



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Camila Casagrande Paganini

**Avaliação e modelagem do comportamento de sorotipos de *Salmonella enterica* sob
estresse osmótico: um estudo do Fenômeno Fênix**

Florianópolis

2022

Camila Casagrande Paganini

Avaliação e modelagem do comportamento de sorotipos de *Salmonella enterica* sob estresse osmótico: um estudo do Fenômeno Fênix.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof.^a Dr.^a Gláucia M. F. de Aragão
Coorientador: Prof. Dr. Bruno A. M. Carciofi
Coorientador: Prof. Dr. Daniel A. Longhi

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Paganini, Camila

Avaliação e modelagem do comportamento de sorotipos de Salmonella enterica sob estresse osmótico: um estudo do Fenômeno Fênix / Camila Paganini ; orientador, Gláucia Aragão, coorientador, Bruno Carciofi , coorientador, Daniel Longhi, 2022.

124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. segurança de alimentos . 3. patógenos. 4. microbiologia preditiva. 5. citometria de fluxo. I. Aragão, Gláucia . II. Carciofi , Bruno. III. Longhi, Daniel IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Camila Casagrande Paganini

Avaliação e modelagem do comportamento de sorotipos de *Salmonella enterica* sob estresse osmótico: um estudo do Fenômeno Fênix.

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 22 de julho de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Maristela da Silva do Nascimento, Dr^a

UNICAMP

Prof.^a Marília Miotto, Dr^a

UFSC

Prof. Wiaslan Figueiredo Martins, Dr

IF Goiano

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Gláucia M. F. de Aragão, Dr^a

Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma maneira, permitiram que esta tese de doutorado se concretizasse.

Em primeiro lugar, quero agradecer a minha orientadora Prof^a. Gláucia por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e, sempre ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço por todo conhecimento transmitido, pela ajuda frente as dificuldades, incentivo e estímulo, além da amizade, gentileza e generosidade.

Aos meus coorientadores, Prof. Bruno e Prof. Daniel, de igual forma, gostaria de agradecer a amizade, a paciência e a gentileza em ensinar e, por todas as contribuições dadas ao longo do trabalho. O meu muito obrigada.

Agradeço também ao Prof. André, pela permissão para a realização de experimentos no Laboratório de Imunobiologia e ainda pelas contribuições e conhecimento compartilhado. Gostaria de demonstrar a minha gratidão e agradecimento a aluna de doutorado Carol, pelo auxílio no desenvolvimento e execução dos experimentos, além da amizade construída.

Aos meus colegas de laboratório, que se tornaram grandes amigos, quero agradecer o suporte e amizade, além dos ótimos momentos. Obrigada.

Um agradecimento especial a minha família, que sempre esteve presente e me deu suporte e apoio nos momentos que mais precisei. Em especial, a minha mãe e meu pai (in memória), sem eles isso não seria possível.

Agradeço imensamente a todos os meus amigos, que sempre estiveram presente ao longo de toda essa jornada. A amizade de vocês foi fundamental.

Agradeço a UFSC, PPGEAL e LIEB por essa grande oportunidade e a CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

"Temos a permissão de ser exatamente quem somos." - Nina Simone

RESUMO

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. estão entre os principais patógenos relacionados a surtos de origem alimentar, causando problemas de saúde pública e impactos econômicos negativos em todo o mundo. *Salmonella enterica* destaca-se pela capacidade de se adaptar a vários ambientes adversos, tal como alimentos com a_w reduzida, próxima ao limite de crescimento dessa bactéria, considerados ambientes osmóticos estressantes. A exposição de *S. enterica* a esses ambientes pode levar ao comportamento caracterizado pela diminuição da concentração celular inicial, seguido de crescimento exponencial até atingir a fase estacionária, denominado Fenômeno Fênix (FF). O objetivo geral deste trabalho é avaliar e modelar a cinética do crescimento, sobrevivência e inativação de populações de *S. enterica* expostas ao estresse osmótico (a_w de 0,940, 0,945, 0,950 e 0,960), próximo ao limite cresce/não cresce, que podem levar ao FF, considerando a influência do sorotipo (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota) e do estado fisiológico do inóculo (fase exponencial ou estacionária cultivado a 25 ou 35 °C). Nessa avaliação, será estudada ainda a heterogeneidade fisiológica e viabilidade celular da população de *S. Typhimurium*, ao longo da exposição a um ambiente osmótico estressante, que leva ao FF, por meio da técnica de citometria de fluxo (CF) acoplada aos marcadores fluorescentes laranja de tiazol (thiazole orange [TO]) e iodeto de propídio (propidium iodide [PI]). Será também avaliado e modelado o efeito da adaptação osmótica, durante o FF, sobre a resistência de sorotipos de *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota) à irradiação UV-C (6,5 W/m²). Os resultados mostraram que, em a_w de 0,950 e 0,960, todas os sorotipos apresentaram o comportamento característico do FF. A inoculação em meio com a_w de 0,940 e 0,945 levou à inativação de todos os sorotipos estudados. As células provenientes de inóculo a partir da fase exponencial a 25 °C apresentaram maior redução populacional inicial e menor tempo para recuperação do crescimento até atingir a fase estacionária. O modelo matemático, proposto para descrever o comportamento microbiano durante o FF, considerou que a curva resultante era a soma de duas subpopulações (inativando e sobrevivendo/crescendo) e apresentou bons ajustes para todas as condições testadas. A análise de CF com dupla marcação fluorescente forneceu fortes evidências da ocorrência de três subpopulações simultâneas que levam ao FF, definidas como células intactas/viáveis, estressadas/injuriadas e danificadas. A resposta da CF mostrou alterações nos percentuais das subpopulações ao longo do tempo de exposição ao ambiente de estresse osmótico. Os resultados sugerem que a exposição prévia das células bacterianas a ambientes osmóticos que desencadeiam o FF leva ao aumento da resistência à aplicação subsequente do tratamento com UV-C. O modelo de inativação log-linear com ombro apresentou melhor ajuste que o modelo de Weibull para descrever as respostas de inativação celular sob luz UV-C. Células de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* estressadas osmoticamente durante o FF foram mais resistentes à irradiação UV-C. Esse fato não foi observado para *S. Enteritidis*. Os resultados obtidos neste estudo mostram repostas complexas de *S. enterica* à exposição a ambientes osmóticos estressantes. Dessa maneira, o presente estudo contribui para garantia da qualidade e segurança dos alimentos, além de levar à melhoria de análises de riscos no processamento de alimentos.

Palavras-chave: segurança de alimentos, patógenos, microbiologia preditiva, citometria de fluxo, luz UV-C.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Salmonella* spp. are among the main pathogens related to foodborne outbreaks, causing public health issues and negative economic impacts worldwide. *Salmonella enterica* stands out for its ability to adapt to several adverse environments, such as foods with reduced a_w , close to the growth limit of this bacteria, considered as osmotic stressful environments. The exposure of *S. enterica* to these environments can lead to a behavior characterized by a decrease in the initial cell concentration, followed by exponential growth until reaching the stationary phase, called the Phoenix Phenomenon (PP). The general objective of this work is to evaluate and model the kinetics of growth, survival and inactivation of populations of *S. enterica* exposed to osmotic stress (a_w of 0.940, 0.945, 0.950 and 0.960), close to the grow/no grow limit, which can lead to the PP, considering the influence of the serotype (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) and the physiological state of the inoculum (exponential or stationary phase cultivated at 25 or 35 °C). In this evaluation, the physiological heterogeneity and cellular viability of the population of *S. Typhimurium* will also be studied during exposure to a stressful osmotic environment, which leads to the PP, through the flow cytometry (FC) technique coupled with fluorescent stained of thiazole orange (TO) and propidium iodide (PI). The effect of osmotic adaptation, during PP, on the resistance of *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) to UV-C irradiation (6,5 W/m²) will also be evaluated and modeled. The results showed that, in a_w de 0.950 and 0.960, all serotypes showed the characteristic behavior of PP. The inoculation in medium with a_w = 0.940 and 0.945 led to inactivation for all serotypes studied. Cells from inoculum from the exponential phase at 25 °C showed greater initial population reduction and less time for growth recovery until reaching the stationary phase. The mathematical model, proposed to describe the microbial behavior during the PP, considered that the resulting curve was the sum of two subpopulations (inactivating and surviving/growing) and presented good fits for all tested conditions. The analysis of FC with double fluorescent labeling provided strong evidence of the occurrence of three simultaneous subpopulations that lead to the PP, defined as intact/viable, stressed/injured, and damaged cells. The FC response showed changes in the percentages of subpopulations over time of exposure to the osmotic stress environment. The results suggest that prior exposure of bacterial cells to osmotic environments that trigger the PP leads to increased resistance to the subsequent application of UV-C treatment. The log-linear with shoulder inactivation model showed a better fit than the Weibull model to describe cell inactivation responses under UV-C light. *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* cells osmotically stressed during PP were more resistant to UV-C irradiation. This fact was not observed for *S. Enteritidis*. The results obtained in this study show complex responses of *S. enterica* to exposure to stressful osmotic environments. In this way, the present study contributes to ensuring the quality and safety of food, in addition to improving risk analysis in food processing.

Keywords: food safety, pathogens, predictive microbiology, flow cytometry, UV-C light.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Experimental data (symbols) of *S. typhimurium* incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from different inoculum conditions (exponential phase inoculum at 25 °C (E25. [a]); exponential phase inoculum at 35 °C (E35. [b]); stationary phase inoculum at 25 °C (S25. [c]) and stationary phase inoculum at 35°C (S35. [d]). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates..... 54

Figure 2. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.940$) from the exponential phase inoculum at 35 °C (I), stationary phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. (*) are values below the detection limit considered in the study. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates..... 58

Figure 3. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.945$) from the exponential phase inoculum at 35 °C (I), stationary phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. (*) are values below the detection limit considered in the study. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates..... 60

Figure 4. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from the stationary phase inoculum at 35 °C (I), exponential phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates..... 64

Figure 5. Experimental data (symbols) of *S. typhimurium* (a), *S. enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.960$) from the stationary phase inoculum at 35 °C (I) exponential phase inoculum at 25 °C (I). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates..... 66

Figure 3.6.1 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of <i>S. Typhimurium</i> in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).....	76
Figure 3.6.2 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of <i>S. Enteritidis</i> in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).....	77
Figure 3.6.3 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of <i>S. Heidelberg</i> in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).....	77
Figure 3.6.4 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of <i>S. Minnesota</i> in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).....	78
Figure 6. Experimental flowchart of analysis by the flow cytometry method .	84
Figure 7. Experimental data (symbols) of <i>S. Typhimurium</i> incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) during the PP obtained by PCM.	86
Figure 8. CFM dot plots representing Controls of <i>S. Typhimurium</i> from live (A) and dead cells (B). The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4)....	87
Figure 9. CFM dot plots representing <i>S. Typhimurium</i> bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).....	88
Figure 10. Percentage of <i>S. Typhimurium</i> cells during the PP based on FCM and TO/PI differential staining. The stained population in each quadrant are presented. Q1 (TO+PI-), Q2 (TO+PI+), Q3 (TO-PI+) and, Q4 (TO-PI-). Symbols with error bars (e.g., $\bar{x} \pm \sigma$) represent the data average value and respective standard deviation due to triplicates.	90
Figure 11. Fluorescence spectra of <i>S. Typhimurium</i> cells stained with TO probe during the PP. The sampling interval (t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{120} , t_{196} and, t_{216}) and live and dead control are showed.....	91
Figure 4.6.1. CFM dot plots representing <i>S. Typhimurium</i> bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable	

subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4)..... 93

Figure 4.6.2 CFM dot plots representing *S. Typhimurium* bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).....94

Figure 12. Experimental cell counts (symbols) of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* serotypes incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from the exponential phase inoculum at 25 °C. The circles represent the experimental point of sample collecting (t_0 and t^*) during the Phoenix Phenomenon for UV-C inactivation. 102

Figure 13. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (A), *S. Enteritidis* (B), *S. Heidelberg* (C), and *S. Minnesota* (D) serotypes inactivation in BHI ($\log N/N_0$) exposed to UV-C irradiance (6.5 W/m^2) as a function of the fluency (kJ/m^2). Sample t_0 (■) after exposure to the stressful osmotic environment, t^* (●) when bacterial cells returned to exponential growth, and *Control* (▲) not exposed to osmotic stress. The lines represent the fitting of the Weibull model (I) and log linear shoulder model (II) to the data. Error bars correspond to the duplicate of each measurement. 103

Figure 14, Residue analysis. Sample t_0 (■) after exposure to the stressful osmotic environment, t^* (●) when bacterial cells resumed exponential growth, and *Control* (▲) not exposed to osmotic stress. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i>	30
Table 2. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of <i>S. Typhimurium</i>	56
Table 3. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Heidelberg</i> and <i>S. Minnesota</i> incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w=0.940$ and 0.945) from the exponential phase inoculum at 25 °C (E25) and stationary phase inoculum at 35 °C (S35)	62
Table 4. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Heidelberg</i> , and <i>S. Minnesota</i> incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$ and 0.960) from the exponential phase inoculum at 25 °C (E25) and stationary phase inoculum at 35 °C (S35).	68
Table 3.6.1 - Percentage of NaCl (%) added to the BHI medium to obtain the average a_w values. The a_w values were measured in a a_w -meter (Aqualab, modelo SÉRIE 3TE, Decagon Devices).....	76
Table 5 - Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the Log-linear Shoulder models to the inactivation data of <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Heidelberg</i> and <i>S. Minnesota</i> osmotic adapted and no adapted (Sample t_0 (after exposure to the stressful osmotic environment), t^* (when bacterial cells resumed exponential growth), and Control (not exposed to osmotic stress)) exposed to UV-C irradiance (6.5 W/m^2) as a function of the fluency (kJ/m^2) and the statistical indices.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FF - Fenômeno Fênix;
CF - Citometria de fluxo;
TO - Laranja de tiazol (thiazole orange);
PI - Iodeto de propídio (propidium iodide);
UV-C - Ultravioleta C;
BHI - Brain heart infusion;
NaCl - Cloreto de sódio;
 a_w - Atividade de água;
TLR - tempo de adaptação relativo;
CFU - Unidade formadora de colônia;
E25 - Fase de crescimento exponencial a 25 °C;
E35 - Fase de crescimento exponencial a 35 °C;
S25 - Fase estacionária a 25 °C;
S35 - Fase estacionária a 35 °C;
 N_t - Concentração microbiana total;
 N_g - Concentração microbiana sobrevivência/crescendo;
 N_i - Concentração microbiana inativando;
 k_{max} - Velocidade máxima de inativação;
 $y_{(0)}$ - Logaritmo da concentração celular inicial
 λ - Fase de adaptação (lag);
 μ_{max} - Velocidade máxima de crescimento;
 y_{max} - Logaritmo da concentração máxima;
 y_i - Logaritmo da concentração inativando;
 y_g - Logaritmo da concentração sobrevivendo/crescendo;
 R_0 - Fração da subpopulação sobrevivendo/crescendo;
RMSE - Raiz quadrada do erro-médio;
 R^2_{adj} - R-quadrado ajustado;
FCM - Método de citometria de fluxo;
PCM - Método contagem em placa;
PP - Phenomenon Phoenix;
FSC - Forward scatter;

SSC - Side scatter;

SOE - Ambiente osmótico estressante;

F - Fluência;

δ - Fator de escala, tempo da primeira redução decimal;

p - Parâmetro de forma;

S_l - Parâmetro do comprimento do ombro.

t_0 - Fase inicial do Fenômeno Fênix;

t^* - Início da fase exponencial do Fenômeno Fênix.

DIAGRAMA CONCEITUAL

Avaliação e modelagem do comportamento de sorotipos de *Salmonella enterica* sob estresse osmótico: um estudo do Fenômeno Fênix

O que? Por quê?

- *S. enterica* destaca-se como um dos principais patógenos relacionados a surtos de doenças causadas por alimentos contaminados, que afetam humanos e animais. As bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* são considerados de difícil controle e continuam tendo impacto significativo na saúde pública e custos econômicos em todo o mundo;

- Durante o processamento e armazenamento de alimentos os microrganismos estão sujeitos a uma gama de condições adversas, que podem ser letais ou subletais, sendo assim um estresse para a célula microbiana;

- *S. enterica* possui destacada capacidade de adaptação a ambientes estressantes;

- Dentre as condições estressantes, o estresse osmótico, que pode ser obtido pela diminuição da a_w em níveis próximos aos limites de inativação e crescimento microbiano, é um dos mais comumente aplicados na conservação de alimentos;

- Em condições de estresse osmótico, *S. enterica* pode apresentar um comportamento caracterizado pela diminuição inicial da contagem de células, seguido por crescimento exponencial até atingir a fase estacionária. Esse comportamento é denominado Fenômeno Fênix;

- O Fenômeno representa um risco à segurança microbiológica de alimentos, pois pode levar a interpretações erradas sobre o comportamento microbiano, causando graves problemas na indústria de alimentos;

- É de fundamental importância estudar a adaptação de sorotipos de *S. enterica* a ambientes osmóticos estressantes e que desencadeiam o Fenômeno Fênix para garantir a qualidade e segurança dos alimentos. O aprimoramento de modelos que descrevem o Fenômeno Fênix pode contribuir para melhoria do desempenho da microbiologia preditiva de alimentos.

Estado da arte:

- O comportamento de populações microbianas submetidas a condições de estresse osmótico, obtido pela diminuição da a_w por meio da adição de sal tem sido estudado;

- Alguns estudos encontrados na literatura reportam que o comportamento de diminuição, seguida de aumento da contagem microbiana de *Salmonella* spp., denominado Fenômeno Fênix, foi obtido em uma faixa de a_w variando em torno de 0,940 a 0,960;

- Em microbiologia preditiva, são reportados poucos modelos matemáticos que descrevem o comportamento de recuperação de populações microbianas em resposta a ambientes estressantes, próximos dos limites de crescimento, que desencadeiam o Fenômeno Fênix;

- Na literatura, a maioria dos estudos encontrados sobre o Fenômeno Fênix utilizam o método de contagem em placa, nos quais os resultados mostram a quantificação apenas das células capazes de formar colônias;

- Poucos estudos que utilizam diferentes métodos para investigar e avaliar a heterogeneidade e viabilidade celular durante o Fenômeno Fênix estão disponíveis na literatura. Dentro do nosso conhecimento, apenas um estudo utilizando o método de microscopia de lapso de tempo (*time-lapse microscopy*) foi realizado para quantificar as subpopulações existentes durante a ocorrência do Fenômeno Fênix.

Hipóteses:

- As populações bacterianas de *S. enterica* expostas ao estresse osmótico decorrente da baixa a_w apresentam o Fenômeno Fênix e a cinética de inativação/crescimento depende do sorotipo e da condição do inóculo;

- Modelos considerando duas subpopulações – células sendo inativadas e células sobrevivendo/crescendo – permitem a utilização de equações cinéticas para descrever o Fenômeno Fênix de diferentes sorotipos de *S. enterica*;

- O método de citometria de fluxo em conjunto com marcações fluorescentes é capaz de medir a viabilidade e heterogeneidade de células de *S. enterica* submetidas ao estresse osmótico;

- A eficiência de inativação pela tecnologia UV-C é alterada pela adaptação osmótica da *S. enterica* que levam ao Fenômeno Fênix.

Etapas experimentais:

- Determinar os valores de a_w próximos aos limites de crescimentos e inativação de *S. enterica* por meio da adição de concentrações apropriadas de cloreto de sódio (NaCl) ao meio de cultura (BHI);
- Quantificar o crescimento/inativação de *S. Typhimurium* em meio de cultura (BHI) com a_w de 0,950 e incubado a 25 °C, utilizando inóculos de diferentes fases (exponencial ou estacionária e cultivados a 25 ou 35 °C);
- Propor um modelo matemático primário capaz de descrever o comportamento chamado de Fenômeno Fênix;
- Quantificar o crescimento/inativação de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* em caldo BHI com a_w de 0,940, 0,945, 0,950 e 0,96 e incubado a 25 °C utilizando diferentes fases de inóculo (exponencial e estacionária e temperatura 25 e 35 °C);
- Utilizar o método de citometria de fluxo combinado com dupla marcação fluorescente (laranja de tiazol e iodeto de propídio) para avaliar a heterogeneidade da população de *S. Typhimurium* exposta a uma condição que leva ao Fenômeno Fênix;
- Tratar com irradiação UV-C (6,5 W/m²) sorotipos de *S. enterica* obtidos a partir de inóculos, que levem à observação do Fenômeno Fênix, durante as fases inicial e após a recuperação do crescimento.

Resultados esperados:

- Cinética do crescimento, sobrevivência e inativação da população dependente do inóculo (fase exponencial ou estacionária, incubado a 25 ou 35 °C) de *S. Typhimurium* exposta a um ambiente osmoticamente estressante ($a_w = 0,950$) e incubado a 25 °C;
- Índices de avaliação da capacidade do modelo matemático proposto em descrever o Fenômeno Fênix;
- Cinética do crescimento/inativação e modelagem da população de quatro sorotipos de *S. enterica* (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *Heidelberg* e *Minnesota*) a partir de diferentes fases de inóculo expostos a níveis de estresse osmótico ($a_w = 0,940, 0,945, 0,950$ e $0,960$);
- Determinação da heterogeneidade e viabilidade das subpopulações de *S. Typhimurium* ao longo da exposição à condição de estresse que leva ao Fenômeno Fênix, utilizando citometria de fluxo em combinação com marcação fluorescente;

- Modelagem matemática das cinéticas de inativação por irradiação UV-C de sorotipos de *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*), destacando a alteração dos parâmetros do modelo devido à exposição ao estresse osmótico ao longo da ocorrência do Fenômeno Fênix.

APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

Esta tese de doutorado está estruturada em capítulos e apresentada da seguinte maneira:

- **Capítulo 1.** INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

- **Capítulo 2.** REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Metodologia e Resultados

A metodologia de cada etapa do trabalho e seus respectivos resultados e discussão serão apresentadas em capítulos, na forma de artigos, como descrito abaixo. O material de suporte e as informações complementares, encontram-se ao final de cada capítulo.

O material complementar de cada capítulo, que não for apresentado no respectivo artigo, será apresentado ao final de cada capítulo como informações complementares.

As referências bibliográficas de todos os capítulos da tese de doutorado estão apresentadas no final do documento.

- **Capítulo 3.**

MODELAGEM DA INATIVAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *SALMONELLA ENTERICA* SOB ESTRESSE OSMÓTICO CONSIDERANDO A FASE DO INÓCULO E SOROTIPO.

Este capítulo será apresentado inglês, na forma de artigo científico.

- **Capítulo 4.**

DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE FISIOLÓGICA E VIABILIDADE DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ESTRESSADA OSMOTICAMENTE DURANTE O FENÔMENO FÊNIX USANDO CITOMETRIA DE FLUXO

Este capítulo será apresentado inglês, na forma de artigo científico.

- Capítulo 5.

EFEITO DA ADAPTAÇÃO OSMÓTICA (FENÔMENO FÊNIX) DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA ENTERICA*, NA RESISTÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA (UV-C).

Este capítulo será apresentado em inglês, na forma de artigo científico.

- Capítulo 6.

CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Capítulo 7.

REFERÊNCIAS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	28
1.1.1	Objetivo Geral.....	28
1.1.2	Objetivos Específicos	28
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	<i>Salmonella</i> spp.	29
2.1.1	<i>Salmonella enterica</i>	32
2.2	RESPOSTA MICROBIANA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE	34
2.2.1	Estresse osmótico	36
2.2.2	Fenômeno Fênix.....	38
2.3	MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	39
2.3.1	Modelos de crescimento e inativação microbiana.....	40
2.3.2	Modelos que descrevem o Fenômeno Fênix	41
2.4	CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DE CÉLULAS BACTERIANAS.....	42
2.5	INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR LUZ ULTRAVIOLETA NO ESPECTRO C (UV-C)	44
3	MODELAGEM DA INATIVAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOB ESTRESSE OSMÓTICO CONSIDERANDO A FASE DO INÓCULO E SOROTIPO.	46
3.1	INTRODUCTION	48
3.2	MATERIAL AND METHODS.....	49
3.2.1	Bacterial strains	49
3.2.2	Inoculum preparation	49
3.2.3	Experimental bacterial kinetics.....	50
3.2.4	Mathematical modelling.....	50

3.2.5	Evaluation of model performance	53
3.3	RESULTS.....	53
3.4	DISCUSSION.....	70
3.5	SUPPORT MATERIAL INCLUDED IN THE ARTICLE.....	73
3.6	ADDITIONAL INFORMATION	76
4	DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE FISIOLÓGICA E VIABILIDADE DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM ESTRESSADA OSMOTICAMENTE DURANTE O FENÔMENO FÊNIX USANDO CITOMETRIA DE FLUXO	79
4.1	INTRODUCTION	81
4.2	MATERIAL AND METHODS.....	82
4.2.1	Bacterial strains and inoculum preparation	82
4.2.2	Osmotic stress exposure - Phoenix Phenomenon observation	82
4.2.3	Assessment of cells submitted to Osmotic stress by Flow Cytometry during Phoenix Phenomenon	83
4.2.4	Assessment of cells submitted to Osmotic Adaptation by plate counts and pH during Phoenix Phenomenon	85
4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	85
4.4	CONCLUSION	92
4.5	ADDITIONAL INFORMATION	93
5	EFEITO DA ADAPTAÇÃO OSMÓTICA (FENÔMENO FÊNIX) DE SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i>, NA RESISTÊNCIA À luz ULTRAVIOLETA (UV-C)	95
5.1	INTRODUCTION	97
5.2	MATERIAL AND METHODS.....	98
5.2.1	Bacterial strains and inoculum preparation	98
5.2.2	Experimental bacterial kinetics under osmotic condition – Phoenix Phenomenon	99
5.2.3	Sample preparation for UV-C inactivation	99

5.2.4	UV-C inactivation kinetics	100
5.2.5	Mathematical modeling.....	100
5.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	101
5.3.1	Experimental bacterial kinetics under osmotic condition – Phoenix Phenomenon	101
5.3.2	UV-C inactivation kinetics	102
5.4	CONCLUSION	109
6	Conclusão GERAL	111
6.1	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS:.....	113
7	REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

O comportamento microbiano é influenciado por fatores extrínsecos, por exemplo, a temperatura do ambiente, e fatores intrínsecos, como o conteúdo de nutrientes, pH e a_w do alimento em questão (SMET et al., 2015). Sabe-se que, durante o processamento de alimentos, as condições ambientais a que um microrganismo é exposto variam drasticamente. Tais variações podem ser consideradas letais, causando a morte microbiana, ou subletais, representando um estresse para as células microbianas (SPECTOR; KENYON, 2012). A habilidade dos microrganismos responderem de maneira rápida e adequada às mudanças ambientais são cruciais para sua sobrevivência (FOSTER; SPECTOR, 1995). Poucos microrganismos possuem a capacidade de lidar com condições estressantes que estão presentes em ambientes naturais e em hospedeiros, como os sorotipos de *Salmonella enterica* (JAYASENA; JO, 2013).

As bactérias Gram-negativas constituintes da espécie *S. enterica* são um dos principais agentes de doenças transmitidas por alimentos em todo mundo. Possuem a capacidade de infectar animais e humanos e sua relevância como responsável por surtos de origem alimentar é bem conhecida. Ainda hoje são consideradas de difícil controle e representam uma grande preocupação para a indústria de alimentos, afetando a saúde pública e causando prejuízos econômicos. No Brasil, entre o ano de 2012 a 2022, os agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTHA foram *Escherichia coli* (29,6%), *Staphylococcus aureus* (12,9%) e *Salmonella* spp. (11,2%) (SINAN/ SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Na cadeia de processamento de alimentos, a diminuição da a_w é uma estratégia comumente aplicada para a conservação de alimentos, podendo ser obtida pela adição de solutos e por técnicas de desidratação (SPECTOR; KENYON, 2012; ZHOU et al., 2011). Submeter microrganismos a ambientes de baixa a_w , próximos aos limites de crescimento ou inativação, pode ser considerada um tipo de estresse, sendo chamado de estresse osmótico. A exposição a ambientes osmóticos estressantes é reportada como uma causa relacionada a mudanças na resistência e capacidade de adaptação dos microrganismos (KANG et al., 2018; ZHOU et al., 2011).

É conhecido que, em condições ambientais estressantes específicas, microrganismos apresentam um comportamento caracterizado pela diminuição da concentração inicial de células, seguida por um período que a concentração se mantém inalterada e então, ocorre a retomada do crescimento exponencial até atingir a fase estacionária. Esse comportamento é denominado Fenômeno Fênix (FF), relatado pela primeira vez por Collee, Knowlden e Hobbs

(1961) para *Clostridium welchi*. Mais tarde, Shoemaker e Pierson (1976), estudaram o FF em *Clostridium perfringens*, por meio do método de contagem em placa, sugerindo três fases: lesão, recuperação e crescimento microbiano. As bactérias do gênero *Salmonella* apresentam o comportamento descrito como FF, quando submetidas à condição de estresse osmótico (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018). Mellefont, Mcmeekin e Ross (2004, 2005), reportaram que a exposição à condição de estresse osmótico de populações fisiologicamente distintas de *S. Typhimurium* levou ao FF. Aspridou, Akritidou e Koutsoumanis (2018) também estudaram o FF de *Salmonella enterica* Agona submetida a ambientes osmoticamente estressantes. Os autores afirmam que três estados simultâneos ocorrem nas células bacterianas: crescimento, sobrevivência e morte. Ainda não existe um consenso em relação à heterogeneidade e viabilidade das populações bacterianas durante o FF, sendo que diferentes explicações são propostas na literatura.

A modelagem matemática é uma das principais ferramentas utilizadas para descrever o comportamento microbiano, tornando-se importante para a avaliação de risco microbiológico e segurança de alimentos. O uso de modelos preditivos para descrever o comportamento de *Salmonella* spp. (crescimento e inativação) está amplamente disponível na literatura (MUÑOZ-CUEVAS; METRIS; BARANYI, 2012; NOVIYANTI et al., 2018). Entretanto, a maioria dos modelos disponíveis concentra-se exclusivamente em descrever as respostas microbianas frente às condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis ao seu crescimento. Poucos estudos abordam a modelagem matemática para descrever a cinética microbiana em condições próximas aos limites de crescimento, consideradas estressantes e que podem levar ao FF (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; ZHOU et al., 2011).

Ao longo do comportamento denominado como FF, as populações microbianas resultantes podem ser compostas por células em diferentes estados fisiológicos (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018). O comportamento microbiano geralmente tem sido avaliado por métodos convencionais, como a quantificação por contagem em placa, geralmente utilizada para análises microbiológicas em alimentos. Nesse método, apenas bactérias que podem formar colônias visíveis são consideradas viáveis, desconsiderando a possibilidade de qualquer bactéria em outros estados fisiológicos estarem presentes. Uma abordagem alternativa, que possui capacidade de determinar a viabilidade e heterogeneidade bacteriana é o método de Citometria de fluxo (CF) (SINGH; BARNARD, 2017).

A CF, em combinação com técnicas de fluorescência, permite a diferenciação de subpopulações de células em vários estados fisiológicos (SIBANDA; BUYS, 2017). A utilização de dupla coloração com sondas fluorescentes está sendo utilizada para este tipo de

análise, é baseada na diferença das características fisiológicas celulares (GUEDES; DE SOUZA, 2018; SINGH; BARNARD, 2021). Laranja de tiazol (thiazole orange [TO]) é uma sonda permeável a todas as células, independente da integridade da membrana, marcando, em graus variados de intensidade, que se liga aos ácidos nucleicos (DNA ou RNA); e o iodeto de propídio (propidium iodide [PI]) que também é uma sonda de ligação a ácido nucleico, penetra apenas em células com membranas danificadas (SINGH; BARNARD, 2021). A utilização dessa técnica proporciona melhor compreensão do estado das células ao longo da exposição ao estresse e que constituem a população bacteriana total durante a ocorrência do FF.

