de fermentação para a produção de biocombustível.

Objetivos específicos

- a) Correlacionar em laboratório as principais formas de estresses (térmico e osmótico) com o estado VBNC em leveduras.
- b) Comparar a indução do estado VBNC em amostras de creme de levedura industrial e levedura de laboratório.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de leveduras utilizadas

3.1.1. Levedura 63M da coleção de cultura do laboratório

A levedura 63M é uma levedura do gênero *Sacharomyces cerevisiae*, sendo um diploide mutagenizado com marcações genéticas complementadas do genótipo *Mat a/α*, *LYS/lys*, *URA/ura*, desenvolvida no laboratório de Leveduras Industriais do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química – UNESP Araraquara/SP por Laluce et al., (2002). Esta levedura foi submetida ao tratamento ácido para comparação com outra amostra de levedura industrial coletada em usina após tratamento ácido.

3.1.2. Creme tratado de levedura (CT)

Culturas de leveduras do gênero *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) contidas no creme de levedura tratado com H_2SO_4 (CT) utilizado na partida do processo industrial, foram gentilmente cedidas pela Usina Santa Cruz S/A – Açúcar e Alcool, localizada na cidade de Américo Brasiliense, SP. Na usina, o creme de levedura foi separado do mosto fermentado por centrifugação e tratado com H_2SO_4 e água.

3.2. Coleta e armazenamento das amostras

3.2.1. Creme tratado de levedura (CT)

A amostra de CT foi coletada na saída da centrífuga separadora após a fermentação do melaço. Foram utilizados frascos *shot* de 250mL para a coleta e acondicionamento das amostras. Após a coleta, as amostras foram transportadas assepticamente em uma caixa de isopor térmica contendo gelo picado até o laboratório. Em seguida as células das amostras (quantias de células não determinadas) foram lavadas com água destilada estéril e separadas por

centrifugação a 4.700rpm durante 5 minutos (centrífuga modelo Sorvall Legend Mach), sendo o sobrenadante descartado. As células decantadas pela força gravitacional foram suspensas em água esterilizada (200mL) e armazenada em frascos estéreis contendo 40mL de solução de glicerol (200mL de células para 40mL de glicerol concentração 20% v/v). A mesma suspensão de células também foi armazenada em tubos criogênicos (1,5mL) contendo 300µL de glicerol (700µL de suspensão de células para 300µL de glicerol 20% v/v). Os dois tipos de suspensão de células foram acondicionadas em freezer a -80°C modelo Thermo Electron Corporation ULT1386. As amostras de levedura do CT também foram semeadas em meio sólido YPD ágar, incubadas em estufa a 30°C por 48h e armazenadas a 4°C, apenas para avaliação do seu crescimento.

3.2.2. Levedura 63M

A levedura 63M da coleção do laboratório, já se encontrava armazenada em tubos criogênicos contendo glicerol 80% em freezer a -80°C (LALUCE et al., 2002).

3.3. Reativação das leveduras

As amostras de leveduras foram degeladas lentamente a temperatura ambiente e reativadas em meio líquido YPD, transferindo 1mL de células contidos no tubo criogênico para um tubo de ensaio contendo 5mL de meio de cultura YPD líquido estéril. Este tubo foi incubado a 30°C em estufa com agitação de 135rpm durante 48h. Em seguida, com o auxílio de uma alça de níquel cromo, retirou-se uma alçada desse tubo contendo a suspensão de células e estriou em meio de cultura sólido YPD contido em placas de Petri. Incubaram-se as placas em estufa a 30°C por 48h para o crescimento das colônias e em seguida foram armazenadas a 4°C.

3.4. Meios e soluções utilizadas

3.4.1. Meio YPD (Yeast extract Peptona Dextrose)

O meio de cultura YPD é um meio rico utilizado para crescimento de leveduras *S. cerevisiae*, conforme descrito por Sherman; Hicks (1991), contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e solidificado com ágar-ágar 2%.

3.4.2. Meio Nagai

Este meio é utilizado para isolamento de variantes morfológicas, permitindo observar a variabilidade genética das colônias, devido ao crescimento de colônias com diferentes tamanhos e colorações (NAGAI, 1963). Este meio é composto por 2% de glicose, 0,15% de peptona, 0,15% de extrato de levedura, 0,15% de KH_2PO_4 , 0,15% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% de agar, 8-15 mg/L de corante Eozina e 15-20 mg/L de Corante Azul Tripiano.

3.4.3. Solução de ácido sulfúrico

Para preparo dessa solução, em 1000mL de água destilada, foi gotejado ácido sulfúrico concentrado até atingir o pH desejado (2,0). Esta solução foi utilizada no tratamento ácido da levedura 63M.

3.4.4. Solução salina

Dissolveu-se 0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada.

3.5. Teste de identificação das leveduras PE-2 e CAT-1 presentes na amostra do creme trado (CT)

A amostra de creme de levedura tratado (CT) contém linhagens de leveduras do gênero *S. cerevisiae* PE-2 e CAT-1, sendo assim, determinou-se a predominância

de uma dessas leveduras industriais neste CT por meio de plaqueamento em meio de cultura Nagai.

Culturas puras de levedura PE-2 e CAT-1 armazenadas em freezer a -80°C foram reativadas separadamente em meio de cultura YPD líquido incubando-as a 30°C sob agitação de 135 rpm durante 48h. Realizou-se uma diluição seriada dessas leveduras em água destilada estéril e posteriormente, semeou-as separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura Nagai, com o intuito de observar as características e coloração de cada levedura, e realizar a comparação das características morfológicas das amostras de CT. Para isto, foi realizado também o plaqueamento da amostra de CT em meio Nagai, onde todas as placas foram incubadas a 30°C por 48h em estufa. Após esse período, pôde-se observar as diferenças nas colônias e qual foi a levedura com maior persistência e dominância no meio de cultura.

3.6. Tratamento com ácido sulfúrico da levedura 63M

Nas destilarias, normalmente é realizado o tratamento ácido do fermento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0-2,5, por cerca de 1-2 horas, com agitação (BASSO et al., 2008).

Para tratar a levedura 63M com ácido sulfúrico, foi retirada uma alçada da levedura de uma placa contendo YPD e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Esta suspensão foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer para determinação do número de células. Ajustou-se a suspensão para 1×10^8 células/mL e desta foram retirados 10 μL que foi ressuspensa em solução de H_2SO_4 (pH 2,0) em um volume final de 50mL em Erlenmeyer de 125mL. O frasco foi levado para a estufa a 30°C com agitação de 160rpm por 1 hora e 30 minutos. Após este tempo determinou-se a viabilidade, como descrito no item 3.7.1.

3.7. Ensaios de Viabilidade e Culturabilidade

Para a determinação da população total, das células viáveis e das células cultiváveis, foram realizadas análises de viabilidade celular e culturabilidade antes da

indução ao estado VBNC, como forma de controle, assim como durante a transição de entrada e saída do estado VBNC descrito no item 3.8.

3.7.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular das amostras foi determinada pelo método de azul de metileno em câmara de Neubauer, com contagem em microscópio óptico, como descrito por Lee; Robinson; Wang (1981).

Composição da solução de azul de metileno (g.L^{-1}): 10 g de Glicose; 0,42g de KCL; 0,48g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2g de NaHCO_3 ; 9g de NaCl, 0,25g de azul de metileno; Adicionar água deionizada para 1000mL.

Procedimento e cálculo:

A técnica de coloração com azul de metileno consiste na mistura de partes iguais da suspensão de leveduras, se necessário diluído, e da solução corante azul de metileno. Para isto, as amostras foram diluídas 20 vezes em reagente de azul de metileno; Após 5 minutos foram realizadas as contagens das células utilizando uma câmara de Neubauer espelhada e microscópio ótico comum com aumento de 40x (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

As células com alta atividade fisiológica (viáveis) se mantinham incolores, enquanto as células não metabolizantes (mortas, injuriadas ou dormentes) incorporavam o corante azul, apresentando-se azuis. A viabilidade foi obtida pela relação (em porcentagem) entre células viáveis e número total de células (vivas e mortas), de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de céls vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de céls vivas} + \text{N}^\circ \text{ céls mortas}} \times 100$$

3.7.2. Culturabilidade celular

A culturabilidade celular foi avaliada por meio de crescimento de colônias por um processo de espalhamento em placas de Petri sobre meio de cultura YPD ágar. Amostras de 1mL coletadas no início, durante e na saída do estado VBNC (procedimento descrito abaixo), foram convenientemente diluídas em tubos com solução salina, e em seguida 100 µL de cada diluição foram semeados em meio YPD. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. A seguir, o número de colônias formadas foram contados e expressos em UFC/mL.

