

EFEITO DE ÁCIDO SOBRE O CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *Salmonella enterica* ENTERITIDIS ISOLADA DE CARÇA DE SUÍNO

SILVA, Simone Quintão¹
SANTOS, Miriam Teresinha dos²
PAES, Simone Albino²

Recebido em: 2014.11.26

Aprovado em: 2015.06.10

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.1499

RESUMO: Considerando que a tolerância ao ácido é um importante fator de virulência relacionado à sobrevivência ao baixo pH da secreção gástrica em patógenos veiculados por alimentos e o expressivo aumento da prevalência de *Salmonella* sorovar Enteritidis nos últimos anos, como agente etiológico de salmonelose humana, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de ácido sobre o crescimento e sobrevivência de *Salmonella* sorovar Enteritidis. O crescimento de *S. Enteritidis* CCS3, isolada de carcaça suína, e *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi determinado em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) com valores de pH que variaram de 3,5 a 7,2. A sobrevivência foi avaliada no mesmo meio com pH entre 1,5 e 3,5. Avaliou-se também a tolerância ao Fluido Gástrico Simulado (FGS) dessas bactérias. *S. Enteritidis* CCS3 apresentou valores maiores de velocidade específica de crescimento em TSB acidificado e sobreviveu por mais tempo em pH inferior a 3,5 do que *S. Enteritidis* ATCC 13076. As células de *S. Enteritidis* CCS3 apresentaram tolerância à exposição ao FGS por até uma hora. Contrariamente, células de *S. Enteritidis* ATCC 13076 perderam a culturabilidade após 10 minutos de desafio ao FGS.

Palavras-chave: Sobrevivência. Carne. Patógeno

EFFECT OF ACID ON GROWTH AND SURVIVAL OF *Salmonella enterica* ENTERITIDIS ISOLATED FROM SWINE

SUMMARY: Considering that the acid tolerance is an important virulence factor related to survival at low pH of gastric barrier of foodborne pathogens and the expressive increasing of prevalence of *Salmonella* serovar Enteritidis in recent years as etiologic agent of human salmonellosis, this work aimed evaluate the effect of acid on the growth and survival of on *Salmonella* serovar Enteritidis. The growth of *S. Enteritidis* CCS3 isolated of swine carcass and *S. Enteritidis* ATCC 13076 at Trypticasein and Soya Broth (TSB) with pH values between 3.5 and 7.2 and the survival in the same media with pH values between 1.5 and 3.5 were investigated. The tolerance to simulated gastric fluid (SGF) of these cells was also evaluated. *S. Enteritidis* CCS3 presented higher values of specific growth rate in acidified TSB and this culture had longer time survival in pH < 3.5 than *S. Enteritidis* ATCC 13076. The cells of *S. Enteritidis* CCS3 were tolerant until one hours SFG exposure. Instead, cells of *S. Enteritidis* ATCC 13076 lost culturability after 10 minutes of SFG challenge.

Keywords: Survival. Meat. Pathogens

INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais consumida em termos de mercado mundial, devido seu elevado teor nutritivo e atributos sensoriais. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína. Para atender as exigências do mercado e evitar toxinfecções ocasionadas pelo consumo de produtos contaminados o sistema de biossegurança, de qualidade e segurança alimentar, vem se aprimorando (ABPA, 2014).

¹ IBILCE/UNESP

² UFV

O gênero *Salmonella* pode ser responsável por infecções veiculadas por alimentos de origem animal, incluindo carne suína, representando um risco à saúde pública.

Sorovares de *Salmonella enterica* são os agentes mais comuns de doença de origem alimentar no mundo. Microrganismos desse gênero são capazes de colonizar e causar infecções em vários animais, tais como aves, suínos, gado, roedores e seres humanos. Sorovares como *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) infectam diferentes animais, enquanto outros, como *Salmonella Typhi* são restritos a hospedeiros específicos (STEVENS *et al.*, 2009).

S. Enteritidis é um dos sorotipos mais encontrados nos alimentos. A fonte mais comum de isolamento são os ovos, no entanto, outras fontes como o leite cru, carnes bovina e suína também estão associadas aos surtos causados por esse patógeno (CDC, 2010).