Um método não-térmico de inativação de microrganismos, que vem ganhando destaque, é a tecnologia de irradiação UV-C. Estudos mostram a eficácia dessa tecnologia na inativação de diferentes microrganismos (ESTILO; GABRIEL, 2017; GABRIEL; NAKANO, 2009; MENEZES et al., 2020). Porém, foi reportado que a exposição de microrganismos a condições de estresse, em diferentes níveis, pode induzir mecanismos adaptativos que alteram a resistência celular à aplicação subsequente de outras tecnologias utilizadas no processamento de alimentos, que serviriam para inativá-los (ESTILO; GABRIEL, 2017). Existe uma escassez de estudos que abordam o efeito de estresses prévios sobre a eficácia dos processos de inativação. Nesse sentido, fica claro a relevância e necessidade de estudos que abordem as respostas de células bacterianas adaptadas ao estresse, como por exemplo, resultantes do FF, à aplicação da irradiação UV - C. Assim, esses estudos podem contribuir para a melhoria dos processos de inativação e garantia da segurança em toda a cadeia de processamento de alimentos.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese de doutorado.

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar e modelar o comportamento de *S. enterica* exposta ao estresse osmótico, próximo ao limite cresce/não cresce, que podem levar ao Fenômeno Fênix.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do inóculo, a partir de duas fases de crescimento (exponencial e estacionária) e duas temperaturas de incubação (25 e 35 °C), na ocorrência do Fenômeno Fênix de *S. Typhimurium* exposta a um meio osmoticamente estressante ($a_w = 0,950$) e incubada a 25 °C;
- Propor um modelo matemático primário capaz de descrever a cinética de crescimento, sobrevivência e inativação no Fenômeno Fênix de sorotipos de *S. enterica*;
- Modelar a cinética do crescimento, sobrevivência e inativação de sorotipos de *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota) expostos a diferentes níveis de estresse osmótico ($a_w = 0,940, 0,945, 0,950$ e $0,960$) e fases do inóculo (exponencial e estacionária e temperatura 25 e 35 °C);
- Determinar a heterogeneidade fisiológica e viabilidade celular da população de *S. Typhimurium*, a partir dos resultados que indiquem as condições de inóculo e a_w que levam ao Fenômeno Fênix, utilizando citometria de fluxo em combinação com dupla marcação fluorescente de laranja de tiazol e iodeto de propídio;
- Avaliar e modelar o efeito da adaptação osmótica (a partir dos resultados que indiquem as condições de inóculo e a_w que levam ao FF), ao longo do FF, na cinética de inativação por irradiação UV-C ($6,5 \text{ W/m}^2$) de sorotipos de *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. foi primeiramente identificada por Salmon e Smith em 1885 nos Estados Unidos, isolada de suínos que sofriam de cólera, sendo chamada de *Bacillus choleraesuis*, hoje conhecida como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis (DOYLE; BUCHANAN, 2013; SU; CHIU, 2006). São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, pertencentes à família das Enterobacteriaceae, anaeróbias facultativas, oxidase negativa, não formadoras de esporos, com diâmetro em torno de 0,7 a 1,5 µm e comprimento de 2 a 5 µm e capacidade de metabolizar nutrientes por vias respiratórias e fermentativas (DOYLE; BUCHANAN, 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A nomenclatura de *Salmonella* spp. é complexa e ainda está em evolução, o que torna difícil o consenso entre os pesquisadores, além de dificultar a precisão sobre o número de espécies e subespécies que formam o gênero *Salmonella* (AGBAJE et al., 2011). Entretanto, de acordo com a classificação utilizada com maior frequência, o gênero *Salmonella* é composto por três espécies, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterrânea*, com base em diferenças na análise de sua sequência de 16S rRNA. A espécie *S. enterica* é dividida ainda em seis subespécies, com base na expressão genômica e propriedades bioquímicas, denominadas por um algarismo romano e um nome: I - *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, II - *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, III - *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, IV - *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, V - *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* e VI - *Salmonella enterica* subsp. *indica* (DOYLE; BUCHANAN, 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Entre as subespécies de *Salmonella*, *S. enterica* subsp. *enterica* e *Salmonella enterica* subsp. *salamae* são encontradas em humanos e animais de sangue quente. Sendo *S. enterica* subsp. *enterica* responsável por aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* spp. em humanos e animais de sangue quente. As outras cinco subespécies de *S. enterica* e a espécie *S. bongori* são encontradas principalmente no meio ambiente e em animais de sangue frio, por esta razão são raras em humanos (BRENNER et al., 2000).

Os membros do gênero *Salmonella* podem ser divididos em sorotipos/sorovares. Esta classificação foi proposta pela primeira vez por White em 1926 e, posteriormente expandida por Kauffmann em 1941, denominado esquema de Kauffmann-White. O esquema é baseado na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H), e capsulares (Vi), este último quando

presente (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). O Instituto Pasteur, localizado em Paris, na França é o responsável pela atualização da taxonomia do gênero *Salmonella*. Ele é composto por 2.659 sorotipos (Tabela 1) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Tabela 1 Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de *Salmonella*.

<i>S. enterica</i>	Número
subsp. <i>enterica</i>	1586
subsp. <i>salamae</i>	522
subsp. <i>arizonae</i>	102
subsp. <i>diarizonae</i>	338
subsp. <i>houtenae</i>	76
subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total	2659

Fonte: Issenhuth-Jeanjean et al. (2014).

A nomenclatura dos sorotipos pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* normalmente não é realizada pelas fórmulas antigênicas, utiliza-se o nome relacionado ao local geográfico onde o sorotipo foi isolado pela primeira vez. O nome do sorotipo não é escrito em itálico, com a primeira letra maiúscula. Os demais sorotipos não nomeados, descritos após 1966, pertencentes as outras subespécies, II, III, IV e VI e a espécie *S. bongori* são nomeadas por suas fórmulas antigênicas, seguindo o nome da subespécie (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Salmonella spp. possui boa capacidade de adaptação em uma ampla faixa de condições ambientais. A temperatura ótima de crescimento encontra-se entre 35 e 37 °C, com faixa de crescimento entre 5 e 45 °C (BRANDS, 2005; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Embora sejam consideradas mesófilas, algumas cepas podem apresentar crescimento à temperatura de até 54 °C, e outras têm a capacidade de sobreviver em alimentos armazenados na faixa de 2 a 4 °C (DOYLE; BUCHANAN, 2013). O pH ótimo para o crescimento destas bactérias é em torno da neutralidade (6,5 e 7,5), com capacidade de crescimento em uma faixa de pH de 4 a 9 (DOYLE; BUCHANAN, 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; PUI et al., 2011). A inibição do crescimento das espécies de *Salmonella* foi relatada para valores de a_w abaixo de 0,940 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Entretanto, de acordo com Doyle e Buchanan, (2013), *Salmonella* spp. foi capaz de crescer em sopas secas reidratadas, com a_w atingindo valores de até 0,930, após 3 dias de incubação a 30 °C.

A inibição de *Salmonella* spp. tem sido reportada pela presença de NaCl variando entre 3 e 4%. De acordo com a literatura, sua tolerância ao sal pode ser aumentada com o aumento da temperatura na faixa de 10 a 30 °C. Além disso, é relatado que a anaerobiose pode potencializar uma maior tolerância ao sal em *Salmonella* spp., causando preocupações quanto à segurança de alimentos embalados em atmosfera modificada e a vácuo, que contêm altos níveis de sal (DOYLE; BUCHANAN, 2013).

As espécies constituintes do gênero *Salmonella* são amplamente distribuídas na natureza e têm o trato intestinal do homem e de animais como reservatórios primários. Essas bactérias possuem uma grande variedade de hospedeiros (bovinos, suínos, aves, répteis, roedores, vegetais etc.). *Salmonella* spp. é eliminada em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água. A sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa, em particular na matéria orgânica, podendo permanecer viável no material fecal por longos períodos (anos), particularmente em fezes secas, podendo resistir mais de 28 meses nas fezes de aves, 30 meses no estrume bovino, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, podendo ser ainda encontrada em efluentes de água e esgoto, como resultado de contaminação fecal (DOYLE; BUCHANAN, 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Com relação à epidemiologia, bactérias do gênero *Salmonella* spp. podem ser divididas em três grupos. No primeiro grupo, as que somente infectam seres humanos, constituído por *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi e *Salmonella* Paratyphi C, causadoras das febres tifoide e paratifoide. No segundo, estão aqueles sorotipos adaptados ao hospedeiro (alguns dos quais são patogênicos a humanos e podem ser contraídos de alimentos), incluem-se nesse grupo *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum (aves domésticas), *Salmonella* Dublin (gado), *Salmonella* Abortus-equi (cavalos), *Salmonella* Abortus-ovis (ovelha) e *S. Choleraesuis* (suína). E, por fim, sorotipos não adaptados (sem preferência do hospedeiro), infectam homens e animais, e incluem a maioria dos sorotipos de origem alimentar (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Entre os microrganismos patogênicos, causadores de doenças transmitidas por alimentos, as espécies de *Salmonella* destacam-se entre as mais importantes. Este grupo de bactérias está envolvido em vários casos de surtos de doenças, geralmente resultantes da ingestão de alimentos contaminados, como carnes de aves, leite, carne bovina, ovos, carne suína e frutos do mar (JAKOČIUNE et al., 2014). Em todo o mundo, estima-se que, dos 93,8 milhões de casos de gastroenterite relacionados a *Salmonella* spp. que ocorrem a cada ano, 80,3 milhões foram de origem alimentar (MAJOWICZ et al., 2010).

2.1.1 *Salmonella enterica*

A espécie *S. enterica* é constituída por aproximadamente 2.600 tipos de cepas sorologicamente distintas e tem recebido muita atenção por estar envolvida em muitos surtos de contaminação de alimentos (HOHMANN, 2006; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011; POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003) e, entre as seis subespécies dessa espécie, *S. enterica* subsp. *enterica* tem ganhado maior destaque. Essa subespécie é composta por aproximadamente 1.531 sorotipos, com pelo menos 100 deles considerados importantes em termos de saúde pública e animal (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Os sorotipos mais importantes são aqueles que afetam tanto humanos quanto animais e causam as chamadas doenças transmitidas por alimentos. Alguns sorotipos que constituem essa subespécie se destacam por serem os principais responsáveis por infecções humanas transmitidas por alimentos (GRIMONT; WEILL, 2007; PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). Por essa razão, muitos estudos têm focado na avaliação da prevalência, resistência antimicrobiana, virulência, capacidade de infecção e formação de biofilme de *S. enterica* subsp. *enterica* (LAMAS et al., 2018).

O surgimento de infecções humanas transmitidas por alimentos, a disseminação mundial juntamente com a resistência a múltiplos antibióticos e diferentes condições ambientais de *S. enterica*, tornaram-se de grande importância, principalmente no que diz respeito à ocorrência de salmonelose (HOHMANN, 2006; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011). O controle da salmonelose de origem alimentar é um desafio, destacando a necessidade de desenvolvimento e avaliação contínuos de abordagens para avanços na segurança de alimentos (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012). Surtos de salmonelose têm sido associados a vários alimentos e os dois sorotipos, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Salmonella enterica* Typhimurium, são reportados como os mais comumente associados a infecções humanas (MAJOWICZ et al., 2010).

Por serem espécies amplamente distribuídas na natureza e possuírem capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, que se tornam fontes de disseminação do agente, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são consideradas de difícil controle e eliminação (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Produtos à base de ovo e carne de frango ainda são os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos causados por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (YADAV et al., 2016).

Quando aves e porcos são infectados por *S. Typhimurium*, a detecção da bactéria torna-se um grande problema, pois geralmente os animais não apresentam sintomas,

contribuindo para transmissão do patógeno a seres humanos (BEST et al., 2007). *S. Typhimurium* é considerado um dos sorotipos de maior ocorrência em todo o mundo. Nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, entre os anos de 2001 e 2007, *S. Typhimurium* foi reportada como o sorotipo mais isolado. Nesse mesmo período, na África, Ásia e América latina, incluindo o Brasil, foi a segunda mais isolada, ficando atrás de *S. Enteritidis* (SPECTOR; KENYON, 2012).

Os casos de contaminação humana por *S. Enteritidis* aumentaram na Europa entre 2013 e 2017 e foram normalmente associados ao consumo de carne de aves e ovos contaminados. No Sul do Brasil, mais especificamente no Estado do Rio Grande do Sul, uma cepa específica denominada *S. Enteritidis* SE86 foi responsável por mais de 95% das salmoneloses investigadas durante os anos de 1999 a 2013 (RITTER et al., 2019).

Salmonella enterica Heidelberg, também pertencente a subespécie *enterica*, tem chamado atenção como um dos principais sorotipos associados ao consumo de produtos avícolas, podendo contaminar e causar doenças em animais e humanos (DEWI et al., 2021). As bactérias pertencentes ao sorotipo *S. Heidelberg* são consideradas uma das mais virulentas e invasivas, causando infecções intestinais associadas a sintomas graves da doença, como miocardite e bacteremia (BRONOWSKI; WINSTANLEY, 2009). São frequentemente reportados por colonizarem aves sem apresentar sintomas, representando um risco maior de disseminação (BEARSON et al., 2017). O consumo de ovos e carnes de aves já é muito conhecido como fator de risco associado à doença devido aos sorotipos da subespécie *enterica*, incluindo *S. Heidelberg*, porém outros alimentos também têm sido associados, como por exemplo, macarrão e feijão frito (PAPHITIS et al., 2020).

Shah et al. (2017) reportaram o sorotipo *S. Heidelberg* como o terceiro mais isolado de produtos avícolas. Demczuk et al. (2003) relataram *S. Heidelberg* como o sorotipo isolado mais comum em hemoculturas no Canadá. Outros países também reportaram a ocorrência desse sorotipo, como Estados Unidos (DEBLAIS et al., 2018), Colômbia (DONADO-GODOY et al., 2015) e Brasil (ETTER et al., 2019).

Comparado aos outros sorotipos (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*) citados acima, poucos estudos específicos envolvendo o sorotipo *Salmonella enterica* Minnesota estão disponíveis. A real importância de *S. Minnesota* na saúde pública ainda tem sido pouco documentada (BRASÃO et al., 2021). De acordo com Edwards e Bruner (1938), *S. Minnesota* foi isolada pela primeira vez em 1936, em um peru de uma granja de três semanas de idade, no estado de Minnesota nos Estados Unidos. *S. Minnesota* traz preocupação devido

ao aumento no número de isolamentos na cadeia de produção de carne de aves (VOSS-RECH et al., 2015) e pelo fato de pouco se conhecer sobre seu potencial zoonótico.

No Brasil e no mundo, alguns estudos têm demonstrado um aumento de isolados de *S. Minnesota* na cadeia avícola. Freitas (2011) demonstraram que, de 2009 a 2010, *S. Minnesota* foi o segundo sorotipo mais isolado em frangos de corte no Brasil. Apesar da poucas evidências e estudos que suportem a associação de *S. Minnesota* com doenças em aves ou na saúde pública, a presença de representantes deste sorotipo em alimentos é indesejável, além de interferir na relação comercial entre os países, podendo levar até mesmo à interdição do alimento exportado.

Durante o processamento de alimentos, nem todos os microrganismos são capazes de se adaptar e crescer frente aos diferentes tipos de barreiras impostas. Porém, dentre estes microrganismos, a subespécie *S. enterica* é bem conhecida por sua boa capacidade de crescer e sobreviver em muitas condições ambientais, adaptando-se e respondendo de forma apropriada a uma variedade de barreiras encontradas (SPECTOR; KENYON, 2012). Os constituintes dessa subespécie possuem a capacidade de responder de maneira variada às condições ambientais estressantes, por meio de uma ampla gama de respostas genéticas, bioquímicas e fisiológicas. As células bacterianas, pertencentes às populações expostas a condições estressantes, que sobrevivem, normalmente são capazes de colonizar e invadir a mucosa intestinal do hospedeiro por meio de alimentos contaminados (GÓMEZ-BALTAZAR et al., 2019; SPECTOR; KENYON, 2012). Como estratégias da *S. enterica* para a sobrevivência ao estresse pode-se destacar a indução à formação de biofilme (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012), geração de células filamentosas (MATTICK et al., 2000) e modificação da sua composição e fluidez (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2008).

2.2 RESPOSTA MICROBIANA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE

As condições ambientais a que um microrganismo é exposto podem variar drasticamente durante todo o seu ciclo de vida. A capacidade de microrganismos crescerem e sobreviverem é influenciada por fatores extrínsecos, como a temperatura do ambiente, e fatores intrínsecos, como por exemplo, o conteúdo de nutrientes, pH e a_w do alimento em questão (SMET et al., 2015). Ao longo do seu ciclo de vida, principalmente durante o processamento de alimentos, microrganismos podem se deparar com mudanças ambientais, sendo estas letais levando a inibição ou subletais representando um tipo de estresse para a célula microbiana (SPECTOR; KENYON, 2012). A habilidade dos microrganismos reconhecerem e responderem

de maneira rápida e adequada às mudanças ambientais são crucias para sua sobrevivência (FOSTER; SPECTOR, 1995).

Patógenos de origem alimentar encontram condições adversas à vida em praticamente todos os ambientes incluindo os naturais (por exemplo, solo, sistemas hídricos), os industriais (por exemplo, matadouros, fábricas de processamento de alimentos) e os hospedeiros (animais, humanos) (WINFIELD; GROISMAN, 2003). Alimentos são ambientes complexos, que podem gerar diferentes condições estressantes, naturalmente ou durante o processamento, armazenagem e distribuição, como por exemplo, disponibilidade limitada de nutrientes, pH adverso, osmolaridade, oxidação, temperaturas extremas, entre outros (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015; ULTEE et al., 2019).

A resposta bacteriana à exposição a diferentes condições ambientais consideradas estressantes, tais como temperatura, pH, atividade de água (a_w), aplicados individualmente ou simultaneamente, têm se tornado foco de muitos estudos (DUFRENNE et al., 1997; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2003; MUÑOZ-CUEVAS et al., 2010; SMET et al., 2015; TIGANITAS et al., 2009). Condições de estresse podem ser impostas pelo processamento de alimentos, gerando um desafio às células bacterianas, limitando seu crescimento. Estratégias mais recentes, como a de múltiplas barreiras, que utilizam tratamentos mais leves para inibir microrganismos, estressando-os ou lesionando-os permanentemente, veem sendo utilizadas, especialmente no caso de alimentos minimamente processados. Entretanto, quando células bacterianas conseguem adaptar-se ao estresse, podem ser capazes de resistir a tratamentos posteriores, ou ainda, resistirem à passagem pelo estômago e barreiras intestinais quando confrontadas com barreiras defensivas do hospedeiro (MELO et al., 2017).

Outra preocupação, relacionada à exposição de bactérias a condições de estresse, é reportada pela dificuldade de detecção durante a análise microbiológica das células lesionadas, pois elas não são capazes de crescer em meios microbiológicos convencionais ou, na maioria das vezes, um ambiente apropriado não é utilizado. Assim, essa situação pode levar a uma superestimação da letalidade dos tratamentos ou à falha na detecção da presença de patógenos durante o controle de qualidade de alimentos ou investigações de surtos (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015).

As respostas adaptativas ao estresse podem derivar do aparecimento de mutações genômicas, que surgem na população microbiana devido ao fenótipo benéfico que a elas é conferido, quando em ambientes de pressão seletiva (RANDO; VERSTREPEN, 2007). Segundo Abee, (1999), em alguns casos, pode ocorrer também uma resposta transitória ao estresse, geralmente consistindo em uma mudança característica no padrão de expressão gênica.

A regulação genética envolve uma série de interruptores controlando a expressão coordenada ou a repressão de genes. No final, uma série de respostas fisiológicas ocorrem com alterações em proteínas, DNA e lipídios. Essas respostas incluem o início de sistemas homeostáticos, síntese induzida de proteínas de estresse que reparam DNA e proteínas danificadas e ativação de sistemas enzimáticos com estresse específico.

A exposição de bactérias patogênicas a uma condição estressante pode resultar no aumento da sua resistência a essa condição de estresse aplicada ou a outros diferentes estresses ambientais subsequentes. As respostas e estratégias de sobrevivência ao estresse de *Salmonella* spp. podem ter um impacto profundo na epidemiologia e patogênese dessas bactérias (SIRSAT et al., 2011; YADAV et al., 2016).

2.2.1 Estresse osmótico

Durante o processamento de alimentos, microrganismos enfrentam diversas mudanças ambientais, deparando-se com diferentes tipos de estresse. Dentre essas condições estressantes, o estresse osmótico, que pode ser obtido pela diminuição da a_w do alimento, é um dos mais comumente aplicados no processamento de alimentos, seja pela adição de solutos, como agentes osmóticos, por técnicas de desidratação, ou ainda pela evaporação natural da água dos alimentos. A adição de solutos, como o cloreto de sódio (NaCl), é uma estratégia comumente aplicada na indústria de alimentos e seu uso pode causar danos às células bacterianas, interrompendo a manutenção do equilíbrio osmótico entre os ambientes citoplasmático e intracelular (TIGANITAS et al., 2009).

A exposição de células bacterianas de *Salmonella* a ambientes osmóticos estressantes resulta na perda de água, causando considerável encolhimento da célula microbiana e, como consequência, o aumento nas concentrações de todos os metabólitos intracelulares. A perda repentina de água das células, chamada de plasmólise, pode resultar na inibição de uma variedade de processos fisiológicos, desde a absorção de nutrientes até a replicação do DNA (BURGESS et al., 2016). A adaptação de bactérias a ambientes osmóticos estressantes é descrita por manifestações fisiológicas e genéticas. Quando as bactérias são submetidas a tais condições, elas necessitam de respostas rápidas para sobreviver, para equilibrar rapidamente a pressão de turgência, e assim se reajustar aos níveis osmóticos do ambiente (SLEATOR; HILL, 2001; SPECTOR; KENYON, 2012), por meio do aumento na concentração de solutos ou “osmoprotetores” compatíveis no citosol e/ou periplasma (SMET et al., 2015; SPECTOR; KENYON, 2012). Para as constituintes do gênero *Salmonella* os principais “osmoprotetores”

ou solutos descritos incluem íons de potássio, glutamato, glutamina, prolina, glicina-betaína, e colina ou trealose (BURGESS et al., 2016).

A resposta inicial das bactérias ao choque hiperosmótico (maior osmolaridade) é um aumento da captação de K^+ do meio extracelular. Dois principais sistemas de transporte são descritos como responsáveis por esta função: o Trk, um sistema constitutivo de baixa afinidade e o sistema Kdp, rapidamente induzido, que tem uma alta afinidade com K^+ (BURGESS et al., 2016; SPECTOR; KENYON, 2012). Em seguida, ocorre um aumento de glutamato que é catalisado por duas enzimas, glutamato desidrogenase e glutamato sintase (BURGESS et al., 2016). Os sistemas de transporte pelos quais os solutos compatíveis são transportados para as células são ProP e ProU. O primeiro sistema possui menor afinidade pela glicina betaína, mas é expresso constitutivamente e só sofre indução de 2 a 3 vezes durante o crescimento a alta osmolaridade. O sistema ProU é um sistema de transporte de alta afinidade, induzido sob condições de estresse osmótico e reprimido pelo acúmulo de solutos compatíveis, como a prolina e a glicina-betaína (BURGESS et al., 2016; FOSTER; SPECTOR, 1995; KOO; BOOTH, 1994).

As bactérias da espécie *S. enterica* sintetizam a trealose e algumas podem converter a colina fornecida externamente em glicina-betaína. Se nenhum soluto compatível estiver disponível para transporte ou se o fornecimento desses compostos não for adequado para equilibrar forças osmóticas, os sorotipos de *Salmonella* sintetizam o dissacarídeo trealose como seu principal “osmoprotetor” (SLEATOR; HILL, 2001; SPECTOR; KENYON, 2012). A biossíntese de trealose envolve as enzimas trealose-6-fosfato fosfatase e trealose-6-fosfato sintase codificadas pelos genes *otsB* e *otsA*, respectivamente (SPECTOR; KENYON, 2012).

A avaliação do comportamento de espécies do gênero *Salmonella* submetidas a ambientes de estresse osmótico tem se tornado foco de estudos, demonstrando que a variação nos níveis osmóticos do ambiente de crescimento pode influenciar o comportamento bacteriano (KOUTSOUMANIS, 2008; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2005; MELO et al., 2017; ZHOU et al., 2011, 2012). De acordo com Koutsoumanis (2008), que estudou os limites de crescimento de células individuais de *S. Enteritidis* expostas a níveis de estresse osmótico, à medida que a concentração de NaCl aumenta e, conseqüentemente a a_w diminui, o número de células da população capaz de crescer diminui gradualmente.

Estudos relatam que a exposição de cepas de *Salmonella* a ambientes osmóticos estressantes pode induzir a maior resistência a estresses subsequentes ou a tratamentos de inibição microbiana. Podolak et al. (2010), mostraram que a redução da a_w pode aumentar a

resistência de sorotipos de *Salmonella* ao calor, e que as células permanecem em um estado de baixa atividade metabólica, que é retomada após o retorno a condições ambientais favoráveis.

2.2.2 Fenômeno Fênix

Estudos que abordam o comportamento microbiano em condições próximas aos limites de crescimento, desencadeando ambientes estressantes, apresentam um comportamento caracterizado pela redução inicial da população microbiana, seguido por um período que a população microbiana se mantém inalterada, e então ocorre a retomada do crescimento exponencial até atingir a fase estacionária. Este comportamento foi denominado como Fenômeno Fênix (FF). Primeiramente reportado por Collee, Knowlden e Hobbs, (1961), para *Clostridium welchii*, e mais tarde, estudado por Shoemaker e Pierson (1976), no comportamento de *Clostridium perfringens*.

Mesmo sendo um foco de estudos de extrema importância para a segurança de alimentos, existem poucas pesquisas disponíveis na literatura sobre o FF. Ao longo dos anos, alguns autores têm reportado o FF para diferentes microrganismos e condições ambientais. Mellefont, Kocharunchitt e Ross (2015) avaliaram o efeito combinado da aplicação de resfriamento e ressecamento superficial na sobrevivência de *E. coli*, a partir da exposição do microrganismo a ambientes de baixa temperatura e a_w . Nas condições impostas, o FF foi observado para *E. coli*.

O comportamento de *Salmonella* spp. frente a níveis de estresse osmótico tem sido reportado por levar a ocorrência do FF (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2004, 2005; ZHOU et al., 2011, 2012). Mellefont, Mcmeekin e Ross (2005) observaram o FF no comportamento de *S. Typhimurium*, avaliando as respostas de populações fisiologicamente distintas, a partir de inóculos em fase exponencial e fase estacionária, expostas a níveis de estresse osmótico (valores de a_w variando de 0,950 a 0,993). De acordo com os autores, o comportamento ocorreu devido à inativação inicial de uma porção da população, seguida de retomada do crescimento.

O FF foi também reportado no estudo realizado por Zhou et al. (2011). As células bacterianas de *S. Typhimurium* foram expostas à condição de estresse osmótico em diferentes níveis (% NaCl variando de 0,5 a 7,5%), e cultivadas em dois tipos de meio, um meio “mínimo” (sem adição de “osmoprotetor”) e outro “rico” (com adição de “osmoprotetor”). As células bacterianas expostas a um meio “mínimo” apresentaram um período inicial de declínio, antes da retomada do crescimento exponencial. Os autores atribuíram esse comportamento

populacional à adequação das células ao novo ambiente, com baixa a_w , e ao trabalho de adaptação que as células têm que percorrer em um meio menos propício ao crescimento.

Aspridou, Akritidou e Koutsoumanis (2018) estudaram o FF de *Salmonella* Agona submetida a condição de estresse osmótico (6,75% NaCl), caracterizando-o como um comportamento “trimodal”. Uma sequência de imagens de microscópio gravadas e visualizadas a uma velocidade maior do que a real (*time-lapse microscopy*) foi utilizada para análise. As respostas de *S. Agona* exposta a condição de estresse osmótico foram estudadas ao longo do tempo, em nível de células individuais. De acordo com os autores, ao longo do FF, três subpopulações podem ser observadas simultaneamente: células crescendo, sobrevivendo e morrendo.

De acordo com Booth (2002), uma explicação para a diminuição inicial da concentração celular, seguida do crescimento, é que o inóculo é constituído de uma população heterogênea, devido à expressão de proteínas nas células. Algumas células podem ter uma concentração maior de uma determinada proteína, o que as ajuda a lidar com o estresse.

2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

O uso da microbiologia preditiva como uma ferramenta permite a descrição, por meio de modelos matemáticos, da dinâmica (crescimento, sobrevivência e inativação) de populações microbianas submetidas às mudanças físicas, químicas e biológicas no ambiente, ao longo do processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos. Os modelos propostos buscam descrever o comportamento microbiano frente a diferentes conjuntos de fatores intrínsecos e extrínsecos, contribuindo muito para análise de risco microbiológico e segurança de alimentos (HUANG, 2014).

Em microbiologia preditiva, de acordo com McDonald e Sun (1999), os modelos matemáticos podem ser classificados em modelos primários, secundários e terciários (pelo nível da modelagem), em modelos empíricos ou mecanísticos (pela sua concepção estrutural) e modelos cinéticos ou probabilísticos (interesse específico da modelagem). O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou por volta de 1920, para o cálculo do tempo de destruição térmica de microrganismos (BIGELOW, 1921; BIGELOW; ESTY, 1920). Os modelos primários descrevem as respostas microbianas em relação ao tempo, para um único conjunto de condições constantes. Os modelos secundários descrevem as respostas de um ou mais parâmetros obtidos no modelo primário, em relação a uma ou mais condições ambientais,

como variações de temperatura, por exemplo. Os modelos terciários estão disponíveis na forma didática em softwares (WHITING; BUCHANAN, 1993).

2.3.1 Modelos de crescimento e inativação microbiana

Os modelos cinéticos são uma importante ferramenta para a simulação dos diferentes fenômenos que ocorrem durante o processamento de alimentos. Modelos matemáticos para descrever o crescimento e a inativação de microrganismos em alimentos como uma função das condições intrínsecas (pH, atividade de água) e extrínsecas (temperatura, pressão, aplicação de ultrassom ou radiação) estão disponíveis (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005). Com o objetivo de descrever e prever o comportamento, o grau de inativação microbiana, ou os efeitos letais e subletais durante toda a cadeia de processamento de alimentos, a aplicação de modelos matemáticos se torna fundamental para o estabelecimento de melhores condições para segurança de alimentos.

Existe uma grande quantidade de modelos matemáticos disponíveis na literatura para descrever o crescimento microbiano. De acordo com Vadasz e Vadasz (2005), 14 modelos matemáticos estavam sendo usados de forma consistente naquela última década. Entre os modelos matemáticos de crescimento microbiano em alimentos, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) destaca-se na literatura e tem sido um dos mais utilizados. Ele se destaca pela facilidade no uso, por ter softwares disponíveis onde as equações já estão inseridas, é aplicável em condições ambientais dinâmicas, possui boa capacidade de ajuste, e os parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (LEBERT; LEBERT, 2006; VAN IMPE et al., 2005).

Modelos primários de inativação microbiana em alimentos são amplamente utilizados. As predições da cinética de inativação podem ser realizadas por meio de modelos que descrevem o número de reduções logarítmicas decimais em função do tempo de tratamento aplicado. Um dos modelos que é tradicionalmente usado é o modelo de Bigelow, que considera a inativação de microrganismos uma cinética log-linear de primeira ordem. Ele assume que todas as células de uma população têm a mesma sensibilidade ao fator de inativação aplicado (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005). Porém, comportamentos log-lineares são considerados uma exceção, e cinéticas de inativação não log-lineares são mais comuns (PELEG, 2000).

Normalmente, diferentes tipos de curvas de inativação podem ser observados, caracterizadas por suas formas, descritas como log-linear, log-linear com ombro, log-linear com cauda, log-linear com ombro e cauda, bifásico, bifásico com ombro, e não-linear com

concauidade para cima ou para baixo (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005). Entre os modelos de inativação, os modelos de Weibull e log-linear com ombro têm sido aplicados com sucesso para descrever a inativação de microrganismos. Ambos os modelos têm como vantagem a sua simplicidade matemática e grande flexibilidade (MAFART et al., 2001).