3.8. Indução da entrada e saída no estado VBNC

A entrada no estado VBNC foi induzida pela submissão das amostras de leveduras a dois tipos de estresses: Estresse Térmico a uma temperatura de 40°C e Estresse Osmótico utilizando concentração de sacarose 30%. A saída do estado VBNC foi induzida através da remoção do agente estressante, avaliando a capacidade de recuperação das células verificando se houve morte celular ou se elas retornaram à sua viabilidade (ressuscitaram). Amostras de suspensão de células não submetidas aos estresses forneceram a contagem total de células iniciais viáveis cultiváveis utilizadas como controle dos experimentos.

3.8.1. Estresse térmico

A temperatura de 40°C foi utilizada como fator de estresse térmico na tentativa de induzir o estado VBNC nas amostras de leveduras. Porções de cada cultura reativada foram distribuídas em cinco frascos Erlenmeyers de 125mL contendo 30 mL de meio YPD líquido, sendo estes incubados em mesas giratórias (135rpm) a temperatura de 40°C. Os cinco frascos de cada amostra foram incubados em tempos diferentes de (1, 5, 24 e 48hs) para determinação dos melhores tempos, tanto de exposição ao estresse térmico (incubação a 40°C) quanto de saída da situação de estresse. No final de cada tempo de exposição, os frascos foram transferidos para estufa de menor temperatura (30°C) para saída do estado VBNC.

Alíquotas de 1mL foram retiradas, para a realização dos ensaios de viabilidade e culturabilidade conforme descritos nos itens 3.7.1 e 3.7.2. respectivamente.

3.8.2. Estresse osmótico

Para a indução do estado VBNC por meio do estresse osmótico, as células de leveduras foram suspensas em soluções de sacarose 30%. Alíquotas de cada cultura reativada foram transferidas para cinco frascos Erlenmeyers de 125mL contendo 30 mL de meio YPD líquido adicionados com 30% de sacarose. Os cinco Erlenmeyers de cada amostra foram incubados a 30°C com agitação de 135rpm em tempos diferentes de (1, 5, 24 e 48hs) para determinação dos melhores tempos, tanto de exposição ao estresse quanto de saída da situação de estresse. No final de cada tempo de exposição, as suspensões de células foram separadas por centrifugação (10350rpm durante 3 minutos) e transferidas para outros frascos Erlenmeyers contendo meio YPD líquido sem a adição de sacarose 30%, para a medida da saída do estado VBNC. Alíquotas de 1mL foram retiradas, para a realização dos ensaios de viabilidade e culturabilidade conforme descritos no item 3.7.1 e item 3.7.2.

3.9. Análise estatística

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, para todas as amostras. Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey). Os tratamentos foram considerados significativos para $p < 0,01$.

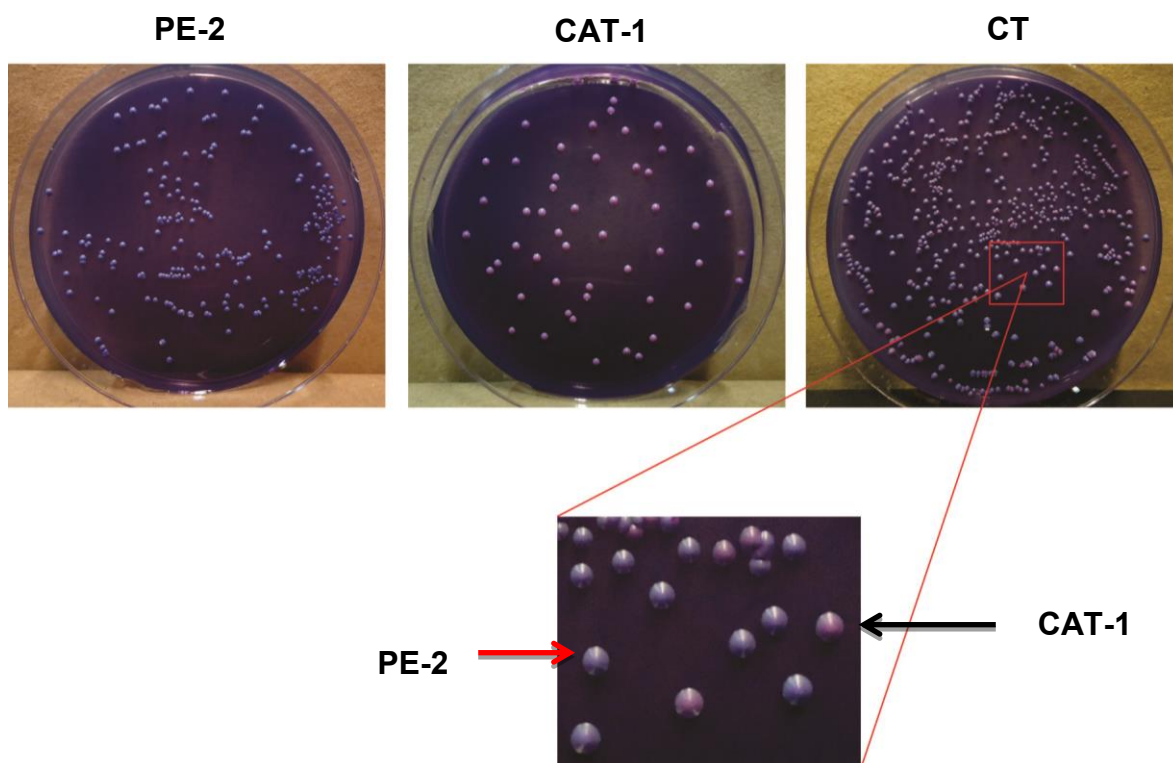
Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de identificação das leveduras PE-2 e CAT-1 presentes na amostra do creme trado (CT)

O CT coletado na usina contém leveduras industriais do gênero *S.cerevisiae*, PE-2 e CAT-1. Estas cepas comerciais são utilizadas frequentemente pelas usinas de açúcar e álcool no início da safra e estão presentes naturalmente na cana de açúcar (BASSO et al., 2008). Assim, para determinar a predominância de uma dessas leveduras na amostra coletada, foi realizado um plaqueamento em meio de cultura Nagai (NAGAI,1963) das linhagens de leveduras isoladas PE-2, CAT-1 e também da amostra do creme tratado de levedura (CT). (Figura 2 A).

A



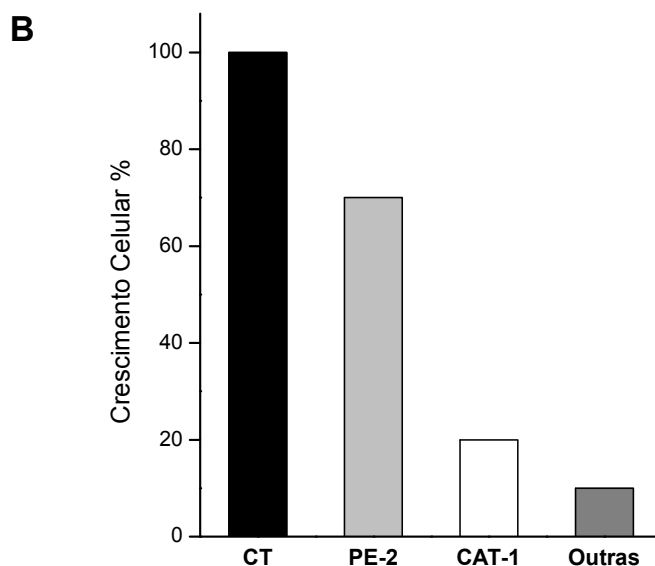


Figura 2 - (A) Teste de identificação de leveduras industriais em amostras de CT, comparando-se com leveduras do gênero *S. cerevisiae* PE-2 e CAT-1 em meio de cultura Nagai. **(B)** Gráfico representando o crescimento em porcentagem das células de leveduras industriais totais contidas na amostra de CT e das leveduras PE-2 e CAT-1.

De acordo com a Figura 2A, a levedura PE-2 apresentou coloração roxa (indicada pela seta vermelha) e a levedura CAT-1 apresentou coloração rosa (seta preta). Desse modo, na amostra do creme tratado de levedura foi possível observar maior presença da levedura industrial PE-2 após 48h a 30°C, com aproximadamente 70% do total das células. (Figura 2A e B).

4.2. Efeito do tratamento ácido sobre a levedura 63M

De acordo com a Figura 3, verificou-se que o tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0, com agitação, não afetou significativamente a viabilidade das leveduras 63M, mostrando que antes do tratamento a viabilidade era de 90,85% e após o tratamento a viabilidade foi de 88,41% ($p < 0,01$).