No Brasil a presença de *Salmonella* spp. em abatedouros de aves e suínos é significativa (BESSA *et al.*, 2004; BORSOI *et al.*, 2011; KICH *et al.*, 2011; MILBRADT *et al.*, 2014). Além disso, o isolamento desse patógeno em linguça, carcaças de suínos, em carnes de frango e em vegetais minimamente processados tem sido documentada (OLIVEIRA *et al.*, 2005; MÜRMAN *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2011).

Estratégias têm sido empregadas nos abatedouros a fim de evitar a contaminação por esse patógeno, dentre elas, temperaturas altas e baixas, pressão e aplicação de sais, ácidos e a combinação de vapor com soluções ácidas (SUN *et al.*, 2003; PIPEK *et al.*, 2006). Porém essas estratégias geram ambientes de estresse moderado e os microrganismos possuem a capacidade de responder e de se adaptar a essas condições adversas. Essa resposta varia principalmente com o tipo e intensidade do estresse e o estado fisiológico do microrganismo (LOU; YOUSEF, 1997).

Poucos microrganismos são capazes de lidar com essa variedade de estresses presente nos ambientes como os sorovares de *Salmonella enterica* (STOCKER; MAKELA, 1986; D'AOUST; BAILEY, 2001; RYCHLIK; BARROW, 2005; KENYON; SPECTOR, 2011).

Esses estresses têm um efeito significativo na sobrevivência de *Salmonella* durante o processamento, preparo e estocagem dos alimentos, bem como durante sua passagem pelas barreiras do corpo humano, incluindo o suco gástrico. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a sobrevivência e crescimento de duas cepas de *S. Enteritidis* inoculada em TSB acidificado e em Fluido Gástrico Simulado (FGS).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo duas culturas do sorotipo *S. Enteritidis*. O isolado CCS3 obtido a partir de carcaça de suíno por Lima *et al.* (2004); e a cultura de referência *S. Enteritidis*

ATCC 13076. As culturas foram mantidas em caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Merck®) contendo 20% de glicerol e congeladas a -18 °C.

Em cada experimento, CCS3 e ATCC 13076 foram reativadas em Caldo Trypticaseína e Soja (TSB) e incubadas a 37 °C por, aproximadamente, 12 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação em centrífuga Sorvall RT 6000D (Du Pont Company, USA), a 1275 g por dez minutos, ressuspendidas em solução salina 0,85%, novamente centrifugadas sob as mesmas condições e padronizadas em 10^8 UFC mL⁻¹ correspondente a uma densidade ótica de aproximadamente 0,60 em espectrofotômetro Spectronic 20D, em comprimento de onda de 600 nm.

As culturas padronizadas conforme citado acima foram inoculadas em TSB acidificado com os valores de pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,2 (controle) até que as amostras atingissem DO_{600 nm} 0,05. Em seguida, um volume de 180 µL desta suspensão foi transferido, em triplicata, para microplacas esterilizadas e incubadas a 37 °C ± 1. Foram realizadas leituras periódicas de DO_{600 nm} em aparelho leitor de placas de ELISA (Versa Max® Molecular Devices) com intervalos de 30 minutos por até 12 horas.

Foram construídas curvas de crescimento e calculados os valores de velocidades específicas de crescimento (μ) para determinar o valor de pH que afeta a taxa de crescimento dessas bactérias.

As culturas padronizadas foram inoculadas na proporção de 1:3 em caldo TSB ajustado para os seguintes valores de pH 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5, e incubadas a 37 °C ± 1. Alíquotas das suspensões de células foram retiradas em intervalos de tempo que variaram de acordo com o valor de pH. Em caldo TSB com valores de pH 3,0 e 3,5 as amostras foram retiradas de quatro em quatro horas, em pH 2,5 de duas em duas horas e em pH 2,0 e 1,5, de 20 em 20 minutos por até 24, dez e quatro horas, respectivamente. Essas amostras foram plaqueadas em ágar Trypticaseína e Soja (TSA) pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) para determinação do número de células sobreviventes.