A utilização de modelos preditivos para descrever o crescimento e inativação de espécies de *Salmonella* aumentaram nos últimos anos (MILKIEVICZ et al., 2020, 2021; MUÑOZ-CUEVAS; METRIS; BARANYI, 2012; NOVIYANTI et al., 2018; PIN et al., 2011). Entretanto, a maioria dos modelos disponíveis concentra-se em descrever o comportamento microbiano, frente às condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis ao seu crescimento (crescimento ou inativação). Poucos estudos abordam modelos capazes de descrever o comportamento microbiano em condições próximas aos limites de crescimento, considerados ambientes estressantes, e que possa ter a presença de uma população intermediária, o que torna difícil a quantificação e estimativa, como ocorre no FF (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; ZHOU et al., 2011).

2.3.2 Modelos que descrevem o Fenômeno Fênix

A eficiência dos modelos matemáticos utilizados para descrição do comportamento de microrganismos expostos a ambientes próximos aos limites de crescimento depende da sua habilidade em propor parâmetros coerentes, que auxiliem na compreensão do comportamento microbiano. Existem poucos estudos disponíveis que apresentam modelos matemáticos capazes de prever a recuperação das células bacterianas expostas a ambientes estressantes, mais conhecido como o FF (MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2004; RHODES; KATOR, 1988). Sabe-se que, além das condições ambientais às quais os microrganismos são expostos, e do estado fisiológico das células, que pode ser resultante das condições de crescimento do ambiente de pré-inoculação, após a exposição de microrganismos a condições ambientais desfavoráveis, nem todas as células são capazes de crescer, podendo levar a obtenção de populações bacterianas heterogêneas (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018).

A predição segura do comportamento bacteriano nesses ambientes estressantes é difícil de ser alcançada. A compreensão e o desenvolvimento de modelos capazes de descrever esse comportamento é fundamental para a aplicação e a utilização dos modelos preditivos na segurança e no controle da qualidade de alimentos, visto que são condições reais encontradas pelos microrganismos durante o processamento de alimentos (AGUIRRE; BORNEO; LEON, 2013; BARANYI; ROBERTS, 1994; ZHOU et al., 2011).

O efeito da exposição a condição de estresse osmótico em populações fisiologicamente distintas de *S. Typhimurium* foi estudado por Mellefont, Mcmeekin e Ross (2004, 2005). Os autores utilizaram o tempo de adaptação relativo (TLR), definido pela razão entre o tempo de adaptação e o tempo de duplicação, para caracterizar o tempo necessário para o crescimento das células durante a exposição aos ambientes osmótico estressantes. Os experimentos foram realizados em uma ampla gama de níveis da condição de estresse osmótico (adição de NaCl), com o objetivo de avaliar seus efeitos no TLR. Os autores concluíram que a exposição a condição de baixa a_w levou à obtenção de maiores TLRs.

Zhou et al. (2011) avaliaram e modelaram o comportamento de *S. Typhimurium* exposta a condição de estresse osmótico, variando a composição do meio de crescimento, que levou ao FF. A fase de adaptação foi definida como a adaptação da subpopulação sobrevivente e foi modelada por meio de um parâmetro que quantifica o trabalho bioquímico que as células sobreviventes realizam durante esse período, definido como o “trabalho a ser feito”. Visto isso, com a definição da fase de adaptação (lag) revisada, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) foi modificado para levar em consideração o período de declínio inicial. Os autores afirmaram que a curva da concentração da população total era a soma de uma subpopulação morrendo e outra sobrevivente e crescente.

2.4 CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DE CÉLULAS BACTERIANAS

A citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta de diagnóstico biológico primário (HAMEED; XIE; YING, 2018), definida como o estudo de células isoladas em um fluxo líquido. É um método individual, quantitativo e qualitativo utilizado para caracterizar partículas em uma suspensão líquida. Um citômetro de fluxo é composto de três partes principais: fluídica, óptica e eletrônica e seus componentes principais são o laser, uma câmara de amostras e um sistema fotodetector carregado com um tubo fotomultiplicador (LONGIN et al., 2017).

A técnica de CF utiliza uma combinação de dispersão de luz e emissão de fluorescência para detectar células com vários estados estruturais, fisiológicos e genéticos. CF é um método poderoso que pode ser utilizado para analisar múltiplos parâmetros de células individuais dentro de populações heterogêneas (CRONIN; WILKINSON, 2010). As aplicações industriais de CF incluem a detecção rápida de patógenos, a estimativa de dano celular após etapas de processamento, como aquecimento, secagem por aspersão e liofilização, e monitoramento de bioprocessos (DÍAZ et al., 2010; WILKINSON, 2018).

Diferentes aplicações têm sido dadas ao método de CF como, por exemplo, a avaliação bacteriológica de amostras de água e a detecção de bactérias indesejáveis e não cultiváveis (HOEFEL et al., 2003). A técnica de CF fornece um detalhamento sobre o estado fisiológico das células microbianas, com o auxílio de sondas específicas fluorescentes, que possibilitam a enumeração rápida em culturas mistas. A CF é utilizada também nas indústrias vinícolas para determinar a concentração e o estado fisiológico dos microrganismos fermentadores e deteriorantes (LONGIN et al., 2017).

Métodos convencionais utilizados para a análise de populações microbianas são considerados limitados, pois podem determinar erroneamente o número de bactérias viáveis, uma vez que estas técnicas assumem que todas as bactérias presentes estão vivas ou mortas. Em determinadas situações, as bactérias podem entrar em um estado viável, mas não cultivável (VBNC), durante o qual elas não são cultiváveis, mas ainda são metabolicamente ativas e podem causar infecção em hospedeiros humanos (GUEDES; DE SOUZA, 2018; SINGH; BARNARD, 2017).G

Além disso, quando células são submetidas a condições adversas, o dano celular causado pelo estresse pode ser de difícil detecção, uma vez que não se sabe por qual tipo de subpopulações a população bacteriana total será constituída. A CF pode ser considerada como uma abordagem alternativa, que permite a detecção rápida e confiável de múltiplos estados fisiológicos em células. Essa técnica tem recebido muita atenção para ser aplicada como método de medida da viabilidade e das funções fisiológicas das bactérias (SINGH; BARNARD, 2017).

O método de CF, em combinação com técnicas fluorescentes, oferece uma ferramenta poderosa para analisar uma população celular em nível unicelular, já que pode fornecer dados quantitativos, em tempo real e de alta velocidade para aquisição de dados para amostras ambientais, alimentares e clínicas. Antolinos et al. (2014) e Chen et al. (2012) observaram que o uso da CF para medir a “dinâmica” da membrana celular forneceu evidências consistentes para monitorar a heterogeneidade fisiológica e a análise de células individuais em uma população bacteriana estressada, fornecendo informações imediatas sobre o estado fisiológico das células.

As respostas bacterianas de *Shigella* e *Salmonella*, expostas a um ambiente simulado do estômago humano (fluido gástrico ácido), foram estudadas usando CF e o método de contagem em placa, com o objetivo de avaliar a heterogeneidade fisiológica, a integridade da membrana e a sobrevivência. Quando coradas com iodeto de propídio (PI) e laranja de tiazol (TO), os resultados obtidos por CF mostraram que as células bacterianas, após a exposição ao

líquido gástrico, transformaram-se distintamente em subpopulações fisiologicamente heterogêneas: células intactas, estressadas e danificadas (SINGH; BARNARD, 2017).

Sibanda e Buys (2017) avaliaram o efeito da exposição de células de *Listeria monocytogenes* aos estresses ácido (pH 4,2), osmótico (NaCl 10%) e térmico (55 °C por 30 min), utilizando o método de contagem em placa e CF juntamente com corantes indicadores de integridade da membrana (PI e TO). Com base na análise de CF juntamente com os corantes TO e PI, foi possível concluir que o estresse ácido causou o maior nível de lesão, seguido pelos estresses térmico e osmótico.

2.5 INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR LUZ ULTRAVIOLETA NO ESPECTRO C (UV-C)

A luz ultravioleta (UV) possui uma faixa de comprimento de onda de 100 a 400 nm, é uma radiação eletromagnética não-ionizante com aplicação potencial na descontaminação microbiana. Ela é dividida em faixas de comprimentos de onda, como UV-A (315-400 nm), UV-B (280-318 nm), UV-C (200-280 nm) e UV a vácuo (100-200 nm). A luz UV-C (com 90% de emissão a 253,7 nm) é conhecida por ser germicida, inativar vírus, bactérias, protozoários, leveduras, fungos filamentosos e algas (KEYSER et al., 2008; KOUTCHMA, 2009).

O tratamento por UV-C possui diferentes aplicações na indústria de alimentos, como descontaminação de superfícies, desinfecção de água potável e inativação microbiana. A inativação microbiana usando luz UV é alcançada quando os fótons UV atacam o DNA microbiano e subsequentemente o danificam por meio da dimerização de pirimidina, inibem a formação de novas cadeias de DNA no processo de replicação celular, resultando na chamada morte clonogênica (inabilidade de replicação) dos microrganismos (KAAVYA et al., 2021).

A aplicação do tratamento com luz UV-C apresenta diversas vantagens, como a ausência de resíduos químicos, a fácil configuração, o baixo consumo de energia e a manutenção de características sensoriais do alimento. Entretanto, pode apresentar algumas desvantagens, como a descoloração em alguns alimentos e o baixo poder de penetração da luz, pois o efeito germicida é obtido apenas pela aplicação direta no alvo, não sendo eficaz em superfícies porosas, com sombras ou orifícios (MENEZES et al., 2020).

Quando um produto é submetido à luz UV, é importante definir a fluência (dose) de radiação recebida. E, para avaliar o comportamento de microrganismos expostos à luz UV-C são utilizados os parâmetros de fluência (dose) e irradiância (intensidade). A fluência (J/m^2) é definida como a energia total recebida por unidade de área na superfície de um substrato, sendo

que ela varia com o tempo (s), ou seja, quanto maior o tempo de exposição, maior a fluência. A irradiância (W/m^2) é definida como a quantidade de fótons recebidos por unidade de área da superfície do substrato, sendo que ela varia com a potência da lâmpada de UV-C e a distância entre o substrato e a lâmpada. Sensores chamados de radiômetros (térmicos ou fotônicos) são utilizados para medir a fluência ou irradiância (KOUTCHMA, 2009).

A utilização de tecnologia baseada em luz UV-C vem sendo proposta como uma alternativa aos tratamentos térmicos para descontaminação de alimentos, pois ela causa menor impacto nas propriedades dos alimentos (POSSAS et al., 2018). A tecnologia baseada em luz UV-C é considerada relativamente simples, acessível e eficaz para tornar os produtos acabados seguros e com prazo de validade estável. Bons resultados estão sendo obtidos em pesquisas que avaliam a eficácia da aplicação da luz UV-C na inativação de uma ampla gama de microrganismos relacionados à contaminação e deterioração de alimentos (CONDÓN-ABANTO et al., 2016; ESTILO; GABRIEL, 2017; GUILLÉN et al., 2020; MENEZES et al., 2020). A luz UV-C foi avaliada como uma agente efetiva de inativação de *Salmonella* spp. (ESTILO; GABRIEL, 2017), *E. coli* (GABRIEL; NAKANO, 2009), *Aspergillus fischeri* (MENEZES et al., 2019, 2020) e *Paecilomyces niveus* (MENEZES et al., 2020).

CAPÍTULO 3

3 MODELAGEM DA INATIVAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *SALMONELLA ENTERICA* SOB ESTRESSE OSMÓTICO CONSIDERANDO A FASE DO INÓCULO E SOROTIPO.

No capítulo 3, utilizou-se o método de contagem em placa e a modelagem matemática para avaliar o comportamento de sorotipos de *Salmonella enterica* em ambientes estressados osmoticamente ($a_w = 0,940, 0,945, 0,950$ e $0,960$), considerando diferentes fases (exponencial e estacionária) e temperaturas de cultivo (25 e 35 °C) do inóculo.

Os dados deste capítulo foram publicados na revista *Journal of Applied Microbiology* em 2022 como *Modelling the inactivation, survival and growth of Salmonella enterica under osmotic stress considering inoculum phase and serotype* (10.1111/jam.15515) e está apresentado a seguir.

ABSTRACT

Aims: This study evaluated the behaviour of the *Salmonella enterica* serotypes in osmotically stressful BHI broth ($0.940 \leq a_w \leq 0.960$), assessing inoculum from two stages of the bacterial life cycle (exponential and stationary) and two temperatures (25 °C and 35 °C).

Methods and Results: Four *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) were grown in stressful BHI at 25 °C. A mathematical model was proposed for describing the total microbial count as the sum of two subpopulations, inactivating and surviving-then-growing. When submitted to a_w of 0.950 and 0.960, all strains showed a decreased count, followed by a period of unchanged count and then exponential growth (Phoenix Phenomenon). Strains inoculated at $a_w = 0.940$ and 0.945 showed inactivation kinetics only. Cells cultivated at 25 °C and inoculated from the exponential phase were the most reactive to the osmotic stress, showing a higher initial population reduction and shorter adaptation period. The proposed model described the inactivation data and the Phoenix Phenomenon accurately.

Conclusions: The results quantified the complex response of *S. enterica* to the osmotic environment in detail, depending on the inoculum characteristic and serotype evaluated.

Significance and impact of study: Quantifying these differences is truly relevant to food safety and improves risk analysis.

KEYWORDS: food safety, limit of growth, microbial survival, Phoenix phenomenon, predictive microbiology.

3.1 INTRODUCTION

Microbial growth and survival are influenced by extrinsic (temperature) and intrinsic (nutrients content, pH and a_w) factors of a growth environment (SMET et al., 2015). In the food chain, microorganisms face several environmental changes that can be lethal or sublethal. Reduced a_w is a preservation strategy commonly applied to food. It is obtained by adding osmotic agents (e.g., NaCl) (TIGANITAS et al., 2009) or by dehydration techniques (LAURINDO et al., 2018). However, exposure to such environmental stresses can lead to changes in the microorganism's resistance, ability to adapt and growth responses (KANG et al., 2018; ZHOU et al., 2011). In addition, the physiological state changes the bacterial response to a stressful environment (MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2004).

The cell count decreases under specific environmental conditions, followed by an unchanged count with subsequent exponential growth. This behaviour is called Phoenix Phenomenon, first reported by Collee, Knowlton and Hobbs (1961). Shoemaker and Pierson (1976) studied the Phoenix Phenomenon of *Clostridium perfringens*, observing three phases: injury, recovery, and microbial growth. The genus *Salmonella* is well-known for handling stressful conditions (GUILLÉN et al., 2020), presenting the Phoenix Phenomenon under osmotic stress. Mellefont, Mcmeekin and Ross (2005) showed this phenomenon in *Salmonella* Typhimurium due to the first inactivation of part of the population, followed by growth. Aspridou, Akritidou and Koutsoumanis (2018) suggested three simultaneous effects on *Salmonella* cells-growth, survival, and death, resulting in the Phoenix Phenomenon.

Predictive models for *Salmonella* spp. growth and inactivation are widely available in the literature (MILKIEVICZ et al., 2020, 2021; MUÑOZ-CUEVAS; METRIS; BARANYI, 2012; NOVIYANTI et al., 2018; PIN et al., 2011). However, most of them exclusively describe microbial behaviour in response to favorable or unfavorable environmental conditions. Few studies propose a model to describe the *Salmonella* behaviour under stress conditions, in which the coexistence of subpopulations characterizes the Phoenix Phenomenon (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; ZHOU et al., 2011, 2012).

Zhou et al. (2011) modified the Baranyi and Roberts (1994) model to describe *S. enterica* behaviour under osmotic stress. They assumed that the log-count curve of the total population was the sum (in log-count) of a dying and a surviving-then-growing subpopulation. Aspridou et al. (2018) used a trimodal Baranyi and Roberts model to simulate the osmotic stress effect on *Salmonella* individual cells, extending it to the populational dynamics. They assumed scenarios of 10 cells split into growing, surviving and dying subpopulations.

Differences between *Salmonella* serotypes and strains can lead to substantial changes in stress tolerance (GUILLÉN et al., 2020). Since a microbial serotype tolerance cannot be safely extended to others in the same species (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2011), studies that quantify the resistance and adaptive responses of *Salmonella* serotypes are needed, as well as the understanding of how the cells' history affects these responses.

In this context, the objectives of the present study were (1) to evaluate the effect of the inoculum from two life cycle phases (exponential growth and stationary phases) and two incubation temperatures (25 °C and 35 °C) on the Phoenix Phenomenon occurrence of *S. Typhimurium* exposed to an osmotically stressful environment ($a_w= 0.950$); (2) to propose a mathematical model to describe the kinetics of the Phoenix Phenomenon of *S. Typhimurium*; (3) to extend the model to four *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) exposed to the different osmotic stress conditions ($a_w= 0.940, 0.945, 0.950$ and 0.960) and inoculum from different bacterial life cycle phases (exponential growth and stationary).

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Bacterial strains

The present study used four *Salmonella enterica* strains. It was used two of the most common serotypes (*S. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. Enteritidis* ATCC 13046) associated with many human infections worldwide and widely studied, and two serotypes (*S. Heidelberg* and *S. Minnesota*) obtained from a poultry processing plant (Santa Catarina State, Brazil). All strains were kept in Eppendorf tubes containing Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi, Brazil) medium supplemented with 30% (v/v) glycerol and stored at -24 °C until needed.

3.2.2 Inoculum preparation

Aliquots of 100 µl from the bacterial stock culture were added in 10 ml of BHI medium. Then, for reaching the desired phase of the inoculum, four different incubation procedures were used (based on previous experiments, data not shown): (i) - 14 h (*S. Enteritidis*), 10 h (*S. Typhimurium*) and 9 h (*S. Minnesota* and *S. Heidelberg*) at 25°C to exponential growth phase (E25); (ii) - 5 h (*S. Typhimurium*) at 35 °C to exponential growth phase (E35); (iii) - 18 h (*S. Typhimurium*) at 25 °C to obtain the late stationary phase (S25)

and (iv) - 18 h (*S. Typhimurium*) at 35 °C to obtain the late stationary phase (S35) (ADDITIONAL INFORMATION 3.6. Figure 3.6.1).

3.2.3 Experimental bacterial kinetics

Each inoculum was diluted in BHI to about 10^7 CFU/ml. Thus, the cell count kinetics was carried out by adding 1 ml of the inoculum to 100 ml of prewarmed (25 °C) BHI, reaching an initial bacterial concentration of around 10^5 CFU/ml and pH = 7.2. To BHI broth medium, the appropriate amount of NaCl - around 6.0, 7.0, 9.0 and 9.5% (w/v) - were added to obtain $a_w = 0.960, 0.950, 0.945$ and 0.940 , respectively, which was verified by an a_w -meter (Aqualab, model SERIES 3TE, Decagon Devices) (ADDITIONAL INFORMATION 3.6. Table 3.6.1). The kinetics of *S. Typhimurium* were evaluated for E25, E35, S25 and S35 inoculum. From the results, two inoculum conditions were selected for the kinetics measurement of the *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* in a_w of 0.940, 0.945, 0.950 and 0.960. All kinetics experiments were performed at 25 °C in duplicate.

The bacterial count was carried out at predetermined time intervals. For that, 1 ml of the bacterial suspension was removed from each sample and serially diluted in peptone water solution (0.1% w/v). Aliquots of 100 μ l from the appropriate serial decimal dilution were surface plated on BHI agar. Finally, plates were incubated at 35 °C for 24 h for bacterial colonies counting. The incubation time of the plates was based on previous studies that showed that there was no difference in the count after 24 hours. The detection limit was between 10 and 250 colony-forming units (CFU).

3.2.4 Mathematical modelling

Mathematical modelling the total microbial concentration (N_t , CFU/ml) exposed to the osmotic-stressful environment was assumed to be the sum of two subpopulations: inactivating cells (N_i , CFU/ml) and surviving-then-growing cells (N_g , CFU/ml), as shown in Equation (3.1).

$$N_t = N_i + N_g \quad (3.1)$$

The logarithm transformation of N ($y_t = \log N_t$, $y_i = \log N_i$, and $y_g = \log N_g$) was applied for modelling purposes. Then Equation (3.1) was rewritten to the logarithm form, as shown in Equation (3.2).

$$y_t = \log(10^{y_i} + 10^{y_g}) \quad (3.2)$$

In Equation (3.2), y_i and y_g can be replaced by mathematical equations describing the time-dependence of the inactivating and surviving-then-growing subpopulations. The y_i (log CFU/ml) along the time t (h) was modelled with the traditional first-order kinetic model (RANJBARAN et al., 2021), as shown in Equation (3.3), with $y_i(0) = y_{i,0}$, in which $y_{i,0}$ (log CFU/ml) is the logarithm of the initial cell concentration of the inactivating subpopulation and k_{max} (1/h) is the maximum specific inactivation rate of this subpopulation.

$$\frac{dy_i}{dt} = \frac{k_{max}}{\ln 10} \quad (3.3)$$

The y_g (log CFU/ml) along the time was modelled with the Baranyi and Roberts (1994) model, Equations (3.4) and (3.5), with $y_g(0) = y_{g,0}$ and $Q(0) = Q_0$. For these equations, $y_{g,0}$ (log CFU/ml) is the logarithm of the initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation, λ (h) is the time needed for the surviving population to start the growth, μ_{max} (1/h) is the maximum specific rate of the surviving-then-growing subpopulation y_{max} (log CFU/ml) is the logarithm of the maximum cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation, and Q (dimensionless) is related to the physiological state of the cells.

$$\frac{dy_g}{dt} = \frac{\mu_{max}}{\ln 10} \left(\frac{1}{1+e^{-Q}} \right) (1 - e^{y_g - y_{max}}) \quad (3.4)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\mu_{max}}{\ln 10} \quad (3.5)$$

The differential Equations (3.3), (3.4) and (3.5) can be algebraically solved when the extrinsic and intrinsic factors are considered constant. Thus, the explicit solutions of y_i (from Equation (3.3)) and y_g (from Equations (3.4) and (3.5)) can be replaced in Equation (3.2) to

describe y_t (log CFU/ml) along the time (for more details, see SUPPORT MATERIAL) to describe the Phoenix Phenomenon, as shown in Equation (3.6).

$$y_t = \log \left((1 - R_0)10^{y(0) + \frac{k_{max}t}{\ln 10}} + 10^{y_{max} + \ln \left(\frac{1 + e^{-\frac{\mu_{max}\lambda}{\ln 10} \left(\frac{\mu_{max}t}{\ln 10} - 1 \right)}}{e^{y_{max} - y(0) - \log(R_0)} + e^{-\frac{\mu_{max}\lambda}{\ln 10} \left(\frac{\mu_{max}t}{\ln 10} - 1 \right)}} \right)} \right) \quad (3.6)$$

Equation (3.6) was compared to the model proposed by Zhou et al. (2011) (Equation [3.7]) for describing the same phenomenon.

$$y_t = \ln \left(e^{(1-r_0)y_0 + \frac{k_{max}t}{\ln 10}} + \frac{e^{\left(r_0 y_0 + \frac{\mu_{max}}{\ln 10} (t-\lambda) + \ln \left(1 - e^{-\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} + e^{-\frac{\mu_{max}(t-\lambda)}{\ln 10}} \right) \right)}}{1 + \frac{e^{\left(\frac{\mu_{max}}{\ln 10} (t-\lambda) + \ln \left(1 - e^{-\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} + e^{-\frac{\mu_{max}(t-\lambda)}{\ln 10}} \right) \right)}}{e^{y_{max} - r_0 y_0}}} \right) \quad (3.7)$$

The main differences between Equations (3.6) and (3.7) are (1) the logarithm base of the models (log instead of ln), (2) the ratio parameters (r_0 and R_0) and (3) the logarithm of the total initial concentration (y_0 and $y(0)$). The r_0 parameter of Zhou et al. (2011) (Equation (3.7)) is the ratio of the natural logarithm of the initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($y_{0,g}$) to the natural logarithm of the total initial cell concentration (y_0), i.e. $r_0 = y_{g,0}/y_{t,0} = \ln(N_{g,0}) / \ln(N_{t,0})$, whereas the R_0 parameter of the proposed model (Equation (3.6)) is the ratio of initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($N_{0,g}$) to total initial cell concentration (N_0), that is i.e., $R_0 = N_{g,0}/N_{t,0}$. The y_0 of Zhou et al. (2011), Equation (3.7), is different from $y_t(0)$, as can be seen in Equation (3.8), while the $y(0)$ of the model proposed in the present study, Equation (3.6), is equal to $y_t(0)$. Thus, y_0 (Zhou et al., 2011) is a model parameter and should be estimated by fitting the model to the data, while $y(0)$ (current study) is the experimental data of logarithm of the initial population.

$$y_t(0) = \ln(e^{(1-r_0)y_0} + e^{(r_0 y_0)}) \quad (3.8)$$

The time for the inactivating subpopulation to be reduced to zero is usually much lower than the time for the surviving-then-growth subpopulation to start to grow, a consequence of the stressful environment. From this hypothesis, at a certain moment (*Phoenix time*, t_p), the concentration of the inactivating subpopulation tends to zero (i.e., $N_{i,p} \rightarrow 0$), while the concentration of the surviving-then-growing subpopulation remains close to its initial value ($N_{g,p} \cong N_{g,0}$). These assumptions applied to Equation (1) lead to Equation (3.9) with $R_0 = N_{g,0}/N_{t,0}$. Thus, $-\log R_0$ is a reasonable approximation of the log reduction from the total initial concentration to the total concentration at the *Phoenix time*, that is it measures the potential magnitude of the inactivation before the Phoenix Phenomenon.

$$\log N_{t,0} - \log N_{t,f} = -\log R_0 \quad (3.9)$$

Equations (3.6) and (3.7) were fitted to the experimental data (bacterial cell concentration vs time) with the nonlinear least squares method (trust-region algorithm, curve fitting toolbox, Matlab R2013a, MathWorks®, Natick, USA), estimating the five model parameters of Equation (6) (k_{max} , λ , μ_{max} , R_0 , and y_{max}) and six model parameters of Equation (7) (k_{max} , λ , μ_{max} , r_0 , y_0 , and y_{max}), and 95% confidence intervals of model parameters.

3.2.5 Evaluation of model performance

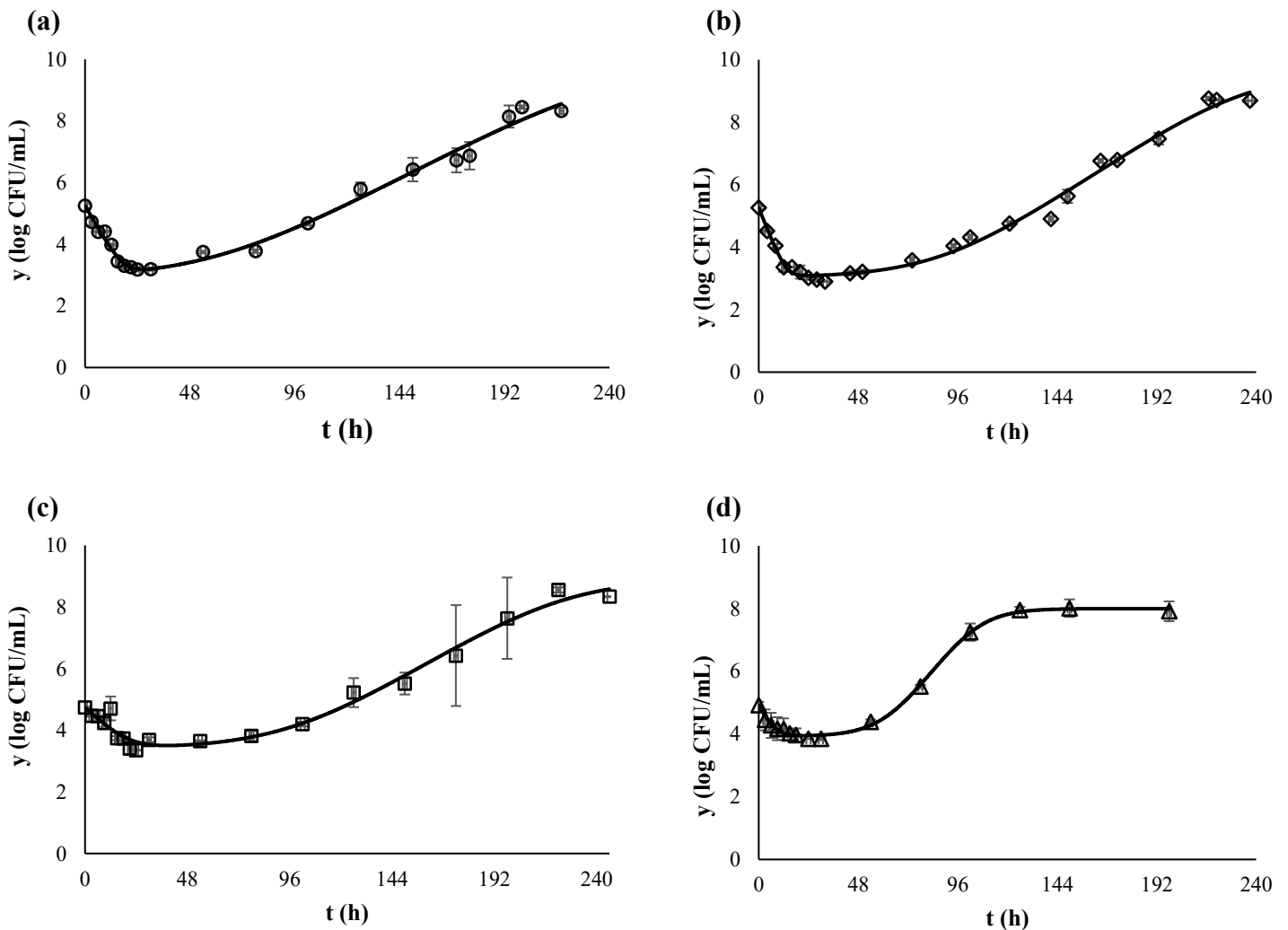
The evaluation of the models' performance, the goodness-of-fit indexes root-mean-squared error (*RMSE*) and adjusted coefficient of determination (R^2_{adj}) were obtained from the output of the Matlab curve fitting toolbox.

3.3 RESULTS

Figure 1 shows the experimental kinetics data for *S. Typhimurium* growth from the four different inoculums at 25 °C into the BHI medium with $a_w = 0.950$ and the fitting of the proposed mathematical model (Equation (3.6)). All *S. Typhimurium* inoculum conditions tested induced the Phoenix Phenomenon. In the first 20 h after inoculation, a reduction was observed in the bacterial cell concentration from close to 5 log CFU/ml to around 3 to 4 log CFU/ml, depending on the inoculum phase. In the following, the bacterial concentration remained

constant in the interval between 20 and 50 h of incubation (plateau). After that, an exponential growth phase was observed until the stationary phase, about 8 log CFU/ml or more, depending on the life cycle phase of the inoculum.

Figure 1. Experimental data (symbols) of *S. typhimurium* incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from different inoculum conditions (exponential phase inoculum at 25 °C (E25. [a]); exponential phase inoculum at 35 °C (E35. [b]); stationary phase inoculum at 25 °C (S25. [c]) and stationary phase inoculum at 35°C (S35. [d]). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates.



The statistical indexes and estimated parameters of the models (Equations (3.6) and (3.7)) are shown in Table 2. The $RMSE$ and R^2_{adj} values calculated were relatively low (below 0.298 log CFU/ml) and high (over 0.967), respectively, indicating that both models had a good performance to describe the observed data to the studied conditions. However, all estimates of the y_0 parameter (Equation (3.7)) were higher than the initial concentrations, $y(0)$, as suggested by Equation (3.8). These results are shown in Table 2. The cells from stationary phase

inoculums (S25 and S35) were more resistant to the osmotic stress than those from exponential phase inoculums (E25 and E35), as shown in Figure 1. S25 and S35 showed 1.32 log CFU/ml and 0.99 log CFU/ml reductions (from $-\log R_0$ calculation), respectively, during the declining phase, while E25 and E35 showed 2.25 log CFU/ml and 2.21 log CFU/ml reductions respectively. R_0 parameter (Table 2) is higher for S35 and S25 than for E35 and E25 conditions, indicating that the initial population from the exponential phase cells was more sensitive to the osmotic environment than those from the stationary phase.

Table 2. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of *S. Typhimurium*.