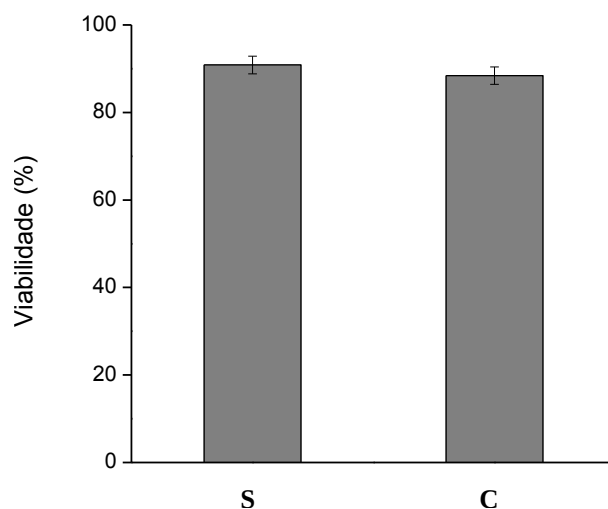


Figura 3 - Mostra a viabilidade em porcentagem da levedura 63M antes do tratamento ácido e após o tratamento ácido. S (amostra sem tratamento ácido) e C (amostra com tratamento ácido)

Ao avaliar o crescimento celular da levedura 63M e 63M tratada com ácido sulfúrico (63M-T) em meio de cultura bacteriológico quimicamente definido YPD, verificou-se que neste meio todas as células de leveduras apresentaram perfil de crescimento semelhante, demonstrando que estas células encontravam-se cultiváveis em meio de cultura comercial (Figura 4).

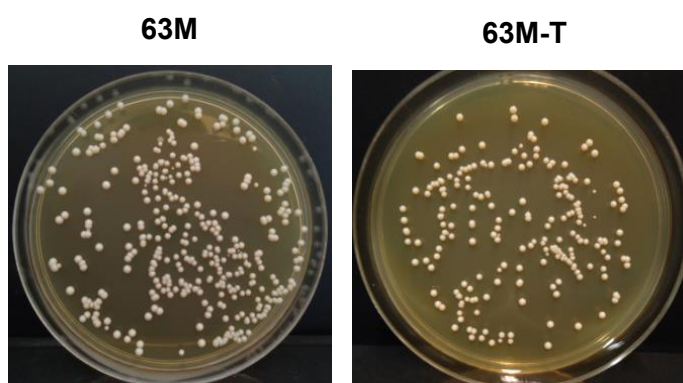


Figura 4 - Crescimento das leveduras 63M e 63M-T em meio de cultura padronizado YPD, incubadas a 30°C por 48 horas.

Desse modo utilizou-se a levedura 63M-T para as análises de estresse térmico e estresse osmótico.

4.3. Indução de entrada e saída do estado VBNC

4.3.1. Ensaios de estresse Térmico

A temperatura de 40°C foi utilizada como fator de estresse térmico na tentativa de induzir o estado VBNC no creme de levedura tratado e na levedura 63M. A contagem de células totais e viáveis utilizando microscópio ótico e a contagem de células cultiváveis em meio de cultura YPD foram comparadas a fim de verificar a entrada dessas leveduras no estado VBNC.

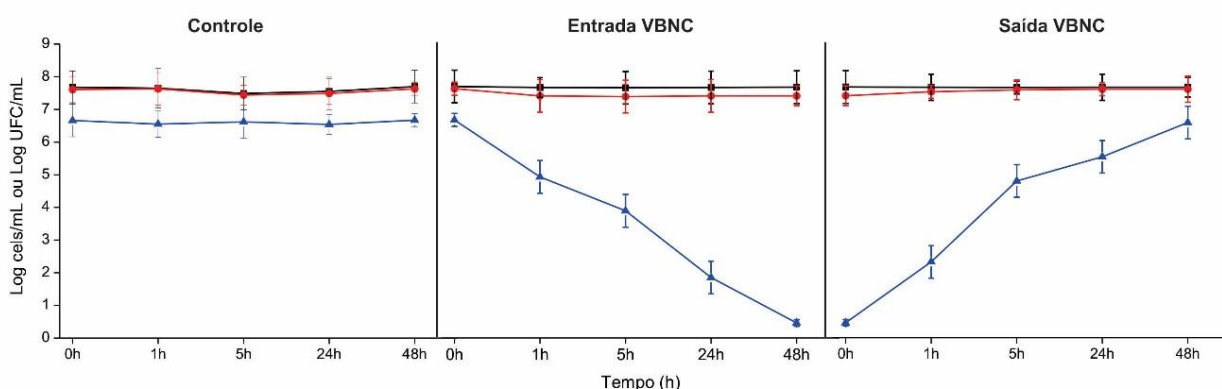


Figura 5 - Análises de entrada e saída do estado VBNC do creme tratado de levedura (CT) antes, durante e após estresse térmico a 40°C por 48h. Células totais (—■—); Viabilidade (—◆—) e Culturabilidade (—▲—).

De acordo com a Figura 5, para o creme de levedura tratado, na ausência de estresse (Controle) todas as células permaneceram viáveis e cultiváveis. Quando as células foram submetidas ao estresse térmico (Entrada VBNC), pode-se observar que o número de células medido pela contagem em placas caiu de $6,67 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL para $0,46 \pm 0,1 \times 10^1$ UFC/mL, sendo uma redução de 93%, mostrando que após um período de 48h sob estresse térmico as células de leveduras do CT não foram capazes de formar colônias em meio de cultura convencional YPD, entretanto

mantiveram-se viáveis tal como avaliado por visualização em microscópio ótico. A diferença entre as células cultiváveis e células viáveis sugere que uma proporção significativa de células entrou em um estado VBNC.

Em condições que induzem estresse metabólico, as células de leveduras precisam diminuir o seu metabolismo e entrar em um estado de dormência para que aquela condição desfavorável de crescimento não seja letal para as suas células (DHIAF, BAKHROUF, WITZEL 2008; SERPAGGI et al., 2012, OLIVER, 2005). No estado viável, mas não cultivável, as leveduras são metabolicamente ativas, entretanto incapazes de serem cultiváveis.

Para sugerir a existência do fenômeno VBNC como um mecanismo de sobrevivência fisiológica, é necessário que as células demonstrem a possibilidade de recuperação do estado cultivável em meio de cultura bacteriológico (GIRAFFA, 2004). Dessa forma, a capacidade das células para sair desse estado VBNC foi investigada por meio da remoção do agente estressante aplicado no creme de levedura tratado, o que permitiu que as células saíssem do estado não cultivável, aumentando a culturabilidade de $0,46 \pm 0,1 \times 10^1$ UFC/mL para $6,59 \pm 0,5 \times 10^6$ UFC/mL, aumento de 93% após 48h.

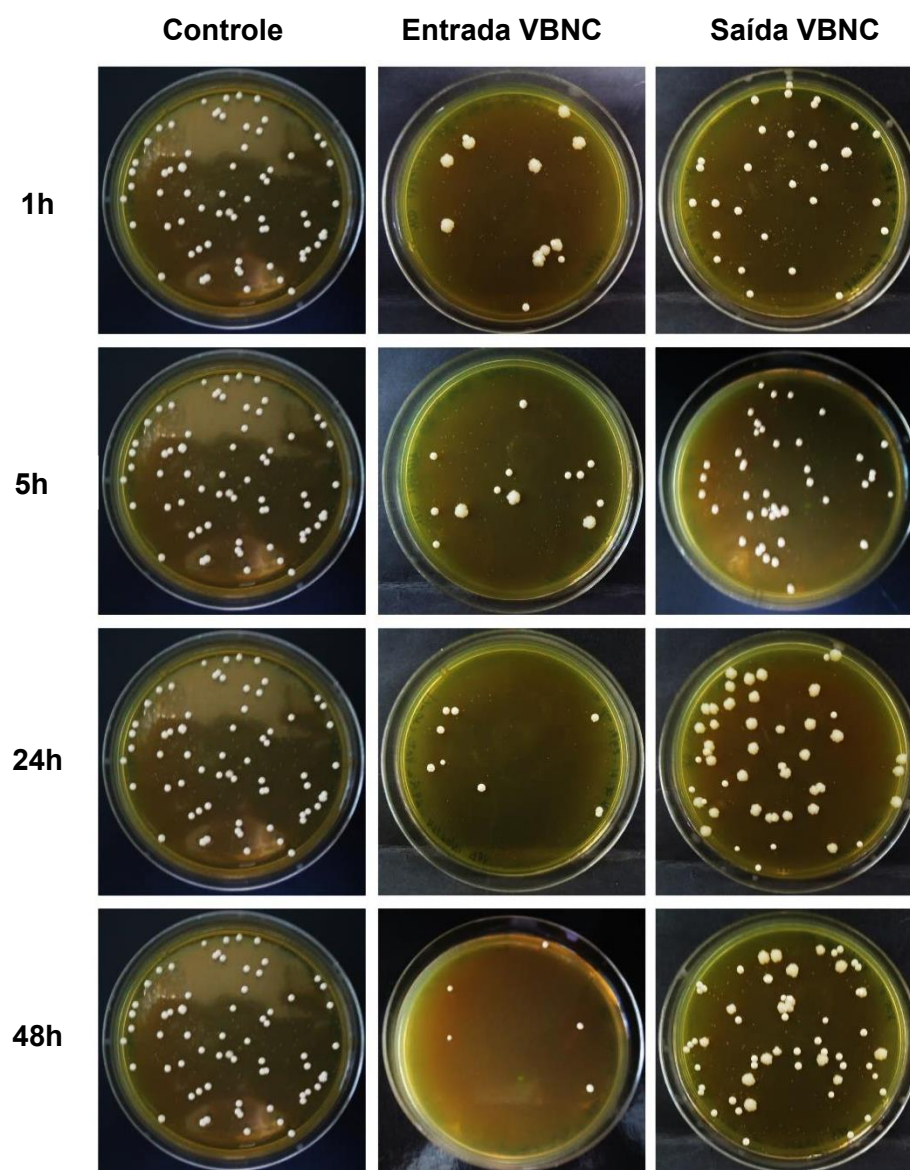
Uma verdadeira reanimação de células do estado VBNC utilizando inversão simples de estresse como mudança de temperatura e inibição de nutrientes, foi previamente descrita por Oliver, (2010) em células procariotas. Para o estudo atual, a remoção do estresse térmico (redução da temperatura de 40°C para 30°C), foi o suficiente para induzir a saída do estado VBNC e a recuperação observada na culturabilidade foi evidenciada como uma verdadeira “reanimação” e não um simples crescimento de algumas células residuais com um metabolismo normal. O estado VBNC pode ser uma estratégia de sobrevivência adotada por muitos micro-organismos quando expostos a situações de estresse, caso as células sobreviventes consigam recuperar mais uma vez a sua capacidade de se multiplicar (COLWELL, 2000).