As culturas de CCS3 e ATCC 13076 foram avaliadas quanto a tolerância ao FGS, seguindo metodologia adaptada de Campbell *et al.* (2004). Alíquotas de 5 mL das culturas padronizadas foram diluídas na proporção de 1:1 em FGS (pH 1,5) e mantidas a 37 °C.

O FGS foi preparado de acordo com Beumer *et al.* (1992), e foi previamente aquecido a 37 °C antes da mistura com as amostras.

A tolerância a ácido foi monitorada por meio de plaqueamento, em triplicata, utilizando a técnica de microgotas descrita por Morton (2001) em ágar TSA, em intervalos de tempo de 10 minutos por até uma hora para a cultura CCS3, e de dez minutos por até meia hora, para a cultura

ATCC 13076. O pH da mistura do FGS com as amostras foi monitorado ao final de todos os experimentos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O efeito do pH sobre o crescimento de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 está apresentado nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A CCS3 apresentou crescimento semelhante em caldo TSB com valores de pH acima de 5,5, enquanto que a ATCC 13076 cresceu de forma similar em valores de pH acima de 5,0. CCS3 entrou em fase estacionária após três horas de crescimento, enquanto que a ATCC 13076 entrou após cinco horas. Não foi observado crescimento de CCS3 e ATCC 13076 em meio TSB ajustado para valores de pH 3,5 e 4,0, respectivamente, no período de 12 horas de incubação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lin *et al.* (1995) que verificaram que *S. Typhimurium* teve crescimento inibido em caldo Luria Bertani (LB) com pH ajustado para 4,0 e com os observados por Bryan *et al.* (1979), que verificaram que *Salmonella* apresenta crescimento no intervalo de pH 4,0 a 9,0, sendo pH ótimo próximo de 7,0.

Na Tabela 1, são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento, velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica máxima (D.O._{max}), de ambas as culturas. A redução da velocidade específica de crescimento e da densidade óptica máxima foi observada com a diminuição do valor de pH do meio. Além de crescer em uma faixa mais ampla de pH, *S. Enteritidis* CCS3 apresentou valores maiores de velocidades específicas de crescimento do que *S. Enteritidis* ATCC 13076 em todas as condições avaliadas.

No entanto, os valores de densidade óptica máxima da cultura ATCC 13076 foram discretamente maiores que os da CCS3 em valores de pH igual ou maior a 5,0. Somente nos valores de pH 4,0 e 4,5 a CCS3 alcançou maiores valores de D.O._{max}. Como essa variação nos valores de D.O._{max} é pequena, acredita-se que a população final das culturas seja semelhante.

Figura 1. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis CCS3 em TSB a 37 °C com pH ajustado para valores entre 3,5 e 7,2. pH 3,5 (▲); pH 4,0 (□); pH 4,5 (●); pH 5,0 (*); pH 5,5 (Δ); pH 6,0 (■); pH 6,5 (○), pH 7,2 (*).