Inoculum Conditions	Model	y_0 or $y(0)$ (Log CFU/ml)	Parameters				Statistical indexes		
			μ_{max} (1/h)	y_{max} (Log CFU/ml)	λ (h)	r_0 or R_0	k_{max} (1/h)	RMSE (Log CFU/ml)	R^2_{adj}
E25	Eq. (7)	8.02 (± 1.01)	0.0848 (± 0.0258)	9.91 (± 4.09)	55.0 (± 44.8)	0.357 (± 0.065)	-0.352 (± 0.189)	0.260	0.979
	Eq. (6)	5.25	0.0869 (± 0.0234)	9.74 (± 3.10)	61.3 (± 31.6)	0.00567 (± 0.00653)	-0.281 (± 0.068)	0.245	0.982
S25	Eq. (7)	7.96 (± 0.90)	0.0982 (± 0.0365)	8.92 (± 1.21)	94.9 (± 37.1)	0.426 (± 0.061)	-0.242 (± 0.231)	0.298	0.967
	Eq. (6)	4.74	0.0991 (± 0.0335)	8.91 (± 1.11)	96.4 (± 31.5)	0.0475 (± 0.0610)	-0.151 (± 0.079)	0.281	0.971
E35	Eq. (7)	8.16 (± 0.56)	0.102 (± 0.019)	9.66 (± 1.33)	86.3 (± 16.1)	0.368 (± 0.028)	-0.496 (± 0.207)	0.227	0.987
	Eq. (6)	5.26	0.103 (± 0.018)	9.60 (± 1.20)	88.4 (± 14.5)	0.00614 (± 0.00312)	-0.382 (± 0.096)	0.222	0.988
S35	Eq. (7)	8.28 (± 0.32)	0.223 (± 0.038)	8.00 (± 0.13)	61.5 (± 5.4)	0.471 (± 0.020)	-0.425 (± 0.210)	0.091	0.997
	Eq. (6)	4.92	0.227 (± 0.040)	8.00 (± 0.13)	62.5 (± 5.1)	0.102 (± 0.029)	-0.299 (± 0.099)	0.097	0.997

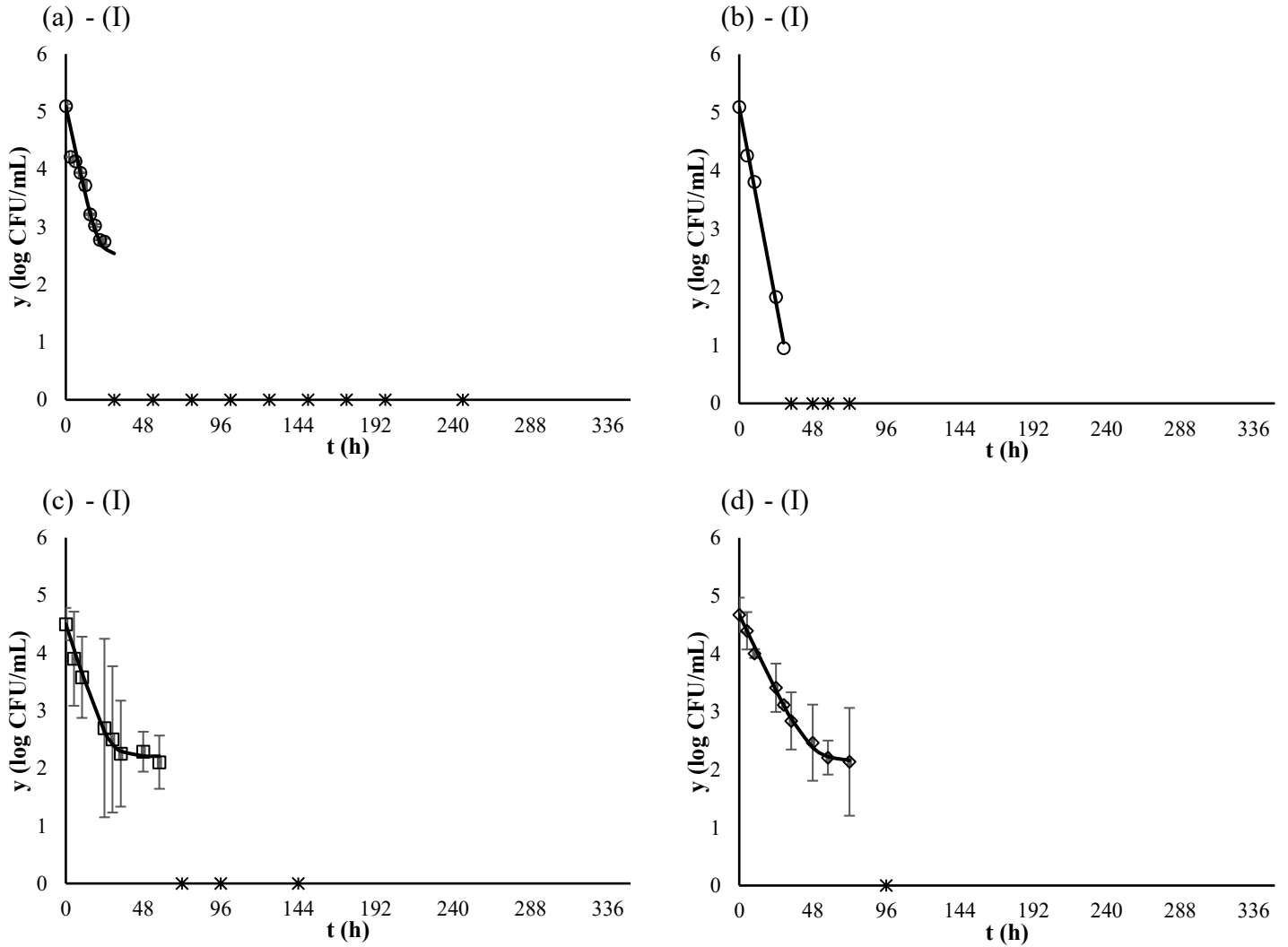
y_0 is a parameter related to the logarithm of the total initial cell concentration; $y(0)$ is the logarithm of the total initial cell concentration; μ_{max} is the maximum specific rate of the surviving-then-growing subpopulation; y_{max} is the logarithm of the maximum cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation; λ is the time needed for the surviving population to start the grow; r_0 is the ratio of the logarithm of the initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($y_{0,g}$) to the logarithm of the total initial cell concentration (y_0); R_0 is the ratio of initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($N_{0,g}$) to total initial cell concentration (N_0); and k_{max} is the maximum specific rate of the inactivating subpopulation. Reported values are estimates \pm 95% confidence interval

The inoculum incubation temperature led to differences in *S. Typhimurium* overall behaviour, and the estimated models' parameters differed. Higher inoculum incubation temperatures led to higher μ_{max} ; this parameter value for S35 was more than twice higher than for S25, while the difference between E35 and E25 was around 18% only. For the lag time (λ), E25 and S35 showed a shorter value (around 60 h) than E35 and S25 (around 90 h).

All *S. Typhimurium* inoculums tested presented the Phoenix Phenomenon. However, the most concerning situation was observed for the E25 inoculum. It showed the higher initial log count reduction ($-\log R_0 = 2.25 \log \text{CFU/ml}$), looking like it will be fully inactivated, followed by the shorter lag phase. On the other hand, the S35 inoculum was more resistant to osmotic stress. Thus, both inoculum conditions (S35 and E25) were used for further growth studies of the *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) exposed to the osmotic environments ($a_w = 0.940, 0.945, 0.950$ and 0.960) at 25°C .

Figures 2 and 3 shows the *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* kinetic data curve from S35 and E25 inoculums, respectively, with 0.940 and 0.945 and the fitting of the primary model (Equation 3.6) to the data. Model parameters (Equations 3.6) and statistical indexes are shown in Table 3. Exposure to a_w conditions of 0.940 and 0.945 led to the total inactivation of all serotypes evaluated. Thus, to fit the model for those a_w conditions, the parameters λ , μ_{max} , and y_{max} were fixed as zero, estimating k_{max} and R_0 parameters.

Figure 2. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.940$) from the exponential phase inoculum at 35 °C (I), stationary phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. (*) are values below the detection limit considered in the study. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates.



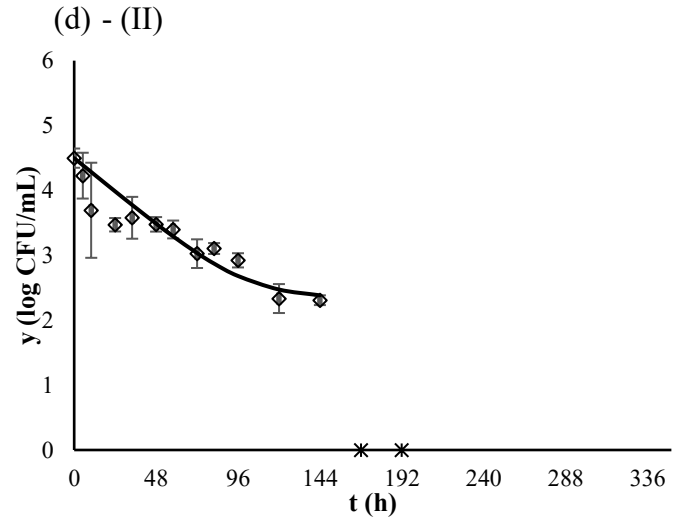
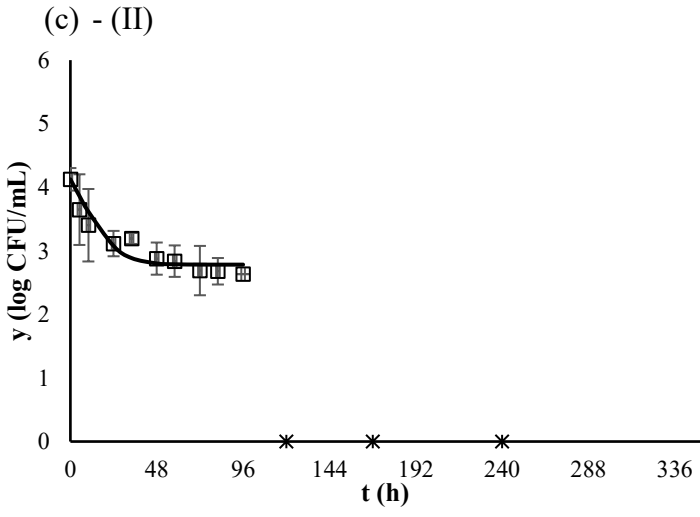
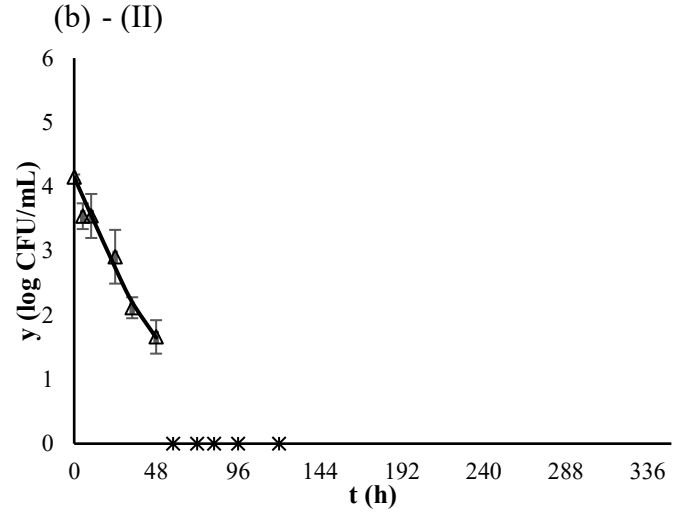
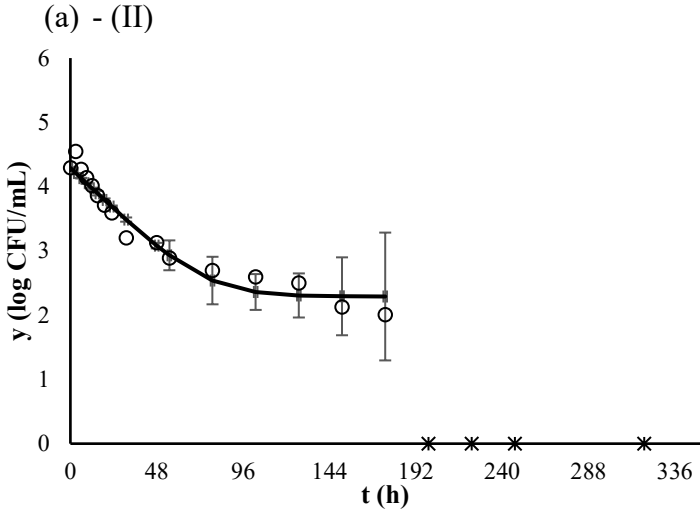
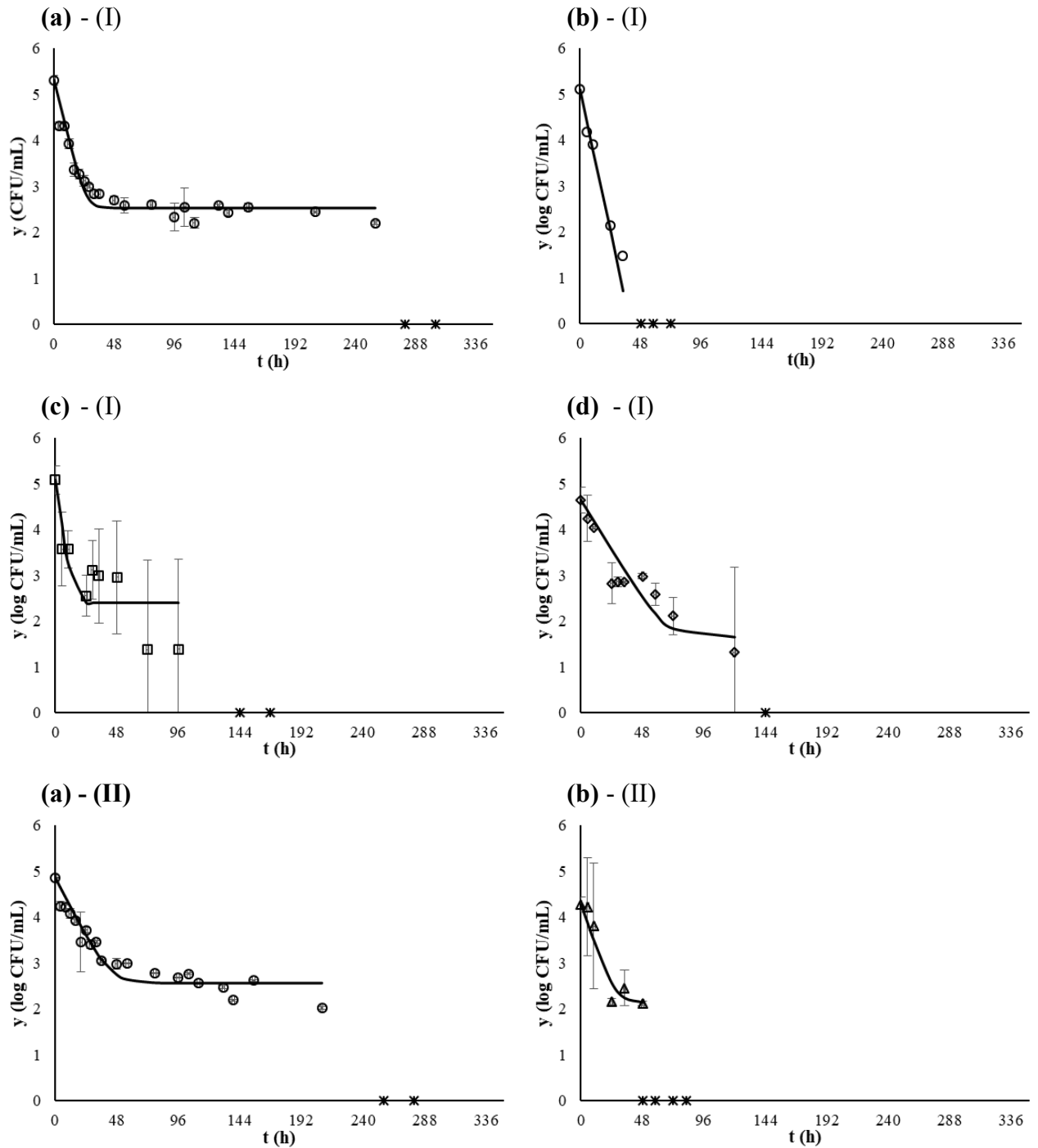
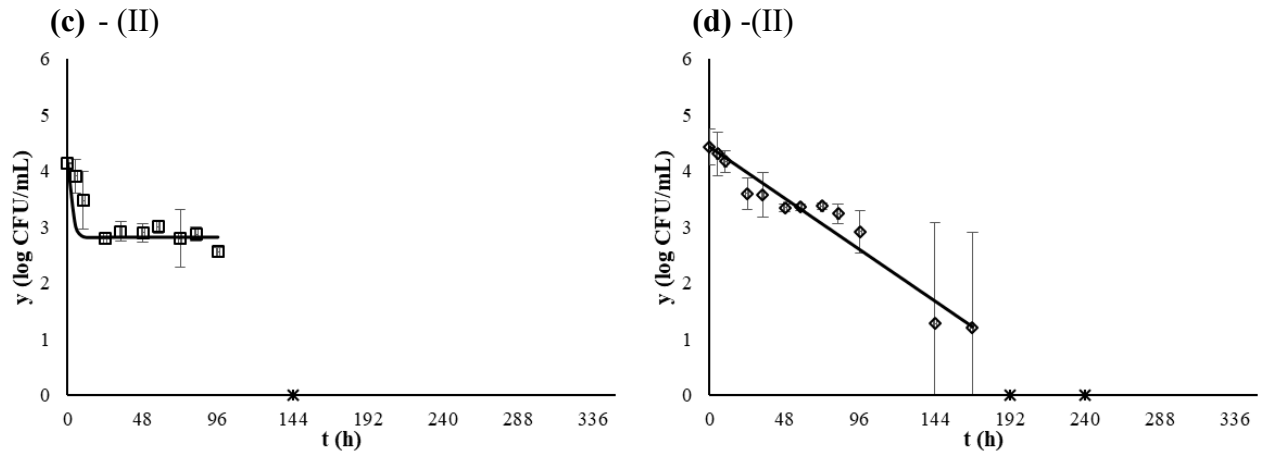


Figure 3. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.945$) from the exponential phase inoculum at 35 °C (I), stationary phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. (*) are values below the detection limit considered in the study. Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates.





The model fitted the data well in most cases, confirmed by statistical indexes values (Table 3). Some datasets in Figure 2 showed variation in the experimental data, as observed by error bars, mainly for *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* serotypes when exposed to a_w of 0.940 and 0.945 using the S35 inoculum condition. Consequently, less accurate model fitting was obtained in these cases.

The R_0 values were higher for the S35 inoculum condition for all strains. It confirms that stationary phase inoculum is more resistant than exponential phase inoculum, as observed in the *S. Typhimurium* data (Table 2). The k_{max} values also agree with that. The higher intensity of osmotic stress applied (lower a_w values) led to the shorter time required for complete inactivation of the strains in the study. *S. Enteritidis* showed the fastest inactivation for both inoculums (E25 and S35) and a_w (0.940 and 0.945) conditions studied (Figures 2 and 3).

Table 3. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w=0.940$ and 0.945) from the exponential phase inoculum at 25 °C (E25) and stationary phase inoculum at 35 °C (S35)

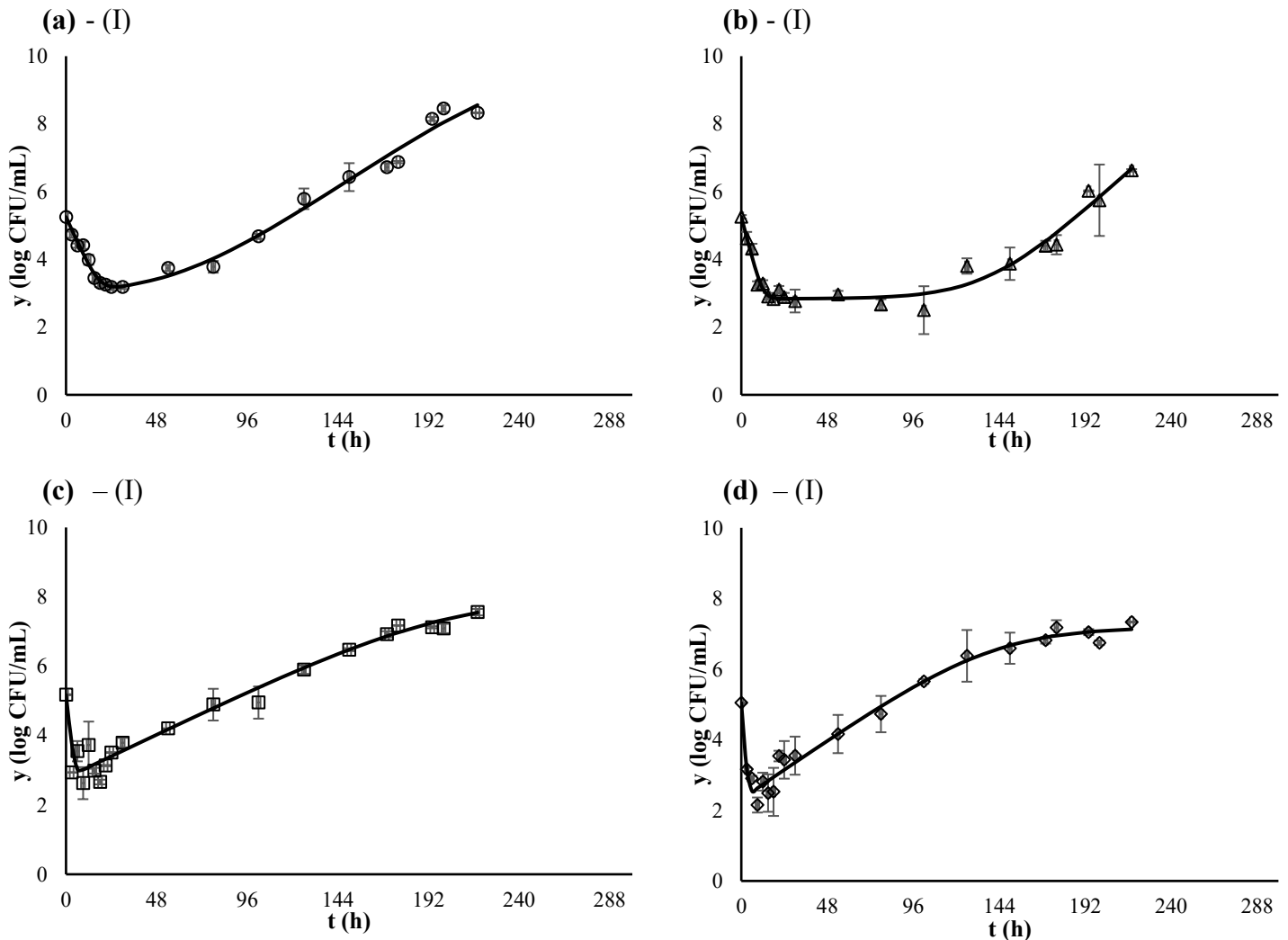
Serotypes/Inoculum	a_w	$y(0)$ (log CFU/ml)	Parameters		Statistical indexes	
			R_0	k_{max} (1/h)	$RMSE$ (log CFU/ml)	R^2_{adj}
<i>S. Typhimurium</i> E25	0.940	5.10	0.0026 (± 0.00237)	-0.298 (± 0.051)	0.205	0.947
<i>S. Typhimurium</i> S35	0.940	4.29	0.0100 (± 0.00478)	-0.061 (± 0.011)	0.183	0.953
<i>S. Enteritidis</i> E25	0.940	5.09	0.0000 (± 0.000)	-0.322 (± 0.018)	0.108	0.996
<i>S. Enteritidis</i> S35	0.940	4.15	0.0018 (± 0.00487)	-0.137 (± 0.036)	0.181	0.971
<i>S. Heidelberg</i> E25	0.940	4.50	0.0051 (± 0.00190)	-0.198 (± 0.029)	0.104	0.988
<i>S. Heidelberg</i> S35	0.940	4.13	0.0455 (± 0.01881)	-0.128 (± 0.058)	0.173	0.888
<i>S. Minnesota</i> E25	0.940	4.67	0.0030 (± 0.00076)	-0.127 (± 0.007)	0.059	0.996
<i>S. Minnesota</i> S35	0.940	4.50	0.0069 (± 0.00962)	-0.050 (± 0.014)	0.287	0.826
<i>S. Typhimurium</i> E25	0.945	5.31	0.0017 (± 0.00051)	-0.251 (± 0.035)	0.225	0.928
<i>S. Typhimurium</i> S35	0.945	4.86	0.0050 (± 0.00207)	-0.124 (± 0.021)	0.252	0.896
<i>S. Enteritidis</i> E25	0.945	5.10	0.0002 (± 0.00032)	-0.298 (± 0.059)	0.166	0.991
<i>S. Enteritidis</i> S35	0.945	4.28	0.0072 (± 0.01304)	-0.183 (± 0.119)	0.324	0.922
<i>S. Heidelberg</i> E25	0.945	5.08	0.0002 (± 0.00335)	-0.298 (± 0.400)	0.725	0.647

S. Heidelberg S35	0.945	4.14	0.0482 (±0.01441)	-0.174 (±0.619)	0.138	0.939
S. Minnesota E25	0.945	4.64	0.0010 (±0.00200)	-0.104 (±0.030)	0.427	0.841
S. Minnesota S35	0.945	4.43	0.0000 (±0,000)	-0.044 (±0.005)	0.255	0.939

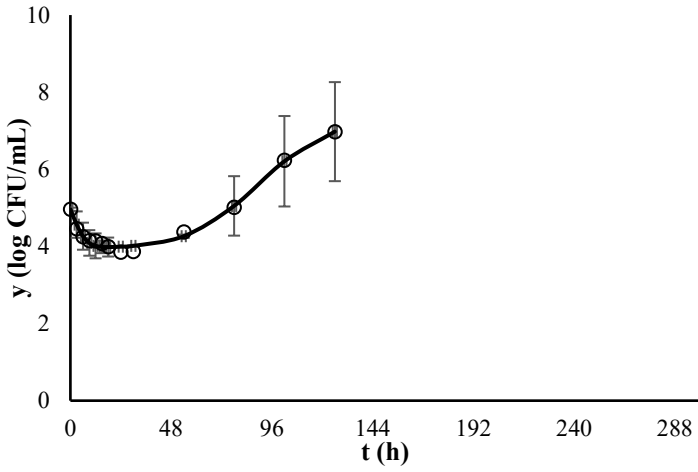
y_0 is a parameter related to the logarithm of the total initial cell concentration; $y(0)$ is the logarithm of the total initial cell concentration; R_0 is the ratio of initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($N_{0,g}$) to total initial cell concentration (N_0); and k_{max} is the maximum specific rate of the inactivating subpopulation. Reported values are estimates \pm 95% confidence interval.

Figures 4 and 5 show *S. enterica* strains kinetics data curve for the S35 and E25 inoculums and the fitting of the primary model (Equation 3.6) under osmotic stress conditions ($a_w = 0.950$ and 0.960), leading to the Phoenix Phenomenon. In general, the inoculum E25 presented a higher inactivation rate in the first few hours and a quicker increase in cell concentration than the inoculum S35. As expected, for most cases, the higher the a_w value (0.960), the higher the bacteria's ability to adapt and return to growth.

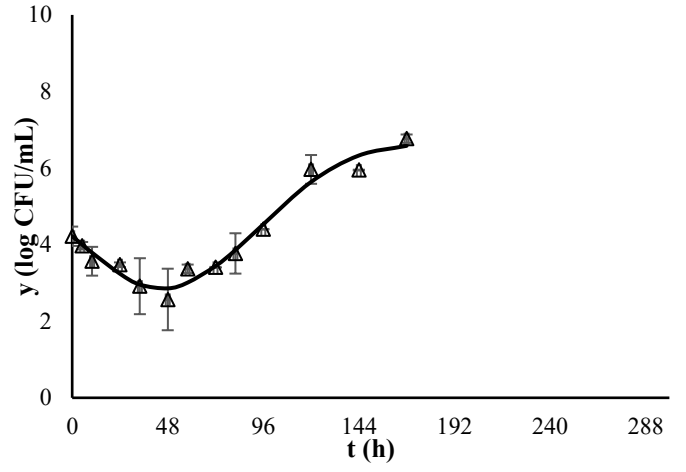
Figure 4. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (a), *S. Enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from the stationary phase inoculum at 35 °C (I), exponential phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., \square) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates.