Zeng, et al., (2013) estudaram a reanimação do estado VBNC por meio de uma mudança de temperatura, removendo 10 mL de amostra de um microcosmo e incubando a uma temperatura de 10°C, em seguida, a temperatura da cultura foi aumentada em 5°C, a cada 60 min. A culturabilidade destas amostras foram determinadas por meio de plaqueamentos das células em meio ágar nutriente. Para recuperar as células VBNC, eles adicionaram catalase e Tween 20 às amostras. As

amostras foram então incubadas a 37°C e a culturabilidade novamente foi determinada por semeadura em placas contendo meio ágar nutriente. Houve entrada das células do microcosmo no estado VBNC.

A Figura 6 A e B, mostram a culturabilidade do teste de estresse térmico após 48h na amostra CT.

A



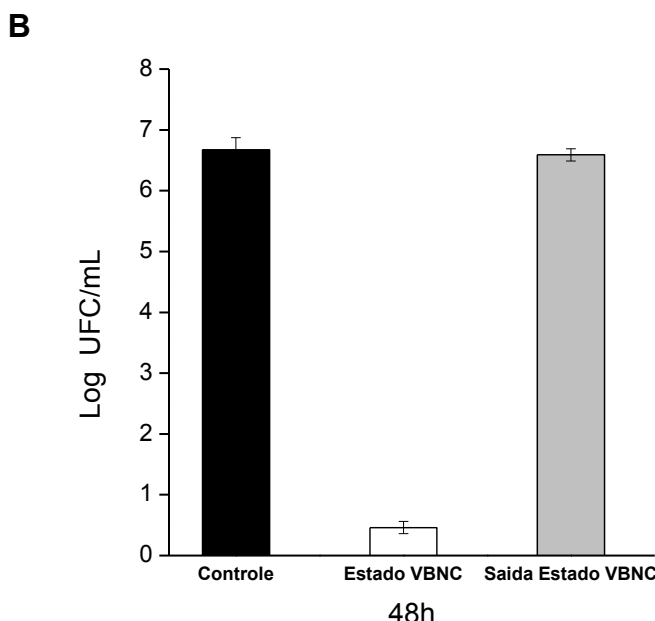


Figura 6 - (A) Semeadura do creme de levedura tratado (CT) em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse térmico. **(B)** Contagem das células (log UFC/mL) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).

Foi realizada uma comparação entre o número de células cultiváveis obtidas antes das células serem submetidas ao estresse térmico com o número de células cultiváveis obtidas após a recuperação das células do estresse (Figura 6 A e B). Nesta análise verificou-se que durante a recuperação das células (saída do estado VBNC) o número de unidades formadoras de colônias ($6,59 \pm 0,5 \times 10^6$ UFC/mL) não ultrapassou o seu número total inicial ($6,67 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL). O estado VBNC somente é caracterizado caso a culturabilidade final não ultrapasse a culturabilidade inicial, isto indica que houve recuperação celular e não apenas um crescimento das células em fase log.

O fato de que as leveduras quando entram no estado VBNC mantém a sua viabilidade, mas já não são cultiváveis pode influenciar o processo de fermentação industrial uma vez que o seu metabolismo é muito lento, podendo não produzir etanol a partir de açúcares fermentescíveis.

Já para a levedura 63M, pertencente à coleção de leveduras do laboratório (Laluce, et al., 2002), em resposta ao estresse térmico a 40°C também foi possível notar que o número de células medido pela contagem em placas diminuiu de $6,65 \pm$

0,2 x10⁶ UFC/mL para 0,39 ± 0,1 x10¹ UFC/mL, sendo uma redução de 95% das células, indicando que após dois dias sob estresse térmico estas células de leveduras também se tornaram não cultiváveis, porém mantiveram-se viáveis como observado na Figura 7.