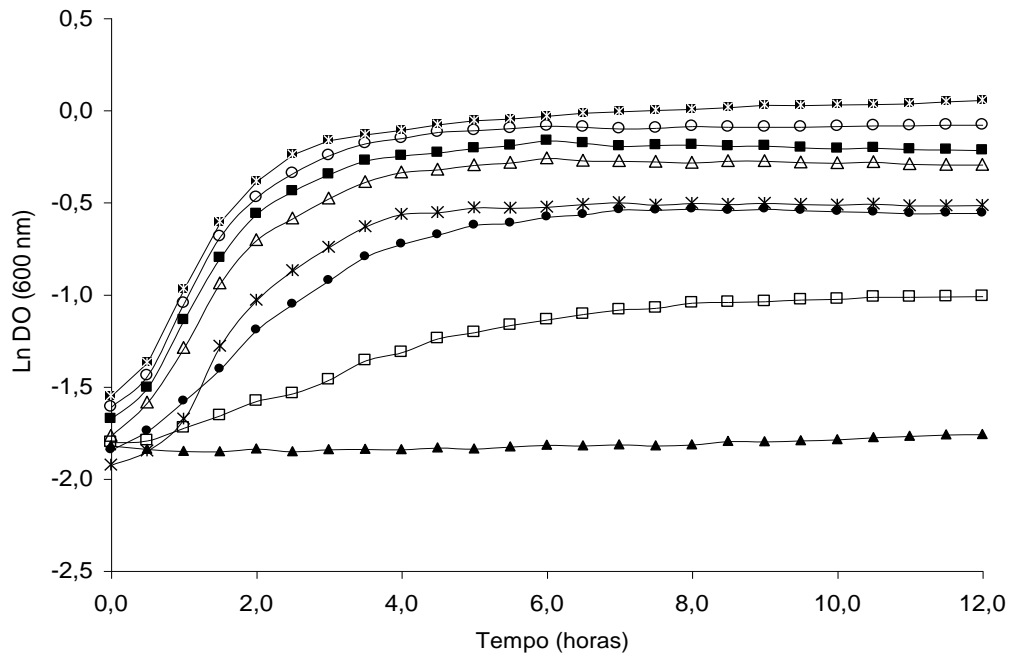


Figura 2. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em TSB a 37 °C com pH ajustado para valores entre 4,0 e 7,2. pH 4,0 (▲); pH 4,5 (□); pH 5,0 (●); pH 5,5 (*); pH 6,0 (Δ); pH 6,5 (■); pH 7,2 (○).