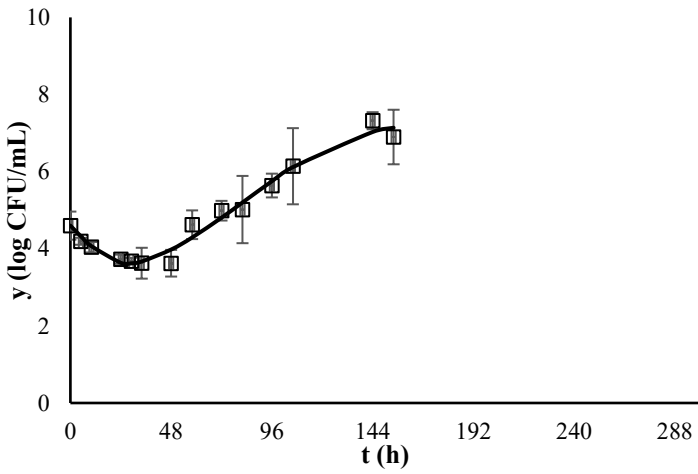
(a) - (II)



(b) - (II)



(b) - (II)



(c) - (II)

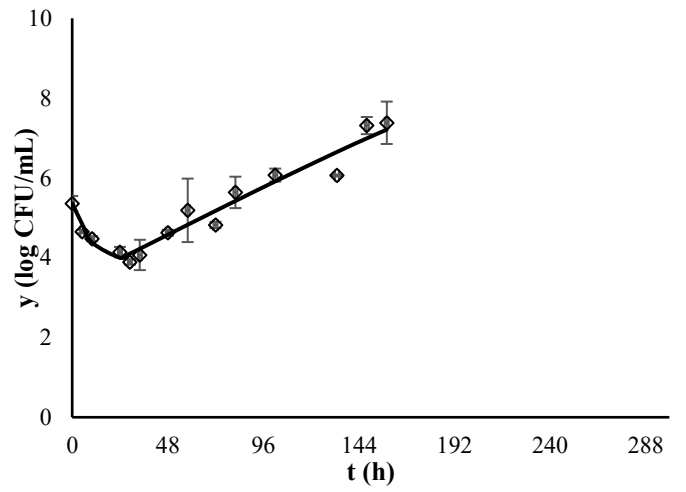
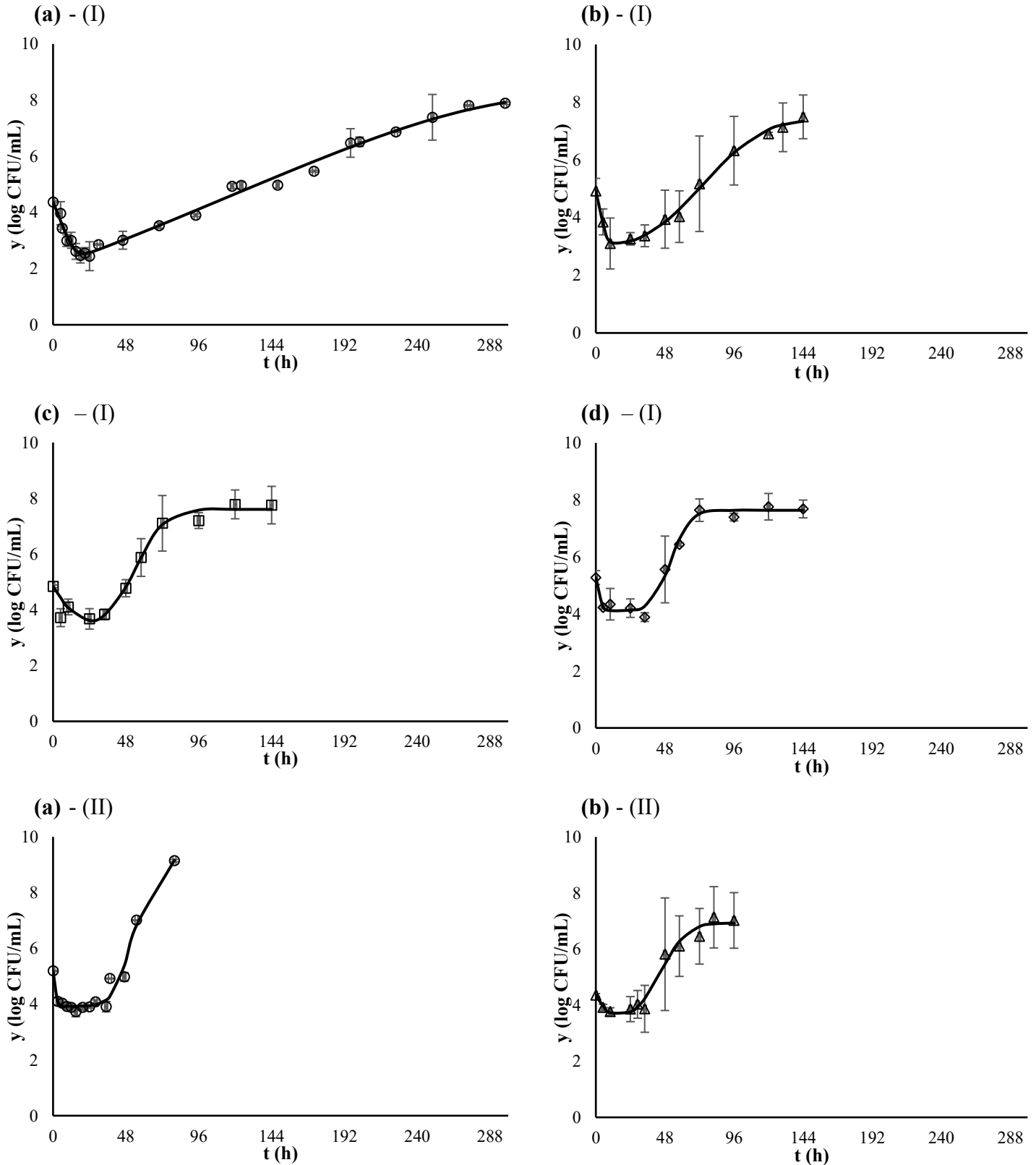
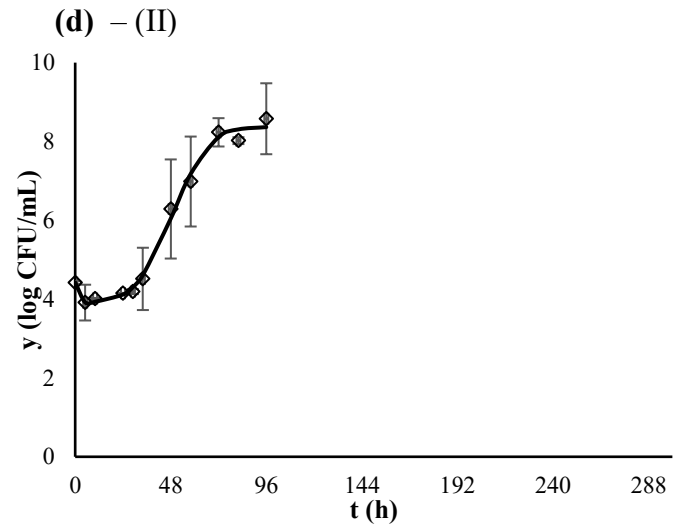
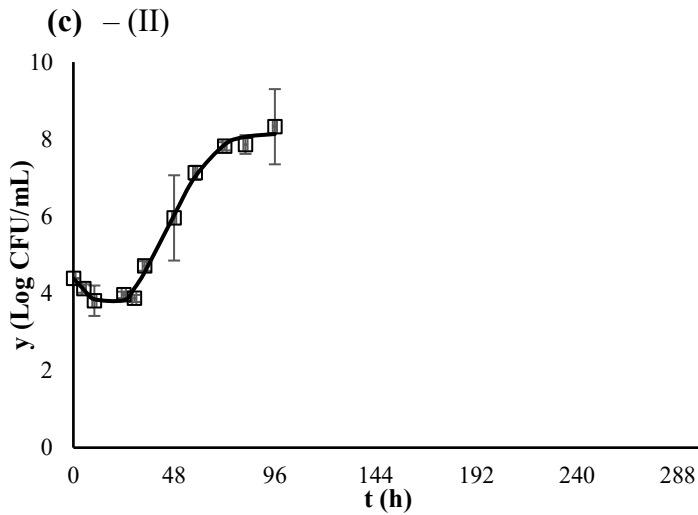


Figure 5. Experimental data (symbols) of *S. typhimurium* (a), *S. enteritidis* (b), *S. Heidelberg* (c) and *S. Minnesota* (d) incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.960$) from the stationary phase inoculum at 35 °C (I) exponential phase inoculum at 25 °C (II). Continuous lines are the fitting of Equation (3.6) to the data. Symbols with error bars (e.g., $\bar{x} \pm \sigma$) represent the data average value and respective standard deviation due to replicates.





The model parameters and statistical indexes estimated by fitting the primary models (Equation (3.6)) to the experimental data of *S. enterica* serotypes incubated at 25 °C in BHI ($a_w = 0.950$ and 0.960) are shown in Table 4. The model proposed in this study (Equation (3.6)) described the Phoenix phenomenon and fitted well to the data of all strains. Low $RMSE$ (≤ 0.345 log CFU/ml) and high R^2_{adj} (≥ 0.952) values demonstrated the goodness-of-fit to the experimental data.

In most of the conditions studied, μ_{max} values were higher for the S35 inoculum condition. The analysis of the model parameters estimates confirmed that E25 shows a smaller initial cell decrease (by $-\log R_0$ calculations), followed by the need for a longer time to reach the stationary phase. The a_w of 0.960 leads to better adaptability for all strains and inoculum conditions, as expected.

Table 4. Model parameters and statistical indexes estimated from the fitting of the primary models to the experimental data of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$ and 0.960) from the exponential phase inoculum at 25 °C (E25) and stationary phase inoculum at 35 °C (S35).

Serotypes/Inoculum	a_w	$y(0)$ (log CFU/ml)	Parameters					Statistical indexes	
			μ_{max} (1/h)	y_{max} (log CFU/ml)	λ (h)	R_0	k_{max} (1/h)	RMSE (log CFU/ml)	R^2_{adj}
S. Typhimurium E25	0.950	5.25	0.086 (±0.0234)	9.74 (±3.11)	61.3 (±31.6)	0.0050 (±0.00652)	-0.281 (±0.069)	0.245	0.985
S. Typhimurium S35	0.950	4.96	0.169 (±0.0599)	7.28 (±0.000)	67.1 (±8.3)	0.0990 (±0.03208)	-0.366 (±0.146)	0.107	0.992
S. Enteritidis E25	0.950	5.25	0.112 (±0.0598)	10.41 (±71.59)	139.0 (±19.6)	0.0038 (±0.00216)	-0.463 (±0.123)	0.275	0.973
S. Enteritidis S35	0.950	4.22	0.146 (±0.0970)	6.67 (±0.80)	63.8 (±48.4)	0.0185 (±0.06562)	-0.103 (±0.071)	0.281	0.968
S. Heidelberg E25	0.950	5.18	0.060 (±0.0141)	8.04 (±1.44)	0.0 (±75.5)	0.0040 (±0.00312)	-1.100 (±0.535)	0.373	0.959
S. Heidelberg S35	0.950	4.60	0.118 (±0.0761)	7.33 (±0.81)	43.7 (±53.0)	0.0432 (±0.12690)	-0.137 (±0.136)	0.233	0.975
S. Minnesota E25	0.950	5.04	0.081 (±0.0343)	7.19 (±0.47)	0.0 (±0.9)	0.0019 (±0.00281)	-1.477 (±1.319)	0.294	0.980
S. Minnesota S35	0.950	5.36	0.059 (±0.0824)	9.07 (±13.67)	0.0 (±211.7)	0.0101 (±0.04935)	-0.244 (±0.178)	0.310	0.953
S. Typhimurium E25	0.960	4.37	0.054 (±0.0095)	8.43 (±0.59)	10.7 (±43.4)	0.0052 (±0.00577)	-0.319 (±0.065)	0.187	0.992
S. Typhimurium S35	0.960	5.19	0.496 (±0.2343)	9.21 (±0.70)	41.4 (±5.6)	0.0543 (±0.03202)	-1.172 (±1.506)	0.285	0.976
S. Enteritidis E25	0.960	4.92	0.154 (±0.0442)	7.43 (±0.39)	42.0 (±15.6)	0.0113 (±0.01143)	-0.541 (±0.193)	0.155	0.994
S. Enteritidis S35	0.960	4.36	0.315 (±0.2828)	6.94 (±0.50)	33.0 (±26.2)	0.1444 (±0.48000)	-0.238 (±0.535)	0.288	0.974
S. Heidelberg E25	0.960	4.84	0.315	7.60	39.8	0.0411	-0.200	0.321	0.974

			(±0.2078)	(±0.45)	(±17.8)	(±0.09228)	(±0,196)		
S. Heidelberg S35	0.960	4.39	0.299	8.15	25.9	0.0691	-0.152	0.185	0.994
			(±0.1274)	(±0.36)	(±24.9)	(±0.29629)	(±0.178)		
S. Minnesota E25	0.960	5.28	0.438	7.64	42.9	0.0686	-0.729	0.252	0.985
			(±0.2837)	(±0.33)	(±8.7)	(±0.06857)	(±1.237)		
S. Minnesota S35	0.960	4.42	0.340	8.37	33.7	0.3077	-3.944	0.211	0.992
			(±0.1224)	(±0.38)	(±9.0)	(±0.33330)	(±8,885)		

$y(0)$ is the logarithm of the total initial cell concentration; μ_{max} is the maximum specific rate of the surviving-then-growing subpopulation; y_{max} is the logarithm of the maximum cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation; λ is the time needed for the surviving population to start the growth; R_0 is the ratio of initial cell concentration of the surviving-then-growing subpopulation ($N_{0,g}$) to total initial cell concentration (N_0); and k_{max} is the maximum specific rate of the inactivating subpopulation. Reported values are estimates \pm 95% confidence interval.

3.4 DISCUSSION

The *RMSE* and R^2_{adj} values from Equation (3.6) fitting were slightly better than those obtained from Equation (3.7). The *RMSE* values obtained in the present study are good in predictive microbiology since they are close to the order of magnitude of the measurement uncertainty (Ratkowsky, 2004). The model Equation (3.7) fitting to the experimental data led to an overestimation of the y_0 parameter values. The model approach can explain these overestimations, considering that $y_t = y_i + y_g$. In the present study, the model was built from $N_t = N_i + N_g$ (Eq. (3.1)), which allows the consideration that the initial concentration is $y(0)$.

One of the difficulties encountered in establishing mathematical models capable of describing this type of behaviour (Phoenix Phenomenon) is obtaining the precise experimental data for model validation. During the Phoenix Phenomenon, the presence of three subpopulations - inactivating, surviving, and growing - is reasonable, which agrees with Aspidou et al. (2018). However, for modelling, as the data obtained by plate counting are macroscopic, surviving, and growing subpopulations are evaluated together. This assumption allows predicting the total number of cells over time, which has a relevant value in terms of safety.

There are few reports in the literature describing how the inoculum bacterial life cycle affects the *Salmonella* behaviour at low a_w . Mellefont et al. (2004) analyzed the impact of the osmotic stress on the lag of stationary and exponential phase inoculums cells using the relative lag time (RLT) (λ divided by the generation time), which is related to μ_{max} and λ parameters in the present study. These authors believe that stationary phase cells have enhanced the resistance to osmotic stress and can exploit new growth environments at low a_w more rapidly than exponential phase cells, resulting in shorter lag phases and high RLT values. In the present study, the cells from the inoculum in the stationary phase also resisted and adapted better to the osmotic stress conditions, as reported in the results shown above.

According to Cebrián et al. (2014), Gram-negative cells at the exponential phase have a significantly lower NaCl maximum non-inhibitory concentration value when compared to stationary phase cells. The authors reported that a decrease in osmotolerance might be partly due to the decreased sigma factor RpoS activity in exponential cells. Shiroda et al. (2014) studied how the RpoS factor impacts *S. enterica* in LB culture medium supplemented with 6% of NaCl (LB-NaCl), correlating the cells' lag phase inversely to the RpoS content. When inoculated into the LB-NaCl medium, cells from a stationary phase with a higher steady-state

level of RpoS showed a shorter lag phase than cells in an exponential phase, which required physiological adaptations to combat environmental stress and initiate growth due to more RpoS stored. It is a reasonable explanation for the current results, in which cells from exponential phase inoculums were more sensitive. The stationary phase cells may have accumulated higher levels of RpoS, showing a better ability to adapt to the new stressful environment.

Different responses among *Salmonella* serotypes (11) and strains (15) were reported by Guillén et al. (2020) when exposing *S. enterica* to several environmental stresses (acid, hydrogen peroxide, NaCl and heat) and nonthermal food preservation technologies. The results indicated that, despite the observed differences, there were no significant differences in NaCl resistance among the studied *S. Typhimurium* strains. Nevertheless, significant differences were found when comparing the NaCl resistance of *S. Typhimurium* strains to the other 10 *Salmonella* serotypes, as observed in the present study.

The bacterial growth in a high salt concentration environment (low a_w) can be explained by the accumulation of compatible solutes, which act as osmolytes, transported from the extracellular environment, or synthesized by the cell. Thus, the quickness in accumulating solutes into the cell, either as gene expression or transport mechanisms, is the main factor determining the velocity to answer the osmotic-stressful environment (Aspridou et al., 2018; Shiroda et al., 2014).

It was observed that the sensitivity of each serotype to the osmotic environment depends on the a_w and inoculum condition. Studies of *Salmonella* behaviour at the limits of its growth tolerance are needed due to increasing outbreaks in low- a_w foods. In addition, *Salmonella* strains can behave differently, so these results are important for the field.

Thus, *S. enterica* strains (Heidelberg, Minnesota, Typhimurium and Enteritidis) inoculated in media under relatively low water activity ($a_w = 0.940, 0.945, 0.950$ and 0.960) are under osmotic stress, showing a reduction in the viable cell count during incubation at 25 °C. In cases with $a_w = 0.950$ and 0.960 , the count decay was followed by a growth phase until a maximum population, characterizing the Phoenix Phenomenon. Additionally, it was demonstrated that *S. Typhimurium* cells from different inoculums states (25 °C or 35 °C, and stationary or exponential phase) showed the Phoenix Phenomenon when added to BHI broth with $a_w = 0.950$. Among them, cells cultivated at 25 °C and inoculated from the exponential phase were the most reactive to the osmotic stress, showing a higher population reduction at the first hours and shorter period of adaptation (lag phase).

The proposed mathematical model described the inactivation and the Phoenix Phenomenon for all tested conditions while presenting biological-meaning parameters. This

model quantitatively described *Salmonella* behaviour of four strains under different stress intensities due to a higher or lower a_w applied to cells from distinct stages of the bacterial life cycle. There are dangerous situations since some strains may die more pronounced initially and later grow faster than others, depending on their physiological state.

3.5 SUPPORT MATERIAL INCLUDED IN THE ARTICLE

Total microbial concentration (N_t) was assumed to be the sum of inactivating cells (N_i) and surviving-then-growing cells (N_g), as given by:

$$N_t = N_i + N_g$$

With logarithm transformation ($y = \log N$) and rearrangement, the resulting equation is:

$$y_t = \log(10^{y_i} + 10^{y_g}),$$

Modeling the dying subpopulation, with $y_i(0) = y_{i,0}$.

$$\frac{dy_i}{dt} = \frac{k_{max}}{\ln 10}$$

The solution of the differential equation, as given by Geeraerd et al. (2005), is:

$$y_i = y_{i,0} + \frac{k_{max}}{\ln 10} t,$$

Modeling the surviving-then-growing subpopulation, with $y_g(0) = y_{g,0}$ and $Q(0) = Q_0$.

$$\frac{dy_g}{dt} = \frac{\mu_{max}}{\ln 10} \left(\frac{1}{1 + e^{-Q}} \right) (1 - e^{y_g - y_{max}})$$

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\mu_{max}}{\ln 10}$$

The solution of the set of the two differential equations, as given by Baranyi and Roberts (1994), is:

$$A(t) = t + \frac{1}{\frac{\mu_{max}}{\ln 10}} \ln \left(e^{-h_0} + e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t} - e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t - h_0} \right)$$

$$y_g = y_{g,0} + \frac{\mu_{max}}{\ln 10} A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10} A(t)} - 1}{e^{y_{max} - y_{g,0}}} \right)$$

With further rearrangements, as given by Gospavic et al. (2009), the Baranyi and Roberts model is given by:

$$y_g = y_{max} + \ln \left(\frac{e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t - h_0} + 1 - e^{-h_0}}{e^{y_{max} - y_{g,0}} + e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t - h_0} - e^{-h_0}} \right)$$

Now, replacing h_0 by $\frac{\mu_{max}}{\ln 10} \lambda$, the model is given by:

$$y_g = y_{max} + \ln \left(\frac{e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t - \frac{\mu_{max}}{\ln 10} \lambda} + 1 - e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10} \lambda}}{e^{y_{max} - y_{g,0}} + e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10} t - \frac{\mu_{max}}{\ln 10} \lambda} - e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10} \lambda}} \right)$$

After further rearrangements, the model is given by:

$$y_g = y_{max} + \ln \left(\frac{1 + e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10}(t-\lambda)} - e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda}}{e^{y_{max}-y_{g,0}} + e^{\frac{\mu_{max}}{\ln 10}(t-\lambda)} - e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda}} \right),$$

Then, replacing Eqs. (2) and (3) into Eq. (1), the model for the total population y_t is given by:

$$y_t = \log \left(10^{y_{i,0} + \frac{k_{max}t}{\ln 10}} + 10^{y_{max} + \ln \left(\frac{1 + e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda} \left(e^{\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} - 1 \right)}{e^{y_{max}-y_{g,0}} + e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda} \left(e^{\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} - 1 \right)} \right)} \right),$$

Introducing R_0 as:

$$R_0 = \frac{N_{g,0}}{N_{t,0}}$$

With replacement of previous equations and rearrangements:

$$\begin{aligned} N_{t,0}R_0 &= N_{g,0} \\ \log(N_{t,0}R_0) &= \log N_{g,0} \\ \log(N_{t,0}) + \log(R_0) &= \log N_{g,0} \\ y_{t,0} + \log(R_0) &= y_{g,0}, \quad (5) \end{aligned}$$

From R_0 , with further replacement of previous equations and rearrangements:

$$\begin{aligned} R_0 &= \frac{N_{t,0} - N_{i,0}}{N_{t,0}} \\ R_0 &= 1 - \frac{N_{i,0}}{N_{t,0}} \\ (R_0 - 1)N_{t,0} &= -N_{i,0} \\ (1 - R_0)N_{t,0} &= N_{d,0} \\ \log(1 - R_0) + \log N_{t,0} &= \log N_{i,0} \\ y_{t,0} + \log(1 - R_0) &= y_{i,0}, \quad (6) \end{aligned}$$

Thus, replacing Eqs. (5) and (6) into Eq. (4), and considering that $y_{t,0} = y(0)$, the model for y_t is given by:

$$y_t = \log \left(10^{y(0) + \log(1-R_0) + \frac{k_{max}t}{\ln 10}} + 10^{y_{max} + \ln \left(\frac{1 + e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda} \left(e^{\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} - 1 \right)}{e^{y_{max}-y(0) + \log(R_0)} + e^{-\frac{\mu_{max}}{\ln 10}\lambda} \left(e^{\frac{\mu_{max}t}{\ln 10}} - 1 \right)} \right)} \right)$$

With rearrangements, the final model for y_t with log-linear and Baranyi and Roberts models is:

$$y_t = \log \left((1 - R_0) 10^{y^{(0)} + \frac{k_{max} t}{\ln 10}} + 10^{y_{max} + \ln \left(\frac{1 + e^{-\frac{\mu_{max} \lambda}{\ln 10} \left(e^{\frac{\mu_{max} t}{\ln 10}} - 1 \right)}}{e^{y_{max} - y^{(0)} - \log(R_0)} + e^{-\frac{\mu_{max} \lambda}{\ln 10} \left(e^{\frac{\mu_{max} t}{\ln 10}} - 1 \right)}} \right)} \right)$$

3.6 ADDITIONAL INFORMATION

Table 3. 6.1 shows the percentage of NaCl (%) added to the BHI medium to obtain the average a_w values. Figures 3.6.1, 3.6.2, A3.6.3, and 3.6.4 show the calibration curve with the absorbance values obtained from inoculation of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota*, respectively, in BHI medium at 25 °C and 35°C.

Table. 3.6.1 - Percentage of NaCl (%) added to the BHI medium to obtain the average a_w values. The a_w values were measured in a a_w -meter (Aqualab, modelo SÉRIE 3TE, Decagon Devices).

NaCl (%)	a_{w1}	a_{w2}	$a_{wmédia}$	<i>padrão</i>	<i>Desvio</i>
6	0,962	0,962	0,96		0,000
7	0,950	0,956	0,95		0,003
9	0,946	0,943	0,945		0,002
9,5	0,940	0,942	0,94		0,001

Figure 3.6.1 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of *S. Typhimurium* in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).

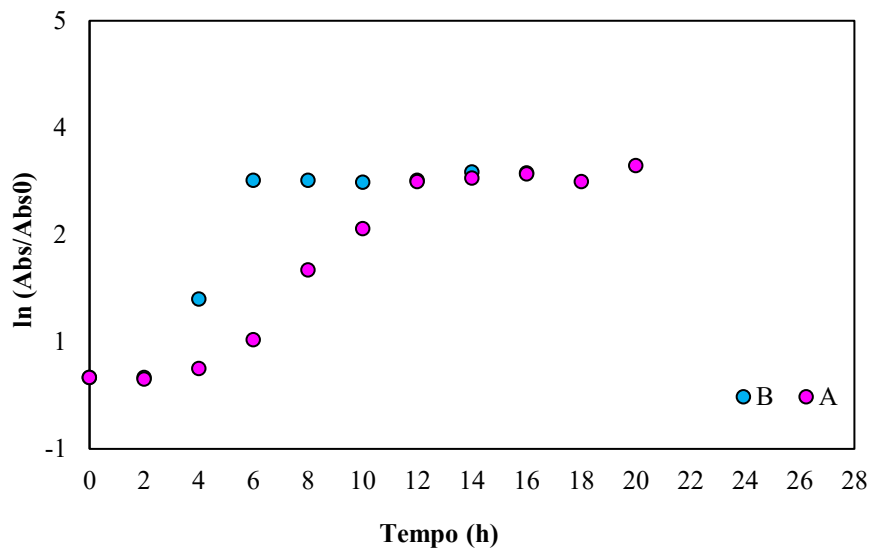


Figure 3.6.2 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of *S. Enteritidis* in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).

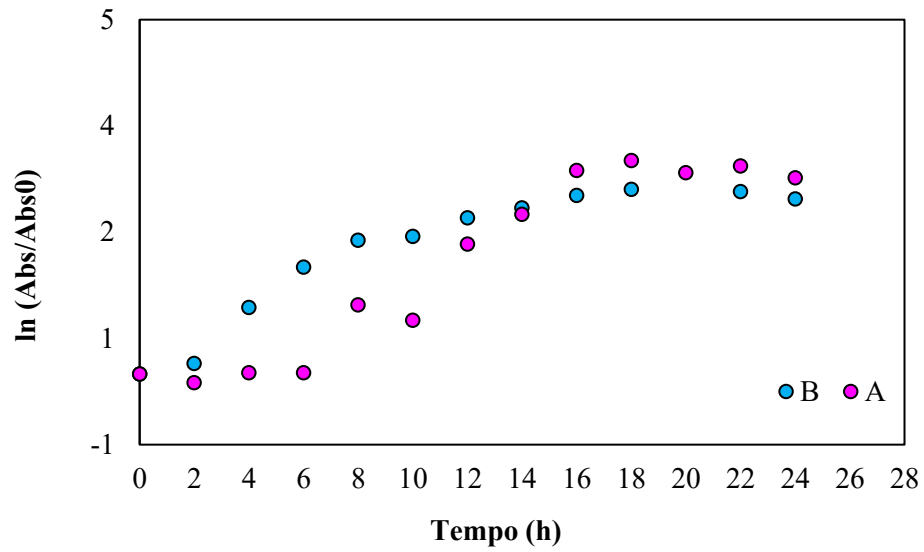


Figure 3.6.3 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of *S. Heidelberg* in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).

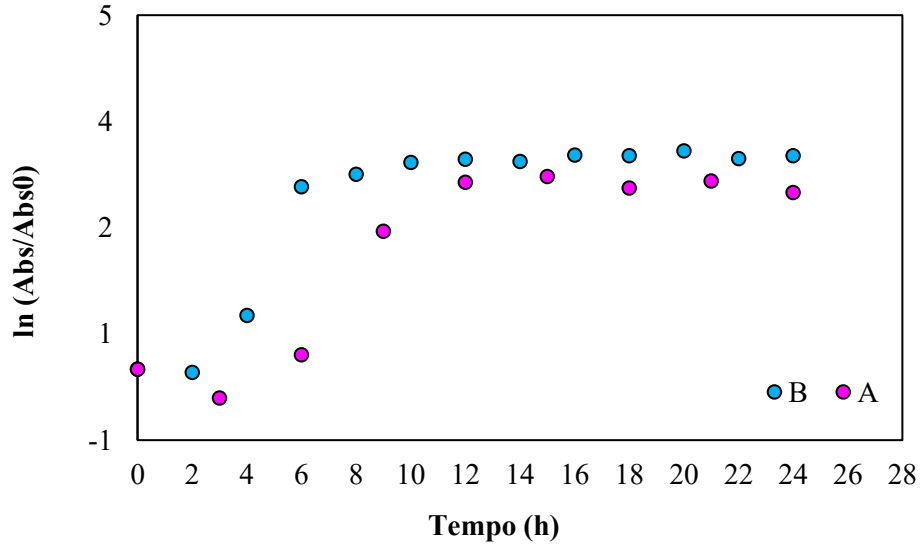
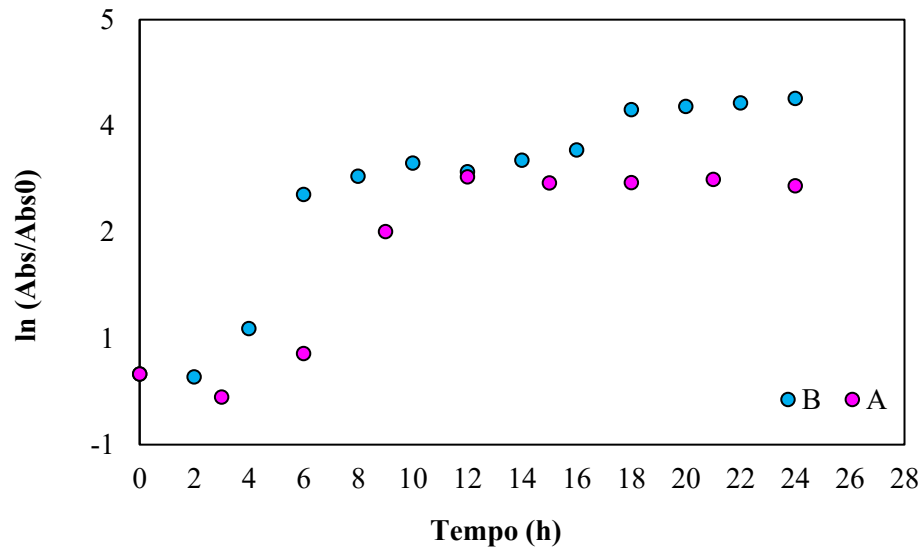


Figure 3.6.4 - Calibration curve with absorbance values obtained from inoculation of *S. Minnesota* in BHI medium at 25 °C (A) and 35 °C (B).



CAPÍTULO 4

4 DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE FISIOLÓGICA E VIABILIDADE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ESTRESSADA OSMOTICAMENTE DURANTE O FENÔMENO FÊNIX USANDO CITOMETRIA DE FLUXO

O capítulo 4 avaliou a heterogeneidade fisiológica e viabilidade de populações de *Salmonella enterica* Typhimurium estressadas osmoticamente durante o Fenômeno Fênix. As respostas bacterianas de *S. Typhimurium* foram avaliadas utilizando o método de contagem de placas e método de citometria de fluxo (FCM) combinado com corantes fluorescentes laranja de tiazol (thiazole orange [TO]) e iodeto de propídio (propidium iodide [PI]).

Este capítulo será submetido a uma revista internacional e está apresentado a seguir:

Physiological heterogeneity and viability determination of Salmonella Typhimurium osmotically stressed during the Phenomenon Phoenix using Flow cytometry.

ABSTRACT

The flow cytometry method (FCM) combined with thiazole orange (TO) and propidium iodide (PI) fluorescent probes was applied to evaluate the physiological heterogeneity and viability of the *Salmonella enterica* Typhimurium population osmotically stressed during the Phenomenon Phoenix (PP). The concentration of bacterial cells of *S. Typhimurium* was also assessed by Plate count method (PCM). FCM with TO and PI was used to separate into heterogeneous populations and evaluate the viability based on their fluorescence signal. The bacterial concentration obtained by PCM confirmed the behavior known as PP, characterized by the decrease in bacterial concentration after incubation, followed by the resumption of exponential growth and the stationary phase. FCM sorting of double-stained cells with fluorescent probes provided convincing evidence for three simultaneous subpopulations: intact/viable, stressed/injured, and damaged. The proportion among the subpopulations resulting from the FCM changed over time of exposure to the osmotic environment, evidencing the PP. The highest percentage of stressed/injured cells was observed at the beginning of exposure and during the decrease in bacterial concentration. The viable/intact subpopulation presented the highest percentage at the beginning of the exponential phase, following until reaching the stationary phase. The damaged subpopulation showed an increase at the beginning of the exponential phase, followed by a decrease at the end of the exponential phase and resumption of the percentage increase in the stationary phase. Results of the present study provide a promising and necessary approach for a more in-depth view of the different physiological responses of microbial subpopulations in response to stressful environments, especially the occurrence of PP.

Keywords: damaged, injured, viable, food safety, pathogenic bacteria, fluorescence signal.

4.1 INTRODUCTION

The Gram-negative *Salmonella enterica* bacteria are one of the main etiologic agents of foodborne diseases, considered a concern for the food industry, affecting public health and causing economic losses (MAJOWICZ et al., 2010). The ability of *S. enterica* strains to adapt and survive to a wide range of adverse conditions, considered stressful environments, has been documented. The lowering a_w has been used as a protective measure against pathogens and spoilage microbiota in the food industry, which can be obtained by adding osmotic agents (e.g., NaCl) (TIGANITAS et al., 2009) or by dehydration techniques (LAURINDO et al. 2018). However, in contrast to this approach, studies have reported that exposure to such environments leads to changes in the microorganisms' resistance, ability to adapt, and growth responses (KANG et al., 2018; ZHOU et al., 2011).

In addition to osmotic adaptation, some *S. enterica* serotypes initially exhibit a viability decrease, followed by an eventual adaptive response and the resumption of growth (MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2005; ZHOU et al., 2011). This behavior is called Phoenix Phenomenon (PP), characterized by an initial reduction in bacterial cell concentration, followed by a period that the bacterial concentration remain unchanged (plateau) and, after that, exponential growth occur until it reaches the stationary phase (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018, PAGANINI et al., 2022). The ability of the pathogenic bacteria to resist and adapt at to osmotic environments leading at PP is still a controversial issue (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2005; ZHOU et al., 2011; PAGANINI et al., 2022).

The PP has been generally identified and quantified using typical cultivation methods as Plate count method (PCM) (MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2005; ZHOU et al., 2011). In this method, only bacteria that can form visible colonies are considered viable, disregarding the possibility of any bacteria in other physiological states can be present. The application of stress to bacterial cells can induce distinct types of microbial cell injury within a total microbial population (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; SINGH; BARNARD, 2021). Thus, measuring heterogeneity and viability is crucial for determining the cells physiological state during stressful situations and understand the behavior of these pathogens.