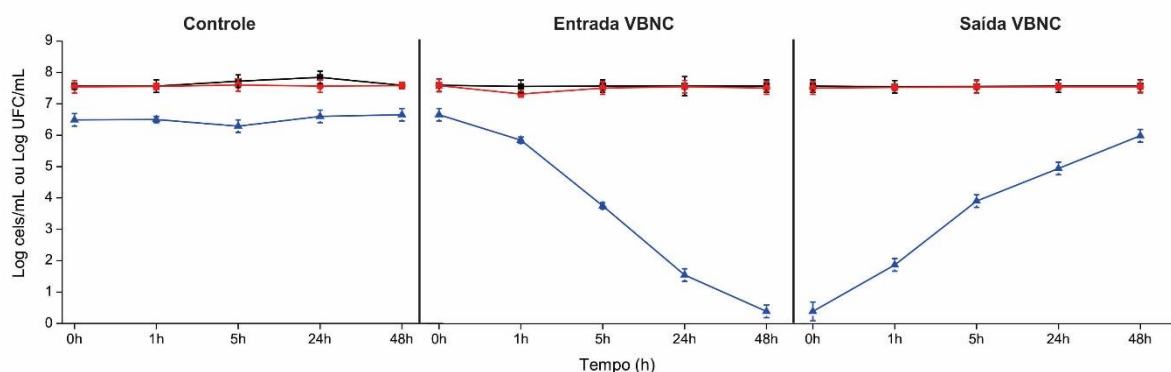


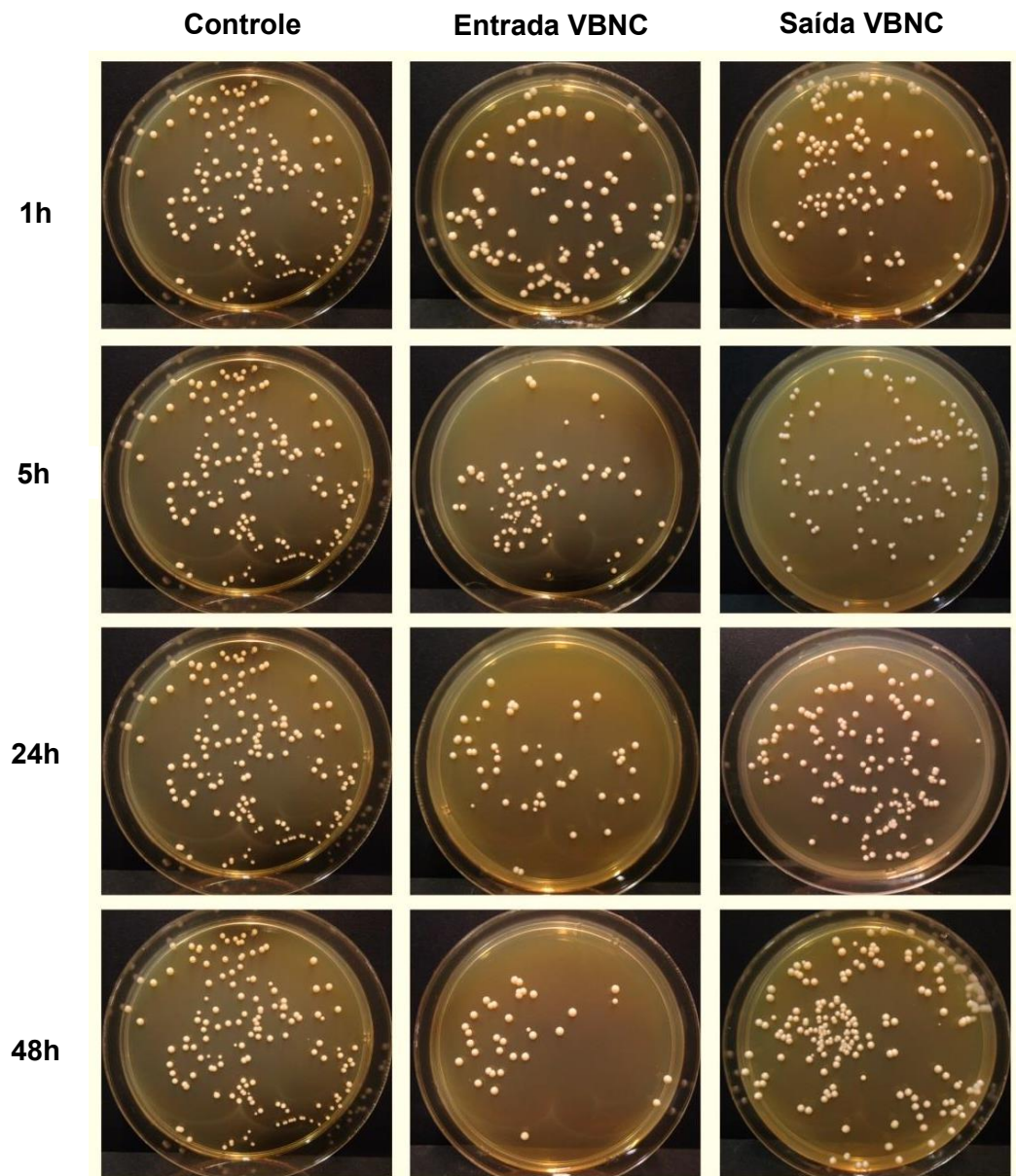
Figura 7 - Análises de entrada e saída do estado VBNC da levedura 63M antes e após estresse térmico a 40°C por 48h. Células totais (—■—), Viabilidade (—♦—) e Culturabilidade (—▲—).

Com a utilização da mesma técnica de remoção da condição estressante para identificar a saída do estado não cultivável, as células de leveduras 63M apresentaram um aumento de 72% na culturabilidade (0,39 ± 0,1 x10¹ UFC/mL para 5,98 ± 0,2 x10⁶ UFC/mL) durante a saída do estado VBNC, demonstrando também que houve uma capacidade de reanimação (Figura 7).

Mohammad et al., (2013) investigaram o efeito do estresse sulfito (SO₂) para fornecer evidências conclusivas da existência de um estado VBNC em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Populações viáveis foram monitoradas por meio de citometria de fluxo, enquanto que populações cultiváveis foram analisadas por plaqueamento em meio de cultura. Vinte e quatro horas após a aplicação do estresse com sulfito, a comparação entre a população viável e a população cultivável demonstrou a presença de células viáveis que eram não cultiváveis. Para demonstrar a saída das células de *S. cerevisiae*, do estado VBNC, os autores aumentaram o pH do meio em diferentes intervalos de tempo, permitindo assim uma recuperação das células. A similaridade entre os perfis do ciclo celular de células

VBNC e células que saem do estado VBNC juntamente com a taxa de geração de células indicou ausência de multiplicação celular durante a saída do estado VBNC.

A



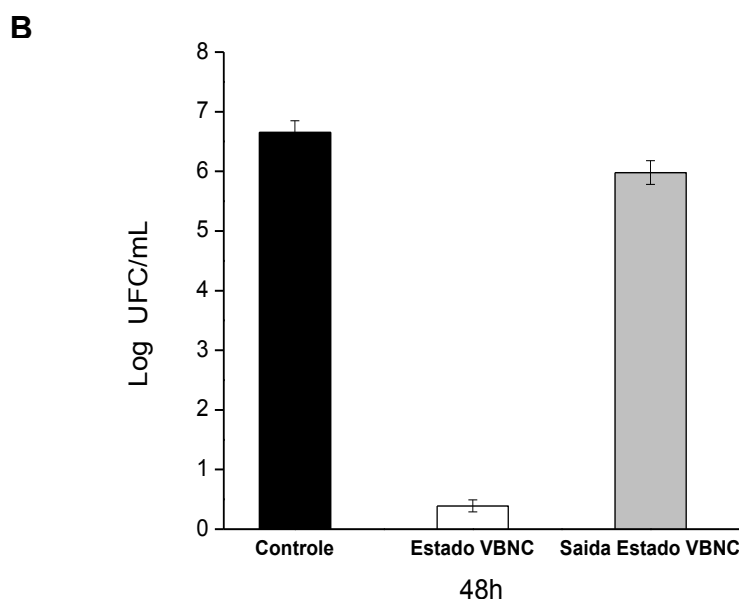


Figura 8 - (A) Semeadura da levedura 63M em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse térmico. **(B)** Contagem das células (log UFC/mL) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).

A quantidade de células cultiváveis obtidas antes do estresse térmico foi comparada com a quantidade de células cultiváveis obtidas após a saída do estado VBNC (Figura 8 A e B). Verificou-se que durante a recuperação das células, na saída do estado VBNC, o número de unidades formadoras de colônias ($5,98 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL) também não ultrapassou o seu número total inicial ($6,65 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL).

Ao comparar a resposta ao estado VBNC entre as leveduras do creme tratado (CT) e de laboratório (63M) nota-se que ambas apresentaram diminuição do número de células cultiváveis quando submetidas ao estresse térmico, mostrando que estas leveduras podem entrar em um estado de dormência quando há oscilações de temperatura durante o processo industrial.

A produção de etanol combustível através da fermentação de leveduras tem apresentado limitações econômicas. Isto ocorre devido à alta energia requerida para manter o processo de fermentação em temperaturas entre 25°C e 35°C, onde a produção de etanol, bem como a viabilidade das células é máxima (BANAT et al., 1998). O controle da temperatura aumenta os custos de produção de etanol. Assim, um sistema caro de refrigeração é exigido para manutenção da temperatura do

processo em países de clima tropicais ou no verão de países temperados (D'AMORE et al., 1989). Essa preocupação com a oscilação da temperatura também tem o intuito de manter as células viáveis e cultiváveis durante o processo.

4.3.2. Ensaios de estresse Osmótico

O estresse osmótico, assim como o estresse térmico são comuns em usinas de açúcar e álcool, sendo assim, o intuito é descobrir quando as leveduras do gênero *S. cerevisiae* são induzidas ao estado VBNC durante o processo fermentativo, analisando as formas mais comuns de estresse.

Um meio de cultura contendo 30% de sacarose foi utilizado como fator de estresse osmótico na tentativa de induzir o estado VBNC no creme de levedura tratado e na levedura 63M. A contagem de células totais e viáveis foi comparada com as células cultiváveis a fim de avaliar a entrada dessas leveduras no estado VBNC.