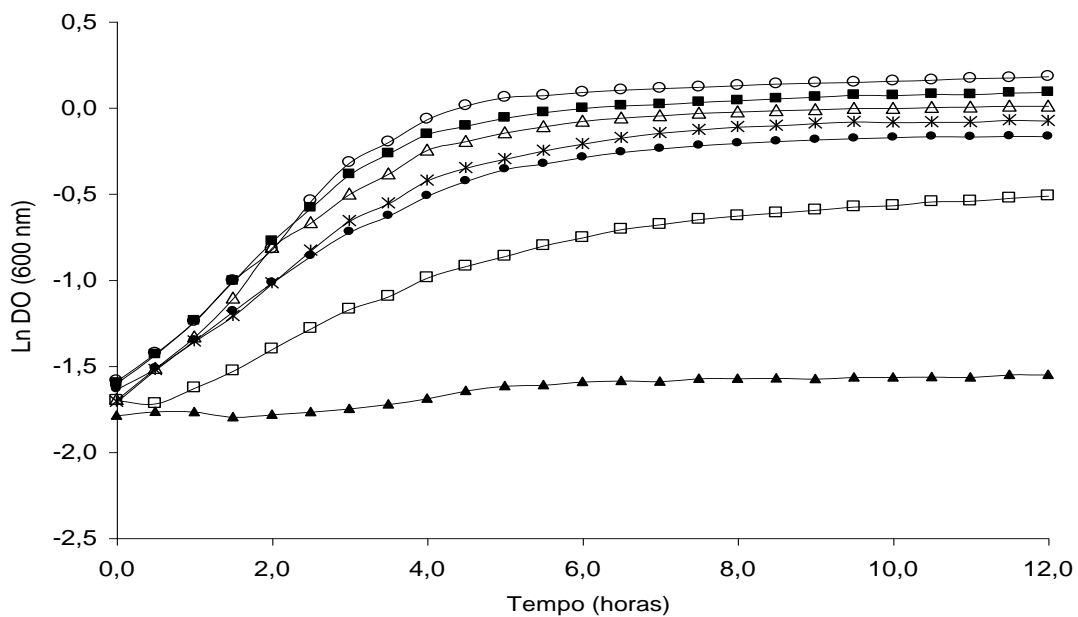


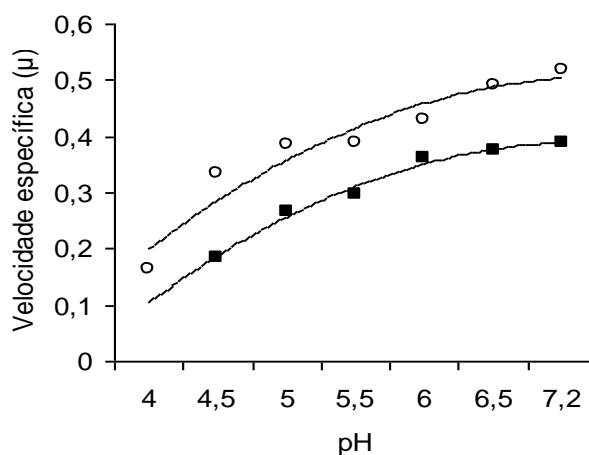
Tabela 1. Velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica máxima ($D.O_{(max)}$) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 e ATCC 13076, cultivadas em TSB com pH ajustado para valores entre 4,0 e 7,2, por 12 horas

Valores de pH	<i>S. Enteritidis</i> CCS3		<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	
	μ^* (h^{-1})	$D.O_{(max)}$ **	μ (h^{-1})	$D.O_{(max)}$
4,0	0,1644 \pm 0,1145***	0,3931	-	-
4,5	0,3338 \pm 0,1676	0,6445	0,1852 \pm 0,0098	0,5798
5,0	0,3867 \pm 0,0456	0,6580	0,2675 \pm 0,0208	0,8166
5,5	0,3875 \pm 0,0448	0,8057	0,2949 \pm 0,0158	0,8938
6,0	0,4293 \pm 0,0334	0,8794	0,3611 \pm 0,0272	0,9827
6,5	0,4907 \pm 0,0397	1,0124	0,3766 \pm 0,0042	1,0573
7,2	0,5175 \pm 0,0455	1,1599	0,3882 \pm 0,0108	1,1721

* Média da velocidade específica de três repetições; ** Média da densidade óptica determinada a 600 nm de três repetições; *** Desvio padrão de três repetições.

Os valores de pH influenciaram a velocidade específica de crescimento das culturas, quando o pH aumentou de 4,0 para 7,2. Considerando que estresse é uma alteração das condições ótimas de crescimento na qual há redução da taxa de crescimento ou da sobrevivência dos microrganismos (YOUSEF; JUNEJA, 2002), a faixa de pH entre 4,0 e 6,0 foi considerada condição de estresse ácido sub-letal para *S. Enteritidis* CCS3, pois os valores de μ apresentaram redução variando de 17 a 68,2% em relação ao controle (pH 7,2) e a faixa de 4,5 a 5,5, para *S. Enteritidis* ATCC 13076 que apresentou redução de μ variando de 24 a 52,3%. Esses valores de estresse ácido sub-letal estão de acordo com os valores empregados em alguns estudos de tolerância a ácido em *Salmonella*, que variam entre pH 4,0 e 6,0 (FOSTER; HALL, 1991; LEYER; JOHNSON, 1993; BAIK *et al.*, 1996).

Figura 3. Efeito dos diferentes valores de pH sobre a velocidade específica de crescimento (μ) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 (○) e ATCC 13076 (■).



A incubação de *S. Enteritidis* CCS3 e ATCC 13076 em caldo TSB com o pH ajustado para valores entre 1,5 e 3,5 resultou na inativação celular e o número de sobreviventes diminuiu

com a queda do pH em meio de cultura (Tabela 2). *S. Enteritidis* CCS3 demonstrou ser mais tolerante ao pH baixo e a redução do número de ciclos logarítmicos foi sempre menor do que a redução observada para *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Tabela 2. Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) de *Salmonella* Enteritidis CCS3 e ATCC 13076 em caldo TSB a 37 °C com pH ajustado para valores entre 1,5 e 3,5

Estirpe	pH	População Inicial	População Final	Δ^*	Tempo** (h)
<i>S. Enteritidis</i> CCS3	3,5	8,27	7,77	0,5	24
	3,0	8,38	6,88	1,5	24
	2,5	7,59	6,11	1,48	10
	2,0	8,00	≤ 2,0***	≥ 6,0	4
	1,5	7,36	≤ 2,0	≥ 5,36	4
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	3,5	8,58	8,00	0,58	24
	3,0	8,50	2,64	5,86	24
	2,5	8,50	≤ 2,0	≥ 6,5	8
	2,0	8,58	≤ 2,0	≥ 6,58	1,3
	1,5	8,53	≤ 2,0	≥ 6,53	1

* Diferença entre populações inicial e final, corresponde à redução em ciclos logarítmicos; ** Tempo máximo avaliado em horas para cada condição de pH; *** Valor corresponde ao limite de detecção da técnica de microgotas utilizada.