Methods that can differentiate cellular responses within a population and unravel the mechanisms involved in microbial behavior under stressful conditions are necessary. One approach to investigating the role of cell heterogeneity in the behavior of bacterial populations at conditions of osmotic stress in terms of bacterial physiological state is using the fluorescent

probes in combination with flow cytometry method (FCM) (GUEDES; DE SOUZA, 2018; SINGH; BARNARD, 2021). The FCM when coupled with fluorescent labeling offers a powerful tool for quantitative analysis of optical characteristics of individual cells passing through a focused light beam (VEAL et al., 2000). Cell particles that flow through a light beam in a liquid stream are calculated on a flow cytometer by fluorescence and light scattering signals (SINGH; BARNARD, 2017).

Fluorescent probe staining is focused on different physiological cellular characteristics, such thiazole orange (TO), a permeant dye that enters all cells, irrespective of membrane integrity, to varying degrees of staining intensity, binding to nucleic acids (DNA or RNA); propidium iodide (PI) which is an impermeant membrane nucleic acid probe that only penetrates cells with damaged membranes (SINGH; BARNARD, 2021). So, these fluorescent probes are capable to differentiate between “live and dead” bacterial cells and “injured microorganisms” (LLOYD; HAYES, 1995).

Thus, the present study determined the physiological heterogeneity and cellular viability of the population of *S. Typhimurium* during exposure to an osmotic stress environment ($a_w=0.950$) incubated at 25 °C, leading to the Phoenix Phenomenon, using FCM in combination with double fluorescent labeling of thiazole orange and propidium iodide.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Bacterial strains and inoculum preparation

S. Typhimurium ATCC 14028 strain was used in this study, which is one of the most common serotypes of *S. enterica* associated with many human infections worldwide. The strain was kept in Eppendorf tubes containing Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi, Brazil) growth medium supplemented with 30% (v/v) glycerol and stored at -24 °C, until needed. The inoculum was prepared according to Paganini et al. (2022). An aliquot of 100 µl from the bacterial stock culture was added into 10 ml of BHI growth medium and incubated at 25 °C for 10 h to reach exponential growth phase.

4.2.2 Osmotic stress exposure - Phoenix Phenomenon observation

For the exposure of *S. Typhimurium* cells to the stressful osmotic environment, an aliquot of 3 ml from inoculum (around 10^7 CFU/ml) was transferred to 297 ml of pre-warmed

(25 °C) BHI broth medium, previously added of the appropriate amount of NaCl (about 7.0% NaCl) to obtain $a_w = 0.950$ (verified by an a_w -meter Aqualab, model SERIES 3TE, Decagon Devices, USA). The sample with an initial bacterial concentration of around 10^5 CFU/ml was incubated at 25 °C for further analysis of the behavior of *S. Typhimurium*. Predetermined sampling time intervals (0, 24, 48, 120, 198, and 216 h) denominated t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{120} , t_{192} , and t_{216} were established. The sampling intervals were defined based on previous studies (PAGANINI et al., 2022). In each sampling time, aliquots were collected for FCM and plate count method (PCM) analysis.

4.2.3 Assessment of cells submitted to Osmotic stress by Flow Cytometry during Phoenix Phenomenon

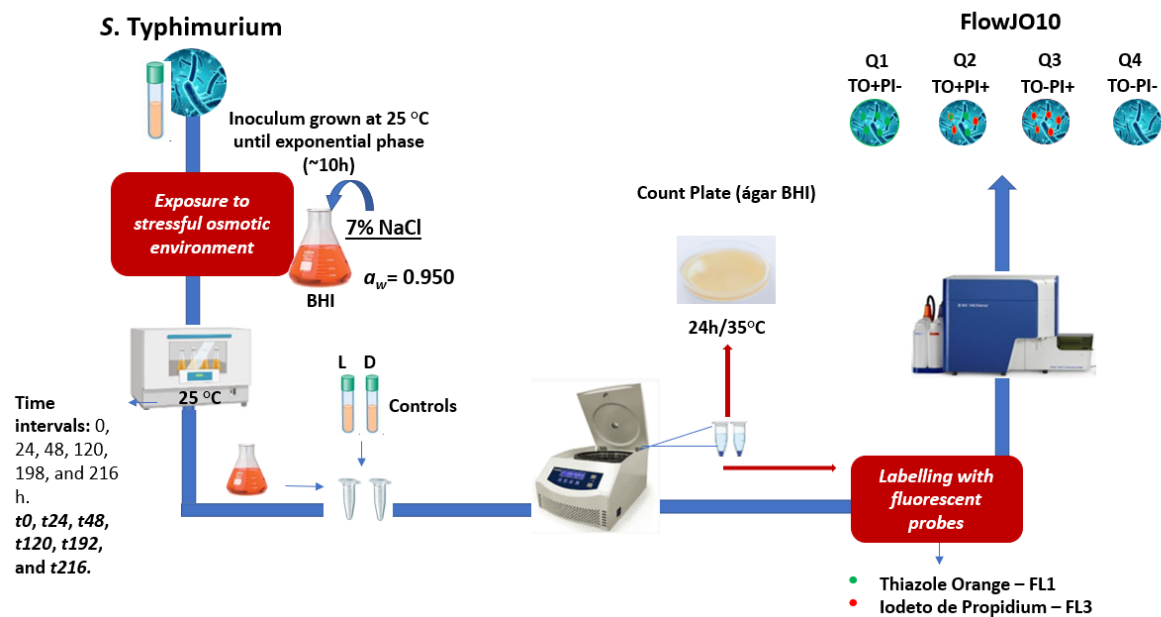
4.2.3.1 Preparation of cell suspensions and staining

The *S. Typhimurium* cells exposed to a stressful osmotic environment during the PP and the controls were analyzed using the BD™ Cell Viability Kit (349483) according to the manufacturer's instruction with adjustments. Kit containing two probes was applied: i) TO (0.42 μ M), that stain all cells, to varying degrees of intensity, and ii) PI (4.3 mM), that stain cells with damaged membranes only (BD™ cell viability kit, BD Biosciences).

S. Typhimurium cell suspensions were centrifuged in sterile microtubes at 5000g for 10 min. The cell pellets were re-suspended in 0.5 ml sterile buffer solution (Physiologic phosphate-buffered saline containing 0.2% + 0.01% TWEEN® 20) and washed twice with sterile buffer solution. Each suspension at varying sampling interval was labelled with i) 5 μ l of TO and incubated at room temperature in the dark for 15 min, and then, ii) staining with 5 μ l of PI and incubated at room temperature in the dark for 5 min.

Untreated overnight cultures (no exposure to stressful osmotic environment) of *S. Typhimurium* were performed (untreated live cells). Cells from overnight cultures were suspended in isopropanol 70% for 20 min at room temperature killing growing cells (untreated dead cells), confirmed by CFM and PCM. The following bacterial controls were then prepared: (a) untreated live and dead cells and cells treated (exposure to stressful osmotic environment) unstained (b) untreated live cells stained with TO (c) untreated dead cells stained with PI (d) TO+PI stained with untreated live and dead cells (e) treated stained with TO+PI. Stained and unstained cells served as controls, to ensure that proper gating was set and to allow for compensation on the flow cytometer (Figure 6).

Figure 6. Experimental flowchart of analysis by the flow cytometry method



4.2.3.2 Flow cytometer Analyzes

Flow cytometry analysis was performed using a flow cytometer (FACS Verse - BD Bioscience) after labelling with fluorescent probes (TO and PI). The gating and labelling approach was used to confirm cell differences between bacterial subpopulations over osmotic environment exposed. The fluorescence of TO was collected in the FL1 photomultiplier with a filter of 527/32 nm. The fluorescence of PI was recorded in the FL3 photomultiplier with a filter of 700/54 nm. For each sample, all the events in the test tube were measured at a flow rate of approximately five hundred events per second. Intact cells were computed from FL1 (TO) region and the damaged cells from FL3 (PI) region. An intermediate subpopulation that is positive for both the TO+PI probes has been categorized as being in the “injured” or “stressed” state of cells. Compensation was performed to avoid overlap in the emission spectra of the two fluorochromes. Fluorescence compensation was set using single-stained controls for each cell type, and fluorescence spillover was corrected.

For all sample were performed plots of “forward scatter (FSC) *versus* side scatter (SSC)” obtaining the total bacterial population without any background particles/noise. Bacterial populations were computed from the FL1 *vs.* FL3 region and separated into four quadrants, representing *S. Typhimurium* cells with different physiological properties. The stained bacterial subpopulations were automatically counted from the number of events

(bacterial cells) included inside the four quadrants with the FlowJo v10 software. The percentage of cells for each subpopulation was determined as the number of events in each gate as a proportion of the total events. graphs of the fluorescence intensity of the TO probe were performed to contribute to the analysis of the results.

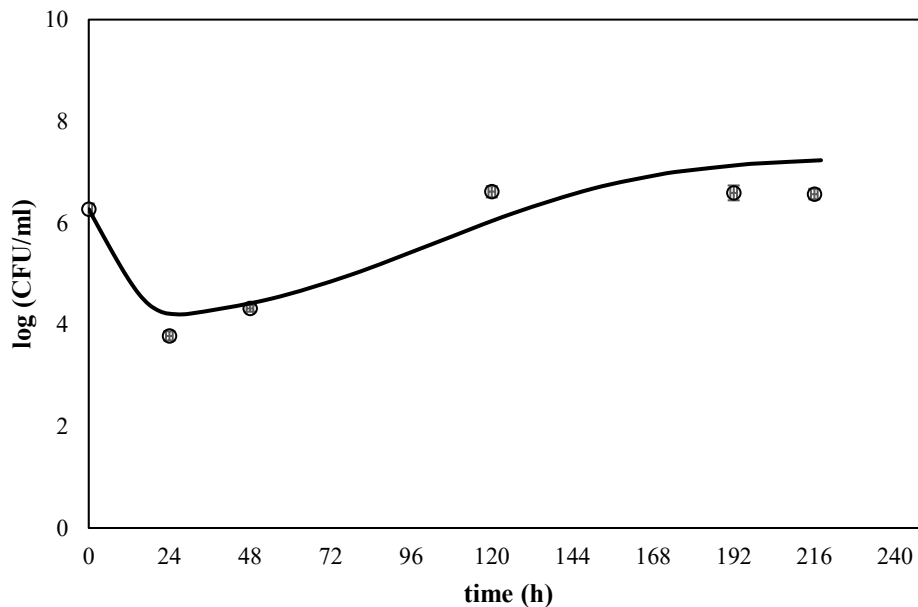
4.2.4 Assessment of cells submitted to Osmotic Adaptation by plate counts and pH during Phoenix Phenomenon

The bacterial count was carried out by plate count method (PCM) at predetermined time intervals. Suspension was removed from each sample and serially diluted in Peptone water solution (0.1%). Aliquots of 100 μ l from the appropriate serial decimal dilution were surface plated on BHI agar. Plates were incubated by 24 h at 35 °C for counting. The incubation time of the plates was based on previous studies that showed that there was no difference in the count after 24 hours. In this study, the detection limit used was 10 to 250 colonies. All kinetics experiments were performed at 25 °C in triplicate.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

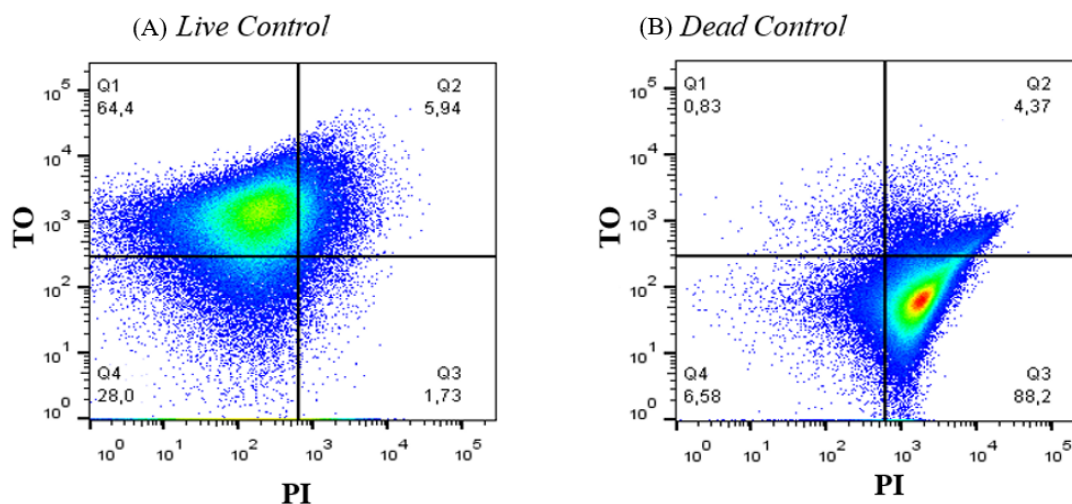
During the exposure to the stressful osmotic environment, the bacterial cells were periodically quantified to evaluate their ability to grow on plate count agar, forming colonies as a representation of culturable cells. The behavior of *S. Typhimurium* cells quantified by the PCM is presented in Figure 7. The solid line represents the trend based on the primary model proposed by Paganini et al. (2022), with $y_{(0)} = 6.27$ and $y_{max} = 7.30$. The bacterial response of *S. Typhimurium* showed that the exposure to the stressful osmotic environment resulted in behavior characterized as PP. Thus, the initial cell concentration of *S. Typhimurium* decreased after the incubation in the osmotic environment from 6.27 log CFU/ml to 3.78 log CFU/ml. After, the bacterial population presented an exponential growth phase until reaching the stationary phase. This trend of the *S. Typhimurium* is the typical behavior of the PP, which has been found by Paganini et al. 2022.

Figure 7. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) during the PP obtained by PCM.



To distinguish the physiological heterogeneity and assay the viability of the *S. Typhimurium* population during the PP, the FCM with double fluorescent probe (TO and PI) staining was performed. The subpopulations of *S. Typhimurium* were sorted based on their differential staining characteristics with PI and TO. Previous studies reported an intermediary subpopulation that is positive for both the TO and PI probes, classified as being injured or stressed cells (SINGH; BARNARD, 2017). Controls of *S. Typhimurium* from untreated live and dead cells were used. Dot plots of TO (FL1) vs. PI (FL3) (Figure 8) of the live (A) and dead (B) controls were performed. Four gates (Q1, Q2, Q3, and Q4) were defined and the percentage of the bacterial subpopulations that fall in each gate are presented in Figure 8.

Figure 8. CFM dot plots representing Controls of *S. Typhimurium* from live (A) and dead cells (B). The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).

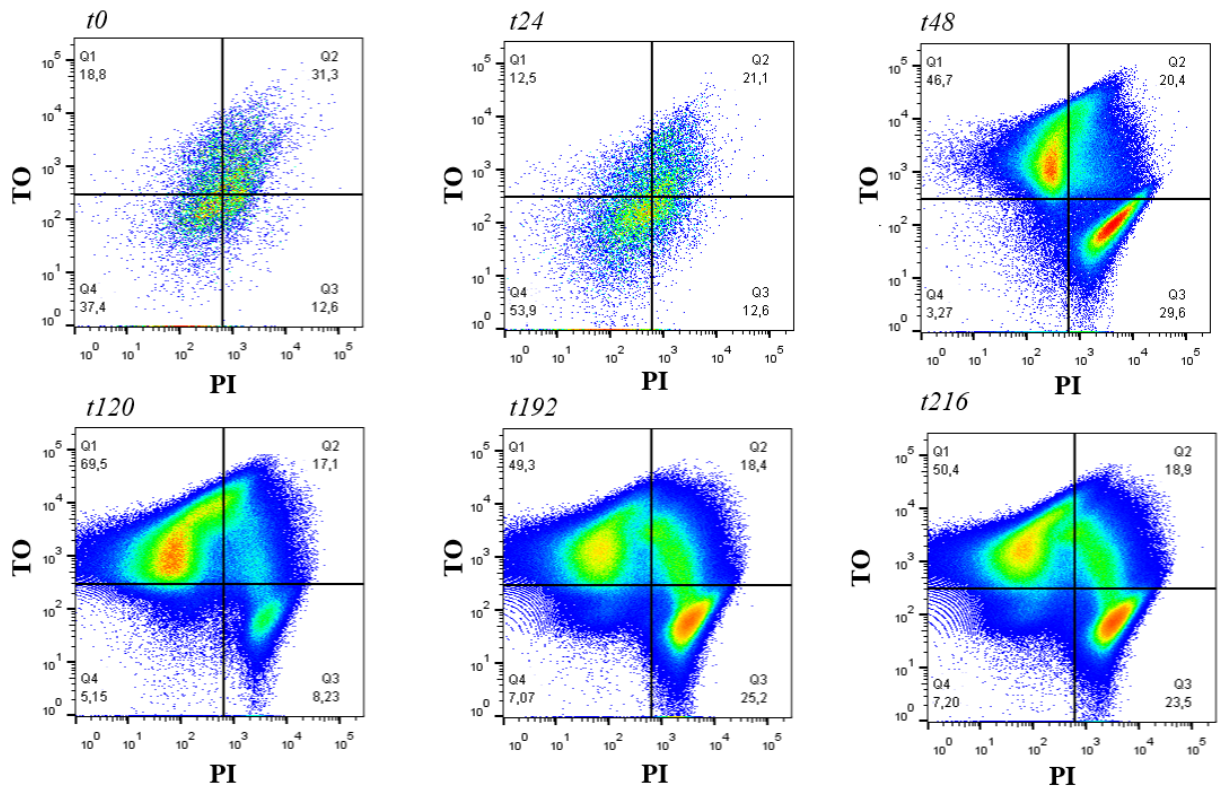


Q1 quadrant shows cells stained with TO only (named as TO+PI-), indicating intact/viable cells. Q2 quadrant shows cells stained with both TO and PI (named as TO+PI+), indicating minimally damaged membrane but intact/viable cells (stressed/injured). Q3 quadrant shows cells stained with PI only (named as TO-PI+), indicating that the cell membrane was damaged (named as damaged). Q4 quadrant shows unstained cells (named as TO-PI-), representing the background noise/debris. Thus, the physiological heterogeneity of the bacterial cells during the PP were described in terms of intact/viable, stressed/injured, and damaged cells. According to the used FCM kit (BD™ Cell Viability Kit), TO is a dye capable of staining all cells regardless of membrane damage. However, although the literature reports that TO enters all cells, from the results obtained in this study, it was observed that the TO probe tends to not enter dead cells or enter in small amount.

The composition of the subpopulations during the PP was established from the FCM data. Figure 9 shows representative fluorescence density dot plots of stained *S. Typhimurium* cells for each sampling time (t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{120} , t_{192} , and t_{216}) during the exposure to a stressful osmotic environment that led to the PP. In the results obtained by PCM, t_0 is the initial time after the exposure to the stressful osmotic environment; t_{24} corresponds to the time in which bacterial count decreases; t_{48} and t_{120} are the start and end times of the exponential phase, respectively; t_{192} and t_{216} time characterize the stationary phase. Different distributions for bacterial subpopulations were observed over time of exposure to the stressful osmotic environment. The results showed the emergence of the three subpopulations simultaneously,

localized in the gates Q1, Q2, and Q3, and described as: intact/viable, stressed/injured, and damaged.

Figure 9. CFM dot plots representing *S. Typhimurium* bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4)



The behavior of the three subpopulations during the PP presented changes over time of exposure to the stressful osmotic environment. Results obtained from the dot plots (FCM) showed that, in the initial sampling time ($t_0 = 6.27 \log \text{CFU/ml}$, Fig. 7), the injured/stressed subpopulation (Q2) showed a higher percentage (31.3%) than the intact/viable subpopulation (Q1, 18.8%) and the damaged subpopulation (Q3, 12.6%). This occurrence also was observed after 24 h of incubation, with 21.2%, 12.5%, and 12.6% for intact/viable (Q2), injured/stressed (Q1) and damaged subpopulations (Q3), respectively, but it was characterized by the decrease in the bacterial concentration ($t_{24} = 3.78 \text{ CFU/ml}$, Fig.7).

In the following sampling time, at the start of the exponential phase ($t_{48} = 4.32 \log \text{CFU/ml}$, Fig. 7), a predominance (46.7%) of the intact/viable subpopulation (Q1) was observed, followed by the damaged (Q3, 29.3%) and stressed/injured (Q2, 20.4%) subpopulations. In the following sampling times (t_{120} , t_{192} , and t_{216}), during the stationary

phase (averaged bacterial concentration = 6.59 log CFU/ml, Fig. 7), the intact/viable cells (Q1) remain the main subpopulation (averaged percentage = 50.0%), and the stressed/injured subpopulation (Q2) remains unchanged (averaged percentage = 18.0%). However, the damaged subpopulation (Q3) showed differences in these three sampling times. After 120 h of exposure ($t120$), a low percentage of a damaged cells (8.23%) was observed than in the following times ($t192$ and $t216$) (averaged percentage = 25.0%).

Aspridou et al. (2018) used *time-lapse microscopy* method to monitor the behavior of *Salmonella enterica* Agona individual cells in solid laboratory medium (tryptone soy agar) with various salt concentrations (0.5%, 3.5%, 4.5% and 5.7% NaCl). The authors reported that, under severe osmotic stress conditions, three subpopulations were observed simultaneously, composed of growth, survival, and death cells, leading to a total population behavior known as PP. This affirmation agreed with the results observed in the present study.

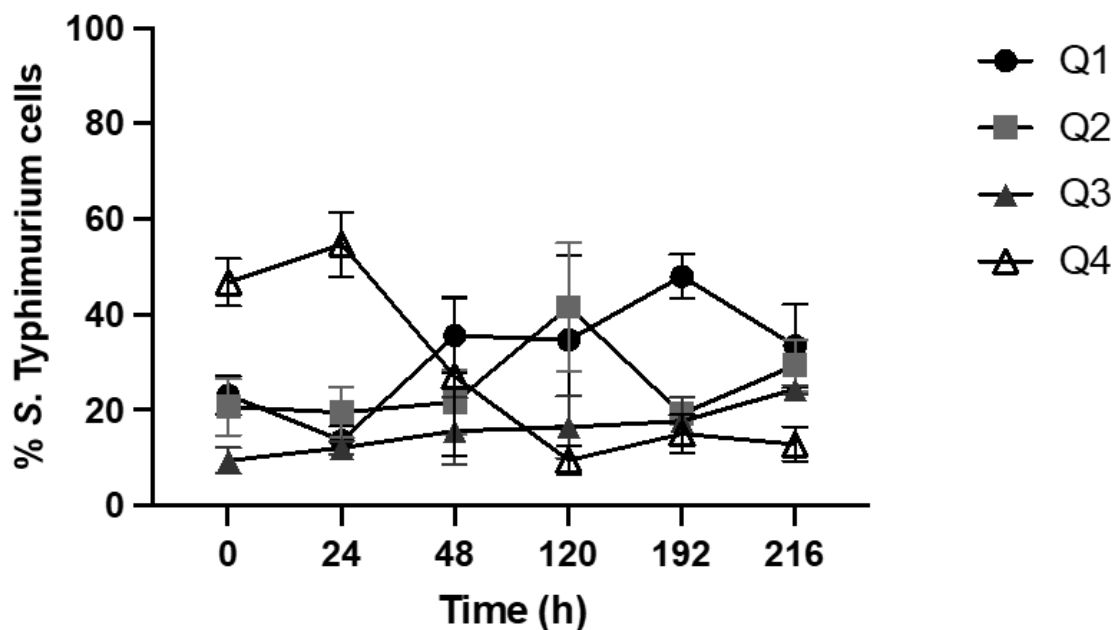
The behavior of *S. Typhimurium* during the PP obtained by FCM confirmed the presence of three subpopulations and, furthermore, showed that the heterogeneous profile of the subpopulations during the PP. The results found by the FCM add more relevant information than the response obtained by PCM. FCM clearly showed cell subpopulations in each quadrant during bacterial concentration decrease, growth recovery, and stationary phase. However, in the initial sampling time ($t0$) and, mainly, after 24 h of incubation ($t24$), which is characterized by a maximum decrease in bacterial concentration, a high percentage of unstained cells (Q4) was observed.

The bacterial response to osmotic stresses can be described by the intracellular accumulation of compatible solutes that act as osmolytes, reducing intracellular water loss by osmosis (WOOD et al., 2001). Under conditions of injury or sublethal stress, cellular changes may occur, where morphological and functional components will be damaged or affected, such as the cell wall, inner membrane, cytoplasmic membrane, numerous enzymes, and nucleic acids. TO is a permeant probe that can enter all cells, to varying degrees of intensity, irrespective of membrane integrity, binding to nucleic acids (DNA or RNA), while PI is an impermeant membrane nucleic acid probe that only penetrates cells with damaged membranes (SINGH; BARNARD, 2021). Surowsky et al. (2014) suggested that a lack of TO and PI fluorescence may indicate damage to DNA and RNA while the cell membrane remains intact. It is possible that the same thing happened in the sampling intervals $t0$ and $t24$.

Another form for showing the subpopulations instead of the quadrants (Figure 9) is a graph of cell percentage over exposure to the stressful osmotic environment in the Q1, Q2, Q3, and Q4 quadrants, referring to TO+PI-, TO+PI+, TO-PI+, and TO-PI-, respectively (Figure 10).

The FCM analyses were performed in triplicate (ADDITIONAL INFORMATION 4.5), and standard deviations are presented. From t_0 to t_{24} sampling times, Q1 showed a decrease followed by an increase (t_{48} , t_{120} , and t_{192}), and the stationary phase was characterized again by a decrease. Q2 showed an increase followed by a decrease. Q3 showed an increase followed by a period of unchanged percentage, and then a percentage increase.

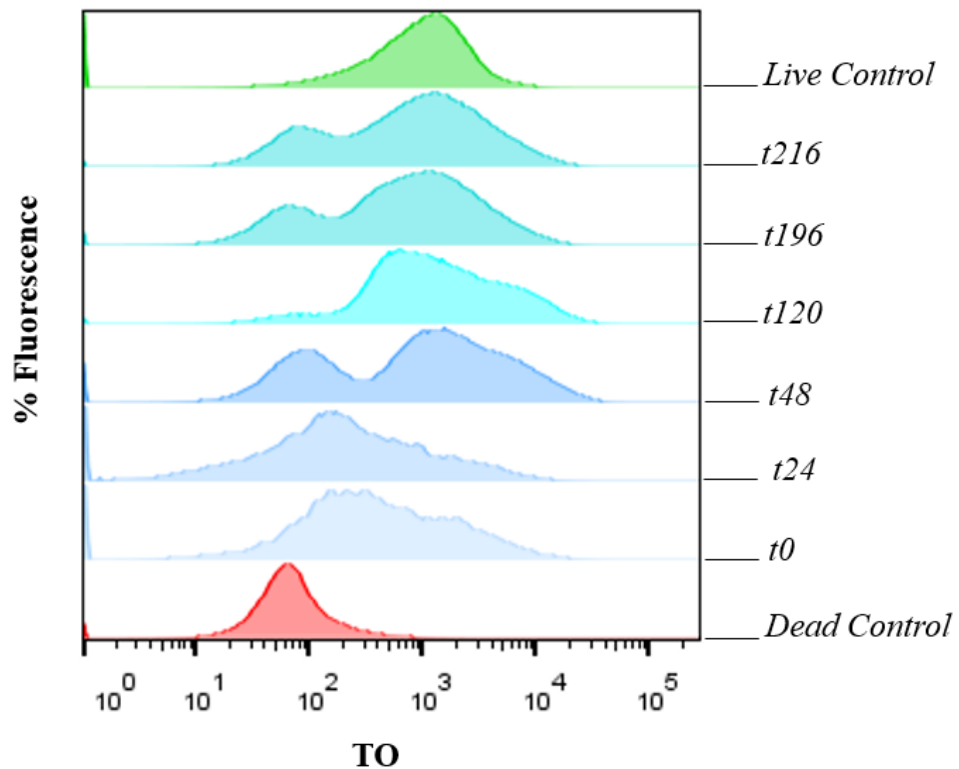
Figure 10. Percentage of *S. Typhimurium* cells during the PP based on FCM and TO/PI differential staining. The stained population in each quadrant are presented. Q1 (TO+PI-), Q2 (TO+PI+), Q3 (TO-PI+) and, Q4 (TO-PI-). Symbols with error bars (e.g., \bar{x}) represent the data average value and respective standard deviation due to triplicates.



The percent decrease in Q1 and percent increase in Q2 at the end of the stationary phase can be explained by the fact that, when entering the stationary phase, the number of cells still increasing while the metabolic activity is often decreasing. Usually, in the late stationary phase, there are a lot of cells, but the overall metabolic activity is low (BRAISSANT et al., 2020).

Figure 11 shows the graph of the fluorescence intensity of the TO probe for *S. Typhimurium* cells exposed to the stressful osmotic environment over the PP and for untreated live and dead control cells. The TO's fluorescence intensity in each sampling time (t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{120} , t_{192} , and t_{216}) are showed. From the analysis of these results, it was considered that, when *S. Typhimurium* cells died, TO tends to not enter dead cells or enter in small amount. For the analysis performed, the equipment was set in 10^2 for the TO probe. Thus, the permeation with TO occurs only above 10^2 . Dead control in Figure 11 shows that the cells were not stained because the fluorescence intensity peak is below 10^2 .

Figure 11. Fluorescence spectra of *S. Typhimurium* cells stained with TO probe during the PP. The sampling interval (t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{120} , t_{196} and, t_{216}) and live and dead control are showed.



Comparing each sampling time with the controls (live and dead), the samples t_0 and t_{24} showed a higher fluorescence intensity localized in an intermediate region, between the area of higher fluorescence intensity of the live and dead controls (10^2 and 10^3). This result suggests that the higher population would be composed of stressed/injured cells. At t_{48} , it is possible to observe two fluorescence peaks, the lowest peak of fluorescence located between 10^1 and 10^2 and the highest located near the live cells control 10^3 and 10^4 . The time interval t_{48} , corresponding to the PP stage characterized by start exponential growth, the results suggest the existence of intact/viable and smaller damaged subpopulations. At the following three sampling times (t_{120} , t_{192} , and t_{216}), when *S. Typhimurium* end exponential growth and reaches the stationary phase, two peaks were observed; the highest is in the same region as the live cell controls, and the lower are in the dead region, leading to the conclusion that most bacterial cells are in the same state as the live control cells.

During the PP, the stressed/injured physiological state appeared to be temporary, progressively changing to the state of damaged/dead or viable/intact. According to Singh et al.

(2021), when bacterial cells are in a stressed state, the bacteria can still recover. Bacterial cells can recover from partial cell damage due to stress and return to the viable/intact state, but if the membrane is permanently damaged, cells death will occur.

From flow cytometry data, it is possible to suppose that the stressed/injured cell population may have cellular metabolic activity, but due to the nucleic acid or membrane damage, these cells are not cultivable on plate count agar. This occurrence can only be demonstrated after further investigation, which can include an analysis of the unmarked and stressed/injured subpopulations that make up the total population leading to the PP of *S. Typhimurium*. A possible method is the flow cytometry with cell sorting, which can sort these different populations and recover them for additional investigation. This could be a way to confirm the state of unlabeled and stressed/injured bacterial populations.

Measurement of cell particles by FCM using fluorescent probes allowed the detection of viable and intact bacterial cells that may or may not maintain membrane integrity. FCM provided valuable insights into the heterogeneity of microbial subpopulations that make up the total population resulting in the PP.

4.4 CONCLUSION

In this study, we investigated the physiological heterogeneity and the viability of *S. Typhimurium* exposed to stressful osmotic environments during the PP. The behavior termed as PP was confirmed by PCM. FCM was an appropriate tool for the determination of bacterial physiological states of the subpopulations of *S. Typhimurium*, during PP. According to the results, there was the emergence of the three subpopulations simultaneously defined as intact/viable, stressed/injured, and damaged that presented changes over time of exposure to the osmotic environment. In the initial phase, corresponding to the decrease of bacterial concentration characteristic of PP, the results showed a high percentage of stressed/injured cells. After this period, the PP stage in which growth recovery occurs, an increase in viable/intact subpopulation was observed. Our results proved the high heterogeneity and complexity in the behavior of microbial populations in stressful and osmotic environments. These conditions are common in foods and the combination of fluorescent probes with FCM enabled a good understanding of the physiological status of stressed bacteria cells of *S. Typhimurium* during the PP and can contribute to food safety.

4.5 ADDITIONAL INFORMATION

The Figures 4.5.1 e 4.5.2 presented the CFM dot plots representing *S. Typhimurium* bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).