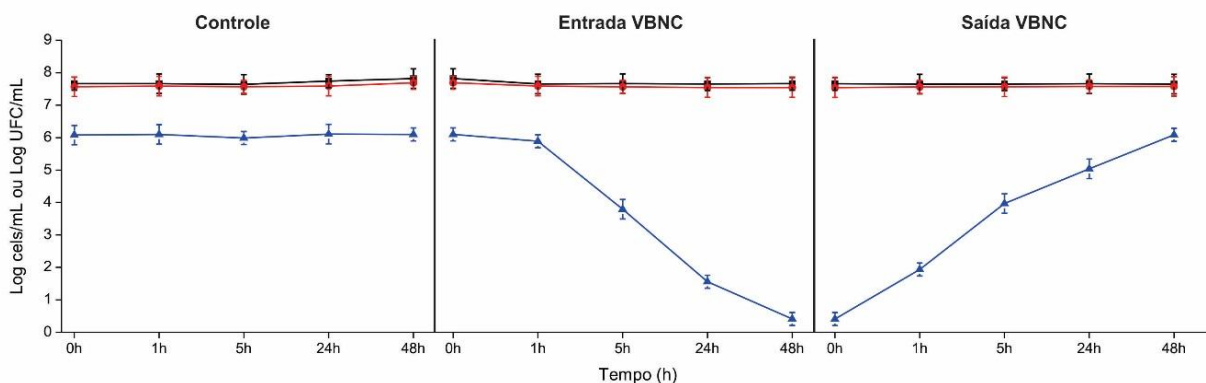
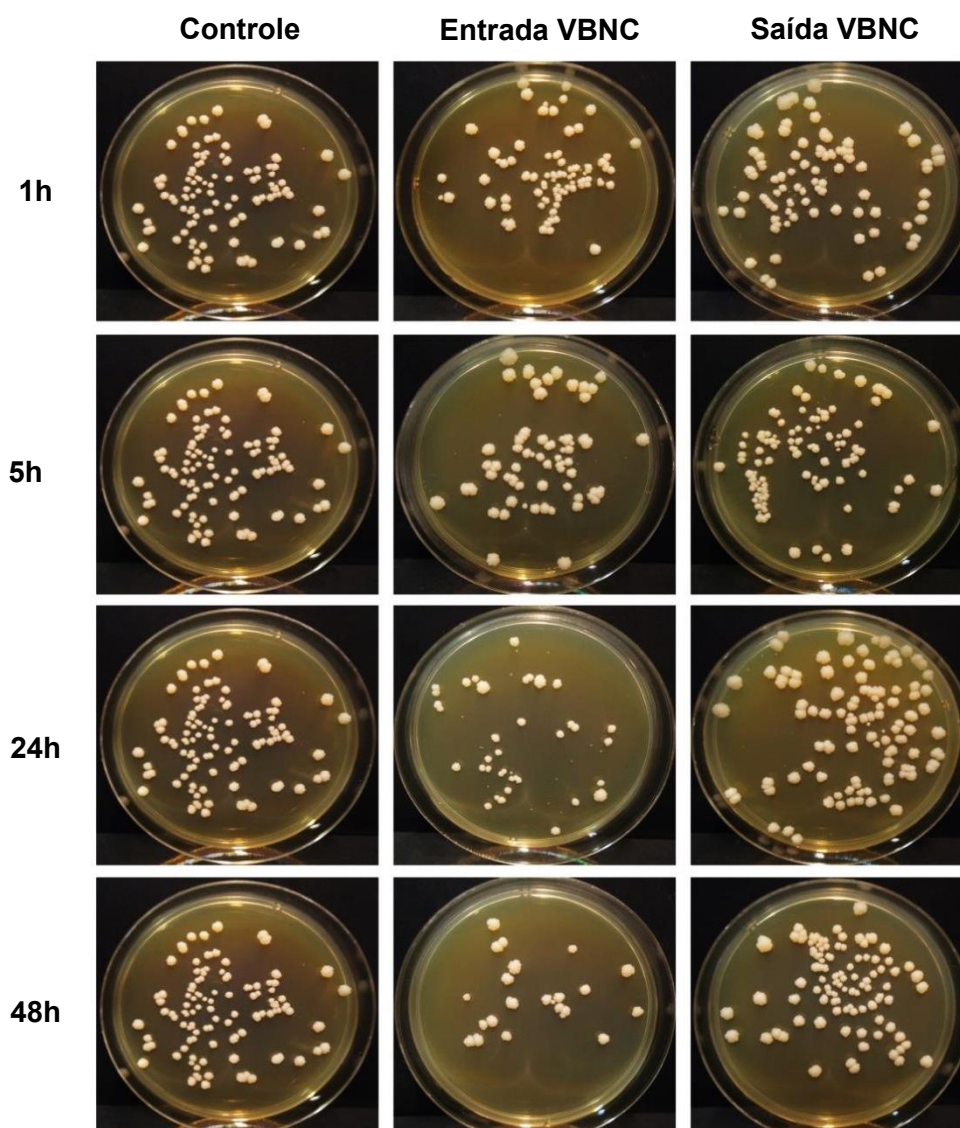


Figura 9 - Análises de entrada e saída do estado VBNC do creme tratado de levedura (CT) antes e após estresse osmótico 30% por 48h. Células totais (—■—); Viabilidade (—●—) e Culturabilidade (—▲—).

Conforme mostra a Figura 9, todas as células do creme tratado de levedura permaneceram viáveis e cultiváveis na ausência de estresse osmótico. Entretanto, quando as células de leveduras foram submetidas ao meio de cultura contendo 30% de sacarose, pode-se observar uma redução de 93% na culturabilidade celular, reduzindo de $6,10 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL para $0,41 \pm 0,2 \times 10^1$ UFC/mL, indicando que

após um período de 48h sob estresse osmótico as células do CT não foram capazes de formar colônias em meio de cultura convencional YPD, apesar de ainda estarem viáveis. Assim, essa diferença entre a culturabilidade e a viabilidade celular sugere que uma proporção significativa de células de leveduras entrou no estado VBNC.

Com a remoção do agente estressante após 48h de incubação, foi possível verificar um aumento de 93% na culturabilidade (de $0,41 \pm 0,2 \times 10^1$ UFC/mL para $6,09 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL) demonstrando uma capacidade de reanimação das células de leveduras do CT do estado VBNC, indicando também que neste caso, apenas com a simples remoção do estresse submetido, foi possível recuperar as células de leveduras que estavam dormentes.

A

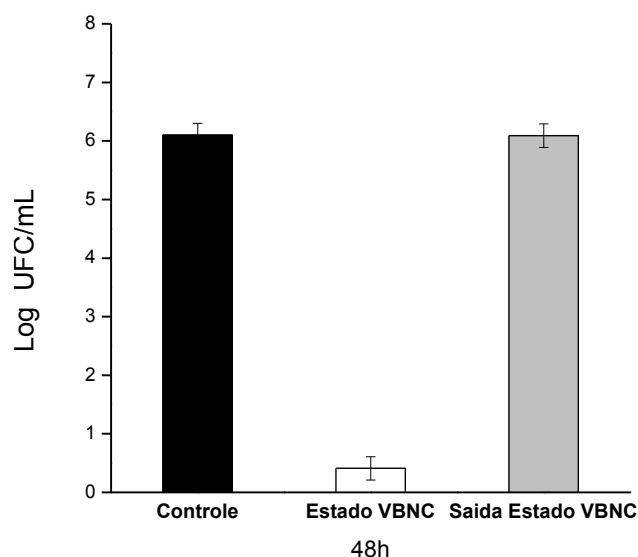
B

Figura 10 - (A) Semeadura do creme de levedura tratado (CT) em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse osmótico 30%. **(B)** Contagem das células (log UFC/mL) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).

A Figura 10 A e B, mostram a culturabilidade do creme tratado de levedura em resposta ao estresse osmótico 30%. Quando comparado a culturabilidade das células de leveduras obtidas antes do estresse osmótico com a culturabilidade obtida após o estresse osmótico, foi possível verificar que durante a recuperação das células, na saída do estado VBNC, o número de unidades formadoras de colônias ($6,09 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL) não ultrapassou o seu número total inicial ($6,10 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL). Ressaltando que o estado VBNC é caracterizado quando a culturabilidade final após a saída do estado VBNC não ultrapasse a culturabilidade inicial (Controle), indicando que houve reanimação celular e não apenas um crescimento de células (Figura 10 B).

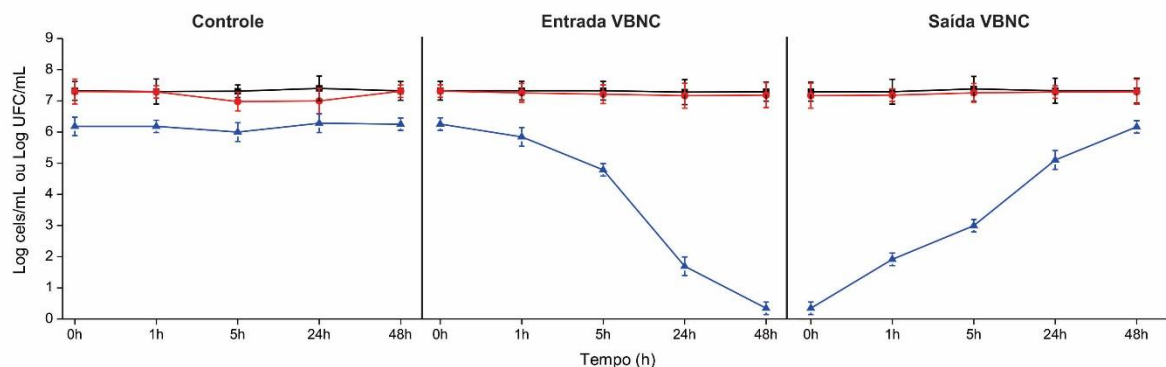


Figura 11 - Análises de entrada e saída do estado VBNC da levedura 63M antes e após estresse osmótico 30% por 48h. Células totais (—■—), Viabilidade (—♦—) e Culturabilidade (—▲—).