A sobrevivência das culturas foi semelhante no pH 3,5. Em valores de pH menores que 3,5, a redução média de ciclos logarítmicos para a ATCC 13076 foi sempre superior a de CCS3, além disso, o tempo necessário para essa queda de ciclos logarítmicos foi sempre menor para a ATCC 13076. Nos valores de pH 1,5 e 2,0, um período de exposição três vezes menor foi suficiente para a redução da população da cultura ATCC 13076 até o limite de detecção (10² UFC mL⁻¹). Os resultados de sobrevivência em pH 3,0 de CCS3 são semelhantes para *Salmonella* Typhimurium que, crescida até fase estacionária, sobreviveu em meio mínimo ajustado com pH 3,0 por mais de quatro horas (LIN *et al.*, 1995). Outro trabalho realizado com Enterobactérias indica que *Escherichia coli* K-12 e *Shigella flexneri*, crescidas até a fase estacionária, sobreviveram por várias horas em pH 2 e 3, sendo que esses valores são considerados menores que o limite ácido para crescimento que é de aproximadamente 4,5 (SMALL *et al.*, 1994). Esses resultados de sobrevivência em baixo pH são preocupantes, uma vez que esse é um dos recursos utilizado para se controlar a contaminação de alimentos contra patógenos e deterioradores.

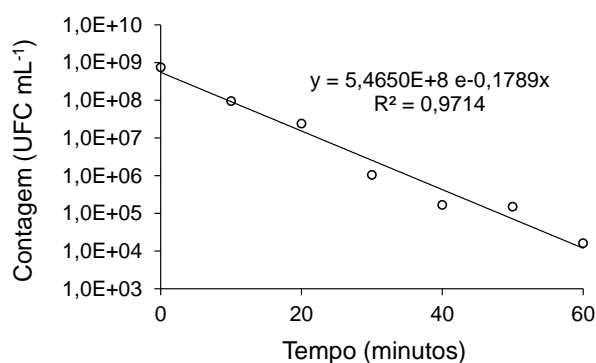
Os dados obtidos quanto ao efeito do pH sobre o crescimento e sobrevivência do sorotipo *S. Enteritidis* evidenciam a diferença entre as culturas CCS3 e ATCC 13076 quanto à resistência natural ao pH baixo nas condições testadas. *S. Enteritidis* CCS3 apresentou maior crescimento e sobrevivência que a ATCC 13076. Segundo Kenyon; Spector (2011), a resistência natural é controlada geneticamente e pode ser diferente entre espécies relacionadas ou sorotipos diante das mesmas condições de estresse, o que foi observado neste estudo. A maior resistência da cultura

CCS3 pode ser devida ao fato de se tratar de um isolado de campo, isto é, obtido na linha de abate de suínos, podendo estar mais adaptado ou ser naturalmente mais resistente como resultado da seleção em função das condições ambientais a que teria sido submetido.

Vários trabalhos já evidenciaram a resistência a ácido em *Salmonella* (YUK; SCHNEIDER, 2006; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2012). Esse comportamento ocorre principalmente devido a uma reação do microrganismo na presença do ácido, que é chamada de Resposta de Tolerância a Ácido (ATR). Esta resposta tem sido bem caracterizada em *Escherichia Coli* e *Salmonella Typhimurium*, nas quais tem sido demonstrada que a exposição a pH sub-letal induz à expressão de várias proteínas do choque ácido (FOSTER; HALL, 1992; HALL; FOSTER, 1996; BAIK *et al.*, 1996; BEARSON *et al.*, 1998; FOSTER, 1999; FOSTER; MORENO, 1999).

Foi observado nesse estudo que CCS3 sobreviveu em FGS por até 1 hora (Figura 4), por outro lado a ATCC 13076 não foi detectada após 10 minutos de exposição, indicando grande sensibilidade desta bactéria ao ambiente ácido. Essa redução é apresentada até o limite da técnica empregada neste estudo que é de 10^2 UFC mL⁻¹.