Figure. 4.5.1. CFM dot plots representing *S. Typhimurium* bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).

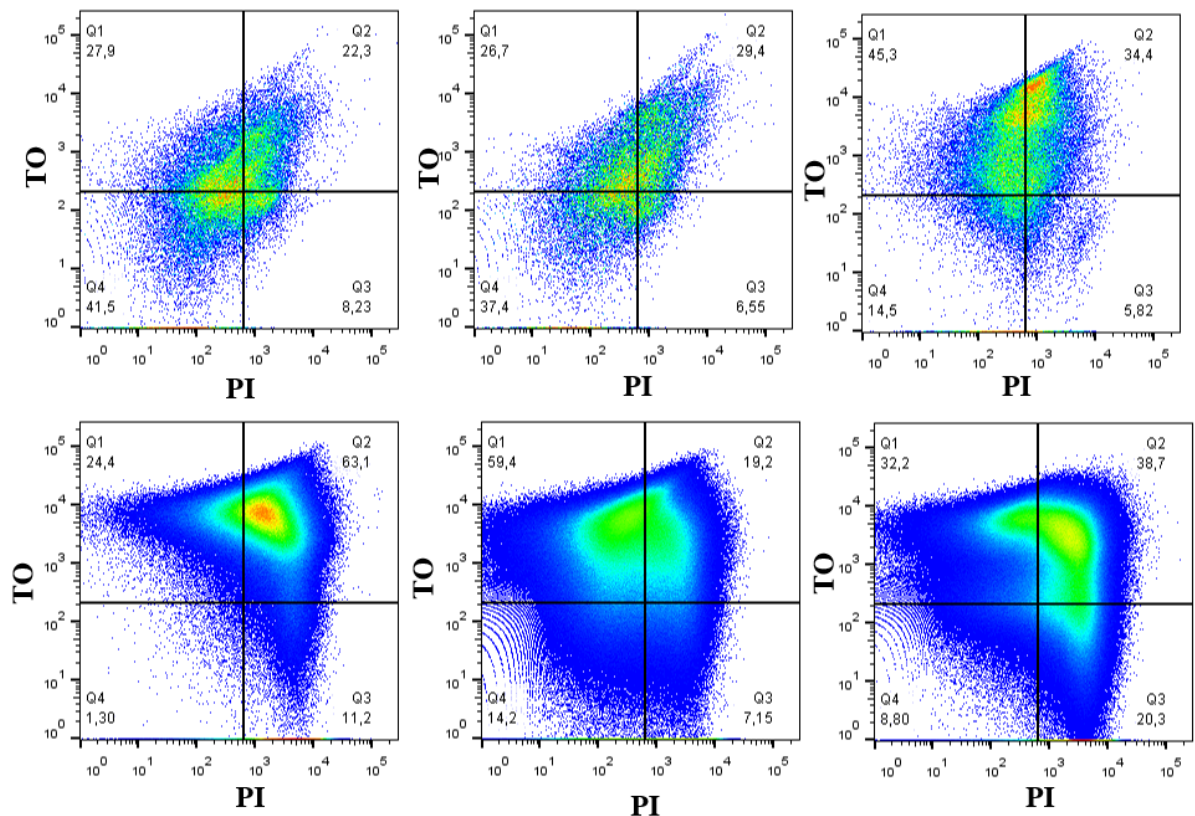
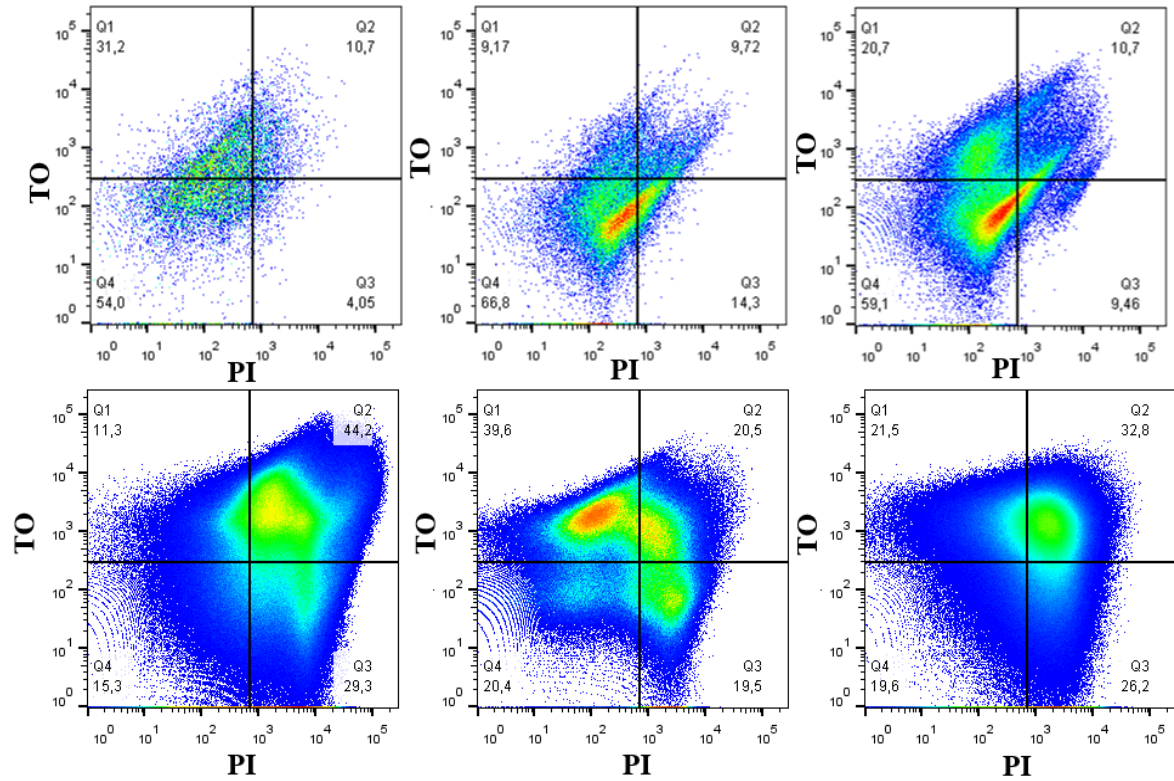


Figure. 4.5.2 CFM dot plots representing *S. Typhimurium* bacterial cells' exposure to an osmotic environment during PP. The x-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of PI (FL3). The y-axis indicates the logarithmic fluorescence intensity of TO (FL1). Four quadrants (sub-populations) are defined as: intact/viable subpopulations (Q1), stressed/injured subpopulations (Q2), damaged cells subpopulations (Q3), and unstained cells (Q4).



CAPÍTULO 5

5 EFEITO DA ADAPTAÇÃO OSMÓTICA (FENÔMENO FÊNIX) DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA ENTERICA*, NA RESISTÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA (UV-C).

O Capítulo 5 apresenta a avaliação e modelagem matemática das cinéticas de inativação por irradiação UV-C de sorotipos de *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota), destacando a possibilidade de alteração dos parâmetros do modelo devido à exposição ao estresse osmótico ao longo da ocorrência do Fenômeno Fênix.

Este capítulo será submetido a uma revista internacional e está apresentado a seguir:

Effect of osmotic adaptation (Phoenix Phenomenon) of Salmonella enterica serotypes, on ultraviolet (UV-C) lighth resistance.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of osmotic adaptation of *Salmonella enterica* serotypes, the so-called Phoenix Phenomenon (PP), on ultraviolet (UV-C) irradiation resistance. Cells of *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota serotypes) were individually inoculated in a stressful osmotic environment (SOE) in BHI broth added NaCl ($a_w = 0.950$) at 25 °C, for obtaining the kinetic curves of the PP. The effect of the osmotic stress adaptation on the UV-C inactivation of *S. enterica* serotypes was performed from cell collected in three different times: t_0 (collected after a short exposure to SOE), t^* (collected after the PP, long exposure to SOE), and *Control* (not exposed to SOE, for results comparison). UV-C inactivation was carried out under constant irradiance of 6.5 W/m² in different pre-determined fluence. Weibull and log-linear with shoulder models were fitted to the UV-C inactivation responses. Both models were suitable to describe the inactivation data as a function of UV-C fluence to all tested conditions, although the log-linear with shoulder model fitted better. Bacterial cells of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* osmotically stressed after the PP (t^*) were most resistant to the application of UV-C irradiation, which presented higher S_l and lower k_{max} values than other samples tested (t_0 and *Control*). The exception was *S. Enteritidis*, which the *Control* sample was the most resistant to the application of UV-C irradiation. The results suggest that previous exposure of the bacterial cells to OSE leads to increased resistance to subsequent application of UV-C treatment. These findings provide appropriate information, close to the real conditions found during food processing, contributing to the improvement of UV-C inactivation processing safety.

KEYWORDS: osmotic stress environment; microbial inactivation; predictive microbiology; non-thermal processing.

5.1 INTRODUCTION

Salmonella spp. are some of the most common agents of foodborne illness in the world, and their relevance as responsible for foodborne outbreaks is well known. Previous studies reported that *Salmonella* spp. has skilled in adapting, growing, and surviving in a diverse range of stressful environments, coping with the stresses present in natural, commercial, and host environments (LIM; HA, 2021; SPECTOR; KENYON, 2012). Serotypes of *S. enterica* have been reported by their ability to adapt rapidly to osmotic environments. Studies show that in osmotic stress conditions, *S. enterica* serotypes presented cell count decreases, followed by a period of unchanged count with further exponential growth, called Phoenix Phenomenon (PP) (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2005; ZHOU et al., 2011; PAGANINI et al., 2022), representing a risk for the food industry.

The UV-C technology is proposed as an alternative to thermal treatments for microbial decontamination of food, causing less impact on food properties while ensuring its quality. (POSSAS et al., 2018). This technology is considered relatively simple, affordable, and effective in rendering finished products safe and shelf-life stable. The exposure of the microbial cells to UV-C rays leads to physicochemical changes in genetic materials, so inactivation occurs (ESTILO; GABRIEL, 2017). Several studies have demonstrated that UV-C irradiation inactivates a wide range of microorganisms related to food contamination and spoilage with high efficiency in broth and various food products (CONDÓN-ABANTO et al., 2016; ESTILO; GABRIEL, 2017; GUILLÉN et al., 2020; MENEZES et al., 2020). However, the exposure of pathogenic bacteria to stressful conditions could result in increased resistance to inactivation technologies, as UV-C irradiation, i.e., bacterial inactivation may be influenced by conditions to which the bacteria have been exposed before treatment applied (MELO et al., 2017; SIRSAT et al., 2011).

During food processing, bacteria are exposed to various stresses at all levels, which could induce adaptive mechanisms toward the processing technology that was supposed to inactivate them (ESTILO; GABRIEL, 2017). There is a lack of previous studies about microbial resistance to inactivation processes of different serotypes that have suffered previous stresses. Studies are necessary to understand bacterial behavior and assist the design of more efficient inactivation processes that ensure food safety throughout the food chain, helping to improve the accuracy of quantitative microbial risk assessments. Mainly searches investigating the effect of osmotic adaptation, so-called PP, that is characterized by an initial reduction in bacterial cell concentration, followed by a period that the bacterial concentration remained in a constant

interval (plateau), and then, exponential growth resumes (PAGANINI et al., 2022), on the inactivation of *S. enterica* serotypes by UV-C irradiation. To the best of our knowledge, the present study is the first to investigate the effect of osmotic adaptation, the so-called PP, on the inactivation of *S. enterica* serotypes by UV-C irradiation.

Several predictive models are available and can be used to describe microbial behavior. Mathematic models that describe the growth, survival, or inactivation kinetics of microorganisms are tools that can help in the understanding of the influence of a variety of conditions that should be taken into consideration for process improvement and food safety (POSSAS et al., 2018). A primary model to describe the PP was proposed, following the supposition that the total microbial count is the sum of two subpopulations, inactivating and surviving-then-growing (PAGANINI et al., 2022). In the literature, other authors show the effectiveness of using inactivation models to describe microbial behavior by applying UV-C technology. Among the inactivation models, the Weibull and log-linear with shoulder models have been successfully applied to describe the inactivation of microorganisms by UV-C irradiation (MENEZES et al., 2020; POSSAS et al., 2018; SORO et al., 2021).

The objective of this study was to evaluate and model the effect of osmotic adaptation, along the PP, on the kinetics of inactivation by UV-C irradiation (6.5 W/m^2) of *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota).

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Bacterial strains and inoculum preparation

Four strains of *Salmonella enterica* were selected. *S. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. Enteritidis* ATCC 13046, the most common serotypes of *S. enterica* associated with many human infections worldwide and widely studied, and *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* obtained from a poultry processing plant (Santa Catarina, Brazil) (PAGANINI et al., 2022). All strains were kept in Eppendorf tubes containing Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi, Brazil) growth medium supplemented with 30% (v/v) glycerol and stored at $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ until needed.

Before each experiment, aliquots of 100 μl from each bacterial stock culture were added in 10 ml of BHI growth medium. Then, for reaching the desired growth phase (according to previous studies, performed with plate counts and turbidity measurements), the incubation procedures were carried out: 14 h (*S. Enteritidis*), 10 h (*S. Typhimurium*), and 9 h (*S. Minnesota*

and *S. Heidelberg*) at 25 °C to obtain exponential growth phase inoculum (E25) (Paganini et al., 2022).

5.2.2 Experimental bacterial kinetics under osmotic condition – Phoenix Phenomenon

From the inoculum at a concentration of approximately 10^7 CFU/ml, an aliquot of 1 ml was transferred to 100 ml of pre-warmed (25 °C) BHI broth medium, reaching an initial bacterial concentration of around 10^5 CFU/ml and pH 7.2. BHI broth medium was previously added of the appropriate amount of NaCl, about 7.0 % NaCl to obtain $a_w = 0.950$, which was verified by an a_w -meter (Aqualab. model SERIES 3TE. Decagon Devices. USA). The bacterial count was carried out at predetermined time intervals. Then, 1 ml of the bacterial suspension was removed from each sample and serially diluted in peptone water solution (0.1%). Aliquots of 100 μ from the appropriate serial decimal dilution were surface plated on BHI agar. Plates were incubated by 24 h at 35 °C for counting. The incubation time of the plates was based on previous studies that showed that there was no difference in the count after 24 hours. In this study, the detection limit used was 10 to 250 colonies. All kinetics experiments were performed at 25 °C in duplicate.

5.2.3 Sample preparation for UV-C inactivation

Three samples from different times were used to study the UV-C irradiation: *Control*, t_0 , and t^* . Two samples (t_0 and t^*) were exposed to the osmotic stressful conditions ($a_w = 0.950$), and were collected in pre-determined experimental times (based on previous studies): t_0 immediately treated after exposure to osmotic stress medium (bacterial concentration around 10^5 CFU/ml); and t^* after 120 h for *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Typhimurium*, and after 96 h for *S. Minnesota* of exposure to osmotic stress medium (bacteria returned to the exponential growth after the Phoenix Phenomenon, around 10^5 CFU/ml). From the samples described in item 5.2.2 for each serotype evaluated, 30 ml of t_0 samples were transferred to Petri dishes; and 3 ml of t^* samples were transferred to Petri dishes containing 30 ml of BHI medium. This procedure was performed to ensure the same transmittance as the other samples evaluated, insured by spectrophotometer (BIOSPECTRO, Spectrophotometer SP-220). The *Control* sample was prepared for further comparison, when 3 ml of the respective inoculum suspensions, at a concentration of 10^7 CFU/ml, was added to 297 ml of BHI broth at 25 °C, achieving a

bacterial concentration of 10^5 CFU/ml, from of the control samples 30 ml were transferred to Petri dishes.

5.2.4 UV-C inactivation kinetics

For the UV-C inactivation, a UV-C chamber (75x70x45 cm), with five germicidal lamps, three of 15 W (TUV 15W/G15T8, Philips, Holland) and two of 32 W (Dulux HNS L23W, OSRAM, Germany) with radiation peak at 254 nm wavelength, was used. The samples were continuously stirred with a magnetic agitator (IKA, BIG SQUID White) while were irradiated. The tested UV-C irradiance (intensity) was measured by a UV-VIS radiometer (DELTA OHM HD 2302.0, Italy) placed at the same position from the UV lamp to the plates.

The microbial inactivation was carried out under constant irradiance of 6.5 W/m^2 . The UV lamp was switched on for about 30 min before the UV-C treatments to minimize irradiance fluctuations. Each fluency F (KJ/m^2) was calculated as a function of the time t (0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 min) and the irradiance I (6.5 W/m^2), according to Equation 5.1.

$$F = \frac{(60.t.I)}{1000} \quad (5.1)$$

During the UV-C inactivation treatments, 1 ml of the bacterial suspension was removed from each sample per time interval (0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 min), then subjected to serial dilutions in 0.1% (w/v) sterile buffered peptone water. Aliquots of 100 μl from the appropriate serial decimal dilution were surface plated on BHI agar. The plates were incubated at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. Plates with 25 to 250 colonies were used for obtaining the inactivation data. Duplicates of each treatment were performed, and the results were expressed as mean (CFU/mL) \pm standard deviations (SD).

5.2.5 Mathematical modeling

5.2.5.1 Inactivation Models - UV-C inactivation

Weibull (MAFART et al., 2001) and log-linear with shoulder (GEERAERD; HERREMANS; VAN IMPE, 2000) models were fitted to the inactivation data (t_0 and t^*) of *S. enterica* serotypes. The experimental data were transformed to logarithmic microbial survival ratio ($\log(N/N_0)$), in which N is the bacterial concentration (CFU/ml) after UV-C

treatment at a specific fluency F (KJ/m²), and N_0 (UFC/ml) is the initial bacterial concentration before the treatment.

Weibull model is shown in Equation 5.2, where δ (kJ/m²) is a scale factor called the time of first decimal reduction and p (dimensionless) is a shape parameter. $p < 1$ and $p > 1$ correspond to concave upwards and concave downwards survival curves, respectively, and $p = 1$ corresponds to the simple first-order linear model.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{d}{\delta}\right)^p \quad (5.2)$$

Log-linear with shoulder model is shown in Equation 3, where k_{max} (m²/kJ) is the first order rate of inactivation, and S_l (kJ/m²) is the parameter of shoulder length.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{k_{max}F}{(e^{k_{max}S_l}-1)(e^{-k_{max}t})+1} \quad (5.3)$$

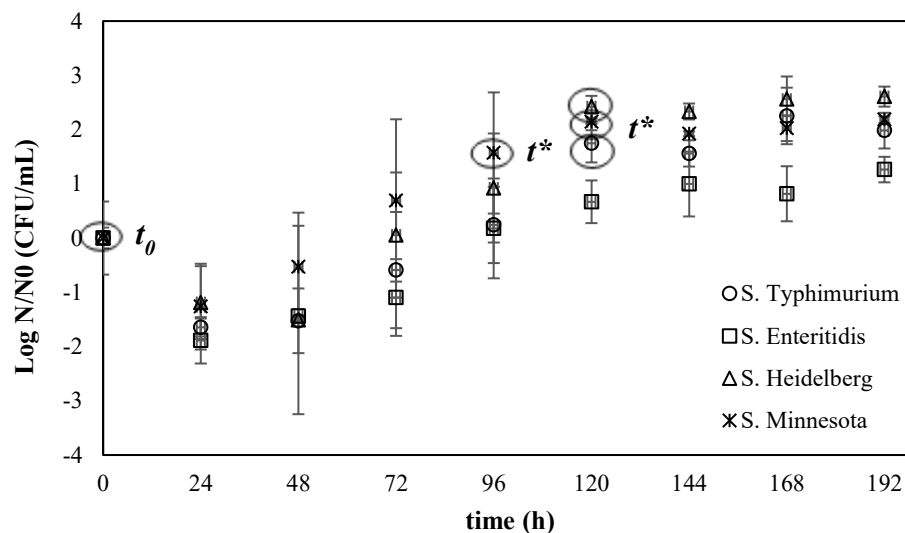
Equations (5.2) and (5.3) were fitted to the experimental data with the non-linear least-squares method (trust-region algorithm, curve fitting toolbox, Matlab R2013a, MathWorks®, Natick, USA) estimating the model parameters and their 95% confidence intervals. Each model performance was assessed with the residue analysis and the goodness-of-fit indices root-mean-squared error ($RMSE$) and adjusted coefficient of determination (R_{adj}^2), which were obtained from the output of the Matlab curve fitting toolbox.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 Experimental bacterial kinetics under osmotic condition – Phoenix Phenomenon

The kinetics experimental cell counts of the four serotypes of *S. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, and Minnesota) into the BHI medium with $a_w = 0.950$, incubated at 25 °C, are shown in Figure 12. All serotypes tested showed an initial cell count decrease after the inoculation from close to 5.0 log CFU/ml to 3.0-3.5 log CFU/ml in bacterial cell concentration. Then, an exponential growth phase was observed until the stationary phase. This behavior is known as the PP.

Figure 12. Experimental cell counts (symbols) of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* serotypes incubated at 25 °C in BHI broth ($a_w = 0.950$) from the exponential phase inoculum at 25 °C. The circles represent the experimental point of sample collecting (t_0 and t^*) during the Phoenix Phenomenon for UV-C inactivation.

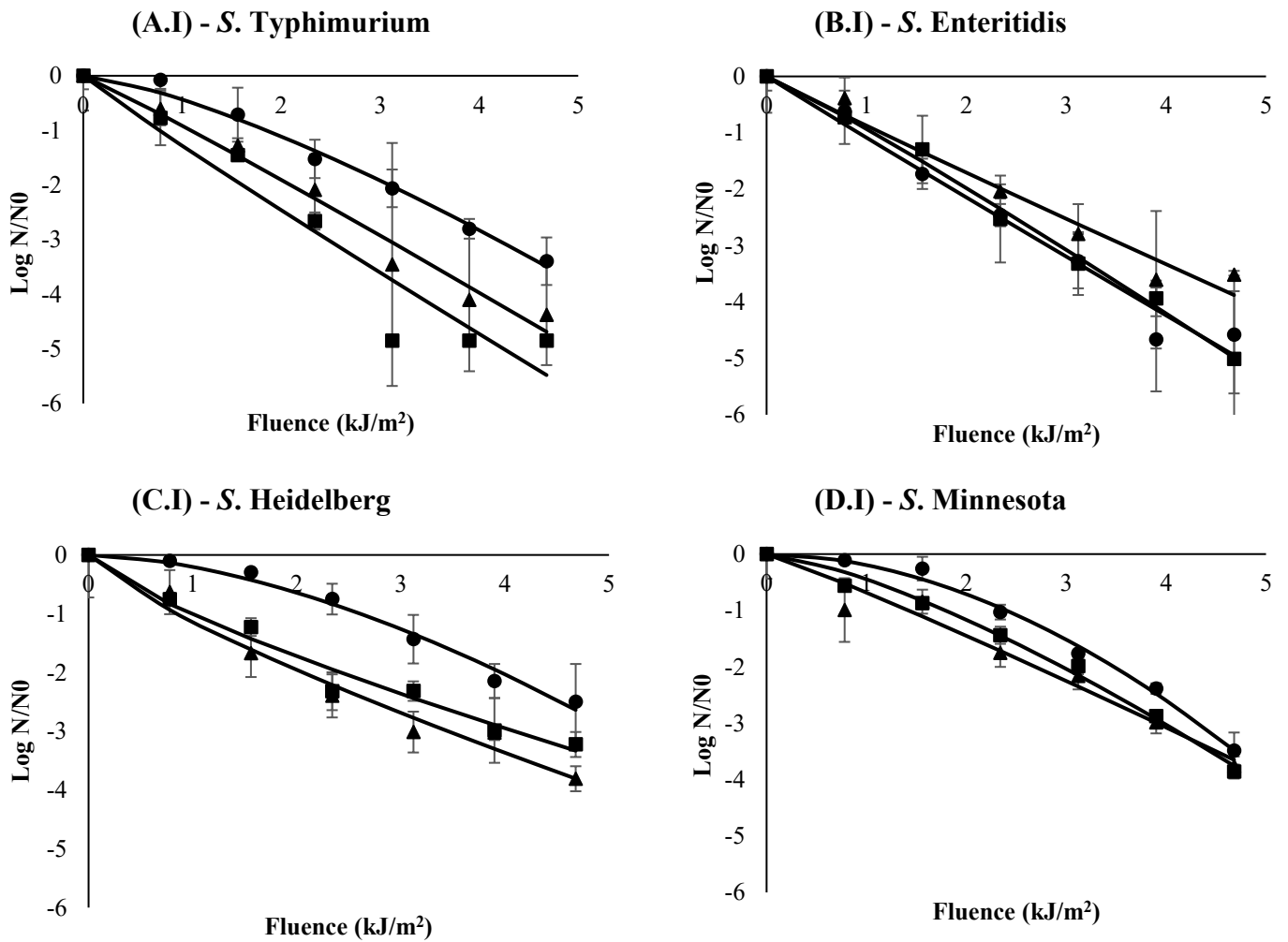


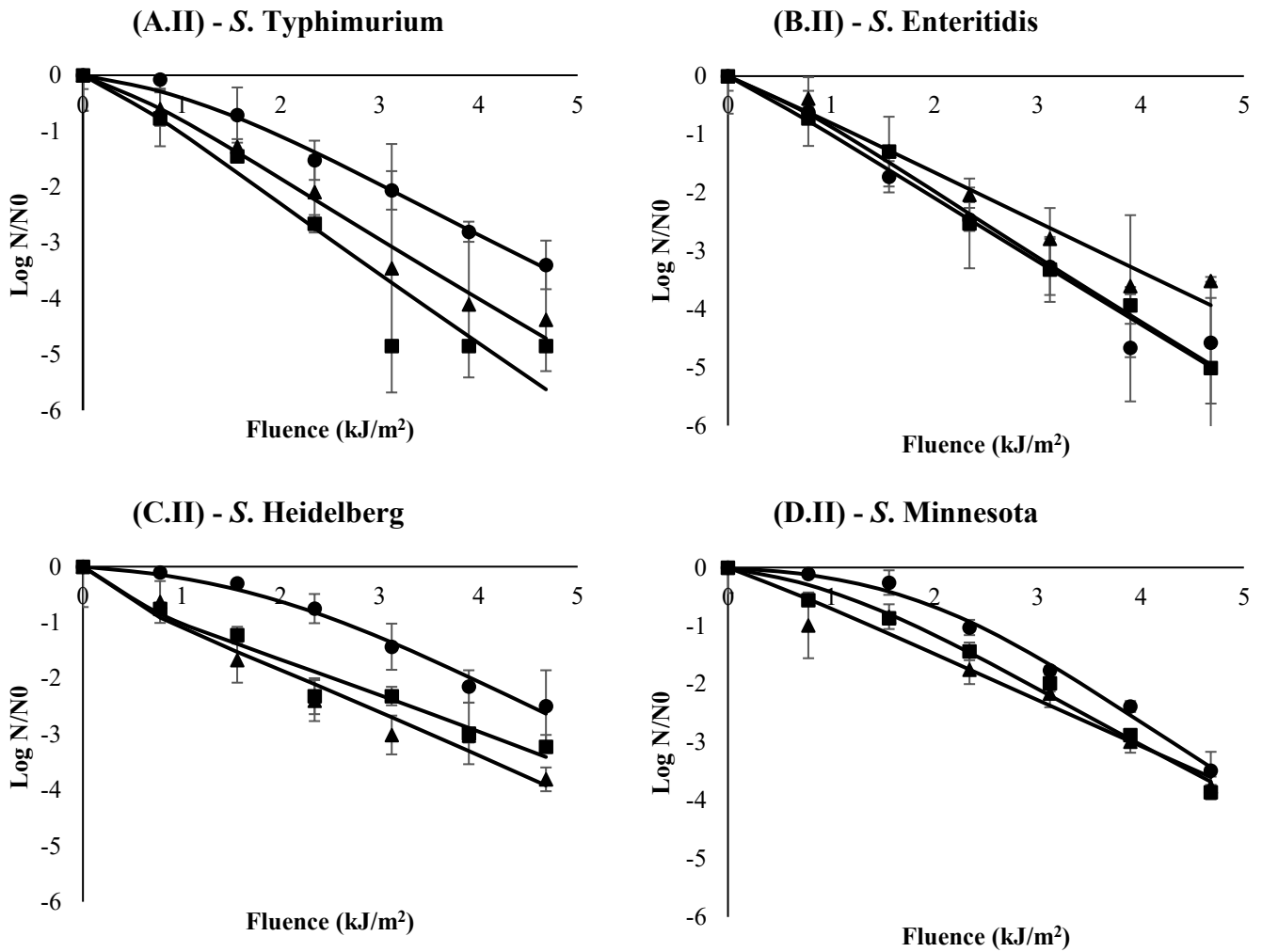
Although all serotypes presented the PP, differences in the responses of serotypes exposed to a stressful osmotic environment were observed. Paganini et al. (2022) showed that *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* serotypes had a better ability to adapt to the applied osmotic stress than *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. A hypothesis to explain the difference in the resistance of the serotypes studied would be the origin of the strains. *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* were obtained from a culture collection, while *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* were obtained from a poultry processing plant.

5.3.2 UV-C inactivation kinetics

Figure 13 shows the UV-C experimental data of the inactivation of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* exposed, t_0 (initial phase of the PP, after 5min exposure) and t^* (start exponential phase, during PP) and not exposed (*Control*) to previous osmotic conditions in BHI broth and the fitting of the Weibull and log-linear with shoulder models. The application of the UV-C irradiation showed good levels of inactivation at the highest applied Fluence (4.68 kJ/m²) for all tested serotypes. The cells reduction levels increased with the increasing of UV-C irradiation Fluence. However, differences in resistance to the UV-C irradiation between the serotypes and the samples evaluated (exposure and no exposure at previous osmotic stress) were observed.

Figure 13. Experimental data (symbols) of *S. Typhimurium* (A), *S. Enteritidis* (B), *S. Heidelberg* (C), and *S. Minnesota* (D) serotypes inactivation in BHI (log N/N₀) exposed to UV-C irradiance (6.5 W/m²) as a function of the fluency (kJ/m²). Sample t_0 (■) after exposure to the stressful osmotic environment, t^* (●) when bacterial cells returned to exponential growth, and *Control* (▲) not exposed to osmotic stress. The lines represent the fitting of the Weibull model (I) and log linear shoulder model (II) to the data. Error bars correspond to the duplicate of each measurement.





The goodness-of-fit of the Weibull and log-linear with shoulder models are shown in Table 5 and the residue analysis in Figure 14. Differences in the ability of the models to fit the inactivation responses of *S. enterica* serotypes were small. For both evaluated models, the R_{adj}^2 values were always close to one, and the $RMSE$ values were close to zero, which indicates a good model fit for the data. The Weibull model presented the best fit only to the inactivation data of *S. Enteritidis* (*Control*) and *S. Heidelberg* (*Control* and t_0). The log-linear with shoulder model showed the best values of statistical indices for most of the tested samples. From the residue analysis, the log-linear with shoulder model confirmed better fits to the inactivation experimental data of *S. enterica* by UV-C irradiation for most of the tested samples in this study. Thus, the log-linear with shoulder model was chosen to evaluate the inactivation results obtained in the study.

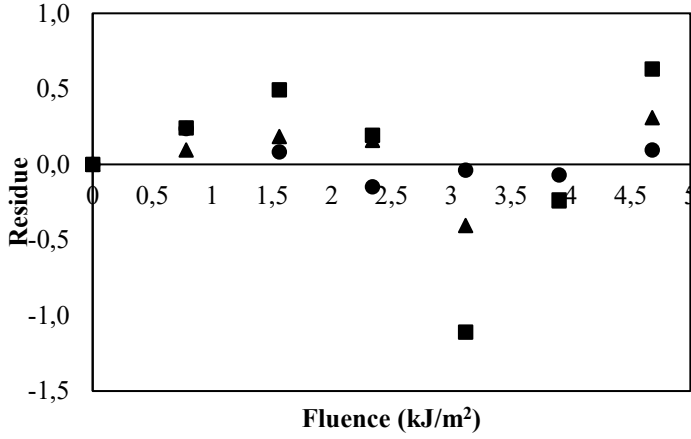
Table 5 - Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the Log-linear Shoulder models to the inactivation data of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* and *S. Minnesota* osmotic adapted and no adapted (Sample t_0 (after exposure to the stressful osmotic environment), t^* (when bacterial cells resumed exponential growth), and Control (not exposed to osmotic stress)) exposed to UV-C irradiance (6.5 W/m^2) as a function of the fluency (kJ/m^2) and the statistical indices.