Quanto à levedura do laboratório 63M, como mostra a Figura 11, antes da indução do estresse osmótico, as células também se apresentavam viáveis e cultiváveis, apesar de uma pequena variação na viabilidade, porém que se manteve constante. Quando submetida ao estresse osmótico 30% (entrada VBNC), nota-se que as células de leveduras permaneceram viáveis porém não cultiváveis, havendo uma diminuição de 95% na culturabilidade durante o período analisado ($6,25 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL para $0,34 \pm 0,2 \times 10^1$ UFC/mL).

Ao analisar a saída do estado VBNC, percebe-se que as células de levedura 63M continuaram viáveis e foi possível observar uma recuperação de 86% das células que estavam não cultiváveis ($0,34 \pm 0,2 \times 10^1$ UFC/mL para $6,16 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL) apenas com a remoção da condição de estresse osmótico após 48h de incubação.

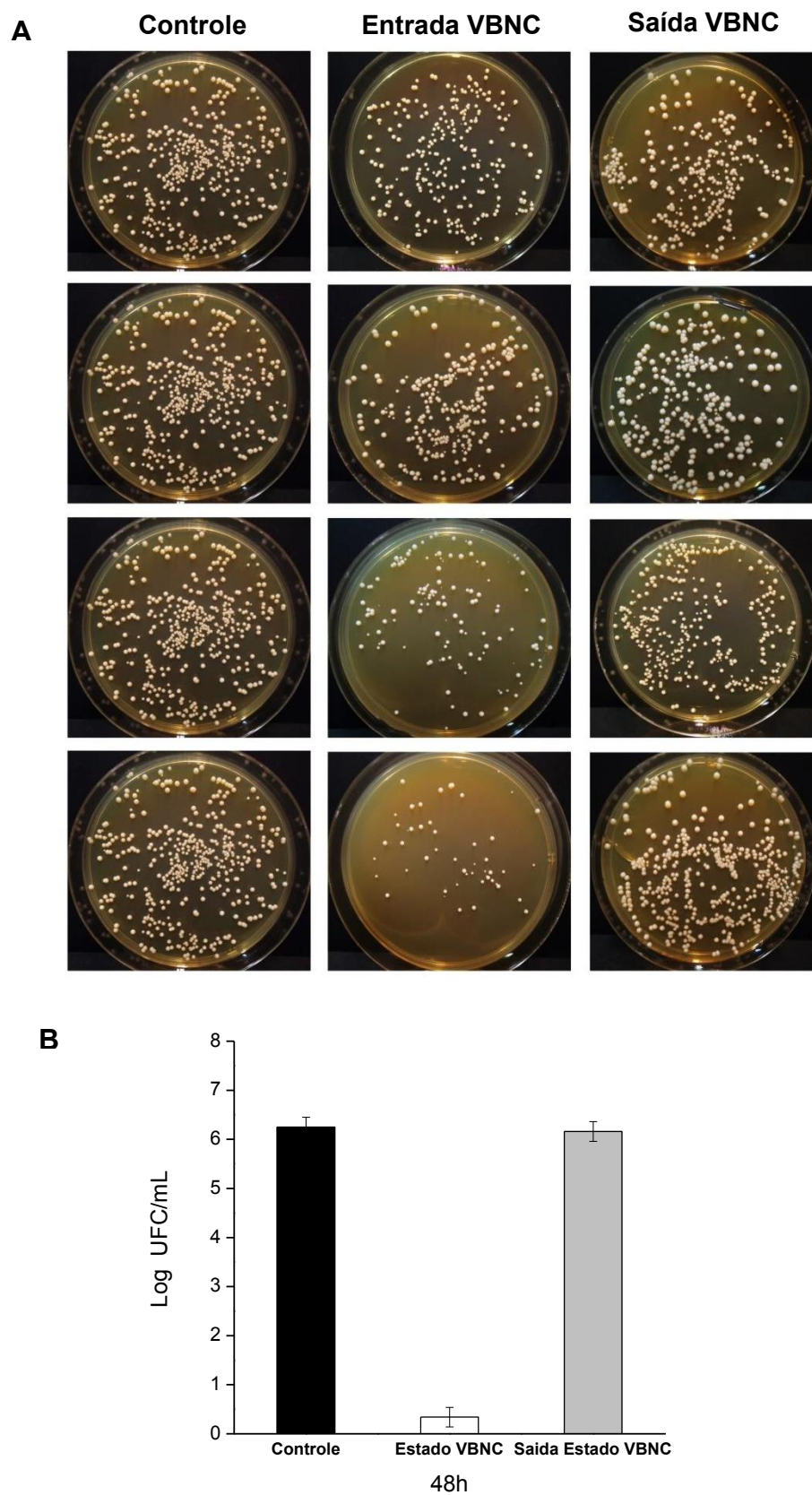


Figura 12 - (A) Semeadura da levedura 63M em placas contendo meio YPD ágar, durante a entrada e saída do estado VBNC na análise de estresse osmótico 30%. **(B)** Contagem das células (log UFC/mL) em final de permanência (48h) do estado VBNC e após saída do estado de dormência (culturabilidade).

De acordo com a Figura 12 A e B, comparando-se a quantidade de células cultiváveis obtidas antes do estresse osmótico com a quantidade de células cultiváveis obtidas após a saída do estado VBNC, foi possível analisar que durante a recuperação das células, o número de unidades formadoras de colônias ($6,16 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL) também não ultrapassou o seu número total inicial ($6,25 \pm 0,2 \times 10^6$ UFC/mL).

Do mesmo modo que ocorreu no estresse térmico, nota-se que tanto a levedura do creme tratado quanto a levedura 63M apresentaram diminuição do número de células cultiváveis quando submetidas ao estresse osmótico, indicando que ambas as leveduras podem entrar no estado VBNC em condições adversas de osmolaridade.

Tabela 1 - Comparação entre as leveduras do CT e a 63M quanto ao efeito do estresse térmico e osmótico submetido durante a análise de entrada e saída do estado VBNC, após 48h de incubação em meio YPD.

Leveduras	Efeito do estresse térmico		Efeito do estresse osmótico	
	Entrada no estado VBNC (decrécimo)	Saída do estado VBNC (aumento)	Entrada no estado VBNC (decrécimo)	Saída do estado VBNC (aumento)
CT	↓93%	↑ 93%	↓93%	↑ 93%
63M	↓ 95%	↑ 72%	↓ 95%	↑ 86%

De acordo com a Tabela 1, foi possível observar que as células de leveduras do CT que entraram em estado de dormência (93%), conseguiram recuperar-se totalmente quando saíram do estado VBNC, tanto para o estresse térmico quanto para o estresse osmótico.

Já para a levedura de laboratório 63M, não foi observado o mesmo, sendo que 95% das células entraram em estado de dormência no teste de estresse térmico e no teste de estresse osmótico, mas apenas 72% das células conseguiram recuperar-se durante a saída do estado VBNC (estresse térmico) sugerindo que 23% das células não foram capazes de retornarem a sua atividade metabólica normal, podendo ainda estar em estado de dormência, precisando de um período de tempo

maior para se recuperarem. Quanto ao estresse osmótico, 86% das células de levedura 63M foram capazes de recuperar-se do estado VBNC, sugerindo também que 9% das células ainda podem estar no estado de dormência ou mortas.

A taxa de entrada e saída do estado VBNC varia de acordo com a espécie, com as condições de estresse e também depende do estado fisiológico da população. Em algumas ocasiões o micro-organismo pode levar dias ou até anos para perder a sua culturabilidade, embora sua viabilidade seja mantida, ou ainda, a recuperação integral da capacidade de ser cultivado pode levar horas, dias, ou até anos, isto vai depender também das condições fisiológicas do micro-organismo (OLIVER, 2005).

Nota-se então, que a reanimação das células pode ser simples, apenas com a retirada do agente estressante, como pode ser extremamente complexa, sendo necessária a utilização de outros métodos para a recuperação das células do estado VBNC (ZENG, et al., 2012).

O estresse osmótico e de temperatura são amplamente estudados como fatores de indução ao estado VBNC (FLORESTA, 2006). As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção de álcool por via fermentativa. A fermentação alcoólica é um processo biológico conduzido geralmente por leveduras do gênero *S. cerevisiae* e por este motivo a sua fisiologia vem sendo amplamente estudada, de forma simples ou por meio de mecanismos genéticos com o intuito de melhorar o rendimento etanólico das usinas. A entrada das células no estado VBNC, pode diminuir ou dependendo das condições do processo inviabilizar a produção e o rendimento final de etanol. Sendo assim, estudar os tipos mais comuns de estresse durante o processo fermentativo pode ajudar a elucidar melhorias ou formas de impedir ou diminuir a entrada das células de levedura nesse estado.

Conclusões

CONCLUSÕES

- Ambas as leveduras estudadas neste trabalho (CT e 63M) entraram no estado VBNC, pois apresentaram diminuição do número de células cultiváveis quando foram submetidas aos estresses, enquanto ainda estavam viáveis.