Figura 4. Sobrevivência de *Salmonella Enteritidis* CCS3 em FGS.



Dentro do intervalo estudado, verificou-se que as contagens de CCS3 diminuíram uma unidade log a cada 12,87 minutos. Durante os 60 minutos de desafio em FGS, a redução da contagem de células foi de $4,60 \times 10^4$ unidades log.

Esse resultado é semelhante ao obtido por Yuk; Schneider (2006), que observaram a sobrevivência de sorovares de *Salmonella* em FGS, além disso, eles verificaram que a adaptação de sorovares de *Salmonella* em sucos que apresentam pH moderado como o de laranja, maçã e tomate sob temperaturas de refrigeração, resultou em um aumento da sobrevivência dessas células em FGS.

Com relação à sobrevivência no FGS, a diferença é também acentuada entre as culturas, enquanto a maior parte da população de CCS3 permanece viável por mais de uma hora de exposição ao FGS, a população de ATCC 13076 apresenta intensa perda da culturabilidade em apenas 10 minutos de exposição. Esse resultado é muito similar ao observado em *Salmonella* Typhimurium, que perdeu culturabilidade em apenas cinco minutos ao ser submetida ao FGS (ROERING *et al.*, 1999). Além disso, foi verificado em outro estudo que diversos sorotipos de *Salmonella* não foram detectados em FGS após 100 segundos de inoculação (YUK; SCHNEIDER, 2006).

Neste trabalho, a ATCC 13076 foi mais sensível que a CCS3 quando submetida ao estresse ácido. Esse fato pode estar relacionado às diferenças entre as culturas CCS3 e ATCC 13076 na expressão de genes que codificam proteínas necessárias para o reparo e proteção de componentes celulares envolvidas nos mecanismos de resistência a esses tipos de estresse.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a exposição ao FGS, pH 1,5, não promove redução expressiva da população de CCS3, podendo-se considerar que contaminações de carnes suínas por esse patógeno representam risco potencial para a saúde dos consumidores. No entanto, é menos provável que a cultura ATCC 13076 sobreviva à passagem pelo suco gástrico do estômago. Cabe ressaltar que o pH da mistura do FGS com as células variou de 1,9 a 2,2, durante todo o experimento. Esses valores de pH são compatíveis com os valores médios encontrados no ambiente do estômago em humanos (MARTINSEN *et al.*, 2005). Além disso, o tipo de alimento pode influenciar essa sobrevivência, pois, sorovares de *Salmonella* expostos a pH 2,5 sobreviveram melhor quando foram inoculados em alimentos proteicos como bife de boi e ovos, comprovando que o alimento possa favorecer a passagem de bactérias patogênicas pelo trato gastrointestinal (WATERMAN; SMALL, 1998).

Este conhecimento, associado ao histórico de resistência de *S. Enteritidis* em ambientes adversos e sua disseminação por meio da carne suína poderão ser uma alerta para os consumidores para que durante a aquisição dessa carne se atente para as boas práticas de higiene no local de compra, bem como durante sua manutenção no ambiente domiciliar.