Serotypes/	Time-point	Model	Models Parameters				Statistics Indexes	
			S_l	k_{max}	δ	p	RMSE (log CFU/ml)	R^2_{adj}
<i>S. Typhimurium</i>	Control	Log Linear	0.526 (± 1.170)	1.013 (± 0.109)			0.258	0.978
		Weibull			1.088 (± 0.397)	1.059 (± 0.308)	0.278	0.975
	t_0	Log Linear	0.333 (± 2.561)	1.204 (± 0.248)			0.635	0.908
		Weibull			0,769 (± 0.698)	0.942 (± 0.544)	0.636	0.908
	t^*	Log Linear	1.417 (± 0.688)	0.779 (± 0.0702)			0.123	0.991
		Weibull			1.847 (± 0.286)	1.345 (± 0.277)	0.142	0.988
<i>S. Enteritidis</i>	Control	Log Linear	0.119 (± 1.745)	0.842 (± 0.126)			0.278	0.963
		Weibull			1.148 (± 0.481)	0.964 (± 0.341)	0.277	0.964
	t_0	Log Linear	0.456 (± 0.635)	1.063 (± 0.060)			0.144	0.994
		Weibull			1.069 (± 0.203)	1.088 (± 0.162)	0.152	0.993
	t^*	Log Linear	0.153 (± 1.494)	1.068 (± 0.124)			0.307	0.972
		Weibull			0.920	0.9824	0.310	0.971

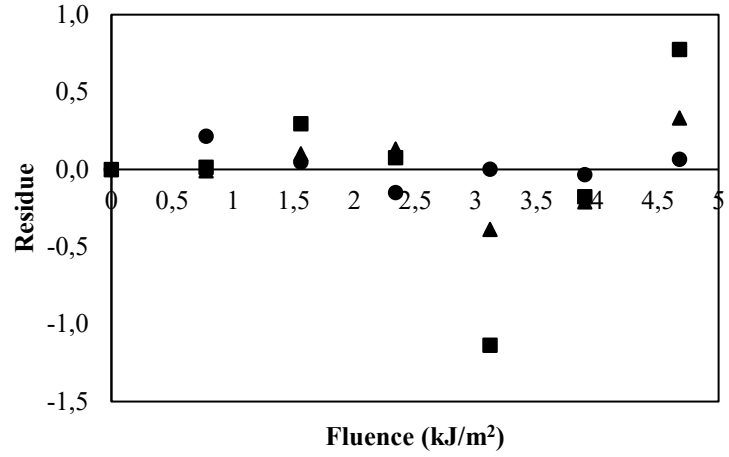
S. Heidelberg	Control	Log Linear	-0.992 (±2.474)	0.827 (±0.117)	(±0.399)	(±0.304)	0.274	0.961
		Weibull			0.851 (±0.382)	0,7841 (±0.244)	0.230	0.972
	t0	Log Linear	-1.273 (±2.495)	0.713 (±0.106)			0.234	0.962
		Weibull			0.986 (±0.413)	0.774 (±0.249)	0.208	0.970
	t*	Log Linear	2.512 (±0.817)	0.670 (±0.102)			0.120	0.986
		Weibull			2.609 (±0.314)	1.659 (±0.414)	0.134	0.982
S. Minnesota	Control	Log Linear	0.241 (±1.455)	0.773 (±0.350)			0.268	0.958
		Weibull			1.427 (±0.058)	1.090 (±0.277)	0.261	0.960
	t0	Log Linear	1.405 (±1.489)	0.822 (±0.630)			0.177	0.983
		Weibull			1.788 (±0.321)	1.375 (±0.111)	0.141	0.989
	t*	Log Linear	2.624 (±0.519)	0.848 (±0.001)			0.118	0.992
		Weibull			2,399 (±0.266)	1,866 (±0.255)	0.116	0.992

Figure 14, Residue analysis. Sample t_0 (■) after exposure to the stressful osmotic environment, t^* (●) when bacterial cells resumed exponential growth, and *Control* (▲) not exposed to osmotic stress.

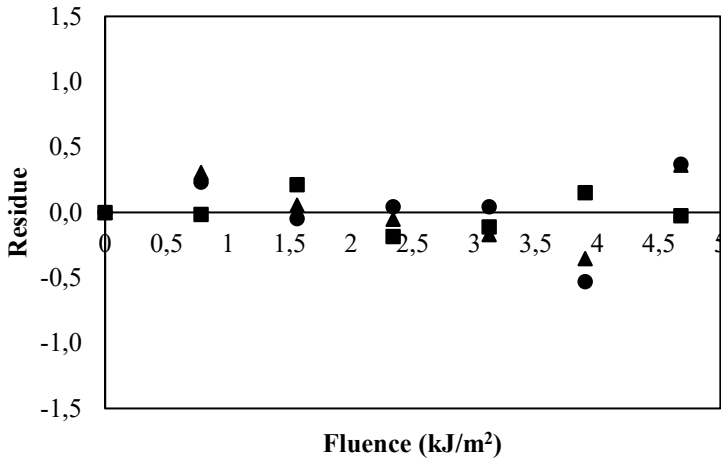
***S. Typhimurium* – Weibull - Eq. (5.2)**



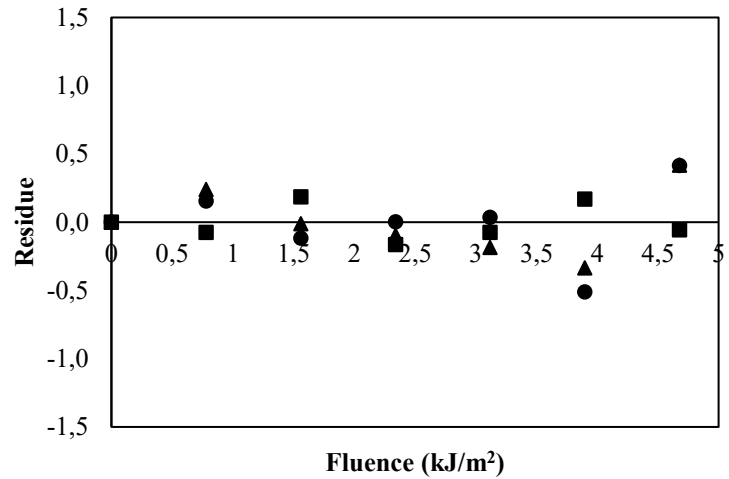
***S. Typhimurium* – Log- Linear –Shoulder - Eq. (5.3)**



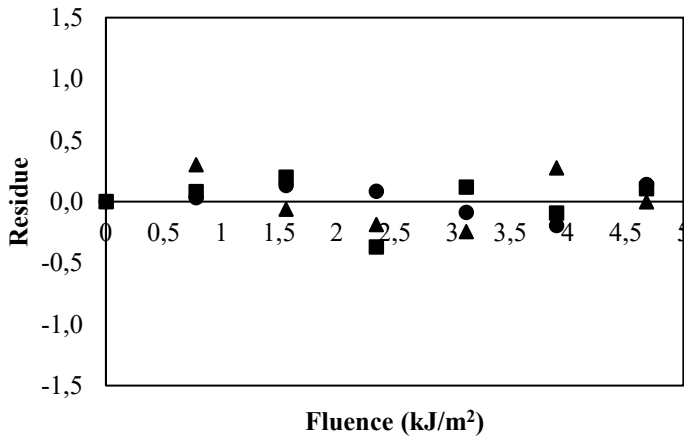
***S. Enteritidis* – Weibull - Eq. (5.2)**



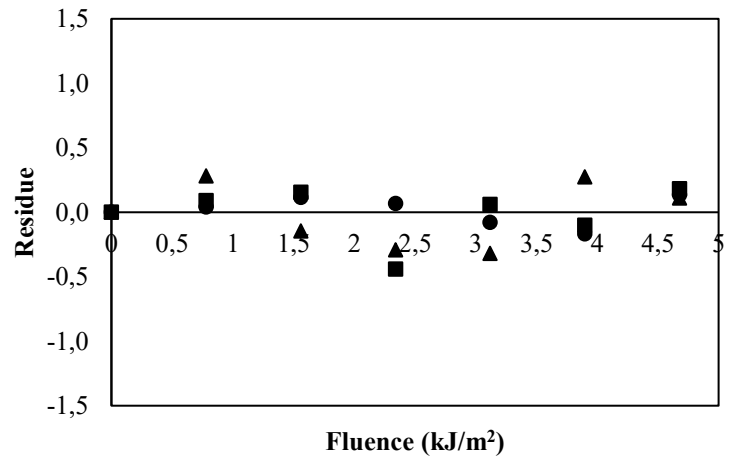
***S. Enteritidis* – Log- Linear –Shoulder - Eq. (5.3)**

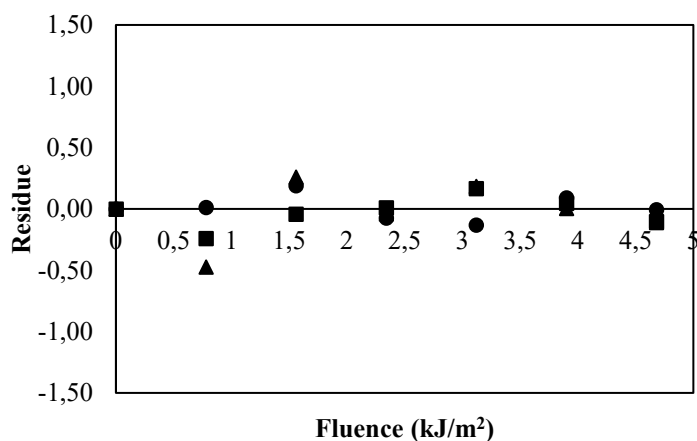
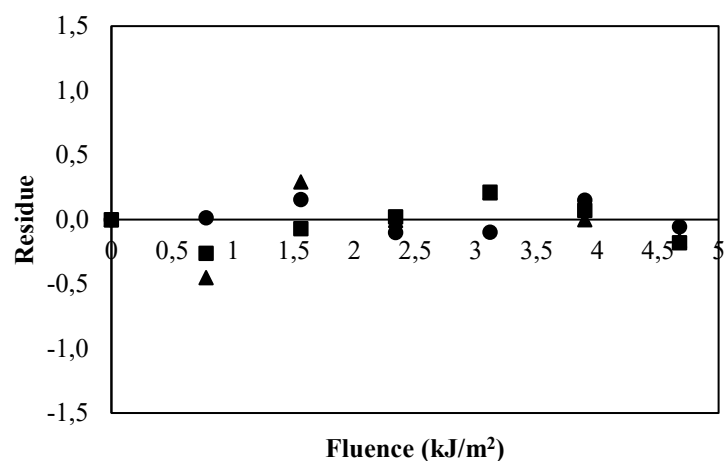


***S. Heidelberg* – Weibull - Eq. (5.2)**



***S. Heidelberg* – Log- Linear – Shoulder - Eq. (5.3)**



S. Minnesota – Weibull - Eq. (5.2)**S. Minnesota – Log- Linear –Shoulder - Eq. (5.3)**

The t^* samples of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* serotypes presented the highest resistance to the application of UV-C treatment among the samples tested, requiring a higher Fluence for inactivation than t_0 and *Control* samples. The *Control* sample of *S. Enteritidis* serotype was more resistant than the other studied samples (t_0 and t^*), but little difference was observed. In this study, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* serotypes were most sensitive to the application of UV-C irradiation than *S. Heidelberg* and *S. Minnesota*. The same tendency was observed for exposure to the osmotic environment during the PP, agreeing with the results reported by Paganini et al., 2022.

The UV-C resistance may vary with the species and even with the strain (LÓPEZ et al., 2005; SOMMER et al., 2000). Gayán et al. (2012) showed that variation to UV light susceptibility was observed among the tested *S. enterica* strains. The 4D (intensity required to achieve four decimal reductions) values ranged from 18.03 J/ml for *S. Typhimurium* STCC 878 to 12.75 J/ml for the *S. Enteritidis*. Gabriel and Nakano (2009) reported that *S. Enteritidis* was less resistant than *S. Typhimurium* in phosphate-buffered saline (PBS) buffer to the UV-C irradiation treatment.

The parameters obtained by the fitting of the Weibull and log-linear with shoulder models are shown in Table 5. The t^* samples of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* showed higher values of the S_l parameter and lower values of the k_{max} parameter than t_0 and *Control* samples, except for *S. Enteritidis* that higher S_l and lower k_{max} values were estimated for the t_0 sample. Then, the t^* samples of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* showed higher resistance to the application of UV-C irradiation Fluences than t_0 and *Control* samples. Thus, previous exposure to osmotic stress during the PP resulted in more

resistance to the UV-C irradiation treatment to *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota*.

According to Bernbom et al. (2011), *Listeria monocytogenes* exhibited enhanced UV-C survival in the presence of 5% NaCl in the suspending medium. The authors reported that it was not known whether the observed enhancement occurred due to physiological changes in the cells, physical protection in the food matrix, or a combination of both. In the current study, evidence showed that exposure to osmotic stress led to the highest survivability at UV-C irradiation for most of the serotypes evaluated.

Estilo and Gabriel (2017) studied the effects of prior exposures to stresses of gradual acidification (final pH 4.5), abrupt desiccation (a_w 0.960), or heat stress at 40 °C for 24 h on the subsequent UV-C inactivation rates of seven different strains of *S. enterica* in coconut liquid endosperm. The authors observed heterologous adaptive mechanisms after *S. enterica* cells were exposed to acid, acid + desiccation, heat, and acid + heat, with individual heat stress exposure, resulting in the significantly most UV-C resistant cells.

Studies about the effectiveness of UV-C irradiation against *S. enterica* serotypes previously adapted to osmotic stress are particularly scarce. In this study, the results showed that most of the osmotic adapted serotypes were highly resistant to the application of UV-C irradiation when compared to serotypes cultivated under optimal growth conditions. For this reason, such studies are necessary to improve the accuracy of quantitative microbial risk assessments and the development of more efficient inactivation processes and action plans throughout the food chain.

5.4 CONCLUSION

This is the first study to investigate the effect of osmotic adaptation during the PP on the resistance of pathogens to UV-C irradiation. The results showed that the application of UV-C irradiation was effective in the inactivation of all *S. enterica* serotypes studied. However, the osmotic adapted cells of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Minnesota* (during PP) were most resistant to UV-C irradiation than *Control* samples. In contrast, prior exposure to osmotic stress caused little influence on the resistance of *S. Enteritidis* to UV-C irradiation, with the control sample showing to be the most resistant to the application of UV-C irradiation. The Weibull and log-linear with shoulder models fitted well to the data, but the log-linear with shoulder model presented the best fits to the inactivation data. The results of this study indicate

that the resistance of *S. enterica* cells adapted at PP should be considered before of the application of UV-C irradiation in the food sterilization process.

6 CONCLUSÃO GERAL

As células de *S. Typhimurium* submetidas a um meio osmoticamente estressante ($a_w = 0,950$) e incubadas a 25 °C a partir de diferentes inóculos (fase estacionária ou exponencial e 25 ou 35 °C) apresentaram o Fenômeno Fênix. As células cultivadas a 25 °C, a partir do inóculo em fase exponencial, mostraram-se mais sensíveis ao estresse osmótico, com maior redução populacional nas primeiras horas de incubação e menor período de adaptação (fase lag). O modelo matemático proposto, que considera a curva resultante como a soma de duas subpopulações: inativando e sobrevivendo/crescendo descreveu o Fenômeno Fênix para todas as condições testadas.

Os quatro sorotipos de *S. enterica* inoculados em meios osmoticamente estressantes ($a_w = 0,940, 0,945, 0,950$ e $0,960$) e incubados a 25 °C apresentaram redução inicial na contagem de células viáveis. No entanto, quando incubados em meio de cultura com a_w de $0,950$ e $0,960$, a diminuição da contagem foi seguida por uma fase de crescimento até a atingir a população máxima, caracterizando o Fenômeno Fênix. Meios de cultura com a_w de $0,940$ e $0,945$ ocorreu completa inativação, sem a ocorrência do Fenômeno Fênix.

A heterogeneidade fisiológica e viabilidade das populações de *S. Typhimurium* adaptadas ao estresse osmótico durante o Fenômeno Fênix foram confirmadas pelas medidas utilizando citometria de fluxo em combinação com marcação fluorescente. Evidenciou-se a existência de três subpopulações simultaneamente, definidas como intactas/viáveis, estressadas/injuriadas e danificadas ao longo do cultivo de células com existência do Fenômeno Fênix. Observou-se que as subpopulações apresentaram alterações ao longo do tempo de exposição ao ambiente osmótico. A fase inicial foi caracterizada por um alto percentual de células estressadas/injuriadas. Na etapa após recuperação, houve crescimento da contagem em placas e um aumento da subpopulação viável/intacta que se manteve até a fase estacionária. Os resultados comprovaram a alta heterogeneidade e complexidade no comportamento das populações de *S. Typhimurium* em ambientes sob estresse osmótico ao longo do Fenômeno Fênix.

A partir do estudo da eficácia da irradiação UV-C na inativação de sorotipos de *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*) ao longo do crescimento, sobrevivência e inativação (Fenômeno Fênix), observou-se a irradiação UV-C como efetiva na inativação de todos os sorotipos de *S. enterica* estudados. No entanto, as células de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* ao longo do Fenômeno Fênix foram mais resistentes à irradiação UV-C do que as amostras controle (sem exposição ao estresse). A

exposição prévia ao estresse osmótico exerceu pouca diferença na resistência de *S. Enteritidis* à irradiação UV-C quando comparada à amostra controle. Os modelos Weibull e log-linear com ombro se ajustaram bem aos dados, sendo o modelo log-linear com ombro o que apresentou os melhores ajustes aos dados de inativação.

O comportamento de *S. enterica*, denominado como Fenômeno Fênix, representa um perigo relevante para a indústria de alimentos. Essa situação pode levar a uma superestimação da inibição aos tratamentos ou à falha na detecção da presença de patógenos, durante o controle de qualidade de alimentos ou investigações de surtos. Os resultados obtidos nesse estudo trazem uma melhor elucidação e compreensão do comportamento de *S. enterica* em condições reais, contribuindo para estabelecimento de melhorias nas condições de processamento de alimentos.

6.1 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS:

Como trabalhos futuros para complementar os resultados obtidos na presente tese, sugere-se:

- Estudo de outros tipos de estresse que podem levar ao Fenômeno Fênix de *Salmonella enterica*.

- Investigação das subpopulações não marcadas e estressadas/injuriadas observadas durante o Fenômeno Fênix, a partir do método de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). Este método separa uma mistura heterogênea de células biológicas em dois ou mais recipientes, uma célula por vez, com base na dispersão de luz específica e nas características fluorescentes de cada célula. Desta maneira, seria possível realizar análises complementares para a confirmação de cada subpopulação.

7 REFERÊNCIAS

ABEE, T. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1–2, p. 65–91, 1999.

AGBAJE, M. et al. Evolution of *Salmonella* nomenclature: A critical note. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 6, p. 497–503, 2011.

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEON, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, n. August, p. 2–9, 2013.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 99–109, 2015.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 212–219, 2008.

ANTOLINOS, V. et al. Assessment of the of acid shock effect on viability of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* using flow cytometry. **Food Research International**, v. 66, p. 306–312, 2014.

ASPRIDOU, Z.; AKRITIDOU, T.; KOUTSOUMANIS, K. P. Simultaneous growth, survival and death: The trimodal behavior of *Salmonella* cells under osmotic stress giving rise to “Phoenix Phenomenon”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. February, p. 103–109, 2018.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277–294, 1994.

BEARSON, B. L. et al. Characterization of a multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg outbreak strain in commercial Turkeys: Colonization, transmission, and host transcriptional response. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, n. SEP, p. 1–7, 2017.

BERNBOM, N.; VOGEL, B. F.; GRAM, L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 69–73, 2011.

BEST, E. L. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: Comparison of isolates from pigs, poultry and cases of human gastroenteritis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p.

565–572, 2007.

BIGELOW, W. D. The logarithmic nature of thermal death time curves. **Journal of Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 528–536, 1921.

BIGELOW, W. D.; ESTY, J. R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 602–617, 1920.

BOOTH, I. R. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 19–30, 2002.

BRAISSANT, O. et al. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 1–25, 2020.

BRANDS, D. A. **Deadly diseases and epidemics *Salmonella***. Oklahoma, United States: Chealsea House Publishers, 2005.

BRASÃO, S. C. et al. Characterization and control of biofilms of *Salmonella* Minnesota of poultry origin. **Food Bioscience**, v. 39, p. 100811, 2021.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465–2467, 2000.

BRONOWSKI, C.; WINSTANLEY, C. Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella* Heidelberg: Research letter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, n. 1, p. 29–36, 2009.

BURGESS, C. M. et al. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 37–53, 2016.

CEBRIÁN, G. et al. Bacterial maximum non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations of different water activity depressing solutes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 67–74, 2014.

CHEN, S. et al. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 345–356, 2012.

COLLEE, J. G.; KNOWLDEN, J. A.; HOBBS, B. C. Studies on the growth, sporulation and carriage of *Clostridium welchii* with special reference to food poisoning strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 24, n. 3, p. 326–339, 1961.

CONDÓN-ABANTO, S. et al. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Lactobacillus plantarum* by UV-C light in flour powder. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 35, p. 1–8, 2016.

CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1–16, 2010.

DEBLAIS, L. et al. Comparative genomic studies of *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken- and Turkey-associated farm environmental samples. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–11, 2018.

DEMCZUK, W. et al. Phage-based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4279–4284, 2003.

DEWI, G. et al. Effect of lemongrass essential oil against multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg and its attachment to chicken skin and meat. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101116, 2021.

DÍAZ, M. et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 385–407, 2010.

DONADO-GODOY, P. et al. Molecular characterization of *Salmonella* Paratyphi B dT+ and *Salmonella* Heidelberg from poultry and retail chicken meat in colombia by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 802–807, 2015.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4 TH ed. Washington, USA: ASM Press Washington, DC 20036, 2013.

DUFRENNE, J. et al. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 89–94, 1997.

EDWARDS, P. R.; BRUNER, D. W. Two new *Salmonella* types isolated from fowls. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 716–720, 1938.

ESTILO, E. E. C.; GABRIEL, A. A. Previous stress exposures influence subsequent UV-C resistance of *Salmonella enterica* in coconut liquid endosperm. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 139–147, 2017.

ETTER, A. J. et al. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress tolerance capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 16, 2019.

FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. How *Salmonella* survive against the odds. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 145–174, 1995.

FREITAS, J. Evolution of sorovars strain bank model (in Portuguese). In **Proceedings of the Seminário Internacional Sobre Salmonelose Aviária**, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria*

monocytogenes in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 443–446, 2009.

GAYÁN, E. et al. Inactivation of *Salmonella enterica* by UV-C light alone and in combination with mild temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8353–8361, 2012.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 185–209, 2000.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 95–105, 2005.

GÓMEZ-BALTAZAR, A. et al. Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Food Microbiology**, v. 82, n. January, p. 303–315, 2019.

GOSPAVIC, R., et al. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* ssp. in poultry under variable temperature conditions. **Int J Food Microbiol**, v.127, 290 – 297, 2008.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Who collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. **Institut Pasteur**, v. 9th editio, p. 1–166, 2007.

GUEDES, J. P. DE S.; DE SOUZA, E. L. Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. **Food Microbiology**, v. 76, p. 564–571, 2018.

GUILLÉN, S. et al. Differences in resistance to different environmental stresses and non-thermal food preservation technologies among *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains. **Food Research International**, v. 132, n. January, p. 109042, 2020.

HAMEED, S.; XIE, L.; YING, Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. July, p. 61–73, 2018.

HOEFEL, D. et al. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: A comparison to culture-based techniques. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 585–597, 2003.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal Salmonellosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 263–269, 2006.

HUANG, L. IPMP 2013 - A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 100–107, 2014.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JAKOČIUNE, D. et al. Effects of environmental conditions on growth and survival of *Salmonella* in pasteurized whole egg. **International Journal of Food Microbiology**, v. 184, p. 27–30, 2014.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 th ed. New York, USA: Science+Business Media. Inc, 2005.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 96–108, 2013.

KAHVYA, R. et al. Emerging non-thermal technologies for decontamination of *Salmonella* in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, n. April, p. 400–418, 2021.

KANG, I. B. et al. Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis under prolonged exposure to acid-salt combined stress and subsequent refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. August, p. 165–172, 2018.

KEYSER, M. et al. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 3, p. 348–354, 2008.

KOO, S.-P.; BOOTH, I. R. Quantitative analysis of growth stimulation by glycine betaine in *Salmonella* Typhimurium. **Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 617–621, 1994.

KOUTCHMA, T. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 2, p. 138–155, 2009.

KOUTSOUMANIS, K. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 116–121, 2008.

LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, n. May 2017, p. 60–73, 2018.

LAURINDO, J.B.; Carciofi, B.A.M.; Monteiro, R.L.; Link, J.V. Multi-flash drying to produce dried and crisp foods. **Drying technologies for foods: fundamentals and applications: part III**, Arun S. Mujumdar, 2018.

LEBERT, I.; LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behaviour during food

processing using an integrated modelling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 6, p. 968–984, 2006.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 828–837, 2011.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–178, 2012.

LIM, J. S.; HA, J. W. Effect of acid adaptation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to X-ray irradiation in apple juice. **Food Control**, v. 120, n. June 2020, p. 107489, 2021.

LLOYD, D.; HAYES, A. J. Vigour, vitality and viability of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, n. 1–2, p. 1–7, 1995.

LONGIN, C. et al. Application of flow cytometry to wine microorganisms. **Food Microbiology**, v. 62, p. 221–231, 2017.

LÓPEZ, P. et al. Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939–6946, 2005.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **Acta Horticulturae**, v. 566, p. 107–114, 2001.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Food Safety**, v. 50, p. 882–889, 2010.

MATTICK, K. L. et al. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 at low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1274–1279, 2000.

MCDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1–2, p. 1–27, 1999.

MELLEFONT, L. A.; KOCHARUNCHITT, C.; ROSS, T. Microbiology Combined effect of chilling and desiccation on survival of *Escherichia coli* suggests a transient loss of culturability. **International Journal of Food Microbiology**, v. 208, p. 1–10, 2015.

MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 281–293, 2003.

MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of physiologically distinct populations of *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 111–120, 2004.

MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella* Typhimurium M48 subjected to abrupt osmotic shifts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 399–410, 2005.

MELO, A. N. F. DE et al. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 15–23, 2017.

MENEZES, N. M. C. et al. Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV-C light. **International Journal of Food Microbiology**, v. 296, n. November 2018, p. 43–47, 2019.

MENEZES, N. M. C. et al. Modeling the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, p. 108773, 2020.

Ministério da Saúde do Brasil, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/copy_of_apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view.

MILKIEVICZ, T. et al. Development of a general model to describe *Salmonella* spp. growth in chicken meat subjected to different temperature profiles. **Food Control**, v. 112, p. 107151, 2020.

MILKIEVICZ, T. et al. Modeling *Salmonella* spp. inactivation in chicken meat subjected to isothermal and non-isothermal temperature profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 344, n. December 2020, 2021.

MUÑOZ-CUEVAS, M. et al. Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2908–2915, 2010.

MUÑOZ-CUEVAS, M.; METRIS, A.; BARANYI, J. Predictive modelling of *Salmonella*: From cell cycle measurements to e-models. **FRIN**, v. 45, n. 2, p. 852–862, 2012.

NOVIYANTI, F. et al. Predictive Modeling for the Growth of *Salmonella* Enteritidis. v. 15, n. 7, p. 1–7, 2018.

PAGANINI, C.C. et al. Modelling the inactivation, survival and growth of *Salmonella* enterica under osmotic stress considering inoculum phase and serotype. **Journal Applied Microbiology**, v.132, n.5, p. 3973-3986, 2022.

PANDIT, V. A.; SHELEF, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 57–63, 1994.

PAPHITIS, K. et al. A case–case study comparing the individual risk factors and symptomatology of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in Ontario in 2015, following implementation of the Ontario Investigation Tools. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 5, p. 484–495, 2020.

PELEG, M. Microbial survival curves - The reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 531–538, 2000.

PIN, C. et al. Modelling *Salmonella* concentration throughout the pork supply chain by considering growth and survival in fluctuating conditions of temperature, pH and a_w . **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. S96–S102, 2011.

PODOLAK, R. et al. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 10, p. 1919–1936, 2010.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 173–174, 2003.

POSSAS, A. et al. Influence of temperature on the inactivation kinetics of *Salmonella* Enteritidis by the application of UV-C technology in soymilk. **Food Control**, v. 94, p. 132–139, 2018.

PUI, C. F. et al. *Salmonella*: A foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 2, p. 465–473, 2011.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. Food safety - *Salmonella* update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, p. 0–1, 2019.

RANJBARAN, M., CARCIOFI, B.A.M. & Datta, A.K. Engineering modeling frameworks for microbial food safety at various scales. **Food Science and Food Safety**, v.20, p. 4213–4249, 2021.

RANDO, O. J.; VERSTREPEN, K. J. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 655–668, 2007.

RHODES, M. W.; KATOR, H. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp . in Estuarine Environmentst. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2902–2907, 1988.

RITTER, A. C. et al. Genome analysis reveals insights into high-resistance and virulence of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, n. July, p. 108269, 2019.

SHAH, D. H. et al. Microbiology and food safety: Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Poultry Science**, v. 96, n. 3, p. 687–702, 2017.

SHIRODA, M. et al. RpoS impacts the lag phase of *Salmonella enterica* during osmotic stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 357, n. 2, p. 195–200, 2014.

SHOEMAKER, S. P.; PIERSON, M. D. " Phoenix Phenomenon " in the Growth of *Clostridium perfringens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 803–807, 1976.

SIBANDA, T.; BUYS, E. M. Resuscitation and growth kinetics of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* strains following fluorescence activated cell sorting (FACS). **Food Research International**, v. 100, n. April, p. 150–158, 2017.

SINGH, A.; BARNARD, T. G. Adaptations in the physiological heterogeneity and viability of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Salmonella* Typhimurium, after exposure to simulated gastric acid fluid. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. November, p. 378–384, 2017.

SINGH, A.; BARNARD, T. G. A. Possible flow cytometry-based viability and vitality assessment protocol for pathogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 postexposure to simulated gastric fluid. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

SIRSAT, S. A. et al. Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 813–822, 2011.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 49–71, 2001.

SMET, C. et al. Influence of the growth morphology on the behavior of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* under osmotic stress. **Food Research International**, v. 77, p. 515–526, 2015.

SOMMER, R. et al. UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1015–1020, 2000.

SORO, A. B. et al. Modelling the effect of UV light at different wavelengths and treatment combinations on the inactivation of *Campylobacter jejuni*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 69, n. October 2020, p. 102626, 2021.

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

SU, L.-H.; CHIU, C.-H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung medical journal**, v. 30, n. 3, p. 210–9, 2006.

SUROWSKY, B. et al. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: inactivation kinetics and mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 63 - 71, 2014.

TIGANITAS, A. et al. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 104–112, 2009.

ULTEE, E. et al. **Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria**. *Advances in Microbial Physiology*, v. 74, 97-141, 2019.

VADASZ, P.; VADASZ, A. S. Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 257–275, 2005.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 2005.

VEAL, D. A. et al. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1–2, p. 191–210, 2000.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433–441, 2015.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology - a reply to K.R. Davey. **Food Microbiology**, v10, 175-177, 1993.

WILKINSON, M. G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, n. December 2017, p. 1–10, 2018.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of. **Am Soc Microbiol**, v. 69, n. 7, p. 3687–3694, 2003.

WOOD, J. M. et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 437–460, 2001.

YADAV, A. S. et al. Study on heat stress response in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis and its impact on their attachment to dressed broiler skin surface. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 2, p. 114–121, 2016.

ZHOU, K. et al. Lag phase of *Salmonella enterica* under osmotic stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1758–1762, 2011.

ZHOU, K. et al. Effect of periodic fluctuation in the osmotic environment on the adaptation of *Salmonella*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 298–302, 2012.