- A levedura do CT obteve uma recuperação integral do número de células não cultiváveis em ambos os estresses testados, recuperando os 93% das células que entraram em estado de dormência.

- A levedura 63M obteve uma recuperação parcial do número de células não cultiváveis, sendo que dos 95% das células que entraram no estado de dormência, apenas 72% e 86% das células foram capazes de retornarem as suas atividades metabólicas normais, respectivamente para o estresse térmico e estresse osmótico.

- A remoção da condição de estresse foi suficiente para que as leveduras saíssem do estado VBNC.

- O efeito dos estados transitórios de entrada e saída do estado VBNC podem ter efeitos negativos sobre a produção do etanol combustível.

- Um estudo mais aprofundado utilizando uma fermentação em escala piloto e análises genéticas deve ser realizado em trabalhos futuros.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; WOUTERS, J. A. Microbiol stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 65-91, 1999.
- AGNOLUCCI, M.; REA, F.; SBRANA, C.; CRISTANI, C.; FRACASSETTI, D.; TIRELLI, A.; NUTI, M. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 76-80, 2010.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, S. R.; ATECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ATTFIELD, P. V.; CHOI, H. Y.; VEAL, D. A.; BELL, P. J. L. Heterogenety of stress gene expression and stress resistance amog individual cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 1000-1008, 2001.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 89-105, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I - yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 809-821, 1998.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Chap. 5, p. 85-100.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de; OLIVEIRA, A. J. de; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; DECLERQ, E.; JUGIAN, F.; CAPPELIER, J. M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Research**, v. 33, p. 359-370, 2002.

BLEVE, G.; RIZZOTTI, L.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4116-4122, 2003.

BOGOSIAN, G.; BOURNEUF, E. V. A matter of bacterial life and death. **EMBO Reports**, v. 2, n. 9, p. 770-774, 2001.

BREJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 27-38, 2002.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 7, p. 1151-1161, 2008.

COLWELL, R. R. Bacterial death revisited. In: COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. (Ed). **Nonculturable microorganisms in the environment**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2000. p. 325-342.

D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. **Enzyme Microbial Technology**, v. 11, p. 411-416, 1989.

DHIAF, A.; BAKHROUF, A.; WITZEL, K. P. Resuscitation of eleven year VBNC *Citrobacter*. **Journal of Water and Health**, v. 6, p. 565-568, 2008.

DIVOL, B.; LONVAUD-FUNEL, A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 85-93, 2005.

DORTA, C.; OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M. S. de; NICOLAU JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 177-182, 2006.

DUBNAU, D.; TURGAY, K. Regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress. In: STORS, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Ed.). **Bacterial stress responses**. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 249-260.

DUCKITT, E. **Investigating the impact of sulphur dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a molecular and cellular level**. 2012. 89 p. Thesis (Master of Science) - Faculty of Science, Stellenbosch University, Stellenbosch, 2012.

du TOIT, W. J.; PRETORIUS, I. S.; LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 862-871, 2005.

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

FLEET, G. H. Yeast spoilage of foods and beverages. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, chap. 5, p. 53-63.

FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado viável e não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escheichia coli***. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés em la levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, n. 1/2, p. 24-46, 2004.

FROUDIERE, I.; LARUE, F.; LONVAUD-FUNEL, A. Utilisation del epifluorescence pour la detection des micro-organismes dans le vin. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, v. 24, p. 43-46, 1990.

GAUTHIER, M. J. Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. (Ed.). **Nonculturable micro-organisms in the environment**. Washington, DC: ASM Press, 2000. Chap. 7, p. 87-112.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2004.

GUILLOU, S.; BESNARD, V.; EI MURR, N.; FEDERIGHI, M. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 85-89, 2003.

GUNASEKERA, T. S.; SORENSEN, A.; ATTFIELD, P. V.; SORENSEN, S. J.; VEAL, D. A. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1988-1993, 2000.

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

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

HELMANN, J. D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Advances in Microbial Physiology**, v. 46, p. 47-110, 2002.

HOBBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, p. 1225-1228, 1977.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. London: Elsevier, 2011. v. 1, chap. 3, p. 21-44.

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

KOCH, A. L. What size should a bacterium be? A question of scale. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 317-348, 1996.

LAI, C. J.; CHEN, S. Y.; LIN, I. H.; CHANG, C. H.; WONG, H. C. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 118-124, 2009.

LALUCE, C.; SOUZA, C. S.; ABUD, C. L.; GATTAS, E. A. L.; WALKER, G. M. Optimization of ethanol production by yeast strain 63M and a strategy to improve cell survival at high temperatures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 140-144, 2002.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia industrial, v. 3).

LINDBACK, T.; ROTTENBERG, M. E.; ROCHE, S. M.; RORVIK, L. M. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolated from salmon, patients and environment. **Veterinary Research**, v. 41, p. 8-12, 2010.

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

LLEO, M. M.; BONATO, B.; TAFI, M. C.; SIGNORETTO, C.; BOANETTI, M.; CANEPARI, P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 1095-1102, 2001.

LOPES, M. L.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CHERUBIN, R. A.; BASSO, L. C. Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEAST, 11., 2004, Rio de Janeiro. **Abstracts...** [S.l.]: International Commission on Yeast, 2004. p. 183.

LOWDER, M.; UNGE, A.; MARAHA, N.; JANSSON, J. K.; SWIGGETT, J.; OLIVER, J. D. Effect of starvation and the viable but nonculturable state on green fluorescent protein fluorescence in GFP tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3160-3165, 2000.

LUCENA, B. T.; SANTOS, B. M. dos; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSH, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, F. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiololy**, v. 10, p. 298-306, 2010.

MAKINO, S.-I.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 enter the VNC state in salmon roe? **Applied Environmental Microbiololy**, v. 66, p. 5536-5539, 2000.

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

MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E. A.; COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4884-4893, 2002.

MOHAMMAD, S.; SANDRINE, R.; ANABELLE, S. G.; BENOIT, D.; HERVE', A. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013. doi: 10.1371/journal.pone. 0077600.

MONTVILLE, T. J. Principles which influence growth, survival, and death in foods. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamental and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 13-29.

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

MUKHTAR, K.; ASGHER, M.; AFGHAN, S.; HUSSAIN, K.; ZIA-UL-HUSSNAIN, S. Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010. doi:10.1155/2010/419586.

NAGAI, S. Diagnostic color differentiation plates hereditary respiration efficiency in yeast. **Journal Bacteriology**, v. 86, p. 299-302, 1963.

OLIVER, J. D. Formation of viable but non culturable cells. In: KJELLBERG, S. (Ed.). **Starvation in bacteria**. New York: Plenum Press, 1993. p. 239-271.

OLIVER, J. D. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. (Ed.). **Nonculturable microorganisms in the environment**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2000. p. 277-300.

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

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

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

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

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 1, 524 p.

PRETORIUS, I. A. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking review. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; OLMO, M. del.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1/2, p. 3-10, 2003.

RIVERA, C. R.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1682-1687, 2006.

ROLLINS, M. D.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 531-538, 1986.

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

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

ROTH, W. G.; LECKIE, M. P.; DIETZLER, D. N. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. **Applied and Environment Microbiology**, v. 53, p. 3142-3146, 1988.

SAITO, A.; OTSUKA, K.; HAMADA, Y.; ONO, K.; MASAKI, H. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentration from dried squid and behaviors of those strains in the dried squid Japan. **Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 11-17, 2000.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1256-1261, 1982.

SERPAGGI, V.; REMIZE, F.; RECORBET, G.; GAUDOT-DUMAS, E.; SEQUEIRA-LE GRAND, A.; ALEXANDRE, H. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 438-447, 2012.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Guide to yeast genetics and molecular biology**. New York: Academic Press, 1991. p. 21-37. (Methods enzymology, v. 194).

STEINERT, M.; EMODY, L.; AMANN, R.; HACKER, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR 32 by *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2047-2053, 1997.

TURPIN, P. E.; MAYCROFT, K. A.; ROWLANDS, C. L.; WELLINGTON, E. M. H. Viable but non-culturable salmonellas in soil. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 421-427, 1993.

WALKER, G. W. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998. 350 p.

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

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

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

YOUSEF, A. E.; COURTNEY, P. D. Basics of stress adaptation and implications in new generation foods. In: YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. (Ed.). **Microbiol stress adaptation and food safety**. Washington, DC: CRC Press, 2003. Chap. 1, p. 369-399.

ZENG, B.; ZHAO, G.; CAO, X.; YANG, Z.; WANG, C.; HOU, L. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi*. **BioMed Research International**, 2013. doi:10.1155/2013/1907170.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 23-30, 2009.

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

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