CONCLUSÃO

S. Enteritidis CCS3 apresentou valores maiores de velocidade específica de crescimento em TSB acidificado e sobreviveu por mais tempo em Ph inferior a 3,5 do que *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Houve diferença pronunciada entre as culturas com relação à sobrevivência em FGS, enquanto *S. Enteritidis* ATCC 13076 perdeu culturabilidade após 10 minutos de desafio, *S. Enteritidis* CCS3 apresentou tolerância por até uma hora.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Acid tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. **Food Microbiology**, v. 27, p. 44-49, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Estatísticas**, 2014. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao-2>. Acesso em: 20/10/2014.
- BAIK, H.S. *et al.* The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium provides protection against organic acids. **Microbiology**, v. 142, p. 3195-3200, 1996.
- BEARSON, B.L.; WILSON, L.; FOSTER, J.W. A low pH-inducible, PhoPQ dependent acid tolerance response protects *Salmonella* Typhimurium against inorganic acid stress. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2409-2417, 1998.
- BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 24, p. 80-84, 2004.
- BEUMER, R.R.; VRIES, J.; ROMBOUTS, F.M. *Campylobacter jejuni* nonculturable coccoid cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 153-163, 1992.
- BORSOI, A. *et al.* Salmonella Fecal Excretion Control in Broiler Chickens by Organic Acids and Essential Oils Blend Feed Added. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 13, p. 65-69, 2011.
- BRYAN, F.L.; FANELLI, M.J.; RIEMANN, H. *Salmonella* infections. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F.L. **Foodborne infections and intoxications**. London: Academic Press, 1979. p. 74-130.
- CAMPBELL, J. *et al.* Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, p. 727-735, 2004.
- [CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/#eggs) (CDC). **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**, 2010. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/#eggs. Acesso em: 23/10/2014.
- D' Aoust, J.Y., MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTIVILLE, T.J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p. 141-178.
- FOSTER, J.W. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion Microbiology**, v. 2, p. 170-174, 1999.
- FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 5129-5135, 1991.

- FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Effect of *Salmonella* Typhimurium ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4317-4323, 1992.
- FOSTER, J.W.; MORENO, M. Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. **Novartis Foundation Symposium**, v. 221, p. 55-69, 1999.
- FREITAS, C.G. *et al.* PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 15-22, 2010.
- HALL, H.K.; FOSTER, J.W. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5683-5691, 1996.
- KENYON, W.J.; SPECTOR, M.P. Response of *Salmonella enterica* serovars to environmental stresses. In: WON, H. **Stress Responses in Foodborne Microorganisms**. New York: Nova Science Publishing, 2011. p. 461-507.
- KICH, J.D. *et al.* Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 307-313, 2011.
- LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1842-1847, 1993.
- LIMA, E.S.C. *et al.* Isolation of *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* at swine slaughtering as subsidy for HACCP, the Hazard Analysis and Critical Control Point system. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v. 24, p. 185-190, 2004.
- LIN, J. *et al.* Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4097-4104, 1995.
- LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1252-1255, 1997.
- MARTINSEN, T.C.; BERGH, K.; WALDUM, H.L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 96, p. 94-102, 2005.
- MILBRADT, E.L. *et al.* Control of *Salmonella* Enteritidis in turkeys using organic acids and competitive exclusion product. **Journal Applied Microbiology**, v. 117, p. 554-563, 2014.
- MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 63-67.
- MÜLLER, K. *et al.* Survival and Growth of Epidemically Successful and Nonsuccessful *Salmonella enterica* Clones after Freezing and Dehydration. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 456-464, 2012.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.

OLIVEIRA, S.D. *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97 p. 297-305, 2005.

PIPEK, P. *et al.* Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. **Journal Food Engineering**, v. 74, p. 224-231, 2006.

ROERING, A.M. *et al.* Comparative survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 263-269, 1999.

RYCHLIK, I.; BARROW, P.A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonization and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 1021-1040, 2005.

SANT'ANA, A.S. *et al.* Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1235-1237, 2011.

SMALL, P.; BLANKENHORN, D.; WELTY, D.; ZINSER, E.; SLONCZEWSKI, J.L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1729-1737, 1994.

STEVENS, M.P.; HUMPHREY, T.J.; MASKELL, D.J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 2709-2723, 2009.

STOCKER, B.A.D.; MAKELA, P.H. Genetic determinance of bacterial virulence with special reference to *Salmonella*. **Microbiology Immunology**, v. 124, p. 149-172, 1986.

SUN, J. *et al.* Microbial decontamination of pork carcass and chilled pork by different technological treatments. **Food and Fermentation Industries**, v. 29, p. 1-5, 2003.

WATERMAN, S.R.; SMALL, P.L.C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3882-3886, 1998.

YOUSEF, A.E.; JUNEJA, V.K. **Microbial stress adaptation and food safety**. Washington: CRC Press, 2002. 369 p.

YUK, H.G.; SCHNEIDER, K.R. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. **Food Microbiology**, v. 23, p. 694-700, 2006.